



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

EVALUACIÓN DE LA
SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA
DE CEPAS DE *Yersinia ruckeri*
AISLADAS DEL AMBIENTE ACUÁTICO
EN ESTANQUES DE CULTIVO DE
TRUCHA ARCOIRIS DE LA REGIÓN
JUNÍN

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

CHRISTIAN FELIX LUYO AVILA

LIMA - PERÚ

2020

ASESOR DE TESIS

MG. MV. NESTOR GERARDO FALCÓN PÉREZ

DEDICATORIA

A mis padres Rudy y Carmen, mi hermano Alexis, mi prima María y toda mi familia que constantemente me han brindado su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, porque gracias a Él he podido afrontar con sabiduría los retos que implica la vida profesional.

A mi madre celestial, la Virgen María que siempre intercede por nosotros.

Al Dr. Nestor Gerardo Falcón Pérez, por guiarme durante el desarrollo de mi tesis, depositando su confianza en mi persona para culminar este trabajo.

A los doctores Enrique Serrano, Luis Llanco, Carlos Shiva, Nieves Sandoval, Luis Jara, Jasmin Hurtado y Romina Caballero por su asesoría en los aspectos microbiológico, molecular y de campo en el presente trabajo.

A los señores Elias Porta, Pablo Centeno, Euclides, Yavely Gonzales, Martín Silvera por abrirme las puertas de sus piscifactorias y colaborar con este estudio.

Un agradecimiento especial a los doctores Marelsy Pilco Pinedo y Jefferson Pinedo Quiñones por el apoyo en el asesoramiento de temas administrativos.

Finalmente mi enorme gratitud a mis compañeros de maestría, con los que he compartido experiencias y contactos para facilitar el desarrollo de este trabajo de investigación.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

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

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	3
2.1.	SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA PERUANA.....	3
2.1.1.	Potencial Acuícola Nacional	3
2.1.2.	Producción de trucha arcoiris.....	3
-	Producción de trucha arcoiris en sistemas convencionales	4
-	Producción de trucha arcoiris en sistemas no convencionales	5
2.2.	ENFERMEDAD ENTÉRICA DE LA BOCA ROJA (ERM).....	6
2.2.1.	<i>Yersinia ruckeri</i>	6
2.2.2.	Distribución y Rango de Hospedadores	8
2.2.3.	Fisiopatología.....	10
2.2.4.	Formación de Biofilm	11
2.2.5.	Diagnóstico	13
-	Antibioterapia.....	14
-	Probióticos	15
-	Vacunación	15
-	Inmunoestimulantes	16
2.3.	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	16
2.3.1.	Resistencia Antibiótica de <i>Yersinia ruckeri</i>	16
2.3.2.	Ambiente Acuático	19
2.3.3.	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).....	20
2.3.4.	Interpretación de Resistencia Normalizada (NRI)	21
III.	JUSTIFICACIÓN	23
IV.	OBJETIVOS	24
4.1.	OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1.	LUGAR Y TIEMPO	25
5.2.	TIPO DE ESTUDIO	25

5.3.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	25
5.4.	TAMAÑO DE MUESTRA.....	25
5.5.	TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AMBIENTALES.....	26
5.5.1.	Toma de muestra de agua.....	26
5.5.2.	Toma de muestra de sedimento.....	26
5.5.3.	Envío de muestras.....	26
5.6.	LABORATORIO.....	27
5.6.1.	Cultivo y Aislamiento de <i>Yersinia ruckeri</i>	27
5.6.2.	Confirmación de <i>Yersinia ruckeri</i>	28
-	Extracción de DNA.....	28
-	Amplificación de DNA.....	28
5.6.3.	Susceptibilidad Antimicrobiana.....	30
-	Método de Difusión en disco.....	30
-	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	30
-	Control de Calidad.....	31
5.7.	PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS.....	32
5.8.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	32
VI.	RESULTADOS.....	33
6.1.	AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Yersinia ruckeri</i>	33
6.2.	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	35
VII.	DISCUSIÓN.....	42
VIII.	CONCLUSIONES.....	54
IX.	RECOMENDACIONES.....	55
X.	LITERATURA CITADA.....	56
	ANEXOS	

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1** Producción Nacional de trucha arcoiris (TM) según región, periodo 2008-2017.
- Cuadro 2** Esquema de serotipificación de *Y. ruckeri* entre 1977-2016
- Cuadro 3** Especies acuícolas susceptibles a infecciones por *Y. ruckeri*
- Cuadro 4** Organismos no acuáticos con aislamiento de *Y. ruckeri*
- Cuadro 5** Condiciones de PCR para la detección de *Y. ruckeri*
- Cuadro 6** Diámetros de Zonas de Inhibición de agentes antimicrobianos de aislados de *Yersinia ruckeri* en muestras ambientales: agua y sedimento de piscigranjas de la región Junin
- Cuadro 7** Concentración Mínima Inhibitoria de agentes antimicrobianos de aislados de *Yersinia ruckeri* en muestras ambientales: agua y sedimento de piscigranjas de la región Junin
- Cuadro 8** Resultados de análisis de NRI de antibióticos frente a *Y. ruckeri*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Aislamiento y caracterización de cepas de *Yersinia ruckeri* de muestras ambientales de la región Junin.
- Figura 2** Confirmación molecular por PCR convencional de cepas de *Yersinia ruckeri* de muestras ambientales de la región Junin.
- Figura 3** Distribución de los valores de Diámetros de Inhibición de Oxitetraciclina, Florfenicol, Enrofloxacina, Amoxicilina, Sulfametoxazol/Trimetoprim contra 26 aislados de *Y. ruckeri* procedentes del ambiente acuático de estanques de cultivo trucha arcoiris de la región Junín.
- Figura 4** Distribución de valores de CIM Oxitetraciclina, Florfenicol, Enrofloxacina, Amoxicilina, Sulfametoxazol/Trimetoprim contra 26 aislados de *Y. ruckeri* procedentes del ambiente acuático de estanques de cultivo trucha arcoiris de la región Junín.

RESUMEN

Yersinia ruckeri es una bacteria patógena en trucha arcoiris, que tiene la capacidad de persistir en el ambiente acuático representando una fuente de reinfección. Actualmente se vienen utilizando diferentes agentes antimicrobianos de manera irresponsable siendo liberados al medio ambiente propiciando la aparición de cepas resistentes a antibióticos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoiris de la región Junín. Se tomaron muestras de agua y sedimento de 7 piscigranjas, posteriormente se llevó a cabo el cultivo, aislamiento e identificación mediante métodos microbiológicos y moleculares. Los aislados se sometieron a las pruebas de susceptibilidad antibiótica de difusión en disco y microdilución en caldo para oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, amoxicilina y sulfametoxazol/trimetoprim. Finalmente, se aplicaron los métodos de Interpretación de Resistencia Normalizada y ECOFFinder para obtener los valores de corte epidemiológicos. Se obtuvieron 26 cepas de *Y. ruckeri* siendo clasificadas como totalmente susceptibles (WT) a los cinco antibióticos. Se sugiere que en la región Junín, las infecciones producidas por *Y. ruckeri* pueden ser tratadas efectivamente con la dosis correcta de alguno de los 5 antibióticos evaluados.

Palabras Clave: Antibióticos, Agua, Sedimento, Piscigranjas, Resistencia.

ABSTRACT

Yersinia ruckeri is a pathogenic bacterium in rainbow trout, which has the ability to persist in the aquatic environment representing a source of reinfection. Currently, different antimicrobial agents have been used irresponsibly, being released into the environment, leading to the emergence of antibiotic resistant strains. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility of *Yersinia ruckeri* isolated from aquatic environment in rainbow trout culture ponds in Junin region. Water and sediment samples were taken from 7 trout farm, then the culture, isolation and identification was carried out by microbiological and molecular methods. The isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing of disc diffusion and broth microdilution for oxytetracycline, florfenicol, enrofloxacin, amoxicillin and sulfamethoxazole/trimethoprim. Finally, the Normalized Resistance Interpretation and ECOFFinder methods were applied to obtain epidemiological cut-off values. 26 strains of *Y. ruckeri* were obtained being classified as fully susceptible (WT) to the five antibiotics. It is suggested that in the Junin region, infections caused by *Y. ruckeri* can be effectively treated with the correct dose of any of the 5 antibiotics evaluated.

Keywords: Antibiotics, Water, Sediment, Trout farm, Resistance

I. INTRODUCCIÓN

La producción de trucha arcoiris representa un aporte del 54.63% de la acuicultura peruana y ha experimentado en la última década un crecimiento sustancial, observándose una cosecha de 54 878 TM en el año 2017 de tal manera que cuadruplica lo obtenido en el año 2008 (PRODUCE, 2018).

En esta actividad se ha identificado 2 sistemas de producción: convencional (estanques) y no convencional (jaulas flotantes), destacando que la Región Junín cuenta con el mayor número de unidades productivas de sistema convencional aportando a la producción truchícola el 4.9% de la cosecha total (FONDEPES, 2014; PRODUCE, 2018).

Yersinia ruckeri, agente causal de la Yersiniosis o Enfermedad Entérica de la Boca Roja, tiene la capacidad de sobrevivir en los ambientes acuáticos (Bystritskaya *et al.*, 2016) y ha sido reportada en los diferentes sistemas de producción de truchas (Bravo y Kojagura, 2004; Sierralta *et al.*, 2013; Mesías, 2019). Utilizando como medida preventiva, terapéutica y de control de mortalidades, el uso de antibióticos (Sierralta *et al.*, 2013).

Los antibióticos como oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, amoxicilina y sulfonamidas potenciadas con trimetoprim son algunos de los compuestos autorizados y de importancia para su aplicación en especies acuáticas (OIE, 2019).

Las truchas después que reciben antibióticos excretan sus metabolitos, depositándose en el agua y el sedimento, siendo arrastrados a lugares distantes

contaminando el ambiente acuático (Tação *et al.*, 2012; Wellington *et al.*, 2013), estos residuos pueden ser ingeridos por peces y otros organismos (Boxal *et al.*, 2004; Sørum, 2006), generando resistencia antimicrobiana (Beaber *et al.*, 2004; Hastings *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Sørum, 2006).

Progresivamente se vienen desarrollando estudios enfocados en el aislamiento y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* en ambientes acuáticos en diferentes piscifactorías de países vecinos (Coquet *et al.*, 2002; Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017). Sin embargo a nivel nacional los estudios están centrados en cepas aisladas de truchas clínicamente enfermas y no se contempla el ambiente acuático (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019).

En ese sentido, el presente estudio pretendió evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoiris de la región Junín, con el fin de estimar el impacto del agua y los sedimentos en la resistencia antimicrobiana en estos sistemas de cultivo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1.SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA PERUANA

2.1.1. Potencial Acuícola Nacional

La acuicultura peruana en la actualidad es considerada incipiente en comparación con países vecinos de sudamérica, debido a que la actividad acuicola está liderada principalmente por Chile, Brasil y Ecuador que en conjunto representan 90% de la producción en América Latina, mientras que Perú aporta 4% de la producción regional; sin embargo en la última década la actividad ha crecido aproximadamente 13% enfocandose en la producción de trucha arcoiris representando a la acuicultura continental; así como concha de abanico y langostino en acuicultura marina o maricultura (Saldarriaga y Regalado, 2017).

El Perú presenta en sus tres regiones (costa, sierra y selva) las condiciones climáticas e hidrológicas (2000 recursos hídricos) favorables para el desarrollo de la acuicultura, teniendo como principales especies cultivadas la concha de abanico y langostino en el ambiente marino, y la trucha arcoiris, tilapia, paiche, gamitana y paco en aguas dulces (Ruiz, 2012; Saldarriaga y Regalado, 2017).

2.1.2. Producción de trucha arcoiris

PRODUCE (2018) en su último anuario estadístico pesquero y acuícola establece que la cosecha de trucha arcoiris representa el 54.63% de la producción nacional, y esta ha experimentado un crecimiento de 339.1% en la última década, colocando a Puno, Huancavelica y Junin como los principales productores (Cuadro 1).

La producción intensiva de trucha arcoiris se desarrolla en una altitud mayor a los 2500msnm (Mateo *et al.*, 2017) y se han identificado 2 sistemas de cultivo: convencional, que utiliza estanques, y no convencional que requiere el uso de jaulas flotantes (FONDEPES, 2014).

Cuadro 1. Producción Nacional de trucha arcoiris (TM) según región, periodo

2008-2017

REGIÓN	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Amazonas	44.9	100.6	23.8	24.9	60.6	41.1	35.6	81.3	291.4	269.3
Ancash	145.7	147.7	129.3	128.1	135.8	659.0	82.1	78.6	85.7	78.8
Apurímac	25.7	21.5	50.6	26.9	38.3	50.1	59.6	75.0	97.7	125.0
Arequipa	44.5	52.7	15.3	43.6	62.3	42.8	90.7	28.8	18.8	13.1
Ayacucho	82.5	97.3	67.9	209.4	240.4	264.9	304.4	482.7	543.9	781.0
Cajamarca	130.2	225.6	263.2	294.4	328.9	328.4	175.1	75.5	139.3	162.0
Cusco	161.8	132.9	263.6	251.7	438.0	641.0	170.2	637.0	797.5	810.0
Huancavelica	153.7	247.3	726.4	1122.2	1143.9	1222.0	1443.9	3386.8	3704.1	3454.1
Huánuco	38.4	47.1	112.1	109.6	148.0	197.7	269.1	258.9	247.0	286.0
Junín	2078.9	1757.9	1847.9	1947.1	3412.5	2126.9	1614.7	1177.6	2262.9	2687.6
La Libertad	206.0	73.9	63.5	6.9	9.4	9.6	49.2	122.1	120.3	124.8
Lima	172.5	181.2	794.4	83.4	128.3	197.4	219.6	253.2	371.8	476.5
Moquegua	5.7	24.6	4.7	1.1	6.2	10.7	8.4	8.4	-	-
Pasco	310.8	243.5	171.1	121.7	90.3	88.3	89.3	127.8	234.1	332.1
Puno	8877.2	9437.8	9682.8	15549.6	18471.0	29090.7	28236.1	34114.0	43290.0	45232.7
Tacna	18.8	25.2	33.8	21.1	47.5	20.8	67.6	29.7	32.7	37.2

*Adaptado por PRODUCE, 2018

- *Producción de trucha arcoiris en sistemas convencionales*

Los sistemas convencionales tienen como fuente de abastecimiento de agua los ambientes lóticos (ríos, riachuelos, manantiales); y de acuerdo al caudal de agua requerido y al área de producción se diseña la infraestructura hidráulica necesaria como bocatoma, canal principal, canales secundarias, fitros, desarenadores y otros (PRODUCE, 2010; FONDEPES, 2014).

Según la topografía del terreno y la disponibilidad económica de los productores, la construcción de los estanques puede ser de tres tipos: concreto, mampostería de piedra y de tierra (PRODUCE, 2010; FONDEPES, 2014); observándose predominancia por estanques de concreto en las regiones de Junin, Cusco, Arequipa y Lima (PRODUCE, 2010).

La principal ventaja de este sistema de producción es la facilidad de manejo, aprovechamiento de los ambientes, traslado de animales y programación de actividades durante todo el año (PRODUCE, 2010; FONDEPES, 2014).

- *Producción de trucha arcoiris en sistemas no convencionales*

La crianza en este tipo de sistema se desarrolla principalmente en el lago Titicaca, región de Puno (PRODUCE, 2010; Mateo *et al.*, 2017), utilizando jaulas flotantes, cuyos costos de construcción son menores que los estanques de concreto, debido a que requiere material simples como cañas de bambú, nylon, flotadores de cilindro (PRODUCE, 2010).

Desde el inicio de ejecución de este sistema en el año 2003, en los primeros siete años, la región Puno ha logrado triplicar la producción de Junín (PRODUCE, 2010), logrando un mayor desarrollo contando con el 98% de unidades productivas (FONDEPES, 2014).

Según PRODUCE (2018), actualmente los mayores productores de trucha arcoiris son la región de Puno y Huancavelica que utilizan el sistema de crianza no convencional (jaulas flotantes), mientras que en tercer lugar se ubica la región Junin cuyo sistema principal es el convencional.

2.2.ENFERMEDAD ENTÉRICA DE LA BOCA ROJA (ERM)

2.2.1. *Yersinia ruckeri*

Yersinia ruckeri es una bacteria bacilar gramnegativa, anaerobio facultativa perteneciente a la familia Yersiniaceae (Adelou *et al.*, 2016), de distribución mundial y con un amplio rango de hospedadores afectando principalmente a salmónidos (Barnes, 2011; Kumar *et al.*, 2015). *Y ruckeri* mide 0.75µm de diametro y 1-3µm de longitud, a su vez posee un genoma de 3.7Mb con una proporción de 47% G+C aproximadamente (Navas *et al.*, 2014), no forma esporas ni tampoco posee cápsula y algunas cepas presentan flagelo dispuestos peritricamente exhibiendo motilidad variable (Tobback *et al.*, 2007).

Las diferentes cepas de *Y. ruckeri* que han sido reportadas se han clasificado en base a serotipos, biotipos y proteínas de membrana externa (Kumar *et al.*, 2015). El esquema de serotipificación es compleja y se basa en la reacción serológica de los antígenos (lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa y antígeno O) frente a antisueros (Wrobel *et al.*, 2019).

La clasificación de serotipos más utilizadas son las establecidas por Davies (1990) y Romalde *et al.* (1993), a inicios de los noventa el primero propuso un esquema basado en Antígenos O estables al calor distinguiendo cinco serotipos (O1 al O7), mientras que Romalde propuso una clasificación tomando en cuenta perfiles de lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa, distinguiendo cuatro serotipos (O1 al O4).

En los últimos años han aparecido nuevos serotipos (Cuadro 2) y en el año 2016 se ha reportado un serotipo O8 obligando a los investigadores a buscar nuevas soluciones de tratamiento (Ormsby *et al.*, 2016).

Cuadro 2. Esquema de serotipificación de *Y. ruckeri* entre 1977-2016

	AÑO DE SEROTIPIFICACIÓN						
	1977	1978	1984	1988	1990	1993	2016
	I	I	I	-	O1	O1a	O1
	II	II	II	II	O2	O2a,b,c	O2
	-	III	III	III	O1	O1b	O1
	-	-	IV	-	-	-	-
SEROTIPO	-	-	V	V	O5	O3	O5
	-	-	VI	VI	O6	O4	O6
	-	-	-	-	O7	-	O7
	-	-	-	-	-	-	O8
AUTOR	a	b	C	d	e	f	g

*Adaptado por Wrobel *et al.*, 2019

**Fuente: (a) O'Leary, 1977; (b) Bullock *et al.*, 1978; (c) Stevenson y Airdrie, 1984; (d) DeGrandis *et al.*, 1988; (e) Davies, 1990; (f) Romalde *et al.*, 1993; (g) Ormsby *et al.*, 2016.

Asimismo, se han descrito dos biotipos en función a la presencia de flagelo y capacidad de hidrolizar Tween 20 y Tween 80, es así que el Biotipo 1 es móvil y lipasa positivo; mientras que el Biotipo 2 es no móvil y lipasa negativo, curiosamente esta pérdida de la motilidad y actividad lipasa es ocasionada por mutaciones en el aparato de secreción flagelar (Moreau *et al.*, 2019).

El esquema de tipificación establecido por Davies (1991) y basado en la variación de la masa molecular de las principales Proteínas de Membrana Externa

(OMP) distinguió seis grupos clonales, para el serotipo O1 consistieron en OMP-1 al OMP-4, mientras que para el serotipo O2 consistieron en OMP-1 y OMP-2, y ha sido capaz de diferenciar entre las cepas clásicas de Hagerman y las recién emergidas del biotipo 2. Posteriormente, el análisis OMP ha jugado un papel importante en varios análisis epidemiológicos de *Y. ruckeri* (Sousa *et al.*, 2001; Bastardo *et al.*, 2012).

2.2.2. Distribución y Rango de Hospedadores

Yersinia ruckeri ha sido aislado de peces silvestres y de piscifactorías, así como de especies no acuícolas (Kumar *et al.*, 2015; Zorriehzahra *et al.*, 2017) y ambientes acuáticos (Coquet *et al.*, 2002). Reportándose en Canadá, Europa, Sudamérica, China, India y Australia (Manna *et al.*, 2003; Tobback *et al.*, 2007; Shaowu *et al.*, 2013). Las especies afectadas por este patógeno, así como los organismos no susceptibles se detallan en el Cuadro 3 y 4.

Los salmónidos son las especies más susceptibles a infecciones por *Y. ruckeri* (Wrobel *et al.*, 2019) produciendo graves pérdidas económicas en la industria, principalmente en Australia (Carson y Wilson, 2009), Chile (Bastardo *et al.*, 2011), Noruega (Shah *et al.*, 2012) y Escocia, donde la producción es significativa (Ormsby *et al.*, 2016).

Cuadro 3. Especies acuícolas susceptibles a infecciones por *Y. ruckeri*

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Bacalao Atlántico	<i>Gadus morhua</i>	Gudmundsdottir <i>et al.</i> , 2014
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	Berc <i>et al.</i> , 2015
Gardí	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Popovi'c <i>et al.</i> , 2001
Pez Zebra	<i>Danio rerio</i>	Korbut <i>et al.</i> , 2016
Salmón Atlántico	<i>Salmo salar</i>	Navas <i>et al.</i> , 2014
Salmón Chinook	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Ormsby <i>et al.</i> , 2016
Salmón Coho	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Glenn <i>et al.</i> , 2011
Tilapia del Nilo	<i>Oreochromis niloticus</i>	Avendaño-Herrer <i>et al.</i> , 2016
Trucha Arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Eissa <i>et al.</i> , 2008
Trucha de arroyo	<i>Salmo trutta</i>	Sierralta <i>et al.</i> , 2013
		Duman <i>et al.</i> , 2017
		Mesias <i>et al.</i> , 2019
		Huang <i>et al.</i> , 2015

*Adaptado por Wrobel *et al.*, 2019

Cuadro 4. Organismos no acuáticos con aislamiento de *Y. ruckeri*

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Aves Falconiformes	<i>Falco</i> spp.	Kumar <i>et al.</i> , 2015
Hombre	<i>Homo sapiens</i>	De Keukeleire <i>et al.</i> , 2014
Necturo	<i>Necturus maculosus</i>	Standish <i>et al.</i> , 2018
Tortuga	<i>Cheloniidae</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2015
Agua	-	Capkin <i>et al.</i> , 2015
Alga / Sedimento	-	Coquet <i>et al.</i> , 2002

*Adaptado por Wrobel *et al.*, 2019

En el Perú, *Y. ruckeri* ha sido aislado en piscigranjas de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), que se localizan a una altitud superior a los 3000 msnm, siendo reportado por primera vez en la región Junin (Bravo y Kojagura, 2004). Posteriormente se han registrado casos continuos en la sierra central (Sierralta *et al.*, 20013; Mateo *et al.*, 2017), en departamentos costeros como Lima y Huaraz

(Sirvas-Cornejo *et al.*, 2011; Mesias *et al.*, 2019) y en la región de Puno (Estrella, 2019; Mesias, 2019).

Y. ruckeri es un patógeno de alta morbilidad (Mesias *et al.*, 2019), y según esta característica la Organización Mundial de Sanidad Animal estima prevalencias superiores al 5% (OIE, 2009). Anicama (2011) reportó una prevalencia de 6.5% de *Y. ruckeri* en truchas arcoiris de la región Junín. Mientras que SANIPES (2017) informó una prevalencia de infección por *Y. ruckeri* del 8% en la región Puno.

En nuestro medio, las infecciones por *Y. ruckeri* en trucha arcoiris presentan diferentes grados de mortalidad, oscilando entre una mortalidad acumulativa menor al 10% (Bravo y Kojagura, 2004) hasta tasas elevadas de 10-15% (Sierralta *et al.*, 2013), asimismo en infecciones experimentales la mortalidad registrada varía entre 60-100% (Mesias *et al.*, 2019).

2.2.3. Fisiopatología

La mayoría de brotes de ERM son causados por *Y. ruckeri* serotipo O1 biotipo 1; sin embargo existe una incidencia creciente y de amplia distribución de brotes ocasionados por el serotipo O1 biotipo 2 (Fouz *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2009; Calvez *et al.*, 2014).

Y. ruckeri tiene como puerta de entrada principal las células de las lamelas branquiales, donde desde ese punto se diseminan rápidamente vía sanguínea a los órganos internos (Toback *et al.*, 2009; Ohtani *et al.*, 2014). Siendo detectados al minuto post-infección en sangre con un aumento de bacterias que alcanza 2.3×10^5 UFC/mL, a los 30 minutos en intestino, en el riñón a los 3 días y en el bazo, hígado, cerebro y corazón a los 7 días post-infección (Ohtani *et al.*, 2014).

La ERM puede afectar a salmónidos de diferente grupo etéreo, pero los signos más agudos se presentan en alevines, comenzando con bajas mortalidades que se mantienen en el tiempo, resultando en pérdidas acumulativas (Tobback *et al.*, 2007).

Macroscópicamente se observan cambios en el comportamiento, letargia, inapetencia, así como exoftalmia, oscurecimiento de la piel, hemorragias subcutáneas y alrededor de la boca, las petequias internas se localizan en el hígado, páncreas, ciegos pilóricos, vejiga natatoria y músculo, a su vez se observa esplenomegalia y enteritis (Tobback *et al.*, 2007; Sierralta *et al.*, 2013).

El examen histopatológico muestra septicemia general con inflamación, necrosis en la mayoría de los órganos, particularmente en el hígado, riñón, bazo, corazón y branquias, en esta última se observan hiperemia, edema y descamación, mientras que en el hígado se evidencia degeneración grasa y en el riñón se encuentran los túbulos renales degenerados, nefritis glomerular y un marcado aumento en melano-macrófagos (Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009; Sierralta *et al.*, 2013; Mesias *et al.*, 2019).

2.2.4. Formación de Biofilm

Yersinia ruckeri tiene la capacidad de formar biofilm (Coquet *et al.*, 2002; Coquet *et al.*, 2005), adheriéndose a sólidos como PVC, fibras de vidrio, concreto, madera y otros materiales comunmente empleados en piscigranjas, dependiendo de la rugosidad de la superficie y el tiempo de incubación que hace más pronunciado la formación de biopelículas; representando una fuente recurrente de infección por tiempos prolongados (Coquet *et al.*, 2002).

Coquet *et al.* (2002) determinó que la eficiencia en la formación de biopelículas varía de cepa a otra y que está relacionado a la motilidad mediada por flagelo, asimismo observó que los aislados de *Y. ruckeri* procedentes de muestras ambientales exhiben mayor capacidad de adhesión a superficies que las cepas de referencia, formación de biopelículas y tolerancia a los antibióticos que las células planctónicas.

Y. ruckeri también puede adherirse e invadir varias líneas celulares de peces (Tobback *et al.*, 2010; Menanteau-Ledouble *et al.*, 2018). La aplicación de inhibidores dirigidos a los mecanismos del huésped disminuyó significativamente la susceptibilidad de las líneas celulares de peces a ser invadidos por *Y. ruckeri*, resaltando el papel del quorum sensing (QS) en la regulación de los factores de virulencia, formación de biopelículas y motilidad (Delshad *et al.*, 2018).

Delshad *et al.* (2018) suplementaron cultivos de *Y. ruckeri* con una molécula de señalización (3-oxo-C8-homoserina lactona) y observaron un aumento significativamente la motilidad y formación de biopelículas *in vitro*, mientras tras la aplicación de bacterias degradadoras de N-acyl homoserina lactona (quorum quenching - QQ) se observó un efecto opuesto, lo que sugiere que las bacterias QQ pueden influir en la expresión genética de las cepas de *Y. ruckeri*.

Estudios han demostrado la presencia de bacterias QQ en branquias, intestino y piel de trucha arcoiris, las cuales pueden ser útiles para regular negativamente la expresión de los genes de virulencia de *Y. ruckeri* e impedir el ingreso y distribución del patógeno (Ohtani *et al.*, 2014; Ohtani *et al.*, 2015).

2.2.5. Diagnóstico

Múltiples pruebas diagnósticas se han desarrollado para la detección de *Yersinia ruckeri*, dentro de ellas se encuentran el cultivo y aislamiento, pruebas serológicas y moleculares (Tobback *et al.*, 2007). *Y. ruckeri* ha sido aislada usando Agar Tripticasa de Soya (TSA) y Agar MacConkey (Austin *et al.*, 2003; Tobback *et al.*, 2007), a una temperatura de 20-28°C (Tobback *et al.*, 2007).

En nuestro medio, el cultivo y aislamiento se ha llevado a cabo mediante el uso principal de agar TSA a 20-25°C observando colonias blanco cremosas, y para la identificación se utiliza pruebas bioquímicas como oxidasa, catalasa, motilidad, citrato, producción de indol, rojo de metilo, entre otras (Sirvas-Cornejo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2017; Mesias, 2019).

Por otra parte, el cultivo de *Y. ruckeri* procedente de muestras de ambientes acuáticos como el agua o el sedimento se realiza mediante el método de filtración establecido por Atwill *et al.* (2007) donde se utiliza un filtro de 0.45µm y que ha sido aplicado exitosamente (Capkin *et al.*, 2015).

Y. ruckeri ha sido detectado mediante pruebas serológicas como ELISA, prueba de aglutinación e inmunofluorescencia indirecta (Smith *et al.*, 1987; Olesen, 1991; Calvez *et al.*, 2014). Mientras que las pruebas moleculares han incluido el Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción - RFLP (García *et al.*, 1998), Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle – LAMP (Saleh *et al.*, 2008) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (Gibello *et al.*, 1999; Altinok *et al.*, 2001; Glenn *et al.*, 2011), esta última basada en la amplificación del gen 16S-rRNA (Gibello *et al.*, 1999; Lejeune y Rurangirwa, 2000; Altinok *et al.*, 2001).

2.2.6. Tratamiento y Control

- *Antibioterapia*

Los agentes antimicrobianos son usados frecuentemente en acuicultura para el control de *Y. ruckeri* (Tobback *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2013), siendo la oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina, sulfadiazina combinada con trimetoprim y recientemente el florfenicol son los antibióticos habitualmente empleados (Michel *et al.*, 2003). Sin embargo, debido a la limitada gama de compuestos aplicados, se ha generado presión sobre las bacterias de organismos acuáticos facilitando la aparición de cepas resistentes (Defoirdt *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2013).

En el Perú se aplica el mismo listado de antimicrobianos en acuicultura, siendo evaluada su eficacia frente a *Y. ruckeri* (Sierralta *et al.*, 2013; Sandoval *et al.*, 2016; Mesias, 2019). Actualmente, según SANIPES (2016a) solamente están permitido para la acuicultura el uso de oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, sulfas, florfenicol, eritromicina, enrofloxacina, amoxicilina, benzoato de emamectina, ciprofoxacino y trifuralin, llevandose a cabo el control de límites máximos en el músculo.

La dosificación de antibióticos contra *Y. ruckeri* se han venido desarrollando a lo largo del tiempo, es así que frente a brotes se emplea oxitetraciclina (65mg/kg/día x 10 días), ácido oxolínico (10 mg/kg/día x 10 días) y sulfamerazina (200 mg/kg/día x 3 días) (Rodgers y Austin, 1983; Schmidt *et al.*, 2000). Sin embargo en nuestro país no se ha establecido una dosis adecuada, lo que ha conllevado al uso empírico de los compuestos antimicrobianos por parte de los productores (Mesias, 2019).

- *Probióticos*

El incremento en el uso de antibióticos y la preocupación por la resistencia antimicrobiana ha estimulado la búsqueda de nuevas alternativas ecológicas, en particular bacterias probióticas y levaduras (Irianto y Austin, 2002; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Raida *et al.* (2003) demostraron cierta protección en trucha arcoiris frente a infecciones por *Y. ruckeri* con la administración oral de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. Posteriormente, Brunt *et al.* (2007) observaron una reducción de la mortalidad en 80% con la suplementación dietética con *B. subtilis* y en 6% con *Aeromonas sobria*.

La aplicación de *Carnobacterium* spp. aisladas de intestino de trucha arcoiris han demostrado brindar una amplia protección frente a infección por *Y. ruckeri*, considerando como mecanismo de acción la estimulación del sistema inmune del hospedero (Robertson *et al.*, 2000; Kim y Austin, 2006).

- *Vacunación*

Las vacunas comerciales han permitido el control eficiente de las infecciones por *Y. ruckeri* y el avance de la producción de salmónidos en Estados Unidos y Europa (Austin *et al.*, 2003). Sin embargo para una adecuada protección se debe tener en cuenta el biotipo y serotipo de la cepa que se va aplicar (Chettri *et al.*, 2013).

Las vacunas monovalentes utilizan suspensiones de *Y. ruckeri* serotipo O1 biotipo 1 inactivadas mediante vías de inmersión, inyección u oral proporcionando buenos resultados (Raida y Buchmann, 2008; Costa *et al.*, 2011; Soltani *et al.*, 2014; Villumsen *et al.*, 2014).

Asimismo se han desarrollado vacunas bivalentes usando cepas de *Y. ruckeri* biotipo 1 y biotipo 2 inactivadas con formalina, que evidenciaron una buena protección principalmente contra el biotipo 2 (Tinsley *et al.*, 2011; Deshmukh *et al.*, 2012).

- *Inmunoestimulantes*

La resistencia frente a patógenos se ha logrado mediante el uso de inmunoestimulantes que mejoran la efectividad de las vacunas (Tobback *et al.*, 2007).

El β -hidroxi- β -metilbutirato (HMB), es un metabolito producido por la descomposición de la leucina que se encuentra en diversos tejidos, y se ha demostrado que provee un efecto estimulante contra *Y. ruckeri* después de la inmunización in vivo en trucha arcoiris (Siwicki *et al.*, 2001; Siwicki *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha sugerido el uso de Proteínas de Estrés Térmico (HSPs) para estimular la inmunidad innata y adaptativa contra *Y. ruckeri* en situaciones de estrés (Ryckaert *et al.*, 2010).

2.3.SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

2.3.1. Resistencia Antibiótica de *Yersinia ruckeri*

Los antimicrobianos más utilizados para controlar la yersiniosis y autorizados en acuicultura son oxitetraciclina, amoxicilina, florfenicol y sulfadiazina combinada con trimetoprim (Michel *et al.*, 2003; Serrano, 2005). Los cuales, mediante pruebas *in vitro* se ha demostrado que *Y. ruckeri* puede desarrollar resistencia antimicrobiana (Rodgers, 2001; Huang *et al.*, 2013; Calvez *et al.*, 2014).

Se realizó un estudio llevado a cabo por Michel *et al.* (2003), en el cual evaluaron 50 cepas de *Y. ruckeri* obtenidas de brotes en salmónidos de Francia, Italia, Bélgica, Dinamarca e Idaho (USA) enfrentándolos a fenicoles: florfenicol y cloranfenicol mediante CIM, donde no hallaron patrones de resistencia, solamente una cepa presentó resistencia a florfenicol por el método de difusión en disco; sin embargo no se evidenciaron genes de resistencia.

A su vez, en España se evaluaron 7 cepas de *Y. ruckeri* procedentes de truchas arcoiris clínicamente enfermas, frente a cuatro quinolonas: ácido oxolínico, ácido nalidíxico, flumequina y enrofloxacin, hallando una baja susceptibilidad por las pruebas de difusión en disco y microdilución en caldo a los dos primeros antibióticos, resultados que coincidió con el hallazgo de la sustitución de Ser por Arg en la posición 83 del gen *gyrA* (Gibello *et al.*, 2004).

Posteriormente, Huang *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio en Alemania abarcando diferentes grupos de antimicrobianos para evaluar el grado de susceptibilidad en 83 aislados de *Y. ruckeri* de casos clínicos y no clínicos, utilizando el método de microdilución en caldo y el análisis molecular para determinar genes de resistencia, observando que la distribución de CIM de enrofloxacin y ácido nalidíxico fue bimodal y aquellas cepas con baja susceptibilidad, a nivel molecular presentaron sustitución de aminoácidos en la posición 83 (Ser83-Arg o -Ile) u 87 (Asn87-Tyr) del gen *gyrA*; asimismo, una cepa con CIM elevado a sulfonamidas y trimetoprim presentaban un plásmido de 8.9kb portando los genes *sul2*, *strB* y un casete del gen *dfrA14* integrado en el gen *strA*, resultados que coinciden con los hallazgos de Gibello *et al.* (2004).

Por otra parte, en Francia, se analizaron 100 cepas de *Y. ruckeri* en truchas arcoiris de diferentes regiones contra diferentes antibióticos aplicando la prueba de difusión en disco y concentración inhibitoria mínima (CIM) obteniendo patrones de susceptibilidad alta y uniforme, concluyendo que aun no ha surgido resistencia antimicrobiana (Calvez *et al.*, 2014).

Una investigación realizada por Kumar *et al.* (2017) en Austria utilizaron las pruebas de difusión en disco y microdilución en caldo frente a una gran variedad de antibióticos, determinando alta susceptibilidad a enrofloxacin, florfenicol, tetraciclina, amoxicilina, ácido oxolínico, trimetoprima-sulfametoxazol, flumequina y doxiciclina; susceptibilidad intermedia a gentamicina y polimixina, así como resistencia a eritromicina (MIC = 1024 µg/ml), rifampicina (MIC = 32 µg/ml), novobiocina (MIC = 16–32 µg/mL) y mupirocina (MIC = 32–64 µg/mL).

En el Perú los estudios relacionados a susceptibilidad antimicrobiana en *Y. ruckeri* son limitados, inicialmente Sierralta *et al.* (2013) analizaron 30 cepas procedentes de la región Junín y las evaluaron por la técnica de difusión en disco frente a una serie de antibióticos utilizados comúnmente en el medio; sin embargo no observaron altos niveles de resistencia, atribuyendo los resultados a una limitada aplicación de estos agentes en las truchas arcoiris.

Posteriormente Sandoval *et al.* (2016) realizaron un estudio en la región de Puno, trabajando con 20 truchas positivas a *Y. ruckeri*, frente a trimetropin sulfametoxazol, Florfenicol, Fosfomicina, Clorhidrato de oxitetraciclina y Enrofloxacin, observando una alta sensibilidad a enrofloxacin, sulfametoxazol/trimetoprim y fosfomicina; y con sensibilidad media a la oxitetraciclina y florfenicol.

Mesias (2019) estudió 43 cepas de *Y. ruckeri* procedentes de cuatro regiones de la sierra peruana: Lima, Ancash, Junin y Puno, aplicando la prueba de difusión en disco y la detección de genes de resistencia para oxitetraciclina, florfenicol, ácido oxolínico, amoxicilina y sulfametoxazol/trimetoprim; observando un patrón de susceptibilidad unimodal en todos los antimicrobianos y determinando los puntos de corte epidemiológicos categorizando el total de aislados como cepas altamente susceptible o tipo salvaje, asimismo no se detectaron genes de resistencia.

Recientemente, Mesias *et al.* (2020) reportaron la secuencia del genoma de una cepa de *Y. ruckeri* FMV-22 procedente de Canta – Lima, donde hallaron la presencia de secuencias de codificación asociadas a resistencia frente a fluoroquinolonas y una beta-lactamasa, indicando que esta cepa vendría a ser un portador de genes de resistencia antimicrobiana.

2.3.2. Ambiente Acuático

En la acuicultura se han abordado problemas terapéuticos y ambientales debido a que los agentes antimicrobianos son liberados en el agua circundante durante el tratamiento de los peces (Aoki, 1992) y su impacto en la microbiota del medio acuático es complejo a diferencia de los patógenos de peces que reflejan el uso intensivo de los antibióticos (Bruun *et al.*, 2000).

El agua que transporta las bacterias que contienen genes de resistencia antimicrobiana representan una fuente de difusión de estos microorganismos a otros ecosistemas continentales, producciones acuícolas y el hombre (Duman *et al.*, 2017).

Schmidt *et al.* (2000) llevaron a cabo una vigilancia durante 1 año en piscigranjas de Dinamarca, donde se tomaron muestras de truchas arcoiris, agua y

sedimento, obteniendo 134 aislados de *Y. ruckeri*, que fueron sometidos a prueba de susceptibilidad de CIM mediante dilución en agar para oxitetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, ácido oxolínico, amoxicilina y florfenicol, donde observó alta sensibilidad para todos los antimicrobianos.

Balta *et al.* (2010) caracterizaron fenotípica y molecularmente el perfil de resistencia antimicrobiana en 116 cepas de *Y. ruckeri* en piscifactorías de Turquía, donde hallaron 41 aislados resistentes a oxitetraciclina, 21 presentaron genes tetA y tetB, concluyendo que las cepas de *Y. ruckeri* resistentes a antimicrobianos pueden actuar como un reservorio de genes de resistencia a los ambientes de crianza de trucha arcoiris.

En Turquía, los estudios de resistencia antimicrobiana integran el análisis de los peces y el ambiente acuático: agua y sedimento, aplicando las pruebas de susceptibilidad de difusión en disco y microdilución en caldo y analizando los genes de resistencia antimicrobiana, hallando susceptibilidad a florfenicol y sulfametoxazol/trimetoprim y resistencia al sulfametoxazol, mientras que por otro lado se han detectado los genes tetC, tetD, tetE, sul1, floR, ampC (Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017).

2.3.3. Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI)

El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, anteriormente NCCLS) es una organización internacional e interdisciplinaria sin fines de lucro que desarrolla estándares que promueven el desarrollo y uso de normas y pautas voluntarias basadas en el consenso como forma efectiva y rentable para mejorar pruebas y servicios de atención médica (CLSI, 2014).

El CLSI (2010) sugiere que para los patógenos de organismos acuáticos se debe desarrollar estándares de prueba de antimicrobianos para organismos que prefieren o requieren condiciones tales como temperaturas más bajas, medios semisólidos o medios suplementados.

En ese sentido, el CLSI ha publicado 2 documentos con la finalidad de obtener resultados de susceptibilidad antimicrobiana comparables y estandarizados: VET03-A para la prueba de susceptibilidad de difusión de disco en agar (CLSI, 2006a) y VET04-A para la prueba de microdilución en caldo (CLSI, 2006b).

Posteriormente se publicó un tercer documento del CLSI: VET03/VET04-S1 que contiene los primeros puntos de corte clínicos y también valores de corte epidemiológicos aplicables a *Aeromonas salmonicida* (CLSI, 2010), importantes para predecir un tratamiento antimicrobiano adecuado (Bywater *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2010).

2.3.4. Interpretación de Resistencia Normalizada (NRI)

El método de la Interpretación de Resistencia Normalizada (NRI) se desarrolló en respuesta a la necesidad de calibrar los resultados de las pruebas de difusión en disco para hacer posible la comparación entre laboratorios, siendo aplicado en medicina humana, medicina veterinaria y biología marina, proporcionando el cálculo de valores de corte epidemiológico (CO_{WT}) (Kronvall y Smith, 2016), que clasifican a las cepas en Totalmente Susceptible o tipo salvaje (WT) o de Susceptibilidad Reducida o tipo no salvaje (NWT) (Smith y Christofilogiannis, 2007; Kronvall y Smith, 2016).

El método de NRI fue modificado por Kronvall (2010) para las distribuciones de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) mediante la introducción de variables auxiliares y valores intermedios asignados a la media de los números vecinos de aislamientos, asimismo ha sido propuesto por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) la determinación de los valores de corte epidemiológico (ECOFF).

Turnidge *et al.* (2006) diseñaron el análisis de ECOFFinder que consiste en ajustar un conjunto de datos de CIM a la distribución logarítmica normal acumulativa que es válido para datos agrupados, así como datos obtenidos de un laboratorio, y que ha venido siendo aplicado eficientemente en distribuciones CIM para patógenos de salmónidos y de ambientes acuáticos (Baron *et al.*, 2017; Contreras-Lynch *et al.*, 2017; Van Vliet *et al.*, 2017).

La prueba de NRI ha sido aplicado con éxito en el sector acuícola, calculandose los valores de corte epidemiológicos para la zona de difusión en disco en *Aeromonas* spp. (Uhland, 2010; Smith *et al.*, 2012), *Aeromonas salmonicida* (Douglas *et al.*, 2007; Ruane *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Hurtado, 2019), *Edwardsiella tarda* (Lim *et al.*, 2016), *Streptococcus phocae* (Avendaño-Herrera *et al.*, 2011), *Vibrio* spp. (Smith y Christofilogiannis, 2007; Uhland, 2010), *Vibrio harveyi* (Lim *et al.*, 2016) y recientemente *Yersinia ruckeri* (Mesias, 2019).

Mientras que para la prueba de CIM, los valores de corte epidemiológicos mediante NRI han sido calculados para *Aeromonas* spp. (Uhland, 2010), *Flavobacterium psychrophilum* (Enriques-Nuñez *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014) y *Vibrio* spp. (Uhland, 2010).

III. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura peruana ha experimentado un crecimiento considerable que ha llevado al incremento del uso de antibióticos, provocando problemas de contaminación ambiental por la exposición crónica de los antimicrobianos en los ambientes acuáticos.

Por otro lado, la producción de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mikyss*) se encuentra concentrada en las regiones de Puno y Junín, siendo esta última la que cuenta con un sistema de crianza convencional, es decir por estanques, albergando 310 unidades de producción (Gobierno Regional de Junin, 2010).

Yersinia ruckeri es un agente patógeno prevalente (>5%) en la región, que afecta estos sistemas de crianza, generando altas tasas de mortalidad (10-15%) y reincidencia de brotes, que representan para los productores graves pérdidas económicas, esto sumado a las grandes cantidades de antibióticos arrojados al agua y su acumulación en el sedimento, lleva a la sospecha de la aparición de cepas resistentes que se transmiten por diferentes ecosistemas. Este problema debe documentarse y mantenerse en vigilancia, considerando que para *Y. ruckeri* no se ha establecido puntos de corte clínicos y se vienen aplicando metodologías epidemiológicas que permiten la comparación y estandarización de resultados.

Frente a esta problemática se tiene la necesidad de evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoiris de la región Junín, con la finalidad de determinar el grado de resistencia que han alcanzado estos microorganismos.

IV. OBJETIVOS

4.1.OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoíris de la región Junín.

4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar cepas de *Yersinia ruckeri* procedentes del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoíris de la región Junín.
- Identificar cepas de *Yersinia ruckeri* procedentes del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoíris de la región Junín mediante pruebas preliminares y molecular para su confirmación.
- Caracterizar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* procedentes del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoíris de la región Junín, contra 5 antibióticos: oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacina, amoxicilina y sulfa/trimetoprim, mediante pruebas de susceptibilidad estandarizadas y análisis epidemiológico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.LUGAR Y TIEMPO

El presente estudio se llevó a cabo en piscigranjas de producción de trucha arcoiris, procedentes de la región Junin (Huancayo, Concepción, Jauja, Chupaca); a una altitud entre 3,252 a 3,460 msnm y una temperatura que oscilaba entre 1 – 21°C, durante los meses de febrero a setiembre del 2019.

5.2.TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación es de tipo observacional y descriptivo.

5.3.CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se incluyeron muestras ambientales: agua y sedimento provenientes de estanques de cultivo de piscifactorías de trucha arcoiris de la región Junín. Tomando como áreas de muestreo los estanques en etapas de incubación, alevinaje, juvenil y engorde.

Se excluyeron aquellas muestras ambientales procedentes de áreas externas de la piscigranja.

5.4.TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra se determinó mediante muestreo por conveniencia (Casal y Mateu, 2003), de acuerdo a estudios previos (Coquet *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2014; Parrado *et al.*, 2014; Capkin *et al.*, 2015) se consideraron 7 piscigranjas.

Asimismo se tomó en consideración que la región Junin cuenta con más de 200 piscifactorías (Gobierno Regional de Junin, 2010) y que *Yersinia ruckeri* ha logrado ser aislado de todas las unidades productivas (Bastardo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019).

Para determinar el número de estanques se aplicó la metodología establecida por el MINAM (2014), seleccionándose 9 estanques por piscigranja siguiendo la siguiente distribución: Incubación (2), alevinaje (3), juvenil (3) y engorde (1).

5.5.TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS AMBIENTALES

5.5.1. Toma de muestra de agua

Previo consentimiento informado (Anexo 1) se colectó 1L de agua, tomando como puntos de referencia el ingreso, centro y salida de cada estanque (Parrado *et al.*, 2014; Capkin *et al.*,2015), para ellos se utilizaron frascos esteriles de 500ml (PN-ACUI, 2012), y se siguió la metodología establecida por Awtill *et al.* (2007).

5.5.2. Toma de muestra de sedimento

De la misma manera, previo consentimiento informado (Anexo 1), se tomaron muestras de sedimento de la capa superficial del fondo del estanque en tres puntos: entrada, centro y salida (Capkin *et al.*, 2015). Para ello se procedió a un muestreo manual mediante el uso de palas estériles y frascos de boca ancha, siguiendo los procedimientos establecidos por CSN (2007). Tomando 1Kg de sedimento en cada piscigranja (PN-ACUI, 2012).

5.5.3. Envío de muestras

Las muestras ambientales fueron debidamente etiquetadas, rotuladas, almacenadas en temperatura de refrigeración (0-4°C); posteriormente, enviadas al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UPOCH para el análisis dentro de las 6-96 horas (Awtill *et al.*, 2007).

5.6.LABORATORIO

5.6.1. Cultivo y Aislamiento de *Yersinia ruckeri*

Las muestras ambientales: agua (1L) y sedimento (1Kg), fueron procesados mediante el Método de Filtración utilizando un papel filtro de 0.45µm y siguiendo el protocolo descrito por Atwill *et al.* (2007).

Las muestras de agua fueron sometidas a homogenización y centrifugación a 1000g por 10 minutos, posteriormente se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 0.5mL de agua estéril pasando por una segunda centrifugación de 14000g por 10 minutos, seguido del retiro del sobrenadante y una segunda resuspensión en 1200µL de Solución Salina Tamponada (PBS) estéril, finalmente esta suspensión fue añadida a 90ml de PBS (Atwill *et al.*, 2007).

Para la preparación del sedimento, se pesaron 20g de muestra y se suspendieron en 90mL de PBS estéril, se homogenizó y se centrifugó a 500g durante 10 minutos, posteriormente se separó los 90mL de sobrenadante que fue la muestra utilizada para la filtración (Atwill *et al.*, 2007; Capkin *et al.*, 2015).

El método de filtración se llevó a cabo utilizando una bomba de vacío que contaba con un embudo esterilizado previamente, el filtro de membrana de 0.45µm se colocó en la zona intermedia del embudo y la bomba, para añadir la suspensión de muestra y encender la bomba de vacío (Atwill *et al.*, 2007), los filtros fueron retirados y sembrados en Agar Tripticasa de Soya (TSA) (Liofilchen, Italia) e incubadas a 25°C por 24 a 48 horas (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019).

Las colonias sugerentes a *Y. ruckeri* presentaron las siguientes características: colonias blancas, redondas, lisas y translúcidas a la luz natural (Sirvas-Cornejo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013) donde 2-3 aislados fueron

colectados de la placa de aislamiento original y sometidos a pruebas preliminares: tinción Gram, prueba de catalasa, citocromo oxidasa y motilidad en “gota pendiente” (Austin y Austin, 2007).

A continuación se preservaron en caldo BHI (Liofilchen, Italia) suplementados con Glicerol 20% (Calvez *et al.*, 2014; Duman *et al.*, 2017) aquellas colonias que a los análisis preliminares resultaron bacilos gramnegativos, catalasa positivos, oxidasa negativas y motilidad variable (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019), para su posterior confirmación.

5.6.2. Confirmación de *Yersinia ruckeri*

- Extracción de DNA

Cada aislado fue suspendido en caldo BHI (Liofilchen, Italia) e incubado a 25°C durante 24 horas, posteriormente se procedió al centrifugado de 9000 g durante 5 minutos y finalmente al decantado para la obtención de un pelet bacteriano, el cual fue lavado por solución salina tamponada (PBS pH 7.2) (Altinok *et al.*, 2001).

La extracción del DNA se realizó siguiendo las instrucciones establecidas en el protocolo del kit comercial Wizard genomic DNA Purification (PROMEGA, EE.UU). Finalmente, la concentración del DNA se cuantificó mediante espectrofotometría, utilizando un equipo nanodrop (Thermo Fisher, EE.UU) a 260/280 nm y se ajustó a 100ng/μL (Bastardo *et al.*, 2011).

- Amplificación de DNA

La confirmación de cepas de *Y. ruckeri* se llevó a cabo mediante pruebas de PCR convencional siguiendo el protocolo establecido por Gilbello *et al.* (1999). Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen de 20μL de reacción conteniendo: 1 μL de DNA (100ng/μL), 10 pmol de cada cebador: Yer8 y Yer10, 10 μL de Taq

polimerasa (PROMEGA, EE.UU) conteniendo 0.2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP), 4 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) y 5 U/μL de *Taq* polimerasa; y posteriormente fueron colocadas en un termociclador (Eppendorf-Masterecycler, USA) cuyas condiciones y características se detallan en el Cuadro 5.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1.5%, sometidos a un campo eléctrico de 80V/cm durante 90 minutos y finalmente teñidos con Bromuro de Etidio (2μg/mL) (Bastardo *et al.*, 2011).

Para la visualización de los amplificados se utilizó un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, EE. UU.) y se compararon las bandas intensas con un tamaño control de 575bp, para ello se utilizaron como control positivo una cepa de *Y. ruckeri* ATCC 29473 (donación del Laboratorio de Parasitología –FAVEZ-UPCH) y como control negativo, agua libre de nucleasas (AppliChem, Alemania).

Cuadro 5. Condiciones de PCR para la detección de *Y. ruckeri*

GEN	CEBADOR	PRIMERS	TAMAÑO	CONDICIONES DE PCR		
				Nº Ciclos	Temp. (°C)	Tiempo (min)
16S-rDNA	Yer8 (F)	5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3'	575pb	1	92	5
	Yer10 (R)	5'- GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3'		35	92	1
					57	1
					72	1
				1	72	5

*Adaptado por Mesias (2019)

5.6.3. Susceptibilidad Antimicrobiana

- *Método de Difusión en disco*

Las cepas confirmadas de *Y. ruckeri* fueron analizadas mediante la técnica de difusión en disco en agar Müller-Hinton (Liofilchem, Italia), brevemente se fabricó el inóculo mediante la suspensión de 2 a 3 colonias en solución fisiológica (NaCl 0.85%) y para su estandarización se ajustó a escala Mc Farland 0.5 ($1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL) mediante lectura de un espectrofotómetro (OD = 625nm) que oscilaba entre 0.08 -0.10, siguiendo las instrucciones del CLSI (2006a).

Los antimicrobianos evaluados (Liofilchem, Italia) fueron: oxitetraciclina (30µg), florfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), amoxicilina (10µg) y sulfametoxazol/trimetoprim (23.72-1.25 µg). Una vez colocados los discos en placas con agar Müller-Hinton, estas se incubaron a 28°C durante 24 a 48 horas (Kronvall y Smith, 2016).

Posteriormente, se procedió a la lectura de las placas utilizando un vernier calibrado para la medición de los diámetros de las zonas de inhibición (mm).

- *Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)*

Cada aislado fue evaluado mediante el Método de Microdilución en caldo, para ello se utilizaron los antibióticos previamente mencionados con las siguientes concentraciones: oxitetraciclina (0.015-8 µg/mL), florfenicol (0.03-16 µg/mL), enrofloxacina (0.004-2 µg/mL), amoxicilina (0.03-16 µg/mL) y sulfametoxazol/trimethoprim (0.3-19/0.015-1 µg/mL) (Calvez *et al.*, 2014).

En una placa estéril de 96 pocillos con fondo redondo se realizaron diluciones intermedias de cada antimicrobiano en caldo Müller-Hinton (Liofilchem, Italia),

para ello cada antibiótico fue preparado con su respectivo solvente según las instrucciones del CLSI (2014).

El inóculo se preparó suspendiendo 3 a 5 colonias en caldo Müeller-Hinton, ajustandose a la escala de Mc Farland 0.5 ($1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL) mediante lectura de un espectrofotómetro (OD = 625nm) que oscilaba entre 0.08 -0.10, posteriormente se realizó una dilución 1:200 para obtener una concentración de 5×10^5 UFC/mL en cada pocillo (Miller *et al.*, 2005; CLSI, 2014). Inmediatamente después de la inoculación, las placas de dilución se incubaron a 22°C durante 24 a 48 horas.

La concentración inhibitoria mínima se definió como la concentración más baja de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento visible de *Y. ruckeri* (Miller *et al.*, 2005; Calvez *et al.*, 2014). Tomando como patrones la presencia de turbidez o punto de crecimiento > 2 mm en el control positivo y la ausencia o reducción de la misma en un 90% en el control negativo (Cavalieri *et al.*, 2005; Kolarevic *et al.*, 2016).

- *Control de Calidad*

Cada prueba fue desarrollada por triplicado, asimismo se utilizaron como controles las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658, debido a su tolerancia a diferentes rangos de temperaturas y su amplia susceptibilidad a los antimicrobianos evaluados, así como su estandarización para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de bacterias de ambiente acuático (Miller *et al.*, 2005; CLSI, 2006a; CLSI, 2006b).

5.7. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

La interpretación de la información obtenida fue evaluada por estadística descriptiva, mediante tablas de distribución e histogramas (Arora y Malhan, 2010). Para el método de difusión en disco, se utilizó el software Bioscand AB de cálculo de la Interpretación de Resistencia Normalizada (NRI) para la obtención de los puntos de corte epidemiológicos (CO_{WT}) de las zonas de inhibición (Kronvall y Smith, 2016).

Del mismo modo, para los valores de concentración inhibitoria mínima, se utilizó 2 métodos analíticos: NRI (Kronvall y Smith, 2016), y ECOFFinder (Turnidge *et al.*, 2006) para estimar los valores de corte epidemiológico (CO_{WT}).

El método NRI se utilizó con el permiso del titular de la patente Bioscand AB, TÄBY, Suecia (Patente Europea N° 1383913, Patente de los EE. UU. N° 7 465 559), estos programas en excell fueron puestos a disposición por cortesía de P. Smith, W. Finnegan y G. Kronvall.

5.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se ejecutó con la autorización de las piscigranjas (previo consentimiento informado) procedentes de la región Junín.

Asimismo, debido a las características del estudio y las consideraciones de la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, no se requirió evaluación por el Comité Institucional de Ética en Humanos o en Animales. Código CAREG-ORVEI-150-19.

VI. RESULTADOS

6.1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Yersinia ruckeri*

Durante los meses de febrero a setiembre del 2019 se tomaron muestras ambientales: agua y sedimento de 7 piscigranjas localizadas en las provincias de Chupaca (2), Concepción (1), Huancayo (3) y Jauja (1), de la región Junin.

Durante el primer análisis microbiológico se logró cultivar 273 cepas del ambiente acuático, que posteriormente se sometieron a pruebas preliminares, seleccionándose 35 aislados, los cuales finalmente fueron confirmados molecularmente, lográndose identificar un total de 26 cepas de *Yersinia ruckeri*: 18 de agua y 8 de sedimento.

En la caracterización macroscópica, se observó que las colonias confirmadas presentaron un aspecto blanco cremoso, de 2-3mm con bordes regulares y convexos, mientras que microscópicamente se observaron bacilos gramnegativos (Figura 1), y a las pruebas preliminares resultaron catalasa positivos, oxidasa negativos y movilidad positiva.

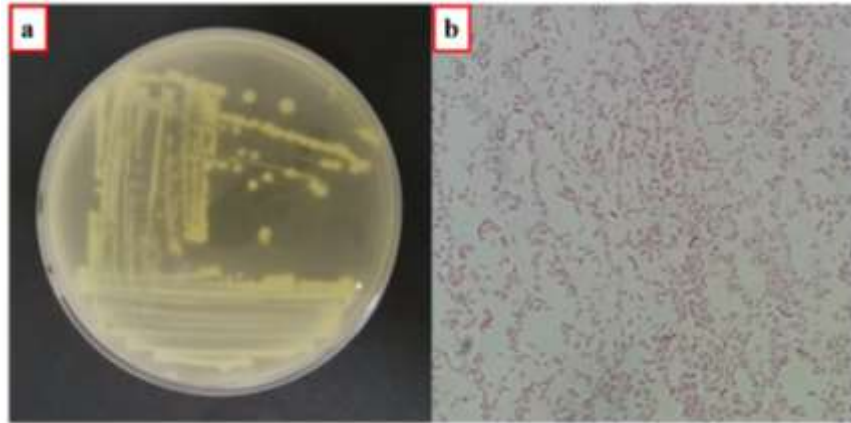


Figura 1. Aislamiento y caracterización de cepas de *Yersinia ruckeri* de muestras ambientales de la región Junin. **a)** Características macroscópicas en agar TSA. **b)** Bacilos cortos gramnegativos.

Cada aislado fue confirmado mediante PCR, observándose la amplificación de un fragmento DNA de 575bp, de acuerdo al tamaño estimado en el control positivo (Figura 2).



**MPM: Marcador de Peso Molecular; C+: Control Positivo; C-: Control Negativo; M: Muestra

Figura 2. Confirmación molecular por PCR convencional de cepas de *Yersinia ruckeri* de muestras ambientales de la región Junin.

6.2.PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

La susceptibilidad antimicrobiana de los diferentes aislados se determinó mediante la prueba de difusión en disco y concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en caldo.

El Cuadro 6 muestra las tendencias de cada antibiótico frente a *Y. ruckeri* aisladas de agua y sedimento, en cuanto se refiere a los diámetros de las zonas de inhibición, observándose medidas de halos > 25mm.

Cuadro 6. Diámetros de Zonas de Inhibición de agentes antimicrobianos de aislados de *Yersinia ruckeri* en muestras ambientales: agua y sedimento de piscigranjas de la región Junin

ATB	MUESTRA	N	DIÁMETRO DE ZONA DE INHIBICIÓN (mm)													
			25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
OTC	Agua	18			1	2	1	3	5	2	3	1				
	Sedimento	8		1	2		2	2						1		
FFN	Agua	18					1	5	1	3	4	2	1	1		
	Sedimento	8					2	1	1	1	1		1	1		
ENR	Agua	18								2	4	2	4	2	3	1
	Sedimento	8								2	1	2	2		1	
AMX	Agua	18						4	6	2	2	3	1			
	Sedimento	8						2	1	1	1	2	1			
SXT	Agua	18		2		5	1	3		3	2	1			1	
	Sedimento	8		1		1	2	1		2	1					

**ATB: Antibiótico; OTC: Oxitetraciclina; FFN: Florfenicol; ENR: Enrofloxacina; AMX: Amoxicilina; SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprim

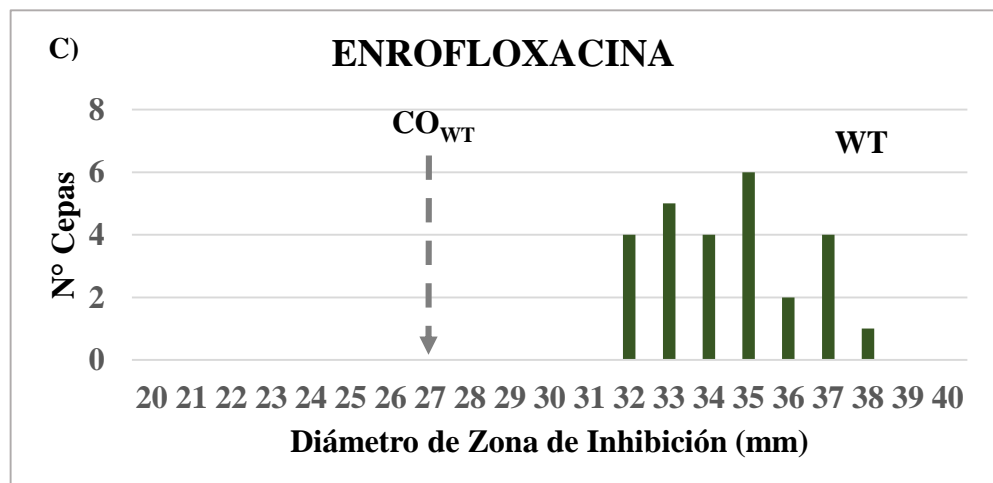
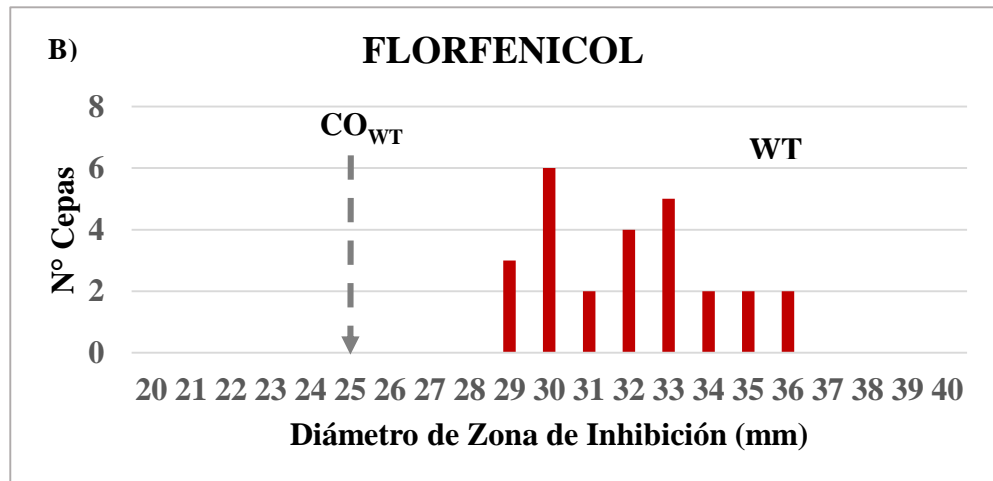
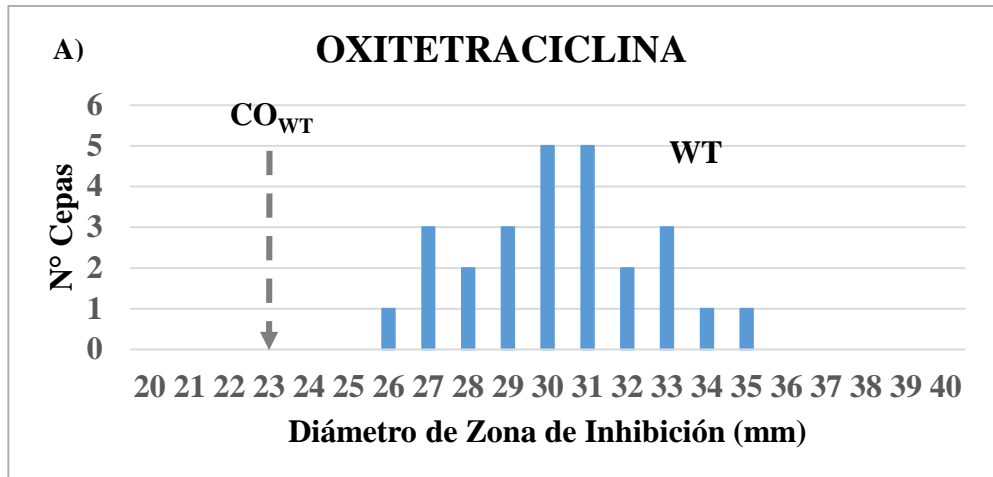
Del mismo modo, en el Cuadro 7 se muestran las tendencias de las concentraciones inhibitorias mínimas de cada antimicrobiano frente a *Y ruckeri* aisladas de agua y sedimento.

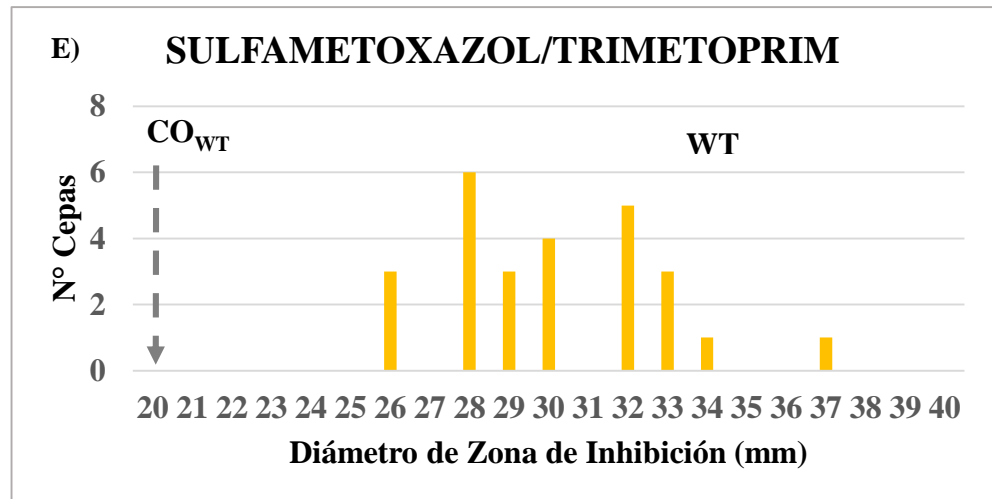
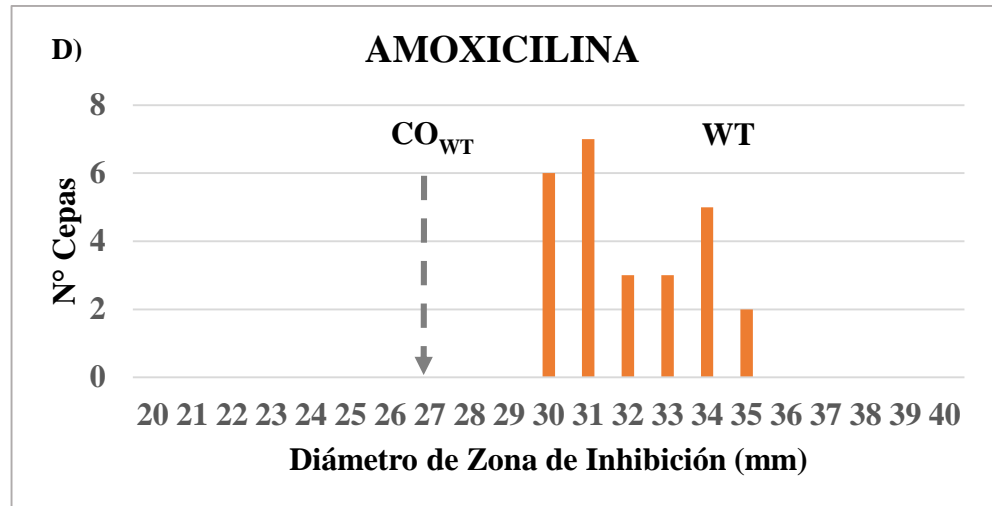
Cuadro 7. Concentración Mínima Inhibitoria de agentes antimicrobianos de aislados de *Yersinia ruckeri* en muestras ambientales: agua y sedimento de piscigranjas de la región Junin

ATB	MUESTRA	N	MIC ($\mu\text{g/mL}$)											
			0.004	0.008	0.016	0.03	0.06	0.13	0.25	0.5	1	2	4	8
OTC	Agua	18				10	6	2						
	Sedimento	8				4	1	3						
FFN	Agua	18				13	4	1						
	Sedimento	8				5	2	1						
ENR	Agua	18	6	9	3									
	Sedimento	8	4	4										
AMX	Agua	18				12	4	2						
	Sedimento	8				6	2							
SXT	Agua	18				2	11	5						
	Sedimento	8					8							

****MIC:** Concentración Mínima Inhibitoria; **ATB:** Antibiótico; **OTC:** Oxitetraciclina; **FFN:** Florfenicol; **ENR:** Enrofloxacina; **AMX:** Amoxicilina; **SXT:** Sulfametoxazol/Trimetoprim

Aplicando el método de NRI, Los resultados obtenidos para la prueba de difusión en disco se muestran en la Figura 3, observando puntos de corte epidemiológico (CO_{WT}) para Oxitetraciclina ($\geq 23\text{mm}$), Florfenicol ($\geq 25\text{mm}$), Enrofloxacina ($\geq 27\text{mm}$), Amoxicilina ($\geq 27\text{mm}$) y Sulfametoxazol/trimetoprim ($\geq 20\text{mm}$) clasificando a las cepas como Totalmente Susceptibles o de Tipo Salvaje (WT).



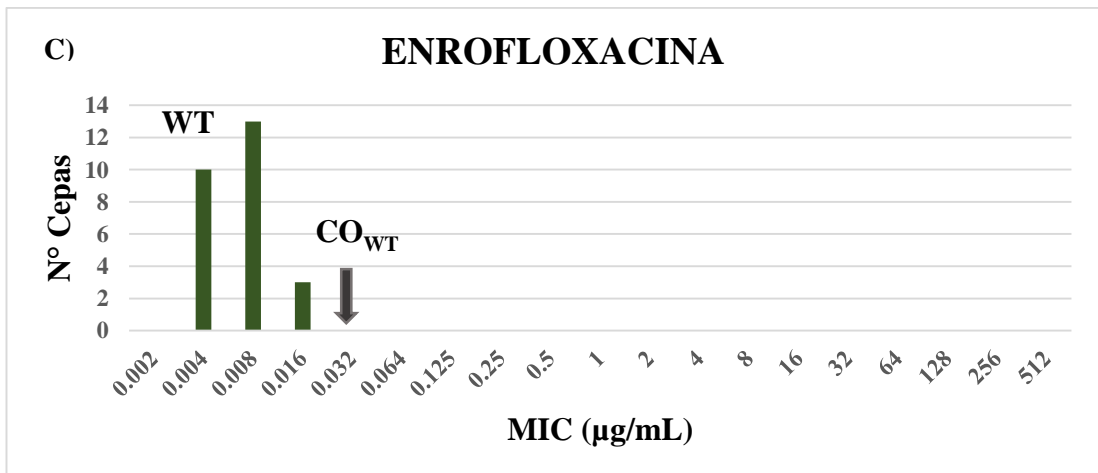
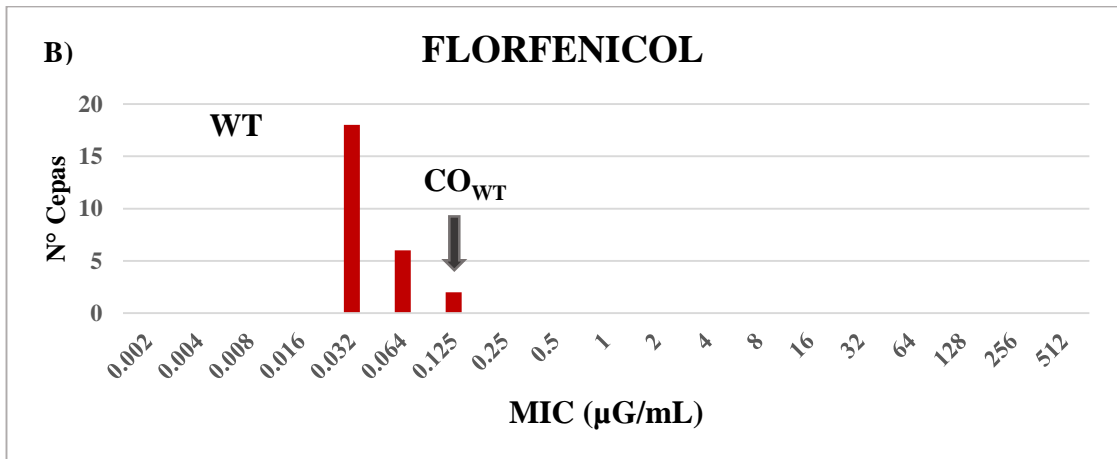
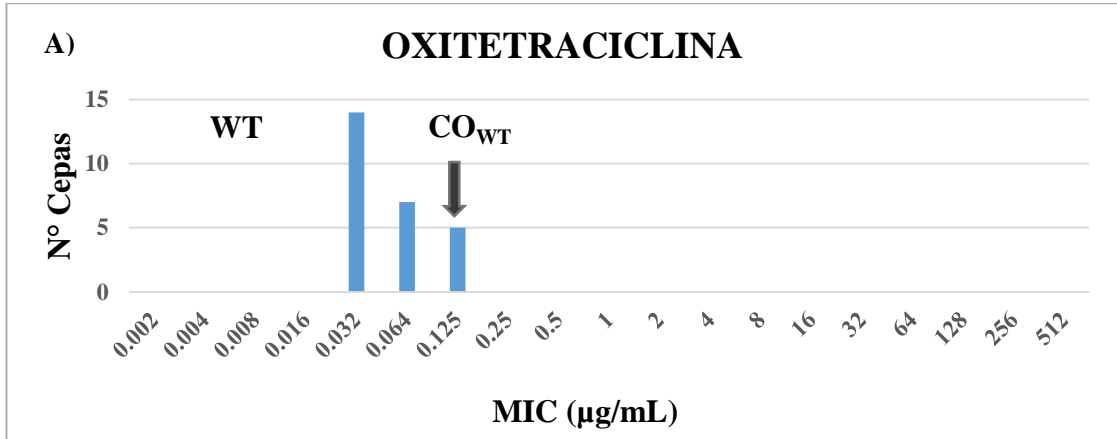


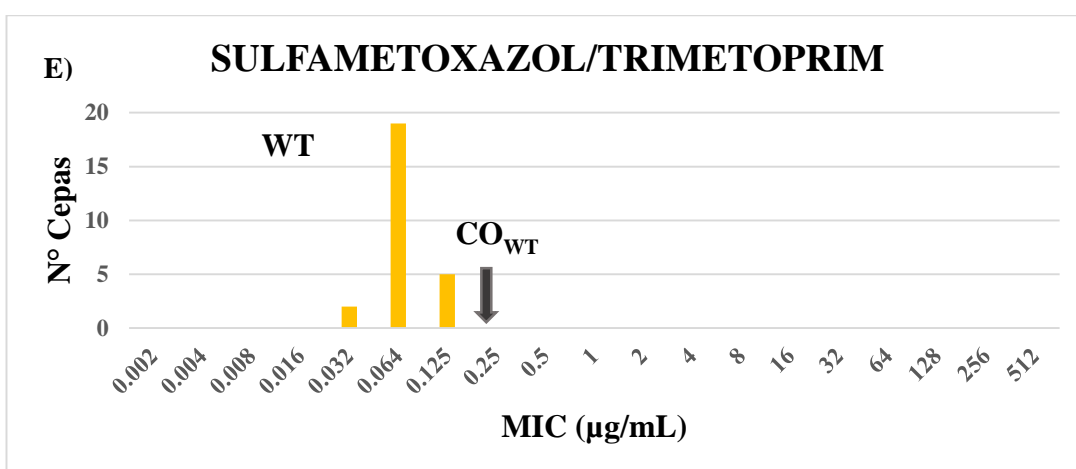
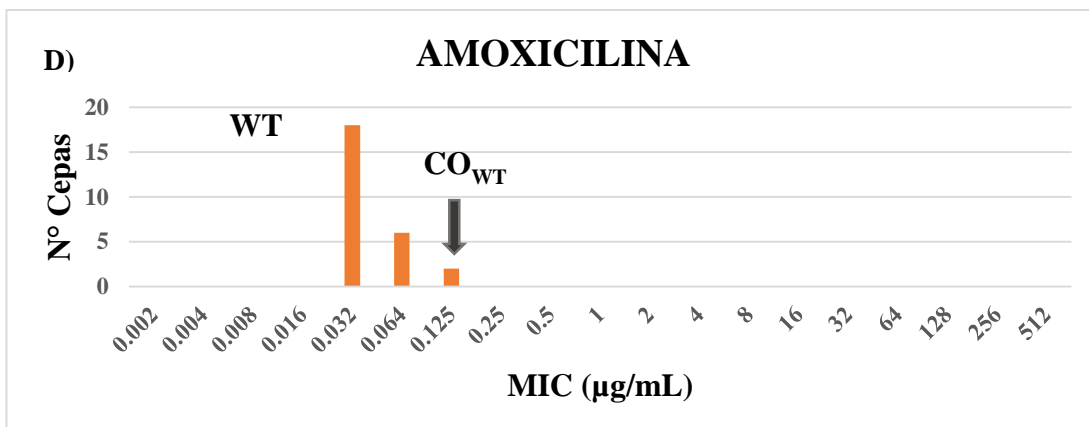
****CO_{WT}: Punto de Corte Epidemiológico; WT: Cepas Totalmente Susceptibles**

Figura 3. Distribución de los valores de Diámetros de Inhibición de Oxitetraciclina, Florfenicol, Enrofloxacina, Amoxicilina, Sulfametoxazol/Trimetoprim contra 26 aislados de *Y. ruckeri* procedentes del ambiente acuático de estanques de cultivo de trucha arcoiris de la región Junín

Paralelamente, por el método de microdilución en caldo, los resultados observados en la Figura 4 indican que los 5 antibióticos presentaron inhibición bacteriana a concentraciones muy bajas, calculando los puntos de corte

epidemiológicos (CO_{WT}) a Oxitetraciclina, Florfenicol, Amoxicilina ($\leq 0.125\mu\text{g/mL}$), Enrofloxacin ($\leq 0.03\mu\text{g/mL}$) y Sulfametoxazol/Trimetoprim ($\leq 0.25\mu\text{g/mL}$).





****CO_{WT}: Punto de Corte Epidemiológico; WT: Cepas Totalmente Susceptibles;
MIC: Concentración Inhibitoria Mínima**

Figura 4. Distribución de valores de CIM Oxitetraciclina, Florfenicol, Enrofloxacina, Amoxicilina, Sulfametoxazol/Trimetoprim contra 26 aislados de *Y. ruckeri* procedentes del ambiente acuáticos de estanques de cultivo trucha arcoiris de la región Junín.

Finalmente, la distribución de las medidas de zonas de inhibición y concentraciones inhibitorias mínimas evaluadas por NRI, evidencian puntos de corte epidemiológicos (CO_{WT}) así como variables de validez como desviación estándar y número de cepas WT (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de análisis de NRI de antibióticos frente a *Y. ruckeri*

ATB	ZONA DE INHIBICIÓN (mm)				MIC (µg/mL)			
	MEDIA	SD	CO _{WT}	WT	MEDIA	SD	CO _{WT}	WT
OTC	29.9	2.6	≥ 23	26	0.03	0.6	0.125	26
FFN	31.9	2.7	≥ 25	26	0.03	0.6	0.125	26
ENR	34.0	2.7	≥ 27	26	0.005	0.7	0.03	26
AMX	32.5	2.0	≥ 27	26	0.03	0.6	0.125	26
SXT	29.3	3.4	≥ 20	26	0.05	0.5	0.25	26

**ATB: Antibiótico; MIC: Concentración Inhibitoria Mínima; SD: Desviación Estándar; CO_{WT}: Punto de corte epidemilógico; WT: Cepas Tipo Salvaje o de susceptibilidad reducida

VII. DISCUSIÓN

Yersinia ruckeri es una bacteria patógena responsable de producir la Enfermedad Entérica de la Boca Roja (ERM), que afecta a las piscigranjas de salmónidos, generando graves pérdidas económicas (Glenn *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2015). En el Perú los brotes en la crianza de trucha arcoíris se han reportado en diferentes regiones (Sierralta *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2017; Mesias, 2019), siendo considerado por SANIPES (2016b) como una enfermedad de interés nacional. Ante esta realidad los productores aplican antibióticos de forma empírica e indiscriminada (Mesias, 2019) que pueden producir un impacto negativo en el ambiente acuático, ejerciendo presión para la aparición de cepas resistentes en los animales como el medio ambiente (Michel *et al.*, 2003; Akinbowale *et al.*, 2007).

En ese sentido, el presente estudio se enfocó en evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas del ambiente acuático en estanques de cultivo de trucha arcoíris de la región Junín, trabajo que inicialmente presentó diferentes limitantes como la procedencia y el tipo de muestra, considerándose la región Junín en base a estudios previos sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *Y. ruckeri* (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019), donde los autores resaltan el problema del uso indiscriminado de antibióticos eliminados al medio ambiente, que son apoyados por el análisis realizado por Cabello (2006) sobre el problema ocasionado por los antimicrobianos en la acuicultura.

Asimismo, otra limitante observada fue la cantidad de antibióticos analizados (5), que por lo general se consideran entre 5-24 antimicrobianos, de acuerdo a criterios ajustados a la realidad de cada estudio (Huang *et al.*, 2013; Sierralta *et al.*,

2013; Calvez *et al.*, 2017; Mesias, 2019). Para el caso de esta investigación, la selección de antibióticos se fundamentó en criterios como la eficacia clínica, costo, indicaciones de la OIE (CLSI, 2010; OIE, 2019), e investigaciones previas (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019).

Particularmente, Enrofloxacin, que ha sido recientemente evaluado, SANIPES (2016a) lo considera dentro de sus análisis en peces de acuicultura determinando el límite máximo permisible. Sin embargo, oficialmente solo se ha autorizado su uso en la crianza de langostino blanco (SANIPES, 2016c); de tal manera que este antimicrobiano se contempló en el estudio debido al uso excesivo por parte de los productores.

En el presente trabajo se obtuvieron 26 aislados de *Y. ruckeri* de muestras de agua y sedimento de piscigranjas de la región Junín, presentando características fenotípicas similares a las cepas reportadas previamente en la misma región (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019). Este número pequeño de cepas representaría una nueva limitante; sin embargo en otros estudios que intentaron aislar *Y. ruckeri* de muestras ambientales, solamente lograron coleccionar 1 cepa procedente de muestra de agua (Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017), situación que puede estar relacionado a la acción producida por los antimicrobianos que alteran la microbiota ambiental y afectan la degradación de la materia orgánica (Kummerer *et al.*, 2000; Kummerer, 2009).

En el Perú, los reportes del aislamiento de *Y. ruckeri* proceden de animales clínicamente enfermos (Sirvas-Cornejo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2017; Mesias, 2019); sin embargo en este caso, las cepas provienen del

ambiente acuático en muestreos que duraron 8 meses, sin discriminar problemas sanitarios. Esto sugiere que *Y. ruckeri* puede sobrevivir y permanecer en el medio ambiente, debido a la alteración de permeabilidad de la membrana externa (Bystritskaya *et al.*, 2016) y la propiedad de adherirse a materiales sólidos para formar biopelículas que le confieren un potencial de infección recurrente por tiempos prolongados (Coquet *et al.*, 2002).

Durante el periodo de muestreo, se observó que las piscigranjas de truchas arcoiris presentaban una infraestructura elaborada a base de cemento, la fuente de agua procedía de ríos y se distribuía a los estanques mediante canales, con un único ingreso y salida de caudal de agua, de acuerdo a las recomendaciones de FONDEPES (2014); sin embargo algunas piscigranjas presentaban áreas con distribución de estanques “En Rosario”, que consistía en un sistema continuo de reutilización del agua. Este factor resultaría bastante perjudicial en la acuicultura por alterar la calidad del agua, que impide el desarrollo óptimo de los peces (Davidson *et al.*, 2011). Así también, se observó que no se contaba con un protocolo de terapia antimicrobiana ni con un profesional sanitario que controle el uso de antibióticos, evidenciando un manejo empírico y constante (Mesias, 2019).

Un aspecto importante que también se observó fue el uso de antimicrobianos como oxitetraciclina en las etapas de alevinaje y juvenil, sin discriminar problemas infecciosos, deduciendo que los productores utilizan este agente antimicrobiano como promotor de crecimiento. Situación que resulta bastante peligrosa ya que actualmente el uso de antibióticos como promotores de crecimiento y profilácticos ha superado el uso de medidas terapéuticas (Bush *et al.*, 2011; Cabello *et al.*, 2013).

Siendo los antibióticos más utilizados: oxitetraciclina y florfenicol (Rigos y Troisi, 2005) como se evidenció en el presente estudio.

Oxitetraciclina y florfenicol usados como promotores de crecimiento tienen efectos negativos en peces, suprimiendo los parámetros humorales de la inmunidad innata (Lunden y Bylund, 2000; Guardiola *et al.*, 2012; Reda *et al.*, 2013), causando daños hepáticos y renales (Hentschel *et al.*, 2005) y generando residuos de antibióticos en los tejidos (Samanidou y Evaggelopoulos, 2007). De tal manera que se ha comprobado su inutilidad para fines productivos (Trushenski *et al.*, 2018).

De acuerdo a la realidad descrita, se esperaría la detección de cepas de *Y. ruckeri* con patrones de resistencia antimicrobiana; sin embargo los resultados obtenidos en la prueba de difusión en disco muestran niveles altos de sensibilidad, mostrando una amplia distribución de longitud de halos de inhibición, lo que nos lleva a comprobar que el patrón de susceptibilidad antimicrobiana en la región Junín nuevamente se mantiene uniforme (Sierralta *et al.*, 2013; Mesias, 2019).

Estos resultados se podrían estar debiendo a que los piscicultores optan por otras alternativas como los baños de sal en etapa de alevinaje, situación observada por Montesinos (2018) en crianza de truchas en jaulas flotantes del lago Tititcaca donde determinó un alto porcentaje en el uso de este producto (62.5%), asimismo algunos truchicultores utilizan probióticos caseros como medida preventiva, situación encontrada igualmente por Sierralta *et al.* (2013).

A nivel nacional, Sierralta *et al.* (2013) evaluaron Oxitetraciclina, Florfenicol y Sulfametoxazol/trimetoprim contra *Y. ruckeri* reportando una sensibilidad en 100% de sus aislados frente a estos antimicrobianos. Recientemente Mesias (2019)

analizó la resistencia fenotípica frente a los mismos antibióticos evaluados en el presente estudio, con la excepción de enrofloxacin, siendo en su lugar reemplazado por otra quinolona (ácido oxolínico), hallando una sensibilidad total en todos sus aislados. Sin embargo, a nivel internacional *Y. ruckeri* ha comenzado a mostrar patrones de resistencia por el uso de grandes cantidades de antibióticos (Balta *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013).

Los estudios realizados sobre la caracterización fenotípica de la susceptibilidad antimicrobiana en cepas de interés para el sector acuícola se han basado principalmente en la técnica de difusión en disco (Sierralta *et al.*, 2013; Sanchez, 2018; Hurtado, 2019; Mesias, 2019). Sin embargo, para armonizar las pruebas y obtener resultados confiables y comparables, el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio ha publicado dos documentos: VET03-A para las pruebas de susceptibilidad por difusión en disco (CLSI, 2006a) y VET04-A para pruebas de susceptibilidad por microdilución en caldo (CLSI, 2006b).

En ese sentido, el presente estudio es el primero en aplicar la prueba de microdilución en caldo para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de *Y. ruckeri* en nuestro medio, teniendo como consideración 2 ventajas con respecto a la prueba de difusión en disco: en primer lugar se obtienen resultados cuantitativos (CIM) que aumentan el potencial para optimizar un régimen de dosificación basados en farmacocinética y farmacodinámica, y en segundo lugar permite el desarrollo de bacterias de lento crecimiento como es el caso de las bacterias de ambiente acuático (Miller *et al.*, 2005; CLSI, 2006b).

Mediante la prueba de microdilución se obtuvo una distribución unimodal donde se observaron bajas concentraciones inhibitorias en los cinco antibióticos, coincidiendo con reportes internacionales como los publicados inicialmente en Alemania y Francia donde observan una alta actividad de enrofloxacin frente a *Y. ruckeri* aisladas de diferentes salmónidos (Huang *et al.*, 2013; Calvez *et al.*, 2014). Así como Calvez *et al.* (2014) quienes reportan una eficacia alta a moderada en sulfametoxazol/trimetoprim, florfenicol y oxitetraciclina.

A la actualidad se han realizado numerosos estudios sobre la susceptibilidad antimicrobiana contra *Y. ruckeri* (Sierralta *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Calvez *et al.*, 2014). Sin embargo no se han establecido los puntos de corte aplicables para dicha bacteria que la categorize en susceptible, intermedio o resistente (CLSI, 2010). En base a estos antecedentes, se desarrolló la Interpretación de Resistencia Normalizada (NRI) evaluada previamente en nuestro país por Mesías (2019), así como la prueba de ECOFFinder con la finalidad de obtener los puntos de corte epidemiológicos (CO_{WT}).

El método de NRI aplicado a la prueba de difusión en disco tiene la propiedad de calibrar los resultados obtenidos (diámetros de inhibición) y compararlos entre diferentes laboratorios (Smith *et al.*, 2012; Kronvall y Smith, 2016). Siendo usado principalmente en medicina humana, medicina veterinaria y biología marina (Kronvall y Smith, 2016), así como también recientemente en la acuicultura (Ruane *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Hurtado, 2019; Mesías, 2019). Con la obtención de los CO_{WT} las cepas analizadas en determinados laboratorios pueden clasificarse en totalmente susceptible o tipo salvaje (WT) y en no totalmente susceptibles o tipo no salvaje (NWT) (Smith, 2008; Kronvall *et al.*, 2011).

Los diámetros de inhibición observados en cada antibiótico: oxitetraciclina, florfenicol, enrofloxacin, amoxicilina y sulfametoxazol/trimetoprim sometidos a la prueba de NRI obtuvieron valores de corte epidemiológicos, que en los cinco casos clasifican al 100% de cepas como WT, estos resultados coinciden con los hallazgos de Mesías (2019) que permiten la oportunidad de desarrollar nuevos trabajos a futuro para la obtención de puntos de corte clínicos.

Por otro lado, al realizar la prueba de microdilución para la determinación de la concentración inhibitoria mínima, se tuvo disponible el método de NRI (Kronvall, 2010) y el ECOFFinder (Turnidge *et al.*, 2006) para establecer los CO_{WT}, que han sido aplicados satisfactoriamente en aislados de interés acuícola (Henriquez-Nuñez *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014; Contreras-Lynch *et al.*, 2017; Ngo *et al.*, 2017).

Para el presente caso, los valores de CIM siguieron un patrón uniforme, con CO_{WT} que clasificaron todas las cepas de *Y. ruckeri* en WT para los cinco antimicrobianos. Estos resultados reafirman y consolidan los datos obtenidos por el NRI de la prueba de difusión en disco, así como coinciden con estudios realizados en Dinamarca (Schmidt *et al.*, 2000), Alemania (Huang *et al.*, 2013), Francia (Calvez *et al.*, 2014), Austria (Kumar *et al.*, 2017) y Turquía (Duman *et al.*, 2017), que consideran que la resistencia antimicrobiana de *Y. ruckeri* aun no es emergente.

Cabe mencionar que inicialmente, el método de NRI se desarrolló para bacterias de interés de medicina humana obtenidas en hospitales, donde la cantidad de datos es amplia (Kronvall, 2003). En acuicultura estos datos son más reducidos considerando que por cada laboratorio se evalúa una cantidad pequeña de aislados; sin embargo el NRI presenta la ventaja que puede integrar los datos entre

laboratorios, ya sea de origen clínico, ambiental o de alimento siempre que se evalúe una especie objetivo (Smith y Christofilogiannis, 2007; EUCAST, 2017).

Smith *et al.* (2009) mencionan que la precisión del CO_{WT} en la prueba de difusión en disco, está asociada al número de cepas analizadas. En ese sentido para obtener CO_{WT} válidos, Smith *et al.* (2012) sugieren criterios cualitativos y cuantitativos: con respecto a las propiedades cualitativas, solo serán considerados válidos los CO_{WT} obtenidos de una distribución de datos con una desviación estándar inferior a 4mm, mientras que los criterios cuantitativos se recomienda que solo los datos entre 20-40 cepas WT serán capaces de generar un CO_{WT} preciso, una cantidad entre 15 a 20 cepas WT calculará un CO_{WT} que debe tratarse con precaución, y un CO_{WT} generado a partir de un número de cepas WT inferior a 15 debe ser rechazado (Smith *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2012).

Para el caso de los datos de la concentración inhibitoria mínima por microdilución, se recomienda que la distribución de las cepas WT sean de tendencia unimodal y que a su vez el número de estas sean igual o mayor a 15 para que los CO_{WT} sean considerados válidos (EUCAST, 2017). Siguiendo los lineamientos para las 2 pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, las cepas de *Y. ruckeri* procedentes de muestras ambientales de piscigranjas de Junin cumplen con todos los requisitos establecidos.

La clasificación de cepas WT confirmadas por las pruebas de susceptibilidad recomendadas por la OIE (2015) y avaladas por EUCAST (2017), nos sugieren que estos aislados carecen de mecanismos de resistencias detectables fenotípicamente frente a un antibiótico (EUCAST, 2018). Recientemente Mesias (2019) analizó los

genes de resistencia en *Y. ruckeri*, hallando unicamente el gen *gyrA*; sin embargo no observó mutaciones en las posiciones 83 (Ser83-Arg o Ile) y 87 (Asn87- Tyr) que estan asociadas con la reducción de la susceptibilidad para quinolonas. Asimismo Mesias *et al.* (2020) hallaron secuencias de codificación asociadas a resistencia frente a fluoroquinolonas y a una betalactamasa, lo cual sugiere la presencia de estos genes; sin embargo no se ha documentado su expresión.

El presente estudio es el primero en el medio en aplicar las pruebas validadas por el CLSI (2006a,b) para determinar la susceptibilidad antibiótica de un patógeno de interés para la acuicultura, aislado de ambientes acuáticos, ya que hasta la fecha los estudios se han venido enfocando en animales clínicamente enfermos (Sierralta *et al.*, 2013; Sandoval *et al.*, 2016; Mesias, 2019). Asimismo, los valores de susceptibilidad son válidos según los criterios establecidos por EUCAST (2017) donde se pueden aplicar estas pruebas para muestras ambientales.

Según la OIE (2015), para un programa de vigilancia de susceptibilidad antimicrobiana en las piscifactorias de Perú, es recomendable la evaluación de aislados procedentes de muestras clínicas y del ambiente acuático, para contrastar los resultados, ya que para el primer caso, las muestras clínicas presentan una mayor concentración de bacterias en los órganos blancos y mayor probabilidad de aislar el patógeno de interés (Sierralta *et al.*, 2013), mientras que en el caso de las muestras ambientales, estas permanecen dispersas y la concentración depende de la estación del año (Pucci *et al.*, 2009).

Estudios recomiendan en primera instancia los análisis de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de muestras clínicas, ya que esa información guarda una

relación directa con el uso incrementado de antimicrobianos en la zona de estudio, así como su presencia en la carne de los peces que serán destinados al consumo humano (Calvez *et al.*, 2014; Orozova *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). Asimismo se está empezando a evidenciar la aparición de cepas resistentes y la detección de genes de resistencia en animales con signología (Balta *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013; Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017). Para el caso de Perú se han detectado genes de resistencia a fluoroquinolonas y betalactamasas (Mesias *et al.*, 2020).

Asimismo, también se resalta la importancia de evaluar cepas obtenidas del ambiente acuático, debido a que estas se encuentran en contacto directo con los antibióticos depositados al medio ambiente, generando selección de bacterias resistentes y convirtiéndose en reservorios e indicadores de genes de resistencia que se diseminan en otras piscigranjas, así como producciones animales y centros de salud humana (Balta *et al.*, 2010; Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017).

Estudios de susceptibilidad antimicrobiana de *Y. ruckeri* han utilizado aislados obtenidos de trucha arcoiris, como de ambientes acuáticos, sin encontrar diferencias en el grado de susceptibilidad (Capkin *et al.*, 2015; Duman *et al.*, 2017). Sin embargo el CLSI (2014) considera la existencia de variantes que aún se encuentran en evaluación. Para el caso del presente estudio se observó una ligera variación en la distribución de halos de inhibición en comparación a los resultados obtenidos por Mesias (2019) quien evaluó muestras clínicas, que si en ambos casos resultaron susceptibles a todos los antibioticos, para nuestro caso se observaron diámetros menores frente a florfenicol y sulfametoxazol/trimetoprim.

Las cepas ambientales también presentan tolerancia a algunos antibióticos debido a su capacidad de adherirse a superficies sólidas, mantenerse fijas y formar biofilms mediado por la motilidad y presencia de flagelo (Coquet *et al.*, 2002; Wrobel *et al.*, 2019). Coquet *et al.* (2002) evaluó aislados de *Y. ruckeri* obtenidas de sedimento y pudo verificar que estos presentaban un alto grado de resistencia a ácido oxolínico en comparación a células sin la capacidad de formar biopelículas. Sin embargo los resultados que se obtuvieron en nuestro caso difieren en el grado de susceptibilidad, lo que nos sugiere que *Y. ruckeri* aún no presenta niveles de exposición suficiente para generar resistencia antimicrobiana.

Un factor que pudo influir sobre en el aislamiento y susceptibilidad antimicrobiana es la calidad del agua, ya que su alteración es indicador de la presencia de sustancias ajenas al suelo que podrían facilitar el movimiento de sustancias antimicrobianas (Baquero *et al.*, 2008; Gu y Karthikeyan, 2008). Por tal motivo el incremento en la concentración de estos agentes destaca la necesidad de integrar los estudios de calidad de agua tanto para uso humano como productivo (Brooks y Conckle, 2019).

ANA (2002) menciona que la calidad de las aguas continentales se evalúa en base a parámetros físico-químicos y a su vez presenta variaciones en función de procesos hidrológicos, antropogénicos y productivos. Para la producción de trucha arcoiris, se han establecido parámetros de calidad como: temperatura, oxígeno disuelto, potencial de hidrógeno (pH), alcalinidad, dureza total y dióxido de carbono (FONDEPES, 2014).

Durante el periodo de muestreo, se observó que la mayoría de productores solamente tomaban la temperatura del agua durante la mañana y noche registrando valores que oscilaban entre 12-14°C, que a su vez se han observado en estudios realizados en la misma región, mostrando temperaturas de 10-13°C (Bravo y Kojagura, 2004; Anicama, 2011). Según el FONDEPES (2014), estos valores son los adecuados para el crecimiento óptimo de las truchas arcoirirs.

Respecto a los otros parámetros de calidad, FONDEPES (2014) establece valores adecuados de pH de 6.6 -7.9 y oxígeno disuelto de 6-8.5mg/L. Las piscigranjas evaluadas no contaban con esta información; sin embargo estudios que evaluaron la calidad de agua en la región Junín han determinado valores de 7-8.7 de pH y 6.3-7.9mg/L de oxígeno disuelto, que se encuentran dentro del rango adecuado (Bravo y Kojagura, 2004; Anicama, 2011).

El presente trabajo de investigación brinda un valioso aporte que junto a los resultados de los estudios referentes a resistencia antimicrobiana en *Y. ruckeri* previamente citados permitan la obtención de los CO_{WT} correspondientes y la determinación de puntos de corte clínicos validados, asimismo brinda una propuesta de establecer un programa de vigilancia de resistencia antimicrobiana recomendada por la OIE (2015), donde se consideren en su integridad muestras clínicas y de ambiente acuático, así como utilizar pruebas de susceptibilidad estandarizadas para organismos acuáticos. Finalmente la información obtenida nos ratifica que el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *Yersinia ruckeri* se mantiene estable, pero que debe permanecer en constante evaluación.

VIII. CONCLUSIONES

- Se aislaron cepas de *Yersinia ruckeri* del ambiente acuático: agua y sedimento de estanques de cultivo de trucha arcoiris de la región Junín, siendo este el primer estudio realizado de muestras ambientales en nuestro país.
- Los aislados en su totalidad fueron determinados como Totalmente Susceptibles (WT) frente a los cinco antimicrobianos evaluados, mediante las pruebas de difusión en disco y microdilución en caldo, lo que sugiere que el uso de estos antibióticos sería efectivo frente a infecciones por *Y. ruckeri*.
- Los valores de corte epidemiológicos CO_{WT} obtenidos permitirá a futuro, la estandarización de puntos de corte para determinar si una cepa de *Y. ruckeri* es sensible, intermedia o resistente.

IX. RECOMENDACIONES

- Para un programa de vigilancia de resistencia antimicrobiana en patógenos de interés en acuicultura, se debe tomar muestras procedentes de animales con diagnóstico de enfermedad y de ambientes acuáticos.
- Asimismo para establecer el perfil de susceptibilidad antimicrobiana, se debe aplicar los métodos estandarizados de difusión en disco y microdilución en caldo.
- Se recomienda realizar nuevos estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana en *Y. ruckeri* para establecer puntos de corte validados.

X. LITERATURA CITADA

1. **Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta R. 2016.** Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 5575–5599.
2. **Akinbowale OL, Peng H, Barton MD. 2007.** Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 103 (5): 2016e2025.
3. **Altinok I, Grizzle J, Liu Z. 2001.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org* 44: 29-34.
4. **[ANA]. Autoridad Nacional del Agua. 2002.** Protocolo de monitoreo de la calidad de los recursos hídricos. Lima: MINAGRI. Informe Técnico. 34p.
5. **Anicama J. 2011.** Frecuencia de *Yersinia ruckeri* en una piscigranja del Valle del Mantaro bajo el contexto de su variabilidad climática estacional. Tesis de Grado de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 95p.
6. **Aoki T. 1992.** Present and future problems concerning the development of resistance in aquaculture, p. 254–262. *In* C. Michel and D. Alderman (ed.), *Chemotherapy in aquaculture: from theory to reality*. Office International des Epizooties, Paris, France.

7. **Arora PN, Malhan PK. 2010.** Biostaistics. Nueva Delhi: Himalaya Publishing House. 570p.
8. **Atwill E, Lewis D, Bond R, Pereira G, Huerta M, Ogata S. 2007.** Protocol consideration for monitoring fecal coliform and in Northern California Estuaries. University of California, Davis School of Veterinary Medicine and University of California Cooperative Extension, Sonoma County, Santa Rosa, CA.
9. **Austin B, Austin DA. 2007.** Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, 4th ed. Springer-Praxis.
10. **Austin DA, Robertson PAW, Austin B. 2003.** Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Systematic and Applied Microbiology 26: 127–131.
11. **Avendaño-Herrera R, Molina A, Magariños B, Toranzo AE, Smith P. 2011.** Estimation of epidemiological cut-off values for disk diffusion susceptibility test data for *Streptococcus phocae*. Aquaculture 314: 44-48.
12. **Avendaño-Herrera R, Tapia-Cammas D, Aedo A, Saldivia P, Ortega C, Irgang R. 2016.** Disease caused by *Yersinia ruckeri* serotype O2b found in Chilean-farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792). J. Fish Dis. 40: 279–285.
13. **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): 211-219.

14. **Baquero F, Martínez J, Cantón R. 2008.** Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotech* 19: 260-265.
15. **Baron S, Granier SA, Larvor E, Jouy E, Cineux M, Wilhelm A, Gassilloud B, Le BS, Kempf I, Chauvin C. 2017.** *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater-An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. *Front Microbiol* 8:503.
16. **Bastardo A, Bohle H, Ravelo C, Toranzo AE, Romalde JL. 2011.** Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *Dis Aquat Organ* 93:207–214.
17. **Bastardo A, Sierralta V, León J, Ravelo C, Romalde J. 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.
18. **Bastardo A, Ravelo C, Romalde JL. 2012.** A polyphasic approach to study the intraspecific diversity of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in salmonid culture. *Vet Microbiol* 160:176–182
19. **Barnes AC. 2011.** Enteric Redmouth Disease (ERM) (*Yersinia ruckeri*). In *Fish Diseases and Disorders, Vol 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI International PTK. Woo & DW. Bruno. p: 484–511.
20. **Berc A, Petrincec Z, Matašin Ž, Kozarić Z. 2015.** *Yersinia ruckeri* Septicaemia in Experimentally Infected Carp (*Cyprinus Carpio* L.) Fingerlings. *Acta Vet. Hung.* 47: 161–172.

21. **Bravo S, Kojagura V. 2004.** First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. Bull Eur Ass Fish Pathol. 24(2): 104-108.
22. **Brooks B, Conkle J. 2019.** Commentary: Perspectives on aquaculture, urbanization and water quality. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 217: 1-4.
23. **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.
24. **Bruun MS, Schmidt AS, Madsen L, Dalsgaard I. 2000.** Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. Aquaculture 187:201–212.
25. **Bullock G, Stuckey H, Shotts E. 1978.** Enteric redmouth bacterium: Comparison of isolates from different geographic areas. J. Fish Dis. 1: 351–356.
26. **Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P. 2011.** Tackling antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 9: 894-896.
27. **Bystritskaya E, Stenkova A, Chistuylin D, Chernysheva N, Khomenko V, Anastyuk S, Novikova O, Rakin A, Isaeva M. 2016.** Adaptive responses of outer membrane porin balance of *Yersinia ruckeri* under different incubation temperature, osmolarity, and oxygen availability. Microbiology Open 5(4): 597–603.
28. **Bystritskaya E, Stenkova A, Chistuylin D, Chernysheva N, Khomenko V, Anastyuk S, Novikova O, Rakin A, Isaeva M. 2016.** Adaptive

responses of outer membrane porin balance of *Yersinia ruckeri* under different incubation temperature, osmolarity, and oxygen availability. *Microbiology Open* 5(4): 597–603.

29. **Bywater R, Silley P, Simjee S. 2006.** Antimicrobial breakpoints – definitions and conflicting requirements. *Vet. Microbiol.* 118: 158– 159.
30. **Cabello F. 2006.** Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 8(7): 1137-1144.
31. **Cabello F, Godfrey H, Tomova A, Ivanova L, Dolz H, Millanao A, Buschmann A. 2013.** Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol* 15(7): 1917-1942.
32. **Calvez S, Gantelet H, Blanc G, Douet D, Daniel P. 2014.** *Yersinia ruckeri* Biotypes 1 and 2 in France: Presence and antibiotic susceptibility. *Dis. Aquat. Organ.* 109: 117–126.
33. **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. *Dis Aquat Org* 114: 127-137.
34. **Carson J, Wilson T. 2009.** Yersiniosis in fish. *Aust New Zeal Stand Diagnost Proced* 2009: 1–19.
35. **Casal J, Mateu E. 2003.** Tipos de Muestreo. *Rev Epidem Med Prev* 1: 3-7.

36. **Cavaliere S, Harbeck R, Mc Carter Y, Ortez J, Rankin I, Soutter R, Sharp S, Spiegel C. 2005.** Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Seattle: American Society for Microbiology. 248p.
37. **Chettri JK, Deshmukh S, Holten-Andersen L, Jafaar RM, Dalsgaard I, Buchmann K. 2013.** Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. Vet. Immunol. Immunopathol. 6 p.
38. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006a.** Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. Approved Guideline VET03-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: CLSI.
39. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006b.** Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline. CLSI Document VET04-A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA: USA.
40. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; first informational supplement. CLSI Document. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. PA: USA.
41. **[CLSI].Clinical and Laboratory Standards Institute. 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.

42. **Contreras-Lynch S, Smith P, Olmos P, Loy M, Finnegan W, Miranda C. 2017.** A Novel and Validated Protocol for Performing MIC Tests to Determine the Susceptibility of *Piscirickettsia salmonis* Isolates to Florfenicol and Oxytetracycline. *Front Microbiol* 6(8):1255.
43. **Coquet L, Cosette P, Dé E, Galas L, Vaudry H, Rihouey C, Lerouge P, Junter GA, Jouenne T. 2005.** Immobilization induces alterations in the outer membrane protein pattern of *Yersinia ruckeri*. *J Proteome Res* 4: 1988–1998.
44. **Coquet L, Cosette P, Quillet L, Petit F, Junter G, Jouenne T. 2002.** Occurrence and Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Appl Environ Microbiol* 68(2): 470-475.
45. **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
46. **[CSN]. Consejo de Seguridad Nuclear. 2007.** Procedimiento de toma de muestras de sedimentos para la determinación de la radiactividad ambiental. Madrid: CSN. Colección Informes Técnicos. 28p.
47. **Davidson J, Good C, Welsh C, Summerfelt S. 2011.** The effects of ozone and wáter Exchange rates on wáter quality and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* performance in replicated wáter recirculating systems. *Aquacult Eng* 44: 80-96.

48. **Davies RL. 1990.** O-serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on European isolates. *Vet Microbiol* 22:299–307.
49. **Davies RL. 1991.** Clonal analysis of *Yersinia ruckeri* based on biotypes, serotypes and outer membrane protein types. *J Fish Dis* 14:221–228.
50. **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
51. **DeGrandis S, Krell P, Flett D, Stevenson R. 1988.** Deoxyribonucleic Acid Relatedness of Serovars of *Yersinia ruckeri*, the Enteric Redmouth Bacterium. *J. Syst. Bacteriol.* 38: 49–55.
52. **De Keukeleire S, de Bel A, Jansen Y, Janssens M, Wauters G, Piérard D. 2014.** *Yersinia ruckeri*, an unusual microorganism isolated from a human wound infection. *New Microbes New Infect.* 2: 134–135.
53. **Delshad S, Soltanian S, Sharifiyazdi H, Bossier P. 2018.** Effect of quorum quenching bacteria on growth, virulence factors and biofilm formation of *Yersinia ruckeri* in vitro and an in vivo evaluation of their probiotic effect in rainbow trout. *J Fish Dis.* 41: 1429–1438.
54. **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.
55. **Douglas I, Ruane NM, Geary M, Carroll C, Fleming GTA, McMurray J, Smith P. 2007.** The advantages of the use of discs containing single

agents in disc diffusion testing of the susceptibility on *Aeromonas salmonicida* to potentiated sulphonamides. *Aquaculture* 272: 118-125.

56. **Duman M, Altun S, Cengiz M, Saticioglu I, Buyukekiz A, Sahinturk P. 2017.** Genotyping and antimicrobial resistance genes of *Yersinia ruckeri* isolates from rainbow trout farms. *Dis Aquat Org* 125: 31–44.
57. **Eissa A, Moustafa M, Abdelaziz M, Ezzeldeen N. 2008.** *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt. *Afr. J. Aquat. Sci.* 33: 283–286.
58. **Enriques-Nuñez H, Evrard O, Kronvall G, Avendaño-Herrera R. 2012.** Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354-355: 38-44.
59. **Estrella M. 2019.** Determinación de patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* procedente de un brote de yersiniosis en truchas “arcoíris” (*Oncorhynchus mykiss*) de una piscifactoría ubicada en Charcas, Puno, Perú. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 90p.
60. **[EUCAST]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017.** Suecia: EUCAST. Procedimiento Operativo Estándar. 17p.
61. **[EUCAST]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018.** Considerations in the numerical estimation of epidemiological cutoff (ECOFF) values. 10p.
62. **[FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2014.** Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. Lima: FONDEPES. 86p.

63. **Fouz B, Zarza C, Amaro C. 2006.** First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. J. Fish Dis. 29: 339–346.
64. **Garcia JA, Dominguez L, Larsen JL, Pedersen K. 1998.** Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. J Appl Microbiol 85:949–955.
65. **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. Appl Environ Microbiol 65:346–350.
66. **Gibello A, Concepción M, Mar M, Vela A, Liébana P, Moreno M, Fernández-Garaizábal J, Dominguez M. 2004.** Analysis of the *gyrA* Gene of Clinical *Yersinia ruckeri* Isolates with Reduced Susceptibility to Quinolones. Appl Environ Microbiol 70(1): 599-602.
67. **Glenn RA, Taylor PW, Hanson KC. 2011.** The use of a real-time PCR primer/probe set to observe infectivity of *Yersinia ruckeri* in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), and steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 34(10): 783-791.
68. **Gobierno Regional de Junin. 2010.** Desarrollo de la Acuicultura Continental de aguas frías de la Región Junin. . [Internet].[Acceso: 30 julio 2019].

Disponibile:http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/TALLER_AC/ponencias/2%20Desarrollo%20de%20la%20acuicultura%20en%20Jun%C3%ADn.pdf.

69. **Gu C, Karthikeyan K. 2008.** Sorption of antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *J Environ Qual* 37: 704-711.
70. **Guardiola F, Cerezuela R, Meseguer J, Esteban M. 2012.** Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream (*Sparus aurata L*) by dietary administration of OTC. *Aquaculture* 51-57: 334-337.
71. **Gudmundsdottir B, Gudmundsdottir S, Gudmundsdottir S, Magnadottir B. 2014.** Yersiniosis in Atlantic cod, *Gadus morhua* (L.), characterization of the infective strain and host reactions. *J. Fish Dis.* 37: 511–519.
72. **Henriquez-Nuñez H, Evrard O, Kronvall G, Avendaño-Herrera R. 2012.** Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354–355: 38–44.
73. **Hentschel D, Park K, Cilenti L, Zervos A, Drummond I, Bonventre J. 2005.** Acute renal in zebrafish: a novel system to study a complex disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: 923-929.
74. **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.
75. **Huang Y, Jung A, Schäfer W, Mock D, Michael GB, Runge M, Schwarz S, Steinhagen D. 2015.** Analysis of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout farms in northwest Germany. *Dis. Aquat. Organ.* 116: 243–249.

76. **Hurtado C. 2019.** Caracterización fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana de *Aeromonas salmonicida* aisladas de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de provenientes de cuatro regiones de la sierra del Perú. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 73p.
77. **Irianto A, Austin B. 2002.** Probiotics in aquaculture. J Fish Dis 25:633–642
78. **Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. 2008.** Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274, 1–14.
79. **Kim DH, Austin B. 2006.** Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. Fish Shellfish Immunol 21:513–524
80. **Kim DH, Choi SY, Kim CS, Oh MJ, Jeong HD. 2013.** Low-value fish used as feed in aquaculture were a source of furunculosis caused by atypical *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 408-409: 113-117.
81. **Kolarevic S, Milovanovic D, Avdovic M, Oalde M, Kostic J, Sunjog K, Nikolic B, Knezevic-Vukcevic J, Vukovic-Gacic B. 2016.** Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. Bot Serb 40: 29-36.
82. **Korbut R, Mehrdana F, Kania PW, Larsen MH, Frees D, Dalsgaard I, Jørgensen LVG. 2016.** Antigen Uptake during Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*) Using a GFP-Tagged *Yersinia ruckeri*. PLoS ONE 11: e0158968.

83. **Kronvall G. 2003.** Determination of the real standard distribution of susceptible strains in zone histograms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22: 7–13.
84. **Kronvall G. 2010.** Normalized resistance interpretation as a tool for establishing epidemiological MIC susceptibility breakpoints. *J. Clin. Microbiol.* 48: 4445–4452.
85. **Kronvall G, Smith P. 2016.** Normalized resistance interpretation, the NRI method Review of NRI disc test applications and guide to calculations. *APMIS* 124: 1023–1030.
86. **Kronvall G, Giske CG, Kahlmetter G. 2011.** Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disc diffusion. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38: 281–290.
87. **Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet Res* 46: 103.
88. **Kumar G, Hummel K, Welch T, Razzazi-Fazeli E, El-Matbouli M. 2017.** Global proteomic profiling of *Yersinia ruckeri* strains. *Vet Res* 48:55.
89. **Kummerer K. 2009.** Antibiotics in the aquatic environment—A review -Part I. *Chemosphere* 75: 417-434.
90. **Kummerer K, Al-Ahmad A, Mersch-Sundermann V. 2000.** Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere* 40: 701-710.

91. **Lejeune JR, Rurangirwa FR. 2000.** Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. J Vet Diagn Investig 12:558–561.
92. **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 24: 1153-1161.
93. **Lunden T, Bylund G. 2000.** The influence of in vitro and in vivo exposure to antibiotics on mitogen-induced proliferation of lymphoid cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shelfish Immunol 10: 395-404
94. **Manna SK, Samanta S, Das MK, Mishra SS. 2003.** An outbreak of *Yersinia ruckeri* septicemia in Indian major carps. J Inland Fish Soc India 35:28–31.
95. **Martínez J. 2008.** Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. Science. 321: 365-367.
96. **Mateo E, Castro T, Sierralta V, Mateo D. 2017.** Bacteriological and histopathological study of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in Peru. J Fish Dis 40: 941–946.
97. **Menanteau-Ledouble S, Lawrence M, El-matbouli M. 2018.** Invasion and replication of *Yersinia ruckeri* in fish cell cultures. BMC Vet. Res. 14: 81.
98. **Mesias F. 2019.** Análisis genotípico y fenotípico de la resistencia antimicrobiana de *Yersinia ruckeri* procedente de truchas arcoíris

- (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de cuatro departamentos de la sierra del Perú. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 77p.
- 99. Mesias F, Gerpe D, Llanco L, Serrano-Martinez E, Romalde J. 2020.** Draft Genome Sequence of *Yersinia ruckeri* Strain FMV-22, Isolated from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. Microbiol Resour Announc 9:e01389-19.
- 100. Mesias F, Vargas M, Cueva A, Manchego A, Sandoval N. 2019.** Patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* de un brote de yersiniosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Huaraz, Perú. Rev Inv Vet Perú 30(1): 387-403.
- 101. 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: 1008–1015.
- 102. Miller RA, Walker RD, Carson J, Coles M, Coyne R, Dalsgaard I, Giesecker C, Hsu HM, Mathers JJ, Papapetropoulou M, Petty B, Teitzel C, Reimschuessel R. 2005.** Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. Dis Aquat Org 64: 211–222.
- 103. [MINAM]. Ministerio del Ambiente. 2014.** Guía para muestreo de suelos. Lima: MINAM. Serie de Informes Técnicos. 39p.
- 104. Montesinos J. 2018.** Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en centros de cultivo del Lago Titicaca. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 106p.

105. **Moreau E, Thomas T, Brevet M, Thorin C, Fournel C, Calvez S. 2019.** Mutations involved in the emergence of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in France. *Transbound. Emerg. Dis.* 66: 1387–1394.
106. **Navas E, Bohle H, Henríquez P, Grothusen H, Bustamante F, Bustos P, Mancilla M. 2014.** Draft genome sequence of the fish pathogen *Yersinia ruckeri* strain 37551, serotype O1b, isolated from diseased, vaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Chile. *Genome Announc* 2:e00858–14.
107. **Ngo T, Smith P, Bartie K, Kim T, Verner-Jeffreys D, Hoare R, Adams A. 2017.** Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from the United Kingdom. *J Fish Dis.* 41(2):309-320.
108. **[OIE]. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2009.** Código Sanitario para los animales acuáticos. Paris: OIE. Serie de Informes Técnicos. 316p.
109. **[OIE]. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2015.** Normas, directrices y resolución de la OIE en materia de la resistencia a los antimicrobianos y del uso de agentes antimicrobianos. Paris: OIE. Serie de Informes Técnicos. 71p.
110. **[OIE]. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2019.** Lista de los agentes antimicrobianos importantes para la Medicina Veterinaria. [Internet][Acceso 26 noviembre 2019]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf.

111. **O’Leary P. 1977.** Enteric Redmouth Bacterium of Salmonids: A Biochemical and Serological Comparison of Selected Isolates. Master’s Thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, USA. p. 93.
112. **Olesen NJ. 1991.** Detection of the antibody response in rainbow trout following immersion vaccination with *Yersinia ruckeri* bacterins by ELISA and passive immunization. J Appl Ichthyol 7 (1): 36-43.
113. **Ohtani M, Villumsen KR, Koppang EO, Raida MK. 2015.** Global 3D Imaging of *Yersinia ruckeri* Bacterin Uptake in Rainbow Trout Fry. PLoS ONE 10(2): e0117263.
114. **Ohtani M, Villumsen K, Strøm H, Raida M. 2014.** 3D visualization of the initial *Yersinia ruckeri* infection route in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by optical projection tomography. PLoS ONE 9: e89672.
115. **Ormsby MJ, Caws T, Burchmore R, Wallis T, Verner-Jeffreys DW, Davies RL. 2016.** *Yersinia ruckeri* Isolates Recovered from Diseased Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Scotland Are More Diverse than Those from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Represent Distinct Subpopulations. Appl Environ Microbiol 82:5785–5794.
116. **Orozova P, Chikova V, Sirakov I. 2014.** Diagnostics and antibiotic resistance of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout fish farms in Bulgaria. Int J Dev Res 4(12): 2727-2733.
117. **Parrado M, Salas, MC, Hernández-Arévalo G, Ortega P, Yossa MI. 2014.** Variedad bacteriana en los cultivos piscícolas y su resistencia a antibacterianos. ORINOQUIA 18(1), 237-246.

118. [PN-ACUI]. **Programa Nacional de Sanidad Acuicola. 2012.** Procedimiento para la toma y envío de muestras de especies de acuicultura. SENASA-Costa Rica. p: 3-4.
119. **Popović N, Hacmanjek M, Teskeredžić E. 2001.** Health status of rudd (*Scardinius erythrophthalmus hesperidicus* H.) in Lake Vrana on the Island of Cres, Croatia. *J. Appl. Ichthyol.* 17: 43–45.
120. [PRODUCE]. **Ministerio de Producción. 2010.** Elaboración de un estudio de mercado de la trucha en Arequipa, Cusco, Lima, Huancayo y Puno. Lima: Maximixe. Informe Técnico. 24p.
121. [PRODUCE]. **Ministerio de Producción. 2018.** Anuario Estadístico Pesquero y Acuicola 2017. Lima: PRODUCE. Oficina de Estudios Económicos. 205p.
122. **Pucci G, Acuña A, Llanes M, Tiedemann M, Pucci O. 2009.** Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Rev Biol Mar Oceanogr* 44: 49-58.
123. **Raida MK, 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.
124. **Raida MK, Larsen JL, Nielsen ME, Buchmann K. 2003.** Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *J Fish Dis* 26:495–498.

125. **Reda R, Ibrahim R, Ahmed E, El-Bouhy Z. 2013.** Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. Egypt J Aquat Res 39:241-248.
126. **Rigos G, Troisi G. 2005.** Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming a synopsis of drugs pharmacokinetics in important Euryhaline fish species and possible environmental implications. Rev Fish Biol Fisheries 15: 53-73.
127. **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.
128. **Rodgers CJ. 2001.** Resistance of *Yersinia ruckeri* to anti - microbial agents in vitro. Aquaculture 196: 325–345
129. **Rodgers CJ, Austin B. 1983.** Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. Vet Rec. 112(4): 83.
130. **Romalde JL, Magariños B, Barja JL, Toranzo AE. 1993.** Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri*: proposal for a new intraspecies classification. Syst Appl Microbiol 16:411–419.
131. **Ruane N, Douglas I, Geary M, Carroll C, Fleming G, Smith P. 2007.** Application of normalised resistance interpretation to disc diffusion data on the susceptibility of *Aeromonas salmonicida* to three quinolone agents. Aquaculture 272: 156–167
132. **Ruiz L. 2012.** Estado de la acuicultura en el Perú. AquaTIC 37: 99-106.

133. **Ryckaert J, Bossier P, D'herde K, Diez-fraile A, Sorgeloos P, Haesebrouck F, Pasmans F. 2010.** Persistence of *Yersinia ruckeri* in trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 29: 648-655.
134. **Saldarriaga M, Regalado F. 2017.** Potencial Acuícola en el Perú. *Moneda* 172: 34-39.
135. **Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. 2008.** Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *BMC Vet Res* 4:31.
136. **Samanidou V, Evaggelopoulou E. 2007.** Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish. *J Sep Sci* 30: 2549-2569.
137. **Sanchez C. 2018.** Detección molecular y fenotípica de resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* aisladas de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos. Tesis de Maestría. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 56p.
138. **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.
139. **[SANIPES]. Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016a.** Indicadores sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación. Lima: SANIPES. Resolución de Dirección Ejecutiva. 76p.

140. [SANIPES]. **Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016b.** Programa Oficial de Vigilancia y Control de Enfermedades en Animales Acuáticos. Lima: SANIPES. Informe Técnico. 12p.
141. [SANIPES]. **Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016c.** Protocolo Técnico de registro sanitario de producto veterinario de uso en acuicultura producto importado N° PTRSI-PV-007-16-SANIPES. Lima: SANIPES. Informe Técnico. 1p.
142. [SANIPES]. **Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2017.** Informe N° 024-2017 SANIPES/DSNPA/SDIP. Lima: SANIPES. Informe Técnico. 4p.
143. **Schmidt A, Bruun M, Dalsgaard I, Pedersen K, Larsen J. 2000.** Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied and Environmental Microbiol* 66(11): 4908–4915.
144. **Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. 2010.** Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet. Microbiol* 141: 1–4.
145. **Serrano PH. 2005.** Responsible use of antibiotics in aquaculture. Fisheries Technical Paper 469. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome.
146. **Shah SQA, Karatas S, Nilsen H, Steinum TM, Colquhoun DJ, Sørum 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* 350–353:37–41.

147. **Shaowu L, Di W, Hongbai L, Tongyan L. 2013.** Isolation of *Yersinia ruckeri* strain H01 from farm-raised amur sturgeon *Acipenser schrencki* in China. *J Aquat Anim Health* 25:9–14
148. **Sierralta V, León J, De Blas I, Bastardo A, Romalde J, Castro T, Mateo E. 2013.** Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. *Rev AquaTIC* 38: 28-45.
149. **Sirvas-Cornejo S, Sanchez-Robinet C, Peña-Dominguez 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.
150. **Siwicki AK, Morand M, Fuller JC Jr, Nissen S, Goryczko K, Ostaszewski P, Kazun K, Glompski E. 2003.** Influence of feeding the leucine metabolate β -hydroxy β -methyl butyrate (HMB) on the nonspecific cellular and humoral defence mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.* 19: 44-48.
151. **Siwicki AK, Morand M, Fuller JC Jr, Nissen S, Kazun K, Glompski F. 2001.** Influence of HMB (β -hydroxy- β -methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after in vitro and in vivo immunization with the anti-*Yersinia ruckeri* vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research* 32: 491–498.
152. **Smith AM, Goldring OL, Dear G. 1987.** The production and methods of use of polyclonal antisera to the pathogenic organisms *Aeromonas*

salmonicida, *Yersinia ruckeri* and *Renibacterium salmoninarum*. J Fish Biol 31:225–226.

153. **Smith P. 2008.** Antimicrobial resistance in aquaculture. In: Bernoth EM, editor. Changing Trends in Managing Aquatic Animal Disease Emergencies. Vol 27. Paris: OIE. p 243–264.
154. **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.
155. **Smith P, Douglas I, McMurray J, Carroll C. 2009.** A rapid method of improving the criteria being used to interpret disc diffusion antimicrobial susceptibility test data for bacteria associated with fish diseases. Aquaculture 290: 172–178.
156. **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: 168-179.
157. **Smith P, Schwarz T, Verner-Jeffreys D. 2012.** Use of normalised resistance analyses to set interpretive criteria for antibiotic disc diffusion data produce by *Aeromonas* spp. Aquaculture 326-329: 27-35.
158. **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):143-54.

- 159. 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.
- 160. Sørum H. 2006.** Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Aarestrup, F.M. (ed). Washington, DC, USA: American Society for Microbiology Press. pp. 213–238 (Chapter 13).
- 161. Sousa JA, Magariños B, Eiras JC, Toranzo AE, Romalde JL. 2001.** Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *J Fish Dis* 24:151–159.
- 162. Standish I, Erickson S, Kleman E, McCann R, Katona R, Leis E. 2018.** *Yersinia ruckeri* Isolated from Common Mudpuppy *Necturus maculosus*. *J. Aquat. Anim. Health* 31: 71–74.
- 163. Stevenson R, Airdrie R. 1984.** Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *J. Fish Dis.* 7: 247–254.
- 164. Tinsley JW, Lyndon AR, 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 Appl Microbiol* 111:8–16.
- 165. Tobback E, Decostere, A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007.** *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.* 30: 257–268.
- 166. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Ryckaert J, Duchateau L, Haesebrouck F, Chiers K. 2009.** Route of entry and tissue distribution of

Yersinia ruckeri in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 84: 219–228.

167. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, van den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010.** In Vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. J. Fish Dis. 33: 197–209.
168. **Trushenski J, Aardsma M, Barry K, Bowker J, Jackson C, Jakaitis M, McClure R, Rombenso A. 2018.** Oxytetracycline does not cause growth promotion in finfish. J Anim Sci 96: 1667-1677.
169. **Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G. 2006.** Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. Clin Microbiol Infect 12(5):418-425.
170. **Uhland CR. 2010.** Characterization of Antimicrobial Resistance in *Aeromonas* and *Vibrio* isolated in Canada from fish and seafood. Master Thesis. Montreal University.
171. **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.
172. **Villumsen KR, Neumann L, Ohtani M, Strøm HK, Raida MK. 2014.** Oral and anal vaccination confers full protection against enteric redmouth (disease (ERM) in rainbow trout. PLoS One 9:e93845
173. **Wheeler R, Davies RL, Dalsgaard I, Garcia J, Welch TJ, Wagley S, Bateman KS, Verner-Jeffreys DW. 2009.** *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. Dis. Aquat. Organ. 84: 25–33.

- 174. Wrobel A, Leo J, Linke D. 2019.** Overcoming Fish Defences: The Virulence Factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes* 10(9): 1-20.
- 175. Zorriehzahra M, Adel M, Delshad ST. 2017.** Enteric redmouth disease: Past, present and future: A review. *Iran. J. Fish. Sci.* 16: 1135–1156.