



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
LOS PRINCIPALES FACTORES DE
VIRULENCIA EN *Yersinia ruckeri*
AISLADAS DE TRUCHAS ARCOÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*) CULTIVADAS EN
JUNÍN Y LIMA.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

JOAN MANUEL SALDAÑA HERRERA

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

CO ASESOR

Dr. MV. Luis Antonio Llanco Albornoz

JURADO DE TESIS

DR. CARLOS MARTÍN SHIVA RAMAYONI

PRESIDENTE

MG. CHRISTIAN FELIX LUYO AVILA

VOCAL

MG. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mis padres, que siempre me apoyaron en cada paso que di en mi vida, enseñándome valores que me hacen ser la persona de hoy en día.

A mi novia Rocío, que está siempre alentándome y ahora me acompaña dándome amor y alegría.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, en primer lugar, por ser el apoyo espiritual en los momentos difíciles que se me presentan en la vida, por cuidarme y darme sabiduría en cada paso o decisión que doy.

A mi asesor Enrique Serrano, por su paciencia, su preocupación y dedicación a poder culminar esta investigación.

A mi coasesor Luis Llanco, que siempre estuvo pendiente y presto a aclarar las dudas que surgieron durante la elaboración de esta tesis.

A todos mis compañeros de mi promoción de la maestría de Sanidad Acuícola, por su amistad, por los momentos divertidos que hemos compartido durante el periodo que duró la misma.

Al programa de maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH y al financiamiento de CienciActiva de CONCYTEC.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

La realización de esta tesis para optar el grado de Maestro en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC, Convenio de Gestión N° 230-2015-FONDECYTDE- PROMOCIÓN 3.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA EN *Yersinia ruckeri* AISLADAS DE TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) CULTIVADAS EN JUNÍN Y LIMA.

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

- 1** aem.asm.org
Fuente de Internet 1%
- 2** L. Fernandez, I. Marquez, J. A. Guijarro.
"Identification of Specific In Vivo-Induced (ivi) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System", *Applied and Environmental Microbiology*, 2004
Publicación 1%
- 3** Rothenbacher, Francesca P, and Jun Zhu.
"Efficient responses to host and bacterial signals during *Vibrio cholerae* colonization", *Gut Microbes*, 2014.
Publicación 1%
- 4** www.frontiersin.org
Fuente de Internet 1%
- 5** www.digsfish.com
Fuente de Internet

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
1.2	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	8
II.	OBJETIVOS.....	10
2.1.	Objetivo general.....	10
2.2.	Objetivos específicos.....	10
III.	HIPÓTESIS	11
IV.	MARCO TEÓRICO	12
4.1.	<i>Yersinia ruckeri</i>	12
4.2.	Trasmisión y epidemiología.....	14
4.3.	Ruta de entrada y diseminación	15
4.4.	Patogenicidad.....	16
4.5.	Factores de virulencia de <i>Y. ruckeri</i>	17
4.5.1.	Toxinas extracelulares.....	17
4.5.2.	Mecanismos de regulación y expresión genética.....	18
V.	METODOLOGÍA.....	21
5.1.	Lugar de estudio.....	21
5.2.	Tipo de estudio.....	21
5.3.	Criterios de inclusión y exclusión.....	21
5.4.	Tamaño de muestra.....	21
5.5.	Procedimientos y técnicas.....	22
5.5.1.	Recolección y procesamiento de muestras y datos.....	22
5.5.2.	Extracción de ADN.....	23
5.5.3.	Diseño de primers.....	23
5.5.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	24
5.6.	Consideraciones éticas.....	25
5.7.	Plan de análisis de datos.....	26

VI.	RESULTADOS.....	28
6.1.	Detección por PCR de la presencia de genes de virulencia.....	28
6.1.1.	Perfiles de las cepas de <i>Y. ruckeri</i> según la presencia de genes de virulencia.....	34
VII.	DISCUSIÓN.....	36
VIII.	CONCLUSIONES.....	48
IX.	RECOMENDACIONES.....	49
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMEN

La Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es la especie acuícola que ha tenido un crecimiento sostenible en los últimos años en el Perú, pero presenta desafíos en contra de su productividad, como son las enfermedades de origen bacteriano, dentro de las cuales se puede observar la yersiniosis, cuyo agente causal es la *Yersinia ruckeri*, una de las enfermedades más prevalentes dentro de la truchicultura peruana. En el presente estudio se detectó la presencia de 7 genes que están asociados a la virulencia en 52 cepas patogénicas confirmadas bioquímica y molecularmente, provenientes de 4 centros acuícolas de las regiones de Junín y Lima. Se detectó la presencia de los 7 genes analizados con un patrón variable. Las 52 cepas analizadas fueron para los genes estudiados, siendo el gen *uvrY* (98%) el más frecuente, seguido de los genes *yrpA* (96%), *barA* (92%), *yhlA* (92%). El gen *yrpB* (27%) fue el menos frecuente. Se encontró 9 perfiles de las cepas de *Y. ruckeri* según la detección de genes de virulencia, lo cual sugiere la flexibilidad genómica de esta bacteria, no obstante, otros factores pudieron haber influido en la heterogeneidad de los datos obtenidos. La identificación de las frecuencias de las cepas que compartieron la mayor cantidad de determinantes de virulencia fue para *rucC+*, *yhlA+*, *yrp1+*, *yrpA+*, *barA+* y *uvrY+* que probablemente estarían afectando el cultivo de la trucha arcoíris. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas de *Y. ruckeri* aisladas de centros acuícolas de Junín y Lima, presentan locus genéticos que codifican para los principales factores de virulencia: proteasas, lipasas, hemolisinas y sideróforos.

PALABRAS CLAVES

Yersinia ruckeri, *Oncorhynchus mykiss*, genes asociados a virulencia.

ABSTRACT

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is the aquaculture species that has had sustainable growth in recent years in Perú, and presents challenges against its productivity, such as bacterial diseases, among which the yersiniosis, whose causative agent is *Yersinia ruckeri*, one of the most prevalent diseases in Peruvian trout farming. In the present study, the presence of 7 genes that are associated with virulence was detected in 52 biochemically and molecularly confirmed pathogenic strains, from 4 aquaculture centers in the Junín and Lima regions. The presence of the 7 genes analyzed with a variable pattern was detected. The 52 strains analyzed were for the genes studied, being the *uvrY* gene (98%) the most frequent, followed by the *yrpA* (96%), *barA* (92%), and *yh1A* (92%) genes. The *yrpB* gene (27%) was the least frequent. Nine profiles were found according to the detection of virulence genes, which suggests the genomic flexibility of this bacterium, however other factors may have influenced the heterogeneity of the data obtained. The identification of the frequencies of the strains that shared the greatest number of virulence determinants was for *rucC*₊, *yh1A*₊, *yrp1*₊, *yrpA*₊, *barA*₊ and *uvrY*₊ that were probably affecting the cultivation of rainbow trout. The results obtained show that the *Y. ruckeri* strains isolated from aquaculture centers in Junín and Lima present genetic loci that code for the main virulence factors: proteases, lipases, hemolysins and siderophores.

KEY WORDS

Yersinia ruckeri, *Oncorhynchus mykiss*, virulence-associated gene

I. INTRODUCCION

En los últimos años, la acuicultura se ha convertido en importante abastecedora de peces, mariscos y algas, principalmente destinadas al consumo humano directo. Actualmente, la biomasa obtenida iguala al de la pesca extractiva. Además, al poseer similares cualidades nutritivas, por su aporte de proteínas, grasas, vitaminas liposolubles, omega 3 y minerales (FAO, 2014), y tener mejores rendimientos comparativos (Bjorkli, 2002), hace que la acuicultura y el consumo per cápita de peces y mariscos tenga una tendencia hacia el aumento a nivel mundial (FAO, 2016).

La acuicultura en el Perú se ha incrementado en los últimos años, debido a esfuerzos de inversionistas privados, mejoras tecnológicas, apertura de mercados mundiales (tratados de libre comercio), así como la demanda mundial creciente de sus productos (MINAGRI, 2014). En el país, la especie íctica más cultivada es *Oncorhynchus mykiss*, conocido comúnmente como trucha arcoíris, donde la producción nacional aumentó 678% en los últimos 10 años y departamentos como Puno, Huancavelica y Junín tienen el 83%, 6% y 5% de la producción nacional, respectivamente. En estas regiones, la acuicultura se está convirtiendo en una gran alternativa para el desarrollo económico y social de su población y del país (PRODUCE, 2018).

La yersiniosis o enfermedad entérica de boca roja, es causada por la enterobacteria *Yersinia ruckeri*, cuyos brotes con altos grados de mortalidad y morbilidad se han convertido en un obstáculo importante para la expansión de la

acuicultura y hacen que tenga un impacto significativo en el desarrollo económico de muchos países (Horne, 1999). *Y. ruckeri* es una enterobacteria gran negativa, con forma de bastón, que se aisló por primera vez de *O. mykiss* en Hagerman, Valle de Idaho, EE. UU. (Ross *et al.*, 1966) y actualmente se encuentra en América del Norte y del Sur, Europa, Australia, Sudáfrica, Medio Oriente y China (Tobback *et al.*, 2007).

En el año 1998, se reportó por primera vez en nuestro país la ocurrencia de yersiniosis en truchas arcoíris procedentes de piscigranjas de Junín; posteriormente, se aisló esta bacteria de 34 piscifactorías del departamento de Junín en el año 2004 utilizando exámenes químicos (Bravo & Kojagura, 2004). En Puno se aisló, de una serie de piscigranjas de trucha arcoíris, *Y. ruckeri* (Palomino, 2009), mientras que en otro estudio se aisló y determinó que las cepas pertenecían al serotipo O1 subgrupo a (Sierralta, 2011). Los últimos doce años los episodios de mortalidad atribuidos a esta bacteria han sido cada vez más frecuentes en todas las regiones donde hay crianza de trucha arcoíris; sin embargo, son escasos los estudios realizados respecto a sus mecanismos moleculares de patogenicidad.

Se han descrito signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas por *Y. ruckeri* muy similares, tanto en infecciones naturales como en infecciones experimentales. Esta bacteria afecta a peces de todas las etapas, siendo su presentación aguda en alevines y larvas, y principalmente crónica en peces juveniles y adultos (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011).

La sintomatología clínica que muestran los peces infectados por *Y. ruckeri* son letargia, anorexia, dificultad para nadar, exoftalmia, nado cerca de la superficie

del agua, melanosis, abdomen abultado y heces blanquecinas o amarillentas (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011; Kumar *et al.*, 2015).

Algunas de las lesiones macroscópicas que más se han observado son hemorragias petequiales en ojos (hifema), estómago, músculo lateral, vejiga natatoria, branquias, aletas dorsales, ventrales y anales, así como hemorragias subcutáneas dentro y alrededor de la boca y garganta, las cuales le dan el nombre característico de Enfermedad de la boca roja. Asimismo, el hígado y el bazo presentan un aumento del tamaño (Buchmann *et al.*, 2003; Raida *et al.*, 2003; Avci y Birincioglu, 2005; Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010b).

Diferentes estudios han identificado los genes responsables por la codificación de factores de virulencia de *Y. ruckeri*, encontrándose que sus frecuencias varían según las condiciones ambientales y el origen geográfico del aislamiento (Fernández *et al.*, 2003, 2004, 2007). También se ha demostrado que varios productos extracelulares (ECP) reproducen los signos clínicos asociados con la forma hemorrágica de la enfermedad, cuando se inyectan experimentalmente en su huésped (Romalde & Toranzo, 1993). Se sabe que algunas de estas proteínas secretadas contribuyen a la virulencia, por ejemplo: la hemolisina Yh1A, similar al de *Serratia* y regulada por hierro, tiene actividad citolítica y hemolítica, y juega un rol en la patogenicidad de *Y. ruckeri*, es muy probable que esta acción esté muy relacionada con su actividad citopática y, quizás, con su contribución a la adquisición de hierro de las células huésped, esta hemolisina fue detectada por primera vez en cepas provenientes de España y Dinamarca (Fernández *et al.*, 2007); la metaloproteasa Yrp1, que también fue detectada inicialmente en cepas de España, es una proteasa importante para la virulencia de *Y. ruckeri*, facilita la colonización

e invasión de tejidos ya que tiene una amplia gama de blancos y es particularmente eficaz para degradar la fibronectina, la actina y la miosina, alterando la morfología de la membrana de las fibras musculares y la porosidad de los vasos sanguíneos (Fernández *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2003; Ryckaert *et al.*, 2010; Stevenson, 2010). La expresión de esta proteasa está relacionada con las condiciones medioambientales, así, las concentraciones bajas de carbono y nitrógeno inhiben su expresión (Wiens y Vallejo, 2010; Ryckaert *et al.*, 2010; Tobback *et al.*, 2010a), siendo también regulada por la osmolaridad y la temperatura del medio (Mendez *et al.*, 2010).

Además, en cepas aisladas de piscigranjas de Dinamarca y España, se demostró que los genes involucrados en el sistema de adquisición de hierro, como el de la ruckerbactina *rucC*, se expresan exponencialmente por la bacteria durante el proceso de infección en peces, y la obtención de hierro del medio ambiente es un requisito primordial del proceso de infección por *Y. ruckeri*. La inactivación del gen correspondiente llevó a un aumento de cien veces en la dosis letal 50 de la bacteria (Fernández, Márquez & Guijarro, 2004). Recientemente, se ha demostrado que *yypA* e *yypB* se inducen en el intestino de la trucha arcoíris y juegan un papel importante en el proceso de infección actuando como colagenasas, en cepas aisladas de España (Navais, 2014). Así mismo, se ha demostrado que el sistema de transducción de 2 componentes BarA-UvrY está relacionado a la producción de enzimas como superóxido dismutasa y catalasa, las cuales permiten a la bacteria invadir las células del huésped y resistir a la respuesta oxidativa del sistema inmune (Dahiya & Stevenson, 2010). Además, la presencia del plásmido pYR1, está asociada

con resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos (Fricke *et al.*, 2009; Welch *et al.*, 2007).

Algunos estudios confirman la presencia de genes de virulencia de cepas de *Y. ruckeri* aisladas de truchas con signos clínicos de yersiniosis como el estudio realizado en el noroeste de Alemania por Yidan H., 2014; que detectó la presencia de los genes de virulencia *yhlA*, *yhlB*, *rucC*, *rupG*, *yrpI*, *yrpDEF*, en dos biotipos 1 y 2 aislados de *Y. ruckeri*, usando PCR multiple, donde no hallaron diferencias significativas entre ambos biotipos.

Asimismo, un estudio realizado por Fernando M., 2020; identificó que una cepa aislada de *Y. ruckeri* en Perú presenta 4 genes relacionados a la adhesión y 13 secuencias codificadas asociadas a la invasión y resistencia intracelular, también se detectó 19 secuencias codificantes asociadas a sideróforos y metabolismo.

Son necesarias más investigaciones en nuestro país para identificar cuáles son los principales genes de virulencia que presentan las cepas que afectan a nuestra producción acuícola a fin de conocer y comprender los principales mecanismos patogénicos de *Y. ruckeri* durante el proceso infeccioso en el pez. La información generada puede ser utilizada para establecer mejores estrategias en futuros estudios para prevenir o tratar la enfermedad, como vacunas acordes a los patógenos que habitan en nuestro medio.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acuicultura en el Perú se ha incrementado en los últimos años, debido a esfuerzos de inversionistas privados, mejoras tecnológicas, apertura de mercados mundiales (tratados de libre comercio), así como la demanda mundial creciente de sus productos (MINAGRI, 2014). En el país, la especie íctica más cultivada es *Oncorhynchus mykiss*, conocido comúnmente como trucha arcoíris, donde la producción nacional aumentó 678% en los últimos 10 años y departamentos como Puno, Huancavelica y Junín tienen el 83%, 6% y 5% de la producción nacional, respectivamente. En estas regiones, la acuicultura se está convirtiendo en una gran alternativa para el desarrollo económico y social de su población y del país (PRODUCE, 2018).

Debido a la alta rentabilidad que genera esta actividad acuícola, los sistemas de crianza de trucha se han intensificado generando altas producciones (PRODUCE, 2016). Pero, en la mayoría de los casos, no se cuenta con apropiados sistemas de manejo técnico y sanitario, lo que ha permitido brotes de enfermedades infecciosas como la yersiniosis o enfermedad de la boca roja, causada por la bacteria *Y. ruckeri*, que se caracteriza por causar grandes mortalidades y pérdidas económicas (Woo y Bruno, 1999). En el Perú, de acuerdo con los últimos informes del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos, están reportadas diferentes enfermedades infecciosas que afectan al cultivo de truchas en el territorio nacional, destacándose la yersiniosis como una de las más frecuentes en varias regiones productivas de salmónidos como, Puno, Junín, Lima, entre otros (SANIPES, 2016). Un estudio realizado en Puno, en el 2018, reveló que la causa de mortalidad más frecuente son las enfermedades bacterianas que ascienden a un

52%, destacándose la yersiniosis como una de las principales y más frecuentes (Montesinos *et al.*, 2018).

En nuestro medio son escasos los estudios referentes a los genes responsables por la patogenicidad de esta bacteria, por eso, es necesario caracterizar molecularmente los genes involucrados en la síntesis de factores de virulencia (*rucC*, *yhlA*, *yrp1*, *yrpA*, *yrpB*, *barA* y *uvrY*) de cepas patogénicas encontradas en nuestro país. La información generada permitirá dilucidar si la virulencia de *Y. ruckeri* está vinculada, en parte, a tales genes. Esto se hará con el propósito de establecer mejores estrategias en futuros estudios para prevenir o tratar la enfermedad, ya que el identificar y caracterizar los genes de los factores de virulencia es uno de los pasos previos necesarios para poder elaborar una vacuna que tenga como blanco evitar la expresión del gen estudiado o direccionar la respuesta inmune contra este, haciéndola más efectiva con respecto a una vacuna inactivada contra una cepa en particular.

1.2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

En los últimos años la truchicultura en el Perú ha tomado gran importancia ya que se viene constituyendo en una alternativa para la producción masiva de pescado fresco, así también para la generación de puestos de trabajo de manera directa e indirecta (FAO, 2016).

Debido a la alta rentabilidad que genera esta actividad acuícola, los sistemas de crianza de trucha se han intensificado generando altas producciones (PRODUCE, 2016). Lamentablemente, en la mayoría de los casos no se cuenta con apropiados sistemas de manejo técnico y sanitario, lo que ha permitido brotes de enfermedades infecciosas como la yersiniosis o enfermedad de la boca roja, causada por la bacteria *Y. ruckeri* (Bravo & Kojagura, 2004).

En el Perú, esta bacteria representa un riesgo para la crianza de trucha arcoíris ya que afecta la morbilidad y la mortalidad de las poblaciones, causando severas pérdidas económicas. Lamentablemente pese a que siguen aumentando los casos de yersiniosis en centros de cultivos en truchas, no existen informes oficiales por parte de las instituciones encargadas que indiquen el verdadero impacto que sufre la truchicultura en el Perú, no obstante, un estudio realizado en centros de cultivo en Puno reportó que la yersiniosis es una de las principales enfermedades

bacterianas, junto con la flavobacteriosis, entre las causas secundarias de mortalidad con un 52.2% (Montesinos *et al.*, 2018).

En nuestro medio son escasos los estudios referentes a los genes responsables por la patogenicidad de esta bacteria, por eso, es necesario caracterizar molecularmente los genes involucrados en la síntesis de factores de virulencia de cepas patogénicas encontradas en nuestro país. Con los resultados de esta investigación se pueden establecer mejores estrategias en futuros estudios para prevenir o tratar la enfermedad, ya que el identificar y caracterizar los genes de los factores de virulencia es uno de los pasos previos necesarios para poder elaborar una vacuna que tenga como blanco evitar la expresión del gen estudiado o direccionar la respuesta inmune contra este, haciéndola más efectiva respecto a una vacuna inactivada contra una cepa en particular.

II. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

- Caracterizar molecularmente los factores de virulencia de *Y. ruckeri* aisladas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de centros acuícolas de la sierra central del Perú.

2.2 Objetivos específicos.

- Identificar molecularmente mediante PCR la presencia de los genes: *rucC*, *yh1A*, *yrp1*, *yrpA*, *yrpB*, *barA* y *uvrY* que codifican la producción de algunos factores de virulencia en los aislados clínicos de truchas arcoíris procedentes de centros acuícolas de la sierra central del Perú.
- Determinar la frecuencia de los genes de los principales factores de virulencia de *Yersinia ruckeri* de las 53 cepas aisladas de truchas arcoíris (*O. mykiss*) procedentes de piscigranjas de Junín y Lima.
- Identificar la frecuencia de las cepas que compartan la mayor cantidad de determinantes de virulencia detectados por PCR para los genes específicos: *rucC*, *yh1A*, *yrp1*, *yrpA*, *yrpB*, *barA* y *uvrY*

III. HIPOTESIS.

Al menos 1 de los genes de los factores de virulencia estudiados se encuentran presentes en las cepas de *Y. ruckeri* aisladas de truchas arcoiris con signos clínicos característicos de la enfermedad.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. *Yersinia ruckeri*

Las bacterias del orden Enterobacteriales pertenecen a la clase y familia Gammaproteobacteria y Enterobacteriaceae respectivamente, donde se encuentra la especie *Y. ruckeri* dentro del género *Yersinia* como representante. Esta fue aislada en Idaho (Estados Unidos) por primera vez en los años 50 y fue descrita inicialmente por Ross *et al.*, 1966 y Rucker, 1966. *Y. ruckeri* es una bacteria en forma de bacilo ligeramente curvado de 2 – 3 µm de longitud y de 1.0 µm de diámetro. Son bacterias anaerobias facultativas, decarboxilan la ornitina y la lisina, catalasa positiva, fermentan el manitol, la glucosa y la maltosa. La capacidad para fermentar sorbitol, producir acetoina e hidrolizar la gelatina, caseína y Tween 80, varía entre las distintas cepas (Davies y Frerichs, 1989). Son negativas para las pruebas de indol, salicina y esculina, así como para el test de oxidasa (Brenner *et al.*, 2005).

Un aproximado del 80% de las cepas aisladas son motiles, y presentan 7 u 8 flagelos en disposición peritrica, *Y. ruckeri* no posee cápsula, inclusiones ni esporas.

Y. ruckeri se clasifica intraespecíficamente en 2 biotipos (1 y 2) y esto se da principalmente en función a la motilidad y a la capacidad de hidrolizar el Tween 80, el biotipo 1 es motil y lipasa positiva, mientras el biotipo 2 es negativo para ambas pruebas (Davies & Frerichs, 1989).

La enfermedad de la boca roja o yersiniosis produce pérdidas económicas importantes en la acuicultura a nivel mundial, puede mantenerse en una tasa baja de mortalidad en zonas donde la enfermedad es endémica, pero las infecciones agudas de la enfermedad, si es que no llegan a detectarse a tiempo, pueden producir una mortalidad del 30 al 70% del total de peces. Es una enfermedad que afecta principalmente a los salmónidos (Busch, 1982), aunque también la bacteria ha sido aislada de otras familias de peces (McArdle y Dooley-Martin, 1985).

La yersiniosis es una enfermedad cuyos signos clínicos tanto externos como en el comportamiento en el pez, son parecidos a otras enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram – negativas, con excepción de los alevines, en los cuales se presentan muertes asintomáticas (Kawula *et al.*, 1996). Los brotes de la enfermedad empiezan con un nivel bajo de mortalidad que son sostenidos en el tiempo, resultando en una alta tasa de pérdidas acumuladas (Home MT., 1999; Tobback *et al.*, 2007).

Cambios en el comportamiento del pez se pueden observar, como nado errático y cerca de la superficie, movimientos letárgicos y falta de apetito. Otros signos de la enfermedad incluyen exoftalmia con oscurecimiento de la piel, y hemorragias subcutáneas en y alrededor de la boca y la garganta, lo cual es característico y da el nombre a la enfermedad. Hemorragias petequiales pueden aparecer en la superficie del hígado, páncreas, ciego pilórico, vejiga natatoria y en los músculos laterales. El bazo está usualmente agrandado y puede tornarse de un color negro, y el intestino inferior puede enrojecerse y llenarse de un líquido amarillento opaco (Home MT., 1999; Tobback *et al.*, 2007).

La examinación histopatológica muestra una septicemia con inflamación en la mayoría de los órganos, particularmente en el hígado, bazo, riñón, corazón, branquias y en áreas con hemorragias petequiales. Se han descrito cambios patológicos en las branquias que incluyen hiperemia, edema, descamación de las células epiteliales en las laminillas secundarias (Home MT., 1999; Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009). Se pueden presentar áreas focales de necrosis en el hígado, bazo y riñón. En este último se puede observar túbulos renales degenerados, nefritis glomerular y un incremento marcado en melanomacrófagos (Home MT., 1999; Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009).

4.2. Trasmisión y epidemiología

La infección por *Y. ruckeri* puede ser transmitida por contacto directo entre un pez infectado y no infectado (trasmisión horizontal). Se demostró un estado de portador de *Y. ruckeri* donde los peces infectados pueden sobrevivir por 2 meses después de infecciones experimentales y naturales (Tobback E. *et al.*, 2007; Rodgers CJ. *et al.*, 1992). Un estudio verificó que alrededor del 25% de la población de trucha arcoíris puede portar *Y. ruckeri* en el intestino inferior (Busch & Lingg, 1975). Algunos estudios revelan que el pez portador puede liberar *Y. ruckeri* cuando se estresa, por ejemplo, se observó que los portadores transmitieron la enfermedad a peces clínicamente sanos cuando la temperatura subió a 25°C, pero la trasmisión no ocurrió con peces portadores sin estrés (Hunter *et al.*, 1980). También es probable que la trasmisión se dé por la eliminación de heces del pez portador y que este juegue un papel importante ya que *Y. ruckeri* puede sobrevivir alrededor de 4 meses fuera de su hospedero (Busch & Lingg, 1975).

La propagación de *Y. ruckeri* también ha sido vinculado con vectores putativos, que incluyen vertebrados acuáticos y aves (Willumsen B., 1989).

Si bien la transmisión vertical de madre a su prole no ha sido bien estudiada, *Y. ruckeri* fue recuperada de huevos desinfectados no fertilizados de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), cuya descendencia experimentó bajas mortalidades desde la fertilización hasta las 12 semanas de alimentación (Glenn RA. et al., 2014). Además, el reciente descubrimiento de ADN de *Y. ruckeri* en huevos no fertilizados y líquido ovárico del salmón Chinook, sugiere que el patógeno podría transmitirse verticalmente. Sin embargo, este estudio no pudo verificar la presencia de células bacterianas dentro del corión del huevo (Glenn RA. et al., 2014).

4.3. Ruta de entrada y diseminación

El examen histológico de la trucha arcoíris experimentalmente infectado con *Y. ruckeri* indicó que las branquias son una importante puerta de entrada para esta. A partir de ahí, *Y. ruckeri* se propaga a los demás órganos (Tobback et al., 2009). Esta propagación se pudo visualizar recientemente en los órganos de la trucha arcoíris mediante tomografía de proyección óptica e inmunohistoquímica (Ohtani M. et al., 2014). Los autores sugirieron que *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 post infección (mpi). Se pudo 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 M. et al., 2014).

4.4. Patogenicidad y factores de virulencia

Se describe como patogenicidad a la habilidad o capacidad que tiene un microorganismo para infectar al hospedero y causar enfermedad. Los factores de virulencia son las moléculas que, al ser expresadas por el agente patógeno, llegan a producir invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y dificultad en el tratamiento contra ellos (Croos, 2008; Sharma et al., 2017), estas moléculas son codificadas por ADN bacteriófago, genes cromosomales o plásmidos. Las moléculas de los factores de virulencia pueden estar alojados en plásmidos y/o islas de patogenicidad (PAIs). Los plásmidos son clústeres de genes que se ubican dentro del citoplasma bacteriano, mientras que los PAIs, codifican factores de virulencia encontrados en el cromosoma bacteriano (Zachary, 2017)

La mayoría de las bacterias tienen un solo cromosoma, pero pueden poseer diversas copias de un mismo o diferentes plásmidos. Los plásmidos se pueden replicar independientemente de la división celular y, cuando una bacteria que los contiene se divide, estos plásmidos se distribuyen al azar en las dos bacterias. Las cepas bacterianas que no poseen plásmidos y/o PAIs que cargan genes de virulencia generalmente no producen enfermedad, además, el tipo y número de factores de virulencia en una cepa bacteriana está constantemente cambiando. Esto se da a través de la selección de aquellos factores de virulencia que favorecen a la sobrevivencia de la bacteria en el hospedero (Zachari, 2017). Cada género

bacteriano y las cepas dentro de cada género poseen su único y propio perfil de factores de virulencia.

4.5. Factores de virulencia de *Y. ruckeri*

Tanto en los cromosomas como en plásmidos, se han identificado, varios genes que codifican moléculas que cumplen el papel de evasión inmune, proteínas con capacidad citotóxica, y otras adicionales que les confieren algunas ventajas frente a otras bacterias como movilidad, adhesión, adherencia, invasividad o captura de hierro, entre otros (Secades P., Guijarro JA. 1999).

El aumento de la frecuencia de brotes de yersiniosis, causados por cepas del biotipo 2, en peces vacunados (Austin et al., 2003), ha resaltado la necesidad de comprender y profundizar los mecanismos de virulencia de esta bacteria en busca de mejores estrategias de tratamiento y prevención. A continuación, se describen algunos factores que se han relacionado con la virulencia de esta bacteria (ver figura 1).

4.5.1 Toxinas extracelulares

Son en su mayoría enzimas que ayudan al crecimiento y la colonización del patógeno (Madigan y Martinko, 2006).

Se ha demostrado que las toxinas o productos extracelulares de esta bacteria son muy tóxicos y ocasionan áreas hemorrágicas y necróticas, las cuales son características de la enfermedad, cuando se inyectan intraperitonealmente en peces.

Entre los productos extracelulares de *Y. ruckeri* se han descrito lipasas, proteasas y hemolisinas (Romalde y Toranzo, 1993).

Yrp1 es una metaloproteasa de *Y. ruckeri*, capaz de degradar y digerir diferentes proteínas de la matriz y del músculo, lo cual sugiere que está asociado directamente con la capacidad de invasión de los tejidos. Además, puede ocasionar alteraciones en la membrana y producir poros en los vasos capilares, causando las hemorragias típicas de la yersiniosis, en especial alrededor de la boca y el intestino (Fernández y col., 2002).

Otros de los productos extracelulares importantes son las hemolisinas, cuya mayoría tiene actividad citotóxica. **Yhla** es una hemolisina/citolisina, capaz de lisar eritrocitos, lo que sugiere estar relacionada con las propiedades invasivas como se ha demostrado para algunas toxinas de *Serratia* (Poole y col., 1988).

4.5.2 Mecanismos de regulación y expresión genética

La bacteria mientras está en el proceso de infección, utiliza diferentes mecanismos de regulación para controlar la expresión de determinados genes (en especial, los relacionados con su patogenicidad) que le permitan adaptarse de la mejor manera al nuevo ambiente que encuentra en el interior del hospedador (Espinoza et al., 2012).

El hierro es una molécula muy importante y es requisito fundamental para el crecimiento y supervivencia de las bacterias, las cuales lo obtienen de las proteínas del huésped mediante los sideróforos (Neilands, 1995). Los sideróforos pueden ser clasificados en 3 grupos, catecoles, hidroxamatos y compuestos heterocíclicos. **RucC**, es un sideróforo tipo catecol ruckerbactina, es el principal sistema de captación de hierro de *Y. ruckeri*, y ha sido involucrado en su virulencia (Fernández y col., 2004). El hierro se encuentra unido fuertemente a moléculas como la hemoglobina y la transferrina. Los sideróforos luego de ser secretados secuestran y solubilizan el hierro y lo transportan dentro de la célula a través de diversos receptores para ser usado en diferentes vías metabólicas (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).

El sistema de transducción de señales de dos componentes **BarA/UvrY** está conformado por dos proteínas, una quinasa de histidina BarA y otra reguladora de respuesta UvrY. Este sistema en sus homólogos, bacterias Gram negativas, controla positivamente la expresión de RNAs no codificantes, CsrB (RsmY) y CsrC (RsmZ), los cuales actúan secuestrando proteínas represoras de traducción y activando la expresión de genes que estarían bloqueados por estos represores. Los genes activados normalmente están implicados en el metabolismo secundario, la motilidad y la formación de biopelículas. El sistema BarA-UvrY colabora también con la patogénesis de *Y. ruckeri* en la trucha arcoíris, regulando la sensibilidad al estrés oxidativo inducido por las células del sistema inmune y a la invasión de células epiteliales (Dahiya y Stevenson, 2010).

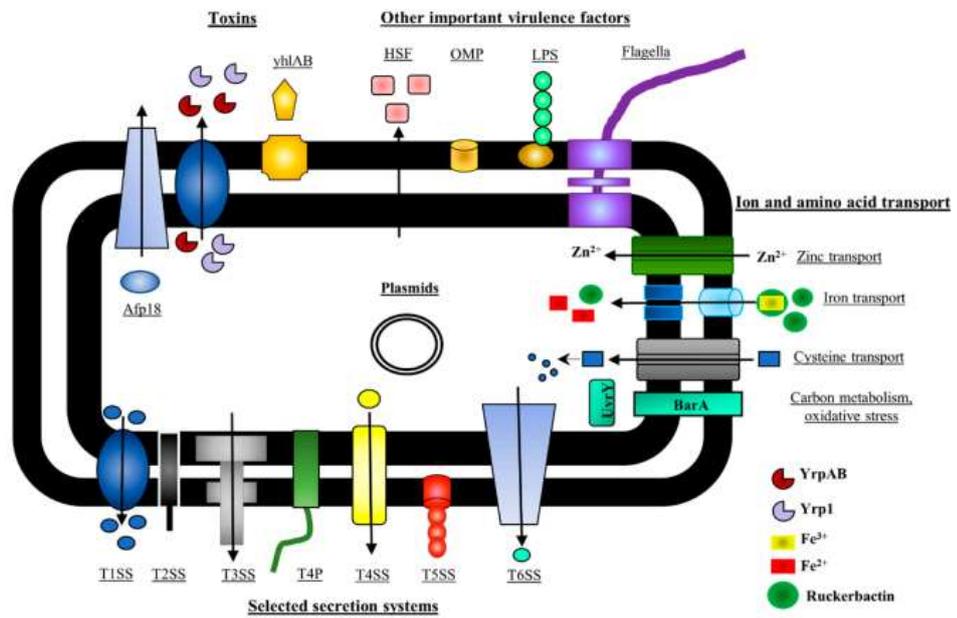


Figura 1.- Representación esquemática de algunos factores de virulencia de *Y. ruckeri* (Guijarro et al., 2018)

V. METODOLOGÍA.

5.1. Lugar de estudio

Las cepas de *Y. ruckeri* utilizadas en esta investigación fueron provenientes del cepario del Laboratorio de Parasitología de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Todas las cepas fueron obtenidas de 4 centros acuícolas de crianza intensiva, ubicados en las regiones de Junín (3) y Lima (1), los peces muestreados mostraron signos clínicos de yersiniosis como melanosis, nado errático, hemorragias en boca, ojos y piel, entre otros.

El estudio molecular se realizó en el mismo Laboratorio.

5.2. Tipo de estudio

El presente estudio es descriptivo y el diseño es un estudio observacional del tipo transversal.

5.3 Criterios de inclusión y exclusión

En cuanto a los criterios de inclusión que se tomaron en cuenta en este estudio fueron todas las cepas de *Y. ruckeri* que forman parte del cepario del laboratorio de Parasitología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. No se incluyeron aislados de otras especies bacterianas, provenientes de otras regiones o de animales clínicamente sanos.

5.4 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue conformado por la totalidad de aislados de *Y. ruckeri*, que hacen parte del cepario del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, provenientes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con signos clínicos sugestivos de yersiniosis, que fueron cultivadas en 4 piscigranjas de la sierra central del Perú, en el periodo enero-agosto del 2018 y que en total suman 53 cepas. Dichas cepas fueron confirmadas previamente mediante pruebas bioquímicas y análisis por PCR, según el protocolo de Gibello et al. (1999).

5.5 Procedimientos y técnicas

5.5.1. Recolección y procesamiento de muestras o datos

Se trabajaron con aislados provenientes del cepario del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Estos aislados fueron recolectados de muestras de truchas arcoíris clínicamente enfermas, diagnosticados con yersiniosis y cuentan con datos previos de resistencia a antimicrobianos, genes de resistencia y de tipaje molecular por rep-PCR.

5.5.2. Extracción de ADN

El ADN bacteriano fue extraído con el kit Wizard Genomic ADN Purification, según las indicaciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN fueron evaluadas por espectrofotometría con una absorbancia de 260 nm mediante el equipo nanodrop (Thermo Scientific, USA). El ADN purificado fue almacenado a -20°C.

5.5.3. Diseño de primers.

Se diseñaron primers para los genes *rucC* (NCBI Accession:AY576531.1), *yhlA* (NCBI Accession: AY576533.3), *yrp1* (NCBI Accession: JQ890543.1), *yrpA* - *yrpB* (NCBI Accession:KF735059.), *barA* (NCBI Accession: EU170244) y *uvrY* (NCBI Accession:EU170243) de manera individual, utilizando el programa Primer3 (<https://primer3.org/>) (ver tabla 1), para lo cual se obtuvo las secuencias de los genes desde la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) correspondiente a la cepa *Y. ruckeri* SC09, con código de acceso CP025800, luego se procedieron a alinear dichas secuencias, se hizo un fasta, y en base a esto se procedió a crear una secuencia consenso. Se seleccionaron los primers que solo se unan al segmento diseñado de cada gen de virulencia, una vez seleccionados fueron evaluados por la concentración de Guanina y Citocina, formación de bucles,

dímeros y heterodímeros utilizando el programa gratuito OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) de la empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Luego, el mejor par de primers para cada gen fue evaluado con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mediante el análisis de los parámetros E-valor (<0.02), cobertura de la secuencia problema (query cover) y el porcentaje de identidad ($>70\%$). Los oligonucleótidos con los mejores parámetros mostrados después esta evaluación fueron adquiridos para el desarrollo de este proyecto.

5.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación de DNA bacteriano fueron realizadas en volúmenes finales de 25 μL conteniendo 2,5 μL de 10 x buffer PCR, 1,5 μL de MgCl_2 (1,5 mM), 1 μL de dNTP (0,2 mM), 1 μL de cada iniciador (0,4 mM) (ver anexo 1), 0,25 μL de Platinum Taq polimerase (0,5 U) (Invitrogen), y 1 μL de DNA (50 ng). Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado para: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C (4 min); 30 ciclos de amplificación en los que las temperaturas de desnaturalización hibridación y elongación fueron de 94 °C (30 seg), 60 °C (30 seg), y 72° C (30 seg), respectivamente; y 1 ciclo final de 72° C (5 min). Todos los productos de PCR han sido analizados por electroforesis en gel de agarosa (1%), teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y fotografiados con transiluminador de luz UV con el sistema Kodak (EDAS, DC-120).

DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) de peso molecular 1000 bp fue utilizada como marcador. Como las temperaturas de desnaturalización, hibridación (annealing), extensión y tamaño de los amplificadores fueron similares (menores a 500 bp) para los genes *rucC*, *yrp1*, *yrpA*, *yrpB*, *barA* y *uvrY* se realizó PCR individual para cada gen (Tabla 1) a excepción del gen *yh1A* cuyo tiempo de extensión y tamaño de amplificadores fue 1 minuto ya que este gen fue el único que pasa los 500 pares de base con 725 pares de base. Como control positivo se utilizó la cepa tipo de *Y. ruckeri* ATCC 29473, la cual en estudios previos como el realizado por Wrobel, A. *et al.* 2018, indica que cuenta con los genes cromosomales utilizados en este estudio; para esto se extrajo el ADN por el método de fenol cloroformo, luego se realizó el PCR según el protocolo que se estandarizó y estos amplicones pasaron a ser usados control positivo. Como control negativo se utilizaron cepas de *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 y de *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.6. Consideraciones éticas

La presente investigación se realizó siguiendo y respetando todas las consideraciones y normas de la DUARI (Dirección Universitaria de Asuntos Regulatorios en Investigación) de la UPCH para investigaciones. Según la carta CAREG-ORVEI-091-22.

5.7. Plan de análisis de datos

Se hizo el análisis de los resultados con estadística descriptiva (distribución de frecuencias). Los datos recolectados, representaciones gráficas y tablas se manejaron en el programa Microsoft Excel 2016.

Del total de muestras positivas de los genes estudiados, se hizo una división entre el número de positivos y el total de muestras evaluadas y esta fue la frecuencia.

Tabla 1. Cebadores para la identificación de los genes de virulencia de *Y. ruckeri*.

Gen	Secuencia de nucleótidos	Tamaño	Tm °C	Referencia
<i>rucC</i>	F => 5'- CGATCGAAAGGCTCCAACTG- 3'	436 bp	60.5	Este estudio
	R => 5'- ATTTCCACGTACCTCTGGCA- 3'		58.4	
<i>yhlA</i>	F => 5'- GAAATTTTCGGCATGGCAGC- 3'	725 bp	59	Este estudio
	R => 5'- GCGTTGATATCTGTTGCCGT- 3'		58	
<i>yrpI</i>	F => 5'- CATCCAGCATTTGTACGGGG- 3'	446 bp	60.5	Este estudio
	R => 5'- CAGGACTGGCAGGTGTAGAA -3'		60.5	
<i>yrpA</i>	F => 5'- TTGCCGGACTGAATTTTACC - 3'	471 bp	56.4	Este estudio
	R => 5'- AGCAGGCACCCACAGTATTC -3'		60.5	
<i>yrpB</i>	F => 5'- AAATGGCGAATTCTTGTTGG- 3'	421 bp	54	Este estudio
	R => 5'- GTAACCGCTTTGGGTCTGAA- 3'		58.4	
<i>barA</i>	F => 5'- GCTGGAAGCAGAAAACTGG -3'	445 bp	58.4	Este estudio
	R => 5'- GCTGATATCGCCATCCATCT- 3'		58.4	
<i>uvrY</i>	F => 5'- TGTGGTGAAGATGCGGTAAA- 3'	422 bp	56.4	Este estudio
	R => 5'- AGATGCAACTGCTCCGAGAT- 3'		58.4	

VI. Resultados

6.1. Detección por PCR de la presencia de genes de virulencia

Se logró detectar todos los genes incluidos en el estudio (*rucC*, *yhlA*, *yrp1*, *yrpA*, *yypB*, *barA* y *uvrY*) con una distribución variada en las 52 cepas, dando positivos para al menos 1 de los genes que codifican factores de virulencia. Del total de cepas analizadas se encontró que 15% (8/52) fueron positivas para los 7 genes considerados para este estudio. Se pudo observar que el gen *uvrY* (98%) fue el más frecuente, seguido de los genes *yypA* (96%), *yhlA* (92%) y *barA* (92%) (ver tabla 2, gráfico 1, figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8)

Tabla 2. Presencia de los genes relacionados a los factores de virulencia de *Y. ruckeri* detectados por PCR.

Código	Departamento	Genes Cromosomales						
		<i>rucC</i>	<i>yhlA</i>	<i>yrp1</i>	<i>yrpA</i>	<i>yrpB</i>	<i>barA</i>	<i>uvrY</i>
T19B	Junín	+	+	+	+	-	-	+
T19R	Junín	+	+	+	+	-	-	+
T20B	Junín	-	+	+	+	+	+	+
T9R	Junín	-	-	-	-	-	-	+
PB1	Junín	+	+	+	+	-	+	+
PB2	Junín	+	+	+	+	-	+	+
PR2	Junín	+	+	+	+	-	+	+
PB3	Junín	+	+	+	+	+	+	+
PR3	Junín	+	+	+	+	+	+	+
PR4	Junín	+	+	-	+	+	+	+
PB4	Junín	-	+	+	+	+	+	+
PR11	Junín	+	+	+	+	-	+	+
PB11	Junín	+	+	+	+	-	+	+
A2R	Junín	+	+	+	+	-	+	+
A2B	Junín	+	+	+	+	-	+	+
A5R	Junín	+	+	+	+	-	+	+
A6R	Junín	-	-	-	-	-	-	+
A18R	Junín	+	+	+	+	-	+	+
A18B	Junín	+	+	+	+	-	+	+
I3B	Junín	+	+	+	+	-	+	+
I3R	Junín	+	+	+	+	+	+	+
I7B	Junín	+	+	+	+	-	+	+
I8B	Junín	-	+	+	+	-	+	+
I8R	Junín	+	+	+	+	-	+	+
I10B	Junín	+	+	+	+	-	+	+
I10R	Junín	-	+	+	+	-	+	+
I11B	Junín	+	-	-	+	-	+	+
DE11R	Junín	+	+	+	+	+	+	+
DE12B	Junín	+	+	+	+	-	+	+
DE4R	Junín	+	+	+	+	-	+	+
HE9B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
HE6B1	Lima	+	-	-	+	-	+	+
F2B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F6B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F8B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F11B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F12B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F14B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F17B	Lima	+	+	+	+	+	+	+
F18B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F19B	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F2R	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F4R	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F6R	Lima	+	+	+	+	+	+	+
F8R	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F10R	Lima	+	+	+	+	+	+	+
F11R	Lima	+	+	+	+	-	+	+
F12R	Lima	+	+	+	+	+	+	+
F14R	Lima	+	+	-	+	+	+	+
F16R	Lima	+	+	-	+	+	+	-
F17R	Lima	+	+	-	+	+	+	+
F18R	Lima	+	+	+	+	-	+	+

MPM : Marcador de Peso Molecular, Carriles del 1 al 7 bandas de amplicones para los genes en estudio

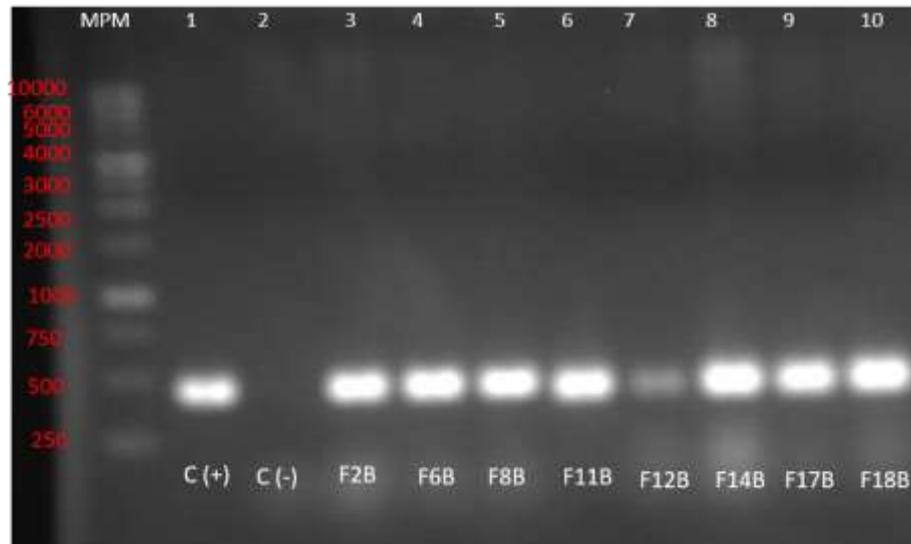


Figura 3.- Identificación molecular por PCR del gen *rucC* de *Y. ruckeri*. Se observa un amplicón de 436 bp. Carril 1: Control positivo *Y. ruckeri* ATCC 29473. Carril 2: Control negativo *E. coli* ATCC 25922. 3-10: muestras analizadas.

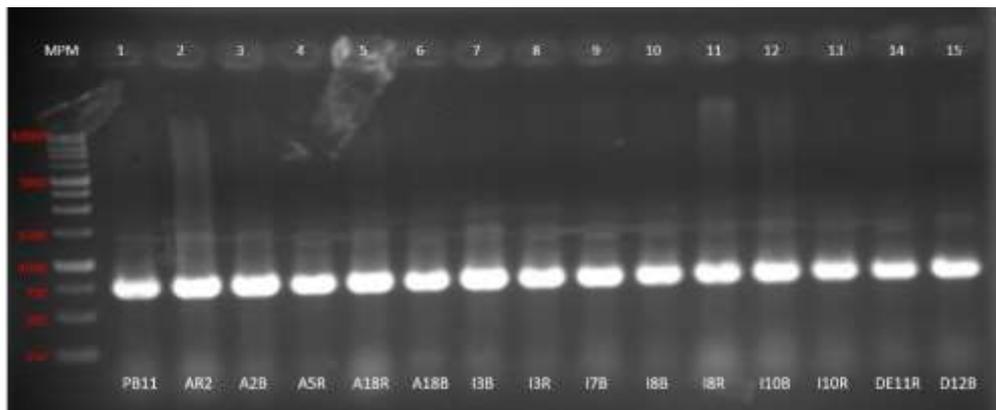


Figura 4.- Identificación molecular por PCR del gen *yhIA* de *Y. ruckeri*. Se observa un amplicón de 725 bp. Carril 1-15: muestras analizadas positivas.

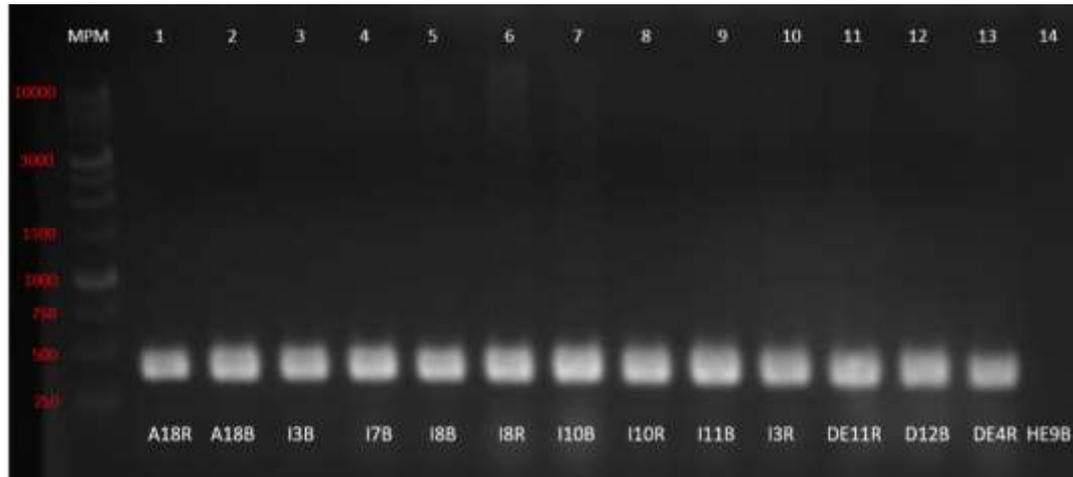


Figura 5.- Identificación molecular por PCR del gen *yrp1* de *Y. ruckeri*. Se observa un amplicón de 446 bp. Carril 1-13: muestras analizadas positivas. Carril 14: muestra analizada negativa.

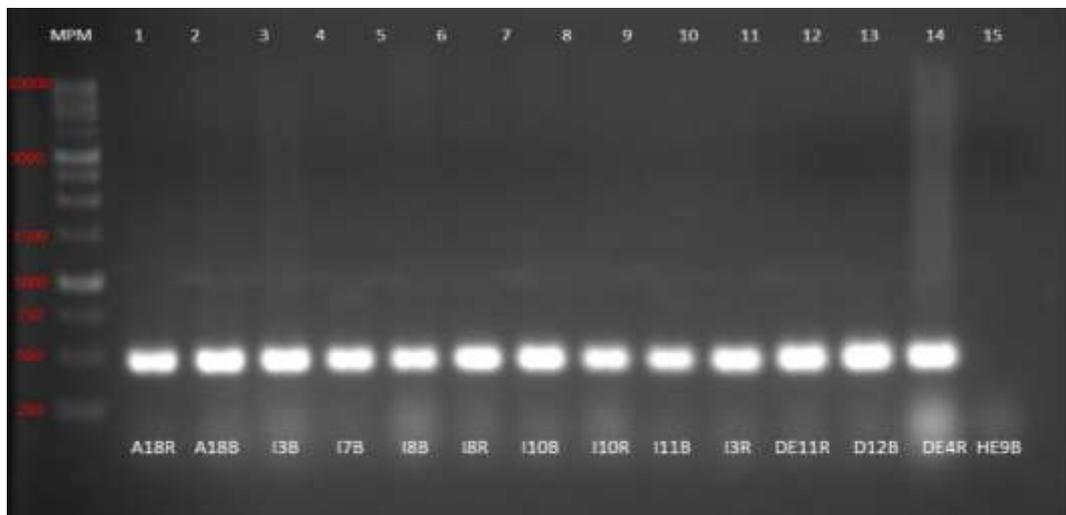


Figura 6.- Identificación molecular por PCR del gen *yrpA* de *Y. ruckeri*. Se observa un amplicón de 471 bp. Carril 1-14: muestras analizadas positivas. Carril 15: muestra analizada negativa.

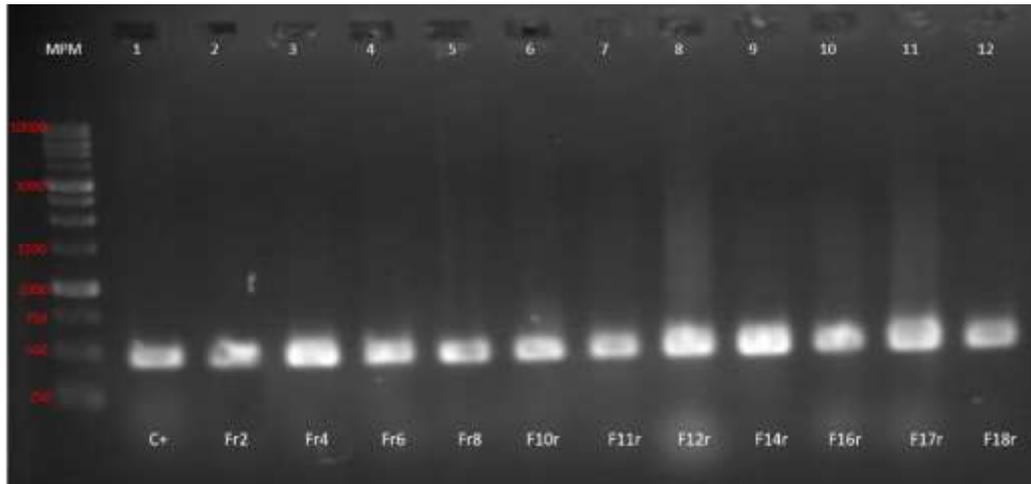


Figura 7.- Identificación molecular por PCR del gen *barA* de *Y. ruckeri*. Se observa un amplicón de 445 bp. Carril 1: Control positivo. Carril 2-12: muestras analizadas positivas.

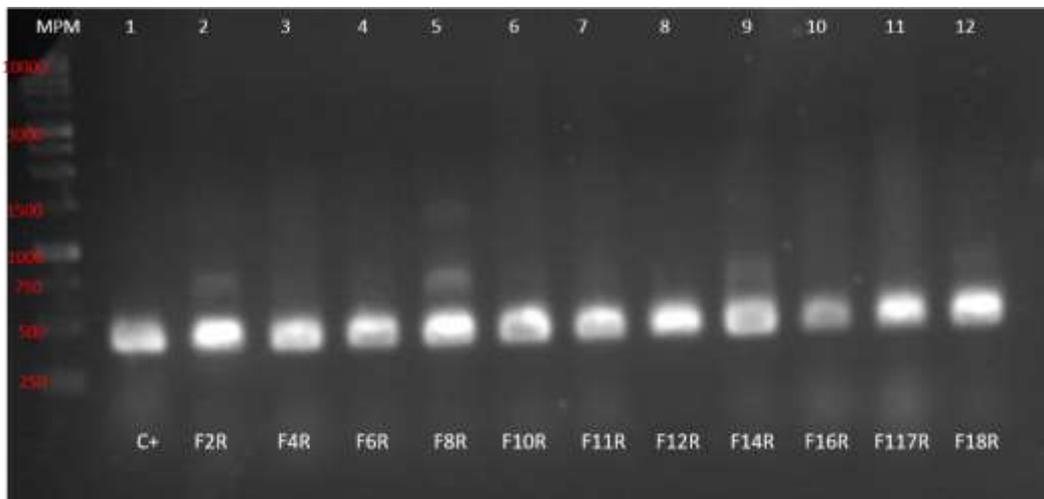


Figura 8.- Identificación molecular por PCR del gen *uvrY* de *Y. ruckeri*. Se observa un amplicón de 422 bp. Carril 1: Control positivo. Carril 2-12: muestras analizadas positivas.

6.2. Perfiles de las cepas de *Y. ruckeri* según la detección de genes de virulencia.

Se pudo observar 9 perfiles basados en la posesión de genes de virulencia (Tabla 3). Se observó que el perfil P1 comprende los 7 genes estudiados, al cual pertenecen sólo el 15% de las cepas evaluadas. Los perfiles P2 y P3 presentan el mayor número de cepas positivas con un 57.7% y 5.8%, respectivamente, que contienen 6 de los 7 genes estudiados siendo *yrpB* y *yrp1* los genes ausentes en cada caso (gráfico 2). Los perfiles (P4, P5, P6, P7 y P8) carecen de 2 o más genes de virulencia.

Tabla 3. Perfiles de las cepas de *Y. ruckeri* según la presencia de genes de virulencia.

Perfil	Gen							N	%
	<i>rucC</i>	<i>yhlA</i>	<i>yrp1</i>	<i>yrpA</i>	<i>yrpB</i>	<i>barA</i>	<i>uvrY</i>		
P1	+	+	+	+	+	+	+	8	15.4
P2	+	+	+	+	-	+	+	30	57.7
P3	+	+	-	+	+	+	+	3	5.8
P4	-	+	+	+	-	+	+	2	3.8
P5	+	+	+	+	-	-	+	2	3.8
P6	+	-	-	+	-	+	+	2	3.8
P7	-	+	+	+	+	+	+	2	3.8
P8	-	-	-	-	-	-	+	2	3.8
P9	+	+	-	+	+	+	-	1	1.9
Total								52	100

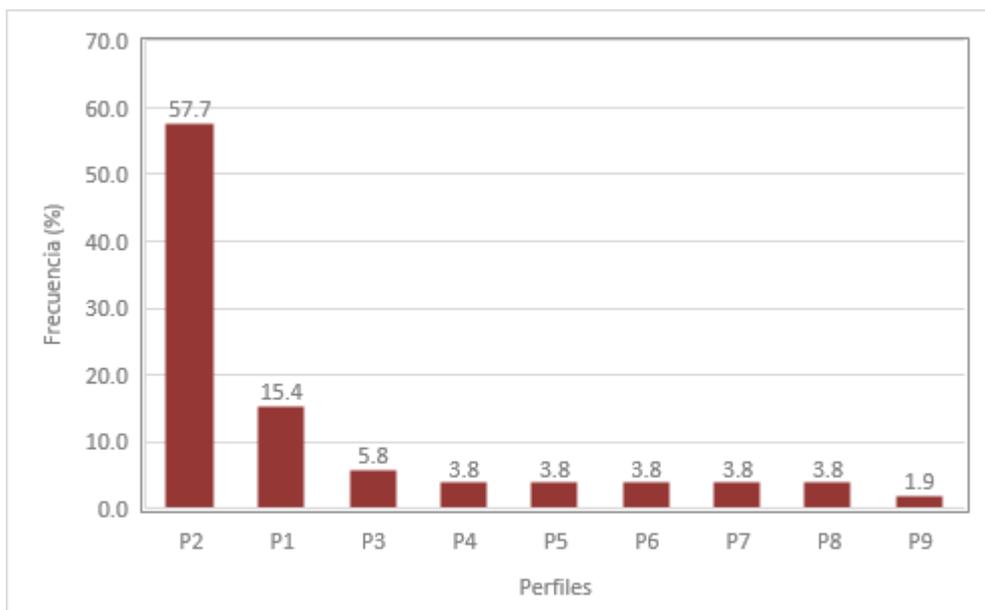


Gráfico 2. Frecuencia de los perfiles de las cepas aisladas de *Y. ruckeri* según la presencia de genes de virulencia.

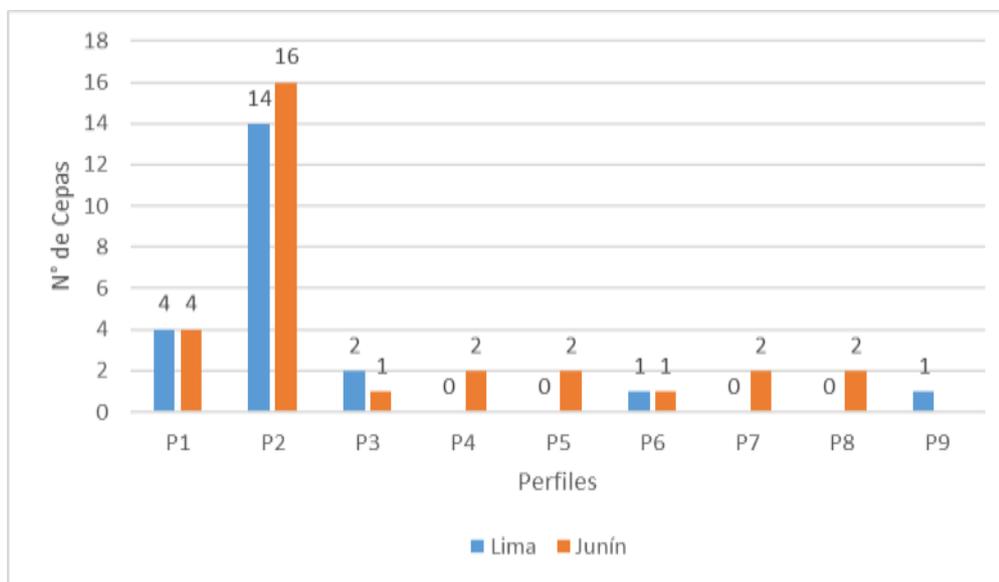


Gráfico 3. Perfiles de las cepas aisladas de *Y. ruckeri* según la presencia de genes de virulencia por región (Lima y Junín).

VII. DISCUSIÓN

Contar con diferentes mecanismos de obtención de recursos limitantes, la resistencia a las amenazas del medio ambiente y las defensas del hospedero, entre otros, brindan la capacidad a un patógeno para producir enfermedad. Se ha observado una gran variedad de componentes bacterianos, por lo general específicos de cada cepa, involucrados en la supervivencia de los microorganismos, adhesión y crecimiento, algunos de estos factores son muy perjudiciales para el hospedero, es por eso por lo que se les llama factores de virulencia (Lebrun et al., 2009).

Hasta donde sabemos, es la primera vez en el Perú que se realiza una investigación mediante el empleo de la reacción de cadena de polimerasa (PCR), para detectar la presencia de 7 genes de virulencia en cepas patogénicas de *Y. ruckeri*, aisladas de trucha arcoíris con signos clínicos sugestivos de yersiniosis, de diferentes centros de cultivo de las regiones de Lima y Junín.

Los genes detectados y sus respectivas frecuencias revelan que la virulencia de microorganismos patógenos, en este caso *Y. ruckeri*, varía no solo en función del género, sino también de la especie, subespecie, y cepa bacteriana (Chao et al., 2013). En general se observó una homogeneidad en la distribución y frecuencia de los genes estudiados que son de origen cromosomal (tabla 2).

Los genes *uvrY* y *barA*, que componen el sistema de transducción BarA/UvrY, fueron los más frecuentes con 98% y 92%, respectivamente. Se sabe que este sistema de transducción está constituido por una proteína quinasa de histidina BarA y una proteína reguladora de respuesta UvrY. Este sistema en *Escherichia coli*, y sus homólogos en otras bacterias Gram negativas, controla positivamente la expresión de los RNAs no codificantes, CsrB (RsmY) y CsrC (RsmZ). Estos pequeños RNAs actúan secuestrando proteínas represoras de traducción y activando la expresión de genes que normalmente estarían bloqueados por estos represores. Los genes activados usualmente están involucrados en el metabolismo secundario, la motilidad y la formación de biopelículas. El sistema BarA-UvrY contribuye también a la patogénesis de *Y. ruckeri* en la trucha arcoíris, regulando la invasión de células epiteliales y la sensibilidad al estrés oxidativo inducido por las células del sistema inmune (Dahiya y Stevenson, 2010). La frecuencia alta encontrada para ambos genes sugeriría que las cepas patogénicas predominantes en estas zonas expresan este sistema de transducción en los pasos iniciales del establecimiento, colonización y adhesión de esta bacteria pudiendo ser unos de los más importantes genes de virulencia de *Y. ruckeri* para producir su patogenicidad en el huésped.

El tercer gen con mayor frecuencia encontrado es *yrpA* (96%) el cual está relacionado con el gen *yrpB* (27%), que es el que presenta menor frecuencia dentro de los genes estudiados. Ambos genes codifican para proteasas. La función de las proteasas es de proveer al patógeno con nutrientes de origen peptídico mediante la hidrólisis de estos. Sin embargo,

al cumplir esta función las hace considerar como factores de virulencia ya que contribuye a la patogénesis de un microorganismo (Secades y Guijarro, 1999). Un estudio reveló mediante la técnica de PCR-RT, que los genes *yrpA* y *yrpB* forman un operón en *Y. ruckeri*, donde se descubrió un efecto sinérgico entre ambos genes en distintas condiciones ambientales, como cuando son cultivados en peptona bajo una atmósfera microaeróbica; lo que indicaría un complejo mecanismo de regulación con diferentes elementos involucrados en su expresión (Navais, et al., 2014).

Muy interesante fue la inducción del operón bajo condiciones microanaerobias. Las bacterias que poseen un operón homólogo al *yrpAB* son generalmente anaerobios o facultativos. Un ambiente, bajo en oxígeno, es una constante en el intestino de varios animales (Dawson AM., Trenchard D., Guz A., 1965) y parece ser el desencadenante para la expresión de algunos genes de virulencia en la colonización del intestino por bacterias patogénicas como *V. cholerae* (Liu Z. et al., 2011) y *Shigella* (Hanlon G., Hodges N., Russell A. 1982) Sin embargo, el mecanismo involucrado en esta regulación aún no está bien definido. Tomando en cuenta que el intestino de la trucha arcoíris es uno de los principales órganos afectados durante la infección de *Y. ruckeri* (Mendez J., Guijarro J., 2013), junto con la presencia de un ambiente microanaerobio en este órgano, es más que probable que las peptidasas YrpA y YrpB sean inducidas específicamente en este tejido. La frecuencia hallada de estos genes *yrpA* (96%) y *yrpB* (27%) indica su alta incidencia en estas cepas patogénicas en estudio, en la cual se podría proponer que no todas estas cepas podrían tener la capacidad

de producir proteasas que puedan proveer a este patógeno de nutrientes de origen peptídico ya que en la revisión de la literatura se indica que ambos genes se complementan para ejercer esta función.

Otro gen que ha demostrado tener un papel fundamental en la virulencia de *Y. ruckeri* es *yhlA* (cuarto puesto en la lista con mayor frecuencia dentro de los genes estudiados con 92%) el cual codifica para una hemolisina que tiene una alta identidad de secuencia con hemolisinas de toxinas formadoras de poros tipo *Serratia*. Estas toxinas se unen a la membrana de los eritrocitos y otros tipos de células y pueden crear poros. Además, se han relacionado con propiedades invasivas (Hertle et al., 1999). Curiosamente, estas hemolisinas también se han encontrado en análisis genómicos de otras especies de *Yersinia*, aunque aún no se ha determinado su función (Deng et al., 2002; Chain et al., 2004). El gen *yhlB* precede al gen *yhlA* y ambos son requeridos para la producción de una citolisina extracelular inducida *in-vivo* llamada YhlA (Fernandez et al., 2006). Dado que *yhlA* y *yhlB* forman una sola unidad transcripcional, un estudio realizado por Fernandez (2006), analizó la regulación de la proteasa YhlA en la región 5' de *yhlBA*. La cepa *Y. ruckeri* 150RiviV, obtenida por IVET, contenía una fusión transcripcional entre el promotor *yhlB* y los genes *lacZY*, que se utilizó para estudiar la regulación de la expresión de este gen en respuesta a dos señales ambientales importantes, el hierro y la temperatura. Dicho estudio mostró, basado en la actividad β -galactosidasa, que tanto el hierro como la temperatura ejercen una influencia importante en los niveles de transcripción de *yhlB*, siendo reprimida por el hierro e inducida por el descenso de la temperatura. Estos resultados son compatibles

con la hipótesis que la producción de la hemolisina puede ser una manera importante de liberar el hierro almacenado dentro de los eritrocitos, para ser usado por la bacteria (Litwin & Calderwood, 1993). Además, la expresión del promotor *yhIB* fue aproximadamente 7 veces mayor a 18°C que a 28°C, temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo. Esto coincide con los resultados obtenidos para la regulación génica de la proteasa Yrp1 y la producción de ruckerbactina (Fernandez et al., 2003, 2004) y refuerza la importancia de la temperatura como señal ambiental que regula la virulencia de *Y. ruckeri*. La modulación dependiente de la temperatura de los genes de virulencia atiende a desencadenar la expresión de estos en condiciones que imitan las que se encuentran en el huésped. Sin embargo, esta no es una regla general y cada caso debe analizarse de forma independiente. En el caso del género *Yersinia*, la regulación de los genes de virulencia por la temperatura es un fenómeno bien caracterizado (Straley & Perry, 1995; Konkel & Tilly, 2000).

La poca frecuencia hallada del gen *yhIA* (92%), en este estudio, podría dar indicios del porqué no todos los peces infectados con *Y. ruckeri* presentan las hemorragias características de la enfermedad, ya que se necesita la expresión de ambos genes *yhIA* y *yhIB* para poder codificar la hemolisina YhIA (Fernández et al, 2007).

Otro gen encontrado en este estudio fue *yrp1*, con una frecuencia de 85%, este gen codifica a la metaloproteasa Yrp1; un estudio para definir cuál es el rol que tiene en la virulencia, utilizó diferentes matrices y proteínas musculares como posibles sustratos de la enzima y se pudo evidenciar que la fibronectina fue completamente degradada, mientras que el colágeno tipo

1 sufrió una pequeña hidrólisis, otras proteínas como fibrinógeno, laminina y gelatina fueron hidrolizadas en diferentes grados. Las proteínas musculares actina y miosina fueron completamente degradados por Yrp1 (Fernandez et al., 2003). Este comportamiento tiene algunas similitudes con el patrón de degradación obtenido con la proteasa Fpp1 de la bacteria patógena *Flavobacterium psychrophilum* (Secades P., B Alvarez, and J. A. Guijarro. 2001) y otras metaloproteasas relacionadas a la invasión o daño de tejidos (Miyoshi & Shinoda. 2000). Esto junto con la clara preferencia a la hidrólisis de laminina en relación a las otras proteínas ensayadas, sugiere que la laminina del pez puede ser uno de los mayores sustratos naturales de esta proteasa. Por lo tanto, esta degradación puede ser la causa de las alteraciones de la membrana que lleva a la erosión y poros en los vasos capilares, lo cual resultaría en una filtración de sangre a través de microhemorragias en particular en áreas como la boca y los intestinos, siendo esto signos característicos de la enfermedad. Estos resultados, junto al hecho de que la proteasa Yrp1 es un factor de virulencia no esencial para el desarrollo de la enfermedad y el crecimiento de la bacteria (Fernandez et al. 2002), nos permite especular que esta proteína pueda estar involucrada en la invasión de diferentes tejidos durante el proceso de infección y puede también tener un rol nutricional.

El gen *rucC* que codifica para la ruckerbactina tuvo una frecuencia de 88% lo cual sugiere que este es un gen de virulencia de alta importancia para que esta bacteria ejerza su patogenicidad ya que como se ha revisado en diferentes estudios juega un papel de catecol sideróforo (ruckerbactina)

como previamente fue sugerido por Romalde et al. (Romalde et al. 1981). Este sistema resultó ser similar a la enterobactina de *E. coli* no solo en términos de homología en la secuencia de aminoácidos si no también en disposición cromosómica de alguno de estos genes. También se probó que la ruckerbactina es uno de los sistemas de absorción de hierro que este patógeno utiliza en el huésped y está también involucrado en la virulencia (Faraldo-Gomez y Sanson. 2003), y ya se han descrito estudios sobre la inducción in vivo de genes relacionados con el hierro en microorganismos patógenos de peces. Así, la limitación de hierro durante el crecimiento *in vivo* induce la expresión de proteínas de membrana externa en *Vibrio salmonicida* (Colquhoun D. y H. Sorum. 1998). De igual forma, estudios realizados en *Vibrio anguillarum*, demostraron que la adquisición de hierro por parte del sideróforo está involucrada en la virulencia de la bacteria (Conchas R F., et al. 1991).

La presencia de todos los genes que codifican a diferentes mecanismos relacionados en la virulencia de *Y. ruckeri* en los aislados de centros de cultivos de trucha arcoíris en Lima y Junín, indica una homogeneidad genética de estas especies en estas áreas geográficas. Estos resultados son similares con un estudio previo realizado en el noroeste de Alemania en cepas patogénicas de *Y. ruckeri* (Yidan H., 2014) realizando PCR múltiple, donde se detectaron distintos genes de virulencia incluidos *rucC*, *yhIA*, y *yyp1* que también fueron detectados en este estudio.

Podríamos decir que aparentemente no se podría establecer una relación entre la presencia entre los genes de virulencia y el área geográfica de donde fueron aislados las distintas cepas de este estudio, ya que la

cantidad de cepas por región no es homogénea. Sin embargo, se puede observar que la mayoría de las cepas de ambas regiones, Junín y Lima, se encuentran distribuidas en su mayoría en el perfil P2 (Gráfico 3), el cual fue negativo para el gen *yrpB*, seguido del perfil P1, el cual presenta los 7 genes detectados en este estudio. Las otras cepas fueron agrupadas en los perfiles restantes (P3, P4, P5, P6, P7, P8 y P9), los cuales carecen de 1 o más genes y presentan una mínima frecuencia de presentación. No obstante, no se puede descartar que estas cepas no hayan tenido tales genes, ya que muchas veces en la manipulación reiterativa de cepas de laboratorio (conservadas en cepario) puede llevar a la presentación de datos pocos fehacientes.

Las bacterias poseen diversos genes de virulencia, los cuales les dan la capacidad de provocar una patología y manifestaciones clínicas particulares en un hospedador, y se agrupan en patotipos. Aún no hay investigaciones que determinen los patotipos de las cepas de *Y. ruckeri*, pero este estudio presenta evidencia preliminar que orienta los siguientes pasos para el establecimiento de un patotipo, iniciando por la determinación de la frecuencia de los genes relacionados a la virulencia hallados en las cepas aisladas de esta investigación. Sin embargo, investigaciones de infección experimental, ensayos de citotoxicidad, secuenciación y determinación de la expresión de estos genes, serán necesarios para la determinación de un patotipo de *Y. ruckeri* (Preeti et al., 2022; Pessoa et al., 2020; Llanto et al., 2014).

Si bien estos genes identificados no son los únicos responsables de asistir a *Y. ruckeri* en el proceso de infección, podríamos proponer un modelo de patogenicidad en base a las cepas con mayor cantidad de

determinantes génicos de virulencia obtenidos y teniendo en cuenta la literatura científica.

Es así que, las truchas arcoíris cultivadas que se encuentran bajo condiciones de estrés, el sistema inmune de estos se ve afectado, lo cual, junto a la presencia de ulceraciones, o lesiones en la mucosa de la piel, proveen al patógeno la oportunidad de adherirse e invadir los tejidos (Bergh y Frey, 2013). Durante el proceso de infección *Y. ruckeri* se adhiere primero a la mucosa, subsecuentemente a las células epiteliales de las branquias y de los enterocitos de las vellosidades intestinales (Tobback et al., 2010). Es aquí donde los genes *barA-uvrY* estarían expresándose en primera instancia ya que como detallamos anteriormente estos genes se encargarían de la adhesión e invasión de células epiteliales, teniendo así una de las funciones más fundamentales para *Y. ruckeri* en su patogenia. El intestino y las branquias son considerados como importantes sitios de entrada, con una subsecuente diseminación sistémica del patógeno (Tobback et al., 2009; Méndez and Guijarro, 2013), llegando así a órganos importantes como hígado, bazo, páncreas y músculos donde la bacteria se replicaría usando como fuente de energía el hierro y es aquí donde el gen *rucC* también jugaría un papel importante codificando una ruckerbactina, encargada de la captación de hierro. Posteriormente la bacteria liberaría toxinas extracelulares como la proteasa *yyp1* la cual sería la encargada de degradar diferentes proteínas musculares como fibrinógeno, laminina (Fernandez et al., 2003) causando hemorragias en distintas zonas del cuerpo del pez. Asimismo, los genes *yypA* y *yypB* actúan sinérgicamente codificando el operon *yypAB* (Navais et al., 2014). El efecto sinérgico ocurre en la

inducción del operon *yrpAB* en ambientes de bajos niveles de oxígeno, que se encuentran en los intestinos de los peces, lo que indicaría que ambos genes podrían expresarse en el tejido intestinal donde también según las necropsias hechas a peces infectados con *Y. ruckeri*, presentan hemorragias en el tejido intestinal (Navais et al., 2014).

Posteriormente las hemorragias observadas en las mucosas de la boca y en la piel cerca de las aletas, podría deberse a la expresión de la hemolisina *yhIA*; la expresión de este gen está regulada por la temperatura y la disponibilidad de hierro y conduce a citólisis y hemólisis (Fernandez et al., 2004)., lo que indicaría que en algunos casos donde el ambiente sea desfavorable para la bacteria con bajos niveles de hierro pueda activar la expresión de este gen. La expresión de los genes mencionados generaría los signos clínicos descritos, los cuales forman parte de la manifestación clínica de la yersiniosis en los peces de los cuales se aislaron las cepas utilizadas en este estudio.

En el presente estudio se propuso identificar un conjunto de genes asociados a la virulencia de *Y. ruckeri*, utilizando la técnica de PCR. Hecho que puede significar el primer paso de todo un gran proyecto que apunte al desarrollo de medidas de prevención, que es un paso fundamental en la sanidad acuícola para garantizar la salud de los peces, y que se ajusten a la realidad de la actividad acuícola en el Perú, principalmente de la trucha arcoíris. La importancia del uso de la técnica molecular PCR para la identificación de genes se justifica cuando se cuenta con un gran número de cepas bacterianas que necesitan ser analizados para llegar a un consenso en cuanto a la presencia o ausencia de un gen en particular. Si bien es cierto

que la realización de una secuenciación de los productos de PCR positivos a la presencia de los genes de virulencia hubiera sido ideal para determinar con precisión la secuencia que codifican para los factores de virulencia en este estudio (Wang Q. et al., 2022; Roberto N. et al., 2014), esto resultó poco viable por diferentes factores, entre ellos se considera el hecho que para realizar la secuenciación de regiones específicas de un gen, los proveedores no son nacionales y el desarrollo de estos ensayos durante la pandemia limitó la capacidad logística de envío al extranjero (Macrogen-Corea), por lo tanto no se realizó la secuenciación SANGER de estos productos de PCR (Deekshit et al., 2019). Asimismo, la utilización de una cepa de *Y. ruckeri* que carezca de los genes de virulencia de este estudio para ser utilizado como control negativo, fue también una de las limitantes, ya que no se contaba con los recursos necesarios para conseguir una de estas cepas, por eso se optó por el uso de cepas de *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 y de *Escherichia coli* ATCC 25922 siendo *A. salmonicida* una bacteria acuática que también produce enfermedad en salmónidos y que se encuentra en nuestro país.

La identificación de estos genes implicados en virulencia y con posteriores estudios de expresión genética, donde se tenga que incluir análisis de transcripción de genes que codifican factores de virulencia, permitirá intuir sobre los mecanismos de interacción entre el patógeno *Y. ruckeri* y el hospedero trucha arcoíris. Conociendo estos aspectos, se pueden definir blancos o antígenos para la búsqueda y desarrollo de inhibidores de uso farmacéutico o profiláctico (Nash et al. 2006). Sin embargo, dado que una enfermedad es el resultado de un efecto acumulativo con la con la

contribución de muchos factores de virulencia, estos genes detectados en diferentes cepas de *Y. ruckeri* que afectan la truchicultura peruana, pueden servir como candidatos para estudios relacionados a vacunología reversa u otro programa cuyo objetivo sea el desarrollo de vacunas, sistemas de delivery de antígenos y otras herramientas para un mejor manejo de la salud de las truchas arcoíris cultivadas en el Perú.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificó molecularmente mediante PCR que los 7 genes estudiados en esta investigación estuvieron presentes dentro de las 53 cepas de *Y. ruckeri* aisladas de trucha arcoíris.
- Los genes cromosomales *uvrY*, *barA*, *yh1A*, *yrpA* tuvieron una frecuencia de 98%, 92%, 92% y 96% respectivamente siendo los más frecuentes en los aislados de *Y. ruckeri*.
- El perfil 2, que tiene la presencia de los genes *barA*, *uvrY*, *yh1A*, *yrpA*, *rucC* y *yrp1*, es el más frecuente en las cepas patogénicas aisladas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) procedentes de piscigranjas de Junín y Lima.

IX. RECOMENDACIONES

- Debido a que este estudio es de tipo exploratorio, se sugiere que en futuras investigaciones se incremente el tamaño muestral y se incluya otras localidades con diferentes sistemas productivos.
- Realizar ensayos de infección convencional (desafíos intraperitoneales y por inmersión) así como de evaluación de expresión (transcriptómica o proteómica) de los genes detectados para determinar si algún perfil encontrado en este estudio es adecuado para predecir la virulencia de estos aislados de *Y. ruckeri*.
- Seguir estudiando estas u otras combinaciones de genes de virulencia de *Y. ruckeri* aisladas de otras zonas geográficas del Perú relacionando los genes de virulencia con los signos clínicos, a fin de enriquecer la información y comprender mejor la diversidad de estos factores de virulencia que permita sentar las bases hacia el desarrollo de medidas eficaces y reproducibles de acuerdo con nuestra realidad.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avcı H., Birincioglu SS. 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.
2. Austin DA., Robertson PA., Austin B. 2003. Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Syst Appl Microbiol 26: 127-131.
3. Barnes AC. 2011. Enteric red mouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: P. Woo y D. Bruno. (eds). Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections (pp. 484-511).
4. Bjorkli J. 2002. Protein and energy account in salmon, chicken, pig and lamb. M.Sc. Thesis, Norwegian University of Life Sciences (UMB), Norway.
5. Bravo S., Kojagura V. 2004. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. Bull Eur Ass Fish Pathol. 24(2): 104-108.
6. Brenner, D. J., Krieg Noel R., Staley J. T. & Garrity M., George G., 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
7. Buchmann K., Nielsen ME., Nielsen CV. 2003. Immune responses against *Yersinia ruckeri* have no effect on colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by *Gyrodactylus derjavini* (Mikailov, 1975). J Fish Dis 26: 183-186.

8. Busch RA., Lingg AJ. 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout. *J Fish Res Board Can* 32:2429–2432.
9. Colquhoun D. J., and H. Sorum. 1998. Outer membrane protein expression during in vivo cultivation of *Vibrio salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 8: 367–377.
10. Conchas R. F., M. L. Lemos, J. L. Barja, and A. E. Toranzo. 1991. Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2956–2962.
11. Cross A. S. 2008. What is a virulence factor? *Crit Care.*, 12(6), 196.
12. Dahiya I., Stevenson RMW. 2010. The UvrY response regulator of the BarA UvrY two-component system contributes to *Yersinia ruckeri* infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch Microbiol* 192:541–547.
13. Davies R. L. & Frerichs G. N. 1989. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *J. Fish Dis.* 12, 357 – 365.
14. Dawson AM., Trenchard D., Guz A. Small bowel tonometry: assessment of small gut mucosal oxygen tension in dog and man. *Nature* 1965; 206:943-4; PMID:5839858; <http://dx.doi.org/10.1038/206943b0>
15. Deekshit V.K., Jazeela K., Chakraborty G., Rohit A., Chakraborty A., Karunasagar I. 2019. Mismatch amplification mutation assay-polymerase chain reaction: A method of detecting fluoroquinolone resistance mechanism in bacterial pathogens. *Indian J Med Res*;149:146-50.

16. E.P. Lago, T.P. Nieto, R. Farto. 2012. Virulence Factors of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* strains associated with infections in turbot *Psetta maxima*. Dis Aquat Organ. 13;99(2):145-51. doi: 10.3354/dao02467. PMID:22691983.
17. Espinoza B. A. V. 2013. Estudio polifásico del patógeno de peces *Yersinia ruckeri*. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/7272>
18. Faraldo-Gómez J. D. and Sansom M. S. P. 2003. Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4: 105-116.
19. FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y acuicultura 2014. Oportunidades y desafíos. Roma 272 pp.
20. FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
21. Fernandez L., Secades P., Lopez J. L, Marquez I., and Guijarro J. A. 2002. Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. Microbiology 148:2233–2243.
22. Fernandez L., Lopez JR., Secades P., Menéndez A., Márquez I., Guijarro JA. 2003. *In vitro* and *in vivo* studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. Appl Environ. Microbiol. 69,7328–7335.
23. Fernández L., Márquez I., Guijarro JA. 2004. Identification of specific *in vivo*-induced (ivi) genes in *Yersinia ruckeri* and análisis of ruckerbactin, a

- catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5199-5207.
24. Fernández L., Prieto M., Guijarro J. 2007. The iron- and temperature-regulated haemolysin YhlA is a virulence factor of *Yersinia ruckeri*. *Microbiology.* 153, 483–489.
25. Fernández L., Secades P., Lopez JR., Márquez I., Guijarro JA. 2002. Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: Insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology.* 148, 2233–2243.
26. Mesías F, Gerpe D, Llanco L, SerranoMartínez E, Romalde JL. 2020. Draft genome sequence of *Yersinia ruckeri* strain FMV-22, isolated from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Microbiol Resour Announc* 9:e01389-19
27. Fricke WF., Welch TJ., McDermott PF., Mammel MK., LeClerc JE., White DG., Cebula TA., Ravel J. 2009. Comparative Genomics of the IncA/C Multidrug Resistance Plasmid Family. *J. Bacteriol.* 191: 4750–4757.
28. Gibello A., Blanco MM., Moreno MA., Cutuli MT., Domenech A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal JF. 1999. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 346-350.
29. Glenn RA., Taylor PW., Pelton EH., Gutenberger SK., Ahrens MA., Marchant LM., Hanson KC. 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.

30. Guijarro J., García-Torrico A., Cascales D., Méndez J. 2018. The Infection Process of *Yersinia ruckeri*: Reviewing the Pieces of the Jigsaw Puzzle. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 218.
31. Hanlon GW., Hodges NA., Russell AD. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J Gen Microbiol* 1982; 128:845-51; PMID:6750040
32. Horne MT., Barnes AC. 1999. Enteric red mouth disease (*Yersinia ruckeri*) In: Woo PTK, Bruno DW, editors. Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections. Wallingford: CABI Publishing. pp. 445–477.
33. Hunter VA., Knittel MD., Fryer JL. 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 3:467–472.
34. Konkel ME & Tilly K. 2000. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2, 157–166.
35. Kumar G., Menanteau-Ledouble S., Saleh M., El-Matbouli M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *Veterinary Research.* 46 (1): 103.
36. Lebrun I., Pereira A. S., Pereira A., Perpetuo E. A. 2009. Bacterial Toxins: An Overview on Bacterial Proteases and their Action as Virulence Factors. *Mini Rev Med Chem,* 9(7), 820–828.
37. Liu Z, Yang M, Peterfreund GL, Tsou AM, Selamoglu N, Daldal F, Zhong Z, Kan B, Zhu J. *Vibrio cholerae* anaerobic induction of virulence gene

- expression is controlled by thiol-based switches of virulence regulator AphB. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108:810-5; PMID:21187377; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014640108>
38. Llanto E., Penttinen R., Banford H. 2014. Comparing the different morphotypes of a fish pathogen – implications for key virulence factors in *Flavobacterium columnare*. BMC Microbiology 14:170
39. Madigan M. T. and Martinko J. M. 2006. Brock Biology of Microorganisms. 11 ed. Pearson Prentice Hall. Lebanon, USA.
40. Méndez J, Guijarro JA. In vivo monitoring of *Yersinia ruckeri* in fish tissues: progression and virulence gene expression. Environ Microbiol Rep 2013; 5:179-85; PMID:23757147; <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12030>
41. Méndez J, Reimundo P, Pérez-Pascual D, Navais R, Gómez E, Guijarro JA. A novel *cdsAB* operon is involved in the uptake of L-cysteine and participates in the pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. J Bacteriol. 2011; 193:944-51; PMID:21169490; <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01058-10>
42. [MINAGRI]. 2014. Crecimiento de la producción (TM) de las principales especies de la acuicultura peruana-2014. Lima 5 pp.
43. Miyoshi S, and S Shinoda. 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbiol. Infect. 2:91–98
44. Montesinos J. 2018. Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del Lago Titicaca [Tesis para optar el grado de maestro en Sanidad Acuicola]. Repositorio institucional

de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

<https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/3862>

45. Nash, J., Findlay, W., Luebbert, C., Mykytczuk, O., Foote, S., Taboada, E., Brown, L. (2006). Comparative genomics profiling of clinical isolates of *Aeromonas salmonicida* using DNA microarrays. *BMC Genomics*, 7, 43.
46. Navais R., Méndez J., Pérez-Pascual D., Cascales D., Guijarro JA. 2014. The *yrpAB* operon of *Yersinia ruckeri* encoding two putative U32 peptidases is involved in virulence and induced under microaerobic conditions. *Virulence*. 5, 619–624.
47. Neilands J. B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* 270: 26723-26726.
48. 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:e89672.
49. Palomino R. 2008. Identificación de lesiones anatomohistopatológicas y aislamiento bacteriológico de Truchas Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la provincia de Melgar en el Departamento de Puno. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
50. Pessoa R. Marques D., Lima R., Oliveira M. 2020. Molecular Characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas spp.* Isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). *Microbial Pathogenesis* 147 (2020) 104273.

51. Preeti M., Partha B., Kumar A., Saha A. 2022. Detection of Virulence-Associated Genes and in vitro Gene Transfer From *Aeromona sp.* Isolated From Aquatic Environments of Sub-Himalayan West Bengal. *Front. Vet Sci* 9: 9:887174 doi: 10.3389/fvets.2022.887174.
52. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016. Anuario estadístico pesquero y acuícola 2015. Ministerio de la Producción. Perú. 196p.
53. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2018. Diagnóstico de vulnerabilidad actual del sector pesquero y acuícola frente al cambio climático. Tomo 3: Diagnostico actual del sector pesca y acuicultura. 88p.
54. 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 *Bacillus licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis* 26: 495-498.
55. Rodgers CJ. 1992. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. *J Fish Dis* 15:243–254
56. Reid GC, Woods DR, Robb FT. Peptone induction and rifampin-insensitive collagenase production by *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* 1980; 142:447-54; PMID:6247322
57. Ross AJ., Rucker RR., Ewing WH. 1966. Description of a bacterium associated with red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Can J Microbiol.* 12:763–770.

58. Romalde JL., Toranzo AE. 1993. Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric red mouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiol Lett. 112:291–300.
59. [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2016). Resultados del programa de vigilancia de la sanitaria 2016. 3p.
60. Secades P., B Alvarez, and J. A. Guijarro. 2001. Purification and characterization of a psychrophilic calcium induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Appl. Environ. Microbiol. 67:2436–2444.
61. Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N. 2017. Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. Indian J Microbiol, 57(1), 1–10.
62. Sierralta V. J., León I., De Blas A., Bastardo J., Romalde T., Castro y E., Mateo. 2013. Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. Revista Aqua TIC. 38: 28-45.
63. Straley S C & Perry R D. 1995. Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. Trends Microbiol 3, 310–317.
64. Tobbäck E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F., Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis. 30:257–268.
65. Tobbäck E., Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F., Chiers K. 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ 84: 219-28.

66. Tobback E., Decostere A., Hermans K., Van Den Broeck W., Haesebrouck F., Chiers K. 2010. In vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis 33: 197-209.
67. Wang Q., Lin N., Yuan L., Isolation, identification, major virulence genes and pathogenicity of *Yersinia ruckeri* from *Micropterus salmoides*. 2020. Journal of Fisheries of China 46(5): 825-835
68. Welch TJ., Fricke WF., Mcdermott PF., White DG., Rosso M., Rasko DA. *et al.*, 2007. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. PLoS ONE 2:e309.
69. Willumsen B. 1989. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis 12:275–277.
70. Wrobel A, Leo J, Linke D. 2019. Overcoming Fish Defences: The Virulence Factors of *Yersinia ruckeri*. Genes 10(9): 1-20.
71. Yidan H., Adamek M., Walker C., Runge M., Steinhagen D. 2014. In vitro citotoxicity and multiplex PCR detection of virulence factors of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout in North West Germany. Berl Munch Tierrztl Wochenschr. May – Jun; 127(5-6):233-42.
72. Zachary J. F. 2017. Mechanisms of Microbial Infections. In M. D. McGAVIN and J. F. ZACHARY (Eds.), Pathologic Basis of Veterinary Disease, 6th ed., pp. 510–512. Elsevier.