



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

**ANÁLISIS GENOTÍPICO Y  
FENOTÍPICO DE LA RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA DE *Yersinia  
ruckeri* PROCEDENTE DE TRUCHAS  
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) DE  
CULTIVO DE CUATRO  
DEPARTAMENTOS DE LA SIERRA  
DEL PERÚ**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

**FERNANDO DANIEL MESÍAS VALLE**

LIMA - PERÚ

2019



**ASESOR DE TESIS:**

Dr. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

**CO-ASESOR DE TESIS:**

Dr. MV. Luis Antonio Llanco Albornoz

## **DEDICATORIA**

A mi madre, mi padre y mi enamorada, por ser el apoyo y soporte en la realización de esta tesis, así como en el periodo de desarrollo académico de toda la Maestría en Sanidad Acuícola.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Serrano, por los consejos, las facilidades y el apoyo en la elaboración de la tesis.

Al Dr. Luis Llanco, por apoyarme de manera constante en la elaboración y redacción de la tesis, así como por todas las enseñanzas en este período académico.

Al Dr. Peter Smith, por guiarme en el desarrollo del proyecto, siempre tener la disposición de ayudarme y por todos sus conocimientos brindados para el análisis de los datos.

A Tania R., Carmen H., Karol Q. y Marely P., por toda la ayuda en el muestreo y el procesamiento de los aislados en el laboratorio.

A todos mis amigos de mi promoción de la Maestría, por su amistad y por su apoyo en los momentos de dificultad.

## **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).

## TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Panorama de la acuicultura a nivel mundial.....	3
2.2 Producción acuícola del Perú .....	4
2.3 <i>Yersinia ruckeri</i> .....	6
2.3.1 Características generales y bioquímicas .....	6
2.3.2 Biotipo, serotipo y perfil de proteínas de membrana externa .....	6
2.3.3 Signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas.....	7
2.3.4 Hospederos y Distribución.....	9
2.3.5 Diagnóstico .....	9
2.3.6 Control y Prevención .....	10
2.4 Resistencia Antimicrobiana.....	13
2.4.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	13
2.4.2 Resistencia antimicrobiana en acuicultura.....	15
2.4.3 Resistencia antimicrobiana en <i>Yersinia ruckeri</i> .....	17
2.4.4. Interpretación de resistencia normalizada.....	23
III. JUSTIFICACIÓN .....	25
IV. OBJETIVOS .....	27
4.1 Objetivo general .....	27
4.2 Objetivo específicos .....	27
V. METODOLOGÍA .....	28

5.1 Lugar de Estudio y tamaño muestral .....	28
5.2 Tipo de Estudio .....	29
5.3 Aislamiento e identificación bioquímica presuntiva de <i>Y. ruckeri</i> .....	29
5.4 Identificación molecular mediante PCR de las cepas de <i>Yersinia ruckeri</i> ..	29
5.4.1 Extracción de ADN.....	29
5.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	30
5.5 Sensibilidad antibiótica de cepas <i>Yersinia ruckeri</i> .....	30
5.6 Identificación de genes de resistencia en cepas <i>Yersinia ruckeri</i> .....	31
5.7 Plan de análisis de datos .....	33
5.8 Consideraciones éticas.....	33
VI. RESULTADOS .....	34
6.1 Aislamiento e identificación bioquímica y molecular.....	34
6.2 Sensibilidad antibiótica .....	34
6.3 Identificación de genes de resistencia .....	38
VII. DISCUSIÓN .....	40
VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS	



## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Principales productores en acuicultura a nivel mundial en 2016.
- Cuadro 2.** Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola nacional por ámbito y según especie, 2014-2018.
- Cuadro 3.** Secuencias de primers para la identificación de *Y. ruckeri* y para la detección de genes de resistencia.
- Cuadro 4.** Distribución de los diámetros de zona de inhibición de los 43 aislados de *Y. ruckeri*
- Cuadro 5.** Resumen de los resultados del análisis NRI

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Producción mundial de la pesca y la acuicultura, 1950-2016.
- Figura 2.** Identificación molecular por PCR de aislados de *Y. ruckeri*.
- Figura 3.** Antibiogramas de *Y. ruckeri* frente a amoxicilina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, florfenicol y sulfametoxazol/trimetoprim.
- Figura 4.** Distribución de los diámetros de zonas de inhibición producidos por discos de antibióticos de amoxicilina, ácido oxolínico, sulfametoxazol/trimetoprim, oxitetraciclina y florfenicol de 43 aislados de *Y. ruckeri*.
- Figura 5.** Identificación molecular por PCR del gen *gyrA* en aislados de *Y. ruckeri*
- Figura 6.** Blast de la secuencia del gen *gyrA* de nuestros aislados de *Y. ruckeri* frente al gen *gyrA* de la cepa referencial de *Y. ruckeri* SC09.

## RESUMEN

En el Perú, *Yersinia ruckeri* produce problemas sanitarios y económicos importantes en las piscifactorías de truchas arcoíris, siendo tratada y/o controlada mediante la aplicación de antibióticos. Sin embargo, el uso empírico y constante de estas drogas produciría el rápido desarrollo de resistencia antimicrobiana de esta bacteria. El presente trabajo tuvo como objetivo principal caracterizar fenotípica y genotípicamente la resistencia antimicrobiana de *Yersinia ruckeri* aisladas de truchas arcoíris de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú. Los aislados de *Yersinia ruckeri* se identificaron por métodos bioquímicos y PCR. El perfil fenotípico se analizó mediante la prueba de difusión en disco y la interpretación de resistencia normalizada, para determinar valores de cortes epidemiológicos y clasificar a los aislados como completamente susceptibles (WT) o de susceptibilidad reducida (NWT), luego se identificaron los genes de resistencia antimicrobiana mediante PCR. En total se obtuvieron 43 aislados provenientes de Lima, Puno, Junín y Áncash; siendo todos clasificados como WT al ácido oxolínico, amoxicilina, florfenicol, oxitetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprim, no detectándose además alguno de los genes de resistencia en estudio. Debido a la completa susceptibilidad mostrada por los aislados de *Y. ruckeri* no es esperado que ocurran, en el corto plazo, fallas en el tratamiento frente a este patógeno cuando se use alguno de los 5 antibióticos analizados en los lugares muestreados.

**Palabras claves:** *Yersinia ruckeri*, *Oncorhynchus mykiss*, valores de corte epidemiológicos, resistencia antimicrobiana, interpretación de resistencia normalizada, genes de resistencia

## ABSTRACT

In Peru, *Yersinia ruckeri* causes important sanitary and economic problems in rainbow trout farms, being treated and/or controlled by the application of antibiotics. However, the empirical and constant use of these drugs would produce the fast development of antimicrobial resistance of this bacterium. The main objective of this work was to characterize phenotypically and genotypically the antimicrobial resistance of *Y. ruckeri* isolated from farmed rainbow trout in four departments of Peruvian highlands. Isolates of *Y. ruckeri* were identified by biochemical methods and PCR. Phenotypic profile was analyzed by disk diffusion test and normalized resistance interpretation, to determine epidemiological cut-off values and to classify isolates as fully susceptible (WT) or reduced susceptibility (NWT), then antimicrobial resistance genes were identified by PCR. A total of 43 isolates were obtained from Lima, Puno, Junín and Ancash; all being classified as WT to oxolinic acid, amoxicillin, florfenicol, oxytetracycline and sulfamethoxazole/trimethoprim, not detecting any of the resistance genes under study. Due to the complete susceptibility shown by *Y. ruckeri* isolates, it is not expected that failures in the treatment of this pathogen will occur in the short term when any of the 5 antibiotics analyzed in the sampled sites are used.

**Key words:** *Yersinia ruckeri*, *Oncorhynchus mykiss*, epidemiological cut-off values, normalized resistance interpretation, antimicrobial resistance, resistance genes

## I. INTRODUCCIÓN

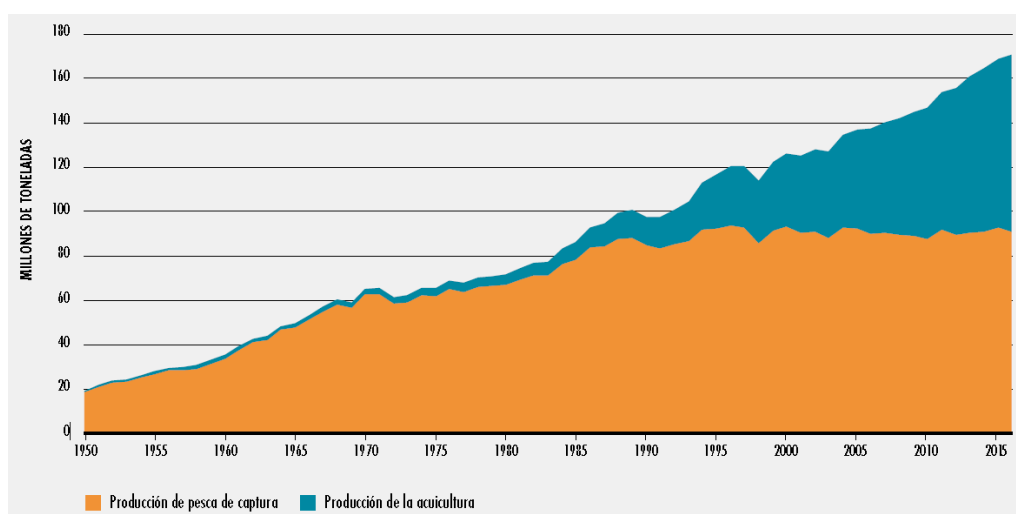
La acuicultura es el sector productivo de mayor crecimiento y actualmente provee más del 50% del pescado que se consume a nivel mundial (FAO, 2018). En el Perú, esta actividad productiva también se ha incrementado enormemente durante la última década, destacando la producción de langostinos, conchas de abanico y trucha arcoíris (PRODUCE, 2018). La enfermedad entérica de la boca roja (ERM) es una de las más importantes en salmónidos, siendo más susceptible la trucha arcoíris, en la cual ocasiona pérdidas económicas significativas que limitan su expansión (Barnes, 2011). Esta enfermedad es ocasionada por *Yersinia ruckeri*, una enterobacteria gramnegativa, que produce diversas lesiones y alta mortalidad (Ross, 1966). El tratamiento y/o control de esta enfermedad en muchos lugares del mundo es mediante la aplicación de antibióticos, como ácido oxolínico, amoxicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, oxitetraciclina y florfenicol (Austin y Austin, 2016). Estas dos últimas drogas son las únicas autorizadas y, por lo tanto, las más usadas en la truchicultura nacional (SANIPES, 2016a, 2016b). No obstante, el uso empírico de estos antimicrobianos por parte de los piscicultores, aplicando incorrectamente la dosis y tiempo de tratamiento de los fármacos, sin un diagnóstico definitivo del agente etiológico ni pruebas de sensibilidad antibiótica; junto al reducido rango de opciones disponibles para el tratamiento y control de *Y. ruckeri*, y ausencia de valores de cortes epidemiológicos de este patógeno frente a diversos antibióticos de uso rutinario, podría traer como consecuencia el rápido desarrollo de resistencia antibiótica de

esta y otras bacterias del sector acuícola (Defoirdt *et al.*, 2007). Esta situación, sin dudas, dificultará el tratamiento y/o control de la yersiniosis en nuestro país y también representaría un riesgo para la salud pública y animal. El presente trabajo tuvo como objetivo principal caracterizar fenotípica y genéticamente la resistencia antimicrobiana de *Yersinia ruckeri* aisladas de truchas arcoíris de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Panorama de la acuicultura a nivel mundial

La acuicultura es el sector productivo de alimentos de mayor proyección a nivel mundial, con un crecimiento promedio anual de 5,8 %. Actualmente, esta actividad productiva suministra aproximadamente el 53% de especies acuáticas para consumo humano con un valor total de venta de 243 500 millones de USD, superando a la pesca (Fig. 1). En 2016, la producción acuícola total fue de casi 110,2 millones de toneladas, la cual incluía peces comestibles (54,1 millones de toneladas), plantas acuáticas (30,1 millones de toneladas), moluscos (17,1 millones de toneladas), crustáceos (7,9 millones de toneladas) y otros animales acuáticos (938 500 toneladas) (FAO, 2018).



**Figura 1.** Producción mundial de la pesca y la acuicultura, 1950-2016.

Fuente: FAO

Desde el año 1991 hasta la actualidad, China ha ocupado el primer lugar como productor acuícola a nivel mundial, representado casi el 62% de la producción total; seguido de India, Indonesia, Vietnam, entre otros (Cuadro 1) (FAO, 2018).

**Cuadro 1.** Principales productores en acuicultura a nivel mundial en 2016.

<b>N°</b>	<b>País</b>	<b>TM</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	China	61536375	58.05
<b>2</b>	Indonesia	15649311	14.76
<b>3</b>	India	5238019	4.94
<b>4</b>	Vietnam	3450200	3.25
<b>5</b>	Filipinas	2348159	2.22
<b>6</b>	Bangladesh	2060408	1.94
<b>7</b>	Corea del Sur	1676489	1.58
<b>8</b>	Noruega	1380890	1.3
<b>9</b>	Egipto	1174831	1.11
<b>10</b>	Japón	1103235	1.04
<b>11</b>	Chile	1057742	1
<b>12</b>	Myanmar	999630	0.94
<b>13</b>	Tailandia	897096	0.85
<b>14</b>	Brasil	575260	0.54
<b>15</b>	Corea del Norte	553950	0.52
	Resto del mundo	6302589	5.95
	<b>Total</b>	<b>106004184</b>	<b>100</b>

Fuente: FAO

Elaboración: Propia

## **2.2 Producción acuícola del Perú**

En Perú, el sector acuícola ha tenido un crecimiento del 29% en la última década; teniendo a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el langostino



(*Litopenaeus vannamei*) y concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) como las tres especies más producidas a nivel nacional (Cuadro 2). En ese lapso, la producción de trucha arcoíris se incrementó en casi 700%, siendo Puno, Huancavelica y Junín, en respectivo orden de importancia, los departamentos que más cultivan esta especie y destinándose más del 80% de su producción al consumo interno (PRODUCE, 2018; PROMPERU, 2019).

**Cuadro 2.** Cosecha de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad acuícola nacional por ámbito y según especie, 2014-2018.

<b>Ámbito / Especie</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>
<b>Continental</b>	<b>38 683</b>	<b>45 758</b>	<b>54 925</b>	<b>60 298</b>	<b>61 398</b>
<b>Trucha</b>	32 923	40 946	48 594	54 424	55 030
<b>Tilapia</b>	4 610	3 250	2 913	2 657	3 074
<b>Gamitana</b>	504	299	1 144	1 046	230
<b>Paiche</b>	55	135	400	217	1 109
<b>Otros</b>	590	1 127	1 873	1 952	1 953
<b>Marítimo</b>	<b>76 586</b>	<b>45 218</b>	<b>38 519</b>	<b>39 913</b>	<b>42 200</b>
<b>Concha de Abanico</b>	55 096	23,029	18,501	13 136	12 477
<b>Langostino</b>	21 484	22,183	20,013	26 768	29 716
<b>Otros</b>	6,5	6,6	4,4	8,1	6
<b>Total</b>	<b>115 269</b>	<b>90 976</b>	<b>93 444</b>	<b>100 211</b>	<b>103 598</b>

Fuente: PROMPERU

## **2.3 *Yersinia ruckeri***

### **2.3.1 Características generales y bioquímicas**

*Yersinia ruckeri* es una bacteria gramnegativa de forma bacilar (0.5-0.8 x 1-3 µm), perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, mayormente móvil debido a sus flagelos peritricos (Roberts, 2012; Austin y Austin, 2016). Este organismo causa la enfermedad entérica de la boca roja o yersiniosis en varias especies de peces a nivel mundial, siendo aislada por primera vez de truchas arcoíris en los años 50 en Idaho (EE. UU.) (Ross *et al.* 1966; Kumar *et al.*, 2015).

Al análisis bioquímico, *Yersinia ruckeri* se caracteriza por ser negativa a citocromo-oxidasa, elastinasa, arabinosa, ureasa, sucrosa, ramnosa, productora de indol y sulfuro de hidrógeno, entre otras. Por otro lado, es positiva para catalasa, beta-galactosidasa, ornitina descarboxilasa, manosa, maltosa, manitol, reducción de nitratos, entre otros (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016).

### **2.3.2 Biotipo, serotipo y perfil de proteínas de membrana externa**

Según el biotipo, *Yersinia ruckeri* se divide en dos (biotipo I y II). Las cepas del biotipo I son móviles y secretoras de lipasa (Tween 20); por el contrario, las cepas del biotipo II, son negativas a ambas características (Tobback *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015).

Según su serotipo, Romalde *et al.* (1993) actualizaron y clasificaron a *Y. ruckeri* en cuatro grupos: serotipo O1, el cual es predominante a nivel mundial, subdividido en dos subgrupos O1a (serovar I) y O1b (serovar III); serotipo O2 (serovar II), subdividido en tres subgrupos (O2a, O2b y O2c); serotipo O3 (serovar V) y serotipo O4 (serovar VI).

Según el perfil de proteínas de membrana externa (OMP), Davies (1991) clasificó a *Y. ruckeri* en cinco perfiles de OMP (OMP-1 al OMP-5). Para ello, analizó más de 130 aislados de *Y. ruckeri* usando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

En nuestro país, se realizó la serotipificación de 30 cepas de *Y. ruckeri*, aisladas de cuatro piscigranjas de la sierra central, perteneciendo todas al serotipo O1a, con el mismo perfil de bandas de LPS y de OMP tipo 3 (Bastardo *et al.*, 2011). Adicionalmente, otros estudios reportaron la presencia de los biotipos I y II en diversas piscigranjas de la sierra central del Perú, tanto en peces que presentaban signos compatibles con yersiniosis como en peces asintomáticos (Bueno, 2012; López, 2012; Sierralta *et al.*, 2013).

### **2.3.3 Signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas.**

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

La sintomatología clínica que muestran los peces infectados por *Y. ruckeri* son letargia, anorexia, dificultad para nadar, exoftalmia, nado cerca de la superficie del agua, melanosis, abdomen abultado y heces blanquecinas o amarillentas (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011; Kumar *et al.*, 2015)

Las lesiones macroscópicas que más se han observado son hemorragias petequiales en ojos (ipema), estómago, músculo lateral, vejiga natatoria, branquias, aletas dorsales, ventrales y anales, oscurecimiento y disminución del

tamaño del riñón; así como, hemorragias subcutáneas dentro y alrededor de la boca y garganta, las cuales le dan el nombre característico de Enfermedad de la Boca roja. Asimismo, el hígado y el bazo presentan un aumento de tamaño (Buchmann *et al.*, 2003; Raida *et al.*, 2003; Avci y Birincioglu, 2005; Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010b). Además, algunos animales presentan el estómago y los ciegos pilóricos con contenido mucoso claro, junto con intestinos de consistencia flácida y contenido acuoso rojizo (Arias *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2010a). En casos crónicos, mayormente los peces manifiestan una descoloración grisácea del hígado (Barnes, 2011).

En los análisis histopatológicos de infección por *Y. ruckeri*, a nivel de branquias se reportan la presencia de edema, hiperemia y descamación de las células epiteliales en lamelas secundarias; así como hemorragia, hiperplasia, teleangiectasia y necrosis en lamelas primarias y secundarias (Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009; Barnes, 2011; Sierralta *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2016). En tejido renal se observan túbulos renales degenerados, glomérulo nefritis y un aumento marcado de melanomacrófagos; sin embargo, otros estudios reportan incremento de células mesangiales e hiperplasia de tejido hematopoyético en las formas agudas de yersiniosis, pero una disminución de este en fases crónicas. En el bazo pueden presentarse áreas focales de necrosis y aumento de melanomacrófagos (Tobback *et al.*, 2007, 2009; Barnes, 2011). A nivel muscular se observan áreas de necrosis, presencia de melanomacrófagos y de otras células inflamatorias. En intestino se describen necrosis y desprendimiento del epitelio luminal, congestión en la capa muscular y serosa, y la presencia de agregados de *Y. ruckeri* (Mahjorr y Akhlaghi, 2012; Sierralta *et*

*al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2016). Finalmente, en tejido hepático se reportan áreas de necrosis focal, congestión con células inflamatorias y degeneración grasa (Tobback *et al.*, 2009, 2010b; Tinsley *et al.*, 2010; Mahjorr y Akhlaghi, 2012).

#### **2.3.4 Hospederos y Distribución**

*Yersinia ruckeri* afecta predominantemente a los salmónidos, siendo la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) la especie más susceptible (Roberts, 2012). Esta bacteria ha sido aislada en muchas especies de peces no salmónidas como anguilas, carpas, cisco, esturiones, goldfish, lenguados, bagres, entre otros (Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016). Asimismo, el patógeno se ha encontrado en otros animales como rata almizclera, halcones, gaviotas, tortugas, lombrices de tierra y humanos (Tobback *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015).

Se ha reportado la presencia de *Yersinia ruckeri* en Norteamérica, Europa, Medio Oriente y Sudamérica; así como en algunos países de Asia, África y Oceanía (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011). En el Perú, la primera vez que se reportó *Y. ruckeri* fue durante un brote en truchas arcoíris de cultivo procedentes del departamento de Junín (Bravo y Kojagura, 2004); subsiguientemente, se han producido otros casos de yersiniosis en diversas regiones del país tales como Lima, Huancavelica, Áncash y Puno (Sirvas *et al.*, 2011; Flores; 2013; Sandoval *et al.*, 2016;). Recientemente, se ha notificado la presencia de este agente infeccioso en Pasco, Cajamarca y Amazonas, indicando su diseminación a lo largo de los andes peruanos (Cerro *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2017).

#### **2.3.5 Diagnóstico**

El cultivo de *Y. ruckeri* se suele realizar en placas con agar tripticasa de soya (TSA), agar con infusión de cerebro y corazón (BHIA) y agar MacConkey;

aunque también se puede utilizar el medio Shotts-Waltman (Barnes, 2011; Roberts, 2012; Austin y Austin, 2016). Para ello, se toman muestras de corazón, hígado, riñón anterior o bazo, y se incuban a 20-28°C por 24-48 horas. En estos cultivos crecen colonias brillosas, de color crema, con un diámetro de 2-3 mm. Adicionalmente, para incrementar el número de aislamientos positivos se puede emplear TSA suplementado con 5% de sangre de oveja (Barnes, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Austin y Austin, 2016).

Para la identificación rápida de *Y. ruckeri* se emplean el kit API 20E, ELISA, prueba de aglutinación e inmunofluorescencia (Barnes, 2011; Kumar *et al.*, 2015; Austin y Austin, 2016).

Adicionalmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar *Y. ruckeri*, propuesta por Gibello *et al.* (1999), tiene la ventaja de encontrar esta bacteria en cantidades muy bajas, pudiendo así detectar peces portadores asintomáticos. Por otra parte, se desarrolló un PCR para detectar *Y. ruckeri* a partir de muestras de sangre, heces y biopsia de riñón anterior mediante aspiración dorso-caudal en peces (Noga *et al.*, 1988; Altinok *et al.*, 2001). Asimismo, Del Cerro *et al.* (2002) desarrollaron un PCR múltiple para detectar *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, en concentraciones tan bajas como 0.6, 6 y 27 unidades formadoras de colonias (UFC), respectivamente.

### **2.3.6 Control y Prevención**

#### **2.3.6.1 Probióticos.**

El uso de probióticos en la acuicultura nace como alternativa al rápido desarrollo de resistencia a antimicrobianos en este sector (Irianto y Austin, 2002).

Robertson *et al.* (2000) demostraron que truchas arcoíris y salmones atlánticos obtenían una buena protección contra *A. salmonicida*, *Vibrio ordalii* y *Y. ruckeri*, al recibir alimento con *Carnobacterium maltaromaticum* B26 y *Carnobacterium divergens*. Análisis posteriores demostraron que esta protección se debía a una buena estimulación del sistema inmune en los peces más que al efecto antimicrobiano *per se* de las bacterias (Kim y Austin, 2006).

Raida *et al.* (2003), reportaron que la administración por vía oral de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, protegía a truchas arcoíris contra infecciones por *Y. ruckeri*. Estos autores demostraron que esta protección fue debido a que aquellas bacterias favorecieron la producción de péptidos antimicrobianos y/o por su efecto inmunoestimulante.

Se ha demostrado que el alimento suplementado con *Bacillus* sp. y *Aeromonas sobria*, reduce efectivamente la mortalidad en truchas arcoíris desafiadas con *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii* y *Yersinia ruckeri* (Brunt *et al.*, 2007). Capkin y Altinok (2009), de manera similar, evidenciaron que *Enterobacter cloacae* y *Bacillus mojavensis*, adicionados en el alimento, aumentaban significativamente la sobrevivencia de truchas arcoíris inoculadas con *Y. ruckeri*.

Balcázar *et al.* (2008), reportaron que *Lactobacillus lactis* y *Lactobacillus fermentum*, antagonistas de *Y. ruckeri*, disminuyen significativamente la adhesión de esta bacteria al mucus de peces. En otro estudio, se demostró de manera similar que, de 12 bacterias ácido-lácticas, 7 de ellas inhibieron a *Y. ruckeri* por exclusión competitiva (Sica *et al.*, 2012).

### **2.3.6.2 Vacunación.**

Una de las primeras enfermedades acuícolas para la cual se desarrolló una vacuna comercial efectiva fue la yersiniosis (Barnes, 2011). Mayormente, las vacunas son bacterinas preparadas a partir de aislados virulentos, las cuales pueden ser de bacterias enteras y/o de componentes celulares internos de la bacteria. Comúnmente, se usan *Y. ruckeri* del serotipo O1 biotipo 1, por ser la que más brotes ocasiona, siendo administradas por vía oral, intraperitoneal o por inmersión, dando niveles significativos de protección contra la enfermedad (Raida y Buchmann, 2008; Costa *et al.*, 2011; Soltani *et al.*, 2014). La elaboración de nuevas vacunas, basadas en el gen *aroA*, la proteasa Yrp1, productos extracelulares y lipopolisacáridos, han sido efectivas contra *Y. ruckeri* del biotipo 1 (Temprano *et al.*, 2005; Ispir y Dorucu, 2010).

Por otro lado, brotes recientes de yersiniosis en peces vacunados contra cepas del biotipo 1 fueron producidos por cepas del biotipo 2 de *Y. ruckeri*, siendo estos más difíciles de controlar, lo que significa que las vacunas del biotipo 1 no producen protección cruzada contra cepas del biotipo 2 (Austin *et al.*, 2003). Sin embargo, una vacuna usando cepas inactivadas por formalina del biotipo 1 y 2 de *Y. ruckeri*, confirió una óptima protección contra ambos biotipos (Tinsley *et al.*, 2011; Deshmukh *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

### **2.3.6.3 Antibióticos.**

Para el tratamiento de la yersiniosis, así como en otras enfermedades bacterianas en acuicultura, se suelen aplicar rutinariamente un limitado espectro de antibióticos como: amoxicilina, ácido oxolínico, oxitetraciclina,



sulfametoxazol/trimetoprim, y últimamente florfenicol (Alderman y Hastings, 1998; Michel *et al.*, 2003).

## **2.4 Resistencia Antimicrobiana**

Si bien los mecanismos de acción de los antibióticos son variados, en general todos actúan en uno de los siguientes blancos, ya sea inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas o pared celular, o bien alterando la membrana celular bacteriana (Daza, 1998). Ante esto, las enterobacterias a nivel mundial han desarrollado diversos mecanismos de resistencia hacia sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclinas, algunos fenicoles, quinolonas y beta-lactámicos (Mosquito *et al.*, 2011). Estos mecanismos se pueden transmitir por vía vertical, de una generación bacteriana a otra, o por vía horizontal, mediante transformación (donde una bacteria toma un segmento de ADN libre a través de su pared celular), conjugación (las bacterias se transmiten plásmidos portando diversos genes o casetes de resistencia por medio de un pili), y transducción (en la cual bacteriófagos transmiten genes de resistencia de una bacteria a otra) (Manage, 2018).

### **2.4.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana**

- **Alteración del sitio diana del antibiótico.-** Se impide o dificulta la acción del antibiótico, como se ha observado en alteraciones de la ADN girasa, del ARNr 23S, de las enzimas fijadoras de penicilina, así como otras alteraciones a nivel ribosomal, siendo esta la vía más frecuente de resistencia para los macrólidos. Estas alteraciones son comunes para desarrollar resistencia a beta-lactámicos, quinolonas y tetraciclinas (Daza, 1998; Paterson *et al.*, 2005; Bush, 2013).

- **Inactivación enzimática del antibiótico.-** Mayormente las bacterias sintetizan enzimas que degradan los antibióticos, tal como las beta-lactamasas que degradan betalactámicos, o como las acetilasas o adenil fosforilasas que degradan aminoglucósidos. El número de estas enzimas está aumentando exponencialmente, degradando antibióticos como el cloranfenicol, las tetraciclinas, los macrólidos y la eritromicina (Daza, 1998; Paterson *et al.*, 2005; Bush, 2013).
- **Reducción de permeabilidad de membrana externa e interna.-** Se disminuye la absorción del fármaco en la bacteria o se expulsa activamente mediante sistemas de bombeo. La reducción de la permeabilidad de la membrana externa puede desempeñar un papel importante en la resistencia a las quinolonas y los aminoglucósidos (Thomas y Nielsen, 2005).
- **Sistema de bomba activa.-** Es un medio bacteriano complejo capaz de expulsar un compuesto tóxico fuera del microorganismo, limitando su acumulación hasta una concentración insuficiente para que funcione adecuadamente. Se han caracterizado numerosas clases de bombas de eflujo tanto en patógenos gramnegativos como grampositivos. Este tipo de resistencia afecta mayormente a antimicrobianos inhibidores de la síntesis de proteínas e inclusive a fluoroquinolonas, beta-lactámicos, carbapenems y polimixinas (McMurry *et al.*, 1980).
- **Uso de una vía metabólica alternativa.-** En vez de realizar cambios en los sitios diana de la bacteria, esta cambia varias enzimas de la ruta metabólica, de tal manera que el antibiótico no pueda actuar. Se ha observado esta resistencia

frente a sulfonamida y trimetoprim, por ejemplo: las bacterias pueden preparar folato del ambiente en lugar de sintetizarlo (Jacoby, 2009).

#### **2.4.2 Resistencia antimicrobiana en acuicultura**

En muchos países en vías de desarrollo, la disponibilidad de agentes antimicrobianos con poca o ninguna supervisión veterinaria puede contribuir directamente a la aparición de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas de peces y de seres humanos. Inclusive, algunas bacterias ambientales o comensales también pueden transferir sus propios genes de resistencia a patógenos veterinarios y zoonóticos (Miller y Harbottle, 2018).

Entre los factores que contribuyen a la resistencia antimicrobiana (RAM) en la acuicultura está el uso terapéutico. Debido a que los antibióticos se suelen administrar con el alimento, los peces más grandes y fuertes consumen la mayoría del alimento medicado, siendo positivo para ellos, mientras que los peces más pequeños y/o enfermos reciben una subdosis y son más propensos a la enfermedad y finalmente a no sobrevivir (Coyne *et al.*, 2004; Austin y Austin, 2016) . Por ello, las estrategias de dosificación alternativas, como aumentar las dosis, pueden mejorar algunos de estos problemas, pero la optimización de las dosis de alimentos medicados y su duración en peces puede ser extremadamente difícil. Los factores ambientales también pueden complicar la terapia porque la temperatura, la salinidad del agua y la presencia de cationes divalentes inactivadores (por ejemplo,  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ ) pueden afectar la absorción del fármaco y, en última instancia, la cantidad biodisponible de fármaco libre (Miller y Harbottle, 2018). Otro factor que fomenta la RAM es la liberación de patógenos resistentes de piscigranjas o del sector agrícola a las áreas circundantes, pudiendo

tener un impacto positivo en la resistencia de las comunidades microbianas. La lixiviación de agentes antimicrobianos de acuicultura en ríos circundantes también puede contribuir a la propagación de patógenos zoonóticos y resistentes a antimicrobianos (Petersen *et al.*, 2002).

Estudios recientes han sugerido que la acuicultura puede ser un gran sumidero de resistencia antimicrobiana en el medio ambiente, lo cual representa un riesgo potencial para la salud humana. Además, el rápido desarrollo de RAM en el sector acuícola ha sido atribuido no sólo al alto uso de antibióticos, sino también a la sobrealimentación, hacinamiento y bajo intercambio de agua (Williams *et al.*, 2016). Por otro lado, Shah *et al.* (2014), analizaron la resistencia fenotípica y genotípica en 124 bacterias marinas de sitios acuícolas y no acuícolas de Chile. Se determinó que el 81% de aislados bacterianos expresaron resistencia fenotípica contra al menos uno de los antimicrobianos probados como tetraciclina, trimetoprim, estreptomicina, amoxicilina, ácido oxolínico, sulfametoxazol, cloranfenicol, florfenicol y eritromicina. Además, se encontró una frecuencia de entre 0,8% a 17.7% para genes de resistencia; detectándose mayormente los genes *tetA* y *tetG* para tetraciclinas, *sul1* y *sul2* para sulfametoxazol, *dfrA1*, *dfrA5* y *dfrA12* para trimetoprim, el gen *strA-B* para estreptomicina y *blaTEM* para amoxicilina. En China se analizaron 4 767 aislados bacterianos, obtenidos de muestras de peces, alimentos y aguas de una piscigranja. Tras la adición de antibióticos, hasta el 80% de los aislamientos mostraron resistencia para más de uno de los cuatro antibióticos evaluados. Luego, por PCR convencional, se detectaron genes de resistencia antimicrobiana con una frecuencia entre 1-13.3 %, con los niveles más altos en los aislados recogidos de muestras de alimento. Cabe

resaltar que la granja no tenía antecedentes conocidos de aplicación de antibióticos (Huang *et al.*, 2016).

Finalmente, Welch *et al.* (2007) indican que el incremento de la resistencia antimicrobiana en diversas especies de enterobacterias es debido a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia (conjugación) entre diversos géneros y especies que comparten un mismo medio, tal como sucede en el género *Yersinia*, incluyendo *Yersinia ruckeri*, lo cual traería altos riesgos para la salud animal y humana de no tomarse las medidas necesarias de prevención y control.

#### **2.4.3 Resistencia antimicrobiana en *Yersinia ruckeri***

De Grandis y Stevenson (1985) reportaron resistencia a oxitetraciclina y sulfonamidas en 2 de 50 aislados de *Y. ruckeri* provenientes de Australia, USA, Alemania e Inglaterra. Esta resistencia fue mediada por la presencia de un plásmido de 36 megadalton y demostraron, además, su conjugación a *E. coli* receptoras. Por otro lado, en Dinamarca se tomaron muestras de peces, agua y sedimento de cuatro piscigranjas de truchas arcoíris que compartían un mismo afluente (Schmidt *et al.*, 2000). Se logró obtener 88 aislados de *Flavobacterium psychrophilum*, 313 *Aeromonas* móviles y 134 *Y. ruckeri*. Todos los aislados fueron enfrentados a oxitetraciclina, florfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, amoxicilina y ácido oxolínico mediante determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC); encontrándose resistencia variada en las *Aeromonas* móviles y *F. psychrophilum*, mientras que no se registró resistencia alguna en todos los aislados de *Y. ruckeri* analizados. Por otra parte, se ha demostrado la resistencia inducida *in vitro* en *Y. ruckeri* luego de realizar 15 subcultivos, logrando que la MIC aumente en 20 veces más para ácido oxolínico y 16 veces

más tanto para oxitetraciclina como para sulfadiazina/trimetoprim (Rodgers, 2001). En otro estudio se examinó la resistencia antimicrobiana frente a cloranfenicol y florfenicol en diversas bacterias patógenas acuáticas, incluida *Yersinia ruckeri*, mediante pruebas de MIC y de difusión en agar. Se halló que los 50 aislados estudiados de *Y. ruckeri* no presentaron resistencia en el análisis de MIC, aunque un aislado fue resistente en la prueba de difusión en agar (Michel *et al.*, 2003). Una investigación adicional se llevó a cabo para clonar, secuenciar y analizar el gen *ampC* de un aislado de *Y. ruckeri*, el cual produce una beta-lactamasa de clase C. Esta enzima haría inefectiva a la amoxicilina u otros beta-lactámicos para el tratamiento de la yersiniosis (Mammeri *et al.*, 2006) pero aparentemente no fue expresada.

En España, se analizaron 10 aislados de *Y. ruckeri*, hallándose que 4 de ellos presentaban reducido diámetro de zona de inhibición (IZD) y alta MIC. Al analizar la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) del gen *gyrA* de estos aislados, se descubrieron mutaciones en la posición nucleotídica 83, lo que les confería una MIC 4 a 8 veces mayor, en comparación con los aislados susceptibles (Gibello *et al.*, 2004). De manera similar, al estudiar 7 aislados de *Y. ruckeri* procedentes de salmones atlánticos de Noruega, se observó que 2 de estos aislados presentaron baja susceptibilidad al ácido oxolínico y flumequina en la prueba de MIC. Se determinó que esta baja susceptibilidad también estaba relacionada a cambios en la posición 83 del QRDR del gen *gyrA* (Shah *et al.*, 2012).

Huang *et al.* (2013), analizaron fenotípica y genotípicamente 82 aislados de *Y. ruckeri* del Noroeste de Alemania. Frente a los 24 antibióticos analizados

mediante la técnica de MIC, 10 aislados presentaron elevados niveles frente a enrofloxacina y ácido nalidíxico, asociados a mutaciones en las posiciones 83 y 87 de la QRDR del gen *gyrA*. Asimismo, reportaron que un aislado con elevado MIC para sulfametoxazol y la combinación de sulfametoxazol/trimetoprim portaba un plásmido transmisible (pYR1521) con los genes *sul2*, *strB* y un casete de gen *dfrA14* integrado en el gen *strA*.

En Francia se examinó la resistencia de 128 aislados de *Y. ruckeri* frente a diez antibióticos mediante análisis de MIC y prueba de difusión en agar. Sólo 1 y 3 aislados fueron resistentes a flumequina y florfenicol, respectivamente; los demás aislados fueron sensibles a todos los antibióticos testados, los cuales incluían oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, entre otros (Calvez *et al.*, 2014). Todos estos datos indican que no es inusual el hallazgo de elevada o completa susceptibilidad antimicrobiana en *Y. ruckeri*, a pesar del uso de estos fármacos en cultivos de truchas arcoíris, pero que esta puede desaparecer debido a su uso continuo.

Por otra parte, en Turquía, se han realizado varios estudios de resistencia antimicrobiana en *Yersinia ruckeri*, a nivel fenotípico y genotípico, encontrando resistencia variada a diversos antibióticos. Balta *et al.* (2010) analizaron 116 aislados, mediante el método de difusión en agar, hallando que el 35.6% fue resistente a oxitetraciclina, el 29% a ampicilina, el 11.1% a ácido oxolínico, el 10.2% a estreptomicina, el 9.4% a sulfametoxazol y a sulfametoxazol/trimetoprim, el 4.2% a florfenicol y el 2.3% a enrofloxacina. Asimismo, en otro estudio similar se examinaron 97 aislados, determinando que el 53.6% fue resistente a eritromicina, 43.3% a neomicina, y 7.2% a trimetoprim,

pero el 75.3% fue susceptible a amoxicilina, ampicilina, enrofloxacina, oxitetraciclina y trimetoprim (Onuk *et al.*, 2011). Adicionalmente, se reportaron que de 17 aislados analizados por el método de Kirby-Bauer frente a 9 antibióticos, el 100% fue resistente a neomicina, lincomicina y eritromicina, el 94.12% a amoxicilina, el 33.33% a gentamicina y doxiciclina, el 20% a florfenicol, el 13.33% a oxitetraciclina y el 6.66% a sulfametoxazol/trimetoprim (Altun *et al.*, 2013).

Interesantemente, en un amplio análisis se tomaron muestras de sedimento, agua y truchas arcoíris de 7 piscigranjas, aislándose 183 bacterias (159 coliformes y 24 patógenas de peces) de diversos géneros, incluyendo *Y. ruckeri*. Al ser testados fenotípicamente se determinó que el 92.45% de bacterias coliformes fue resistente a sulfametoxazol, el 47.79% a ampicilina y el 28.93% a imipenem. Sin embargo, en bacterias patógenas de peces el 100% fue resistente a sulfametoxazol, y el 95% tanto para imipenem como aztreonam. El único aislado de *Y. ruckeri* obtenido, además de ser resistente a estos tres últimos antibióticos, también lo fue a ceftriaxona, aunque se mostró sensible a ampicilina, kanamicina, gentamicina, tetraciclina, oxitetraciclina, cloranfenicol y rifampicina. Durante el estudio genotípico, se analizaron 16 genes de resistencia antimicrobiana (ARG) en los 183 aislados bacterianos. En el caso de las bacterias coliformes el 68.55% portaba al menos un ARG y el 42.10% portaba 2 o más ARG; siendo el gen *ampC* (37.74%) como el más común, seguido de *tetA* (18.87%), *sul2* (18.24%), *blaCTX-M1* (16.98%), *blaTEM-OT12* (14.47%), entre otros genes en menor frecuencia. Entre las bacterias patógenas acuícolas, el 70.33% contenía al menos un ARG y el 66.67% contenían de dos a más ARG, teniendo al gen *ampC* (45.83%) como el



más frecuente, seguido por *cmlA* y *blaTEM* (33.30% para ambos), entre otros de menor frecuencia. Para el caso de *Y. ruckeri*, incluyendo los tres últimos ARG citados, también se detectó la presencia de *tetD*, *sul1*, *blaPSE* y un integrón clase 1. La presencia de plásmidos también fue determinada, hallándose la presencia de estos en el 36.54% del total bacteriano con un tamaño de entre 2 a 10 kb, luego estos portadores fueron evaluados mediante experimentos de conjugación con *E. coli* K12-J53-2, determinándose una eficacia de transferencia en el 34,86% (14/38) de *E. coli* aisladas, 60% (3/5) en *K. oxytoca* y del 100% para el único aislado patógeno de peces (*E. sakazakii*). Los ARG transferidos por plásmidos fueron *ampC*, *blaCTX-M1*, *tetA*, *sul2*, y *blaTEM* (Capkin *et al.*, 2015).

En otra investigación semejante, se estudiaron 8 especies bacterianas, incluida *Y. ruckeri*, procedentes de piscigranjas marinas y continentales, reportándose que el 100% fue resistente a lincomicina, 80% a amoxicilina, 70% a penicilina, 50% a ampicilina, 30% a tetraciclina y eritromicina, 20% a oxitetraciclina y sulfametoxazol/trimetoprim, y el 10% a enrofloxacin, aunque el 100% fue sensible a florfenicol. Los ARG detectados fueron *sul1*, *sul2* y *floR*. Particularmente, los aislados de *Y. ruckeri* fueron resistentes a penicilina y lincomicina, y portadores del gen *sul2* (Ture y Alp, 2016).

También se investigó la resistencia a antibióticos y la presencia de ARG en 133 (incluidos 26 aislados de *Y. ruckeri*) de bacterias aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de diferentes piscigranjas ubicadas en Turquía. Al análisis fenotípico, mediante difusión en agar, los antibióticos a los cuales se detectó mayor resistencia fueron cefalotina (70%), eritromicina (68%), amoxicilina (63%), ampicilina (62%), ticarcilina (56%), aztreonam (51%) y sulfametoxazol

(51%). Del total de aislados bacterianos, el 51% eran resistentes a múltiples fármacos (MDR) y el 35% eran ampliamente resistentes a fármacos (XDR). Ninguno de los aislados fue pan drogo resistente (PDR). Los ARG más comunes fueron *ampC* (36%) y *sul1* (24%), asimismo el casete del gen integrón de clase 1 se detectó en el 51% de las bacterias; también se determinó que el 35% de las bacterias albergaban al menos un plásmido. Los ARG mediados por plásmidos que se identificaron fueron *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *sul1*, *sul3*, *ampC* y *blaPSE*. Particularmente, los aislados de *Y. ruckeri* fueron XDR a diversos betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas, fenicoles, macrólidos y rifampicina; conteniendo varios ARG como *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *sul1*, *sul3*, *ampC*, *blaTEM-OT12*, *blaTEM-OT34*, *blaPSE*, *aadA1*, *cmlA* y casetes de integrón clase 1 y 2. De estos 26 aislados, 11 portaban plásmidos y 8 fueron capaces de realizar conjugación bacteriana, transfiriendo los genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *sul1* y *ampC* (Capkin *et al.*, 2017). Por otro lado, Duman *et al.* (2017) hicieron un análisis de MIC a 142 aislados de *Y. ruckeri*, encontrando que todos eran resistentes a sulfametoxazol, 21 a florfenicol, 19 a tetraciclina y 18 al compuesto sulfametoxazol/trimetoprim; asimismo los genes *sul2*, *sul1*, *tetC*, *tetE*, *tetD* y *floR* fueron detectados en 8, 3, 4, 2, 1 y 1 aislados, respectivamente.

En el Perú, en sendos estudios de Bastardo *et al.* (2011) y Sierralta *et al.* (2013) aislaron y analizaron 30 aislados de *Y. ruckeri* procedentes de la sierra central (Junín) del Perú. Al análisis fenotípico, mediante la prueba de difusión en agar, todos los aislados fueron sensibles a ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, florfenicol, tetraciclina, enrofloxacina, ampicilina, ácido nalidíxico, flumequina, gentamicina, furazolidona y estreptomina. Por

último, en aislados de *Y. ruckeri* procedentes de alevines de truchas arcoíris de cultivo del lago Titicaca, se reportó susceptibilidad intermedia al florfenicol y oxitetraciclina, los cuales son los antibióticos más utilizados en la truchicultura regional (Sandoval *et al.*, 2016).

#### **2.4.4. Interpretación de resistencia normalizada**

En 1996 se propuso la necesidad de elaborar un método de calibración que compare resultados de pruebas de difusión en disco entre diversos laboratorios, cuando se realizaba un taller de resistencia antimicrobiana organizado por la Organización Mundial de la Salud en Génova-Italia (Kronvall y Smith, 2016). Por ello, en el año 2003 se desarrolló y validó la Interpretación de Resistencia Normalizada (NRI, por sus siglas en inglés) como respuesta a esta necesidad (Kronvall *et al.*, 2003; Kronvall, 2003; Joneberg *et al.*, 2003). Este método se utiliza para determinar valores de cortes epidemiológicos ( $CO_{wt}$ , por sus siglas en inglés) en diversas bacterias, basados en la media y desviación estándar de los datos de susceptibilidad fenotípica obtenidos, clasificándolas como cepas completamente susceptibles o de tipo salvaje (WT, por sus siglas en inglés), o como cepas que manifiestan una susceptibilidad reducida o de tipo no salvaje (NWT, por sus siglas en inglés) (Smith y Christoflogiannis, 2007; Kronvall y Smith; 2016). Sin embargo, los términos sensible, intermedio y resistente no deben usarse para referirse a cepas categorizadas por la aplicación de los  $CO_{wt}$  (Sille, 2012). Adicionalmente, los acrónimos ECV y ECOFF, para referirse a estos valores de corte epidemiológicos, deben reservarse sólo para los que son oficialmente establecidos por el Instituto de estándares clínicos y de laboratorio.

(CLSI), y el Comité europeo sobre pruebas de sensibilidad antimicrobiana (EUCAST) (Smith *et al.*, 2014).

El NRI se ha aplicado con éxito para determinar los CO<sub>wt</sub> y comparar resultados de sensibilidad antimicrobiana fenotípica inter-laboratorial en bacterias de importancia en salud pública como *E. coli*; *S. aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Giske *et al.*, 2005; Sjölund *et al.*, 2009; Kronvall, 2010; Sundqvist *et al.*, 2010; Bengtsson *et al.*, 2012). Así mismo, el NRI se ha utilizado en el sector acuícola para la determinación de los CO<sub>wt</sub> en diversas especies bacterianas patógenas, mediante la técnica de difusión en disco o concentración mínima inhibitoria, como *Aeromonas spp.*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Edwardsiella piscicida*, *Streptococcus phocae*, *Vibrio spp.*, *Vibro harveyi* y *Weissella sp.* (Smith y Christofilogiannis, 2007; Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2012; Avendaño-Herrera *et al.*, 2011; Uhland, 2011; Figueiredo *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2017; Van Vliet *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018).

### III. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura a nivel mundial viene creciendo a una tasa constante de 5.8% cada año. En el Perú, la producción acuícola tuvo algunos descensos debido a las baja producciones de conchas de abanico y langostinos; sin embargo, la producción de truchas arcoíris se ha incrementado en casi 700% durante los últimos 10 años, llegando actualmente a representar más del 50% de la producción nacional. No obstante, desde que se reportó el primer caso de yersiniosis en nuestro país en 2004, se han incrementado los brotes de esta enfermedad, debido al desarrollo extensivo de la truchicultura en varias zonas de la sierra peruana. Esto ha conllevado a que los productores de trucha arcoíris sufran pérdidas económicas importantes, a causa de la alta morbilidad y mortalidad que produce *Yersinia ruckeri*. En nuestro país, y en muchas partes del mundo, la forma de controlar rápidamente las infecciones causadas por *Y. ruckeri* es mediante el uso de antibióticos como oxitetraciclina, florfenicol amoxicilina, ácido oxolínico y sulfametoxazol/trimetoprim, por su disponibilidad y bajo costo en el mercado. A pesar de ello, la ausencia de puntos de cortes y/o valores de corte epidemiológicos para *Y. ruckeri*, el uso empírico de estos antibióticos por parte de los criadores, dosis y duración de tratamientos terapéuticos inadecuados, mal diagnóstico definitivo del agente etiológico, así como no realizar pruebas de sensibilidad, podrían traer como resultado la diseminación de resistencia antimicrobiana en el sector acuícola, para el tratamiento y/o control de la yersiniosis o cualquier otra enfermedad que afecte a las truchas arcoíris de cultivo.

Por lo expuesto anteriormente, es necesario evaluar y actualizar el perfil de resistencia antimicrobiana y detectar los genes que pueden ser responsables de

conferir esta característica a aislados de *Y. ruckeri* nacionales, que podrían haber aparecido como respuesta al inadecuado uso de antibióticos en la truchicultura. Además, el establecimiento de puntos de cortes epidemiológicos y la identificación de genes de resistencia en este patógeno contribuirá con la toma de decisiones en programas de manejo y control sanitario acuícola en nuestro país. Finalmente, el presente trabajo suplirá la escasa información fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en *Y. ruckeri* en el Perú, y contribuirá con estudios epidemiológicos sobre este patógeno en nuestro medio.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Analizar la resistencia antibiótica fenotípica y molecular de *Yersinia ruckeri* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú.

### 4.2 Objetivo específicos

- Identificar fenotípica y molecularmente colonias de *Y. ruckeri* aisladas de truchas arcoíris procedentes de sistemas de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú.
- Evaluar la sensibilidad antibiótica, mediante la Interpretación de Resistencia Normalizada, frente a los antimicrobianos de mayor uso en la industria acuícola nacional e internacional: oxitetraciclina, florfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, ácido oxolínico y amoxicilina, en aislados identificados como *Y. ruckeri* procedentes de truchas arcoíris de sistemas de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú.
- Detectar, mediante PCR, genes asociados a resistencia antibiótica: *floR*, *gyrA*, *tetA*, *tetC*, *sul1*, *sul3*, *dfrA1* y *blaTEM*; en cepas de *Y. ruckeri* aisladas de truchas arcoíris de sistemas de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú.
- Caracterizar molecularmente el gen *gyrA* de *Y. ruckeri* aisladas de truchas arcoíris de sistemas de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú.

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Lugar de Estudio y tamaño muestral

El aislamiento, identificación bioquímica y molecular de *Y. ruckeri*, así como la caracterización molecular y fenotípica de la resistencia antimicrobiana se realizó en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú. Para ello, se trabajó con 240 truchas arcoíris (30 peces por piscigranja), procedentes de 8 centros de cultivo intensivo de cuatro departamentos de la sierra central y sur (Lima, Junín, Ancash y Puno) del Perú (ver Anexo 1). Los peces pesaron entre 10-200 g y midieron entre 5-20 cm, asimismo, mostraron signos clínicos de yersiniosis como melanosis, nado errático, exoftalmia, hemorragias en boca, ojos y piel, entre otros. El número de animales para el estudio se calculó con la fórmula de tamaño de muestra para detectar una variable en una población (Ortega y De Blas, 1998), a través del programa WinEpi 2.0 (Working in Epidemiology), con un nivel de confianza del 95%, asumiendo una prevalencia mínima esperada para el gen *floR* del 4.76% en los animales seleccionados, basada en la investigación desarrollada por Duman *et al.* (2017), por lo tanto se requirieron seleccionar al menos 62 peces para el estudio.

$$n = (1 - (1 - NC)^{1/d}) \cdot (N - ((d-1)/2))$$

Donde:

n: tamaño de la muestra requerido

N: tamaño de la población

d: prevalencia mínima esperada

NC: nivel de confianza (95%)



## **5.2 Tipo de Estudio**

Este fue un estudio observacional, transversal y descriptivo.

## **5.3 Aislamiento e identificación bioquímica presuntiva de *Y. ruckeri***

Las truchas arcoíris muestreadas fueron transportadas de los centros productivos al Laboratorio de Parasitología en bolsas plásticas con agua y oxígeno en relación de 2 a 1, respectivamente, cubiertas con gel packs y dentro de cajas de Tecnopor. En el laboratorio los peces fueron anestesiados por sobredosis de eugenol (a dosis de 50mg/L de agua) y eutanasiados por corte medular (CCAC; 2010). Luego se procedió a realizar la necropsia, según la metodología descrita por Meyers (2009). Muestras de riñón anterior y bazo, de cada uno de los animales, fueron sembradas por estriado en placas Petri con agar tripticasa de soya (TSA) (Liofilchem, Italia) e incubadas a 25 °C por 24-48 h.

Entre 2 a 3 colonias por placa se tomaron para la identificación presuntiva de *Y. ruckeri*, mediante coloración de Gram y las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa.

## **5.4 Identificación molecular mediante PCR de las cepas de *Yersinia ruckeri***

### **5.4.1 Extracción de ADN**

Una colonia previamente identificada, fue crecida en caldo BHI (Liofilchem, Italia) durante 24 horas a 25 °C. El cultivo fue centrifugado a 5000 rpm por 5 min, enseguida el pellet bacteriano fue recuperado y lavado con solución salina tamponada. Luego la extracción del DNA microbiano fue realizada según protocolo del kit comercial Wizard genomic DNA Purification (PROMEGA, EE. UU.). El DNA fue cuantificado en equipo nanodrop (Thermo Fisher, EE. UU.) a 260/280 nm para determinar su concentración y pureza.

#### **5.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La confirmación de la identidad de los aislados de *Y. ruckeri* se realizó mediante análisis por PCR, según el protocolo de Gibello *et al.* (1999) (Cuadro 3). Brevemente, un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , conteniendo 1  $\mu\text{L}$  de DNA, una concentración de 10 pmol de cada primer, 2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 10  $\mu\text{L}$  de buffer de Taq polimerasa y 5 U/ $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa; se colocó en el termociclador (Eppendorf-Mastercycler, USA) utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 92 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 92 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE 1X, sometidos a campo eléctrico de 80 V/cm durante 90 minutos. Se utilizó el Perfect DNA Ladder de 50 pb (Novagen, EE. UU.) como marcador de peso molecular. Luego el gel fue teñido con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio por 15 minutos. Al término de la electroforesis se visualizaron y compararon los amplificados en un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, EE. UU.). La presencia de una banda clara, de 575 pb confirmó el resultado. Como control positivo se usó la cepa tipo de *Y. ruckeri* ATCC 29473 y como control negativo, agua ultra pura libre de DNAsas (AppliChem, Alemania).

#### **5.5 Sensibilidad antibiótica de cepas *Yersinia ruckeri***

Por el método de difusión en disco, las cepas confirmadas de *Y. ruckeri* fueron sometidas a pruebas de sensibilidad *in vitro* frente a 5 discos de antibióticos (Liofilchem, Italia) conteniendo oxitetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ), florfenicol

(30 µg), ácido oxolínico (2 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg) y amoxicilina (10 µg), siguiendo las recomendaciones de la guía VET03-A del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Brevemente, se preparó una suspensión bacteriana en solución de suero fisiológico estéril (NaCl 0,85%) a partir de colonias de 24-48 horas de incubación, hasta obtener una concentración equivalente a 0,5 de la escala Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL). Esta suspensión se sembró en placas de agar Müeller-Hinton (Liofilchem, Italia) con una torunda de algodón estéril. Después de dejar secar durante un minuto, se colocaron los discos de antibióticos y se incubaron por 24 horas a 28 °C. Posteriormente, se procedió a la lectura de las placas, utilizando un vernier calibrado para la medición de los diámetros de zona de inhibición (mm). Como controles se emplearon las cepas tipo de *E. coli* ATCC 25922 y *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, como se recomienda en la guía VET03-A (CLSI, 2006). En esta investigación los antibiogramas se incubaron a 28 °C por 24 horas, ya que a una menor temperatura y mayor tiempo de incubación los IZD de esta prueba son menos precisos tanto a nivel intra-laboratorio como inter-laboratorio (Smith y Kronvall; 2014; Smith *et al.*, 2018).

## **5.6 Identificación de genes de resistencia en cepas *Yersinia ruckeri***

La detección de los genes se hizo de acuerdo con los protocolos descritos en el Cuadro 3, los cuales fueron seleccionados debido a su mayor prevalencia y distribución mundial en *Yersinia ruckeri* para cada grupo de antibiótico.

**Cuadro 3.** Secuencias de primers para la identificación de *Y. ruckeri* y para la detección de genes de resistencia.

Gen	T. A. (°C)	Secuencias 5'-3'	Tamaño (bp)	Referencia
16S-rDNA	57	F:GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG R:GAAGGCACCAAGGCATCTCTG	575	Gibello <i>et al.</i> (1999)
<i>gyrA</i>	57	F: TGAGCGACCTTGCCAGAG R: ATTATGTGGCGGAATGTTGG	558	Shah <i>et al.</i> (2012)
<i>floR</i>	55	F: TATCTCCCTGTCGTTCCAG R: AGAACTCGCCGATCAATG	399	Van <i>et al.</i> (2018)
<i>tetA</i>	55	F: GCTACATCCTGCTTGCCTTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	Ng <i>et al.</i> (2001)
<i>tetC</i>	55	F: CTTGAGAGCCTTCAACCCAG R: ATGGTCGTCATCTACCTGCC	418	
<i>sul1</i>	69	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	433	Wang <i>et al.</i> (2014)
<i>sul3</i>	52	F: TCAAAGCAAAATGATATGAGC R: TTTCAAGGCATCTGATAAAGAC	787	
<i>blaTEM</i>	49	F: TGAATTTGGCAACCTATAACC R: AATGAAAGCCACGTAGCTTCC	433	Arlet y Philippon (1991)
<i>dfrA1</i>	62	F: TGGTAGCTATATCGAAGAATGGAG R: TATGTTAGAGGCGAAGTCTTGGGTA	425	Grape <i>et al.</i> (2007)

T.A.: Temperatura de anillamiento

Enseguida, alícuotas de 20 µL de los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Como marcador de peso molecular se emplearon los DNA Ladder Express de 1Kb y 100 bp (Innustar, Alemania) y como control positivo se empleó el DNA de *E. coli* portadoras de los genes analizados, brindadas gentilmente por el Dr. Jesús Tamariz, del Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos e Inmunopatología del LID-UPCH, que fueron previamente secuenciados y publicados. Como control negativo se empleó agua

libre de nucleasas (AppliChem, Alemania). Adicionalmente, y sólo para el gen *gyrA*, algunos de los amplificados por PCR fueron luego purificados empleando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Alemania), según las indicaciones del fabricante, y secuenciados por método Sanger en la Unidad de Secuenciación e Análisis de fragmentos de la Universidad Santiago de Compostela, España. Las fastas de estas secuencias se observaron en el programa Chromas Lite 2.0, posteriormente se analizaron con el programa Blastn, arrojando para cada producto (forward y reverse) 100 % de identidad con el gen estudiado.

### **5.7 Plan de análisis de datos**

Los diámetros de zona de inhibición (IZD) obtenidos en este estudio permitieron establecer los valores de corte epidemiológicos ( $CO_{WT}$ ) para nuestros aislados de *Y. ruckeri* mediante la interpretación de resistencia normalizada (NRI) (Kronvall, 2003; Kronvall y Smith, 2016). Estos  $CO_{WT}$  clasificaron a los aislados como totalmente susceptibles (WT) o de susceptibilidad reducida (NWT). El método de NRI se usó con el permiso del titular de la patente, Bioscand AB, TÄY, Suecia (patente europea N° 1383913; patente estadounidense N° 7,465,559).

Por otro lado, la presencia de los genes de resistencia antibiótica fue analizada mediante tablas de frecuencia en el programa Excel.

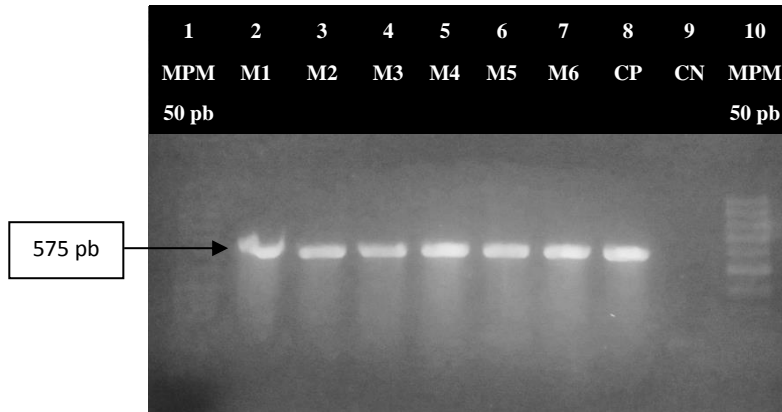
### **5.8 Consideraciones éticas**

Este trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Humanos y Animales- UPCH con código CAREG-ORVEI-143-2018.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento e identificación bioquímica y molecular

Entre enero y agosto del año 2018, se tomaron de muestras de bazos y riñones anteriores de 240 truchas arcoíris clínicamente enfermas (Anexo 2) procedentes de 8 centros de cultivo de Junín, Lima, Áncash y Puno, obteniéndose un total 43 aislados de *Y. ruckeri* (Anexo 3), los cuales fueron bacilos Gram-negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y confirmados al análisis por PCR (Figura 2).

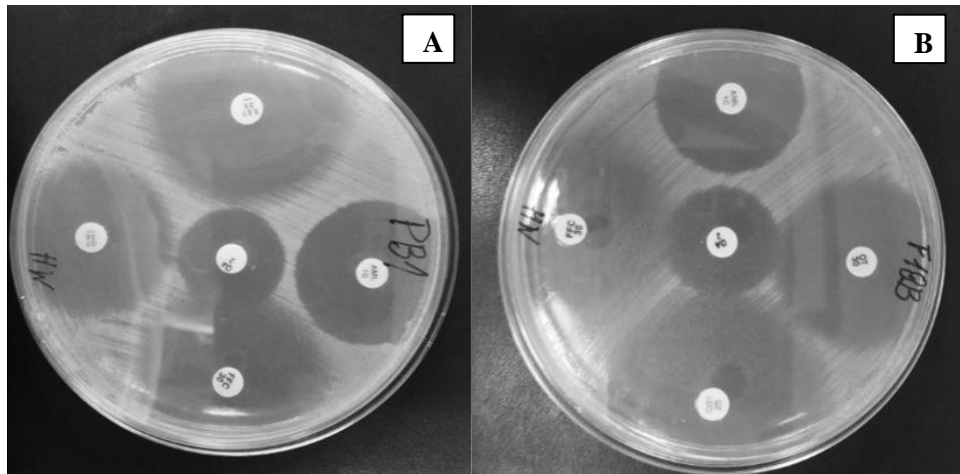


**Figura 2.** Identificación molecular por PCR de aislados de *Y. ruckeri*. Carril 1 y 10: Marcador de peso molecular (MPM) 50 pb; carril 2-7: aislados (M1-M6); Carril 8: control positivo (CP). Carril 9: control negativo (CN).

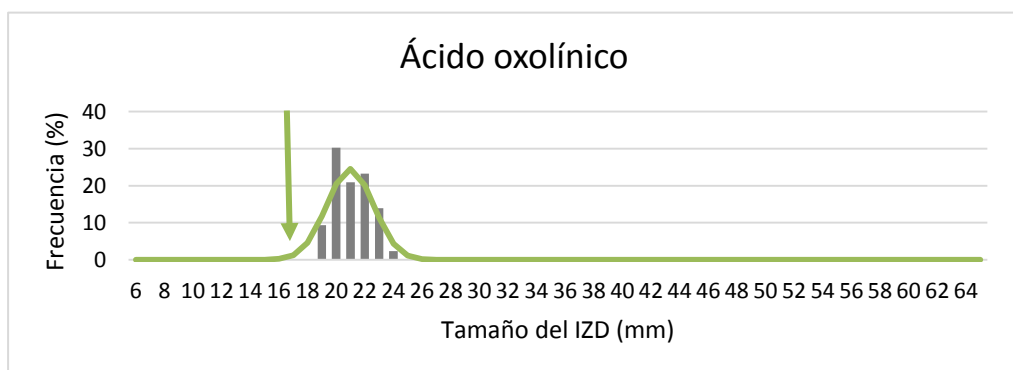
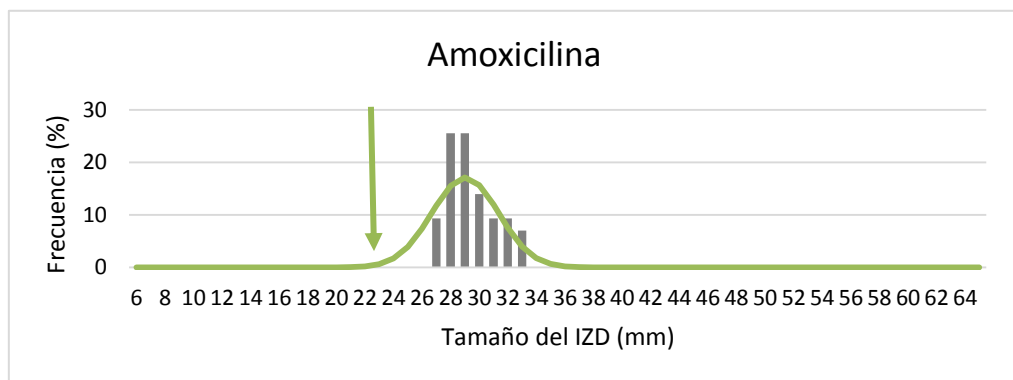
### 6.2 Sensibilidad antibiótica

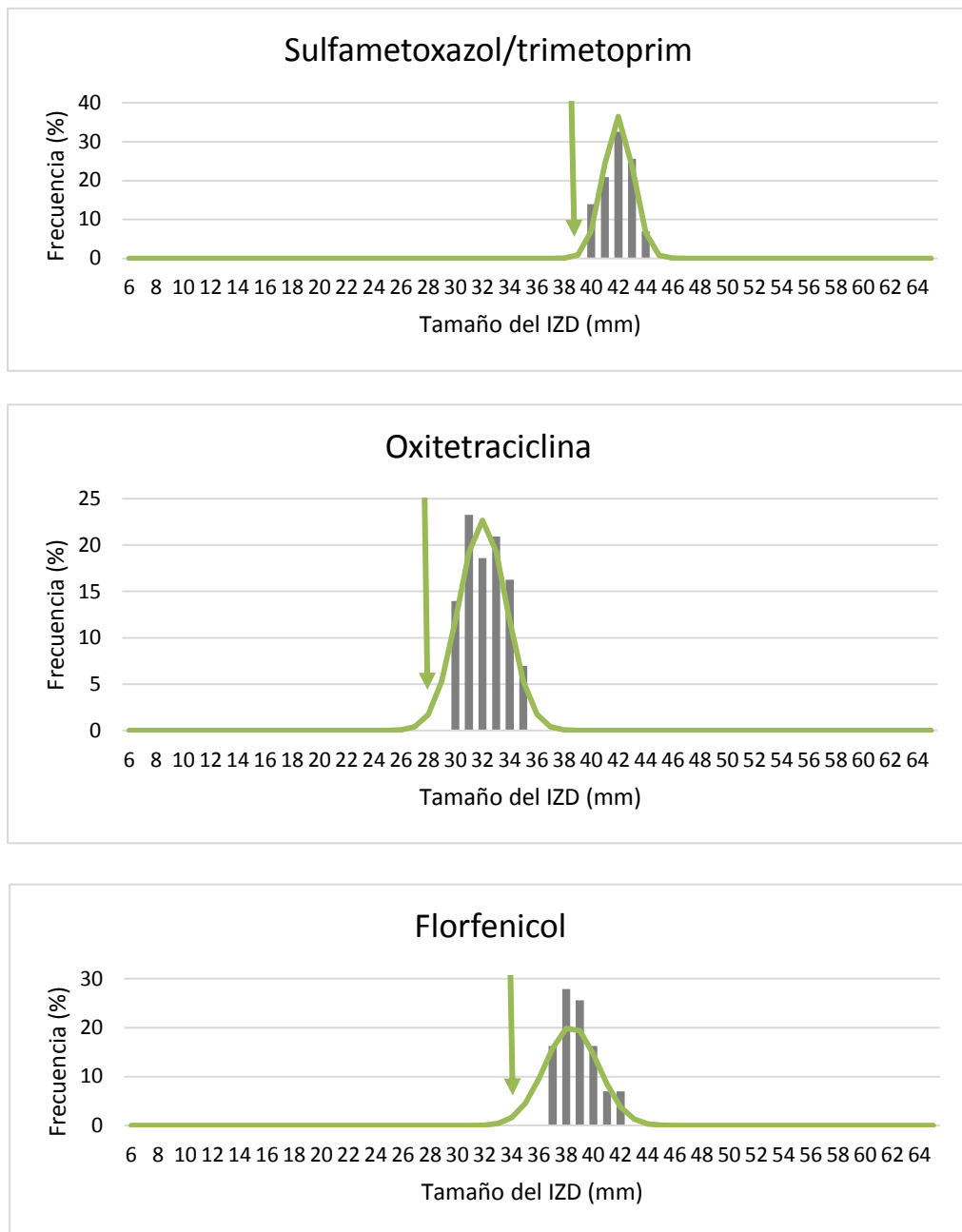
La lectura de los diámetros de zonas de inhibición (IZD) de los antibiogramas (Figura 3) se realizó luego de ser incubados a 28 °C por 24 h. Todos los IZD siguieron una distribución unimodal para cada antibiótico analizado (Figura 4). Los IZD registrados de los 43 aislados de *Y. ruckeri* se muestran en el Cuadro 4.

El análisis NRI se aplicó a los 5 grupos de datos obtenidos en este estudio, estos resultados se presentan en el Cuadro 5, así como los  $CO_{wt}$  obtenidos para cada antibiótico.



**Figura 3.** Antibiogramas de *Y. ruckeri* frente a amoxicilina (AML), ácido oxolínico (OA), oxitetraciclina (OT), florfenicol (FFC) y sulfametoxazol/trimetoprim (SXT o COT). **A:** Aislado procedente de Jauja-Junín. **B:** Aislado procedente de Canta-Lima.

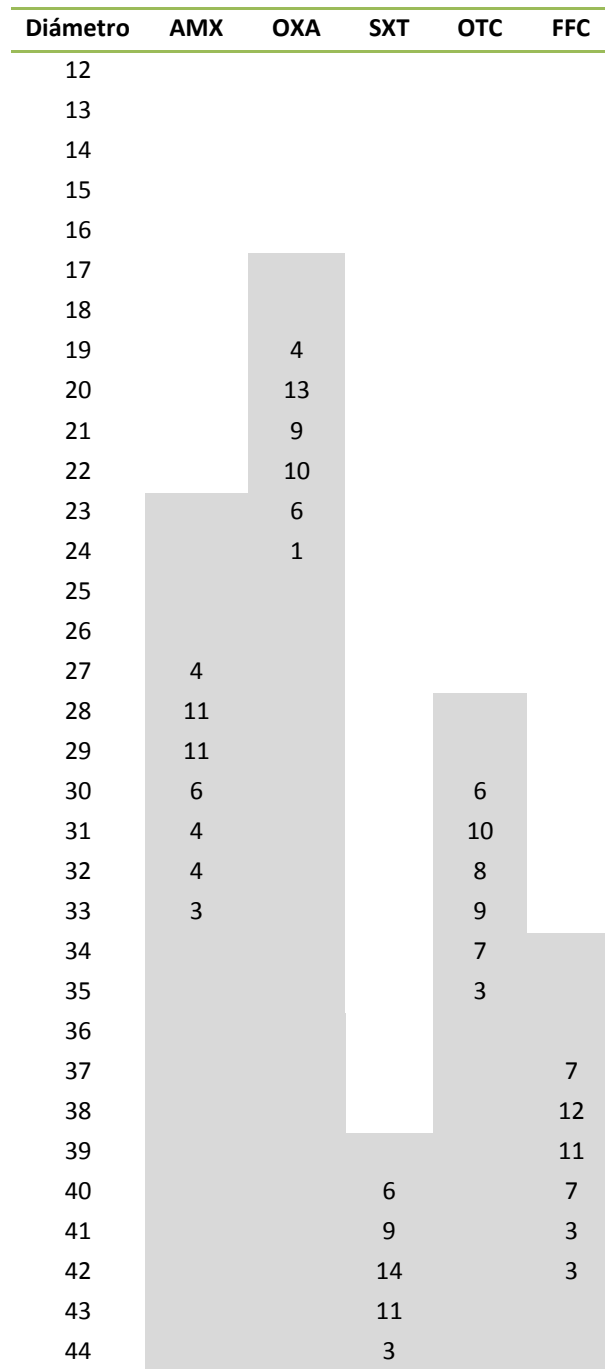




**Figura 4.** Distribución de los diámetros de zonas de inhibición producidos por discos de antibióticos de amoxicilina, ácido oxolínico, sulfametoxazol/trimetoprim, oxitetraciclina y florfenicol de 43 aislados de *Y. ruckeri*. La línea verde continua representa la media móvil y la flecha verde vertical representa el CO<sub>WT</sub> calculado.



**Cuadro 4.** Distribución de los diámetros (mm) de zona de inhibición de los 43 aislados de *Y. ruckeri*



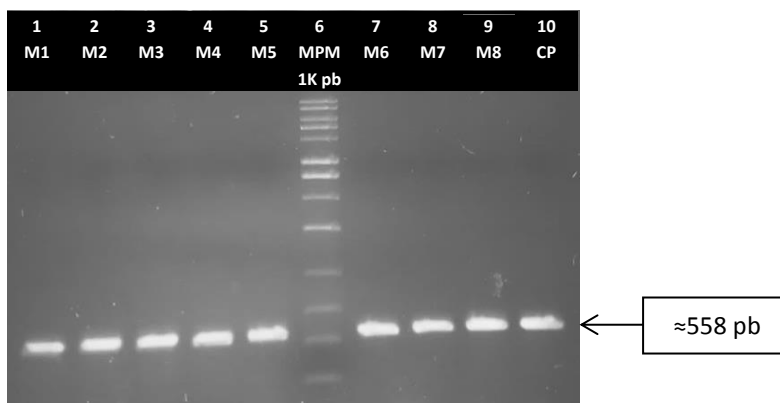
AMX: Amoxicilina; OXA: Ácido oxolínico; SXT: sulfametoxazol/trimetoprim; OTC: Oxitetraciclina; FFC: Florfenicol. Áreas resaltadas en gris indican el rango de zonas para aislados clasificados como WT.

**Cuadro 5.** Resumen de los resultados del análisis NRI

	CO <sub>WT</sub>	SD <sup>a</sup>	WT <sup>b</sup>	
AMX	23	2.31	43	<sup>a</sup> Desviación estándar de la distribución normalizada de las observaciones de WT. <sup>b</sup> Número de aislamientos categorizados por la aplicación del valor CO <sub>wt</sub> relevante.
OXA	17	1.60	43	
SXT	39	1.05	43	
OTC	28	1.73	43	
FFC	34	1.94	43	

### 6.3 Identificación de genes de resistencia

No se detectaron los genes *sul1*, *sul3*, *floR*, *tetA*, *tetC*, *blaTEM* ni *dfrA1* en ninguno de los aislados. Adicionalmente, en el caso del gen *gyrA* de algunos aislados, el secuenciamiento de los amplificados por PCR (Figura 5) no permitió detectar cambios en la proteína *gyrA* en las posiciones 83 (Ser83-Arg o Ile) y 87 (Asn87- Tyr) (Shah *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013) asociadas al fenotipo de resistencia, entre las secuencias del gen *gyrA* de nuestros aislados ni de la cepa referencial de *Y. ruckeri* (SC09).



**Figura 5.** Identificación molecular por PCR del gen *gyrA* en aislados de *Y. ruckeri*. Carril 1-5, 7-9: aislados (M1-M8). Carril 10: control positivo (CP). Carril 6: Marcador de peso molecular (MPM) 1k pb.

Yersinia ruckeri strain SC09 chromosome, complete genome  
Sequence ID: [CP025800.1](#) Length: 3799871 Number of Matches: 1

Range 1: 2578618 to 2581287 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
4926 bits(2667)	0.0	2669/2670(99%)	0/2670(0%)	Plus/Plus
Query 1		ATGAGCGACCTTGCCAGAGAAATAACACCGGTCAACATCGAAGAAGAGTTGAAAACTCC		60
Sbjct 2578618		ATGAGCGACCTTGCCAGAGAAATAACACCGGTCAACATCGAAGAAGAGTTGAAAACTCC		2578677
Query 61		TATTTGGATTATGCGATGTCCTGTCATTGTGGGACGTGCGCTGCCAGATGTTGAGATGGA		120
Sbjct 2578678		TATTTGGATTATGCGATGTCCTGTCATTGTGGGACGTGCGCTGCCAGATGTTGAGATGGA		2578737
Query 121		TTGAAGCCGGTACACCGTGCCTGTTGTTTGGCATGAACGTAAGGTAATGACTGGAAT		180
Sbjct 2578738		TTGAAGCCGGTACACCGTGCCTGTTGTTTGGCATGAACGTAAGGTAATGACTGGAAT		2578797
Query 181		AAACCATACAAAAATCGGCCGTGAGTTGGGGACGTTATCGGTAATATCACCCGCAT		240
Sbjct 2578798		AAACCATACAAAAATCGGCCGTGAGTTGGGGACGTTATCGGTAATATCACCCGCAT		2578857
Query 241		GGTGACAGAGCGGTCTACGACACAATCGTGCATGGCTCAGCCGTTCTCACTGCGCTAT		300
Sbjct 2578858		GGTGACAGAGCGGTCTACGACACAATCGTGCATGGCTCAGCCGTTCTCACTGCGCTAT		2578917
Query 301		ATGCTGGTGGATGGGCAAGGCAACTTCGGTTCGGTTGATGGCGATTCTGCCGACGCGATG		360
Sbjct 2578918		ATGCTGGTGGATGGGCAAGGCAACTTCGGTTCGGTTGATGGCGATTCTGCCGACGCGATG		2578977
Query 361		CGTTATACCGAAGTGCATGTCAAAAAATGCTCACGAACGCTGGCGGATCTGGAAAAAG		420
Sbjct 2578978		CGTTATACCGAAGTGCATGTCAAAAAATGCTCACGAACGCTGGCGGATCTGGAAAAAG		2579037
Query 421		GATACCGTGGATTTGTTGCCGAACACGACGGCACCAGCAAAATCCCGCCGTTATGCCA		480
Sbjct 2579038		GATACCGTGGATTTGTTGCCGAACACGACGGCACCAGCAAAATCCCGCCGTTATGCCA		2579097
Query 481		ACCCGCATCCCGAACCTGCTGGTTAACGGCTCGTCAGGTATTGCCGTGGGTATGGCAACC		540
Sbjct 2579098		ACCCGCATCCCGAACCTGCTGGTTAACGGCTCGTCAGGTATTGCCGTGGGTATGGCAACC		2579157
Query 541		AACATTCGCGCACATAATCTTTCTGAGGTTATCGACGGCTGTCTGGCATATATCGAAGAT		600
Sbjct 2579158		AACATTCGCGCACATAATCTTTCTGAGGTTATCGACGGCTGTCTGGCATATATCGAAGAT		2579217
Query 601		GAAGACATCACCATTTGAAGGGTTGATGGAACACATCCCGGGCCGGACTTCCCTACAGGC		660
Sbjct 2579218		GAAGACATCACCATTTGAAGGGTTGATGGAACACATCCCGGGCCGGACTTCCCTACAGGC		2579277

**Figura 6.** Blast de la secuencia del gen *gyrA* de nuestros aislados de *Y. ruckeri* frente al gen *gyrA* de la cepa referencial de *Y. ruckeri* SC09.

## VII. DISCUSIÓN

*Yersinia ruckeri* es un patógeno de gran importancia en la acuicultura del Perú. La detección de este patógeno en los animales con sintomatología compatible con yersiniosis sugiere que esta bacteria es la responsable de estos cuadros, lo cual demostraría la persistencia de *Y. ruckeri* en departamentos donde anteriormente se ha reportado, así como la diseminación de este agente patógeno, ya que logramos aislarla de provincias que no habían sido muestreadas previamente, pero pertenecientes a estos mismos departamentos. Como consecuencia de esto, se han producido grandes pérdidas económicas en las piscigranjas de truchas arcoíris debido a altas mortalidades y morbilidades causadas por los brotes constantes de yersiniosis. Es de resaltar que algunos criadores indicaron que compran ovas importadas de truchas arcoíris, mientras otros realizan la compra y transporte de alevines de esta especie de otras piscigranjas, sin tener claro como estos factores, u otros no citados aquí, influyen en la aparición de casos clínicos producidos por *Y. ruckeri* en diferentes centros productivos de nuestro país (comunicación personal).

Nuestros resultados sobre la resistencia antimicrobiana de *Y. ruckeri* son inesperados, ya que las drogas evaluadas son ampliamente usadas para controlar la yersiniosis en el campo; inclusive antibióticos no aprobados por la autoridad competente se usan de forma irresponsable, tal como manifestaron los piscicultores. Esta sensibilidad de *Y. ruckeri* hacia los antibióticos testados podría estar asociado a un mal tratamiento y control de yersiniosis por parte de los criadores, al no estar debidamente capacitados en la correcta aplicación de estas drogas.

Con la incubación de los antibiogramas a 28°C por 24 horas, en este estudio, obtuvimos diámetros de zona de inhibición uniformes, tal como se demostró en otros estudios (Smith y Kronvall; 2014; Smith *et al.*, 2018), permitiendo obtener datos más precisos para el análisis NRI de *Y. ruckeri*, y este pueda ser comparado tanto a nivel intra-laboratorio como inter-laboratorio.

El método NRI, en pruebas de difusión en disco, determina puntos de corte epidemiológicos válidos ( $CO_{wt}$ ) que pueden ser aplicados y determinados por cualquier laboratorio, y a su vez estos valores obtenidos puedan compararse a nivel inter-laboratorial; clasificando a los aislados analizados como completamente susceptibles o de tipo salvaje (WT), o como de susceptibilidad reducida o de tipo no salvaje (NWT) (Smith, 2008; Kronvall *et al.*, 2011). Los  $CO_{wt}$  obtenidos serán válidos, si los datos analizados cumplen con dos requisitos basados en su cantidad y calidad (Smith *et al.*, 2012). Se ha reportado que para generar un  $CO_{wt}$  preciso, basado en su cantidad, se debe obtener entre 20 a 40 cepas WT; si en caso se obtuvieran de 15 a 19 cepas WT, el  $CO_{wt}$  generado debe tratarse con precaución; y si fueran menos de 15 cepas WT, el  $CO_{wt}$  debe rechazarse (Smith *et al.*, 2012). En nuestro estudio, los  $CO_{wt}$  determinados por NRI permitió obtener 43 aislados WT para los 5 conjuntos de datos analizados, superando el mínimo requerido para la validación de los  $CO_{wt}$ . Adicionalmente, la calidad de los datos estudiados es otro requisito que se debe cumplir, esta característica está sustentada en la media de las desviaciones estándar de los conjunto de datos hallados por NRI, la cual debe ser menor a 4.15 mm; y si en caso sea igual o mayor los  $CO_{wt}$  no deben ser aceptados por ser excesivamente imprecisos (Smith *et al.*, 2018). Los desvíos estándar de los 5 conjuntos de datos

analizados estuvieron normalmente distribuidos y su media fue de  $1.73 \pm 0.46$  mm. De esta manera, los  $CO_{wt}$  determinados por análisis NRI en la presente investigación son válidos al cumplir con ambos requisitos.

El método NRI se ha aplicado en pruebas de difusión en disco, incubadas a la misma temperatura y tiempo usados en este estudio, en bacterias patógenas acuáticas de interés como *V. anguillarum* (Smith y Christofilogiannis, 2007), *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. (Uhland, 2010; Smith *et al.*, 2012), *V. harveyi* y *E. tarda* (Lim *et al.*, 2016), *P. damsela* (Kwon *et al.*, 2016) y *E. piscicida* (Kim *et al.*, 2018), permitiendo también establecer  $CO_{wt}$  válidos para estos agentes infecciosos, de manera que los  $CO_{wt}$  obtenidos en la presente investigación podrán servir como referencia para estudios posteriores de sensibilidad fenotípica en *Y. ruckeri*.

El NRI aplicado en este trabajo permitió clasificar a todos nuestros aislados como completamente susceptibles, pudiendo ser estos resultados similares a los obtenidos en Dinamarca (Schimdt *et al.*, 2000), Francia (Michel *et al.*, 2003), España (Bastardo *et al.*, 2011), así como en el Perú (Sierralta *et al.*, 2013), donde todos los aislados de *Y. ruckeri* que se analizaron fenotípicamente fueron sensibles a diferentes antibióticos estudiados, entre ellos ácido oxolínico, oxitetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim y florfenicol. Estos autores discuten que la sensibilidad reportada en *Y. ruckeri* podría estar asociada a que la propia resistencia antimicrobiana de esta especie patógena evoluciona con menos frecuencia que en otros patógeno acuícolas, que esta resistencia transferible y seleccionada sea menos significativa frente a los antibióticos estudiados, y también a que el uso de antimicrobianos para el tratamiento de la yersiniosis esté

restringido sólo cuando se producen brotes en las piscigranjas y no se esté aplicando constantemente, tal como ha venido sucediendo en los sitios muestreados. A diferencia de los resultados determinados en este trabajo, diversos análisis realizados en diferentes países como Canadá (De Grandis y Stevenson, 1985), España (Rodgers, 2001; Gibello, 2003), Francia (Calvez, 2014), Turquía (Balta, 2010; Onuk *et al.*, 2011, Altun *et al.*, 2013; Capkin *et al.*, 2015; Ture y Alp, 2016; Duman *et al.*, 2017; Capkin *et al.*, 2017), y también en nuestro país (Sandoval *et al.*, 2016), han encontrado diferentes grados de resistencia antimicrobiana en *Y. ruckeri*, tanto al análisis MIC como de difusión en disco. Sin embargo, tanto estos estudios como los mencionados previamente no describen o dejan en claro la metodología ni los criterios aplicados para determinar la resistencia y sensibilidad de los aislados. Dado que sólo existen actualmente puntos de cortes (Breakpoints) y valores de corte epidemiológicos (ECV) para *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* proporcionados por el CLSI (CLSI; 2014), aún ni esta entidad ni el EUCAST han determinado puntos de cortes o ECV's para alguna otra bacteria patógena del sector acuícola. Por ello, sería incorrecto clasificar a los aislados de *Y. ruckeri* como sensible, intermedio o resistente (Silley, 2012).

El uso incorrecto de los antibióticos puede conducir a la aparición de cepas resistentes, que no son inhibidas por el fármaco de elección (Rodgers, 2001). Aunque, cuando un aislado clínico se clasifica como WT frente a un antibiótico, las pruebas de sensibilidad no revelan razón alguna por la que no se deba iniciar la terapia con esta droga. En cambio, si un aislado clínico se clasifica como NWT, este manifiesta una susceptibilidad reducida y su reducción puede ser suficiente

para comprometer la terapia, ya que las pruebas de susceptibilidad sugieren que el inicio del tratamiento con este agente puede ser imprudente (Smith, 2008). Dado esto, no habría problema alguno en iniciar la antibioterapia en las piscigranjas de donde se obtuvieron nuestros 43 aislados WT de *Y. ruckeri* con alguno de los 5 antibióticos analizados en esta investigación.

La no detección de los genes de resistencia *floR*, *tetA*, *tetC*, *blaTEM*, *sul1*, *sul3* ni *dfrA1*, así como no hallar mutaciones asociadas a la resistencia al ácido oxolínico en el gen *gyrA* de nuestros 43 aislados de *Y. ruckeri*; justifican la clasificación fenotípica de completamente susceptibles (WT) en los 43 aislados de *Y. ruckeri* analizados, puesto que los aislados WT son definidos como microorganismos con ausencia de mecanismos de resistencia adquiridos y mutacionales frente al fármaco en estudio (Silley, 2012). Por otro lado, nuestros resultados difieren de otros estudios donde se ha determinado la presencia de genes de resistencia y mutaciones puntuales, así como la presencia de plásmidos, integrones y casetes, que brindan resistencia frente a oxitetraciclina, sulfametoxazol, trimetoprim, ácido oxolínico y amoxicilina, entre otros antibióticos (De Grandis y Stevenson, 1983; Gibello *et al.*, 2003; Balta *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017; Capkin *et al.*, 2017). Es de destacar que en estos trabajos, ocurrieron 3 hechos importantes; primero, se detectaron genes de resistencia o plásmidos con integrones o casetes con genes de resistencia en algunos aislados de *Y. ruckeri*, los cuales no se expresaron en el análisis fenotípico de resistencia y permitieron clasificar a los aislados como “sensibles” frente a uno o más antibióticos; segundo, en algunos aislados que fueron clasificados como “resistentes” a un



antibiótico no se hallaron genes de resistencia considerados en el estudio, demostrando así la presencia de otros genes que brindan “resistencia” al fármaco examinado; tercero, el secuenciamiento de plásmidos permitió descubrir la presencia de genes de resistencia que no habían sido tomados en cuenta para el estudio fenotípico de resistencia. Por lo tanto, no descartamos que nuestros aislados de *Y. ruckeri* puedan albergar otros genes de resistencia específicos para los antibióticos aquí analizados, y por consiguiente, estos genes no se estén expresando en el estudio fenotípico de difusión en disco. Asimismo, estos 43 aislados de *Y. ruckeri* podrían albergar otros genes de resistencia para otros fármacos no considerados en el presente estudio, los cuales podrían o no estar siendo expresados fenotípicamente como en los estudios citados previamente. En ese sentido, creemos que es muy importante continuar con trabajos genotípicos de este tipo aplicados a *Y. ruckeri* y otras bacterias de interés acuícola en nuestro medio; analizando, además, otros genes y determinantes de resistencia antibiótica no estudiados en el presente estudio, a causa del incremento de reportes de resistencia molecular en *Y. ruckeri* durante las dos últimas décadas.

Adicionalmente, en un estudio de tipificación molecular, realizado en paralelo durante la ejecución de esta tesis y con los mismos aislados, mediante la técnica de RAPD-PCR, se determinó la existencia de apenas un solo genotipo (clonalidad) (Mesías *et al.*, 2019 [en prensa]). Estos resultados sugieren que este genotipo es el responsable de todos los brotes de yersiniosis en las diversas piscigranjas muestreadas, confirmándose la naturaleza endémica de esta enfermedad en los lugares muestreados, asociando la relación genética de estos 43

aislados de *Y. ruckeri* con los perfiles genotípicos y fenotípicos de resistencia antimicrobiana determinados en este trabajo.

Finalmente, la presente investigación es la primera en analizar y determinar la resistencia antimicrobiana fenotípica de *Y. ruckeri*, empleando el método NRI, y genotípica, en aislados de truchas arcoíris de cultivo del Perú. Este estudio también representa el primer intento de aplicar esta metodología a esta bacteria acuícola para establecer el CO<sub>wt</sub> a nivel mundial. Por ello, para tener en cuenta el grado de variación registrada en los IZD de otros laboratorios y luego se establezcan valores de cortes epidemiológicos de validez internacional, tanto por el CLSI como por el EUCAST, se requerirán datos de sensibilidad de al menos tres laboratorios para llegar a un consenso (Smith *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2016). En consecuencia, los CO<sub>wt</sub> de cinco antibióticos, así como la metodología y análisis desarrollados en este trabajo, representan un paso importante para el establecimiento a futuro de tales valores en *Y. ruckeri*.

## VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La presencia de *Y. ruckeri*, confirmada mediante técnicas bioquímicas y moleculares en regiones de la sierra central del Perú, sugiere su participación en los cuadros clínicos.
- Todos los aislados se mostraron sensibles a las drogas evaluadas, indicando que el control de los brotes de esta enfermedad puede ser realizada por cualquiera de ellas.
- Ninguno de los aislados fue positivo para los genes de resistencia antimicrobiana estudiados, por lo que no se les puede considerar como reservorio para otras bacterias
- No se detectaron mutaciones en el gen *gyrA* asociadas a la resistencia contra ácido oxolínico.
- Los valores obtenidos por NRI permitirán determinar patrones de resistencia a los antibióticos en futuros aislamientos de *Y. ruckeri*, tanto a nivel local, regional o nacional.
- Se recomienda efectuar un uso cuidadoso de los medicamentos, optimizar la administración y aplicación de los tratamientos, y usar cíclicamente los dos quimioterapéuticos autorizados (oxitetraciclina y florfenicol) para evitar futuros problemas de resistencia antimicrobiana en el sector acuícola.
- Se sugiere realizar estudios adicionales de resistencia antimicrobiana a nivel fenotípico y genotípico, frente a estas y otras drogas, tanto en *Y. ruckeri* como en otros agentes infecciosos de truchas arcoíris de cultivo, así como también en patógenos de otras especies acuícolas de importancia comercial para el país

para determinar el estatus sanitario del sector acuícola y tomar mejores medidas de prevención y control de enfermedades.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alderman D, Hastings T. 1998.** Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *Int J Food Sci. Technol.* 33: 139-155.
2. **Altinok I, Grizzle JM, Liu Z. 2001.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Dis Aquat Organ* 44: 29-34.
3. **Altun S, Onuk EE, Ciftci A, Duman M, Buyukekiz AG. 2013.** Determination of phenotypic, serotypic and genetic diversity and antibiotyping of *Yersinia ruckeri* isolated from rainbow trout. *Kafkas. Univ Vet Fak Derg* 19: 225-232.
4. **Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, Klesius PH. 2007.** First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. *J Aquat Anim Health* 19: 35-40.
5. **Arlet G, Philippon A. 1991.** Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV, CARB). *FEMS Microbiology Letters* 82: 19-26.
6. **Austin DA, Robertson PA, Austin B. 2003.** Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst Appl Microbiol* 26: 127-131.
7. **Austin B, Austin DA. 2016.** 6<sup>th</sup> ed. *Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish.* Suiza: Springer International. 761 p.
8. **Avci H, Birincioglu SS. 2005.** Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29: 1321-1328.
9. **Avendaño-Herrera R, Molina A, Magariños B, Toranzo AE, Smith P. 2011.** Estimation of epidemiological cutoff values for disk diffusion susceptibility test data for *Streptococcus phocae*. *Aquaculture* 314 (1-4): 44–48.
10. **Balcázar JL, Vendrell D, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Muzquiz JL, Girones O. 2008.** Characterization of probiotic properties of lactic acid

bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278: 188-191.

11. **Balta F, Sandalli C, Kayis S, Ozgumus OB. 2010.** Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 30(6) 2010: 211-219.
12. **Barnes AC. 2011.** Enteric red mouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: P. Woo y D. Bruno. (eds). *Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections* (pp. 484-511). UK: CABI. p 484-511.
13. **Bastardo A, Sierralta V, León J, Ravelo C, Romalde JL. 2011.** Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture* 317: 229-232.
14. **Bengtsson S, Naseer U, Sundsfjord A, Kahlmeter G, Sundqvist M. 2012.** Sequence types and plasmid carriage of uropathogenic *Escherichia coli* devoid of phenotypically detectable resistance. *J Antimicrob Chemother* 67 (1): 69–73.
15. **Bravo S, Kojagura V. 2004.** First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bull Eur Ass Fish Pathol.* 24 (2): 104-108.
16. **Brunt J, Newaj-Fyzul A, Austin B. 2007.** The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 30:573-579.
17. **Buchmann K, Nielsen ME, Nielsen CV. 2003.** Immune responses against *Yersinia ruckeri* have no effect on colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by *Gyrodactylus derjavini* (Mikhailov, 1975). *J Fish Dis* 26: 183-186.
18. **Bueno C. 2012.** Caracterización Fenotípica y Molecular de Cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas de *Oncorhynchus mykiss*, del Centro Piscícola “El Ingenio” – Huancayo (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

19. **Bush K. 2013.** Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277: 84-90.
20. **Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet DG, Daniel P. 2014.** *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: presence and antibiotic susceptibility. *Dis Aquat Org* 109 (2): 117-126.
21. **Canadian Council on Animal Care (CCAC). 2010.** CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. 1<sup>st</sup> ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 36 p.
22. **Capkin E, Altinok I. 2009.** Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *J Appl Microbiol* 106: 1147-1153.
23. **Capkin E, Terzi E, Altinok I. 2015.** Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment. *Diseases of aquatic organisms* 114 (2): 127-137.
24. **Capkin E, Ozdemir S, Ozturk RC, Altinok I. 2017.** Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout. *Aquaculture Research* 48 (11): 5561–5575.
25. **Castro G, Ramos F, Uribe J, Manchego A, Sandoval N. 2017.** Aislamiento de *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de una piscigranja de la ciudad Chachapoyas, Amazonas. En: CISIPA 2017. Lima: SANIPES-PRODUCE.
26. **Cerro L, Manchego A, Ñuñure J, Pihue J, Sandoval N. 2017.** Estudio de sensibilidad antibiótica de diferentes cepas de *Yersinia ruckeri* procedentes de diferentes regiones del país. En: CISIPA 2017. Lima: SANIPES-PRODUCE.
27. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006.** Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI document VET03-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

28. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET03/VET04-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
29. **Costa AA, Leef MJ, Bridle AR, Carson J, Nowak BF. 2011.** Effect of vaccination against yersiniosis on the relative percent survival, bactericidal and lysozyme response of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 315: 201-206.
30. **Coyne R, Bergh Ø, Samuelsen O, Andersen K, Lunestad BT, Nilsen H, Dalsgaard I, Smith P. 2004.** Attempt to validate breakpoint MIC values estimated from pharmacokinetic data obtained during oxolinic acid therapy of winter ulcer disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 238:51-66
31. **Davies RL. 1991.** Virulence and serum-resistance in different clonal groups and serotypes of *Yersinia ruckeri*. *Vet Microbiol* 29: 289-297.
32. **Daza RM. 1998.** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998 (22): 57-67.
33. **De Grandis SA, Stevenson RM. 1985.** Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27 (6): 938-942.
34. **Del Cerro A, Marquez I, Guijarro JA. 2002.** Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 68: 5177-5180.
35. **Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W, Bossier P. 2007.** Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol* 25: 472-479.
36. **Deshmukh S, Raida MK, Dalsgaard I, Chettri JK, Kania PW, Buchmann K. 2012.** Comparative protection of two different commercial



- vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol* 145: 379-385.
37. **Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu IB, Buyukekiz AG, Sahinturk P. 2017.** Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Dis Aquat Org* 125: 31-44.
  38. **FAO. 2018.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma. 2-6 p.
  39. **Figueiredo HCP, Costa FAA, Leal CAG, Carvalho-Castro GA, Leite RC. 2012.** *Weissella* sp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil. *Veterinary Microbiology* 156 (3-4): 359–366.
  40. **Flores K. 2013.** Determinación de la diversidad fenotípica de *Yersinia ruckeri* en aislados de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de las regiones de Junín, Ancash y Huancavelica (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
  41. **Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 1999.** Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 346-350.
  42. **Gibello A, Porrero M, Blanco M, Vela A, Liebana P, Moreno MA, Fernández- Garayzábal J, Domínguez L. 2004.** Analysis of the *gyrA* Gene of Clinical *Yersinia ruckeri* Isolates with Reduced Susceptibility to Quinolones. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1): 599-602.
  43. **Giske CG, Boren C, Wretling B, Kronvall G. 2005.** Meropenem susceptibility breakpoint for *Pseudomonas aeruginosa* strains hyperproducing *mexB* mRNA. *ClinMicrobiol Infect* 11(8): 662–669.
  44. **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 collection of bacteria. *Clin Microbiol Infect* 13: 1112-1118.

45. **Huang Y, Michael G, Becker R, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S, Runge M, Steinhagen D. 2013.** Pheno- and genotypic analysis of antimicrobial resistance properties of *Yersinia ruckeri* from fish. *Vet Microbiol* 171 (3-4): 406-412.
46. **Huang Y, Zhang L, Tiu L, Wang HH. 2016.** Characterization of antibiotic resistance in commensal bacteria from an aquaculture ecosystem. *Front Microbiol* 6: 9-14.
47. **Irianto A, Austin B. 2002.** Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis* 25: 633-642.
48. **Ispir U, Dorucu M. 2010.** Effect of immersion booster vaccination with *Yersinia ruckeri* extracellular products (ECP) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Int Aquat Res* 2: 127-130.
49. **Jacoby GA. 2009.** AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 22(1): 161-182.
50. **Joneberg J, Rylander M, Galas MF, Carlos C, Kronvall G. 2003.** Analysis of parameters and validation of method for normalized interpretation of antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents* 21 (6): 525–535.
51. **Kim DH, Austin B. 2006.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 21: 513-524.
52. **Kim A, Lim Y, Kim N, Nguyen TL, Roh HJ, Park CI, et al. 2018.** A Comparison of Genotypic and Phenotypic Methods for Analyzing the Susceptibility to Sulfamethoxazole and Trimethoprim in *Edwardsiella piscicida*. *Microbial Drug Resistance* 24(8):1226-1235.
53. **Kronvall G. 2003.** Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *Int J Antimicrob Agents* 22 (1): 7–13.
54. **Kronvall G, Kahlmeter G, Myhre E, Galas MF. 2003.** A new method for normalized interpretation of antimicrobial resistance from disk test results for comparative purposes. *Clin Microbiol Infect* 9 (3): 120–132.

55. **Kronvall G. 2010.** Antimicrobial resistance 1979–2009 at Karolinska hospital, Sweden: normalized resistance interpretation during a 30-year follow-up on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistance development. *APMIS* 118 (9): 621–639.
56. **Kronvall G, Giske CG, Kahlmeter G. 2011.** Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (4): 281–290.
57. **Kronvall G, Smith P. 2016.** Normalized resistance interpretation, the NRI method Review of NRI disc test applications and guide to calculations. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology* 124 (12): 1023-1030.
58. **Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary Research*. 46 (1): 103.
59. **Kwon MG, Lim YJ, Kim MS, Seo JS, Kim DH. 2016.** Epidemiological Cut-off Values Generated for Disc Diffusion Data from *Photobacterium damsela*. *Korean J Fish Aquat Sci* 49(6): 838-844.
60. **Lim YJ, Kim DH, Roh HJ, Park MA, Park CI, Smith P. 2016.** Epidemiological cut-off values for disc diffusion data generated by standard test protocols from *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi*. *Aquacult Int* 2016 (24): 1153–1161.
61. **López J. 2012.** Identificación de biotipos de *Yersinia ruckeri* aisladas en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa juvenil procedentes de dos piscigranjas de la región Junín. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
62. **Mahjorr AA, Akhlaghi M. 2012.** A pathological study of rainbow trout organs naturally infected with enteric redmouth disease. *Asian Journal of Animal Sciences* 6: 147-153.
63. **Mammeri H, Poirel L, Nazik H, Nordmann P. 2006.** Cloning and functional characterization of the Ambler class C beta-lactamase of *Yersinia ruckeri*. *FEMS Microbiol Lett* 257 (1): 57-62.

64. **Manage P. 2018.** Heavy use of antibiotics in aquaculture: Emerging human and animal health problems – A review. Sri Lanka J. Aquat. Sci. 23 (1): 13-27.
65. **Mateo E, Castro T, Sierralta V, Mateo DR. 2016.** Bacteriological and histopathological study of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Peru. Journal of Fish Diseases 40: 941-946.
66. **McMurry LM, Petrucci RE, Levy SB. 1980.** Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 77: 3974-3977.
67. **Meyers TR. 2009.** Standard Necropsy Procedures for Finfish. In: Heil N, ed. NWFHS Laboratory Procedures Manual. 5<sup>th</sup> ed. Washington: US Fish and Wildlife Service. p 64-74.
68. **Mesías F, Serrano-Martínez E, Llanco L. 2019.** Genotipificación por RAPD-PCR de aislados de *Yersinia ruckeri* procedentes de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de la sierra del Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (En prensa).
69. **Michel C, Kerouault B, Martin C. 2003.** Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. J Appl Microbiol 95 (5): 1008-1015.
70. **Miller RA, Harbottle H. 2017.** Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. Microbiol Spectrum 6(1): ARBA-0017-2017.
71. **Miranda CD, Smith P, Rojas R, Contreras-Lynch S, Vega JMA. 2016.** Antimicrobial Susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* from Chilean Salmon Farms and Their Epidemiological Cut-Off Values Using Agar Dilution and Disk Diffusion Methods. Front. Microbiol. 7: 1880.
72. **Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. 2011.** Mecanismos moleculares de Resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública 28 (4): 648-656.
73. **Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. 2001.** Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol Cell Probes 15: 209-215.

74. **Ngo TPH, Smith P, Bartie KL, Kim TD, Verner-Jeffreys DW, Hoare R, Adams A. 2017.** Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom. *J Fish Dis.* 41 (2): 309-320.
75. **Noga E, Levine J, Townsend K, Bullis R, Carlson C, Corbett W. 1988.** Kidney biopsy: a nonlethal method for diagnosing *Yersinia ruckeri* infection (enteric red mouth disease) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Am J Vet Res* 49: 363-365.
76. **Onuk EE, Ciftci A, Findik A, Ciftci G, Altun S, Balta F, Ozer S, Coban AY. 2011.** Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* isolates from Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) in Turkey. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124 (7-8): 320-328.
77. Ortega C, De Blas I. 1998. Selección de muestras para el estudio de poblaciones animales en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 3.
78. **Paterson DL, Bonomo RA. 2005.** Extended spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 18(4): 657–686.
79. **Petersen A, Andersen JS, Kaewmak T, Somsiri T, Dalsgaard A. 2002.** Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Appl Environ Microbiol* 68 (12): 6036–6042.
80. **PRODUCE. 2018.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. Lima. 144-154.
81. **PROMPERU. 2019.** Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero y acuícola 2018. Lima. 10-12.
82. **Raida M, Larsen J, Nielsen M, Buchmann K. 2003.** Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis* 26: 495-498.
83. **Raida M, Buchmann K. 2008.** Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: effects of temperature on protection and gene expression. *Vaccine* 26: 1050-1062.
84. **Roberts R. 2012.** *Fish Pathology*. 4th ed. UK: Blackwell Publishing Ltd. 591 p.

85. **Robertson PAW, O'Dowd C, Burrells C, Williams P, Austin B. 2000.** Use of *Carnobacterium sp.* as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 185: 235-243.
86. **Rodgers C. 2001.** Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. *Aquaculture*. 196: 325-345.
87. **Romalde JL, Toranzo AE. 1993.** Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 112: 291-300.
88. **Ross A, Rucker R, Ewing W. 1966.** Description of a bacterium associated with red mouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Microbiol* 12: 763-770.
89. **Sandoval N, Llanco L, Manchego A, Mesías F. 2016.** Determinación de *Yersinia ruckeri* y susceptibilidad antimicrobiana en alevines de truchas arcoíris cultivadas en el lago Titicaca- Puno. LACQUA - SARA 2016. Lima: World Aquaculture Society.
90. **SANIPES. 2016a.** Protocolo técnico de registro sanitario de producto veterinario de uso en acuicultura-oxitetraciclina. Lima.
91. **SANIPES. 2016b.** Protocolo técnico de registro sanitario de producto veterinario de uso en acuicultura-florfenicol. Lima.
92. **Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Pedersen K, Larsen JL. 2000.** Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol* 66 (11): 4908-4915.
93. **Shah S, Karatas S, Nilsen H, Steinum T, Colquhoun D, Sørsum H. 2012.** Characterization and expression of the *gyrA* gene from quinolone resistant *Yersinia ruckeri* strains isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in Norway. *Aquaculture* 350: 37-41.
94. **Shah S, Cabello F, Lund T, Tomova A, Godfrey H, Buschmann A, Sørsum H. 2014.** Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology* 16 (5): 1310-1320.

95. **Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA. 2012.** Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101: 869-879.
96. **Sierralta V, León J, De Blas I, Bastardo A, Romalde J, Castro T, Mateo E. 2013.** Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. *AquaTIC* 38: 28-45.
97. **Silley P. 2012.** Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean?. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 31 (1): 33-41.
98. **Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011.** Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. *Rev Peru Biol* 18 (3): 349 – 353.
99. **Sjölund M, Bengtsson S, Bonnedahl J, Hernandez J, Olsen B, Kahlmeter G. 2009.** Antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* of human and avian origin—a comparison of wild-type distributions. *Clin Microbiol Infect* 15 (5): 461–465.
100. **Smith P, Christoflogiannis P. 2007.** Application of Normalised Resistance Interpretation to the detection of multiple low-level resistance in strains of *Vibrio anguillarum* obtained from Greek fish farms. *Aquaculture* 272 (1–4): 223-230.
101. **Smith P, Ruane NM, Douglas I, Carroll C, Kronvall G, Fleming GTA. 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 (1–4): 168-179.
102. **Smith P. 2008.** Antimicrobial resistance in aquaculture. In: Bernoth EM, editor. *Changing Trends in Managing Aquatic Animal Disease Emergencies*. Vol 27. París: OIE. p 243–264.

103. **Smith P, Schwarz T, Verner-Jeffreys DW. 2012.** Use of normalised resistance analyses to set interpretive criteria for antibiotic disc diffusion data produce by *Aeromonas* spp. *Aquaculture* 326–329: 27-35.
104. **Smith P, Kronvall G. 2014.** Effect of incubation temperature and time on the precision of data generated by antibiotic disc diffusion assays. *J Fish Dis* 38 (7): 629-636.
105. **Smith P, Endris R, Kronvall G, Thomas V, Verner-Jeffreys D, Wilhelm C, Dalsgaard I. 2014.** Epidemiological cut-off values for *Flavobacterium psychrophilum* MIC data generated by a standard test protocol. *J Fish Dis* 39 (2): 143-154.
106. **Smith P, Finnegan W, Ngo T, Kronvall G. 2018.** Influence of incubation temperature and time on the precision of MIC and disc diffusion antimicrobial susceptibility test data. *Aquaculture* 490: 19-24.
107. **Soltani M, Shafiei S, Yosefi P, Mosavi S, Mokhtari A. 2014.** Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 37: 60-65.
108. **Sundqvist M, Geli P, Andersson DI, Sjölund-Karlsson M, Runehagen A, Cars H, et al. 2010.** Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. *J Antimicrob Chemother* 65 (2): 350–360.
109. **Temprano A, Riano J, Yugueros J, Gonzalez P, de Castro L, Villena A, Luengo JM, Naharro G. 2005.** Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *J Fish Dis* 28: 419-427.
110. **Thomas CM, Nielsen KM. 2005.** Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3(9): 711–721.
111. **Tinsley J. 2010.** Studies on the pathogenicity of *Yersinia ruckeri* biotype 2 to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) (Tesis de doctorado). Heriot-Watt University, Edinburgo, UK.



112. **Tinsley J, Lyndon A, Austin B. 2011.** Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J App Microbiology 111: 8-16.
113. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007.** *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis 30: 257-268.
114. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesesbrouck F, Chiers K. 2009.** Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ 84: 219-28.
115. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010a.** In vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis 33: 197-209.
116. **Tobback E, Hermans K, Decostere A, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010b.** Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ 90: 175-179.
117. **Ture M, Alp H. 2016.** Identification of bacterial pathogens and determination of their antibacterial resistance profiles in some cultured fish in Turkey. J Vet Res 2016 (60): 141-146.
118. **Uhland CR. 2011.** Characterization of antimicrobial resistance in *Aeromonas* and *Vibrio* isolated in Canada from fish and seafood. Msc Thesis. Montréal: Université de Montréal.143 p.
119. **Van TTH, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. 2008.** Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. Int J Food Microbiol 124: 217-223.
120. **Van Vliet D, Loch TP, Smith P, Faisal M. 2017.** Antimicrobial Susceptibilities of *Flavobacterium psychrophilum* Isolates from the Great Lakes Basin, Michigan. Microbial drug resistance 23(6):791-798.
121. **Wang N, Yang X, Jiao S, Zhang J, Ye B, Gao S. 2014.** Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soils fertilized with manures from Jiangsu Province, Southeastern China. PLOS ONE 9: e112626.

122. **Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, Rahalison L, LeClerc J.E, Hinshaw JM, Lindler LE, Cebula TA, Carniel E, Ravel J. 2007.** Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One* 2 (3): e309.
123. **Williams R, Stedtled R, Guo X, Hashsham A. 2016.** Water Environment Research 2016. Water Environment Federation. Literature Review 17: 1951-1967.

## ANEXOS

### Anexo 1. Número de peces muestreados según su procedencia

N° de peces	Piscigranja	Provincia	Departamento
30	A	Jauja	Junín
30	B	Concepción	Junín
30	C	Huancayo	Junín
30	D	Huaura	Lima
30	E	Canta	Lima
30	F	Huaraz	Áncash
30	G		
30	H	Puno	Puno

**Anexo 2.** Fotos de truchas arcoíris con lesiones externas e internas de yersiniosis



**A.** Trucha arcoíris con hemorragia en la boca.



**B.** Trucha arcoíris con melanosis e hipema (flecha roja) en ojo izquierdo.



**C.** Trucha arcoíris con moderada exoftalmia, esplenomegalia y hemorragias petequiales en intestino.



**D.** Trucha arcoíris con palidez hepática, congestión intestinal y esplenomegalia.

**Anexo 3. *Y. ruckeri* aisladas según su procedencia y órgano de aislamiento.**

<b>Aislado</b>	<b>Departamento</b>	<b>Provincia</b>	<b>Órgano</b>
1	Junín	Jauja	Bazo
2	Junín	Jauja	Bazo
3	Junín	Jauja	Riñón anterior
4	Junín	Jauja	Bazo
5	Junín	Jauja	Riñón anterior
6	Junín	Jauja	Riñón anterior
7	Junín	Jauja	Riñón anterior
8	Junín	Jauja	Riñón anterior
9	Áncash	Huaraz	Bazo
10	Áncash	Huaraz	Riñón anterior
11	Áncash	Huaraz	Bazo
12	Áncash	Huaraz	Riñón anterior
13	Áncash	Huaraz	Bazo
14	Junín	Concepción	Riñón anterior
15	Junín	Concepción	Riñón anterior
16	Junín	Concepción	Riñón anterior
17	Junín	Concepción	Riñón anterior
18	Junín	Huancayo	Riñón anterior
19	Junín	Huancayo	Bazo
20	Junín	Huancayo	Riñón anterior
21	Junín	Huancayo	Riñón anterior
22	Junín	Huancayo	Bazo
23	Junín	Huancayo	Bazo
24	Junín	Huancayo	Riñón anterior
25	Junín	Huancayo	Bazo
26	Junín	Huancayo	Riñón anterior
27	Lima	Huaura	Bazo
28	Lima	Huaura	Bazo
29	Puno	Puno	Bazo
30	Puno	Puno	Bazo
31	Lima	Canta	Bazo
32	Lima	Canta	Bazo
33	Lima	Canta	Bazo
34	Lima	Canta	Bazo
35	Lima	Canta	Bazo
36	Lima	Canta	Riñón anterior
37	Lima	Canta	Riñón anterior
38	Lima	Canta	Riñón anterior
39	Lima	Canta	Riñón anterior
40	Lima	Canta	Riñón anterior
41	Lima	Canta	Riñón anterior
42	Lima	Canta	Riñón anterior
43	Lima	Canta	Riñón anterior