



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE *Aeromonas salmonicida*
PATÓGENA AISLADA DE LA SIERRA
PERUANA MEDIANTE MLST.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

JEFERSON NUÑURE ORTEGA

LIMA - PERÚ

2023

ASESOR DE TESIS

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

JURADO DE TESIS

DR. CARLOS MARTIN SHIVA RAMAYONI

PRESIDENTE

MG. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR

VOCAL

DRA. FRANCESCA SCHIAFFINO SALAZAR

SECRETARIA

DEDICATORIA

To my dear parents & siblings

To my advisor & teachers

A mis buenos amigos

To granny Bartola

Para la Nenush

A 松原みき

A Violet

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Fermina y a mi padre Álvaro por su afecto infinito, por los miles de consejos durante toda mi vida, por ser mi modelo de valores y superación constante.

A Sofía, mi hermana mayor, por brindarme su invaluable apoyo en mi vida universitaria. A Manuel, mi hermano mayor, por ser la persona que me inculcó las ganas de aprender.

Al equipo del Laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia especialmente al Dr. Serrano-Martínez, por sus palabras, paciencia y comprensión. Al Dr. Llanco por la ayuda y coasesoría en la elaboración de tesis.

A los buenos amigos de mi etapa universitaria y mi etapa laboral, especialmente a Mauro, José, Carlos, María Teresa, Gabriela, Rodolfo, Luis, Petter, Stephanie, Fernanda, Alfredo y Vianney. Gracias por la amistad y por todo su apoyo para la ejecución de esta investigación.

Finalmente, agradezco al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y la financiación de CONCYTEC - CienciActiva por posibilitar la subvención, la formación y la ejecución de la tesis.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Esta tesis de investigación tiene como objetivo principal la obtención del grado académico de Magister en Sanidad Acuícola y fue realizada mediante la subvención proporcionada al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia realizada por CienciActiva - CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015-FONDECYT-DE-PROMOCION 3).

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Aeromonas salmonicida* PATÓGENA AISLADA DE LA SIERRA PERUANA MEDIANTE MLST

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	diposit.uv.edu Fuente de Internet	1%
2	coek.info Fuente de Internet	<1%
3	nportal0.urv.cat:18080 Fuente de Internet	<1%
4	www.nfacc.ca Fuente de Internet	<1%
5	hal.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1%
6	link.springer.com Fuente de Internet	<1%
7	www.centerforproducesafety.org Fuente de Internet	<1%
8	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.	MARCO TEÓRICO	4
	3.1. Panorama Acuícola Contemporáneo	4
	3.1.1. Estado actual del sector Acuícola Mundial	4
	3.1.2. Estado actual del Sector acuícola nacional	7
	3.2. La trucha como especie acuícola	10
	3.2.1. Características generales de la trucha	10
	3.2.2. Cultivo de la trucha arcoíris	12
	3.3. Enfermedades de la trucha de cultivo	14
	3.4. Enfermedad por <i>Aeromonas</i> sp.: Aeromoniasis	15
	3.4.1. Caracterización y taxonomía de <i>Aeromonas</i>	16
3.4.2.	Genes <i>housekeeping</i> de <i>Aeromonas</i>	18
	3.5. <i>Aeromonas</i> sp. patógenos de salmónidos	19
	3.5.1. <i>Aeromonas salmonicida</i> causante de forunculosis	19
	3.5.2. Infección por otras especies de <i>Aeromonas</i>	21
3.6.	Identificación de especies de <i>Aeromonas</i>	23
	3.6.1. Identificación mediante características fenotípicas	23
	3.6.2. Identificación mediante análisis molecular y de filogenia	24
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	27
V.	HIPÓTESIS	28
VI.	OBJETIVOS	29
	6.1. Objetivo general	29
	6.2. Objetivos específicos	29
VII.	METODOLOGÍA	30
	7.1. Lugar de estudio	30
	7.2. Tipo de estudio	30

7.3.	Criterios de inclusión y exclusión	30
7.4.	Tamaño de la muestra	31
7.5.	Colecta y procesamiento de datos	32
7.5.1.	Reactivación de cepas bacterianas	32
7.6.	Extracción de ADN	33
7.7.	Procesamiento de datos: Ensamblaje de genomas	34
7.8.	Recuperación de genes <i>housekeeping</i>	35
7.9.	Análisis MLST	36
7.10.	Consideraciones éticas	37
VIII.	RESULTADOS	38
8.1.	Secuenciación y ensamblaje de genomas	38
8.2.	Detección de los genes <i>housekeeping</i>	40
8.3.	Alineamiento múltiple de secuencias	41
8.4.	Relación filogenética - análisis MLST	42
IX.	DISCUSIÓN	45
X.	CONCLUSIONES	54
XI.	RECOMENDACIONES	54
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
XIII.	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cosecha de especies acuícolas del Perú por tonelada métrica (TM), en el periodo 2011-2020 (PRODUCE, 2021)	7
Tabla 2. Valores óptimos de los parámetros del agua para el cultivo de trucha arcoíris (Tabla elaborada a partir de diversos autores referenciados)	12
Tabla 3. Principales naciones productoras de trucha por tonelada métrica (TM), periodo 2014-2018 (PNIPA, 2020)	13
Tabla 4. Procedencia de los genomas de las bacterias aisladas en este estudio	38
Tabla 5. Detección de los genes <i>housekeeping</i> en cada genoma ensamblado	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Volumen productivo global de pesca y acuicultura calculado en millones de toneladas para el período 1950–2020 (FAO, 2022)	6
Figura 2. Producción de recursos hidrobiológicos de acuicultura por especie en 2020 (PRODUCE, 2021)	8
Figura 3. Trucha arcoíris o “rainbow trout” (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10
Figura 4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud reconstruido con secuencias concatenadas asociadas a los genes <i>housekeeping recA</i> , <i>gyrB</i> , <i>metG</i> , <i>gltA</i> , <i>groL</i> y <i>ppsA</i>	44

RESUMEN

La trucha arcoíris es una importante especie acuícola del Perú que es afectada por *Aeromonas* sp. Para la identificación de *Aeromonas* se recomienda un análisis fenotípico, molecular y de filogenia. El MLST (*Multilocus Sequence Typing*) permite tipificar, establecer asociaciones y relaciones interespecie mediante secuenciación de genes de mantenimiento. El presente estudio descriptivo-interpretativo evaluó la diversidad genética y relacionó 11 cepas patógenas de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp., procedentes de truchas arcoíris afectadas de las regiones de Cajamarca (3), Puno (2), Junín (5) y Ancash (1), usando seis (6) genes *housekeeping* (*recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA*) y datos del *Aeromonas* MLST Databases. Se identificó las cepas por ARNr 16S, luego se realizó secuenciación, ensamblaje de genomas, detección de genes *housekeeping*, alineamiento múltiple y relación filogenética por MLST. El análisis MLST halló que las cepas *Aeromonas salmonicida* 10, 12 (Cajamarca) y 11 (Junín) forman un grupo monofilético muy relacionada a la cepa 6 (Áncash), pero la *A. salmonicida* cepa 7 (Puno) forma un brazo filogenético diferenciado, mientras las cepas *Aeromonas* sp. 2, 3, 4, 5 (Junín) y 9 (Puno) forman otro clado superior. La cepa patógena *Aeromonas* sp. 1 (Cajamarca) forma un clúster diferente mientras la cepa 8 no se relacionó a *Aeromonas*. Se concluyó que los genes *housekeeping* analizados son adecuados para reconstruir relaciones de parentesco entre poblaciones de *Aeromonas*; además, la diversidad genética de las cepas *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. analizadas mostró asociación en dos grandes grupos circulantes, en la sierra norte y sierra centro del Perú, respectivamente.

Palabras clave: MLST, *Aeromonas*, truchas, acuicultura, Perú.

ABSTRACT

Rainbow trout is an important aquaculture species in Peru which is affected by *Aeromonas* sp. For the identification of *Aeromonas*, a phenotypic, molecular, and phylogeny analysis is recommended. MLST (*Multilocus Sequences Typing*) allows typifying, establishing associations, and interspecies relationships through *housekeeping* gene sequencing. This descriptive- interpretative study reclassified and evaluated genetic diversity and related 11 pathogenic strains *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas* sp., from diseased rainbow trout from Cajamarca (3), Puno (2), Junín (5), and Ancash (1), using six (6) *housekeeping* genes (*recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL*, and *ppsA*) and data from *Aeromonas* MLST Databases. The strains were identified by means of 16S rRNA, then sequencing, genome assembly, *housekeeping* gene detection, multiple alignments, and phylogenetic relationship by MLST were performed. The MLST analysis found that *Aeromonas salmonicida* strains 10, 12 (Cajamarca) and 11 (Junin) form a monophyletic group closely related to strain 6 (Ancash), however, *A. salmonicida* strain 7 (Puno) forms a differentiated phylogenetic branch, while the *Aeromonas* sp. 2, 3, 4, 5 (Junin) and 9 (Puno) form another superior clade. The pathogenic strain *Aeromonas* sp. 1 (Cajamarca) forms a different cluster while strain 8 was not related to *Aeromonas*. It was concluded that the analyzed *housekeeping* genes are adequate to reconstruct kinship relationships between populations of *Aeromonas*; furthermore, the genetic diversity of strains *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas* sp. showed association in two large circulating groups, in the northern and central highlands of Peru, respectively.

Keywords: MLST, *Aeromonas*, trout, aquaculture, Peru.

I. INTRODUCCIÓN

El sector acuícola es el área de producción alimenticia de mayor crecimiento a nivel global. Los productos más importantes de la acuicultura peruana son truchas arcoíris, concha de abanico y langostino patiblanco (FAO, 2022; PRODUCE, 2021). Dentro de las patologías más importantes que desfavorecen la crianza de especies acuícolas como las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) se encuentra la infección causada por diferentes especies patógenas del género *Aeromonas*, también denominado Aeromoniasis, esta patología genera retardo progresivo del crecimiento, mermas productivas por mortandad en truchas cultivadas además de significativas pérdidas económicas (Noble *et al.*, 2020; Nuñure *et al.*, 2021). La Aeromoniasis presenta como especies patógenas principales a la especie no motil *Aeromonas salmonicida* la cual genera forunculosis, y a especies móviles de *Aeromonas* como *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. bestiarum*, entre otras cepas patógenas que originan la Septicemia ocasionado por *Aeromonas* Móviles (Janda y Abbott, 2010; Zepeda-Velásquez, 2015b; Latif-Eugenin, 2016; Mesías *et al.*, 2020). En el Perú, se aisló e identificó diferentes cepas patógenas como *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas hydrophila* gracias a las investigaciones publicadas por IMARPE (2008), Mesías *et al.* (2020) y Nuñure *et al.* (2021), de muestras tomadas de truchas cultivadas con signología clínica de enfermedad en diversas regiones del Perú. Por consiguiente, el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, autoridad sanitaria nacional, incluyó a la Aeromoniasis, enfocado en la detección molecular de *Aeromonas salmonicida*, en el Plan Oficial de Vigilancia de Enfermedades de Recursos Hidrobiológicos en el periodo 2020 - 2021 (SANIPES, 2020).

Las especies bacterianas *Aeromonas* sp. patogénicas son cocobacilos Gram negativos que generan signos clínicos de enfermedad como conducta letárgica, natación errática, anorexia, áreas de melanosis, asimismo lesiones externas como úlceras epiteliales, distención del abdomen, zonas necróticas y hemorrágicas en aletas, además de lesiones internas como hemorragia en diferentes órganos y cuadros septicémicos (Noga, 2010; Noble *et al.*, 2020). En el ámbito nacional las investigaciones realizadas sobre cepas patógenas de *Aeromonas* sp. en truchas arcoíris de acuicultura lograron aislar, caracterizar por pruebas bioquímicas, identificar molecularmente *Aeromonas salmonicida* por 16S y *fstA* (IMARPE, 2008; Nuñure *et al.*, 2021) así como identificar factores de virulencia (Toro, 2020) y genes de resistencia antimicrobiana (Hurtado, 2019), y reportar el borrador del genoma de *A. sobria* (Mesías *et al.*, 2020). No obstante, aún no se ha llevado a cabo una investigación vinculada a diversidad genética de cepas de *Aeromonas* sp. patógenas, especialmente *Aeromonas salmonicida*, aisladas de truchas arcoíris cultivadas en la acuicultura nacional mediante el análisis de genes *housekeeping* (*recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA*) por MLST (*Multilocus Sequence Typing*), para analizar características de diversidad genética y la relación filogenética entre cepas como en los estudios realizados por Martino *et al.* en el 2011, Roger *et al.* en el 2012, Craveiro en el 2013 y Navarro y Martínez-Murcia en el 2018, lo cual permitirá tener un mayor entendimiento de la biodiversidad genética de *Aeromonas* sp. y complementará futuros estudios para el control de la infección por Aeromoniasis en truchas.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Perú, la crianza de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es una de las actividades acuícolas económicamente más importantes, siendo el principal recurso hidrobiológico acuícola y representó más del 50% del total de la producción acuícola nacional, destinándose tanto al mercado interno como a la exportación (PRODUCE, 2021). Uno de los recurrentes problemas sanitarios de la truchicultura peruana es la infección ocasionada por cepas *Aeromonas sp.* patógenas, éstas han sido aisladas por diversos autores, en especial *A. salmonicida*, de piscigranjas de los andes peruanos asociándose a cuadros de mortalidad y perjuicio económico (IMARPE, 2008; Hurtado, 2019; Toro, 2020; Mesías *et al.*, 2020; Nuñure *et al.*, 2021) por esta razón SANIPES en 2016 incluyó a la infección por *Aeromonas* o Aeromoniasis dentro del Programa de Control de Infecciones de Animales Acuáticos. No obstante, para una fiable identificación taxonómica de *Aeromonas sp.* se realizan estudios fenotípicos, genotípicos y filogenéticos, por lo que se aconseja realizar un estudio de diversidad genética de cepas de *Aeromonas sp.* patógenas (Craveiro, 2013; Navarro y Martínez-Murcia, 2018; Fernández-Bravo y Figueras, 2020), en este caso se tomó como referencia el estudio de MLST de Martino *et al.* (2011) al no haber antecedentes de investigaciones nacionales similares en truchas. La importancia de efectuar este estudio de diversidad genética por MLST es entender la evolución geográfica de las cepas *Aeromonas sp.* de la sierra peruana, comprender la relación que existen entre estas diferentes cepas bacterianas, identificar y discriminar las cepas patógenas mediante el perfil alélico único que presentan y así obtener mayor información para prevenir y controlar la infección por *Aeromonas* en truchas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Panorama Acuícola Contemporáneo

3.1.1. Estado actual del sector Acuícola Mundial

Se denomina “acuicultura” a la crianza de animales acuáticos como peces, crustáceos y moluscos, además del cultivo de plantas y de diferentes tipos de macroalgas (FAO, 2020). En los últimos reportes de la situación global de la pesquería y rubro acuícola elaborados por FAO (2022) se menciona que la actividad acuícola se erige como un gran generador de productos alimenticios de procedencia acuática, realidad observada tanto para el continente asiático como a nivel mundial. Así, casi el 70% de los productos de la acuicultura mundial, actualmente, es producida dentro de Asia, y en 2020 se logró alcanzar la cifra productiva histórica de casi 88 millones de toneladas de recursos acuáticos pese a las repercusiones generadas por la época pandémica de la COVID-19 (FAO, 2022).

El sector acuícola ha crecido vertiginosamente, es así como solo en el año 2017 la acuicultura triplicó su volumen de producción de 34 millones de toneladas (año 1997) a 112 millones de toneladas. Las especies contribuyentes de hasta 75% de la producción acuícola, según datos de 2017, son algas, carpas, bivalvos, tilapia y bagre. La producción de peces y crustáceos marinos ha crecido rápido, pero son ampliamente superados por los volúmenes generados por bivalvos y algas marinas, así como por peces de origen dulceacuícola, estos últimos representan 75% del producto acuícola comestible, cuyo consumo representó el 17% de la proteína animal global ingerida (FAO, 2020; Naylor *et al*, 2021).

En 2020 el total de la producción acuícola global logró alcanzar el 49,2% de la producción mundial de animales acuáticos y para 2020 se consignó productividad mundial estimada de peces cercana a 87,5 millones de toneladas (Figura 1), de estos 54,4 millones del volumen productivo total provenían de la acuicultura de origen continental y 33,1 millones de toneladas provenían de la acuicultura de origen marino. China se mantiene, por mucho, como el más grande productor global de peces, aportando 35% de la productividad mundial en 2020, seguida de las Américas con 12%, Europa con 10%, África con 7% y Oceanía con 1% (Tacon, 2020; FAO, 2020).

Si analizamos específicamente el volumen productivo acuícola de región y países para el año 2017, Asia aportó 91% de la producción acuícola mundial gracias, sobre todo, a China, India, Indonesia y Vietnam; América generó el 3,2% cifras obtenidas principalmente por Chile, Brasil, Ecuador y Estados Unidos; Europa produjo 2,7% por la gran contribución de Noruega y España; mientras que el resto fue generado por África (2%) y Oceanía (menos del 1%). El valor de las especies cultivadas difiere del volumen producido debido al mayor precio en el mercado como los salmónidos de Chile y Noruega o los langostinos de Ecuador (FAO, 2020; OECD/FAO, 2020).

Luego de un continuo crecimiento, el mercado del rubro pesquero y acuícola declinó ligeramente en 2019, donde el sector acuícola creció un 2% pero la pesca de captura retrocedió 4%. Se proyecta que para el periodo 2020-2029, los precios de los peces permanecerán casi invariables, decrecerán en el caso de peces de captura y aumentarán ligeramente en especies acuícolas. Los futuros asuntos cruciales a tratar para el desarrollo económico acuícola serán el cambio climático y

las flexibilizaciones de las normativas para la exportación e importación del mercado chino, sobre todo en el contexto sanitario del COVID-19 (Barange *et al.*, 2018; OECD/FAO, 2020; FAO, 2020).

Es necesario recalcar que la acuicultura es el sector que produce una gran diversidad de alimentos y presenta una tendencia de continuo crecimiento; sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la productividad piscícola es depender ampliamente de la manufactura de alimentos para acuicultura con ingredientes comerciales importados, lo que limita su desarrollo y sostenibilidad (Tacon y Metian, 2015; Stevens *et al.* 2018). No obstante, también es necesario apreciar el papel fundamental del sector acuícola en seguridad alimentaria, así como del progreso económico y la calidad de vida de las regiones donde se cultivan especies acuícolas (Subasinghe *et al.*, 2009; Béné *et al.*, 2016).

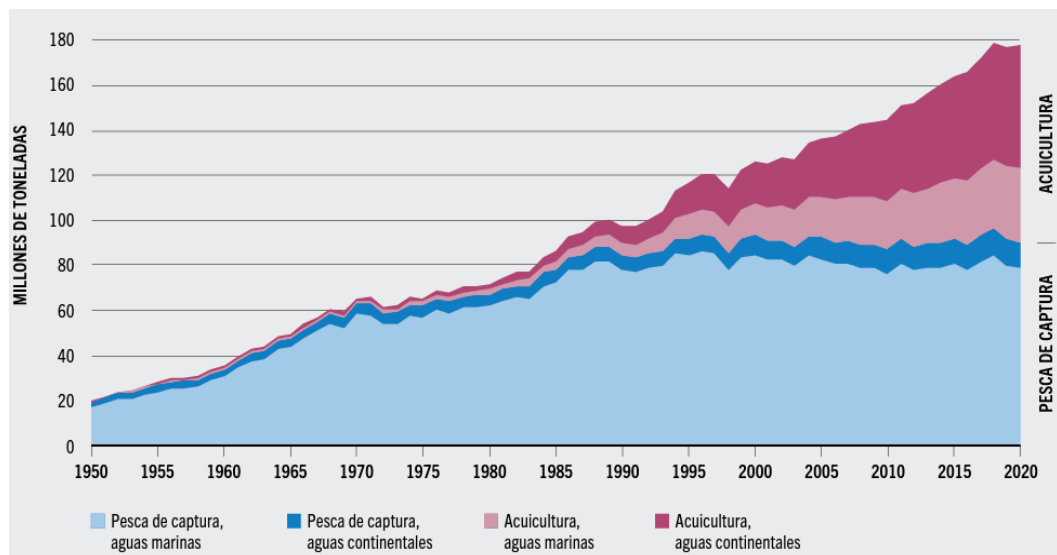


Figura 1. Volumen productivo global de pesca y acuicultura calculado en millones de toneladas para el período 1950–2020 (FAO, 2022).

3.1.2. Estado actual del Sector acuícola nacional

El sector acuícola mundial es un rubro con una producción creciente y el Perú con sus numerosas cuencas hidrográficas y diversos climas, que le permite albergar a un sinnúmero y variado conjunto de especies hidrobiológicas, no es ajeno a este auge productivo teniendo como recursos acuícolas a las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), langostinos peneidos (*Litopenaeus vannamei*), conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*), tilapias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) y peces de la Amazonía donde se puede observar al paiche (*Arapaima gigas*), gamitana (*Colossoma macropomum*), paco (*Piaractus brachypomus*) y otros (Tabla 1) (Berger, 2020; PRODUCE, 2021).

Tabla 1. Cosecha de especies acuícolas del Perú por tonelada métrica (TM), en el periodo 2011-2020 (PRODUCE, 2021)

Ámbito / Especie	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Total	92 201	72 293	125 693	115 269	90 976	100 191	100 455	141 216	161 279	143 830
Continental	23 609	29 564	40 068	38 683	45 758	58 771	61 028	70 164	56 949	61 003
Boquichico	15	35	56	6	9	31	58	29	6	48
Camarón Gigante de Malasia	13	11	20	78	21	34	26	29	60	27
Carachama	6	7	10	5	4	9	6	3	1	2
Carpa	8	19	6	2	4	4	5	4	0	-
Gamitana	522	453	531	504	299	1 863	1 047	952	787	881
Paco	130	299	443	453	825	1 390	1 624	2 184	1 871	2 165
Pacotana	12	17	15	9	219	11	35	14	-	-
Paiche	422	637	94	55	135	142	218	295	86	99
Tilapia	2 423	3 174	3 840	4 610	3 250	2 950	3 042	2 164	3 196	3 099
Trucha	19 962	24 762	34 992	32 923	40 946	52 245	54 878	64 372	50 793	54 188
Sábalo	95	46	58	37	33	87	84	113	148	494
Otros	0	102	3	1	12	4	6	4	1	0
Marítimo	68 592	42 730	85 625	76 586	45 218	41 420	39 427	71 052	104 330	82 827
Algas	-	146	44	3	2	1	2	1	-	-
Concha de Abanico	52 213	24 782	67 694	55 096	23 029	20 975	11 927	31 890	53 496	47 581
Langostino	16 379	17 801	17 883	21 484	22 183	20 441	27 492	39 153	50 820	35 233
Lenguado	-	1	3	3	4	3	7	9	15	13
Ostras del Pacífico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-

En 2020, la producción total de la acuicultura fue de 143830 de toneladas métricas (TM), donde el 42,4% eran de origen continental y 57,6% de origen marítimo, observándose una disminución general de 10,8% con respecto al

año 2019. Las especies de acuicultura más importantes eran truchas (37,7%), conchas de abanico (33,1%), langostino (24,5%) (Figura 2); observándose una importante disminución de 11,1% en la cosecha de concha de abanico y de 30,7% en langostino, pero un aumento de 6,7% en la cosecha de trucha. Es destacable el aumento de 15,7% en la cosecha de paco que ahora representa el 1,5% del global nacional (PRODUCE, 2021).

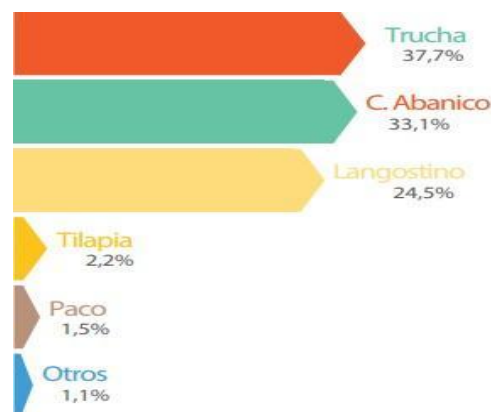


Figura 2. Producción de recursos hidrobiológicos de acuicultura por especie en 2020 (PRODUCE, 2021)

Las principales regiones productoras de especies acuícolas, según las toneladas producidas, son Piura con 44251 TM de la cosecha de concha de abanico, langostino y tilapia principalmente; Puno con 33962 TM (trucha), Tumbes con 31442 TM (langostino y tilapia) y Áncash con 8863 TM (concha de abanico, lenguado y trucha). La venta total de especies acuícolas fue de 48858 toneladas, donde 47799 toneladas son originarias de la acuicultura continental. La trucha aporta 42312 toneladas para la venta en el mercado interno nacional, percibiéndose un aumento con respecto al año 2019, de cerca del 4,9% para el recurso trucha y una contracción de 4,3% para el sector en forma general (PRODUCE, 2021).

En 2021, el volumen de exportación fue de 58580 TM y el valor total de la exportación de especies acuícolas fue de 338 643 229 US\$ FOB, liderado por el recurso concha de abanico y langostino, observándose una disminución de 1,2% en el volumen de exportación total, con respecto al 2019, con un notable incremento del 28,2% en el volumen exportado de tilapia. Los principales países de destino para la concha de abanico son Estados Unidos (39,9%), Francia (26,5%), y España (10,3%); y para el langostino son Estados Unidos (42,7%), Corea del Sur (15,7%) y España (8,5%) (PRODUCE, 2021; PROMPERU, 2021).

El sector acuícola nacional es considerado poco tecnificado, presenta una producción equivalente al 4% del total regional latinoamericano, ostenta un crecimiento constante y progresivo pero que es contrarrestado por diversas limitaciones como tecnología y baja capacidad instalada, organización logística y comercialización, limitado acceso al crédito, reducida capacidad de personal técnico y profesional, red de proveedores de servicios, infraestructura y servicios básicos deficientes, problemas sanitarios (FAO, 2016; Saldarriaga y Regalado, 2017; Ramírez-Gastón *et al.* 2018).

Gran parte de la acuicultura peruana es de subsistencia o autoconsumo, con un promedio de 3,5 TM y de menor escala o AREL, con escaso personal técnico calificado y deficientes buenas prácticas acuícolas. Pese a esto, el sector acuícola genera mayor empleabilidad que el pesquero, aunque a veces promueve la informalidad. Frente a esto, actualmente, existen fondos nacionales para promover los proyectos de desarrollo e innovación para el rubro acuícola (proyectos PNIPA), mejorar la sostenibilidad de la producción, el impacto social y la gobernanza de

áreas acuícolas (Calle Yunis, 2020; Mendoza, 2013; Garteizgogeoasca *et al.* 2020).

3.2. La trucha como especie acuícola

3.2.1. Características generales de la trucha

El volumen productivo global de truchas comprende diversas especies de salmónidos relacionadas entre sí, donde las truchas arcoíris o “rainbow trout” (*Oncorhynchus mykiss*) son el principal recurso acuícola del Perú. Dentro de las principales características conformacionales resalta el cuerpo largo de 30-60 cm., tipo torpedo, dorso con 1 aleta dorsal y 1 adiposa; 1 aleta caudal roma, 2 aletas ventrales, 1 anal y 2 pectorales. El macho en edad reproductiva desarrolla el característico gancho mandibular (figura 3). De dorso oliváceo, pero flancos claros con la distintiva franja iridiscente rojo-violácea y vientre plateado, con manchas negras en casi toda la extensión del cuerpo (Blanco, 1994; FONDEPES, 2014; FONDEPES, 2017).



Figura 3. Trucha arcoíris o “rainbow trout” (*Oncorhynchus mykiss*)

Es una especie dulceacuícola, criada en ríos, lagunas, *raceways* y sistemas de recirculación acuícola (RAS), cuyo ciclo productivo en el Perú comúnmente comprende la etapa de siembra y alevinaje de aproximadamente 3 meses, etapa

juvenil con una duración de 2 meses, finalizando con la etapa de engorde y cosecha de truchas adultas para consumo en un intervalo de 2 a 3 meses. Así, un ciclo productivo con una correcta alimentación, buenas prácticas acuícolas (BPA) y adecuada calidad de agua obtiene una trucha de 250g en unos 6 a 7 meses (Yapuchura, 2006; PNIPA, 2020).

Los principales parámetros físicos y químicos que se establecen para la calidad del agua en la crianza de truchas son la temperatura (aguas frías de 10 a 17°C, limpias y de corriente moderada), oxígeno disuelto (concentración entre 4,5 a 5,9 mg/L), potencial de hidrógeno (pH entre 6,5 a un máximo de 8,5), óptimos niveles de compuestos nitrogenados como amonio no-ionizado (menor de 0,02 mg/L), nitratos (menor de 100 mg/L) y nitritos (menor de 0,02 mg/L); y parámetros adecuados de dureza expresado en carbonato de calcio (valores entre 60 a 300 mg/l CaCO₃), alcalinidad (20 a 180 mg/l CaCO₃) y dióxido de carbono (menor a 5 ppm, partes por millón) (Tabla 2) (Iregui, 2007; INCAGRO, 2008; Salie *et al.* 2008; RAGASH, 2009; Woynarovich *et al.* 2011; Noble *et al.* 2012).

En la actualidad, la acuicultura de salmónidos tiene en cuenta también indicadores del bienestar animal y desarrolló herramientas para evaluar el bienestar piscícola, dentro de la cuales se distinguen indicadores basados en el ambiente como los indicadores cualitativos del agua y la corrección de los rangos óptimos y de tolerancia que satisfagan los requerimientos metabólicos; y los basados en el animal como la nutrición, alimentación y condición corporal adecuada, ausencia de factores estresantes, comportamiento anómalo y de lesiones, malformaciones o enfermedades que afecten la calidad de vida del pez (Duncan, 2005; Segner *et al.* 2012; Stien *et al.* 2013; Noble *et al.* 2020).

Tabla 2. Valores óptimos de los parámetros del agua para el cultivo de trucha arcoíris (Tabla elaborada a partir de diversos autores referenciados).

Parámetros	Valor óptimo	Parámetros	Valor óptimo
Temperatura (°C)	10 – 17	Amonio no ionizado, NH ₃	< 0,02
Oxígeno disuelto (mg/l)	4,5 - 5,9	Nitritos (mg/l)	< 0,02
Potencial de hidrógeno (pH)	6,5 - 8,5	Nitratos (mg/l)	< 100
Alcalinidad (mg/l CaCO ₃)	20 – 180	Nitrógeno amoniacal (mg/l)	< 0,012
Dureza (mg/l CaCO ₃)	60 – 300	Fosfatos (mg/l)	> 500
Dióxido de carbono, CO ₂ (ppm)	< 5	Plomo, Mercurio (mg/l)	0,03 - 0,05

3.2.2. Cultivo de la trucha arcoíris

Las truchas arcoíris son salmónidos que habitan naturalmente aguas frías de las regiones hidrográficas al norte de América, son una especie introducida, carnívora cuya crianza en acuicultura prosperó con el uso de alimento balanceado y que fue introducido en numerosos países (FAO, 2005-2021; Crawford y Muir, 2008). En 1925, la pesca deportiva introduce exitosamente a la trucha arcoíris en Junín y Pasco, para posteriormente ser criada en las alturas en pozas construidas de concreto o tierra con recaptación de aguas fluviales y dentro de balsas jaulas tendidos sobre aguas lacustres altoandinas (FONDEPES, 2006; FONDEPES, 2017).

La truchicultura mundial registra un notable aumento en sus cifras en el periodo desde 2009, produciendo 1683915 TM en el año 2018 y con un pico productivo en el año 2012 de 1751507 TM. En 2018, Perú se mantuvo como el 2° productor de trucha en América del Sur, superando a países de la región como Colombia y Ecuador; y como el 5° productor mundial de trucha, solo superado por Chile, Irán, Turquía y Noruega (Tabla 3). En 2019, el Perú obtuvo la 4° posición dentro de los

más grandes países exportadores de trucha fresca-refrigerada y filete de trucha congelada detrás de Noruega y Chile, pero superando a naciones como China, Reino Unido y Estados Unidos (FAO, 2020; PNIPA, 2020).

En la actual última década, la producción nacional de truchas arcoíris se desarrolló hasta 339,1% más, sobre todo por la adaptación y cultivo de este salmónido en balsas jaulas en Puno, zona del Lago Titicaca, la región con la producción truchícola más grande (33, 962 TM), seguido por Pasco (7,727 TM), Huancavelica (5,825 TM) y Junín (2,698 TM). Así, la truchicultura se presenta como una gran alternativa para el desarrollo socioeconómico y seguridad alimenticia en las regiones andinas. Sin embargo, su cultivo debe ser regulado por ser una especie introducida altamente invasora que pone en riesgo la diversidad de especies nativas (Salinas y Alarcón, 2017; Berger, 2020; PRODUCE, 2021).

Tabla 3. Principales naciones productoras de trucha por tonelada métrica (TM), periodo 2014-2018 (PNIPA, 2020)

N°	País	2014	2015	2016	2017	2018
1	Chile	151.773,00	94.717,00	84.607,00	76.971,27	78.446,16
2	Irán	126.515,00	140.632,00	163.325,00	167.830,00	179.684,00
3	Turquía	112.345,00	106.598,00	104.355,00	106.733,00	112.427,00
4	Noruega	68.910,20	72.921,39	87.774,50	66.902,33	68.215,80
5	Perú	32.923,40	40.946,50	52.245,50	54.878,43	55.030,20
6	Italia	31.300,07	31.300,00	35.000,00	35.000,00	32.825,65
7	Dinamarca	30.733,00	32.345,70	31.087,00	33.036,00	29.737,00
8	Francia	29.346,90	23.488,70	26.100,00	26.100,00	26.100,00
9	China	25.528,00	24.828,00	35.198,00	41.460,00	38.606,00
10	Rusia	25.005,00	24.431,00	28.837,00	33.806,00	35.204,00

En 2018, la producción truchícola peruana comercializó mayoritariamente (87,8%) en el mercado interno con la clásica presentación *pan size* de 200-350g, así como trucha asalmonada corte mariposa y filetes refrigerados; mientras que la exportación representó el 12,2% teniendo como principales destinos a Estados Unidos (17022 miles de dólares), Rusia, Canadá, Japón y Alemania, donde se comercializan mayormente como filetes congelados, pero también como trucha entera refrigerada, congelada, sin cabeza y eviscerada. Por otro lado, las grandes importaciones del sector acuícola son el alimento (70% del valor de la producción) y las ovas embrionadas de Estados Unidos, España y Dinamarca (PNIPA, 2020; PRODUCE, 2020).

Los desafíos de la producción de truchas en el Perú son el cambio climático, la correcta prevención y control de enfermedades, la dependencia de alimento importado con alto porcentaje de harina de pescado, producción nacional de ovas de calidad, la participación activa y cooperativa de instituciones del Estado, universidades, empresa privada, profesionales y productores para el desarrollo de la investigación, tecnología e innovación; la formalización de las unidades productivas, la preocupación medioambiental y el establecimiento de una industria nacional con miras a la exportación (FONDEPES, 2014; Garteizgogeoasca *et al.* 2020; PNIPA, 2020).

3.3. Enfermedades de la trucha de cultivo

Las principales enfermedades que afectan y merman, de forma importante y recurrente, la productividad y la acuicultura de las truchas arcoíris son de origen infeccioso. Las enfermedades de origen no infeccioso se desencadenan

generalmente por alteraciones en los parámetros cualitativos del agua, la nutrición y el manejo de la alimentación, así como instalaciones y prácticas acuícolas no idóneas para el desarrollo de los peces. Estas enfermedades, independientemente de su origen, surgen a menudo en sistemas de cultivo con grandes cantidades de peces y que viven en estrecha proximidad (EFSA, 2008; FONDEPES, 2017; Noble *et al.* 2020).

Dentro de las enfermedades infecciosas más frecuentes y de importancia relevante en la truchicultura se encuentran, sobre todo, afecciones de origen bacteriano y viral, y de forma secundaria, por hongos como la saprolegniasis y por parásitos como *Gyrodactylus salaris* (Noga, 2010; Noble *et al.*, 2020).

Así las patologías bacterianas de interés nacional comprenden la infección por *Aeromonas* sp. o Aeromoniasis, forunculosis por *A. salmonicida* y septicemia por *Aeromonas* móviles; asimismo, infección por *Flavobacterium psychrophilum*, *Yersinia ruckeri*, *Renibacterium salmoninarum* y *Weissella ceti*. Las infecciones virales por el Virus de la Necrosis Pancreática (IPN), Virus de la Septicemia Hemorrágica Viral (VHS), Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHN), Virus de la Anemia Infecciosa del Salmón (ISA), Virus de la Infección por Alfavirus de los salmónidos (AVS), Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHN) (Smith, 2019; Sanipes, 2020).

3.4. Enfermedad por *Aeromonas* sp.: Aeromoniasis

Las *Aeromonas* son bacterias ubicuas de ambientes acuáticos dulceacuícolas que son una preocupación constante para el sector de la acuicultura (Lázara, 2007; Noga, 2010). En 1891, Sanarelli aisló estas bacterias desde ganglios

septicémicos de ranas y denominándolo *Bacillus hydrophillus*, posteriormente en 1943, Steiner las denominó como “unidades que producen gas”, no obstante, en aquellas épocas la identificación y diferenciación entre especies no era fiable por lo que Colwell *et al.* en 1986 inició los estudios de asociación por ARNr 5S y 16S, y en la actualidad gracias a diversas reclasificaciones se reconocen más de 30 especies de *Aeromonas* (Martínez-Murcia *et al.*, 1992; Cipriano y Bullock, 2001; Farmer *et al.*, 2006; Austin y Austin, 2007; Latif-Eugenin, 2016).

La infección por las bacterias del género *Aeromonas* sp., denominada también Aeromoniasis es ocasionado principalmente por patógenos primarios como *Aeromonas salmonicida*, que es la principal especie que amenaza a la truchicultura ocasionando pérdidas económicas y mortandad grave, y *Aeromonas hydrophila*, así como otras especies patógenas secundarias como *A. bestiarum*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. sobria* entre otras especies enmarcadas dentro de las *Aeromonas* móviles, las cuales afectan a especies poiquilothermas como peces silvestres y de acuicultura, e incluso, a humanos no inmunocompetentes (Janda y Abbott, 2010; Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012; Latif-Eugenin, 2016; Zepeda-Velázquez *et al.*, 2017).

3.4.1. Caracterización y taxonomía de *Aeromonas*

De forma general, las especies bacterianas *Aeromonas* presentan una estructura o forma bacilar, no obstante, se evidencian formas tipo cocos e incluso, tipo cocobacilos; sus dimensiones oscilan en el rango de 1,3 - 2,0 x 0,8 - 1,3 micras (μm), la mayoría de especies móviles presenta flagelos, excluyendo a las subespecies de *Aeromonas salmonicida*, y no desarrollan el proceso de esporulación. Son anaerobios facultativos, Gram negativos, crecen óptimamente

entre 22 a 37°C en medios nutritivos, reaccionan positivamente frente a la prueba citocromo oxidasa, reducen nitratos y fermentan carbohidratos (Hiney y Olivier, 1999; Abbott *et al.*, 2003; Martin-Carnahan y Joseph, 2005).

El Manual Bergey indica que la Familia Aeromonadaceae está conformado por *Aeromonas*, *Tolumonas* y *Oceanimonas*; así el Comité Internacional en Sistemática de Procariotas (ICSP) aconseja que las *Aeromonas* sean clasificadas mediante estudios progresivos que incluyan el análisis fenotípico de morfología y caracterización bioquímica, la detección molecular 16S, análisis genotípico, la comparación filogenética y estudio de la diversidad genética de especies de *Aeromonas* usando MLST o ANI, que incluso ha permitido identificar subespecies en *A. salmonicida* y *A. hydrophila* (Stackebrandt *et al.*, 2002; Lázara, 2007; Figueras *et al.*, 2011; Latif-Eugenín, 2016; Navarro y Martínez-Murcia, 2018).

Descripción taxonómica de *Aeromonas* según el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Dominio	:	Bacteria
Phyllum	:	Proteobacteria
Clase	:	Gammaproteobacteria
Orden	:	Aeromonadales
Familia	:	Aeromonadaceae
Género	:	<i>Aeromonas</i>
Especies	:	<i>Aeromonas</i> sp.

3.4.2. Genes *housekeeping* de *Aeromonas*

Los genes *housekeeping* generan la codificación de proteínas con una función crucial para la sobrevivencia de especies bacterianas. Filogenéticamente presentan mayor información que el ARN ribosomal, con variaciones que se distribuyen por todo el gen y con una mayor tasa evolutiva por lo que son ideales para estudios filogenéticos en *Aeromonas*, para lo cual deben tener condiciones como estar contenidos en toda especie, no estar condicionado por la denominada HGT o Transferencia Horizontal Génica, que en el genoma se presente como única copia y tener por lo menos dos regiones conservadas para diseñar cebadores para PCR (Stackebrandt *et al.*, 2002; Harayama y Kasai, 2006).

A lo largo de los años se estudiaron y propusieron exitosamente un número considerable de genes *housekeeping* para diversas bacterias los cuales cumplían con los requisitos anteriormente mencionados, y posteriormente para el género *Aeromonas* se emplearon genes de DNA girasa subunidad β (*gyrB*), Citrato sintasa I (*gltA*), Metionil - tRNA sintetasa (*metG*), Chaperonina GroEL (*groL*), Fosfoenolpiruvasa sintasa (*ppsA*), Recombinasa A (*recA*), los cuales son usados en la presente investigación, entre otros 12 genes más usados por diversos autores (Yáñez *et al.* 2003; Sepe *et al.*, 2008; Martino *et al.*, 2011; Roger *et al.*, 2012; Navarro y Martínez-Murcia, 2018).

La importancia de los genes *housekeeping* en *Aeromonas* se evidencia por Yáñez *et al.* (2003) que investigó *gyrB*, el primer gen *housekeeping*, el cual también es un importante gen estructural, conocido por ser cronómetro molecular ideal para análisis filogenético en este género bacteriano. No obstante, el uso de un solo gen

genera un análisis limitado y poco fiable por lo que la asociación de *gyrB* con otros genes esenciales como *recA*, permitió agrupar de forma más certera entre especies, así también es posible detectar especies nuevas o reclasificar y agrupar especies mediante la secuenciación concatenada de más genes *housekeeping* por estudios MLPA y MLST (Martínez-Murcia *et al.* 2011; Martino *et al.*, 2011; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013; Latif-Eugenin; 2015).

3.5. *Aeromonas* sp. patógenos de salmónidos

3.5.1. *Aeromonas salmonicida* causante de forunculosis

Las bacterias de la especie *Aeromonas salmonicida*, son agentes etiológicos primarios causantes de forunculosis en salmónidos, se caracterizan por presentarse de forma bacilar o cocobacilar, microorganismos gramnegativos, no presentan movilidad y son facultativamente anaerobios (Boone *et al.* 2001; Aravena Román *et al.*, 2012). Dentro de esta especie se reconocen cinco subespecies las cuales se denominan *salmonicida*, *pectinolytica*, *achromogenes*, *smithia* y *masoucida*, asimismo son especies que tienen la capacidad de desarrollarse en temperaturas bajas, o psicrófilas lo cual le confiere, sobre todo a la subespecie *salmonicida* o “cepa típica”, un mayor potencial patológico en peces salmónidos que habitan ambientes dulceacuícolas fríos (Burr y Frey, 2007; Buller, 2014)

Debido a que las especies de *Aeromonas*, y en general el Orden *Aeromonadales*, son contantemente estudiadas y reclasificadas especialmente mediante análisis filogenéticos lo que progresivamente mejora el entendimiento de la inclusión, renombramiento y relacionamiento en estas especies; así, las

subespecies *pectinolytica*, *achromogenes*, *smithia* y *masoucida* son llamadas “aislados o cepas atípicas” de *Aeromonas salmonicida*, generalmente comparten las características de no motilidad, además de ser capaces de generar cuadros lesionales desde úlceras a infecciones sistémicas en peces como las truchas, y de desarrollarse en ambientes psicrófilos o, incluso, mesófilos (Reith *et al.* 2008; Janda y Abbott, 2010).

Dentro de las características fenotípicas relevantes de *A. salmonicida* se encuentran colonias circulares con medidas de 0,5 a 1 mm, tras incubación en un rango que comprende los 18 y 25° C, temperatura óptima también para expresión genética de sus factores de virulencia. Además, en el caso de la subespecie *A. salmonicida*, se observa una frecuente generación de una coloración marrón en medios con triptona como el agar tripticasa de soja (Brenner *et al.*, 2005; Daher *et al.*, 2011).

La forunculosis ocasionada por *A. salmonicida*, especialmente por la subespecie *salmonicida*, es una patología que causa alta morbilidad y puede generar mortalidad en truchas y salmones afectados. Esta compleja enfermedad tiene variadas formas de presentación de acuerdo al estatus sanitario, etario, ambiental y especie de salmónido afectado, cursando de forma subaguda a crónica con una infección que desarrolla forúnculos sobre la piel y musculatura de los especímenes infectados (Janda y Abbott, 2010; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

Los individuos adultos generalmente desarrollan una variante subaguda-crónica con progresión lenta de signología y media a baja mortalidad, presentando superficie epitelial oscurecida o melanótica, anorexia, hipoactividad y aletas

hemorrágicas (Boyd *et al.*, 2003; Austin y Austin, 2007). Por otro lado, la infección aguda, principalmente vista en animales jóvenes, causa en la mayoría de casos un cuadro de septicemia con cuadros lesionales que incluyen zonas epiteliales necróticas y hemorragias multifocales lo cual tiende a ocasionar una abrupta y elevada mortalidad, sin demostraciones tan observables de signos clínicos severos con la excepción de letargia, inapetencia y melanosis (Burr *et al.*, 2005; Plumb y Hanson, 2011).

Se menciona que existe una forma latente donde los organismos portan sub-clínicamente al patógeno, lo cual genera que la enfermedad genere brotes estacionales o pase desapercibida pero arraigada a ciertos ambientes dulceacuícolas, donde afecta a peces silvestres como también a las de acuicultura a través del contacto y diseminación de animales y tejidos infectados, siendo los salmónidos los que desarrollan los más susceptibles, motivo por el que se busca generar prototipos de vacunas contra la infección por forunculosis, sin embargo estas opciones tienden a no poder ser costeadas por el productor o encarecer el producto final, por lo que deben ser medidas de prevención que se manejen en conjunto con la entidad sanitaria correspondiente (Bergh, 2008; Cipriano y Austin, 2011; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

3.5.2. Infección por otras especies de *Aeromonas*

Es de amplio conocimiento que el género *Aeromonas* presenta diversas especies que son habitantes ubicuos de diversos ambientes acuáticos tanto marinos como dulceacuícolas, incluso también puede ser parte de la microbiota que recubre la superficie corporal y estar presente incluso en el tracto intestinal de peces; no

obstante, otras especies de *Aeromonas* pueden comportarse como patógeno primario y causar la infección Septicemia por *Aeromonas* Móviles (MAS) que es el caso de *Aeromonas hydrophila*, o como patógenos secundarios oportunistas donde se incluyen patógenos como *Aeromonas sobria*, *A. veronii*, *Aeromonas bestiarum*, *A. caviae*, entre otros (Noga, 2010; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013; Buller, 2014).

La Septicemia por *Aeromonas* Móviles es un cuadro que cursa con signología septicémica y hemorrágica, la presentación de otros signos clínicos progresivos está condicionados a factores como el estadio de vida, espécimen, virulencia del patógeno, condiciones estresantes y variables ambientales. Este tipo de Aeromoniasis es caracterizada por desarrollar signología clínica a subclínica, de tipo oportunista, con tendencia a la progresión crónica presentando ulceraciones superficiales y mionecrosis focales a multifocales, anorexia, nado anormal e hinchazón, además es posible observar la infección en peces de agua salada, estuarina y dulce (Brown, 2000; Harikrishnan y Balasundaram, 2005; Kozińska, 2007; Zepeda-Velásquez, 2015a).

La patogenicidad experimental de cepas de *Aeromonas* en alevines de truchas de cultivo fue estudiada por Zepeda-Velásquez *et al.* (2017), donde se pudo apreciar mortalidad cercana al 9% por *A. bestiarum* y *A. veronii*, con letalidad alrededor del 12% causada por *A. hydrophila* y 19 % originada por *A. salmonicida*. La permanencia de la enfermedad en salmónidos, otros peces, animales hospederos y ambiente acuático generan un punto de quiebre en la inmunidad de peces susceptibles. Para un diagnóstico fiable de los agentes patógenos se prefiere la detección por pruebas moleculares, ya que la signología puede ser inespecífica (Yang *et al.*, 2008; Meik *et al.*, 2011; Buller, 2014; Navarro y Martínez-Murcia,

2018).

3.6. Identificación de especies de *Aeromonas*

3.6.1. Identificación mediante características fenotípicas

La caracterización por rasgos fenotípicos relevantes y comunes a *Aeromonas* sp. incluye la observación de la forma tipo bacilo o cocobacilo, microorganismos Gram negativos, con fisiología asociada a la anaerobiosis facultativa, tolerancia a la salinidad de hasta 10% en medio nutricional, desarrollo en temperaturas con rangos máximos de 1 a 44°C, crecimiento en sustratos generales como el agar tripticasa de soja, y presentación de hemólisis en agar sangre, fermentación y oxidación de carbohidratos como la glucosa, reacción citocromo oxidasa positiva y no son capaces de producir ácido de inositol (Janda y Abbott, 2010; Buller, 2014).

Los sustratos selectivos como agar GSP o *Glutamate Starch Phenol Agar* permiten el crecimiento y diferenciación de especies de *Aeromonas* sp. mediante el viraje del medio rojo inicial a un medio amarillo, ocasionado por el consumo del almidón. No obstante, pese a que las pruebas bioquímicas automatizadas y no automatizadas pueden dar alcances preliminares para la identificación, no representan un diagnóstico fiable. Por lo tanto, se prefiere un diagnóstico confirmatorio mediante análisis moleculares y bioinformáticos (Havelaar *et al.* 1987; Buller, 2014; Navarro y Martínez-Murcia, 2018).

3.6.2. Identificación mediante análisis molecular y de filogenia

Para identificar y detectar especies de *Aeromonas* sp. se utilizan técnicas moleculares iniciales con base en una molécula marcadora estable como el gen marcador ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) que permite el diseño de cebadores universales, así como comparar o diferenciar especies interrelacionadas; sin embargo, la gran similitud de secuencias con especies cercanamente relacionadas y la presencia de heterogeneidad hacen que este gen no sea tan apropiado para la identificación de *Aeromonas* spp. (Fernández-Bravo y Figueras, 2020). Este tipo de identificación y comparación mejoró con la aparición del MALDI-TOF MS, que detecta proteínas asociadas a ARNr 16S, pero la adición de la secuenciación previa de *rpoB* por Chen *et al.*, (2014) y de *gyrB* por Shin *et al.*, (2015) generaron una identificación de 100-98,5% a nivel del género y de 97-92,3% a nivel de la especie, con la limitación de la actualización frecuente de la base de datos MALDI-TOF.

Otras alternativas para la detección usando métodos moleculares basados en gen ARNr 16S es el uso de variantes de PCR punto final y PCR tiempo real, Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción o RFLP, y el tipado molecular como ERIC-PCR. Además, la asociación de métodos moleculares con análisis bioinformáticos a través de secuencia de genes y genomas donde, inicialmente, el estudio de genes *housekeeping* a través de MLST o Tipificación Multilocus de Secuencias y el Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA) genera información relevante para la clasificación y asociación interespecies de forma ágil y fácil, comparado al uso de *Average Nucleotide Identity* (ANI) y la hibridación ADN-ADN *in silico* (DDHis) (Zepeda-Velásquez, 2015b; Latif-Eugenín, 2016; Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

En el ámbito nacional diversos investigadores identificaron cepas de *Aeromonas* patógenas de diversas regiones utilizando en un inicio técnicas de caracterización bioquímica y posteriormente emplearon marcadores moleculares como 16S (IMARPE, 2008), *fst* o receptor sideróforo férrico de *Aeromonas* (Nuñire *et al.*, 2021), además otros investigadores asociaron genes de resistencia antimicrobiana (Hurtado, 2019), y marcadores moleculares para factores de virulencia (Toro, 2020) hasta incluso se logró obtener el borrador del genoma completo de *Aeromonas sobria* (Mesías *et al.*, 2020).

Actualmente se recomienda una identificación taxonómica más consistente para el estudio de bacterias del género *Aeromonas* la cual comprende estudio fenotípico, genotípico y filogenético, donde se incluye además estudios de diversidad genética como los realizados por Martino *et al.* (2011) en Italia, Craveiro (2013) en Portugal; Navarro y Martínez-Murcia (2018) así como Fernández-Bravo y Figueras (2020) en España, donde se utilizaron MLST así como también MLSA para el procesamiento de un conjunto de genes housekeeping pertenecientes a aislados de especies de *Aeromonas*.

Los resultados del estudio de Martino *et al.* (2011) mostraron una alta diversidad genética caracterizada por once veces más sustituciones sinónimas que no sinónimas, con una variación ligera de 57,6% a 63,7% en el contenido promedio G+C entre genes housekeeping analizados, además se identificaron 89 ST distintos que indica un número diferente de alelos ya que se procesaron distintas especies, además en la construcción del árbol filogenético se observaron diferentes ramas fácilmente distinguibles con dos mayores filogrupos que contenían grupos más pequeños genotípicamente relacionados. Los resultados de esta investigación se

depositaron en la web <https://pubmlst.org/organisms/Aeromonas-spp/> .

En los estudios realizados por Craveiro (2013); Navarro y Martínez-Murcia (2018) y Fernández-Bravo y Figueras (2020) se obtuvieron resultados similares sobre todo en lo referente al hallazgo de alta diversidad genómica en la población de estudio con un rango de variaciones en el % G+C de entre 57 a 64,5 % entre las secuencias genéticas de especies analizadas lo que permitió asociarlos y diferenciarlos entre ellas, la identificación de diferentes ST nuevos y siempre mayor al 50% del tamaño de muestras sugieren que los perfiles alélicos no necesariamente pueden ser idénticos dentro de un grupo de aislados de *Aeromonas*, así como también la generación de los árboles filogenéticos muestran la separación en más de dos filogrupos bien definidos los cuales incluyen grupos y ramas de cepas genéticamente emparentadas pero con variaciones específicas.

Este estudio utilizó el MLST, basándose en el estudio realizado por Martino *et al.* (2011) al no haber investigaciones similares previas en el rubro acuícola nacional, como herramienta molecular epidemiológica para realizar la tipificación de especies de *Aeromonas* a través de la identificación de polimorfismos luego de amplificar y secuenciar fragmentos de 6 genes conservados, los cuales varían en cada especie de *Aeromonas* sp.: DNA girasa subunidad β “*gyrB*” (669 pb), Chaperonina GroEL “*groL*” (782 pb), Citrato sintasa I “*glcA*” (626 pb), Metionil - tRNA sintetasa “*metG*” (657 pb), Fosfoenolpiruvato sintasa “*ppsA*” (619 pb) y Recombinasa A “*recA*” (640 pb). Este análisis posibilita la identificación de diversas asociaciones clonales y el establecimiento de relación evolutiva por parentesco de forma rápida y sencilla, pero con una no tan alta capacidad de discriminación.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La truchicultura peruana es la mayor productora acuícola nacional, no obstante, este sector es afectado recurrentemente por infecciones ocasionadas por bacterias del género *Aeromonas* que provocan mortalidad y pérdidas económicas especialmente por *Aeromonas salmonicida*, agente etiológico de la forunculosis, y por otras *Aeromonas* móviles (IMARPE, 2008; PRODUCE, 2021). Para vigilar la presencia de esta enfermedad en el país estas cepas se aislaron y estudiaron por diversos autores nacionales mediante caracterización bioquímica y marcadores moleculares (Hurtado, 2019; Toro, 2020; Nuñire *et al.*, 2021) e incluso lográndose identificar el genoma de *A. sobria* (Mesías *et al.*, 2020). Actualmente para una identificación taxonómica más consistente de *Aeromonas* sp. se realiza un estudio fenotípico, genotípico y filogenético, incluyéndose un estudio de diversidad genética de cepas *Aeromonas* sp. como en los estudios foráneos realizados por Martino *et al.* (2011) en Italia, Craveiro (2013) en Portugal; Navarro y Martínez-Murcia (2018) así como Fernández-Bravo y Figueras (2020) en España. Así, esta investigación se basó en el estudio de diversidad genética por MLST de Martino *et al.* (2011) ya que hasta la fecha no se encuentran antecedentes de estudios nacionales publicados.

Los resultados de esta investigación sobre diversidad genética mediante MLST nos permite conocer la relación que presentan diferentes cepas patógenas *Aeromonas* sp. aisladas de truchas enfermas de la sierra peruana y comprender su evolución en un espacio geográfico nacional, así como identificar y discriminar estas cepas patógenas mediante el perfil alélico que presentan para así generar más información para prevenir y controlar la infección por *Aeromonas* en truchas.

V. HIPÓTESIS

Todas las cepas patógenas *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. obtenidas de Cajamarca, Puno, Junín y Ancash no presentan ninguna asociación, relación o agrupamiento asociados a la diversidad genética y región.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

- Evaluar la diversidad genética de cepas *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. patógenas provenientes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante MLST.

6.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las cepas patógenas *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. del Laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia provenientes de truchas arcoíris de la sierra peruana mediante secuenciación de 6 genes *housekeeping* y análisis MLST.
- Relacionar filogenéticamente las cepas patógenas de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. del cepario del Laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia provenientes de truchas arcoíris de la sierra peruana y las cepas de *Aeromonas* MLST Database.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Lugar de estudio

El procesamiento de las muestras fue realizado en el Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Favez) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y en el Laboratorio CAVBIO-BTS (Callao).

7.2. Tipo de estudio

Esta investigación es de tipo descriptivo, interpretativo.

7.3. Criterios de inclusión y exclusión

Las cepas bacterianas que ingresaron al estudio:

- Conforman el cepario del Laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, estas cepas fueron aisladas en el periodo 2018-2019, de truchas de acuicultura criadas en estanques de cultivo semi intensivo procedentes de Cajamarca, Puno, Junín y Ancash.
- Fueron recolectadas de truchas arcoíris con signos y lesiones que sugieran haber sufrido de Aeromoniasis como nado anómalo, melanosis, aletas con lesiones necróticas hemorrágicas multifocales, úlceras y abscesos epiteliales.
- Fueron identificadas por PCR preliminar tras amplificar el gen ARNr 16S (271 pb) para *Aeromonas salmonicida* y mediante la amplificación del gen ARNr 16S (480 pb) para las *Aeromonas* sp.

7.4. Tamaño de la muestra

El tamaño muestral fue de 11 cepas patógenas de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp., previamente caracterizadas por métodos de caracterización bioquímica e identificadas por técnicas moleculares preliminares, procedentes de Cajamarca (n=3), Puno (n=2), Junín (n=5) y Ancash (n=1).

La justificación del número de muestras obedece a que el número de cepas que se empleó es la totalidad de cepas bacterianas patógenas identificadas como *Aeromonas* sp y *Aeromonas salmonicida* disponibles en el cepario del laboratorio de Parasitología Animal para fines de este estudio, además de ser un estudio pionero en este segmento ya que evaluó cepas patógenas de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. empleando MLST y generó los primeros datos bioinformáticos de estas bacterias presentes en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de piscigranjas de regiones truchicultoras de la sierra peruana (Cajamarca, Puno, Junín y Ancash) que presentaban signología de enfermedad tales como nado anómalo, melanosis, aletas con lesiones necrótico hemorrágicas multifocales, úlceras y abscesos epiteliales.

Para el análisis comparativo por MLST además de las secuencias genómicas de las 11 cepas patógenas de truchicultura peruana se incluyeron 1 cepa de referencia almacenada en NCBI (secuencia completa de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449) y 89 cepas del estudio MLST realizado por Martino *et al.*, (2011) las cuales se ubicaban en la base de datos de acceso abierto *Aeromonas* MLST Database <http://pubmlst.org/Aeromonas> (Jolley *et al.*, 2018).

7.5. Colecta y procesamiento de datos

7.5.1. Reactivación de cepas bacterianas

Los aislados *Aeromonas* sp. del cepario del laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia descritos anteriormente fueron reactivados en primera instancia a través de la inoculación en tubos con medio infusión cerebro corazón (caldo BHI) e incubados a 28°C por 18 a 24 horas. Luego con asa estéril se sembró por agotamiento en placas Petri con agar general TSA (agar tripticasa de soja) y en placas Petri con agar selectivo para *Aeromonas* GSP (*Glutamate Starch Phenol Agar*), se incubaron entre 21 a 24 °C durante 24 a 48 horas y posteriormente se realizó tinción Gram, caracterización de colonias típicas de *Aeromonas* y pruebas bioquímicas de reacción de citocromo oxidasa y catalasa (Buller, 2014; Nuñure, 2021). Una parte de las bacterias reactivadas y caracterizadas se prepararon para volver a ser almacenadas en ultracongelación a -80°C, mientras que para fines del estudio se colectaron viales con PBS y pellets de colonias reactivadas de las cepas patógenas *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. del cepario del Laboratorio de Parasitología (UPCH) las cuales fueron previamente identificadas previamente por PCR preliminar empleando el gen ARNr 16S (271 pb) para *Aeromonas salmonicida* y el gen ARNr 16S (480 pb) para las *Aeromonas* sp.

7.6. Extracción de ADN

Los genomas de las bacterias aisladas fueron secuenciados y analizados para recuperar marcadores taxonómicos que permitan realizar análisis de filogeografía. Se utilizó el kit de extracción y purificación Wizard Genomic DNA (Promega-USA) para extraer el ADN genómico, empleando las indicaciones del fabricante. Este y los subsiguientes pasos fueron realizados en el laboratorio CAVBIO-BTS (Callao).

Se determinó la concentración de ADN extraído a través de fluorimetría (Qubit™ 3.0, Invitrogen) y la pureza se estimó calculando la relación A260/A280 en espectrofotómetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Fisher Scientific).

Se realizó una separación electroforética en gel de agarosa (1%) para evaluar la integridad de las muestras de ADN. Las bibliotecas de ADN se elaboraron con el kit Illumina Nextera XT y la secuenciación se realizó con plataforma Illumina MiSeq. Las reads resultantes eran secuencias nucleotídicas paired-end de 150 pb (pares de bases).

7.7. Procesamiento de datos: Ensamblaje de genomas

Se evaluó la calidad de las *reads* mediante la herramienta FastQC 0.11.9 (Andrews, 2010) donde los parámetros de calidad que se evaluaron para las lecturas o *reads* obtenidas por secuenciación fueron, de forma general, las características vinculadas a la longitud de lectura (*read length*), la precisión de la base al llamamiento o *basecalling*, calidad de lectura o calidad *score* por secuencia que alcance Q30 o más, contenido GC por secuencia y contenido N por base, presencia de adaptadores o contaminantes y duplicación de lecturas.

Se precisó del uso del software Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014) para eliminar adaptadores y primers, recortar los extremos finales de baja calidad y filtrar las *reads* con una calidad media (Phred) inferior a 30. Además, las secuencias con una longitud inferior a 40 pb se descartaron.

Todas las secuencias que pasaron el control de calidad se utilizaron en el ensamblaje. Para esto, se utilizó Spades v3.13 (Prjibelski *et al.*, 2020) con valores *default* de k-mers. La calidad del montaje fue evaluada usando métricas como N50 y el número de *contigs*. Para obtener estas métricas se utilizó el paquete Quast v5.0.2 (Gurevich *et al.*, 2013). La herramienta Kraken (Wood y Salzberg, 2014) fue usada para realizar la atribución taxonómica y evaluar la contaminación de las secuencias.

7.8. Recuperación de genes *housekeeping*

A partir de cada ensamblaje se detectaron genes que podrían ser usados para determinar relaciones de parentesco entre las bacterias. Para esto, se usó la herramienta de línea de comando MLSTcheck (Page *et al.*, 2016), la cual identifica genes marcadores de copia única con información taxonómica. Esta herramienta usa como archivo de entrada, secuencias en formato FASTA que constituyen un ensamblaje *de novo* de genomas. Al mismo tiempo, usa bancos de datos de análisis MLST (*Multilocus Sequence Typing*). Para ejecutar este software un esquema debe ser definido de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen las secuencias.

Para nuestros datos, se usó el esquema '*Aeromonas*', el cual incluía los genes *housekeeping* Recombinasa A (*recA*), DNA girasa subunidad β (*gyrB*), Metionil - tRNA sintetasa (*metG*), Citrato sintasa I (*gltA*), Chaperonina GroEL (*groL*), Fosfoenolpiruvasa sintasa (*ppsA*). Las secuencias genéticas fueron recuperadas del genoma completo de cada bacteria del estudio.

7.9. Análisis MLST

Las secuencias de los genes *housekeeping* de cada bacteria fueron concatenadas para obtener solo una secuencia para los análisis posteriores. Secuencias nucleotídicas asociadas también a los genes *recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA* de distintas cepas de *Aeromonas* del estudio de Martino *et al.*, (2011) fueron incluidas para análisis comparativo, ubicadas en *Aeromonas* MLST database (<http://pubmlst.org/Aeromonas>) y en GenBank con números de acceso JF323072 a JF32357 o cepas de campo (*field strain*) Ae1 hasta Ae77.

Todas las secuencias fusionadas fueron alineadas usando el software MEGA XI (Tamura *et al.*, 2021). El múltiple alineamiento de secuencias se realizó usando el algoritmo Clustal W (*codons*) (Thompson *et al.*, 1994). Luego el archivo resultante fue usado para determinar el mejor modelo evolutivo que resuelva la relación de parentesco entre todas las cepas del estudio. Para esto fue usada la función *Find Best DNA/Protein Models* (ML) del software MEGA XI. El alineamiento múltiple fue usado como archivo *input* para realizar los análisis de filogenia.

La reconstrucción filogenética fue realizada usando el modelo evolutivo determinado en el análisis previo. Se construyó el árbol filogenético mediante la búsqueda del árbol máximo verosímil utilizando el método de la Máxima Verosimilitud. El soporte estadístico para la clusterización fue obtenido con 1000 replications por el método de *bootstrapping* (Felsenstein, 1985). El árbol resultante fue exportado en formato *Newick* para ser visualizado y personalizado en la herramienta online iTOL (<http://itol.embl.de>) (Letunic y

Bork, 2021).

7.10. Consideraciones éticas

La presente tesis fue aprobada por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la UPCH mediante el código de aprobación CAREG-ORVEI-168-19.

VIII. RESULTADOS

8.1. Secuenciación y ensamblaje de los genomas

La secuenciación de los genomas de las 11 bacterias aisladas (tabla 4) generó 77 Gigabytes distribuidos en 12 archivos de secuencias nucleotídicas (151 pares de bases) *paired-end* en formato FASTA (Anexo 3).

Tabla 4. Procedencia de los genomas de las bacterias aisladas en este estudio.

Código de Genoma	N° cepa	Código interno	Especie	Procedencia
20008D-05-01	1	K29B	<i>Aeromonas</i> sp.	Cajamarca
20008D-05-02	2	P24B	<i>Aeromonas</i> sp.	Junín
20008D-05-03	3	P23B	<i>Aeromonas</i> sp.	Junín
20008D-05-04	4	J4	<i>Aeromonas</i> sp.	Junín
20008D-05-05	5	J5	<i>Aeromonas</i> sp.	Junín
20008D-05-06	6	5B	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Áncash
20008D-05-07	7	C12B	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Puno
20008D-05-08	8	C18R	<i>Psychrobacter</i> sp.	Puno
20008D-05-09	9	C18B	<i>Aeromonas</i> sp.	Puno
20008D-05-10	10	K14P	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Cajamarca
20008D-05-11	11	I9Br'	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Junín
20008D-05-12	12	K23B	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Cajamarca

Los archivos fueron evaluados usando el programa FastQC para determinar la calidad de la secuenciación. El valor promedio de calidad para las posiciones a lo largo de las secuencias es presentado en la Anexo 3. La herramienta Spades produjo ensamblajes de diferentes números de *contigs* (170-440 pb).

Para evaluar la calidad del ensamblaje se ejecutó el programa Quast, específicamente se calcularon métricas de calidad como N50, longitud del genoma, etc (Anexo 4). Para determinar si los ensamblajes estaban “completos” se efectuó el alineamiento de secuencias con un genoma de referencia de *Aeromonas*. Esto permitió determinar si los genomas contienen el mínimo número de genes esenciales que le permitan ser viables.

Para la atribución taxonómica se usó Kraken, esta herramienta también permite evaluar la contaminación de secuencias. Todos los genomas fueron asociados al género *Aeromonas*, con excepción de la cepa 8 (*Psychrobacter* sp.).

8.2. Detección de los genes *housekeeping*

Los genes fueron detectados y analizados usando la herramienta MLSTCheck para todos los genomas (Tabla 5). El esquema escogido permitió identificar los genes en todos los genomas, con excepción de la cepa *Psychrobacter* sp. (C18R).

Los números enteros, son alelos conocidos para cada gen e indican una coincidencia exacta. Cuando el número es precedido por el signo “~” y “?”, un “esfuerzo mayor” (*major effort*) tuvo que hacerse para encontrar coincidencia. No se hallaron secuencias tipo (ST) conocidas, por lo que se pudo inferir que existen nuevas secuencias tipo (NST) asociadas a las cepas patógenas de *Aeromonas* de truchicultura peruana. No se encontró evidencias de contaminación en ninguno de los genomas. Al identificar los genes *housekeeping*, los valores de similaridad con el esquema de referencia estuvieron entre 99-100%.

Tabla 5. Detección de los genes *housekeeping* en cada genoma ensamblado.

Genoma	Esquema	ST	<i>recA</i>	<i>gyrB</i>	<i>metG</i>	<i>gltA</i>	<i>groL</i>	<i>ppsA</i>
20008D-05-01	<i>Aeromonas</i>	NST.1	~46	~9	44	~75	~78	~24
20008D-05-02	<i>Aeromonas</i>	NST.2	~33	75	~59	58	~83	~37
20008D-05-03	<i>Aeromonas</i>	NST.3	~33	75	~33	~59	~56	~87
20008D-05-04	<i>Aeromonas</i>	NST.4	~33	77?	~59	~53	56?	~62
20008D-05-05	<i>Aeromonas</i>	NST.5	~33	~79	~20	58	~82	~78

20008D-05-06	<i>Aeromonas</i>	NST.6	~2	~61	286	373	~2	~109
20008D-05-07	<i>Aeromonas</i>	NST.7	~314	123	~184	195	~362	~313
20008D-05-08	-	-	-	-	-	-	-	-
20008D-05-09	<i>Aeromonas</i>	NST.8	83?	~80	~61	37	~25	~37
20008D-05-10	<i>Aeromonas</i>	NST.9	~306	371	286	291	~362	~113
20008D-05-11	<i>Aeromonas</i>	NST.9	~306	371	286	291	~362	~113
20008D-05-12	<i>Aeromonas</i>	NST.9	~306	371	286	291	~362	~113

8.3. Alineamiento múltiple de secuencias

Las secuencias de cada gen fueron fusionadas para formar una secuencia representativa para los análisis posteriores. Secuencias asociadas a los genes *housekeeping recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA*, y recuperadas por PCR y secuenciación a partir de cepas de *Aeromonas* (Martino *et al.*, 2011) fueron incluidas en este análisis. Un total de 101 secuencias fueron alineadas con el algoritmo Clustal W usando el programa MEGA XI, donde como genoma de referencia (ref) se usó el genoma completo de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 (gi|145297124|ref|NC_009348.1| *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449, complete genome).

El alineamiento múltiple resultó en 3085 posiciones nucleotídicas. Este alineamiento sirvió como archivo *input* para determinar el modelo evolutivo que represente mejor la estructura de los datos. El mejor modelo resultó ser *General Time Reversible* (GTR), combinado con distribución Gamma (+G) y

sitios invariables (+I) (Anexo 5). Estos resultados fueron usados para los análisis de filogenia.

8.4. Relación filogenética - análisis MLST

El alineamiento múltiple de secuencias fue usado como archivo *input* para reconstruir las relaciones de parentesco entre las bacterias. El árbol filogenético generado incluyó 101 taxones (89 del estudio de Martino, 1 del genoma de referencia y 11 de este estudio) con valores de bootstrap robustos, principalmente, en los clados que involucran las bacterias en estudio (figura 4).

El árbol filogenético máximo verosímil (figura 4) fue reconstruido a partir de secuencias concatenadas asociadas a los genes *housekeeping recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA*. Las secuencias fueron recuperadas de genomas de *Aeromonas* spp. con un total de 101 taxones que fueron incluidas en el análisis. La secuencia 15 del estudio de Martino *et al.*, (2011) (ver Anexo 2) fue usado como grupo externo en este análisis. El soporte estadístico está gráficamente descrito con círculos de color gris que representan valores de bootstrap de 0,5 a 1 (figura 4).

Las cepas de *Aeromonas salmonicida* 10, 12 (Cajamarca) y 11 (Junín) formaron un grupo monofilético que, además, está cercanamente relacionado con la cepa 6 (Áncash). Todos estos formaron un clado con la cepa referencial (ref) de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 y los aislados 81, 2, 65 y 21 del estudio de Martino *et al.*, 2011 (ver Anexo 2). La *Aeromonas salmonicida* cepa 7 (Puno), a pesar de compartir el ancestro con el clúster antes mencionado, formaron un brazo filogenético diferenciado y estadísticamente robusto.

La cepa patógena *Aeromonas* sp. 1 (Cajamarca) formó parte de un clúster diferente; sin embargo, comparte un ancestro común con las cepas antes citadas para formar un clado superior. En el árbol se pueden identificar hasta tres clados superiores. Las otras cinco cepas *Aeromonas* sp. 2, 3, 4, 5 (Junín) y 9 (Puno) forman el otro clado superior.

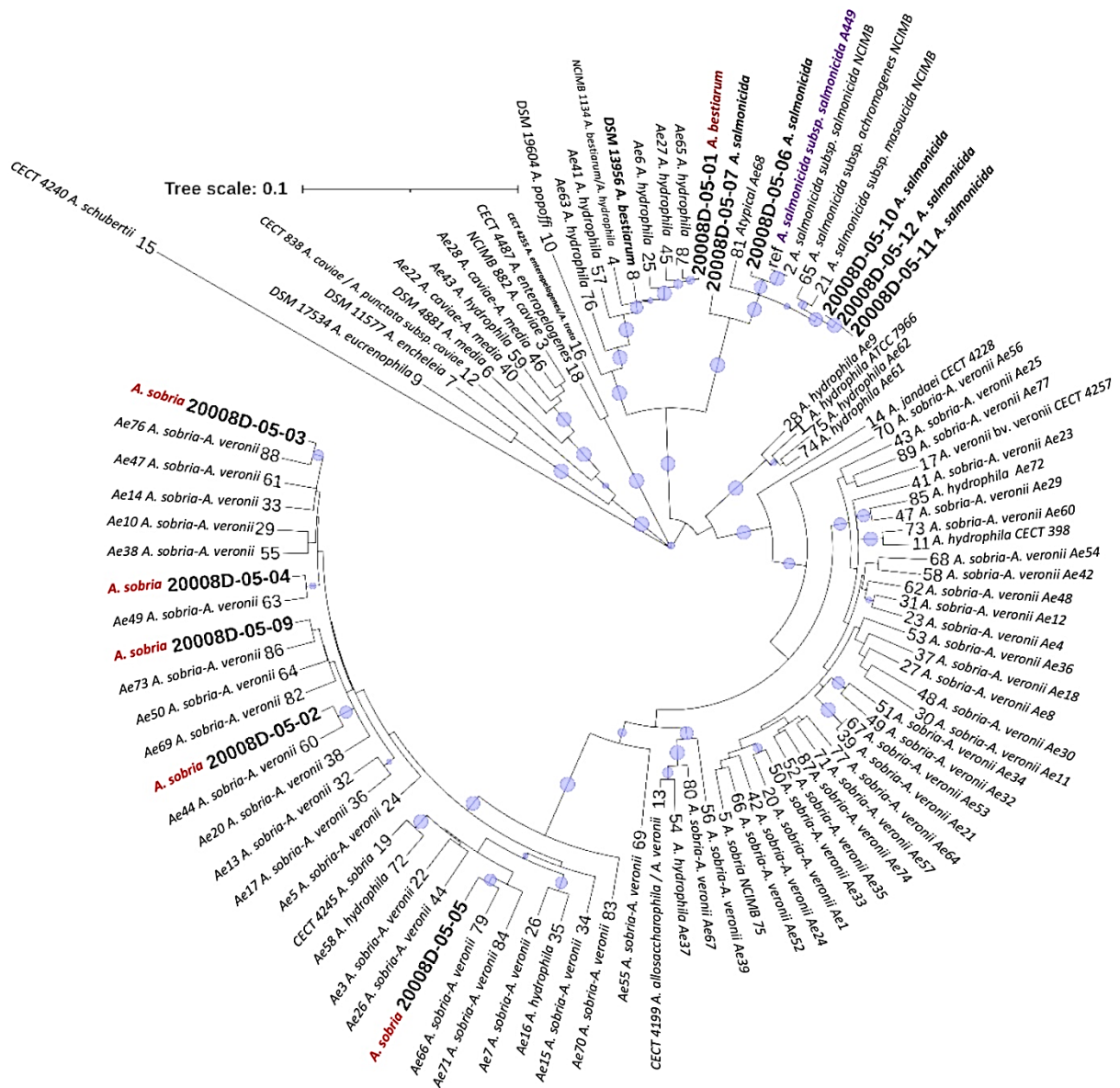


Figura 4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud reconstruido con secuencias concatenadas asociadas a genes *housekeeping recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA*, donde las cepas 20008D-05-01, 20008D-05-10, 20008D-05-12 son de Cajamarca, las cepas 20008D-05-02, 20008D-05-03, 20008D-05-04, 20008D-05-05, 20008D-05-11 son de Junín, las cepas 20008D-05-07, 20008D-05-09 son de Puno y la cepa 20008D-05-06 proviene de Áncash.

IX. DISCUSIÓN

Las *Aeromonas* presentan dificultades en la correcta identificación y clasificación filogenética de sus especies por métodos tradicionales como la caracterización fenotípica y las técnicas moleculares basadas en el gen ARN ribosomal 16S porque estas bacterias presentan características como una gran variabilidad genética, alta variabilidad o plasticidad fenotípica que depende del medio donde se cultivan y condiciones de crecimiento, además de similitud con otras especies bacterianas sobre todo otras gammaproteobacterias (Stackebrandt *et al.*, 2002; Latif-Eugenín, 2016; Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

Actualmente se recomienda el uso de técnicas moleculares más avanzadas, como la amplificación y secuenciación de genes específicos o la secuenciación del genoma completo para lograr una identificación más precisa de las especies de *Aeromonas*, así lo demuestran los estudios de los genes *housekeeping* de *Aeromonas* sp. efectuados por investigadores europeos como Martino *et al.* (2011), Rogers (2012), Navarro y Martínez-Murcia (2018), no obstante, estudios similares con secuencias o genomas completos no se habían efectuado en el rubro científico vinculado a la truchicultura en el ámbito nacional.

El presente estudio tuvo como base la investigación de Martino *et al.* (2011) que incluyó 96 cepas en su base de datos, mientras que para el análisis filogenético se tomó como referencia la secuencia completa de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449, principal agente infeccioso del género *Aeromonas* en truchas, además se analizó 11 secuencias genómicas completas de *Aeromonas* propias de piscigranjas de regiones del Perú tal como indican las recomendaciones actuales de

identificación o agrupación de especies de *Aeromonas* (Reith *et al.*, 2008).

Una característica relevante y diferente de este estudio MLST, con respecto al estudio de Martino *et al.* (2011), es el uso de secuencias de 6 genes *housekeeping* (*recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA*) provenientes de la secuenciación genómica de 11 cepas de *Aeromonas*, las cuales fueron descritas preliminarmente como *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. a través del marcador genético ARNr 16S. Es necesario acotar que el análisis bioinformático hecho por Kraken determinó que el genoma 8 no pertenecía a *Aeromonas*, sino que se emparentaba con *Psychrobacter* sp., la cual también es una Gammaproteobacteria psicrófila, que afecta a salmónidos y otros peces dulceacuícolas de acuicultura (González *et al.*, 2000; Bowman, 2006; McCarthy *et al.*, 2013).

Otra diferencia importante de este estudio, en comparación con el de Martino *et al.* (2011), es que para el procesamiento de datos bioinformáticos se usaron herramientas bioinformáticas actuales y acordes al estudio MLST de secuencias genómicas como FastQC, Spades, Quast, Kraken, MLST check, Clustal W y MEGA XI (Thompson *et al.*, 1994; Andrews, 2010; Gurevich *et al.*, 2013; Wood y Salzberg, 2014; Prjibelski *et al.*, 2020; Tamura *et al.*, 2021). Además, las 11 secuencias genómicas fueron contrastadas con el genoma de referencia *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 con lo que se determinó que los genomas poseían el mínimo número de genes esenciales que permitan su viabilidad (Colston *et al.*, 2014).

Las principales ventajas de las ya mencionadas adecuaciones realizadas en la metodología en este estudio se encuentran la rapidez para generar el análisis de

varias secuencias genéticas específicas de secuencias genómicas completas mediante el uso de herramientas bioinformáticas y la certeza de la caracterización, relacionamiento e inferencia filogenética en *Aeromonas* (Pightling *et al.*, 2018).

El número de *contigs* en un rango de 177 a 438, número de pares de bases en el rango 4,6 a 4,8 Gb, valor N50, ausencia de gaps y Ns (*uncalled bases*) indican que están asociados a bacterias del género *Aeromonas* y que presentan una calidad de ensamblaje aceptable como lo recomendado por Reith *et al.* (2008) y Latif-Eugenin (2016). Asimismo, los valores % G+C de las cepas analizadas oscilan entre 56 - 59%, valores que se encuentran cerca al intervalo de 57 - 63% característico de *Aeromonas* y son similares a los estudios de Martin-Carnahan y Joseph (2005), Martino *et al.* (2011) y Latif-Eugenin (2016).

En el perfil alélico de los 6 genes *housekeeping* en la secuencia de cada genoma bacteriano evaluado por MLST *check* donde cada número entero indica una coincidencia exacta para una secuencia alélica determinada (Page *et al.*, 2016) no se identificó ningún ST conocido en la base de datos por lo que se infiere que en este estudio se encontraron 9 nuevas secuencias tipo (NST) y que existe una alta diversidad genética entre las 11 cepas de *Aeromonas* analizadas, esto se correlaciona con las conclusiones de los estudios realizados por Martino *et al.* (2011), Roger *et al.* (2012) y Craveiro (2013).

Otra ventaja de este estudio fue la selección del mejor modelo evolutivo para evitar errores interpretativos en el estudio filogenético de una población determinada (Bolker, 2019), razón por la que se usó la función *Find Best DNA /Protein Models* (ML) del software MEGA XI, donde se combinaron las opciones

General Time Reversible (GTR), distribución Gamma (+G) y sitios invariables (+I), que son modelos usados para procesos evolutivos complejos y que generalmente se ajustan mejor a los datos reales que otros modelos evolutivos alternativos y más simples (Sumner *et al.*, 2012).

En la creación del árbol de máxima verosimilitud se tomó como grupo externo o taxón fuera del grupo de interés a la secuencia 15 del estudio de Martino *et al.* (2011), vinculada a *A. schubertii* (ver anexo 2), por estar lejanamente relacionado (Wilberg, 2015). Así, cada taxón se agrupó con las especies de *Aeromonas* más estrechamente relacionado, así la secuencia consenso del genoma de referencia *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 formó un clado con las cepas 10, 12 (Cajamarca) y 11 (Junín), las cuales formaron un grupo monofilético debido a su similitud en el perfil alélico para todos los alelos de genes *housekeeping* (371, 362, 291, 286, 113 y 306), con una similitud en el % G+C de aproximadamente 56,8% y una similitud de secuencias (Martino *et al.*, 2011; Latif- Eugén, 2016).

La cepa 6 (Áncash) se relacionó con la cepa de referencia y a las cepas 10, 11 y 12 (*Aeromonas salmonicida*), sin embargo, ésta presenta un perfil alélico completamente distinto, excepto por *metG* (número de alelo 286), difiere en el % G+C con aproximadamente 56,5 % y presenta una mayor cantidad de diferencias en las secuencias nucleotídicas. Los aislados 81, 2, 65 y 21 del estudio de Martino *et al.*, (2011) también están dentro del clado y son cepas asociadas a *Aeromonas salmonicida* provenientes de truchas y crustáceos.

La cepa 7 (*Aeromonas salmonicida* de Puno) formó un brazo filogenético diferenciado y estadísticamente robusto, pese a que comparte el ancestro común

con el clúster de las cepas 10, 12 (Cajamarca) y 11 (Junín). Esta desemejanza se debe a un perfil alélico muy distinto al mencionado clúster, excepto por *groL* (número de alelo 362), con diferencias en el % G+C con aproximadamente 57,1 % y en las secuencias nucleotídicas (Martino *et al.*, 2011; Latif-Eugenín, 2016), pero está lo suficientemente relacionada a la cepa de referencia (figura 4).

Se presenció 2 tipos de asociaciones debidamente distanciadas para las *Aeromonas* sp. Así, en el árbol se identificaron hasta tres clados superiores para el caso de las cinco cepas *Aeromonas* sp. 2, 3, 4, 5 (Junín) y 9 (Puno), las cuales formaron un clado superior. Estas cepas se relacionan por el % G+C con aproximadamente 55,3 - 55,7 %, además las cepas 2, 3, 4 y 5 presentan igual número de alelo 33 para *recA* dentro de su perfil alélico, mientras que la cepa 9 si bien un poco más distante, conserva el número de alelo 37 para *ppsA* similar a la cepa 2, por lo que se infiere que este clado superior está relacionado entre sí (Roger *et al.*, 2012; Gonçalves Pessoa *et al.*, 2019; Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

Por otra parte, la cepa patógena *Aeromonas* sp. 1 (Cajamarca) formó parte de un clúster diferente; sin embargo, se observó que comparte un ancestro común distante con las cepas 7 (Puno), 10, 12 (Cajamarca), 11 (Junín) y la cepa de referencia, lo cual se visualiza como un clado superior en la figura 4. Pese a formar mencionado clado, se conjetura que la cepa 1 (Cajamarca) es una especie distinta a las cepas *Aeromonas salmonicida* (7, 10, 12, 11) e incluso también es una especie diferente a las *Aeromonas* sp. 2, 3, 4, 5 (Junín) y 9 (Puno), todo esto debido a la marcada diferencia de su % G+C con aproximadamente 58,1 % y por poseer un perfil alélico único para los 6 genes *housekeeping* y que se extrapola en más diferencias en las secuencias nucleotídicas (Martino *et al.*, 2011; Latif-Eugenín,

2016; Fernández-Bravo y Figueras, 2020).

Así, los aportes de este estudio y los demás estudios mencionados en esta sección y realizados por los investigadores europeos Martino *et al.* (2011), Roger *et al.*, (2012), Craveiro (2013), Latif-Eugenín (2016), Gonçalves Pessoa *et al.* (2019), Fernández-Bravo y Figueras (2020) tienen conclusiones similares, las bacterias del género *Aeromonas* presentan características que las relacionan bastante, con presencia de ligeras hasta moderadas diferencias entre ellas, pero en general con una alta diversidad genética entre diferentes especies y cepas de *Aeromonas* vinculado principalmente a la plasticidad y variabilidad genética.

Sin embargo, esta investigación no está exenta de limitaciones, y en primer lugar se debe mencionar a las cepas del estudio de Martino *et al.* (2011), las cuales para el momento de su estudio fueron identificadas mediante las técnicas de la época por lo que su identificación no fue tan acertada, ya que la base de datos Genbank que se usó como referencia para la clasificación actualmente está algo desfasada en la nomenclatura de especies de *Aeromonas* e incluso algunas especies como *Aeromonas sharmana* ya no son incluidas dentro del género (Padakandla y Chae, 2017). Además, la descripción de las cepas en especies y complejos (species/complex), como figura en el Anexo 2, relaciona y compara de una forma no tan específica las cepas de Martino con las del presente estudio.

Lo descrito anteriormente hizo que no fuera posible una identificación por MLST más específica ya que a nivel *especie* algunas de las 6 cepas *Aeromonas* sp. del estudio estaban relacionadas a cepas de especies/complejos del estudio de Martino *et al.* (2011), donde la mayor parte de las cepas de campo (*field strain*)

estaban asociadas a *A.sobria-A.veronii*, caso contrario a las 5 cepas *A. salmonicida* de este estudio que estaban bien emparentadas con el genoma de referencia A449. Así que, si bien el MLST es útil para identificar y clasificar cepas, esta capacidad depende de la variabilidad genética de los genes utilizados y para mejorarlo puede ser necesario analizar otro set de genes *housekeeping*, usar genomas correctamente reclasificados para comparación o apoyarnos de métodos *gold standard*.

Dentro de los métodos *gold standard* para la identificación de especies bacterianas, en este caso usándose secuencias genómicas completas de bacterias del género *Aeromonas*, se puede emplear el Promedio de Identidad en Nucléotidos (ANI) y la hibridación ADN-ADN *in silico* (DDHis) lo cual nos permite confirmar y emparentar las cepas *Aeromonas* sp. y saber el género, especie y subespecies (Colston *et al.*, 2014; Latif-Eugenín, 2016). Se recomienda el empleo de ambos ya que ANI es el porcentaje promedio de identidad que hay en la secuencia de nucleótidos de genes ortólogos compartidos por 2 genomas, mientras la DDHis muestra el grado de similitud genética o reasociación entre 2 ADN que provienen de aislados bacterianos distintos (Meier-Kolthoff, 2013; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2015).

Una característica a tener en cuenta de este estudio es la denominación de *cepa patógena* de *Aeromonas*, para lo cual se debe acotar que las cepas empleadas en este estudio fueron tomadas del cepario UPCH y fueron aisladas de truchas con signología de enfermedad asociada a infección por *Aeromonas*, las cuales fueron empleadas en estudios anteriores de identificación de genes de virulencia realizados por Toro (2020) y Mesías *et al.* (2020) quienes identificaron los genes de virulencia *vapA*, *satA*, *ahe2* y *AopH*, por lo tanto se puede inferir que las cepas *Aeromonas* empleadas en este estudio son presuntamente patógenas.

No obstante, uno de los beneficios del análisis MLST es la coherencia para analizar las relaciones filogenéticas dentro del género *Aeromonas*, lo cual se puede corroborar con los estudios previos de emparentamiento filogenético realizados por Soler *et al.* (2004) y Martínez-Murcia *et al.*, (2011), asimismo la implementación del uso de datos de secuenciación de genoma completo se considera actualmente como una técnica acertada de tipificación avanzada en la comparación de genomas y secuencias bacterianas (Uelze *et al.*, 2020).

Si tenemos en cuenta el origen geográfico de las cepas, el análisis MLST permitió visualizar la separación de las cepas en estudio, principalmente en dos grandes grupos. El grupo de las cepas patogénicas *Aeromonas* sp. 2, 3, 4, 5 (Junín) y 9 (Puno) estaban asociadas geográficamente, en su gran mayoría, con la sierra central del Perú, específicamente con la región de Junín (Anexo 1). Mientras que, el otro grupo, constituido por las cepas *Aeromonas salmonicida* 10, 12 (Cajamarca), 11 (Junín), 6 (Ancash) y 7 (Puno) estaban principalmente relacionadas con la sierra norte del país, específicamente con la región de Cajamarca (Anexo 1).

Las cepas 7 (*Aeromonas salmonicida*) y 9 (*Aeromonas* sp.) pese a ser aisladas en la región de Puno (sur del país) no se agruparon en un mismo clado por diferencias en el %G+C y la totalidad del perfil alélico. Además, se apreció la relación de la cepa 9 (*Aeromonas* sp.) con la cepa 86 la cual está comprendida en el complejo bacteriano *Aeromonas sobria* y *Aeromonas veronii* del estudio de Martino *et al.* (2011) (ver figura 4 y Anexo 2). Asimismo, la cepa 1 (Cajamarca) posee características de una especie de *Aeromonas* distinta a todas las especies regionales evaluadas en este estudio, pero relacionada con la cepa 78 comprendida al complejo bacteriano *Aeromonas hydrophila* del estudio de Martino *et al.* (2011).

Estos resultados sugieren que las *Aeromonas* estudiadas en esta investigación están asociadas en dos núcleos principales, donde las *Aeromonas salmonicida* del estudio presentan un núcleo en la sierra norte; mientras que las otras cepas patogénicas *Aeromonas* sp., poseen un núcleo principal en la región central (Junín), resultados que se asemejan a los obtenidos por Hurtado (2019) y Nuñure (2021) que identificaron *Aeromonas* de truchas clínicamente enfermas que principalmente provenían de las regiones del centro y del norte del Perú, principalmente Junín y Cajamarca respectivamente; no obstante, este estudio no puede establecer una relación entre especie de *Aeromonas* y distribución geográfica debido a la no homogeneidad y reducido tamaño de la muestra, así que por el momento solo nos da un vistazo general y bastante particular que podrá ser mejorado en estudios posteriores de mayor complejidad.

Finalmente, debemos entender la importancia y aplicación de este estudio, ya que este estudio es el primero en su rubro y en el ámbito nacional el cual permitió obtener datos bioinformáticos que caracterizaron y relacionaron cepas *Aeromonas*, obtenidas de diversas regiones del país, mediante análisis filogenético de genes *housekeeping* obtenidos de secuencias genómicas y comparadas con la base de datos online del estudio de Martino *et al.* (2011). Así, el presente estudio sienta las bases para tener nuevas formas de hallar información útil para la identificación, asociación y procesamiento de datos sobre diversidad genética de *Aeromonas* patógenas de truchas, lo cual gradualmente robustecerá las medidas de prevención, sanidad, buenas prácticas de manejo, diagnóstico y vigilancia epidemiológica en la acuicultura nacional de la trucha arcoíris.

X. CONCLUSIONES

- Los genes *housekeeping* *recA*, *gyrB*, *metG*, *gltA*, *groL* y *ppsA* son adecuados para reconstruir relaciones de parentesco entre poblaciones bacterianas de *Aeromonas*.
- La diversidad genética de las poblaciones patogénicas de las 11 cepas analizadas de *Aeromonas salmonicida* y *Aeromonas* sp. está reflejada en dos grandes grupos que circulan principalmente en la sierra norte y sierra centro del país respectivamente.

XI. RECOMENDACIONES

- Complementar el estudio MLST con el análisis de más genes *housekeeping* o el estudio de más marcadores moleculares en el genoma completo de cepas patógenas de *Aeromonas* para obtener más datos bioinformáticos vinculados a la identificación de especies y asociación filogenética.
- Realizar estudios posteriores mediante el uso del Promedio de Identidad en Nucléotidos (ANI) e hibridación ADN-ADN *in silico* (DDHis) para la confirmación y emparentamiento de género, especie y subespecies de cepas *Aeromonas* sp.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Aravena-Román, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T., Riley, T., Martínez-Murcia, A., Chang, B., Figueras, M. (2012). *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water in Western Australia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 63(6), 2270–2276.

Austin, B., Austin, D. (2007). Bacterial fish Pathogens. Diseases in Farmed and Wild fish. 4ª Ed. UK: *Springer*. 552 p.

Barange, M., et al. (Eds.). (2018). “Impacts of Climate Change on fisheries and Aquaculture: Synthesis of Current Knowledge, Adaptation and Mitigation Options”, FAO Fisheries Technical Paper. 627p.

Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J. (2012). Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections. En: *Health and Environment in Aquaculture*. Brazil: Carvalho E. 97-132.

Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenín, F., Figueras, M.J. (2013). The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* especies. *Vet Microbiol* 166 (3-4): 359-363.

Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M.J., Liles, M.R., Figueras, M.J. (2015).

Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the GenBank database. PLoS One. 10:e0115813

Béné, C., et al. (2016). Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. *World Dev.* 79, 177–196.

Berger, C. (2020). La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*, 1(1), e003

Bergh, Ø. (2008). Bacterial diseases of fish. En: Eiras JC, Segner H, Wahli T, Kapoor BG (eds.), *Fish Diseases*. Science Publishers. 239–277.

Blanco, M. (1994). La Trucha, cría industrial. 2ª Ed. Madrid: Mundi. 76p.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.

Bolker, J. A. (2019). Selection of Models: Evolution and the Choice of Species for Translational Research. *Brain Behav Evol* 93:82-91. doi: 10.1159/000500317.

Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M. (2001). The Archaea and the deeply branching and Phototrophic Bacteria. En: Garrity GM (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1. 2ª ed. New York: *Springer*. 1-721.

Boyd, J., Williams, J., Curtis, B., Kozera, C., Singh, R., Reith, M. (2003).

Three small, cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449. Plasmid 50: 131–144.

Bowman, J.P. (2006). The Genus Psychrobacter. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_35

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Garrity, G.M., Staley, J.T. (2005). The Proteobacteria. Part A: Introductory Essays. En: Garrity GM (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. 2^a ed. New York: Springer. 1-304.

Brown, L. (2000). Acuicultura para veterinarios. Producción y clínica de peces. España: Acribia. 460 p.

Buller, N.B. (2014). Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals, a practical identification manual. 2^a ed. UK: Editorial CABI. 881 p.

Burr, S.E., Frey, J. (2007). Analysis of type III effector genes in typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. *J Fish Dis* 30: 711–714.

Calle Yunis, C.R., Salas López, R., Cruz, S.M.O., Barboza Castillo, E., Silva López, J.O., Iliquín Trigos, D., Briceño, N.B.R. (2020). Land Suitability for Sustainable Aquaculture of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Molinopampa (Peru) Based on RS, GIS, and AHP. ISPRS Int. J. Geo-Inf, 9, 28.

Chen, P.L., Wu, C.J., Chen, C.S., Tsai, P.J., Tang, H.J., Ko, W.C., Cutler, S. (2014). A comparative study of clinical *Aeromonas dhakensis* and *Aeromonas hydrophila* isolates in southern Taiwan: *A. dhakensis* is more

predominant and virulent. *Clin. Microbiol. Infect.* 20:O428–O434. doi: 10.1111/1469-0691.12456.

Cipriano, R.C., Austin, B. (2011). Furunculosis and other Aeromonad diseases. In: Woo PTK, Bruno DW (eds.), *Fish Diseases and Disorders*. CAB International. 435–494.

Cipriano, R.C., Bullock, G.L. (2001). Furunculosis and other diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. *Fish Disease Leaflet* 66. 33 p.

Colston, S.M., Fullmer, M.S., Beka, L., Lamy, B., Gogarten, J.P., Graf, J. (2014). Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. Nov 18;5(6):e02136. doi: 10.1128/mBio.02136-14.

Colwell, R.R., MacDonell, M.R., De Ley, J. (1986). Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 36: 473-477.

Craveiro, S. (2013). *Aeromonas* spp.: evaluation of genomic diversity and biofilm forming ability. Tesis de Maestría en Microbiología Aplicada. Universidade de Lisboa. Lisboa. 48p.

Crawford, S., Muir, A. (2008). Global introductions of salmon and trout in the genus *Oncorhynchus*: 1870–2007. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18: 313-344.

Daher, R.K., Filion, G., Tan, S.G., Dallaire-Dufresne, S., Paquet, V.E., Charette, S.J. (2011). Alteration of virulence factors and rearrangement of pAsa5 plasmid caused by the growth of *Aeromonas salmonicida* in stressful conditions. *Vet Microbiol* 152: 353–360.

Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K.H., Trudel, M.V., Lafaille, A., Charette, S.J. (2013). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol* 169(1-2): 1-7.

Duncan, I.J.H. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 24(2), 483–92.

[EFSA]. European Food Safety Authority. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Animal Welfare on a request from the European Commission on the Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout. *The EFSA Journal* 796, 1-22

[FAO]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2005-2021). Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oncorhynchus mykiss*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Texto de Cowx IG. En: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Roma. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <http://www.fao.org>

[FAO]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). Una Mirada al Extensionismo Acuícola en América Latina y el Caribe, por Flores-Nava, A.; A. Mena; D. Mendoza y A. Fuenzalida. Santiago de Chile: 81 p.

[FAO]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La

sostenibilidad en acción Roma. 223p. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022].
Disponible en: <http://www.fao.org/>

[FAO]. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul. Roma. 257p. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <http://www.fao.org/>

Farmer, J.J., Arduino, M.J., Hickman-Brenner, F.W. (2006). The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. En: The Prokaryotes, a handbook on the biology of Bacteria. New York: Springer Science Business Media. 564-596.

Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap. *Evolution* Jul;39(4):783-791. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x. PMID: 28561359.

Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms* 8(1):129.

Figueras, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Collado, L., Martínez-Murcia, A.J. (2011). Point of view on the recommendations for new bacterial species description and their impact on the genus *Aeromonas* and *Arcobacter*. *Bol. Bergey's Int. Soc. Microb. Syst.* 2 (1): 1–16.

[FONDEPES]. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (2006). Manual de cultivo de truchas arcoíris en jaulas. Lima: Fondepes. 87 p. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <https://www.fondepes.gob.pe>

[FONDEPES]. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero (2014). Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. Lima. 57p. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <https://www.fondepes.gob.pe>

[FONDEPES]. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. (2017). Cultivo de la trucha arcoíris en el Perú con énfasis en la importación de ovas embrionadas y la comercialización de la producción. Lima: Fondepes. 32 p.

Garteizgogeoasca, M., Kluger, L.C., Gonzales, I.E., Damonte, G., Flitner, M. (2020). Contextualizing Scenarios to Explore Social- Ecological Futures: A Three Step Participatory Case Study for the Humboldt Current Upwelling System. *Frontiers in Marine Science - Marine Conservation and Sustainability*, DOI: 10.3389/fmars.2020.557181.

Gonçalves Pessoa, R.B., de Oliveira, W.F., Marques, D., Dos Santos Correia, M.T., de Carvalho, E., Coelho, L. (2019). The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial pathogenesis*, 130, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.02.036>

González, C.J., Santos, J.A., García-López, M.L., Otero, A. (2000). Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J Food Prot.* Mar;63(3):315-21. doi: 10.4315/0362-028x-63.3.315. PMID: 10716558.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. Apr 15;29(8):1072-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23422339; PMCID: PMC3624806.

Harayama, S., Kasai, H. (2006). Bacterial phylogeny reconstruction from molecular sequences. En: Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes. Ed. Stackebrandt E. Springer Verlag. Alemania. 105-139.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. (2005). Modern Trends in *Aeromonas hydrophila*: Disease Management with Fish. *Reviews in Fisheries Science* 13 (4): 281-320.

Havelaar, A.H., During, M., Versteegh, J.F. (1978). Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J Appl Bacteriol* 62: 279-287.

Hiney, M., Olivier, G. (1999). Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). En: Woo PTK, Bruno DW, eds. Fish Diseases and Disorders. Vol 3. Viral, Bacterial, Fungal Infections. Wallingdorf UK: CAB International. 341- 425.

Hurtado, C.L. (2019). Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Aeromonas salmonicida* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de cuatro regiones de la sierra del Perú. Tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 60 p.

[IMARPE], Instituto del Mar del Perú. (2008). Anuario Científico Tecnológico 2008. Vol 8. Callao: Instituto del Mar del Perú. 176p.

INCAGRO. (2008). Manual para la producción de truchas en jaulas flotantes. Huancavelica - Perú. 60 p.

Iregui, C. (2007). Manual de Sanidad Piscícola. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 7-22.

Janda, J.M., Abbott, S.L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35–73.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>

Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* Sep 24;3:124.

Kozińska, A. (2007). Dominant pathogenic species of mesophilic *Aeromonads* isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis* 30: 293-301.

Latif-Eugenín, F.L. (2016). *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. Tesis de doctorado. España: Universitat Rovira I Virgili. 391 p.

Lázara, A. (2007). Estudio Taxonómico de *Aeromonas* móviles y salicina negativas. Tesis de doctorado. España: Universidad de Valencia. 343 p.

Letunic, I., Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res Jul* 2;49(W1):W293-W296. doi: 10.1093/nar/gkab301. PMID: 33885785; PMCID: PMC8265157.

Martin-Carnahan, A., Joseph, S.W. (2005). Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds Brenner DJ, Krieg

NR, Staley JT y Garrity GM. EEUU: Springer. 556-578.

Martínez-Murcia, A.J., Benlloch, S., Collins, M.D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int J Syst Bacteriol* 42: 412-421.

Martínez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., Figueras, M.J. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and applied microbiology*, 34(3), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2010.11.014>

Martínez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., et al. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 34: 189–199.

Martino, M.E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, F., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., Cardazzo, B. (2011). Determination of Microbial Diversity of *Aeromonas* Strains on the Basis of *Multilocus Sequence Typing*, Phenotype, and Presence of Putative Virulence Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (14): 4986–5000.

McCarthy, U., Stagg, H., Donald, K., Garden, A., Weir, S.J. (2013). *Psychrobacter* sp. isolated from the kidney of salmonids at a number of aquaculture sites in Scotland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 33. 67-72.

Meier-Kolthoff, J.P., Auch, A.F., Klenk, H.P., Göker, M. (2013). Genome

sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinf.* 14-60.

Meik, S., Tiscornia, J., Arias, M., Kien, M.C., Pellerano, G. (2011). Infección cutánea por *Aeromonas*. *Med Cutan Iber Lat Am.* 39: 23-25.

Mendoza, D. (2013). Informe: Situación del Extensionismo Acuícola en el Perú. Dirección de Acuicultura – PRODUCE. Lima: PRODUCE. 14 p.

Mesías, F., Gerpe, D., Hurtado, C., Llanco, L., Serrano-Martínez, E., Romalde, J.L. (2020). Draft genome sequence of *Aeromonas sobria* strain CHT-30, isolated from a diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Microbiol Resour Announc* 9:e00110-20.

Navarro, A., Martínez-Murcia, A. (2018). Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on *housekeeping* gene sequencing and its influence on systematics. *J Appl Microbiol* 125: 622-631.

Naylor, R.L., Hardy, R.W., Buschmann, A.H., et al. (2021). A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature* 591, 551–563.

Noble, C., Berrill, I.K., Waller, B., Kankainen, M., Setälä, J., Honkanen, P., Mejdell, C.M., Turnbull, J.F., Damsgård, B., Schneider, O., Toften, H. (2012). A multi-disciplinary framework for bioeconomic modeling in aquaculture: a welfare case study. *Aquaculture economics & management* 16(4), 297-314.

Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M.H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L.H., Turnbull, J.F. (Eds.). (2020). Welfare Indicators for farmed rainbow

trout: tools for assessing fish welfare. 310 pp.

Noga, E.J. (2010). Fish Disease, Diagnosis & treatment. 2^a ed. USA: Wiley-Blackwell. 410 p.

Nuñure, J., Sandoval, N., Estrella, M., Ramos, F., Herrera, A., Valera, A., Manchego, A. (2021). Identificación y caracterización de *Aeromonas* sp patógenas aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) clínicamente enfermas cultivadas en piscigranjas del Perú. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 32(4), e20927.

[OECD/FAO]. Organisation for Economic Co-operation Development and the Food and Agricultural Organization of the United Nations. (2020). OECD/FAO Agricultural Outlook 2020-2029. FAO, Rome/OECD Publishing, Paris. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food>

Padakandla, S.R., Chae, J.C. (2017). Reclassification of *Aeromonas sharmana* to a new genus as *PseudAeromonas sharmana* gen. nov., comb. nov., and description of *PseudAeromonas pectinilytica* sp. nov. isolated from a freshwater stream. *Int J Syst Evol Microbiol.* Apr;67(4):1018-1023. doi: 10.1099/ijsem.0.001734. Epub 2017 May 5. PMID: 27974085.

Page, et al. (2016). Multilocus sequence typing by blast from de novo assemblies against PubMLST, *Journal of Open Source Software*, 1(8), 118, doi:10.21105/joss.00118

Pightling, A.W., Pettengill, J.B., Luo, Y., Baugher, J.D., Rand, H., Strain,

E. (2018). Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations. *Front. Microbiol.* 9:1482. doi: 10.3389/fmicb.2018.01482

Plumb, J.A., Hanson, L.A. (2011). Health Maintenance and Principal: Microbial Diseases of Cultured Fishes. 3ª ed. Iowa: Wiley-Blackwell. 492 p.

[PNIPA]. Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura. (2020). La cadena de valor de la trucha. Serie: Estudio Prospectivo N°1. Programa Nacional De Innovación En Pesca y Acuicultura – PNIPA. 128p

Prijibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics* Jun;70(1):e102. doi: 10.1002/cpbi.102. PMID: 32559359.

[PRODUCE]. Ministerio de la Producción. (2021). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2020. Lima: PRODUCE. Informe anual estadístico. 182 p.

[PROMPERU]. Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. (2021). Boletín Mensual PROMPERU-Marzo 2021. Departamento de Productos Pesqueros. Lima: PROMPERU. 12 p.

RAGASH. Municipalidad Distrital Ragash. (2009). Manual de Crianza: trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Ragash-Perú. 25p.

Ramírez-Gastón, J., Sandoval, N., Vicente, K. (2018). Sistema Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura. Fundamentos y Propuesta 2017– 2022; PNIPA: Lima. 104 p.

Reith, M.E., Singh, R.K., Curtis, B., Boyd, J.M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J.H., Johnson, S.C., Brown, L.L. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 9: 427.

Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., the colBVH study group, Lamy, B. (2012). Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiology* 12: 62.

Saldarriaga, M., Regalado, F. (2017). Potencial Acuícola en el Perú. *Revista Moneda (BCRP)*. N°172. 32p. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <http://www.bcrp.gob.pe/docs>

Salie, K., Resoort, D., Du Plessis, D., Maleri, M. (2008). Training manual for small-scale rainbow trout farmers in net cages on irrigation dams: water quality, production and fish health. Cape Town - Republic of South Africa. 25 p.

Salinas, J., Alarcón, E. (2017). Acuicultura: trucha. Una opción para el desarrollo de comunidades andinas. Trabajo de investigación de Máster en Dirección de Empresas. Universidad de Piura. PAD-Escuela de Dirección. Lima. 61p.

[SANIPES]. Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2020). Plan de Vigilancia Oficial de Enfermedades de los Recursos Hidrobiológicos. [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <https://www.sanipes.gob.pe>

Segner, H., Sundh, H., Buchmann, K., Douxfils, J., Sundell, K.S., Mathieu, C., Ruane, N., Jutfelt, F., Toften, H., Vaughan, L. (2012). Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish physiology and biochemistry* 38(1), 85-105.

Sepe, A., Barbieri, P., Peduzzi, R., Demarta, A. (2008). Evaluation of *recA* sequencing for the classification of *Aeromonas* strains at the genotype level. *Lett Appl Microbiol* 46: 439-444.

Shin, H.B., Yoon, J., Lee, Y., Kim, M.S., Lee, K. (2015). Comparison of MALDI-TOF MS, *housekeeping* gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Med. J.* 56:550–555. doi: 10.3349/ymj.2015.56.2.550

Smith, S.A. (2019). Fish Diseases and Medicine. 1st ed. CRC Press. 328p

Soler, L., Yáñez, M.A., Chacon, M.R., Aguilera-Arreola, M.G., Catalan, V., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two *housekeeping* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1511–1519. doi: 10.1099/ijs.0.03048-0

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimontm P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossellómóra, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., Whitman, W.B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1043-1047.

Stevens, J.R., Newton, R.W., Tlusty, M., Little, D.C. (2018). The rise of aquaculture by-products: increasing food production, value, and sustainability through strategic utilization. *Mar. Policy* 90, 115–124.

Stien, L.H., Bracke, M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P.J., Vindas, M.A., Øverli, Ø., Kristiansen, T.S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture* 5, 33-57.

Subasinghe, R., Soto, D., Jia, J. (2009). Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture* 1 (1): 2-9.

Sumner, J. G., Jarvis, P. D., Fernández-Sánchez, J., Kaine, B. T., Woodhams, M. D., Holland, B. R. (2012). Is the general time-reversible model bad for molecular phylogenetics? *Syst. Biol.* 61, 1069–1074. doi: 10.1093/sysbio/sys042

Tacon, G.J., Metian, M. (2015). Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Rev Fish Sci Aquacult.* 23:1–10.

Tacon, G.J. (2020). Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–2017, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28:1, 43-56.

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol.* Jun25;38(7):3022-3027. doi: 10.1093/molbev/msab120. PMID: 33892491; PMCID: PMC8233496.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* Nov 11;22(22):4673-80. doi: 10.1093/nar/22.22.4673. PMID: 7984417; PMCID: PMC308517.

Toro, D. (2020). Identificación de genes asociados a la virulencia de *Aeromonas salmonicida* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de piscigranjas del Perú. Tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 79 p.

Uelze, L., Grütze, J., Borowiak, M. et al. (2020). Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-0010-1>

Wilberg, E.W. (2015). What's in an Outgroup? The Impact of Outgroup Choice on the Phylogenetic Position of Thalattosuchia (Crocodylomorpha) and the Origin of Crocodyliformes, *Systematic Biology*, Vol. 64, Issue 4.

Wood, D.E., Salzberg, S.L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* Mar 3;15(3):R46. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r46. PMID: 24580807; PMCID: PMC4053813.

Woynarovich, A., Hoisty, G., Moth-Poulsen, T. (2011). Small-scale rainbow trout farming. Roma: FAO Fisheries and Aquaculture Department [Internet]. [Acceso 15 de abril 2022]. Disponible en: <http://www.fao.org>

Yáñez, M.A., Catalán, V., Apraiz, D., Figueras, M.J., Martínez- Murcia,

A.J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 875-883.

Yapuchura, A. (2006). Producción y comercialización de truchas en el departamento de Puno y nuevo paradigma de producción. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Nacional de San Marcos. 164 p.

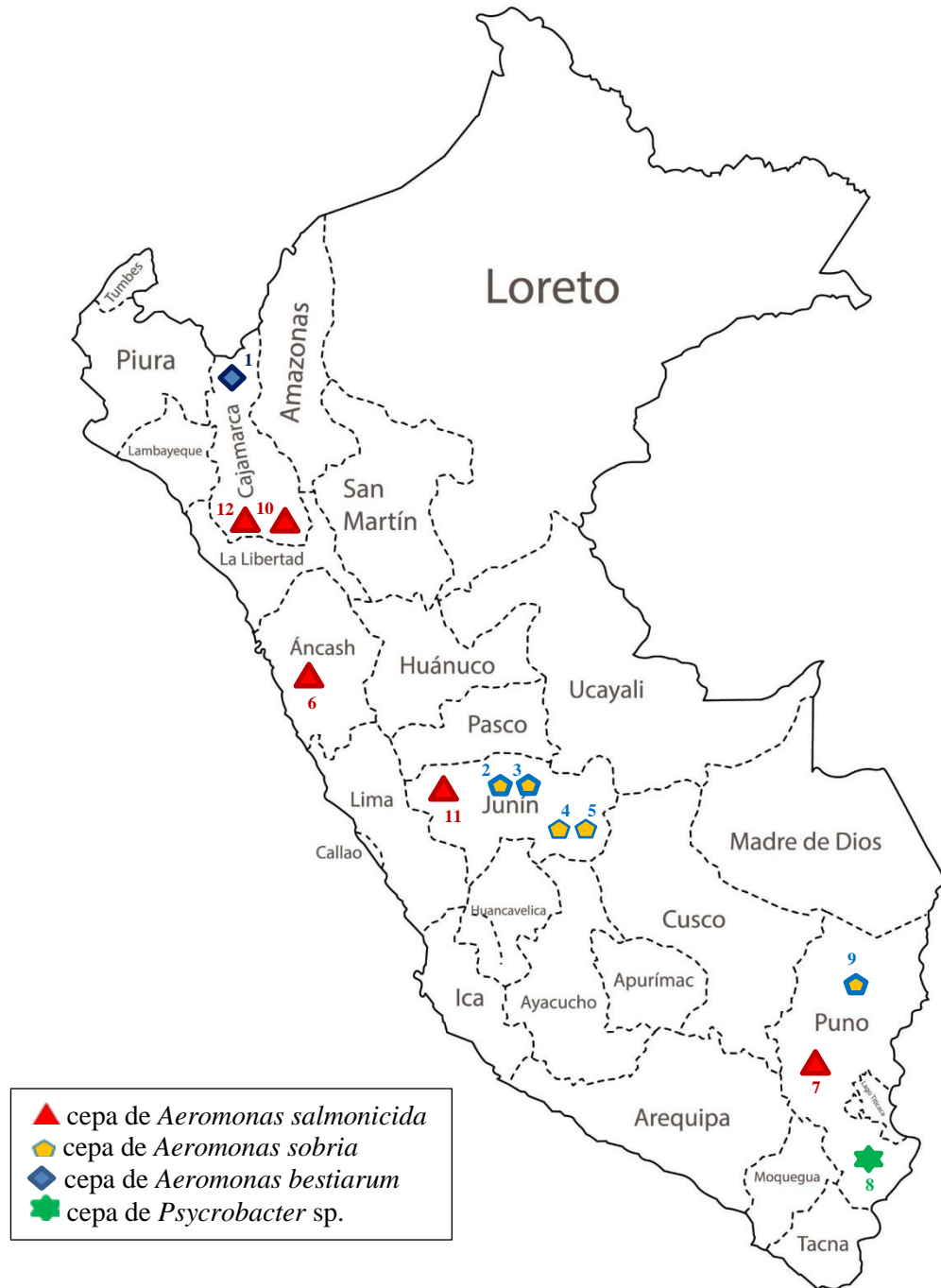
Zepeda-Velásquez, A.P., Vega-Sánchez, V., Salgado-Miranda, C., Soriano-Vargas, E. (2015a). Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species. *Can J Vet Res* 79 (3): 250-254

Zepeda-Velásquez, A.P. (2015b). *Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *Revista AquaTIC* 42: 1-16.

Zepeda-Velázquez, A.P., Vega-Sánchez, V., Ortega-Santana, C., Rubio-Godoy, M., Montes de Oca-Mira, D., Soriano-Vargas, E. (2017). Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Acta Tropica* 169: 122–124

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Distribución general de las 11 cepas patogénicas de este estudio con *Aeromonas salmonicida* en la sierra norte y *Aeromonas* sp. en la sierra sur.



Anexo 2. Procedencia y datos de 89 cepas de *Aeromonas* analizadas en la investigación de diversidad microbiana realizada por Martino *et al.*, (2011).

N#	Strain	Species/complex	Source / organ
	Reference/type strain		
1	ATCC 7966	<i>A. hydrophila</i>	Milk
2	NCIMB 1102	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Atlantic salmon
3	NCIMB 882	<i>A. caviae</i>	Goldfish (<i>Crassius auratus</i>)
4	NCIMB 1134	<i>A. bestiarum</i> / <i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout
5	NCIMB 75	<i>A. sobria</i>	Diseased freshwater fish
6	DSM 4881	<i>A. media</i>	Fish farm effluent
7	DSM 11577	<i>A. encheleia</i>	Healthy eel in freshwater
8	DSM 13956	<i>A. bestiarum</i>	Infected fish
9	DSM 17534	<i>A. eucrenophila</i>	Freshwater fish
10	DSM 19604	<i>A. popoffii</i>	Drinking water
11	CECT 398	<i>A. hydrophila</i>	Human feces of a child with diarrhea
12	CECT 838	<i>A. caviae</i> / <i>A. punctata</i> subsp. <i>caviae</i>	Epizootic of young guinea pigs
13	CECT 4199	<i>A. allosaccharophila</i> / <i>A. veronii</i>	<i>Anguilla</i> (eel)
14	CECT 4228	<i>A. jandaei</i>	Feces from patient with diarrhea
15	CECT 4240	<i>A. schubertii</i>	Forehead abscess
16	CECT 4255	<i>A. enteropelogenes</i> / <i>A. trota</i>	Human feces
17	CECT 4257	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	Sputum of drowning victim
18	CECT 4487	<i>A. enteropelogenes</i>	Human feces
19	CECT 4245	<i>A. sobria</i>	Fish
21	NCIMB 2020	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	Masou, <i>Oncorhynchus</i> sp.
65	NCIMB 1109	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	Diseased sea trout, <i>Salmo trutta</i>
-	CECT 4246	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Infected frog (red leg disease)
-	DSM 17445	<i>A. sharmana</i>	Warm spring
	Field strain		
20	Ae1	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	European catfish (<i>Ameiurus melas</i>)/kidney
-	Ae2	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
22	Ae3	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
23	Ae4	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)/kidney
24	Ae5	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Sturgeon (<i>Acipenser</i> sp.)/kidney
25	Ae6	<i>A. hydrophila</i>	Northern pike (<i>Esox lucius</i>)/kidney
26	Ae7	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
27	Ae8	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	European catfish (<i>Ameiurus melas</i>)/kidney
28	Ae9	<i>A. hydrophila</i>	Crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>)/hemolymph
29	Ae10	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
30	Ae11	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
31	Ae12	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
32	Ae13	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	European grayling (<i>Thymallus thymallus</i>)/kidney
33	Ae14	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Arctic char (<i>Salvelinus alpinus</i>)/kidney
34	Ae15	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Arctic char (<i>Salvelinus alpinus</i>)/kidney
35	Ae16	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mikiss</i>)/kidney
36	Ae17	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
37	Ae18	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Eel (<i>Anguilla anguilla</i>)/kidney
-	Ae19	<i>A. hydrophila</i>	Sea bream (<i>Sparus aurata</i>)/kidney
38	Ae20	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
39	Ae21	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)/spleen
40	Ae22	<i>A. caviae</i> - <i>A. media</i>	Sturgeon (<i>Acipenser</i> sp.)/kidney
41	Ae23	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)/kidney
42	Ae24	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
43	Ae25	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)/spleen
44	Ae26	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Arctic char (<i>Salvelinus alpinus</i>)/liver
45	Ae27	<i>A. hydrophila</i>	Arctic char (<i>Salvelinus alpinus</i>)/spleen
46	Ae28	<i>A. caviae</i> - <i>A. media</i>	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)/spleen
47	Ae29	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Sturgeon (<i>Acipenser</i> sp.)/kidney
48	Ae30	<i>A. sobria</i> - <i>A. veronii</i>	Channel catfish (<i>Ictalurus punctatus</i>)/kidney
-	Ae31	<i>A. hydrophila</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney

49	Ae32	<i>A. sobria-A. veronii</i>	European catfish (<i>Ameiurus melas</i>)/liver
50	Ae33	<i>A. sobria-A. veronii</i>	European catfish (<i>Ameiurus melas</i>)/liver
51	Ae34	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/liver
52	Ae35	<i>A. sobria-A. veronii</i>	European catfish (<i>Ameiurus melas</i>)/kidney
53	Ae36	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mikiss</i>)/kidney
54	Ae37	<i>A. hydrophila</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
55	Ae38	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mikiss</i>)/kidney
56	Ae39	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Sea bream (<i>Sparus aurata</i>)/kidney
-	Ae40	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
57	Ae41	<i>A. hydrophila</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
58	Ae42	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Goldfish (<i>Carassius auratus</i>)/kidney
59	Ae43	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
60	Ae44	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
-	Ae45	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
-	Ae46	<i>A. hydrophila</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
61	Ae47	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
62	Ae48	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
63	Ae49	<i>A. sobria-A. veronii</i>	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>)/kidney
64	Ae50	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
-	Ae51	<i>A. hydrophila</i>	Crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>)/hemolymph
66	Ae52	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>)/hemolymph
67	Ae53	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
68	Ae54	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>)/hemolymph
69	Ae55	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Manila clam (<i>Ruditapes philippinarum</i>)/foot
70	Ae56	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Freshwater mussel (<i>Anodonta sp.</i>)/foot
71	Ae57	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)/kidney
72	Ae58	<i>A. hydrophila</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/kidney
-	Ae59	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Sea bass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)/kidney
73	Ae60	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Eel (<i>Anguilla anguilla</i>)/kidney
74	Ae61	<i>A. hydrophila</i>	Flathead gray mullet (<i>Mugil cephalus</i>)/kidney
75	Ae62	<i>A. hydrophila</i>	Sea bream (<i>Sparus aurata</i>)/kidney
76	Ae63	<i>A. hydrophila</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/kidney
77	Ae64	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)/skin
78	Ae65	<i>A. hydrophila</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/skin
79	Ae66	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)/skin
80	Ae67	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/brain
81	Ae68	<i>Atypical</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/brain
82	Ae69	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
83	Ae70	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Trout (<i>Salmo trutta</i>)/kidney
84	Ae71	<i>A. sobria-A. veronii</i>	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>)/kidney
85	Ae72	<i>A. hydrophila</i>	European catfish (<i>Ameiurus melas</i>)/liver
86	Ae73	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/skin
87	Ae74	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Sea bream (<i>Sparus aurata</i>)/brain
-	Ae75	<i>A. sobria-A. veronii</i>	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>)/kidney
88	Ae76	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)/eyes
89	Ae77	<i>A. sobria-A. veronii</i>	Tench (<i>Tinca tinca</i>)/spleen

(-) No se utilizaron en este estudio

Anexo 3. Estadística de los archivos *paired-end*.

Files	N° reads (pb)	Calidad	stdev	%A	%C	%G	%T	%N	Total (pb)
20008D-05-01_R1	7675597	39,3052	3,9292	20,4982	29,1276	29,4003	20,9730	0.0009	1159015147
20008D-05-01_R2	7675597	38,5781	5,4049	20,3978	29,1895	29,4061	21,0046	0.002	1159015147
20008D-05-02_R1	7696383	39,1601	4,0755	21,8625	27,8313	27,9392	22,3664	0.0007	1162153833
20008D-05-02_R2	7696383	38,6705	5,2218	21,8278	27,7835	27,9743	22,4125	0.0019	1162153833
20008D-05-03_R1	10784310	39,1578	4,0750	22,0768	27,6181	27,7182	22,5861	0.0007	1628430810
20008D-05-03_R2	10784310	38,7018	5,1770	22,0388	27,5547	27,7647	22,6398	0.0019	1628430810
20008D-05-04_R1	11070097	39,1817	4,0597	21,9452	27,7140	27,9276	22,4124	0.0007	1671584647
20008D-05-04_R2	11070097	38,5639	5,3881	21,8932	27,6897	27,9427	22,4725	0.0019	1671584647
20008D-05-05_R1	10828686	39,1536	4,1002	22,1468	27,6089	27,7190	22,5246	0.0007	1635131586
20008D-05-05_R2	10828686	38,6298	5,2907	22,0651	27,5639	27,7733	22,5958	0.0019	1635131586
20008D-05-06_R1	9584113	39,1952	4,0445	21,5049	28,0953	28,3791	22,0199	0.0008	1447201063
20008D-05-06_R2	9584113	38,5625	5,4069	21,4573	28,0995	28,3672	22,0740	0.002	1447201063
20008D-05-07_R1	5370221	39,1067	4,1486	21,1390	28,4771	28,7061	21,6771	0.0007	810903371
20008D-05-07_R2	5370221	38,6139	5,3173	21,1084	28,4444	28,7175	21,7277	0.002	810903371
20008D-05-08_R1	6594954	39,2042	4,0417	28,3494	21,3570	21,5034	28,7894	0.0007	995838054
20008D-05-08_R2	6594954	38,7992	5,0495	28,3640	21,3490	21,4738	28,8112	0.0019	995838054
20008D-05-09_R1	6979290	39,1469	4,0941	21,9442	27,7115	27,8961	22,4475	0.0007	1053872790
20008D-05-09_R2	6979290	38,6643	5,2347	21,8930	27,6727	27,9303	22,5020	0.002	1053872790
20008D-05-10_R1	8420857	39,3455	3,8510	21,2952	28,3434	28,5814	21,7791	0.0009	1271549407
20008D-05-10_R2	8420857	38,6233	5,3171	21,1958	28,3669	28,6096	21,8257	0.002	1271549407

20008D-05-11_R1	10687175	39,3483	3,8602	21,3205	28,3182	28,5520	21,8084	0.0008	1613763425
20008D-05-11_R2	10687175	38,6323	5,3108	21,2148	28,3383	28,5911	21,8538	0.002	1613763425
20008D-05-12_R1	13353079	39,3128	3,9088	21,8135	27,8073	28,0901	22,2882	0.0009	2016314929
20008D-05-12_R2	13353079	38,5490	5,4490	21,6988	27,8725	28,0912	22,3355	0.002	2016314929

Anexo 4. Estadística del ensamblaje de los genomas bacterianos.

File	N° contigs	Pares de bases	Ns	Gaps	Min	Max	N50
20008D-05-01	177	4936697	0	0	128	936626	492776
20008D-05-02	316	4686035	0	0	128	278562	121537
20008D-05-03	438	4816400	0	0	128	257063	98802
20008D-05-04	341	4772467	0	0	128	255439	122820
20008D-05-05	384	4703593	0	0	128	323550	220097
20008D-05-06	422	4847185	0	0	128	246600	72214
20008D-05-07	243	4826976	0	0	128	331557	170287
20008D-05-08	205	3202863	0	0	128	285552	117855
20008D-05-09	229	4832150	0	0	128	348272	156649
20008D-05-10	267	4893275	0	0	128	426577	113531
20008D-05-11	270	4895978	0	0	128	426459	107015
20008D-05-12	290	8362886	0	0	128	685813	159981

Anexo 5. Resultados del análisis para determinar el mejor modelo evolutivo.

Model	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R
GTR+G+I	65.752.582	63.527.201	-31.554.460	0.53	0.55	2.76
TN93+G+I	65.782.303	63.588.861	-31.588.294	0.52	0.53	3.04
T92+G+I	65.870.706	63.709.205	-31.651.469	0.54	0.56	2.79
HKY+G+I	65.929.310	63.746.515	-31.668.122	0.54	0.56	2.82
GTR+G	66.211.893	63.997.159	-31.790.440	n/a	0.21	2.74
TN93+G	66.221.501	64.038.707	-31.814.218	n/a	0.21	2.75
T92+G	66.334.045	64.183.189	-31.889.463	n/a	0.20	2.74
K2+G+I	66.385.014	64.234.159	-31.914.948	0.53	0.56	3.06
HKY+G	66.392.289	64.220.141	-31.905.936	n/a	0.20	2.76
K2+G	66.759.438	64.619.229	-32.108.484	n/a	0.20	2.49
GTR+I	68.227.818	66.013.084	-32.798.402	0.65	n/a	2.49
TN93+I	68.250.708	66.067.913	-32.828.821	0.64	n/a	2.43
T92+I	68.431.643	66.280.787	-32.938.262	0.65	n/a	2.53
HKY+I	68.495.060	66.322.912	-32.957.322	0.65	n/a	2.54
K2+I	68.848.709	66.708.500	-33.153.119	0.65	n/a	2.34

JC+G+I	69.336.784	67.196.575	-33.397.157	0.54	0.61	0.50
JC+G	69.719.017	67.589.455	-33.594.598	n/a	0.20	0.50
JC+I	71.711.165	69.581.603	-34.590.672	0.65	n/a	0.50
GTR	76.043.488	73.839.401	-36.712.562	n/a	n/a	2.03
TN93	76.098.361	73.926.212	-36.758.972	n/a	n/a	2.25
K2	76.645.451	74.515.889	-37.057.815	n/a	n/a	2.23
T92	76.719.437	74.579.228	-37.088.484	n/a	n/a	2.24
HKY	76.807.953	74.646.451	-37.120.093	n/a	n/a	2.24
JC	79.428.057	77.309.141	-38.455.443	n/a	n/a	0.50
