



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**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
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

CARMEN LUZ HURTADO TORRES

LIMA - PERÚ
2019

ASESOR DE TESIS:

Dr. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

Dedicado a mis padres, hermanos y mejores amigos.

AGRADECIMIENTOS

A (I):

Dios, por haberme dado la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón, iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mis padres, Exaltación y Urbano, por creer en mí y por su gran apoyo.

Mis hermanos, Betty, Miguel, Rayner, Jérica, Alexander y Carlos, por su buen ejemplo y su ayuda incondicional.

Mi asesor, por su aporte y colaboración.

Dr. MV. Luis Antonio Llanco Albornoz, por su ayuda en la elaboración de la tesis.

Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH y al financiamiento de CienciActiva del CONCYTEC.

Dr. Pete Smith, por su aporte que fue de gran ayuda para la interpretación de los antibiogramas.

Finalmente, a mis amigos, Tania, Fernando, Milene, Armando, Andrea, Lucero y Carlos, por su apoyo durante los estudios de post grado y su compañía en los buenos y malos momentos.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por CienciActiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015- FONDECYT-DE-PROMOCION 2).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III.	MARCO TEÓRICO.....	6
3.1.	<i>Aeromonas salmonicida</i>	6
3.2.	Fenómeno de resistencia antimicrobiana	8
3.3.	Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos	9
3.4.	Detección de la resistencia antimicrobiana.....	10
3.5.	Plásmidos	12
3.6.	Multidrogo-resistencia	13
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	15
V.	OBJETIVOS	16
5.1.	Objetivo general.....	16
5.2.	Objetivos específicos	16
VI.	METODOLOGÍA	17
6.1.	Lugar de estudio.....	17
6.2.	Tipo de estudio.....	17
6.3.	Criterios de inclusión y exclusión.....	17
6.4.	Tamaño de muestra	18
6.5.	Recolección y procesamiento de datos	19
6.5.1.	Eutanasia de los peces	19
6.5.2.	Aislamiento e identificación bioquímica	19
6.6.	Extracción de ADN.....	20
6.7.	Identificación molecular de <i>A. salmonicida</i> por PCR.....	21
6.8.	Perfil de baja susceptibilidad antimicrobiana de <i>Aeromonas salmonicida</i>	22
6.9.	Identificación molecular de los genes de resistencia	25
6.10.	Secuenciamiento del gen <i>gyrA</i>	26
6.11.	Plan de análisis de datos	26
6.12.	Consideraciones éticas	27
VII.	RESULTADOS.....	28
7.1.	Identificación bioquímica e identificación molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	28
7.2.	Detección de baja susceptibilidad antimicrobiana.....	29

7.4.	Fenotipos de baja susceptibilidad antimicrobiana	33
7.5.	Identificación molecular de los genes de resistencia	34
VIII.	DISCUSIÓN	37
IX.	CONCLUSIONES	45
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de peces colectados por región.....	18
Tabla 2. Valores de corte epidemiológico para diámetros de zonas de inhibición de los discos de difusión para <i>A. salmonicida</i>	23
Tabla 3. Cebadores para la identificación de los genes de resistencia.....	24
Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de <i>A. salmonicida</i> aisladas de trucha arcoíris.....	29
Tabla 5. Susceptibilidad antimicrobiana de <i>A. salmonicida</i> aisladas de trucha arcoíris por regiones.....	30
Tabla 6. Fenotipos de resistencia de <i>A. salmonicida</i> aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación molecular de <i>A. salmonicida</i>	28
Figura 2. Identificación molecular del gen <i>sul1</i>	35
Figura 3. Identificación molecular del gen <i>tetA</i>	35
Figura 4. Identificación molecular del gen <i>gyrA</i>	36

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dispersión de los diámetros registrados para oxitetraciclina.....	30
Gráfico 2. Dispersión de los diámetros registrados para florfenicol.....	31
Gráfico 3. Dispersión de los diámetros registrados para ácido oxolínico.....	31
Gráfico 4. Dispersión de los diámetros registrados para amoxicilina.....	32
Gráfico 5. Dispersión de los diámetros registrados para sulfametoxazol/trimetoprim.....	32
Gráfico 6. Patrones de baja susceptibilidad de <i>A. salmonicida</i>	33

RESUMEN

En la actualidad, el uso inadecuado de los antibióticos ha favorecido el incremento de la resistencia antimicrobiana de *Aeromonas salmonicida*, microorganismo que frecuentemente afecta el cultivo de la trucha arcoíris. En el presente estudio se ha identificado bioquímica y molecularmente *A. salmonicida*, aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de cuatro Regiones de la Sierra del Perú. A continuación, se determinó el perfil de susceptibilidad antibiótica e identificó por PCR los genes de resistencia antimicrobiana. De los 28 aislados obtenidos, algunos mostraron baja susceptibilidad (tipo no salvaje - NWT) frente a amoxicilina (96%), oxitetraciclina (64%), ácido oxolínico (57%), destacándose el perfil no salvaje amoxicilina- ácido oxolínico- oxitetraciclina (43%), indicativo de multidrogo-resistencia (MDR). Los genes *sul1* y *tetA* fueron identificados en el 6.6% (2/30) y 3.3% (1/30) de los aislados, respectivamente. Además, el secuenciamiento del gen *gyrA*, permitió confirmar la presencia de mutaciones en los codones 83 y 92 de la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR), sugiriendo su participación en los fenotipos no salvajes identificados frente a este antimicrobiano. Los resultados muestran que los aislados de *A. salmonicida* obtenidos presentan perfiles de resistencia comparables a los de otros países lo cual debe afectar el éxito terapéutico frente a este patógeno.

Palabras Clave: *Aeromonas salmonicida*, *Oncorhynchus mykiss*, Antibiograma, genes de resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

At present, the inadequate use of antibiotics has favored the increase of *Aeromonas salmonicida* antimicrobial resistance, a microorganism that frequently affects the rainbow trout farming. In the present study, *Aeromonas salmonicida*, isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of Peruvian highlands, has been identified biochemically and molecularly. Antibiotic low susceptibility profile was determined and then the antimicrobial resistance genes were identified by PCR. A total of 28 isolates of *A. salmonicida* were obtained, some of which were classified as non wild type (NWT) since they showed low susceptibility to amoxicillin (96%), oxytetracycline (64%), oxolinic acid (57%), sulfamethoxazole / trimethoprim (7%) and florfenicol (4%), highlighting the non wild type profile amoxicillin- oxolinic acid- oxytetracycline (43%), which could be indicative of multidrug- resistance (MDR). *sul1* and *tetA* genes were identified in 6.6% (2/30) and 3.3% (1/30) of isolates, respectively. Furthermore, sequencing of *gyrA* gene confirmed the presence of mutations in codons 83 and 92 of the Determining Region of Resistance to Quinolones (QRDR), suggesting their participation in the non wild type phenotypes identified against this antimicrobial. These results show that isolates of *A. salmonicida* obtained have resistance profiles comparable to those of other countries, which should affect the therapeutic success against this pathogen.

Keywords: *Aeromonas salmonicida*, *Oncorhynchus mykiss*, antibiogram, antimicrobial resistance genes.

I. INTRODUCCIÓN

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) pertenece a la familia de los salmónidos, es una especie originaria de América del Norte muy bien adaptada a las condiciones geográficas de la Sierra peruana (AECI/PADESPA-FONDEPES, 2004). En América Latina y el Caribe, el Perú ocupa el quinto lugar en producción de esta especie después de Chile, Brasil, Ecuador y México (FAO, 2012). Este sector productivo se ha convertido en uno de los más importantes del país debido al crecimiento significativo que ha conseguido durante estos últimos 10 años (PRODUCE, 2017).

La intensificación de la producción acuícola trajo consigo el incremento de enfermedades de origen bacteriano. Según los resultados del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos (SANIPES, 2016), en el país se han reportado diferentes enfermedades infecciosas, resaltando la furunculosis (causada por *Aeromonas salmonicida*), en varias regiones productivas de salmónidos.

El género *Aeromonas* incluye bacterias Gram negativas que se encuentran en entornos acuáticos, causando enfermedades en animales y humanos (Janda y Abbott, 2010). *A. salmonicida* es el causante de la furunculosis, enfermedad que se caracteriza por la presentación de lesiones externas como hemorragia en las aletas y el orificio anal, descamación epidérmica, exoftalmia y palidez branquial; lesiones internas como ascitis sanguinolenta, renomegalia, enteritis, petequias en las vísceras y esplenomegalia (González, 2002). Esta infección se ha convertido en uno de los problemas sanitarios más prevalentes en las piscifactorías del país, por lo que

está incluida en el Programa de Control de Enfermedades en Animales Acuáticos (SANIPES, 2016).

El incremento en la manifestación de enfermedades ha implicado el aumento del uso de agentes antimicrobianos, que en la mayoría de los casos se realizan sin orientación adecuada y puede conllevar a la aparición del fenómeno de resistencia antibiótica. Este es un problema emergente a nivel mundial y se observa para numerosas bacterias, incluida *A. salmonicida*. Para esta bacteria se ha reportado la falta de sensibilidad a diversas drogas, que puede estar mediada por diferentes mecanismos moleculares de resistencia (Patil *et al.*, 2016).

La sensibilidad bacteriana puede ser determinada de manera fenotípica y genotípica. Dentro de las pruebas fenotípicas se utiliza de manera tradicional la técnica de difusión en disco, y entre las pruebas genotípicas se destaca el PCR (reacción en cadena de la polimerasa), que permite caracterizar la resistencia bacteriana por medio de la identificación de genes de resistencia (IFOP, 2011).

A nivel de América Latina se han desarrollado estudios para determinar la resistencia fenotípica de esta bacteria; en Chile por ejemplo del total de cepas obtenidas y analizadas el 66% presentó resistencia al ácido oxolínico, mientras que el 33% presentó resistencia a oxitetraciclina, flumequina y amoxicilina, independientemente (IFOP, 2011). Por otra parte, otros países vienen realizando estudios moleculares para determinar la resistencia genotípica de *A. salmonicida*; en Canadá, por ejemplo, se han llegado a identificar los genes *floR*, *sul1*, *sul2* y *tetA* (Trudel *et al.*, 2016).

En el Perú se carece de datos actuales sobre la incidencia de esta enfermedad, así como de la situación y mecanismos envueltos en la resistencia antimicrobiana de *A. salmonicida*, que permitan implementar medidas sanitarias adecuadas para el sector truchícola.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia antimicrobiana es un problema emergente a nivel mundial y existen evidencias de la baja susceptibilidad, por la aparición de mutaciones espontáneas o transmisión horizontal de material genético, que expresan numerosas bacterias, incluida *A. salmonicida* (Patil *et al.*, 2016). Según estudios realizados con aislados de *A. salmonicida* procedentes de Italia, Dinamarca, Francia, Irlanda, Noruega, Escocia, este microorganismo fue catalogado como no salvaje (NWT) o de baja susceptibilidad frente a amoxicilina, oxitetraciclina, ácido oxolínico, florfenicol, gentamicina y eritromicina (Scarano *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que las bacterias de este género son portadoras de diversos genes de resistencia frente a tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetE*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*), fenicoles (*floR*, *cat*), aminoglucósidos (*strB*, *aadA1*), quinolonas (*qnrS2*) y penicilinas (*blaSHV-2*, *blaFOX-2*, *ampS*) (Bartkova *et al.*, 2017; Higuera-Llantén *et al.*, 2018; Cattoir *et al.*, 2008; Henriques *et al.*, 2006), los cuales pueden estar contenidos en plásmidos y otros elementos genéticos móviles, poniendo en evidencia el riesgo de transmisión de este material genético a otros patógenos e inclusive a especies que hacen parte de la microbiota residente de la trucha y ambientales.

La intensificación de los sistemas productivos, deficientes planes sanitarios, y la pobre calidad del agua son factores que favorecen la proliferación de *A. salmonicida*, frente al cual, la administración inadecuada de los antibióticos, incluso sin haber llegado al diagnóstico definitivo de las patologías, y la insuficiente legislación sobre el uso de drogas en acuicultura en nuestro país, son las causas para el desarrollo de resistencia antimicrobiana, trayendo como consecuencias el

aumento de mortalidad por el fracaso terapéutico y pérdidas en la productividad; también tiene impacto sobre la salud humana y el medio ambiente, ya que existe alta probabilidad que los residuos de los medicamentos utilizados en las terapias queden en el agua y los sedimentos, sobre todo porque muchos de los fármacos utilizados presentan baja biodisponibilidad. Estos remanentes contaminan el agua y generan resistencia antimicrobiana en los organismos que ocupan ese hábitat (IFOP, 2011; Patil *et al.*, 2016), por lo que, la continua exposición de medicamentos constituye un estímulo para la proliferación de bacterias resistentes a través de la presión selectiva. Generan, también, resistencia cruzada, ya que la sensibilidad frente a un antibiótico específico puede afectar la sensibilidad de otro antibiótico de la misma u otra familia. (OMS, 2001).

Por todo lo mencionado, es importante conocer los perfiles de sensibilidad antimicrobiana de *A. salmonicida* frente a las drogas de mayor uso en la industria acuícola nacional e identificar los mecanismos moleculares que podrían estar envueltos en este fenotipo.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Aeromonas salmonicida*

Las bacterias del género *Aeromonas* pertenecen a la familia *Aeromonadaceae*, orden *Aeromonadales* y clase *Gammaproteobacteria*, son Gram negativas, facultativas, no formadoras de esporas, inmóviles, miden aproximadamente $0.3 - 1.0 \times 1.0 - 3.5$ micras, y están adaptadas a temperaturas de 0 a 45 °C (Janda y Abbott, 2010). Castro *et al.* (2003), mencionan que el género *Aeromonas* incluye varias especies y que la identificación bioquímica es compleja por lo que requiere la identificación molecular.

Este género presenta dos variantes, el grupo mesófilo, como *A. hydrophila* (bacteria mótil que crece a 37 °C) y el grupo psicrófilo, en el cual se encuentra *A. salmonicida* (no mótil y no crece a 37 °C); ambas se caracterizan por ser catalasa y oxidasa positiva (Castro *et al.*, 2003). La mayoría de aislados de *A. salmonicida* producen un pigmento marrón-café en agar TSA después de 24 a 48 horas (cepas típicas), pero no todas comparten esta característica. Buller *et al.* (2004), mencionan que existen algunas cepas que pueden ser consideradas como atípicas, porque no siempre son pigmentadas y cuando lo hacen, generalmente es de intensidad leve, además tienen un periodo de crecimiento más prolongado (mayor a 5 días). Tanto las cepas típicas y atípicas se distribuyen en cuerpos de agua dulce y agua marina sin extrema salinidad, pertenecen a la microbiota del intestino de peces sanos y son el agente etiológico de la furunculosis.

La furunculosis es una enfermedad sistémica y ulcerativa, causada por cepas patogénicas de *A. salmonicida*, presentando un cuadro per agudo, agudo,

subagudo y crónicos (McCarthy, 1975). La enfermedad per aguda es común en peces jóvenes, que presentan la piel oscurecida y exoftalmia. La furunculosis aguda se manifiesta por septicemia general y los peces mueren sin lesiones detectables. Finalmente, la forma subaguda y crónica de furunculosis es más común en peces adultos y se caracteriza por la manifestación de lesiones externas como el oscurecimiento de la piel (melanosis), hemorragia de las aletas y el orificio anal, descamación epidérmica, exoftalmia y palidez branquial; lesiones internas como ascitis sanguinolenta, renomegalia, enteritis, petequias en las vísceras y esplenomegalia (González, 2002). Esta enfermedad produce elevada tasa de mortalidad en las truchas y la característica clínica que permite la identificación de la enfermedad son las lesiones ulcerosas que llegan a penetrar la musculatura, sin embargo, este signo clínico no siempre está presente (OIE, 2000).

La bacteria *A. salmonicida* se transmite de forma horizontal a través del agua contaminada, superficie de ovas infectadas, portadores vertebrados e invertebrados, y equipos e indumentarias, la transmisión vertical no ha sido confirmada. La bacteria ingresa por las branquias y la piel. El asilamiento inicial de la bacteria se realiza a partir del riñón anterior, lesiones de piel o branquias. Se siembra en agar tripticasa de soja (TSA) o caldo cerebro corazón. La identificación se realiza a través del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), aglutinación con anticuerpos específicos y las técnicas de PCR de punto final y PCR en tiempo real. La forma ulcerativa se desarrolla generalmente en los flancos, en tres etapas. Primero, hay hemorragia cutánea débil, luego se forma una lesión blanca bordeada por un tejido inflamatorio hemorrágico y finalmente se manifiesta la piel ulcerada con exposición del tejido muscular (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017).

Dentro los factores de virulencia presenta adhesinas superficiales, como la proteína de capa A que le permite adherirse a las células blanco, resistir a la fagocitosis y a la acción del complemento; no presentan flagelo, pero si presentan el pili tipo I (adherencia) y tipo IV (virulencia). Presentan genes para la síntesis y captación de sideróforos. También presenta los sistemas de secreción T2SS (aerolisinas) y T3SS que transfieren proteínas (destrucción del citoesqueleto). Por último, el quorum sensing media la producción de biopelículas, serina proteasa y metaloproteasa (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017).

3.2. Fenómeno de resistencia antimicrobiana

El uso de antibióticos es el tratamiento más empleado por los productores acuícolas para controlar las pérdidas ocasionadas por enfermedades bacterianas como la furunculosis. Entre los medicamentos más empleados en la acuicultura se encuentran las quinolonas, tetraciclinas, florfenicol y las sulfas, pero el uso inadecuado de estos han generado que las bacterias expresen mecanismos innatos (Guardabassi y Courvalin, 2006) y adquiridos de resistencia (Van Hoek *et al.*, 2011).

Cada fármaco tiene un mecanismo de acción diferente, frente a los cuales se ha desarrollado uno o varios mecanismos de resistencia, los que destacan por su relevancia clínica son: las bombas de eflujo, alteraciones de la permeabilidad, inactivación enzimática y alteraciones del sitio blanco (Tenover, 2006). Estos mecanismos tienen una base genética y pueden ser adquiridos mediante mutaciones puntuales (durante la división celular) o por la transferencia horizontal de material genético, principalmente por conjugación. En la conjugación participan elementos

móviles genéticos (plásmidos, transposones e integrones) que se transmiten por medio de estructuras proteicas denominadas pilis (Tenover, 2006; Romero *et al.*, 2012).

3.3. Mecanismos de acción y de resistencia a los antimicrobianos

Diferentes mecanismos involucrados en la disminución de la sensibilidad antimicrobiana frente a los fármacos utilizados en acuicultura han sido reportados. Así, por ejemplo, frente a las quinolonas, que participan en la cohibición de la topoisomerasa y de la ADN girasa bacteriana, el mecanismo de resistencia se debe a mutaciones puntuales en Regiones Determinantes de Resistencia a Quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *parC* que generan substitución de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico (Alcaide *et al.*, 2010); sistemas de expulsión y genes plasmídicos, también están implicados (Ruiz, 2003). En el caso de las tetraciclinas, que actúan uniéndose al ribosoma bacteriano para inhibir la síntesis proteica, el mecanismo de resistencia se da por bombas de eflujo específicas para este antimicrobiano, codificadas por los genes *tetA* y *tetB* entre otros (Chopra y Roberts, 2001). El mecanismo de acción del cloranfenicol es la inhibición de la biosíntesis de proteínas al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S, y el mecanismo de resistencia es la inactivación enzimática por acetilación y exportadores específicos de cloranfenicol, mediados por los genes *cat*, *floR* y *cmlA* (Schwarz, 2004). Adicionalmente, en el caso de los betalactámicos, que actúan interfiriendo la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, el mecanismo de resistencia más diseminado es la producción de enzimas que hidrolizan el enlace amida del núcleo betalactámico, mediado por los genes

*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CARB, *bla*OXA, *bla*CTX-M y *bla*GES (Rupp y Fey, 2003; Mosquito *et al.*, 2011). Finalmente, en el caso del sulfametoxazol-trimetoprim, cuyo mecanismo de acción combinado es la inhibición de las enzimas dihidropteroato sintasa y dihidrofolato reductasa, ambas necesarias en la ruta del ácido fólico, el mecanismo de resistencia está mediado por los genes *sul1* y *sul2* (sulfametoxazol) y el gen *dfr* (trimetoprim), que codifican formas mutantes de la enzima blanco (Ho *et al.*, 2009).

3.4. Detección de la resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana se puede determinar a nivel molecular y a nivel fenotípico. La identificación molecular se realiza con el uso de herramientas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite identificar genes que confieren resistencia a antibióticos (Garza *et al.*, 2009).

Por otro lado, para la resistencia antimicrobiana fenotípica existen diferentes técnicas. Así, Cavalieri *et al.* (2005), elaboraron el “Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana”, en base a los estándares reportados por el CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio), donde se indica que la difusión en disco (Kirby-Bauer) y la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) (panel de micro dilución en caldo y pruebas de dilución en agar) son las principales pruebas para detectar la pérdida de la sensibilidad antibiótica, pero también indican que existen sistemas comerciales manuales (E-Test) y automatizados (Vitek, MicroScan). Los datos de la difusión en disco y la concentración mínima inhibitoria deben ser interpretados bajo los criterios establecidos por organizaciones encargadas.

El Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y el (CLSI), son organizaciones que establecen criterios para la interpretación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad, ya sea a través de puntos de interrupción clínicos (clinical breakpoints) o valores de corte epidemiológico (epidemiological cut-off values – ECOFFs - ECV). El primero, se basa en datos de farmacocinética/farmacodinamia y estudios clínicos, por lo que es útil para evaluar la eficacia de los tratamientos. Este divide las bacterias en tres categorías: susceptibles (con probabilidad de éxito terapéutico), intermedias (con indeterminado efecto terapéutico) y resistentes (con probabilidad de fracaso terapéutico). Mientras el segundo indica la aparición de mecanismos de resistencia y permite la vigilancia y detección de la resistencia emergente. Este divide las bacterias en dos categorías: tipo salvaje (wild type - WT), susceptibles al antimicrobiano por no tener mecanismos de resistencia detectables; y tipo no salvaje (non wild type - NWT), de baja susceptibilidad debido a mecanismos de resistencia adquiridos y/o mutaciones (Kahlmeter *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, *A. salmonicida* es el único agente patógeno de peces que cuenta con valores de corte epidemiológico (oxitetraciclina, ácido oxolínico, florfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, gentamicina y eritromicina) y puntos de interrupción clínicos (para oxitetraciclina y ácido oxolínico) (CLSI, 2014). Los puntos de interrupción clínicos para los demás antibióticos no están bien establecidos por lo que son tomados de *Enterobacteriaceae*; es de resaltar que ningún criterio ha sido establecido por el EUCAST (Scarano *et al.*, 2018). Debido a la ausencia de puntos de interrupción clínicos, los valores de corte epidemiológico pueden ser usados para interpretar la sensibilidad antimicrobiana (Kahlmeter *et al.*, 2003). Además, si ambos se comparan, el segundo puede ser menos sensible en la

detección de resistencia emergente debido a que éstos puntos de interrupción son dos a tres diluciones más altas que el primero, el cual incluso permite distinguir mejor entre cepas de tipo salvaje y cepas que han adquirido resistencia debido a la presión selectiva (Scarano *et al.*, 2018).

3.5. Plásmidos

Los plásmidos son moléculas extracromosomales de ADN, circular o lineal, que se encuentran en microorganismos, en los dominios bacteria, arquea y eucariota (Funnell y Phillips, 2004). Estos son vehículos importantes para la comunicación genética entre bacterias y son los elementos genéticos móviles más difundidos, debido a su gran facilidad de transferencia (McIntosh *et al.*, 2008). Se clasifican principalmente en:

- a. Plásmidos conjugativos y no conjugativos. Los plásmidos conjugativos tienen origen de replicación, locus para la partición, genes que codifican funciones de transferencia y genes accesorios que a menudo incluyen uno o más determinantes de resistencia. Mientras que los plásmidos no conjugativos no pueden efectuar la conjugación y autotransferencia, por lo que pueden transferirse sólo con la ayuda de plásmidos conjugativos (Rossolini *et al.*, 2017).
- b. También pueden clasificarse en grupo de incompatibilidad, que se definen por la incapacidad que tienen algunos plásmidos de permanecer en la misma célula huésped, debido a que comparten sistemas similares de replicación (Snyder *et al.*, 2013). Por ejemplo, en *A. salmonicida*, pRAS1 es un plásmido del grupo de incompatibilidad U (IncU) y tiene la

capacidad de compartir información genética con otros patógenos acuáticos (Sorum *et al.*, 2003).

c. De acuerdo con la función que cumplen se clasifican en plásmidos F (fertilidad), plásmidos de columna (codifican bacteriocinas), plásmidos degradativos (digieren sustancias), plásmidos de virulencia (factores de virulencia) y plásmidos R (contienen genes que confieren resistencia a los antimicrobianos). Con respecto a estos últimos, en *A. salmonicida* se han encontrado los plásmidos pAsa4, pAsa7, pAsa8, pAr-32, pRAS1, pRAS3.1, pRAS3.2, Pras3.3, Psn254b y Pab5S9b, conocidos por albergar genes de resistencia a antibióticos (Bartkova *et al.*, 2017).

Estos elementos móviles, les otorgan a las bacterias (como *A. salmonicida*) gran plasticidad genómica (Tanaka *et al.*, 2016). Recientemente se han encontrado variantes del plásmido pAsa4 (pAsa4b y pAsa4c) en *A. salmonicida*, lo que confirma su estructura recombinante (Tanaka *et al.*, 2016), y su relación con la aparición de cepas bacterianas multidrogo-resistentes (Del Castillo *et al.*, 2013).

3.6. Multidrogo-resistencia

La resistencia múltiple ocurre cuando se desarrolla resistencia a varios antibióticos, al respecto, Magiorakos *et al.* (2012), elaboraron una propuesta internacional de definiciones para la resistencia bacteriana adquirida, que clasifica a estos microorganismos como: multidrogo-resistentes (MDR), extremadamente-drogo-resistentes (XDR) y pandrogo-resistentes (PDR). Las bacterias MDR se caracterizan por la no susceptibilidad al menos a un agente en tres o más categorías de antimicrobianos; las bacterias clasificadas como XDR se caracterizan por la no

susceptibilidad al menos a un agente en todas las categorías, pero permanece susceptible a una o dos categorías de antimicrobianos y las bacterias PDR se definen como no susceptibles a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos. Sobre lo anterior, en el trabajo realizado por Akinbowale *et al.* (2007) se reportó la presencia de resistencia múltiple a fármacos en la acuicultura, encontrando que el 10.4% (5/48) fueron resistentes a una clase de antibióticos, el 52.1% (25/48) a dos clases de antibióticos y el 37.5% (18/48) mostraron resistencia a tres o más de los antibióticos evaluados, siendo indicativos de la presencia de bacterias multidrogo-resistentes (*Aeromonas* spp y *Pseudomonas* spp).

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La producción de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tiene importancia económica, social y nutritiva para los productores y el estado. La primera porque desde su introducción al país, hace algunas décadas, ha venido creciendo vertiginosamente y en la actualidad representa una actividad muy dinámica, convirtiéndose en la especie dulceacuícola de más producida (50% de las 100 000 toneladas anuales de producción acuícola nacional) (PRODUCE, 2017). Importancia social y nutritiva porque es una actividad generadora de empleo y desde el punto de vista nutritivo contribuye a combatir la desnutrición, garantizando la seguridad alimentaria.

La aeromoniasis es una enfermedad bacteriana importante ya reportada en el Perú que, según los resultados del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos que realizó el SANIPES en el año 2016, representa una de las enfermedades más prevalentes (37%) que afecta a la producción trucha arcoíris, pero existe poca información sobre reportes de resistencia antimicrobiana frente a este patógeno y mucho menos sobre los mecanismos moleculares de resistencia envueltos. Es por eso que el objetivo del presente estudio fue caracterizar la resistencia fenotípica y molecular de *A. salmonicida*, y la información generada, será útil para que las autoridades competentes establezcan un sistema de vigilancia y monitoreo eficiente, donde el uso de antibióticos esté adecuadamente controlado con el objetivo de disminuir la resistencia antimicrobiana.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Determinar el perfil de resistencia antimicrobiana e identificar los genes de resistencia a antibióticos en *Aeromonas salmonicida* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), provenientes de cuatro regiones de la Sierra del Perú.

5.2. Objetivos específicos

- Detectar la presencia de *Aeromonas salmonicida* obtenidos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de seis centros productivos distribuidos en las regiones de Puno, Cajamarca, Junín y Ancash
- Determinar la resistencia de los aislados de *Aeromonas salmonicida* frente a diferentes antibióticos de uso común en la acuicultura.
- Detectar, a nivel molecular, los genes asociados a la resistencia antimicrobiana de los aislados en estudio.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Lugar de estudio

En total se incluyeron seis centros truchícolas de Junín (3), Puno (1), Ancash (1) y Cajamarca (1), durante los años 2017-2018 (anexo: Tabla 7). Posteriormente, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.

6.2. Tipo de estudio

Esta investigación es de tipo observacional y transversal.

6.3. Criterios de inclusión y exclusión

Fueron incluidos aislados de *A. salmonicida* obtenidos de peces con lesiones compatibles con furunculosis, provenientes de centros productivos que tenían antecedentes de la enfermedad.

No fueron incluidos aislados provenientes de peces clínicamente sanos ni de muestras ambientales.

6.4. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se determinó a través del muestreo por conveniencia (Casal y Mateu, 2003), donde se eligieron 200 peces enfermos con signos sugestivos de furunculosis. La muestra fue colectada desde noviembre del 2017 hasta septiembre del 2018:

Tabla 1. Cantidad de peces colectados por Región

Región	Cantidad de peces
Cajamarca	65
Ancash	30
Junín	80
Puno	25
Total	200

La cantidad de aislados se determinó usando la fórmula de detección de un evento a través del software WinEpi 2.0 (Working in Epidemiology).

Por lo tanto, para detectar con un nivel de confianza del 95%, si en la muestra seleccionada existe al menos uno con la presencia del gen *BlaSHV*, se deben seleccionar al menos 28 aislados. Se asume que la proporción de ocurrencia del evento es del 10.5%, basado en el estudio de Henriques *et al.* (2006).

$$n = \frac{\ln \alpha}{\ln(1 - p)}$$

Donde:

n: número de aislados

α : error de tipo I = 1-NC (nivel de confianza de 95%)

p: proporción de ocurrencia 10.5%

6.5. Recolección y procesamiento de datos

6.5.1. Eutanasia de los peces

Doscientas truchas arcoíris, de diferentes edades y con signos clínicos sugestivos de aeromoniasis (melanosis, nado errático, abscesos laterales), fueron anestesiadas en baño de inmersión con Eugenol (50 mg/L), durante 3-5 minutos y luego se sacrificaron cortando el cordón espinal (Noga, 2010).

6.5.2. Aislamiento e identificación bioquímica

Inmediatamente después de la necropsia se sembraron, en agar TSA (Liofilchem, USA), repiques del bazo, riñón anterior, hígado y piel lesionada. Estas placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 a 48 horas (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017), luego una a dos colonias sospechosas y de las más alejadas fueron repicadas (Orvay, 1993 y Barbara *et al.*, 2008).

Para la identificación bioquímica presuntiva se realizaron pruebas de oxidasa y catalasa, seguidas de tinción de Gram, donde se observó la presencia de bacilos Gram negativos (microscopio óptico ZEISS) (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017). Los aislados presuntivos también fueron cultivados en agar selectivo GSP (Glutamate Starch Phenol Red Agar) (Sigma-Aldrich, USA) e

incubadas a 22 °C durante 24-48 horas, para confirmar nuestros resultados. Las colonias purificadas se incubaron en crioviales con BHI para luego ser congeladas con 20% de glicerol a -60 °C (Copan, 1996; Castro *et al.*, 2003), también se incubaron en BHI para la extracción del ADN.

6.6. Extracción de ADN

Una colonia de cada cepa previamente aislada se incubó durante toda la noche en caldo BHI, lavó dos veces con solución salina tamponada (PBS, pH 7.2) y centrifugó a 10 000 g durante 5 min (Vincent *et al.*, 2014). En seguida se utilizó el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Canadá), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit permite la obtención del ADN total microbiano, incluyendo el plasmidial (Becker *et al.*, 2016; Bartkova *et al.*, 2017).

La concentración del ADN genómico fue evaluada por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm, obteniendo un promedio de 502.14 ± 123.43 ng/uL de ADN genómico y la pureza mediante el ratio 260/280, obteniendo un promedio de 1.81 ± 0.1 en el equipo nanodrop (Thermo Scientific, USA). El ADN obtenido fue diluido a una concentración de 50 ng/uL, con la siguiente fórmula (SENASICA, 2015):

$$C1*V1 = C2*V2$$

Donde:

C1: concentración inicial

C2: concentración final

V1: volumen inicial

V2: volumen final

Una vez diluido, el ADN fue utilizado para para la identificación molecular de *A. salmonicida* y los genes de resistencia.

6.7. Identificación molecular de *A. salmonicida* por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando los cebadores - AS1 (5'-GGCCTTTCGCGATTGGATGA-3') y AS2 (5'-TCACAGTTGACACGTATTAGGCGC-3') - y las condiciones de PCR trabajadas por Hoie *et al.* (1997), para la amplificación de una región conservada de 271 bp del gen ARNr 16S. La amplificación del ADN fue realizada en un volumen final de 20 µL, conteniendo 2X del buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.5 U Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.4 pmol de cada cebador y 50 ng ADN molde. Los ciclos de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 1 min), alineamiento (50 °C por 1 min) y extensión (72 °C por 1 min); finalmente la extensión final (72°C por 10 min). Se incluyó como control positivo en cada reacción a la cepa de *A. salmonicida* ATCC® 33658 y como control negativo, agua ultra pura libre de DNAsas.

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis (80 V/cm durante 60 min) en geles de agarosa (Calbiochem, Alemania) al 1.2%, incluyendo el marcador de peso molecular Perfect DNA™ 50 bp Ladder (Novagen-Merck Millipore, Alemania). Posteriormente, fueron teñidos con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Merck Millipore, Alemania), durante 20 min. Al término del

tiempo se visualizaron y compararon las bandas de ADN en el transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, USA). La presencia de una banda intensa y única, de tamaño comparable (271 bp) al de la muestra control confirmó el resultado.

6.8. Perfil de baja susceptibilidad antimicrobiana de *Aeromonas salmonicida*

Primero, los aislados fueron reactivados en agar TSA e incubaron a 22 °C durante 24 a 48 horas (Copan, 1996). La baja susceptibilidad antimicrobiana de *A. salmonicida* fue evaluada según las pautas del CLSI (2006), con la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer. Para lo cual se utilizó agar Mueller Hinton (Liofilchem, Italia), con inóculos de la bacteria ajustados a una densidad óptica de 0.5 de la escala de Mc Farland ($1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$). Luego se colocaron los discos que contenían los antibióticos de mayor uso en la industria acuícola nacional y que no están prohibidos por el SANIPES (PR-DSANIPES/CSMAA-02): fenicoles (florfenicol 30 µg), tetraciclinas (oxitetraciclina 30 µg), quinolonas (ácido oxolínico 2 µg), betalactámicos (amoxicilina 10 µg) y sulfonamidas/diaminopirimidinas (sulfametoxazol/trimetoprim 23.75-1.25 µg), (Oxoid, Canadá). Se incubaron por 24 a 48 horas a 22 °C. Las cepas de *A. salmonicida* ATCC® 33658 y *E. coli* ATCC 25922, fueron usadas como controles de la correcta ejecución de la técnica, como lo recomendado por el CLSI (2014).

Posteriormente se procedió a la lectura de las placas, utilizando una regla para la medición de los halos (mm), y a partir de estos valores los aislados fueron clasificadas como tipo salvaje/completamente susceptibles (WT) debido a que no

presentan mecanismos de resistencia detectables o tipo no salvaje/baja susceptibilidad (NWT) debido a mecanismos de resistencia adquiridos y/o mutaciones, de acuerdo con los valores de corte epidemiológico para *A. salmonicida* establecidos por el CLSI (2014) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de corte para diámetros de zonas de inhibición de los discos de difusión para *A. salmonicida*.

Fármaco	Concentración (μg)	Criterio de lectura		Fuente
		WT	NWT	
Oxitetraciclina	30	≥ 28	≤ 27	CLSI, 2014
Florfenicol	30	≥ 27	≤ 26	CLSI, 2014
Sulfametoxazol/ trimetoprim	25	≥ 20	≤ 19	CLSI, 2014
Ácido oxolínico	30	≥ 30	≤ 29	CLSI, 2014
Ampicilina	10	≥ 27	≤ 26	Smith <i>et al.</i> , 2007

WT: tipo salvaje/completamente susceptible, NWT: tipo no salvaje/baja susceptibilidad.

Tabla 3. Cebadores para la identificación de los genes de resistencia

Gen	Antibiótico	Secuencia de nucleótidos 5'– 3'	Amplicón (bp)	T° de alineamiento (°C)	Referencia
<i>sul1</i> (F)	Sulfametoxazol	GGGCTACCTGAACGATATCC	550	60	Trudel <i>et al.</i> , 2016
(R)		CTAGGCATGATCTAACCCCTCG			
<i>dfrA1</i> (F)	Trimetoprim	TGGTAGCTATATCGAAGAATG GAGT	425	50	Grape <i>et al.</i> , 2007
(R)		TATGTTAGAGGCCGAAGTCTTG GGTA			
<i>floR</i> (F)	Florfenicol	TTGAGCCTCTATATGGTGATG C	632	60	Trudel <i>et al.</i> , 2016
(R)		GTTGTCACGATCATTACAAGC G			
<i>tetA</i> (F)	Tetraciclina	CAAGCAGGATGTAGCCTGTG	526	60	Trudel <i>et al.</i> , 2016
(R)		ATTGCCGATATCACTGATGG			
<i>gyrA</i> (F)	Ácido oxolínico	CCATGAGCGTGATCGTAGGA	663	58	Giraud <i>et al.</i> , 2004
(R)		CTTTGGCACGCACATAGACG			
<i>blaSHV</i> (F)	Amoxicilina	GCGAAAGCCAGCTGTCTGGGC	304	62	Henriques <i>et al.</i> , 2006
(R)		GATTGGCGGCGCTGTTATCGC			
<i>blaOXA2</i> (F)	Amoxicilina	CAAGCCAAAGGCACGATAGT TG	561	56	Henriques <i>et al.</i> , 2006
(R)		CTCAACCCATCCTACCCACC			

WT: tipo salvaje/completamente susceptible, NWT: tipo no salvaje/baja susceptibilidad.

F: Forward; R: Reverse

6.9. Identificación molecular de los genes de resistencia

Las muestras de ADN de las cepas fueron sometidas a PCR para la identificación de los genes de resistencia, usando los primers y los protocolos estandarizados por los autores mencionados en la Tabla 3. Como es conocido, muchos genes de resistencia antimicrobiana son compartidos por varias bacterias Gram negativas (Gao *et al.*, 2018; Lam *et al.*, 2019), por esto, el ADN de cepas de *E. coli*, obtenidas a partir de muestras clínicas, positivas para los genes *sul1*, *dfrA1*, *floR*, *tetA*, *BlaSHV* y *BlaOXA-2*, previamente secuenciadas y publicadas, fueron utilizadas como controles positivos. Estas fueron facilitadas por el Dr. Jesús Tamariz Ortiz del Laboratorio de Investigación y Desarrollo “*Abraham Vaisberg Wolach*”-LID, Perú.

La amplificación del ADN fue realizada en un volumen final de 20 μ L, conteniendo 2X del buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μ M dNTP mix, 0.5 U Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.4 μ M de cada cebador y 50 ng ADN molde. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis según las condiciones mencionadas anteriormente. La presencia de bandas intensas, únicas y de tamaño similar al de los controles (Tabla 3) confirmaron el resultado.

6.10. Secuenciamiento del gen *gyrA*

Los productos de PCR del gen *gyrA* (detallados en la tabla 3), que codifica resistencia para el ácido oxolínico (quinolona), fueron purificados con el kit comercial QIAquick PCR purification (Qiagen, Canadá), siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego fueron enviados a España para su secuenciamiento (Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Santiago de Compostela). Posteriormente, para la detección de mutaciones, los datos fueron alineados con el programa Bio Edit Sequence Alignment Editor, versión 7.0.5.3. Además, se utilizó como referencia una secuencia de nucleótidos del gen *gyrA* de una cepa de *A. salmonicida* disponible en el GenBank (L47978).

6.11. Plan de análisis de datos

Los resultados de la resistencia fenotípica fueron analizados con estadística descriptiva mediante la elaboración de tablas de frecuencia en el programa Excel.

Se utilizó el software Bioscand AB - TABY, Suecia (Automatic_NRI-disc diffusion_V01B.xlsm), para la elaboración de gráficos de barras, donde se indica la distribución de las medidas de los diámetros respecto al valor de corte, el cual clasifica las bacterias en salvajes y no salvajes.

6.12. Consideraciones éticas

El presente trabajo fue aprobado por el comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con código de registro 102712.

VII. RESULTADOS

7.1. Identificación bioquímica e identificación molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se obtuvieron 28 aislados de *A. salmonicida* del bazo, riñón y lesión de piel de truchas arcoíris procedentes de las regiones de Puno (4), Junín (9), Ancash (3) y Cajamarca (12). Según la tinción de Gram se observaron diplobacilos de color rosado tenue. Bioquímicamente resultaron ser oxidasa y catalasa positivas. Los 28 aislados presuntivos se lograron identificar molecularmente (Figura 1). Un resumen de esto resultados se pueden observar en el anexo 1.

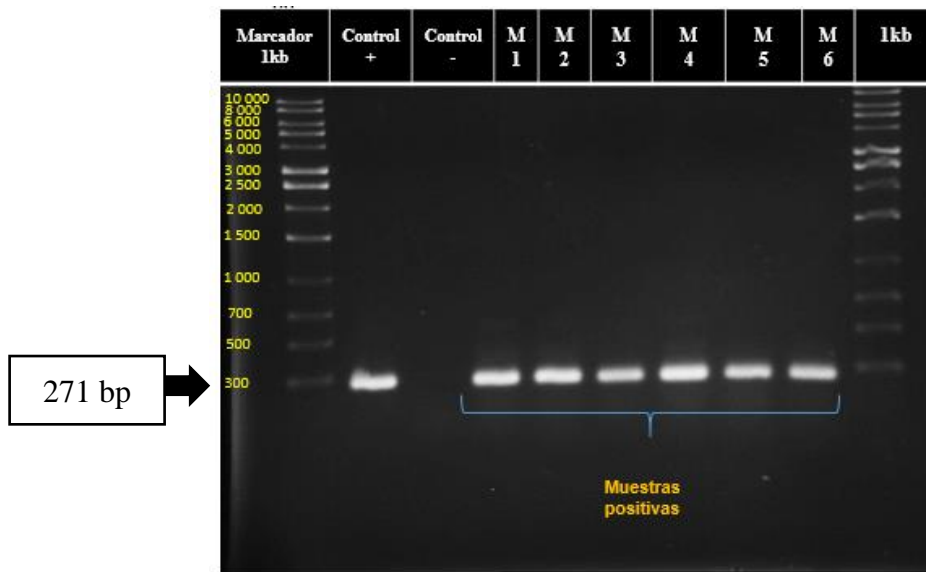


Figura 1. Identificación molecular por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) de *A. salmonicida* a través de la amplificación del gen ARNr 16S (271pb). Carril 1 y 10: marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2: control positivo (*A. salmonicida* ATCC® 33658). Carril 3: control negativo: agua ultra pura libre de DNAasas. Carril

4, 5, 6: muestra procedentes de Puno, Ancash, Cajamarca. Carril 7, 8 y 9: muestras procedentes de Junín.

7.2. Detección de baja susceptibilidad antimicrobiana

Los resultados de la prueba de difusión en disco se muestran en la Tabla 4. La amoxicilina (96%), oxitetraciclina (64%) y ácido oxolínico (57%), fueron los antibióticos frente a los cuales se presentaron mayores porcentajes de aislados no salvajes (NWT) o resistentes (de baja susceptibilidad), mientras que la asociación sulfametoxazol/trimetoprim (93%) y florfenicol (96%) fueron los antibióticos que presentaron mayor cantidad de aislados salvajes o completamente sensibles (Tabla 4).

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de *A. salmonicida* aisladas de trucha arcoíris

Susceptibilidad antimicrobiana	AM		OT		AO		ST		FFC	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Tipo salvaje (WT)	1	4	10	36	12	43	26	93	27	96
Tipo no salvaje (NWT)	27	96	18	64	16	57	2	7	1	4

AM: Amoxicilina (10 µg), AO: ácido oxolínico (2 µg), ST: sulfametoxazol/trimetoprim (23.75-1.25 µg), OT: oxitetraciclina (30 µg), FFC: florfenicol (30 µg).

Tabla 5. Baja susceptibilidad antimicrobiana de *A. salmonicida* aisladas de trucha arcoíris por regiones

Aislados no salvajes (NWT)	AM		OT		AO		ST		FFC	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Junín	9	100	6	67	5	56	1	11	1	11
Ancash	3	100	2	67	2	67	0	0	0	0
Puno	4	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Cajamarca	11	92	10	83	9	75	1	8	0	0

AM: Amoxicilina (10 µg), AO: ácido oxolínico (2 µg), ST: sulfametoxazol/trimetoprim (23.75-1.25 µg), OT: oxitetraciclina (30 µg), FFC: florfenicol (30 µg).

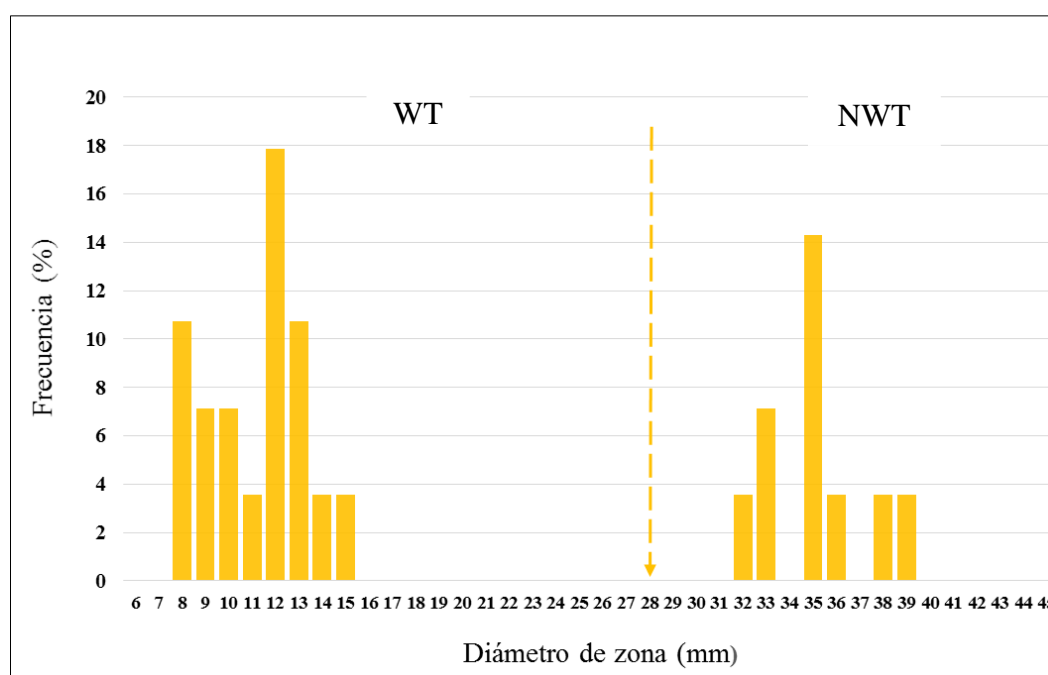


Gráfico 1. Dispersión de los diámetros registrados para oxitetraciclina (30 µg) contra 28 aislados de *A. salmonicida*. La flecha indica el valor de corte epidemiológico, WT: aislados de tipo salvaje, NWT: aislados de tipo no salvaje.

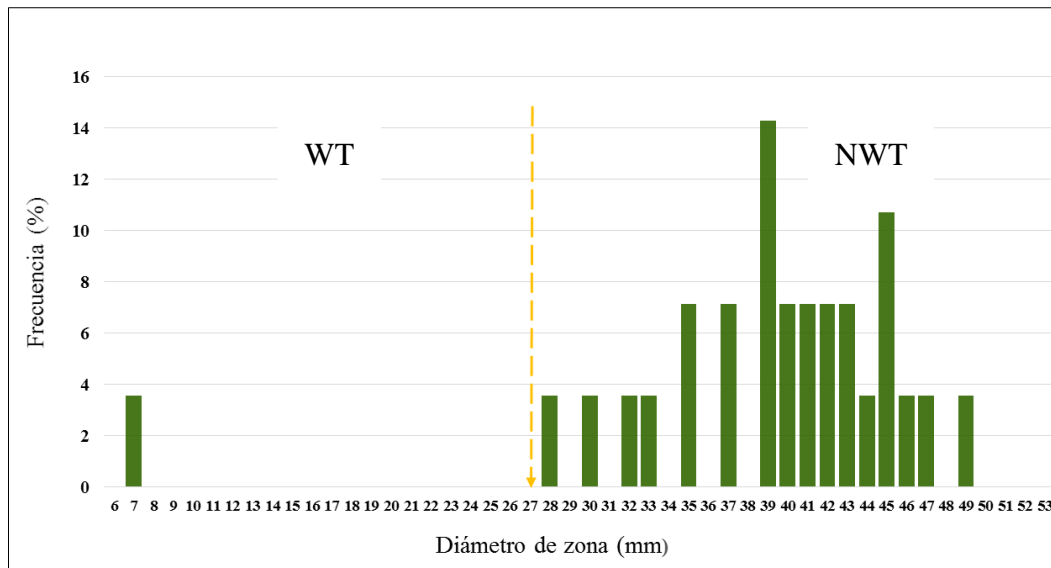


Gráfico 2. Dispersión de los diámetros registrados para florfenicol (30 µg) contra 28 aislados de *A. salmonicida*. La flecha indica el valor de corte epidemiológico, WT: aislados de tipo salvaje, NWT: aislados de tipo no salvaje.

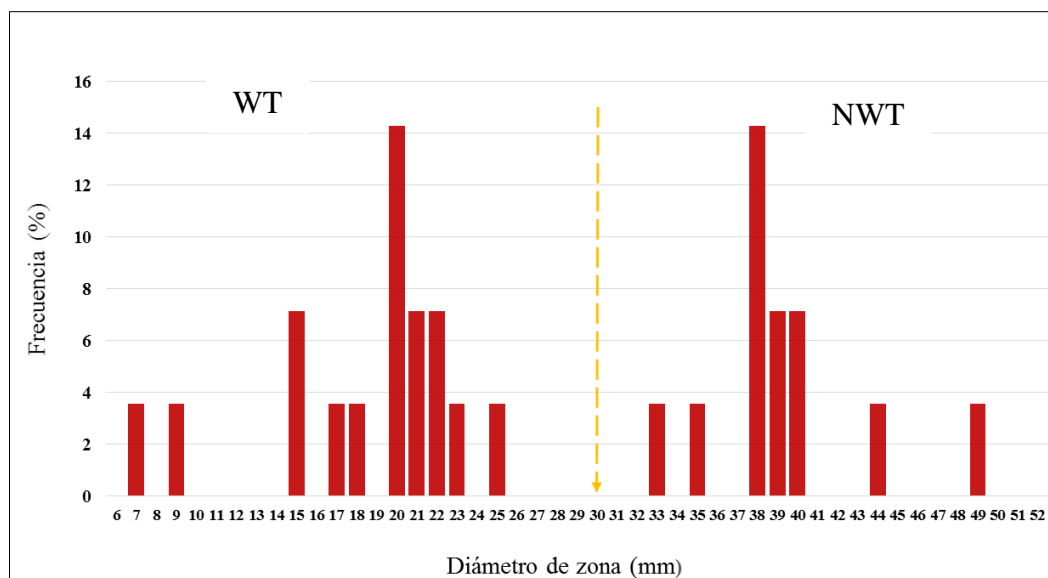


Gráfico 3. Dispersión de los diámetros registrados para ácido oxolínico (2 µg) contra 28 aislados de *A. salmonicida*. La flecha indica el valor de corte epidemiológico, WT: aislados de tipo salvaje, NWT: aislados de tipo no salvaje.

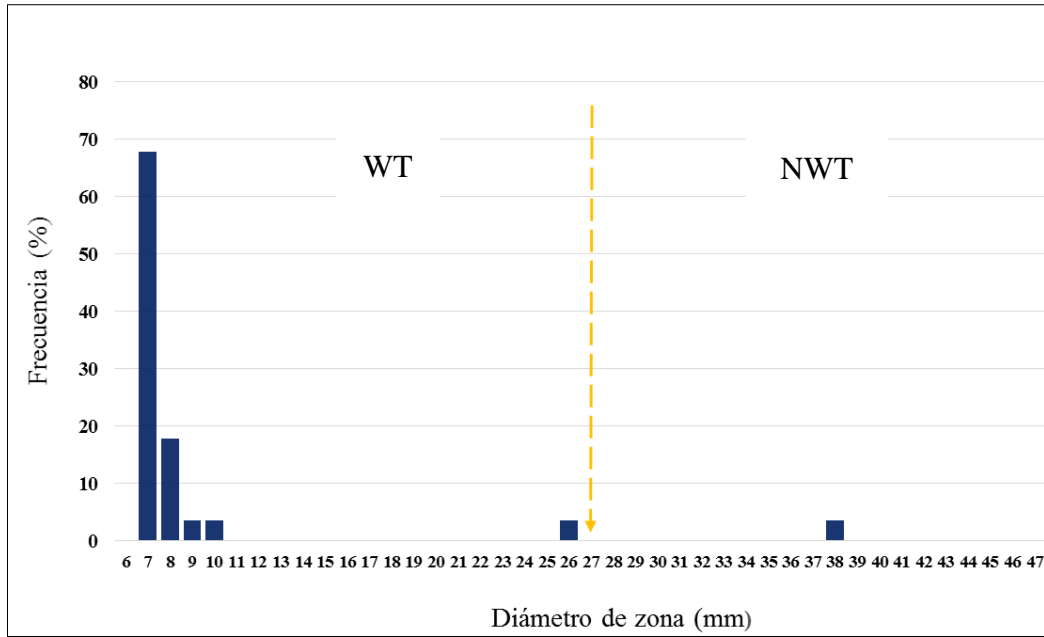


Gráfico 4. Dispersión de los diámetros registrados para amoxicilina (10 µg) contra 28 aislados de *A. salmonicida*. La flecha indica el valor de corte epidemiológico, WT: aislados de tipo salvaje, NWT: aislados de tipo no salvaje.

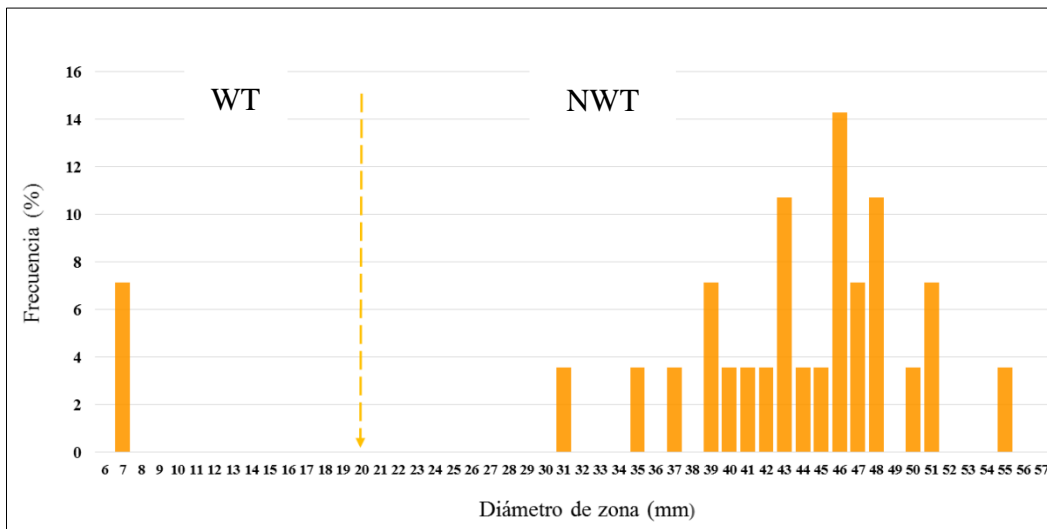


Gráfico 5. Dispersión de los diámetros registrados para sulfametoxazol/trimetoprim (23.75-1.25 µg) contra 28 aislados de *A. salmonicida*. La flecha indica el valor de corte epidemiológico, WT: aislados de tipo salvaje, NWT: aislados de tipo no salvaje.

7.3. Patrones de baja susceptibilidad antimicrobiana

Según el Gráfico 6, el 29%, 21%, 46% y 4% de los aislados mostraron ser no salvajes o de baja susceptibilidad (NWT) frente a uno, dos, tres y cinco antibióticos, respectivamente. El 50% de los aislados presentó baja susceptibilidad frente a múltiples antibióticos o multidrogo-resistencia, es decir pérdida de la susceptibilidad frente a tres o más antibióticos de diferentes familias.

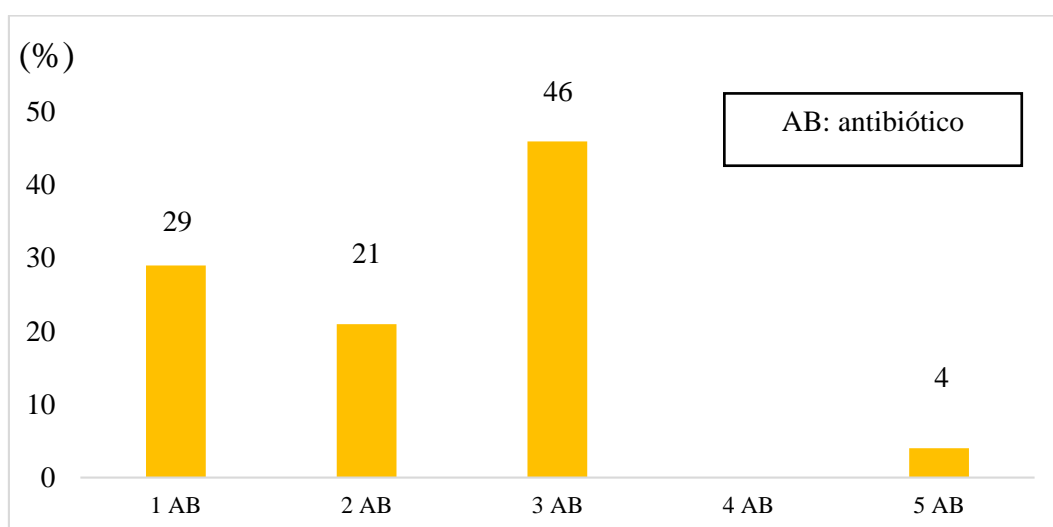


Gráfico 6. Patrones de baja susceptibilidad de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú

7.4. Fenotipos de baja susceptibilidad antimicrobiana

Los aislados de *A. salmonicida* mostraron siete fenotipos de baja susceptibilidad (Tabla 6), destacando los fenotipos: amoxicilina - ácido oxolínico - oxitetraciclina (43%); amoxicilina – oxitetraciclina (14%); y amoxicilina (29%). Se puede observar que la amoxicilina y la oxitetraciclina son los antibióticos que están presentes en la mayoría de los fenotipos resistentes.

Tabla 6. Fenotipos de baja susceptibilidad de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú

Fenotipos de baja susceptibilidad antimicrobiana	Número de aislados	Frecuencia (%)
AM	8	29
AM-OT	4	14
AM-AO	1	4
AO-OT	1	4
AM-AO-OT	12	43
AM-AO-ST	1	4
AM-AO-OT-FFC-ST	1	4
Total	28	100

AM: Amoxicilina, AO: ácido oxolínico, ST: sulfametoxazol/trimetoprim, OT: oxitetraciclina, FFC: florfenicol.

7.5. Identificación molecular de los genes de resistencia

Se detectó el gen *sul1* en dos aislados con baja susceptibilidad para el sulfametoxazol/trimetoprim (6.6%) (Figura 2) y el gen *tetA* en un aislado de baja susceptibilidad para oxitetraciclina (3.3%) (Figura 3). Por otro lado, los genes *dfrA1*, *floR*, *blaSHV* y *blaOXA-2* no fueron identificados en ningún aislado.

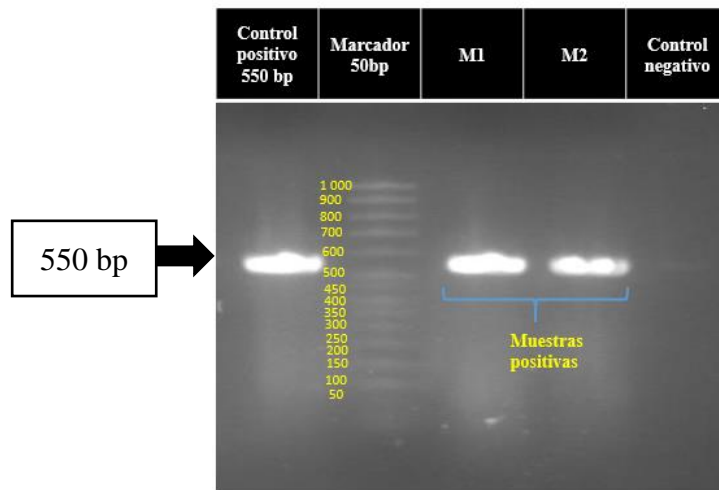


Figura 2. Identificación molecular del gen *sul1*, amplificado de 550 bp. Carril 1: control positivo. Carril 2: marcador de peso molecular 50 bp. Carril 3 (M1): aislado procedente de Ingenio (Junín). Carril 4 (M2): aislado procedente de Cajamarca. Carril 5: Control negativo.

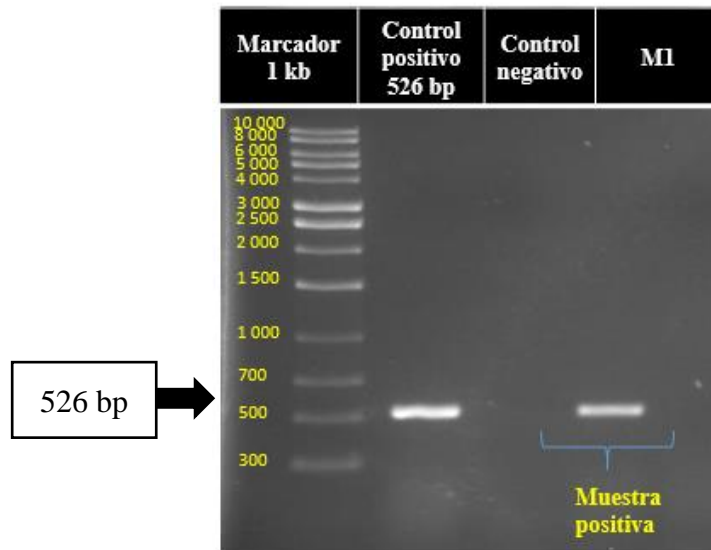


Figura 3. Identificación molecular del gen *tetA*, amplificado de 526 bp. Carril 1: marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2: control positivo. Carril 3: control negativo. Carril 4 (M1): muestra procedente de Ancash.

Respecto al gen *gyrA*, se enviaron a secuenciar 7 de los 16 aislados de tipo no salvaje (Figura 4), con la finalidad de encontrar mutaciones puntuales, responsables de conferir resistencia frente al ácido oxolínico.

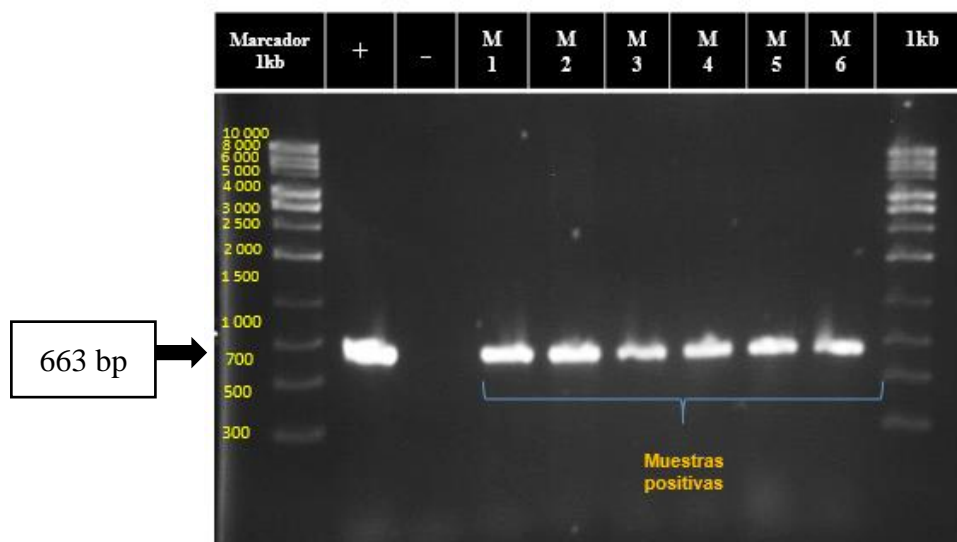


Figura 4. Identificación molecular del gen *gyrA*, amplificado de 663 bp. Carriles 1 y 10: marcador de peso molecular de 1kb. Carril 2: control positivo. Carril 3: control negativo. Carril 4 (M1): muestra procedente de Ancash. Carriles 5, 6 y 7 (M2, M3 y M4): muestras procedentes de Cajamarca. Carriles 8 y 9 (M5 y M6): muestras procedentes de Junín.

Respecto al secuenciamiento, todas las muestras analizadas (Ancash, Cajamarca y Junín) presentaron mutaciones en la Región Determinante de Resistencia a Quinolonas (QRDR) del gen *gyrA*, exactamente en el codón 83 (Serina: AGT → Isoleucina: ATC o Serina: AGT → Arginina: AGA) y el codón 92 (Leucina: TTG → Metionina: ATG).

VIII. DISCUSIÓN

La aeromoniasis es una enfermedad bacteriana importante ya reportada en el Perú que, según los resultados del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos que realizó el SANIPES en el año 2016, representa una de las enfermedades más prevalentes (37%) que afecta a la trucha arcoíris. En el presente estudio se obtuvieron 28 aislados de *A. salmonicida*, los cuales mostraron diferentes perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, donde amoxicilina (96%), oxitetraciclina (64%) y ácido oxolínico (57%), fueron los antibióticos que presentaron porcentajes elevados de aislados no salvajes (NWT) o de baja susceptibilidad, mientras que florfenicol (96%) y la asociación sulfametoxazol/trimetoprim (93%) fueron los antibióticos que presentaron mayor cantidad de aislados salvajes o completamente susceptibles (Tabla 4).

La cantidad de aislados no salvajes (NWT) frente a la amoxicilina fue muy elevada (96%). Porcentaje inferior de *Aeromonas salmonicida* ssp. de tipo no salvaje (NWT) fue encontrado en Italia (36.5%) por Scarano *et al.* (2018); mientras que, resultados similares al presente estudio, fueron reportados en Portugal (Henriques *et al.*, 2006), Croacia (Maravic *et al.*, 2013) y Brasil (Saavedra *et al.*, 2004), donde evaluaron la resistencia antimicrobiana de *Aeromonas*, tomando como referencia los puntos de interrupción clínicos (clinical breakpoints) y encontraron 100%, 100% y 88% de resistencia, respectivamente. Estos resultados se justifican porque en algunas especies de *Aeromonas* se ha demostrado la producción de betalactamasas inducidas cromosomalmente (Janda y Abbott, 2010). En *A. salmonicida*, los genes que codifican la producción de estas enzimas parecen hacer parte constitutiva de su genoma o haber sido adquiridos recientemente, por lo

menos hace 67 – 250 años (Bartkova *et al.*, 2017). De acuerdo con esta información y a los valores de baja susceptibilidad encontrados en el presente estudio, es de esperar que la amoxicilina no tenga éxito en la terapia de la furunculosis, por lo que no debería ser administrado para su tratamiento, aunque algunos autores como Cipriano y Austin (citado en Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017), indican que podría ser utilizado.

El segundo antibiótico con mayor cantidad de aislados no salvajes o de baja susceptibilidad fue la oxitetraciclina (64%), este valor es superior respecto al número de aislados de *Aeromonas salmonicida* ssp. no salvajes reportados en Italia (19.2%) (Scarano *et al.*, 2018), y en aislados de *A. salmonicida* procedentes de Dinamarca, Francia, Irlanda, Noruega y Escocia (48%) (Smith *et al.*, 2007); además, el porcentaje encontrado también es elevado respecto a la resistencia reportada en Corea (45%) por Kim *et al.* (2011) y en Chile (33%) por el IFOP (2011), los cuales también evaluaron la resistencia tomando en consideración los puntos de interrupción clínicos. Interesantemente, *Yersinia ruckeri*, otro patógeno de importancia en el sector acuícola nacional, también presentó 27% de resistencia frente a la tetraciclina (Bueno, 2012), demostrando así que las bacterias que producen las enfermedades más prevalentes en la trucha arcoíris ya manifiestan resistencia frente a los antibióticos de esta familia. Estos valores de baja sensibilidad guardan correlación con lo manifestado por los productores, los cuales indican que en muchos casos ya no obtienen buenos resultados al usar este medicamento. Esto era aguardado, ya que es uno de los antimicrobianos autorizados más utilizados en el sector acuícola del Perú (SANIPES, 2018), incluso siendo utilizado de manera irresponsable, como promotor del crecimiento en peces (Hernández, 2005).

Empeora la situación su baja biodisponibilidad (menor al 10% según Cravedi *et al.*, 1987 y Benavente, 2013) y al hecho de que puede permanecer de forma activa en los sedimentos hasta 12 semanas después de haber sido utilizado (Nygaard *et al.*, 1992), por lo que puede originar complejos cristalinos poco solubles y con tendencia a formar precipitados (Tongaree *et al.*, 1999). Además, la alta concentración de oxitetraciclina en el agua favorece la colonización de la microbiota intestinal de peces con *A. salmonicida* resistentes a esta droga (Navarrete *et al.*, 2010), actuando como un reservorio de bacterias resistentes que podrían ser liberadas constantemente al entorno acuático.

El porcentaje de aislados de tipo no salvaje (NWT) frente al ácido oxolínico (57%) fue igual a lo encontrado en aislados de *A. salmonicida* procedentes de Dinamarca, Francia, Irlanda, Noruega y Escocia (57%) por Smith *et al.* (2007); mientras que fue superior a lo reportado en Italia (33.7%) por Scarano *et al.*, (2018). De hecho, estos porcentajes pueden ser considerados como elevados ya que el género *Aeromonas* es mundialmente susceptible a las fluoroquinolonas (Janda y Abbott, 2010) y, como la disminución de la sensibilidad frente a este antibiótico se genera principalmente por mutaciones puntuales, la presión selectiva estaría favoreciendo una alta tasa de mutaciones.

La asociación sulfametoxazol/trimetoprim (93%) y florfenicol (96%), presentaron mayor cantidad de aislados tipo salvaje (WT) o completamente susceptibles. Scarano *et al.* (2018) del mismo modo, encontraron 80.8% de aislados salvajes frente a florfenicol y esto podría deberse a que todavía no se estarían desarrollado mecanismos de resistencia frente a esos antibióticos (Kahlmeter *et al.*, 2003). Como se mencionó líneas arriba, uno de los fármacos más utilizados es el

florfenicol, pero los resultados obtenidos muestran bajos valores de resistencia, al igual que en Francia, donde a pesar de su uso generalizado, no se han reportado frecuencias altas de resistencia (Michel *et al.*, 2003), lo cual podría estar atribuido a su buena biodisponibilidad (99%) (Horsberg *et al.*, 1996).

En general, en la producción acuícola se cometen errores, tales como: tratamientos empíricos sin diagnóstico definitivo previo y mucho menos prescritos por un Médico Veterinario (Montesinos, 2018), dosis insuficientes, interrupción o disminución del tiempo mínimo recomendado, errores de cálculo y el uso continuo de antimicrobianos, lo cual genera el surgimiento de bacterias resistentes (Higuera-Llantén *et al.*, 2018).

De los siete fenotipos de resistencia encontrados (Tabla 7), destaca el resistotipo amoxicilina - ácido oxolínico - oxitetraciclina (43%). Se resaltan estos valores porque se ha demostrado resistencia cruzada *in vitro* entre ácido oxolínico y oxitetraciclina, ésta resistencia parece estar asociada con alteraciones en las proteínas de membrana externa, lo cual tiene graves implicaciones si este fenómeno llega a ocurrir *in vivo* (Barnes 1990), debido a que en muchos países son los antibióticos más utilizados en la acuicultura.

Respecto a los patrones de resistencia múltiple, el 50% de los aislados presentaron baja susceptibilidad frente a múltiples antibióticos o multidrogo-resistencia (MDR: no susceptibilidad a más de 3 antibióticos) (Gráfico 6), este valor elevado también fue reportado en Italia por Scarano *et al.* (2018), los cuales encontraron 82.7% de *Aeromonas salmonicida* ssp. MDR frente a la amoxicilina, ampicilina, cefalotina, eritromicina, estreptomina, sulfadiazina y trimetoprim, mientras que Miller y Reimschuessel (2006), encontraron sólo 2.7% de *A. salmonicida* MDR frente a oxitetraciclina, sulfadimetoxina/ormetoprima y ácido

oxolínico, en aislados procedentes de diferentes países (Estados Unidos, Israel, Canadá, Reino Unido, Suiza, España, Noruega y Finlandia). En América Latina, ya se reportaron cepas de *A. salmonicida* MDR en Chile, frente a oxitetraciclina, florfenicol, ampicilina y eritromicina (Higuera-Llantén *et al.*, 2018), esto es preocupante, sobre todo porque en la clínica de animales acuáticos se carecen de opciones antibióticas, además se tienen pocos datos sobre la eficacia en varias especies de peces cultivados y los resultados de susceptibilidad antimicrobiana, por lo que actualmente se viene investigando en el establecimiento de los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de punto de interrupción y los criterios interpretativos para los datos de difusión en disco (Smith, 2006).

El aislamiento de especies de *Aeromonas* MDR desde peces cultivados (Higuera-Llantén *et al.*, 2018) y peces ornamentales (Hossain *et al.*, 2018) es frecuente, mientras que en España se han llegado a aislar de muestras de agua y de heces (Esteve *et al.*, 2014) y en Polonia a partir de plantas de tratamiento de aguas residuales (Piotrowska *et al.*, 2017), por lo que estas últimas son consideradas un punto de aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos. Esta información es preocupante ya que, según el Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos de las Naciones Unidas- WWAP (2017), a nivel mundial, más del 80% de las aguas residuales son vertidas al medio ambiente sin tratamiento alguno (95% en los países en desarrollo), constituyendo una fuente potencial de fármacos, incluidos los antibióticos, que llegan a los cuerpos de agua (Mezzelani *et al.*, 2018). En ese sentido, fluoroquinolonas provenientes del sector salud, contaminan el agua y representan un riesgo ecológico para los organismos acuáticos (Riaz *et al.*, 2017) ya que moluscos, crustáceos y peces han demostrado acumular

fármacos bajo condiciones de laboratorio, por lo que podrían tener un potencial efecto adverso en especies que no son objetivo (Almeida *et al.*, 2014).

La presencia de productos farmacéuticos en el medio ambiente acuático también está influenciada por la actividad acuícola y ganadera, resaltan las sulfonamidas por su uso masivo en medicina veterinaria (Carvalho y Santos, 2016). En el Perú, de las tres categorías productivas en acuicultura (AREL - acuicultura de recursos limitados, AMyPE – acuicultura de la micro y pequeña empresa; y AMyGE – acuicultura de la mediana y gran empresa), predominan las unidades AREL (1869), caracterizadas por tener bajos niveles de educación formal, limitación de recursos y deficiencias en el manejo hídrico (FAO, 2012). Por lo que, es muy probable que estas unidades no presenten sistemas de depuración del agua, de entrada ni de salida, esto es grave, ya que varios centros poblados y productivos son muy próximos a ellos y los efluentes generados no son aptos para su reutilización en piscicultura, ni para vertimiento directo a cuerpos receptores, por lo que, el tratamiento de estos es muy necesario (Cuervo y Huetio, 2009).

Respecto a los genes de resistencia reportados en el presente estudio *sul1* y *tetA*, en Israel también se identificaron los genes *sul1* y *tetA* (Patil *et al.* 2016); en Canadá se reportó el gen *sul1*, además de los genes *sul2*, *tet(C)*, *tet(E)* y *floR*; y en Chile, Higuera-Llantén *et al.* (2018), encontraron los genes *tetA*, *tetB*, *tetE* y *tetL*. En lo referente al gen *gyrA*, encontramos mutaciones puntuales en dos posiciones de la región QRDR, asociadas con resistencia a este antimicrobiano. Resultados similares fueron reportados en España por Alcaide *et al.* (2010), los cuales encontraron que todas las *Aeromonas* resistentes a quinolonas presentaron mutaciones puntuales en el codón 83 de este gen, además, el 12% de estos aislados resistentes presentaron mutaciones puntuales adicionales en el codón 92. En Corea,

Kim *et al.* (2011), encontraron mutaciones puntuales en el codón 83 en 94% (15/16) de *A. salmonicida* resistentes a quinolonas, pero no manifestaron mutaciones en los codones 92 y 87. En el presente estudio, no se encontraron mutaciones en el codón 87, a pesar de ser muy frecuente, según lo mencionado por Giraud *et al.* (2004), quienes en Francia encontraron principalmente mutaciones en este codón en el 58% de aislados de *A. salmonicida*.

Por otro lado, los genes *dfrA1*, *floR*, *blaSHV* y *blaOXA-2* no fueron identificados en ningún aislado, a pesar de la resistencia fenotípica encontrada. Según Duman *et al.* (2017) esta resistencia podría estar codificada por genes aún no caracterizados, dado que hay reportes del secuenciamiento de una cepa chilena de *A. salmonicida* que informa sobre la presencia de genes potencialmente responsables de la resistencia a β -lactámicos, florfenicol, macrólidos y quinolonas (Valdes *et al.*, 2015).

Muchos de los genes de resistencia se encuentran principalmente dentro de elementos móviles, tales como plásmidos, transposones e integrones, característicos de *A. salmonicida*, los cuales le otorgan gran plasticidad genómica (Trudel *et al.*, 2016), además la capacidad de compartir material genético con otros microorganismos (Attéré *et al.*, 2017), ya sean acuáticos: *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia ruckeri* (Sorum *et al.*, 2003), *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* (McIntosh *et al.*, 2008); o terrestres como *E. coli* (McIntosh *et al.*, 2008), *Salmonella entérica* y *Proteus mirabilis* (Trudel *et al.*, 2016), propagado así los genes de resistencia entre humanos, animales y el medio ambiente. Al ser esta una bacteria ubicua, aislada incluso de pescado congelado en México (Castro *et al.*, 2003), representa un gran problema para la salud pública por el riesgo de causar no solamente cuadros intra y extraintestinales, a través de la cadena alimenticia y

contacto directo (Janda y Abbott, 2010), sino por la transmisión de genes de resistencia (Vincent *et al.*, 2014).

Es interesante resaltar que en esta tesis buscamos detectar los genes de resistencia antimicrobiana que la literatura reporta como más prevalentes para cada antibiótico estudiado y el no haber encontrado alguno de ellos a pesar de la resistencia fenotípica, sugiere la participación de otros genes. También sugerimos incluir en futuros estudios el uso de protocolos o kits especializados en detectar ADN plasmidial para así determinar los genes de resistencia. Finalmente, recomendamos incluir más genes de resistencia por cada familia de antibiótico evaluado y ampliar la cantidad de antimicrobianos para completar nuestra investigación.

IX. CONCLUSIONES

- La bacteria *A. salmonicida* fue aislada y confirmada a través de pruebas moleculares, señalando su participación en la producción de enfermedad en diferentes regiones de la Sierra del Perú.
- Amoxicilina, ácido oxolínico y oxitetraciclina presentaron mayor resistencia fenotípica, por lo tanto efecto reducido frente a los aislados. El fenotipo multidrogo-resistente fue detectado y esto representa un peligro para el éxito terapéutico debido a la poca disponibilidad de antimicrobianos de uso acuícola.
- Los genes *sul1* y *tetA* confirman la presencia de resistencia genotípica en aislados poco susceptibles y los coloca como reservorios para otras bacterias.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[AECI/PADESPA-FONDEPES] Acuerdo Interinstitucional entre la Agencia Española de Cooperación Internacional, Proyecto de Apoyo al Desarrollo del Sector Pesca y Acuícola del Perú y el Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. (2004). Programa de transferencia de tecnología en acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas. 123 p.

Alcaide, E., Blasco, M. D., Esteve, C. (2010). Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*, 161(1), 40-5.

Almeida, A., Calisto, V., Esteves, V. I., Soares, A. M., Figueira, E., Freitas, R. (2014). Presence of carbamazepine in coastal systems: effects on bivalves. *Aquatic Toxicology*, 156, 74–87. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.08.002.

Akinbowale, O. L., Peng, H., Grant, P., Barton, M. D. (2007). Antibiotic and heavy metals resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, 177-182. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012

Attéré, S. A., Vincent, A. T., Paccaud, M., Frenette, M., Charette, S. J. (2017). The role of the small cryptic plasmids as moldable vectors for genetic innovation in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Frontiers in Genetics*, 8, 211. doi: 10.3389/fgene.2017.00211.

Barbara, A. J., Trinh, H. T., Glock, R. D., Glenn Songer, J. (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Veterinary Microbiology*, 126, 377-382. doi 10.1016/j.vetmic.2007.07.019.

Bartkova, S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Dalsgaard, I. (2017). Epidemiology of Danish *Aeromonas* subsp. *salmonicida* in fish farms using whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2411. doi: 10.3389/fmicb.2017.02411.

Barnes, A. C., Lewin, C. S., Hastings, T. S., Aymes, S. G. (1990). Cross resistance between oxytetracycline and oxolinic acid in *Aeromonas salmonicida* associated with alterations in outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 72, 337-339. doi 10.1016/0378-1097(90)90327-m.

Becker, L., Steglich, M., Fuchs, S., Werner, G., Nubel, U. (2016). Comparison of six commercial kits to extract bacterial chromosome and plasmid DNA for Miseq sequencing. *Scientific Reports*, 6:28063. doi 10.1038/srep28063.

Benavente, J. (2013). Evaluación del perfil farmacocinético en plasma de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tratadas con alimento medicado con oxitetraciclina. Tesis de pregrado. Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcb456e/doc/fcb456e.pdf>. Fecha de revisión 20 de junio del 2017.

Bueno, H. (2012). Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola “El Ingenio” – Huancayo. Tesis de pregrado. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2634/Bueno_mh.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Fecha de revisión 17 de septiembre del 2017.

Buller, N. B. (2004). Bacteria from fish and other aquatic animals. A practical identification manual. Recuperado de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/Buller2004.pdf>.

Carvalho, I. T., Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757. doi: 10.1016/j.envint.2016.06.025.

Casal, J., Mateu, E. (2003). Tipos de muestreo. *Revista de Epidemiología Médica Preventiva*, 1, 3-7. Recuperado de <http://www.mat.uson.mx/~ftapia/Lecturas%20Adicionales%20%28C%3%B3mo%20dise%C3%B1ar%20una%20encuesta%29/TiposMuestreo1.pdf>.

Castro-Escapulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., Hernández-Rodríguez, C. H., Arteaga-Garibay, R. I., Carmona-Martínez, A. A., Pérez-Valdespino, A., Giono-Cerezo, S., Figueras, S. M. J., Aparicio, O. G. (2003). La identificación genética de *Aeromonas* una realidad y una necesidad en la microbiología diagnóstica. *Bioquímica*, 28(4), 11-18. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2003/bq034c.pdf>.

Cattoir, V., Poirel, L., Aubert, C., Soussy, C.J., Nordmann, P. (2008). Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinilone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2), 231-237. En: doi: 10.3201/eid1402.070677.

Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En: Department of Laboratory Medicine and Microbiology, Coile, M., editors. Recuperado de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-60. doi 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals. Informational supplement VET03/04-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Approved Guideline VET03-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI.

Copan, 1996. CRYOBANK™. Bacterial cultures freezing systems. Recuperado de <http://www.copanusa.com/bacteriology/>.

Cravedi, J. P., Choubert, G., Delous, G. (1987). Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*, 60 (2), 133–141. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/004484868790305>
X

Cuervo, M., Huetio, J. (2009). Evaluación del crecimiento de la planta *Azolla pinnata* en efluentes piscícolas y su efecto en la calidad del agua (Tesis de pregrado). Universidad del Cauca, Colombia.

Del Castillo, C. S., Hikima, J., Jang, H. B., Nho, S. H., Jung, T. S., Wongtavatchai, J., Kondo, H., Hirono, I., Takeyama, H., Aoki, T. (2012). Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 120-9. doi: 10.1128/AAC.01239-12.

Duman, M., Altun, S., Cengiz, M., Saticioglu, I. B., Buyukekis, A. G., Sahinturk, P. (2017). Genotyping and antimicrobial resistance genes of

Yersinia ruckeri isolates from rainbow trout farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 125(1), 31-44. doi 10.3354/dao03132.

Esteve, C., Alcaide, E., Giménez, M. J. (2014). Multidrug-resistant (MDR) *Aeromonas* recovered from the metropolitan area of Valencia (Spain): diseases spectrum and prevalence in the environment. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(1), 137- 145. doi 10.1007/s10096-014-2210-z.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2012). Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. 251 p. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i2727s.pdf>.

[FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. (2014). Manual de crianza de trucha en ambientes convencionales. 88 p. Recuperado de https://www.fondepes.gob.pe/src/manuales/MANUAL_TRUCHA.pdf

Funnell, B., Phillips, G. (2004). Preface, in plasmid biology. En Funnell, B., Phillips, G. (Ed.), Washington, EE.UU.

Gao, J., Duan, X., Li, X., Cao, H., Wang, Y., Zheng, S. J. (2018). Emerging of a highly pathogenic and multi-drug resistant strain of *Escherichia coli* causing an outbreak of colibacillosis in chickens. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 392-398. doi 10.1016/j.meegid.2018.08.026.

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51 (Suppl.3), 439-446. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342009000900009.

Giraud, E., Blanc, G., Bouju-Albert, A., Weill, F. X., Donnay-Moreno, C. (2004). Mechanisms of quinolone resistance and clonal relationship

among *Aeromonas salmonicida* strains isolated from reared fish with furunculosis. *Journal of Medical Microbiology*, 53(9), 895-901. doi 10.1099/jmm.0.45579-0.

González, E. (2002). Descripción de la furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fvg643d/doc/fvg643d.pdf>.

Grape, M., Motakefi, A., Pavuluri, S., Kahlmeter, G. (2007). Standard and real-time multiplex PCR methods for detection of trimethoprim resistance *dfr* genes in large collections of bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 13 (11), 1112-1118. doi 10.1111/j.1469-0691.2007.01807.x.

Guardabassi, L., Courvalin, P. Modes of antimicrobial and mechanisms of bacterial Resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Capítulo 1. Recuperado de: <https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817534.chap1>

Gudmundsdottir, B. J., Bjornsdottir, B. (2017). *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*. En Cipriano, P. T. K., Cipriano, R. C. *Fish viruses and bacteria* (173-182). Wallingford, UK: CABI.

Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, 157, 938-947. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250806002129>.

Hernández, P. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*. Roma. 97 p.

Higuera-Llantén, S., Vásquez-Ponce, F., Barrientos-Espinoza, B., Mardones, F. O., Marshall, S. H., Olivares-Pacheco, J. (2018). Extended antibiotic treatment in salmon farms select multiresistant gut bacteria with a high prevalence of antibiotic resistance genes. *PLoS One*, 13(9): e0203641. doi 10.1371/journal.pone.0203641.

Ho, P. L., Wong, R. C., Chow, K. H., Que, T. L. (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Letters in Applied Microbiology*, 49 (5), 627-34. doi 10.1111/j.1472-765X.2009.02717.x.

Hoie, S., Heum, M., Thoresen, O. F. (1997). Evaluation of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of *Aeromonas salmonicida* ss *salmonicida* in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 30, 27-35. Recuperado de <https://www.int-res.com/articles/dao/30/d030p027.pdf>.

Horsberg, T., Hoff, K. A., Nordmo, R. (1996). Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8, 292-301. Recuperado de [https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-667\(1996\)008%3C0292%3APOFAIM%3E2.3.CO%3B2](https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1577/1548-667(1996)008%3C0292%3APOFAIM%3E2.3.CO%3B2)

Hossain, S., De Silva, B. C. J., Dahanayake, P. S., Heo, G. J. (2018). Characterization of virulence properties and multi-drug resistance profiles in motile *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*). *Letters in Applied Microbiology*, 67(6), 598-605. doi: 10.1111/lam.13075.

[IFOP] Instituto de Fomento Pesquero. (2011). Vigilancia de la resistencia bacteriana en salmonicultura. 438 p.

Janda, J., Abbott, S. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35-73. Recuperado de <https://cmr.asm.org/content/23/1/35>

Kahlmeter, G., Brown D.F., Goldstein F.W., MacGowan A.P. Mouton, J.W., Osterlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P., Vatopoulos, A. (2003). European harmonitazi3n of MIC breakpoints for antimicrobial suscetibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 145-148. doi 10.1093/jac/dkg312.

Kim, J. H., Hwang, S. Y., Son, J. S., Han, J. E., Jun, J. W., Shin, S. P., Choresca, C. Jr., Choi, Y. J., Park, Y. H., Park, S. C. (2011). Molecular characterization of tetracycline and quinolone resistance *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), 41-8. doi: 10.4142/jvs.2011.12.1.41.

Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Fostervold, A., Holt, K. E., Lohr, I. H. (2019). Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pii:dkz028. doi 10.1093/jac/dkz028.

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (3), 268-281. doi 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Maravic, A., Skocibusic, M., Samanic, I., Fredotovic, Z., Cvjetan, S., Jutronic, M., Puizina, J. (2013). *Aeromonas* spp. simultaneously harbouring blaCTX-M-15, blaSHV-12, blaPER-1 and blaFOX-2, in wild-growing Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from Adriatic

Sea, Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 166 (2), 301-308. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.010

McCarthy, D. H. (1975). Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *achromogenes*. *Journal of Wildlife Diseases*, 11 (4), 489-493. Recuperado de <https://www.jwildlifedis.org/doi/pdf/10.7589/0090-3558-11.4.489>.

McIntosh, D., Cunningham, M., Ji, B., Fekete, F. A., Parry, E. M., Clark, S. E., Zalinger, Z. B., Gilg, I. C., Danner, G. R., Johnson, K. A., Beattie, M., Ritchie, R. (2008). Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *Journal of Antimicrobiology Chemotherapy* 61 (6), 1221–1228. doi 10.1093/jac/dkn123.

Mezzelani, M., Gorbi, S., Regoli, F. (2018). Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Marine Environmental Research*, 140, 41-60. doi 10.1016/j.marenvres.2018.05.001

Michel, C., Kerouault, B., Martin, C. (2003). Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentrations, using recommended provisory standards for fish bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 95 (5), 1008–1015. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=.+Chloramphenicol+and+lorfenicol+susceptibility+of+fish-pathogenic+bacteria+isolated+in+France%3A+comparison+of+minimum+inhibitory+concentrations%2C+using+recommended+provisory+standards+for+fish+bacteria>.

Miller, R. A., Reimschuessel, R. (2006). Epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents against *Aeromonas salmonicida* isolates determined

by minimal inhibitory concentration and diameter of zone of inhibition data. *American Journal of Veterinary Research*, 67(11), 1837-1843. doi 10.2460/ajvr.67.11.1837

Montesinos, L. (2018). Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del Lago Titicaca (tesis de maestría). Recuperado de http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/3862/Diagnostico_MontesinosLopez_Jeansen.pdf.

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648-656. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>

Navarrete, P., Magne, F., Mardones, P., Riveros, M., Opazo, R., Suau, A., Pochart, P., Romero, J. (2010). Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Microbiology Ecology*, 71 (1), 148-156. doi 10.1111/j.1574-6941.2009.00769.x

Noga, E. (2010). *Fish disease, diagnosis and treatment*. 2nd edition. Wiley-Blackwell, USA.

Nygaard, K., Lunestad, B. T., Hektoen, H., Berge, J. A., Hormazabal, V. (1992). Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, 104, 31-36. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0044848692901358>

[OIE] Organización Internacional de Salud Animal. (2000). *World Animal Health in 2000: Reports on the Animal Health Status and Disease Control Methods and Tables on Incidence of List A Diseases*. pp. 33–37.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. (2001). Estrategia mundial para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Rev Panam Salud Pública* 10:284-93.

Orvay, F. (1993). *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. España: Ed Universitat Barcelona, 739p.

Patil, H. J., Benet-Perelberg, A., Naor, A., Smirnov, M., Ofek, T., Nasser, A., Minz, D., Cytryn, E. (2016). Evidence of increased antibiotic resistance in phylogenetically- diverse *Aeromonas* isolates from semi-intensive fish ponds treated with antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1875. doi 10.3389/fmicb.2016.01875

Piotrowska, M., Przygodzinska, D., Matyjewicz, K., Popowska, M. (2017). Occurrence and variety of b-lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant. *Frontiers in Microbiology*, 8:863. doi 10.3389/fmicb.2017.00863.

[PRODUCE] Ministerio de la producción. (2017). Boletín estadístico pesquero. Oficina de Estudios Económicos. 47 p.

[PRODUCE] Ministerio de la producción. (2017). Cultivo de la Trucha Arcoíris en el Perú, con énfasis en la importación de ovas embrionadas y la comercialización de la producción. Dirección General de Acuicultura del Ministerio de la Producción. 34 p.

Riaz, L., Mahmood, T., Kamal, A., Shafqat, M., Rashid, A. (2017). Industrial release of fluoroquinolones (FQs) in the waste water bodies with their associated ecological risk in Pakistan. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52:14-20. doi 10.1016/j.etap.2017.03.002

Romero, J., Feijoo, C. G., Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture use, abuse and alternatives, health and environment in aquaculture. *Health and environment in aquaculture*, 159-98. doi 10.5772/28157

Rossolini, G. M., Arena, F., Giani, T. (2017). Chapter 138 Mechanisms of antibacterial resistance. En Cohen, J., Powderly, W. G., Opaal, S. M. (Ed.), *Infectious Diseases* (1181-1196 p).

Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (5), 1109-17. doi 10.1093/jac/dkg222.

Rupp, M., Fey, P. (2003). Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63 (4), 353–365. doi 10.2165/00003495-200363040-00002.

Saavedra, M. J., Guedes-Novais, S., Alves, A., Rema, P., Tacão, M., Correia, A., Martínez-Murcia, A. (2004). Resistencia to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Microbiology*, 7 (3), 207-211. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492935>.

[SANIPES] Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. (2018). Sub Dirección de Certificaciones Pesqueras y Acuícolas. Informe N° 83-2018-SANIPES/DHCPA/SDCPA.

[SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2016). Resultados del programa de vigilancia de la sanitaria 2016. 3p.

Scarano, C., Piras, F., Viridis, S., Ziino, G., Nuvoloni, R., Dalmaso, A., De Santis, E. P. L., Sapanu, C. (2018). Antibiotic resistance of *Aeromonas salmonicida* ssp. strains isolated from *Sparus aurata* reared in Italia mariculture farms. *International Journal of food Microbiology*, 284, 91-97. doi 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.033.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (5), 519-42. doi : 10.1016/j.femsre.2004.04.001

[SENASICA] Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2015). Manual de prácticas de laboratorio de biología molecular, México.

Smith, P., Ruane, N. M., Douglas, I., Carroll, C., Kronvall, G., Fleming, G. T. A. (2007). Impact of inter-lab variation on the estimation of epidemiological cut-off values for disc diffusion susceptibility test data for *Aeromonas salmonicida*. *Aquaculture*, 272, 168-179. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.216>

Smith, P. (2006). Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: a review of current practice. *Aquaculture*, 261, 1113–1121. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.027>.

Sorum, H., LAbée-Lund, T. M., Solberg, A., Wold, A. (2003). Integron containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1285-90. PMID: PMC152485.

Snyder, L., Peters, J. E., Henkin, T. M., Champness, W. (2013). Chapter 4 plasmids. In *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington 183 -218.

Tanaka, K. H., Vincent, A. T., Trudel, M. V., Paquet, V. E., Frenette, M., Charette, S. J. (2016). The mosaic architecture of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* pAsa4 plasmid and its consequences on antibiotic resistance. *Peerj*, 4:e2595. doi 10.7717/peerj.2595

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34 (5 Suppl 1): S3-10. doi 10.1016/j.ajic.2006.05.219

Tongaree, S., Flanagan, D. R., Poust, R. I. (1999). The Interaction Between Oxytetracycline and Divalent Metal Ions in Aqueous and Mixed Solvent Systems. *Pharmaceutical Development and Technology*, 4 (4), 581–591. doi 10.1081/PDT-100101397.

Trudel, M. V., Vincent, A. T., Attéré, S. A., Labbé, M., Derome, N., Culley, A. I., Charette, S. J. (2016). Diversity of antibiotic-resistance genes in Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: dominance of pSN254b and Discovery of pAsa8. *Scientific Reports*, 6, 35671. doi 10.1038/srep35617.

Van Hoek, A. H. A., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in Microbiology*, 2, 203. doi 10.3389/fmicb.2011.00203.

Valdes, N., Espinoza, C., Sanhueza, L., Gonzalez, A., Corsini, G., Tello, M. (2015). Draft genome sequence of the Chilean isolate *Aeromonas salmonicida* strain CBA100. *FEMS Microbiology Letters*, 362(5), pii: fnu062. doi 10.1093/femsle/fnu062.

Vincent, A. T., Trudel, M. V., Paquet, V. E., Boyle, B., Tanaka, K. H., Dallaire-Dufrense, S., Daher, R. K., Frenette, M., Derome, N., Charette, S. J. (2014). Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(12), 7367–7374. doi 10.1128/AAC.03730-14

[WWAP] Programa Mundial de Evaluación de los Recursos de las Naciones Unidas. (2017). Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre

el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. Aguas residuales: el recurso no explotado. Paris, UNESCO. p 14.