



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA
DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA
MEDIADA POR BUCLES (LAMP)
DÚPLEX PARA LA DETECCIÓN
SIMULTANEA DE AEROMONAS
SALMONICIDA Y YERSINIA RUCKERI
EN CEPAS AISLADAS DE
ONCORYNCHUS MYKISS “TRUCHA
ARCOÍRIS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN SANIDAD ACUÍCOLA

MARÍA YENY YUPANQUI ARIAS

Lima – Perú

2022

ASESOR DE TESIS

Dr. MSc. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

CO ASESOR DE TESIS

MSc. MV. César Abel Burga Cisterna

JURADO DE TESIS

Dr. CARLOS MARTÍN SHIVA RAMAYONI
PRESIDENTE

Dr. JORGE ENRIQUE RODRÍGUEZ BAILON
VOCAL

Mg. CIELO AYDELI LLERENA ZAVALA
SECRETARIA

DEDICATORIA

*A Dios, quien cada día me brinda una oportunidad más para
lograr objetivos y metas que dignifican mi persona.*

*A mis padres, quienes han contribuido en mi desarrollo
personal y profesional.*

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola patrocinado por FONDECYT - CONCYTEC y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, que otorgaron todas las facilidades para culminar esta etapa profesional.

Al Dr. MSc. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez y MSc. MV. César Abel Burga Cisterna, por ayudarme a dirigir este proyecto de investigación y a la vez compartir sus conocimientos.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La ejecución de esta tesis de investigación, ha sido posible gracias al apoyo financiero de FONDECYT-CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015- FONDECYT-- PROMOCION 3).

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III.	MARCO TEÓRICO	6
3.1.	Aeromonas salmonicida	6
3.2.	Yersinia ruckeri	6
3.3.	Sintomatología de Furunculosis y Yersiniosis	8
3.4.	Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle	9
3.5.	Proceso de amplificación LAMP	12
IV.	JUSTIFICACIÓN	13
V.	HIPÓTESIS	14
VI.	OBJETIVOS	15
6.1.	Objetivo general	15
6.2.	Objetivos específicos	15
VII.	METODOLOGÍA	16
7.1.	Diseño de estudio	16
7.2.	Metodología de trabajo	16
7.2.1.	DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES LAMP DÚPLEX	16
7.2.1.1.	Diseño de primers para LAMP Dúplex	16
7.2.1.2.	Criterios para el diseño y selección de primers LAMP	17
7.2.1.3.	Análisis de especificidad in silico de primers LAMP	18
7.2.1.4.	Análisis de estructuras secundarias de los primers	18
7.2.2.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS ADN CONTROL	19
7.2.2.1.	Reactivación de cepas bacterianas	19
7.2.2.2.	Extracción de ADN bacteriano	19
7.2.2.3.	Confirmación de cepas control por PCR Técnica Gold Estándar	19
7.2.3.	PROCESO DE LA REACCIÓN TÍPICA LAMP	21
7.2.4.	DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LAMP DÚPLEX	23
7.2.5.	OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO LAMP DÚPLEX	24
7.2.5.1.	Optimización de las condiciones de amplificación LAMP Dúplex	24

7.2.4.3.	Evidencia de targets con enzimas de restricción	25
7.2.6.	EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LOS PRIMERS LAMP	25
7.2.5.1.	Determinación de la especificidad analítica	25
7.2.5.2.	Determinación de la sensibilidad analítica	26
7.2.7.	RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE PCR vs LAMP DÚPLEX EN CEPAS PRESUNTIVAS	26
7.2.7.1.	Aplicación de PCR en la detección de cepas presuntivas de <i>A. salmonicida</i> y <i>Y. ruckeri</i>	26
7.2.7.2.	Aplicación de LAMP dúplex en la detección de cepas presuntivas de <i>A. salmonicida</i> y <i>Y. ruckeri</i>	26
7.2.8.	PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS	27
VIII.	RESULTADOS	28
8.1.	Análisis <i>in silico</i> de primers LAMP candidatos	28
8.2.	Análisis de estructuras secundarias	28
8.3.	Obtención de muestras de ADN control	30
8.4.	Proceso de la reacción típica LAMP	30
8.5.	Desarrollo de un protocolo para LAMP dúplex	31
8.6.	Optimización de un protocolo para LAMP dúplex	33
8.6.1.	EVIDENCIA DE TARGETS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	34
8.7.	Evaluación de especificidad y sensibilidad analítica de los primers LAMP	36
8.7.1.	ESPECIFICIDAD ANALÍTICA	36
8.6.1.	SENSIBILIDAD ANALÍTICA	36
8.7.	Resultados de la detección de PCR vs LAMP dúplex en cepas presuntivas	39
8.7.1.	APLICACIÓN DE PCR EN LA DETECCIÓN DE CEPAS PRESUNTIVAS DE <i>A. SALMONICIDA</i> Y <i>Y. RUCKERI</i>	39
8.7.2.	APLICACIÓN DE LAMP DÚPLEX EN LA DETECCIÓN DE CEPAS PRESUNTIVAS DE <i>A. SALMONICIDA</i> Y <i>Y. RUCKERI</i>	39
IX.	DISCUSIÓN	41
X.	CONCLUSIONES	46
XI.	RECOMENDACIONES	47
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificaciones técnicas para el diseño primers LAMP: tamaño y Tm.	18
Tabla 2. Especificaciones técnicas para el diseño de primers LAMP: distancia entre primers.....	18
Tabla 3. Reconstitución de los primers diseñados a una concentración 10X.	22
Tabla 4. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales de los reactivos para una solución madre de LAMP MIX 2X.....	22
Tabla 5. Formulación planteada en una reacción típica de LAMP, en un volumen final de 10 µL.	23
Tabla 6. Formulación para en una reacción LAMP dúplex, en un volumen final de 10 µL.	24
Tabla 7.. Características de los sets de primers sintetizados: A. salmonicida (AER1 – AER2) Y. ruckeri (YER1 – YER2)	29
Tabla 8. Resultados de las pruebas de detección de las cepas presuntivas de A. salmonicida y Y. ruckeri, ensayadas en PCR, LAMP simple y LAMP dúplex....	40

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Análisis de las estructuras secundarias de los sets AER2-YER2 resultados de Multiple Primer Analyzer.	28
Figura 2. Desempeño de los sets de primers en una reacción típica de LAMP: A1+ (AER1 control positivo), A1- (AER1 blanco), A2+ (AER1 control positivo), A2- (AER1 blanco), Y1+ (YER1 control positivo), Y1- (YER1 blanco), Y2+ (YER2 control positivo), Y2- (YER2 blanco).....	30
Figura 3. Revelación de la amplificación de primers LAMP: A1- (AER1 blanco), A1+ (AER1 control positivo), A2- (AER1 blanco), A2+ (AER1 control positivo), Y1- (YER1 blanco), Y1+ (YER1 control positivo), Y2- (YER2 blanco), Y2+(YER2 control positivo).....	31
Figura 4. Desempeño de la combinación de sets de primers AER2-YER1 y AER2- YER2 en un protocolo de reacción LAMP dúplex.	31
Figura 5. Desempeño de la combinación de sets de primers AER1-YER1, AER1- YER2 en un protocolo de reacción LAMP dúplex.	32
Figura 6. Revelación de la amplificación de los primers LAMP en una reacción dúplex: A2Y1-(blanco), A2Y1+ (control positivo), A2Y2- (blanco), A2Y2+ (control positivo), A1Y1- (blanco), A1Y1+ (control positivo), A1Y2- (blanco), A1Y2+ (control positivo).....	32
Figura 7. Concentración de la enzima Bst 2.0 ADN polimerasa ensayadas en una reacción LAMP dúplex.	33
Figura 8. Temperaturas de amplificación evaluadas en una reacción LAMP dúplex con la combinación de primers AER2-YER2.	33

Figura 9. Tiempos de amplificación evaluadas en una reacción LAMP simple para los sets de primers AER2 y YER2.	34
Figura 10. Digestión enzimática de amplicones LAMP: AER2 (digestión de amplicones de AER2), YER2 (digestión de amplicones de YER2), digestión de amplicones LAMP dúplex AER2-YER2 resultantes de la amplificación a 60, 61, 62, 63, 64, 65°C.	35
Figura 11. Desempeño de los primers LAMP forward (F3) y reverse (B3) en reacción PCR: PCR As (primers PCR para <i>A. salmonicida</i>), PCR Yr (primers PCR para <i>Y. ruckeri</i>), LAMP BA (blanco primers de AER2), LAMP As (control positivo primers de AER2), LAMP BY (blanco primers YER2), LAMP Yr (control positivo primers de YER2).....	35
Figura 12. Especificidad analítica de los sets de primers: AER1, AER2, YER1 y YER2 con, <i>A. caviae</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>E. coli</i> , Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, <i>F. psychrophilum</i> , <i>R. salmoninarum</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	1
Figura 13. Sensibilidad analítica de la técnica Gold Estándar PCR (10^{-10}): a. Panel de dilución de <i>A. salmonicida</i> b. Panel de dilución de <i>Y. ruckeri</i>	38
Figura 14. Sensibilidad analítica del set de primers AER2 y YER2 (10^{-10}): B (blanco), 1-10 (diluciones).....	38
Figura 15. Sensibilidad analítica revelada mediante electroforesis: (a) Sensibilidad analítica de set de primers AER2 para <i>A. salmonicida</i> , (b) Sensibilidad analítica del set primers YER2 para <i>Y. ruckeri</i>	38

RESUMEN

Aeromonas salmonicida y *Yersinia ruckeri* son bacterias patógenas de Trucha arcoíris; su detección temprana mediante el uso de pruebas de diagnóstico es fundamental para evitar la propagación bacteriana y la mortalidad excesiva en los sistemas de producción. Sin embargo, el uso de pruebas de diagnóstico no se realiza debido a que son costosas, requieren de laboratorios sofisticados y se realizan en ciudades alejadas de los centros de producción. Por ello, este trabajo tuvo como objetivo estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP), una prueba de diagnóstico molecular rápido altamente sensible y de bajo costo, para detectar simultáneamente *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* en cepas aisladas de Trucha arcoíris. Se diseñó primers LAMP para la detección de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* mediante los genes *vapA* y *rucC-rupB*, respectivamente. Se elaboró un protocolo LAMP DÚPLEX corrido a 60°C durante 60 min y detenido a 80°C por 10 min. Los primers fueron específicos para *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, no observándose reacciones cruzadas con *Aeromonas hydrophila*, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum*, especies relacionadas con enfermedades infecciosas de Trucha arcoíris. Además, de *Staphylococcus aureus*, *Echerenchia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolítica*, especies bacterianas relacionadas con la contaminación ambiental y de manipulación. Finalmente, la sensibilidad analítica de LAMP fue superior a la técnica gold estándar PCR.

Palabras claves: Amplificación isotérmica, detección, *Yersinia ruckeri* y *Aeromonas salmonicida*, *Onchorynchus mykiss*

ABSTRACT

Aeromonas salmonicida and *Yersinia ruckeri* are pathogenic bacteria of rainbow trout; Its early detection through the use of diagnostic tests is essential to avoid bacterial spread and excessive mortality in production systems. However, the use of diagnostic tests are not implements because they are expensive, require sophisticated laboratories and are carried out in cities far from production centers. Therefore, this work aimed to standardize the Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique, a highly sensitive and inexpensive rapid molecular diagnostic test, to simultaneously detect *A. salmonicida* and *Y. ruckeri* in isolated strains of rainbow trout. LAMP primers were designed for the detection of *A. salmonicida* and *Y. ruckeri* through the *vapA* and *rucC-rupB* genes, respectively. A LAMP DUPLEX protocol was developed, running at 60°C for 60 min and stopped at 80°C for 10 min. The primers were specific for *A. salmonicida* and *Y. ruckeri*, not observing cross-reactions with *Aeromonas hydrophila*, Infectious Pancreatic Necrosis Virus, *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum*, species related to infectious diseases of rainbow trout. In addition, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia enterocolitica*, bacterial species related to environmental contamination and handling. Finally, the analytical sensitivity of LAMP was superior to the gold standard PCR technique.

Key words: Isothermal amplification, detection, *Yersinia ruckeri* and *Aeromonas salmonicida*, *Onchorynchus mykiss*.

I. INTRODUCCIÓN

Oncorhynchus mykiss “Trucha arcoíris” es la especie dulceacuícola más importante de la acuicultura peruana, fue introducida en la Oroya en 1952 por la empresa Cerro de Pasco Copper Corporation, quien inició el proceso de reincubación y cultivo por primera vez en Perú (FONDEPES, 2014) desde ese entonces, el cultivo se empezó a masificar en la sierra peruana.

Hasta el momento, esa especie ha logrado posicionarse en los mercados de Estados Unidos, Japón y Rusia (PromPerú, 2018). De ellos el mercado Estadunidense ha sido el principal importador de la producción nacional. Sin embargo, se espera tener mayor presencia en el resto de países europeos y asiáticos. De la misma manera se espera que la población nacional opte por incluir dicha especie en su dieta alimentaria, con mayor frecuencia.

Por lo antes expuesto, el cultivo de trucha arcoíris se ha convertido en una actividad económica activa que crece cada año y nuevos emprendedores están dispuestos a invertir en ella. No obstante, en la cadena productiva de Trucha arcoíris aún existen problemas que obstaculizan la eficiencia del cultivo. En ese sentido, el principal problema que se identifica es el porcentaje alto de mortalidad causado por bacterias nocivas como: *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Renibacterium salmoninarum* y *Piscirickettsia salmonis*, declaradas presentes en los sistemas de cultivo (FONDEPES, 2014). Sin embargo, no son consideradas en la lista de patógenos de reporte obligatorio de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2000).

En los últimos tiempos se reportan problemas sanitarios, principalmente ocasionados por la presencia de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* (Távora, 2019). Donde el control y manejo acarrearán altos costos de producción, además del uso inapropiado de antibióticos que generan daño ambiental en los cuerpos de agua. Para enfrentar el problema, se recomienda incluir en el Plan de Manejo Sanitario, el monitoreo constante de la presencia de bacterias patógenas a fin de aislar y tratar lotes contaminados, y así evitar la proliferación bacteriana en todo el sistema productivo. Pero esto no se realiza debido a que, el monitoreo y la detección bacteriana incurre en aumentar costos de producción.

Los métodos de detección que comúnmente usan los laboratorios son: ensayos microbiológicos, técnicas de detección de anticuerpos monoclonales ligados a enzimas, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), presentan algunos inconvenientes como: tiempo prolongado en los análisis microbiológicos, sensibilidad limitada en la detección de anticuerpos en portadores asintomáticos, y alto costo de los análisis por PCR, son puntos críticos que deben superar las técnicas de diagnóstico para ser eficientes.

En ese contexto, Notomi *et al.*, (2000) crearon la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP). Es un ensayo de detección rápida que ofrece superar las dificultades identificadas en las técnicas de detección antes mencionadas. LAMP se enfoca en la detección de ácidos nucleicos en condiciones isotérmicas, y afianzada en el uso de seis cebadores, responsables de la sensibilidad y especificidad. De esta manera LAMP convierte en una de las mejores opciones en el desarrollo de pruebas rápidas.

El método fue creado, patentado y aceptado por la comunidad científica en Japón, y debido a sus ventajas ha sido reproducida en diferentes países, para la detección de diversos agentes infecciosos en salud humana, animal y vegetal. Así mismo, ha sido desarrollado para la detección de *A. salmonicida* (Kulkarni *et al.*, 2009) y *Y. ruckeri* (Saleh *et al.*, 2008). Ambos trabajos fueron desarrollados para la detección individual y en realidades diferentes al cultivo nacional.

Kulkarni *et al.*, (2009) desarrollo LAMP para la detección de *A. salmonicida* en Bacalao atlántico en piscigranjas de Noruega y Saleh *et al.*, (2008) desarrollo LAMP para la detección de *Y. ruckeri* en salmón, especies y sistemas de cultivos distintos a las de Perú, y eso limita la reproducción de la técnica para su uso, ya que la OIE 2018 en su Capítulo de Principios y Métodos de Validación de la Pruebas de Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas indica que las pruebas deben desarrollarse para la especie en que se va utilizar, ya que cada especie acuática mantiene características genéticas propias que lo hacen más o menos resistente a un patógeno y éste último puede crear diversas rutas de la invasión entonces, las secuencias diana que se usen en una detección pueden ser útiles o no, en otras zonas de cultivo. En ese sentido, es necesario desarrollar pruebas de detección propias para la especie objetivo.

Por ello, este trabajo de investigación se propuso estandarizar la técnica LAMP en una versión dúplex para la detección simultánea de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* en cepas aisladas de Trucha arcoíris. Esto es muy ventajoso pues, permite evaluar la viabilidad de una técnica de diagnóstico rápido para la detección de dos agentes bacterianos en una sola reacción, y a la vez obtener información sobre posibles

casos de coinfecciones, además de llegar a ser una herramienta auxiliar a las pruebas microbiológicas.

Con este trabajo también se espera promover el desarrollo, validación y uso de métodos de detección molecular, que sean fáciles de ejecutar e implementar, y así hacer uso de pruebas de detección con mayor frecuencia, en los centros de cultivo.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aeromonas salmonicida y *Yersinia ruckeri* son bacterias cocobacilares gram negativas, patógenas de Trucha arcoíris. La sintomatología que se observa en organismos infectados es indiferenciable en estadios tempranos de crecimiento. Por ello, la detección rápida y monitoreo de esas bacterias es indispensable para evitar brotes significativos. Sin embargo, las técnicas de detección de ambas bacterias son laboriosas, toman tiempo, son costosas y muchas de ellas se realizan en laboratorios sofisticados, entonces es necesario buscar técnicas de detección rápida que superen las limitaciones de las pruebas convencionales.

En ese sentido, diversas técnicas han sido creadas para superar aspectos logísticos y económicos. La técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) dúplex, es una técnica promisoría, desarrollada para la detección molecular de uno o más bacterias, virus, hongos, parásitos haciendo uso de equipos básicos de laboratorio. En el sector acuícola aún no se ha registrado la estandarización de ese tipo de técnica que determinen su factibilidad.

De acuerdo a ello el problema de investigación fue analizar si con la estandarización de la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) dúplex se logra detectar simultáneamente *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Aeromonas salmonicida*

El género *Aeromonas* son bacterias gram negativas, anaerobias facultativas, pueden presentar motilidad o no, algunas son mesófilas o psicrófilas. Se encuentran en aguas dulces y marinas, y han sido aisladas de especies acuáticas, animales de sangre caliente y poiquilotermo. Dentro de ese género se ubica la especie *A. salmonicida* una bacteria sin motilidad y psicrófila (Dallaire-Dufresne *et al.*, 2013).

De la especie se han identificado 5 subespecies: *salmonicida*, *masoucida*, *smithia*, *achromogenes* y *pectinolytica* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). De ellas Austin *et al.*, 1998 consideró la subespecie *A. salmonicida subsp. salmonicida*, como una cepa típica y el resto de especies las consideró como "atípicas" debido a sus diferentes características fenotípicas entre cepas.

Responsables de la infección llamada Aeromoniasis o Forunculosis en salmónidos, y caracterizada por generan septicemias, úlceras en la piel y hemorragias en peces (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2012).

3.2. *Yersinia ruckeri*

Y. ruckeri, es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, no forman esporas y no tienen capsula, y algunas cepas presentan flagelo (Ross *et al.*, 1966). Se clasifica por biotipo, serotipo y por proteínas presentes en la membrana externa.

Según el biotipo tenemos al biotipo I y II. Las cepas del biotipo I son móviles y secretoras de lipasa (Tween 20); por el contrario, las cepas del biotipo II, son negativas a ambas características (Toback *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015). Según

Romalde *et al.*, (1993) la clasificaron a *Y. ruckeri* en cuatro serotipos: serotipo O1, el cual es predominante a nivel mundial, subdividido en dos subgrupos O1a (serovar I) y O1b (serovar III); serotipo O2 (serovar II), subdividido en tres subgrupos (O2a, O2b y O2c); serotipo O3 (serovar V) y serotipo O4 (serovar VI). Según el perfil de proteínas de membrana externa (OMP), Davies (1991) clasificó a *Y. ruckeri* en cinco perfiles de OMP (OMP-1 al OMP-5). Lo que generan alta variabilidad genética entre cepas de una misma especie.

Distribuida en Norteamérica, Europa, Medio Oriente y Sudamérica; así como algunos países de Asia, África y Oceanía (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011). También ha sido aislada en: anguilas, carpas, esturiones, goldfish, lenguados, bagres, entre otros (Barnes, 2011; Austin y Austin, 2016). Así mismo, el patógeno se ha encontrado en animales terrestres como: ratas almizcleras, halcones, gaviotas, tortugas, lombrices de tierra (Tobback *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015).

En el Perú, la primera vez que se reportó *Y. ruckeri* fue en un cultivo de Trucha arcoíris, procedentes del departamento de Junín (Bravo y Kojagura, 2004); subsiguientemente, se han dados casos de Yersiniosis en diversas regiones del país como: Lima, Huancavelica, Áncash y Puno (Sirvas *et al.*, 2011; Flores; 2013; Sandoval *et al.*, 2016) y desde el 2017 se ha notificado su presencia en Pasco, Cajamarca y Amazonas (Cerro *et al.*, 2017; Castro *et al.*, 2017). Esto indica que dicha bacteria se encuentra altamente difundida.

En ese sentido, Busch y Lingg (1975) demostraron que el 25% de una población de truchas que pasaron por un proceso de infección, portaban la bacteria en sus intestinos y eran asintomáticas. Por su parte Rodgers (1992) demostró que. *Y.*

ruckeri es capaz de seguir siendo infeccioso después de un brote. Sin embargo, influye para esto también influye las condiciones del ambiente acuático y la condición saludable de las truchas (Hunter *et al.*, 1980).

3.3. Sintomatología de Furunculosis y Yersiniosis

La sintomatología clínica de las enfermedades en peces es indiferenciable en etapas tempranas de crecimiento y en fase aguda de la enfermedad. Tanto la Furunculosis y Yersiniosis se detecta en larvas, alevines y adultos de Trucha arcoíris y particularmente en etapa juvenil-adulto se registra la fase crónica de la enfermedad y desde allí se puede identificar la sintomatología característica. En peces adultos con Furunculosis se observan lesiones ulcerosas en la piel, que llegan a penetrar la musculatura (OIE, 2000). En peces adultos con Yersiniosis, se ha observado hemorragias subcutáneas dentro y alrededor de la boca, garganta y ojos (Tobback *et al.*, 2007; Barnes, 2011).

Los síntomas comunes de ambas enfermedades son: la letargia, la falta de apetito, la hiperpigmentación cutánea, exoftalmia, petequias en vísceras, esplenomegalia, palidez branquial y ascitis. No obstante, no todos los peces afectados por estas enfermedades presentan todos los síntomas clínicos, incluso peces que no demuestran síntomas pueden generar brotes bajo condiciones de estrés o medios propicios (González, 2002; Buchmann *et al.*, 2003; Raida *et al.*, 2003; Avci y Birincioglu, 2005; Arias *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2007; Tobback *et al.*, 2009; Tobback *et al.*, 2010a; Tobback *et al.*, 2010b; Austin y Austin, 2007; Bernoth *et al.*, 1997; Hiney y Olivier, 1999; Wiklund y Dalsgaard, 1998).

3.4. Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle

El método de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP) fue creado por Notomi *et al.*, (2000), con el objetivo amplificar material genético rápidamente sin la necesidad de equipos sofisticados. Esta ventaja se logró gracias al uso de la enzima *Bst* polimerasa, que tiene la capacidad de amplificar el material genético bajo condiciones isotérmicas, para el mismo fin también suele utilizarse la enzima *Bsm* polimerasa; estas enzimas han sido aisladas de *Bacillus stearothermophilus*. y *Bacillus smithii*, respectivamente. La actividad enzimática de las enzimas antes mencionadas ocurre a 60 - 65°C, además poseen la capacidad similar de una helicasa; por lo que son capaces de abrir la cadena de ADN, y desnaturalizarse sobre los 70°C. Por estas características no requieren cambios continuos de temperatura como ocurre con las enzimas de las técnicas de PCR.

La reacción LAMP ocurre bajo condiciones isotérmicas, generalmente entre los 60 y 65°C de temperatura y el tiempo puede variar entre 45 a 60 min, ulteriormente se aumenta 80°C por 2 min para finalizar la reacción (Notomi *et al.*, 2000). Como resultado se observan la formación de un precipitado blanco, que puede tomar color o producir de fluorescencia, en presencia de aditivos quelantes (Takada *et al.*, 2005).

La técnica LAMP utiliza 4 primers con diferentes etapas de amplificación en comparación a las de PCR. La primera etapa es la unión y elongación del primer en la región blanco, y la segunda es la amplificación a partir de la formación de bucles en el extremo 3'. El diseño de estos primers tiene características exclusivas y están dirigidos a distintas regiones dentro de una secuencia objetivo, a partir de ello se tiene un primer en sentido externo (F3), un primer en sentido externo reverso (B3);

un primer en sentido interno (FIP) y un primer en sentido interno reverso (BIP). Estos 4 primers reconocen 6 regiones distintas en un gen de interés. Además, cabe resaltar el diseño particular de los primers FIP y BIP, pues el primero presenta una región F2 más un espaciador de timina (TTTT) seguido de la región F1C, y el segundo se forma por una región B2 más un espaciador de timina (TTTT) seguido de la región B1C, dicho juego o set de primers es indispensable para amplificación correcta de las secuencias de ADN.

A partir de la publicación de LAMP, se ha propuesto modificaciones para mejorar su desempeño y dentro ello se halla la adición de 2 primers denominados primer bucle externo (FLP) y un primer de bucle interno (BLP), que se ubican entre las regiones F1 - F2 y B1 - B2, respectivamente. Esto origina bucles, que producen partidas adicionales para la síntesis del ADN, que logran disminuir el tiempo de amplificación (Nagamine *et al.*, 2002).

El producto final amplificado por LAMP es visualizado por la detección de la turbidez generada en la reacción. La turbidez se produce por la polimerización, es decir cuando se incorporación de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs) y se forma el pirofosfato (Mori *et al.*, 2001). No obstante, para facilitar su visualización, se ha comprobado el buen desempeño de colorantes, que producen cambios de color o fluorescencia. Por ejemplo, el Azul de hidroxinaftol (HNB), el cual cambia de color violeta a azul cielo por la quelación de iones Mg^{2+} de los dNTPs (Goto *et al.*, 2009).

La calceína también se ha usado, ya que en combinación con iones de manganeso libres tiene un efecto quelante. A medida que, el manganeso se une fuertemente al pirofosfato recién formado, la calceína se libera y se une al magnesio libre, dando

como resultado una fluorescencia verde brillante después de la excitación con luz visible o UV (Tomita *et al.*, 2008). La adición de intercalantes del ADN como SYBR Green, Eva Green o Berberina, puede hacerse durante o después del término de la reacción de LAMP siendo fácil de visualizar bajo la luz UV (Goto *et al.*, 2009).

Este método ha sido aplicado en diferentes patógenos. En la acuicultura LAMP ha sido desarrollado en países como EE.UU, Taiwan, Alemania, Japón para la detección de bacterias, virus o parasitarios. En la actividad truchicultura ha sido desarrollada para la detección viral de Septicemia Hemorrágica Viral (SHV), Necrosis Pancreática Infecciosa (NPI), Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI) (Soliman y El-Matbouli 2006; Gunimaladevi *et al.*, 2005; Soliman *et al.*, 2009), y bacterianas como Enfermedad Entérica de la Boca Roja, Forunculosis, Enfermedad Bacteriana del Riñón y Enfermedad del agua fría (Saleh *et al.*, 2008; kulkarni *et al.*, 2009; Gahlawat *et al.*, 2009; Fujiwara-Nagata y Eguchi, 2009). En dichos trabajos confirman que el ensayo LAMP supera la sensibilidad, desventajas logísticas y metodológicas de las técnicas de PCR.

En los últimos años se viene investigando nuevas formas para la detección o descarte de dos a más patógenos con una sola muestra y en una sola corrida. En esta última adaptación son muy pocas las investigaciones que se han realizado dentro del sector acuícola y hasta el momento solo se ha desarrollado, para la detección de Nodavirus y Virus Extra Pequeño en *Macrobrachium rosenbergii* (Lin *et al.*, 2018) en la detección de Virus del Síndrome de la Mancha Blanca, *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* en algunos peces y crustáceos (Yu *et al.*, 2013) para el Virus de la Necrosis Hipodérmica y Hematopoyética en *Penaeus vannamei*.

(He *et al.*, 2011). Todos ellos demuestran que el ensayo LAMP tiene cualidades para ser usado como una técnica de detección múltiple.

3.5. Proceso de amplificación LAMP

Para iniciar el proceso de amplificación en LAMP, primero la *Bst* polimerasa abre la cadena de ADN y la amplificación empieza en el extremo 5' con el ingreso de F2-F1C a su región complementaria, seguido empieza amplificar el F3, posterior a ello en el extremo 3' ingresa B2-B1C y B3, para amplificar su región complementaria. Por la característica de los primers; en sus extremos cuentan con regiones complementarias que se unen formando bucles, luego de esto el amplicon se convierte en la secuencia madre a clonar. Posteriormente el primer FLP empiezan amplificar y elongar a partir del bucle en el extremo 5' y BLP realiza lo mismo, pero en el extremo 3' e inicia la amplificación exponencial que entrega como resultado estructuras en forma de coliflor y de diferentes tamaños; motivos por el cual, en la revelación de electroforesis se observa bandas de diversos tamaños.

IV. JUSTIFICACIÓN

La exigencia en el desarrollo de pruebas de diagnóstico eficientes y accesibles, es un reto que se apronta en los últimos tiempos. En acuicultura peruana las técnicas diagnóstico convencionales no son muy usadas por acuicultores, porque son poco accesibles, ofrecen resultados tardíos y se realizan en lugares alejados de los centros de producción. Entonces, es necesario hacer uso de técnicas de detección rápida que ofrezcan resultados fidedignos a costos asequibles y se puedan implementar en laboratorios básicos de las regiones.

Con la estandarización de la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles Dúplex para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de Trucha arcoíris se espera demostrar la factibilidad de la técnica para detectar ambas bacterias en una sola reacción, disminuyendo así gran porcentaje de los tiempos de trabajo, tiempos de entrega de resultados y haciendo uso de equipos básicos de laboratorio. De obtener resultados satisfactorios se podría proponer la validación del protocolo para ser utilizado como una herramienta apoyo a las pruebas de aislamiento microbiológico y así reducir el tiempo que se requiere para realizar las pruebas extras para identificar la especie objetivo. Además, de ser viable esta técnica queda un precedente para continuar con el proceso de validación, a fin de que sea útil para todos los agentes involucrados en la sanidad acuícola.

V. HIPÓTESIS

La estandarización de la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada Por Bucles Dúplex logra detectar simultáneamente *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada Por Bucles (LAMP) Dúplex para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”

6.2. Objetivos específicos

1. Diseñar un protocolo LAMP DÚPLEX para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”.
2. Optimizar LAMP DÚPLEX para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”.
3. Evaluar la especificidad analítica de LAMP DÚPLEX para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”.
4. Evaluar la sensibilidad analítica LAMP DÚPLEX para la detección simultanea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Diseño de estudio

El diseño de investigación es experimental de tipo descriptivo transversal.

7.2. Metodología de trabajo

7.2.1. DISEÑO Y SELECCIÓN DE CEBADORES LAMP DÚPLEX

7.2.1.1. Diseño de primers para LAMP Dúplex

Los primers LAMP fueron diseñados para la detección de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, para ello se analizó genes candidatos en ambas bacterias, para *A. salmonicida* se analizó los genes vapA, fstA, As15, con n° de acceso: M64655, X87995, X64214, respectivamente y para *Y. ruckeri* se consideró: 16S rRNA, gnlA, Yrp1, YhlA, rucC-rupB, Yru1, YruR con n° de acceso en Genbank: X75275, AY333067, MG0208371, AY576533, AY576530, respectivamente. De los genes candidatos se evaluó el tamaño apropiado y regiones altamente conservadas.

En el caso de *A. salmonicida* se seleccionó el gen vapA con N° de acceso M64655.1 y en el caso de *Y. ruckeri* se eligió el gen rucC-rupB con N° de acceso AY576530.1. Las secuencias fueron analizadas con la herramienta Blast del portal web NCBI, para obtener un resumen de las secuencias relacionadas a cada gen; luego los resultados fueron alineados en el programa ClustalX2 con la finalidad de identificar zonas altamente conservadas y apropiadas para una posible amplificación. La secuencia consenso de cada especie objetivo fue guardada en formato fasta, extensión necesaria que requiere el programa PrimerExplorerV5.

Las secuencias mencionadas anteriormente fueron cargadas al programa online PrimerExplorerV5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) que generó

primers candidatos para cada secuencia objetivo, teniendo en cuenta los criterios establecidos para el diseño y selección de primers LAMP.

7.2.1.2. Criterios para el diseño y selección de primers LAMP

Para desarrollar el ensayo LAMP se debe cumplir con algunas especificaciones, tales como las que se mencionan a continuación:

- Concentración óptima de Mg igual a 4 mM.
- Concentración óptima de Na igual 50 mM.
- Porcentaje de GC de 40 – 60%.
- La Tm de F1C y B1C deben ser ligeramente superior a la Tm del LOOP.
- La Tm de F3 y B3 debe ser inferiores a la Tm de F2 y B2.
- dG Menor o igual a -4 Kcal/mol en los extremos 5' y 3'.
- Elegir el set de primers con el más alto dG.
- Evitar que una base se repita más de tres veces.
- Evitar la formación de estructuras secundarias en el extremo 3' de los primers FIP y BIP.

Se resalta la importancia de dG, pues esta podría avizora la estabilidad de los primers en la reacción, esta acotación es requerida específicamente en el extremo 3' del primer F2, el extremo 5' del primer F1c, el extremo 3' del primer B2 y el extremo 5' del primer B1c, ya que son las posiciones iniciales de la replicación génica. Adicionalmente, sugiere rangos en tamaños de primers, temperatura de hibridación y distancias entre primers tal como se muestran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Especificaciones técnicas para el diseño primers LAMP: tamaño y T_m.

PRIMERS	TAMAÑO	T _m
F1C/B1C	15 – 25	64 – 66
F2/B2	15 – 25	59 – 61
F3/B3	15 - 25	59 - 61
FL/BL	15 – 22	64 - 66

Tabla 2. Especificaciones técnicas para el diseño de primers LAMP: distancia entre primers.

PRIMERS	DISTANCIA
F2/B2	120 – 180
F1C/F2	40 – 60
F2/F3	0 – 60
F1C/B1C	0 – 100

7.2.1.3. Análisis de especificidad *in silico* de primers LAMP

El análisis de especificidad *in silico* fue realizado utilizando el programa Primer-BLAST, herramienta que utiliza algoritmos de alineación global, que alinea el primer en la secuencia objetivo; siendo altamente predecible para detectar targets en todas las secuencias génicas existentes en el banco de secuencias genéticas. Con este programa bioinformático se verificó los primers correspondan a las especies bacterianas en estudio y así se fue discriminando primers que tengan relación cercana con género o familias de especies implicadas en enfermedades de Trucha arcoíris o que sean causantes de contaminación.

7.2.1.4. Análisis de estructuras secundarias de los primers

Posteriormente los sets de primers seleccionados fueron analizados con el programa Multiple Primer Analyzer de ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/pe/en/home.html>) para identificar la formación de

dímeros y autodímeros entre primers, luego se eligió dos sets de primers apropiados para cada especie bacteriana. Los cuales fueron mandados a sintetizar en Macrogen.

7.2.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS ADN CONTROL

7.2.2.1. Reactivación de cepas bacterianas

Para la etapa de pruebas se usó el ADN de cepas control ATCC 33658 y 29473 correspondientes a *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, respectivamente. Dichas cepas fueron reactivadas en caldo Brain Heart Infusion BHI (Liofilchem, USA) durante 24 h. Después cultivados y purificados en agar Agar Tripticasa de Soya TSA (Liofilchem, USA), mediante el sembrado por agotamiento, la temperatura de incubación fue de 22 °C.

7.2.2.2. Extracción de ADN bacteriano

Las colonias de *A. salmonicida* se colocaron en caldo BHI y se incubaron a 22°C durante 24 horas, luego se centrifugaron a 5 000 rpm por 5 min, el pellet bacteriano recuperado fue lavado con Solución Salina Tamponada (PBS), de igual forma se procedió con las colonias de *Y. ruckeri*. Posteriormente se procedió a la aplicación del kit de extracción de ADN DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN bacteriano fue medido por espectrofotometría a 260 nm en un Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

7.2.2.3. Confirmación de cepas control por PCR Técnica Gold Estándar

La identificación molecular PCR de *A. salmonicida* se desarrolló según el protocolo de Hoie *et al.*, (1997). Donde el volumen final de la reacción fue de 20 µL conteniendo: 10 µL de 2X del buffer PCR (1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.5

U Platinum Taq DNA polimerasa) (Invitrogen), 1 µL de cada primer (F: 5'-CGTTGGATATGGCTCTTCCT-3' y R: 5'-CTCAAAACGGCTGCGTACCA-3'), 7 µL de agua ultra pura libre de DNAsas (AppliChem, Alemania) y 1 µL de ADN. El control positivo fue la cepa tipo de ATCC 33658 y como blanco se usó agua ultra pura libre de DNAsas (AppliChem, Alemania). Luego los tubos de reacción se colocaron en el termociclador (Eppendorf-Mastercycler, USA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial será de 94 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 50 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min, finalmente la extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se detectaron en geles de agarosa al 1.5%, en buffer TAE 1X, el cual fueron sometidos a un campo eléctrico de 80 V/cm por 60 minutos. La cantidad de producto amplificado por PCR para la corrida de electroforesis fue de 10µL y 3µL de marcador de peso molecular Perfect DNA Ladder de 100 pb (Novagen, EE. UU.). Seguidamente el gel fue teñido con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (Merck Millipore, Alemania) por 20 minutos, y revelado bajo un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, EE. UU.). La presencia de una banda de 271 pb confirmó el resultado esperado.

Siguiendo el protocolo de Gibello *et al.*, (1999), se detectó la presencia de *Y. ruckeri*. Para ello el volumen final de reacción fue de 20 µL conteniendo: 10 µL de 2X del buffer PCR (1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.5 U Platinum Taq DNA polimerasa) (Invitrogen), 1 µL de cada primer (F: YER8 5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3' y R: YER10 5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3'), 7 µL de agua ultra pura libre de DNAsas

(AppliChem, Alemania) y 1 μ L de ADN. El control positivo fue ATCC 29473 y como blanco se usó agua ultra pura libre de DNAsas (AppliChem, Alemania). Luego los tubos de reacción fueron colocados en un termociclador (Eppendorf-Mastercycler, USA), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 92 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 92 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los productos obtenidos por PCR se detectarán mediante gel de agarosa al 1.5%, en buffer TAE 1X, el cual fueron sometidos a un campo eléctrico de 80 V/cm por 90 minutos. La cantidad de producto PCR para la electroforesis fue de 10 μ L y 3 μ L de marcador de peso molecular Perfect DNA Ladder de 100 pb (Novagen, EE. UU.). Seguidamente el gel fue teñido con 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio (Merck Millipore, Alemania) por 20 minutos, y revelado bajo un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, EE. UU.). La presencia de una banda de 575 pb confirmó el resultado esperado.

7.2.3. PROCESO DE LA REACCIÓN TÍPICA LAMP

Para establecer la metodología del ensayo se inició un protocolo LAMP simple para la detección separada de ambas bacterias y así evaluar el desempeño de cada set de primers en una reacción típica de LAMP.

Este estudio se basó en la experiencia y el protocolo de Trangoni *et al.*, (2017). Inicialmente se reconstituyó los primers diseñados en un volumen final de 100 μ L (Tabla 3), luego se planteó la solución madre de LAMP Mix a una concentración 2X para un volumen de 100 μ L (Tabla N° 4). Posteriormente se estableció las concentraciones para la reacción Master Mix para un volumen final de 10 μ L, el

ADN control fue el proveniente de cepas ATTC y como blanco agua libre de nucleasas. (Tabla N°5).

Tabla 3. Reconstitución de los primers diseñados a una concentración 10X.

SET	PRIMERS	SOLUCIÓN STOCK (pmol/μL)	VOLUMEN μL
AER1	F3	100	2
	B3	100	2
	FIP	100	16
	BIP	100	16
	LR	100	8
	Agua Libre de Nucleasas	-	56
AER2	F3	100	2
	B3	100	2
	FIP	100	16
	BIP	100	16
	LR	100	8
	Agua Libre de Nucleasas	-	56
YER1	F3	100	2
	B3	100	2
	FIP	100	16
	BIP	100	16
	LR	100	8
	Agua Libre de Nucleasas	-	56
YER2	F3	100	2
	B3	100	2
	FIP	100	16
	BIP	100	16
	LR	100	8
	Agua Libre de Nucleasas	-	56

Tabla 4. Reactivos, volúmenes y concentraciones finales de los reactivos para una solución madre de LAMP MIX 2X.

REACTIVOS	SOLUCIÓN STOCK	VOLUMEN μL	LAMP MIX 2X
Agua Libre de Nucleasas		248	
Betaina	5 M	320	1.6 M
Datp	100 Mm	28	2.8 mM
dTTP	100 mM	28	2.8 mM
dCTP	100 mM	28	2.8 mM
dGTP	100 mM	28	2.8 mM
MgSO4	100 mM	120	12 mM
ThermoPol Buffer	10 X	100	1X

Tabla 5. Formulación planteada en una reacción típica de LAMP, en un volumen final de 10 μ L.

REACTIVOS	VOLUMEN μ L
Agua Libre de Nucleasas	2.6
LAMP MIX 2X	5
PRIMER MIX 10X	1
<i>Bst</i> 2.0 ADN polimerasa	0.4
ADN	1
Syber Green	1.5*

*El reactivo fue colocado en la parte interna de las tapas de los tubos.

Los tubos de reacción en un volumen final de 10 μ L fueron corridos a 60°C durante 60 min y detenidas a 80° por 10 min como fase de terminación. Al finalizar la incubación se invirtió los tubos para que el Syber Green se mezcle con el producto de la amplificación y tome una coloración. Si fuera una coloración verde corresponde a un resultado positivo, en cambio si es anaranjado corresponde a un resultado negativo. Los amplicones resultantes fueron analizados por electroforesis al 1 % de agarosa en TAE 1X, bajo 70 V durante 115 min, el transiluminador UV usado fue de la marca MiniBis Pro (DNR Bio-imaging System, Israel).

7.2.4. DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA LAMP

DÚPLEX

Al evaluar el desempeño de cada set de primers se puede identificó condiciones apropiadas y comunes para amplificar ambos materiales genéticos en una sola reacción. En el ensayo dúplex se usó las combinaciones de primers: AER1-YER1 AER1-YER2 AER2-YER1 AER2-YER2 en un volumen final de 10 μ L, conteniendo el mix de primers para *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, ThermoPol buffer (New England Biolabs, Alemania), betaina (Sigma-Aldrich), *Bst* 2.0 ADN polymerase (New England Biolabs, Alemania), dNTPs (Promega), Syber Green y las muestras de ADN control, los volúmenes usados se muestra la Tabla N° 6. La

condición de amplificación fue de 60°C durante 60 min e inactivada a 80° por 10 min.

Tabla 6. Formulación para en una reacción LAMP dúplex, en un volumen final de 10 µL.

REACTIVOS	AER1-YER1 (µL)	AER1-YER2 (µL)	AER2-YER1 (µL)	AER2-YER2 (µL)
Agua Libre de Nucleasas	2.6	2.6	2.6	2.6
LAMP MIX 2X	5	5	5	5
PRIMERS para <i>A. Salmonicida</i>	0.5	0.5	0.5	0.5
PRIMERS para <i>Y. Ruckeri</i>	0.5	0.5	0.5	0.5
Bst 2.0 ADN polimerasa	0.4	0.4	0.4	0.4
ADN de <i>A. Salmonicida</i>	0.5	0.5	0.5	0.5
ADN de <i>Y. Ruckeri</i>	0.5	0.5	0.5	0.5
Syber Green	1.5*	1.5*	1.5*	1.5*

*El reactivo fue colocado en la parte interna de las tapas de los tubos.

7.2.5. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO LAMP DÚPLEX

7.2.5.1. Optimización de las condiciones de amplificación LAMP Dúplex

Se estableció paneles de control positivo, para ejecutar el proceso de estandarizar en tres variables críticas de la amplificación:

- **Concentración de Bst 2.0 ADN polimerasa:** se determinó evaluar concentraciones de 4U/Rx, 8U/Rx, 16U/Rx.
- **Temperatura de amplificación:** de acuerdo a las especificaciones técnicas de la enzima se consideró evaluar reacciones a los 60, 61, 62, 63, 64 y 65°C.
- **Tiempo de incubación:** se evaluaron el resultado de la reacción a los 15, 30, 45, 60 min.

De esta manera logramos determinar reacciones eficientes en corto tiempo a una temperatura estable y con la concentración necesaria de la enzima.

7.2.4.3. Evidencia de targets con enzimas de restricción

Mediante el programa Nebcutter V2 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), se mapeó y analizó las enzimas de restricción que realizasen cortes adecuados para evidenciar los targets objetivo de la amplificación dúplex. La enzima de restricción seleccionada fue AluI, prediciendo fragmentos de los siguientes tamaños: 126 y 91pb en *A. salmonicida* y 186 y 51pb en *Y. ruckeri*.

La digestión enzimática fue aplicada a los amplicones resultantes de amplificación de cada set de primers, luego se procedió con la digestión de amplicon resultante de la reacción dúplex. La digestión de esta última también se realizó a los amplicones obtenidos a 60, 61, 62, 63, 64 y 65°C. Por otro lado, se aplicó la digestión enzimática a los amplificados de los primers forward (F3) y reverse (B3) de LAMP corridos bajo las condiciones de la técnica gold estándar PCR.

7.2.6. EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD ANALÍTICA DE LOS PRIMERS LAMP

7.2.5.1. Determinación de la especificidad analítica

La especificidad analítica se evaluó incluyendo muestras de ADN de 9 cepas: *Echerenchia coli* (ATCC 25922), *Vibrio vulnificus* (ATCC 27562) *Flavobacterium psychrophilum* (ATCC 49418T) y *Aeromonas hidrophila* (ATCC 7966T), *Aeromonas caviae* (ATCC 15468), *Yersinia enterocolítica* (ATCC 23715), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Renibacterium salmoninarum* (ATCC 33209), *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235) y se incluyó una muestra de ADNc secuenciada del Virus de la Necrosis Pancreática (IPN), dicha muestras fueron

corridas bajo las condiciones optimizadas para *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* en LAMP simple.

7.2.5.2. Determinación de la sensibilidad analítica

De las cepas ATCC de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* se extrajo el ADN, y se tomó una concentración inicial de 20 ng/μL de ADN de *A. salmonicida* y 20 ng/μL de *Y. ruckeri*. Dichas concentraciones iniciales fueron diluidas hasta 10^{-10} por triplicado, luego cada panel fue procesado según la técnica gold estándar PCR y el método LAMP optimizado en una reacción típica. Los resultados de este último fueron comparados con la sensibilidad analítica hallada en la técnica gold estándar.

7.2.7. RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE PCR vs LAMP DÚPLEX EN CEPAS PRESUNTIVAS

7.2.7.1. Aplicación de PCR en la detección de cepas presuntivas de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*

Se procesó 28 cepas presuntivas de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* (las cepas fueron asiladas de Trucha arcoíris y conservadas en el cepario del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de UPCH). Tanto la reactivación bacteriana, extracción de ADN y la técnica diagnóstica de detección PCR se realizaron bajo los protocolos que se usaron con las cepas control, antes descritas.

7.2.7.2. Aplicación de LAMP dúplex en la detección de cepas presuntivas de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*

Las 28 cepas presuntivas de *A. salmonicida* y 28 cepas presuntivas de *Y. ruckeri* fueron procesadas inicialmente en una reacción simple de LAMP, con el objetivo

de evaluar la detección individual de cada muestra, luego se procedió a procesarlas en una reacción dúplex.

7.2.8. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS

Se avaluó ambos métodos mediante la comparación de resultados, que también se presentan en una tabla de Excel.

VIII. RESULTADOS

8.1. Análisis *in silico* de primers LAMP candidatos

De los 1000 sets de primers arrojados por PrimerExplorerV5 se seleccionaron 2 sets candidatos para cada secuencia objetivo, elegidos según las condiciones de diseño anteriormente descritas. En la Tabla N° 7 se muestra los primers seleccionados con sus respectivas características.

8.2. Análisis de estructuras secundarias

El análisis de estructura secundarias del programa MultiplePrimerAnalyzer de ThermoFisher no detectó la formación de dímeros y autodímeros en las combinaciones AER1-YER, AER1-YER2 y AER2-YER1, pero sí detectó la formación de un dímero en la combinación AER2-YER2 (Figura N° 1).

Name	Sequence	Tm°C	CG%	nt	A	T	C
AER2-F3:	accaagcctttaagctg	56.0	47.1	17	5.0	4.0	5.0
AER2-B3:	gcagaaatattcgcatca	57.8	38.9	18	7.0	4.0	4.0
AER2-FIP:	cggatcagcagtgtaagaagcgtttctcaaggtacagtagctctga	81.4	48.9	45	13.0	10.0	9.0
AER2-BIP:	cgtgttcaaaactgggttaagctgttcaagaaaccttcggaaacca	84.2	46.7	45	14.0	10.0	11.0
AER2-LB:	tccagttgagtttgactaac	54.8	40.0	20	5.0	7.0	4.0
YER2-F3:	gcgcacgcgaagtataaaaaaccg	66.5	45.5	22	9.0	3.0	5.0
YER2-B3:	atcgaccagatcctgacgg	65.6	57.9	19	5.0	3.0	6.0
YER2-FIP:	tcgacgcctgttaatgcactaaggtaggggaattgcggagcgaatc	85.6	52.3	44	12.0	9.0	9.0
YER2-BIP:	acggacagtcacagccgattgttagctgagtgaggcctgagtc	85.2	57.5	40	9.0	8.0	10.0
YER2-LB:	tcggggtgtgtccccccttg	68.6	61.1	18	0.0	7.0	5.0

Results for primer dimer detection. To export the results: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V).

Self-Dimers:

Cross Primer Dimers:

AER2-FIP: with YER2-FIP:

AER2-FIP:

5-cggatcagcagtgtaagaagcgtttctcaaggtacagtagctctga->

| | | | |

<-ctaagcgaggcgttaagggtggaatcacgtaatgtccgcagct-5

Figura 1. Análisis de las estructuras secundarias de los sets AER2-YER2 resultados de Multiple Primer Analyzer.

Tabla 7.. Características de los sets de primers sintetizados: *A. salmonicida* (AER1 – AER2) Y. *ruckeri* (YER1 – YER2)

	PRIMER	Secuencia 5'- 3'	5'pos	3'pos	Tam	Tm	5'dG	3'dG	GC	dG
AER1	F3	AAGCCTTTAAGCTGACCTCC	389	408	20	59	-5.58	-5.69	0.5	-1.61
	B3	GCAGAAATATTCGCATCA	582	602	21	59	-5.26	-6.19	0.48	
	FIP	GCAACCGGATCAGCAGTGTAAGA- AGGTACAGTAGCTCTGACCG			43					
	BIP	CGCTGTTCAAACCTGGGTAAGCTGT- TCAAGAAACCTTCGGAAACCA			45					
	F2	AGGTACAGTAGCTCTGACCG	417	436	20	60	-4.57	-6.19	0.55	
	F1c	GCAACCGGATCAGCAGTGTAAGA	457	479	23	65	-6.01	-3.59	0.52	
	B2	TCAAGAAACCTTCGGAAACCA	551	571	21	60	-4.27	-4.67	0.43	
	B1c	CGCTGTTCAAACCTGGGTAAGCTGT	488	511	24	66	-6.57	-5.63	0.5	
	LB	TCCAGTTGAGTTTGACTAAC	512	534	23	62	-5.25	-6.07	0.43	-1.43
AER2	F3	ACCAAGCCTTTAAGCTG	386	405	20	60	-5	-5.35	0.5	-2.02
	B3	GCAGAAATATTCGCATCA	582	602	21	59	-5.26	-6.19	0.48	
	FIP	CGGATCAGCAGTGTAAGAAGCGT- TCTCAAGGTACAGTAGCTCTGA			45					
	BIP	CGCTGTTCAAACCTGGGTAAGCTGT- TCAAGAAACCTTCGGAAACCA			45					
	F2	TCTCAAGGTACAGTAGCTCTGA	412	433	22	60	-4.27	-4.6	0.45	
	F1c	CGGATCAGCAGTGTAAGAAGCGT	452	474	23	65	-5.53	-6.07	0.52	
	B2	TCAAGAAACCTTCGGAAACCA	551	571	21	60	-4.27	-4.67	0.43	
	B1c	CGCTGTTCAAACCTGGGTAAGCTGT	488	511	24	66	-6.57	-5.63	0.5	
	LB	TCCAGTTGAGTTTGACTAAC	512	534	23	62	-5.25	-6.07	0.43	-1.43
YER1	F3	TGACCCACGTTCTATCTCCA	78	101	20	60	-6.87	-5.40	0.45	-2.45
	B3	TGGCCTTTGTTACCACCTT	245	264	19	59	-5.06	-6.10	0.57	
	FIP	GGTTCTGGTCCGAACAGCACGA ACGTGCAGAAGACTTCCTG			41					
	BIP	ATTCGCTTTGGCAGCAGCATCAT GCGCCTTCGATATCATCG			41					
	F2	ACGTGCAGAAGACTTCCTG	100	122	19	60	-4.65	-4.52	0.60	
	F1c	GGTTCTGGTCCGAACAGCACGA	145	167	22	63	-6.30	-4.00	0.48	
	B2	GCGCCTTCGATATCATCG	232	250	18	61	-4.82	-4.65	0.57	
	B1c	ATTCGCTTTGGCAGCAGCATCAT	188	211	23	64	-6.20	-4.84	0.55	
	LB	CGTGGCTCCCACGTTGCTAT	230	250	20	60	-6.98	-4.50	0.65	-1.91
YER2	F3	GCGCATCGAAGTATAAAAACCG	79	100	22	60	-6.97	-5.44	0.45	-2.04
	B3	ATCGACCAGATCCTGACGG	297	315	19	60	-5.08	-6.19	0.58	
	FIP	TCGACGCCTGTAATGCACTAAGGTA- GGGAATTGCGGAGCGAATC			44					
	BIP	ACGGACAGTCACAGCCGATTG- TAGCTGAGTGGCCTGAGTC			40					
	F2	GGGAATTGCGGAGCGAATC	102	120	19	61	-4.85	-4.69	0.58	
	F1c	TCGACGCCTGTAATGCACTAAGGTA	148	172	25	66	-6.37	-4.08	0.48	
	B2	TAGCTGAGTGGCCTGAGTC	249	267	19	60	-4.82	-4.76	0.58	
	B1c	ACGGACAGTCACAGCCGATTG	203	223	21	65	-6.18	-4.84	0.57	
	LB	TCGGGGTGTTCCCTTTG	227	244	18	61	-6.98	-4.61	0.61	-2.38

8.3. Obtención de muestras de ADN control

El ADN bacteriano extraído de las cepas ATCC de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* alcanzaron una concentración de 506 y 184.6 ng/ μ L, respectivamente. Mientras el grado de pureza se encontró en 1.89 ± 0.0092 . Esas concentraciones fueron disueltas y trabajadas a 20 ng/ μ L.

8.4. Proceso de la reacción típica LAMP

En esta etapa los cuatro sets de primers demostraron resultados esperados en la colorimetría final. El blanco de la reacción y el control positivo mostraron un viraje anaranjado y verde, respectivamente (Figura N° 2) mientras los resultados en la electroforesis mostraron las bandas de amplificación (Figura N° 3).

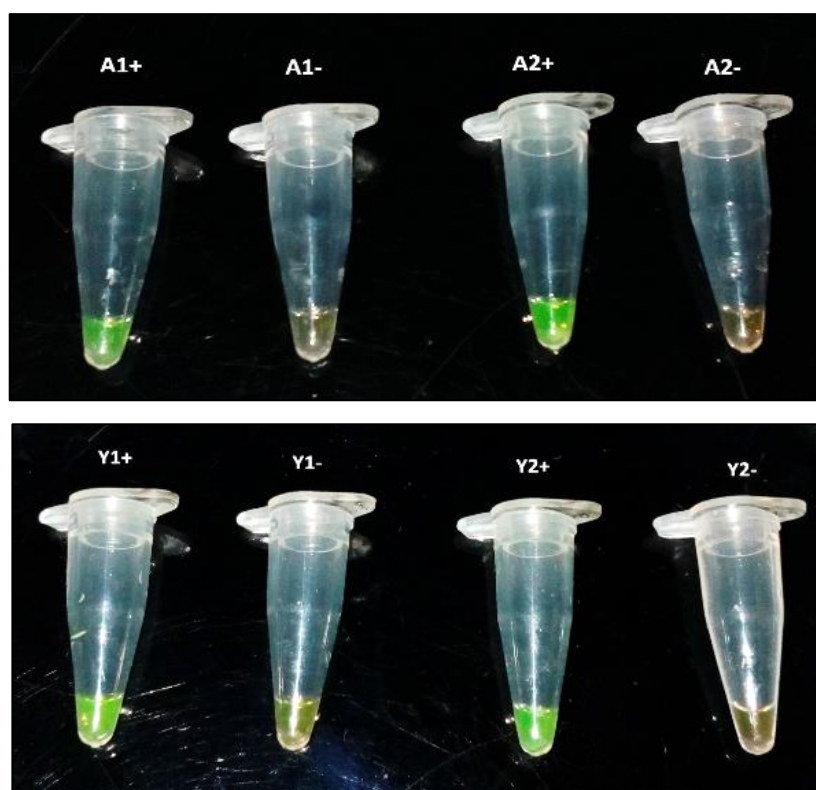


Figura 2. Desempeño de los sets de primers en una reacción típica de LAMP: A1+ (AER1 control positivo), A1- (AER1 blanco), A2+ (AER1 control positivo), A2- (AER1 blanco), Y1+ (YER1 control positivo), Y1- (YER1 blanco), Y2+ (YER2 control positivo), Y2- (YER2 blanco).

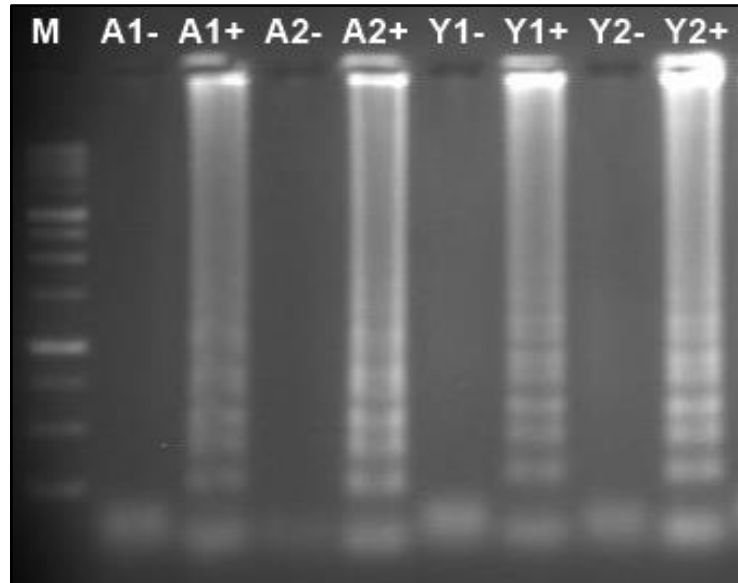


Figura 3. Revelación de la amplificación de primers LAMP: A1- (AER1 blanco), A1+ (AER1 control positivo), A2- (AER1 blanco), A2+ (AER1 control positivo), Y1- (YER1 blanco), Y1+ (YER1 control positivo), Y2- (YER2 blanco), Y2+(YER2 control positivo).

8.5. Desarrollo de un protocolo para LAMP dúplex

De la combinación de primers AER1-YER1, AER1-YER2, AER2-YER1 y AER2-YER2 solo se observó amplificación en las combinaciones AER2-YER2 (Figura N° 4, 5 y 6), de acuerdo a ello se seleccionó el set de primers AER2-YER2 para el proceso de optimización.



Figura 4. Desempeño de la combinación de sets de primers AER2-YER1 y AER2-YER2 en un protocolo de reacción LAMP dúplex.

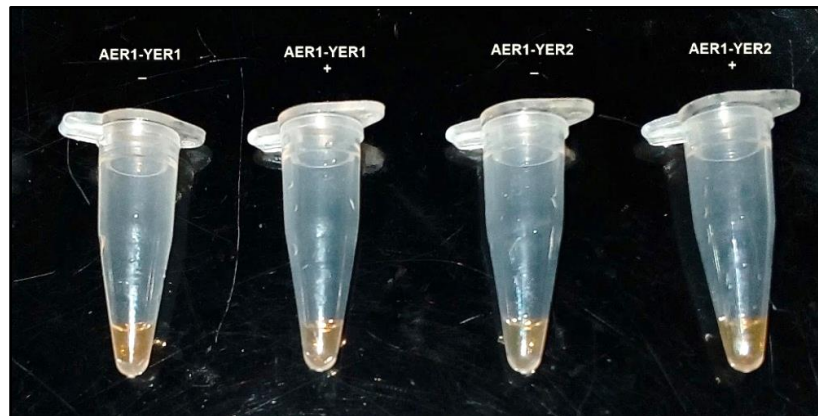


Figura 5. Desempeño de la combinación de sets de primers AER1-YER1, AER1-YER2 en un protocolo de reacción LAMP dúplex.

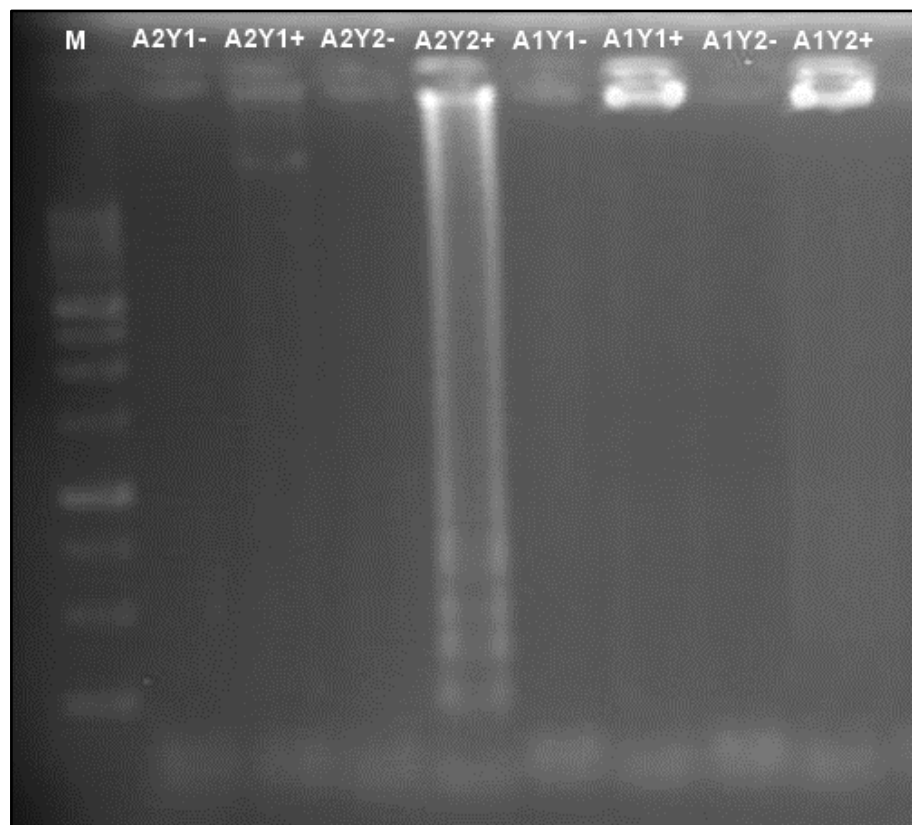


Figura 6. Revelación de la amplificación de los primers LAMP en una reacción dúplex: A2Y1- (blanco), A2Y1+ (control positivo), A2Y2- (blanco), A2Y2+ (control positivo), A1Y1- (blanco), A1Y1+ (control positivo), A1Y2- (blanco), A1Y2+ (control positivo).

8.6. Optimización de un protocolo para LAMP dúplex

- **Concentración de la enzima *Bst* 2.0 ADN polimerasa**

Se observó productos amplificados al ensayar la concentración a 8U y 16U mas no, en una concentración de 4U (Figura N° 7).

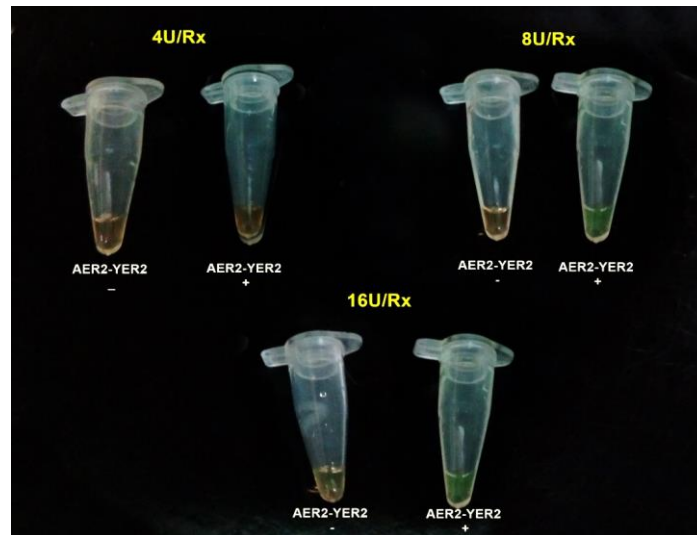


Figura 7. Concentración de la enzima *Bst* 2.0 ADN polimerasa ensayadas en una reacción LAMP dúplex.

- **Temperatura de amplificación**

Se identificando temperaturas óptimas desde 60 hasta 65°C (Figura N° 8).

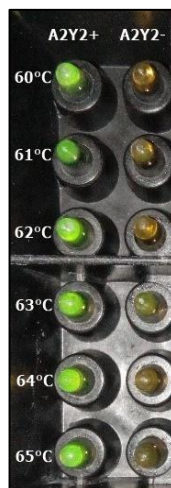


Figura 8. Temperaturas de amplificación evaluadas en una reacción LAMP dúplex con la combinación de primers AER2-YER2.

- **Tiempo de incubación:**

El rango de tiempo de amplificación en LAMP simple fue de 15, 30, 45 y 60 min, observando resultados desde los 45 min en *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*. Sin embargo, 60 min fue el tiempo más adecuado (Figura N° 9).



Figura 9. Tiempos de amplificación evaluadas en una reacción LAMP simple para los sets de primers AER2 y YER2.

8.6.1. EVIDENCIA DE TARGETS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

De la digestión enzimática se obtuvieron amplicones de 126 y 91 pb en *A. salmonicida* y 186 y 51 pb en *Y. ruckeri*, pero con fragmento inespecíficos en los amplicones dúplex de *Y. ruckeri* (Figura N° 10). La amplificación de los primers LAMP forward (F3) y reverse (B3) amplificaron *A. salmonicida* y *Y. ruckeri* en una reacción PCR, de ello se obtuvo un amplicon de 214 bp para *A. salmonicida* y 236 bp para *Y. ruckeri* (Figura N° 11).

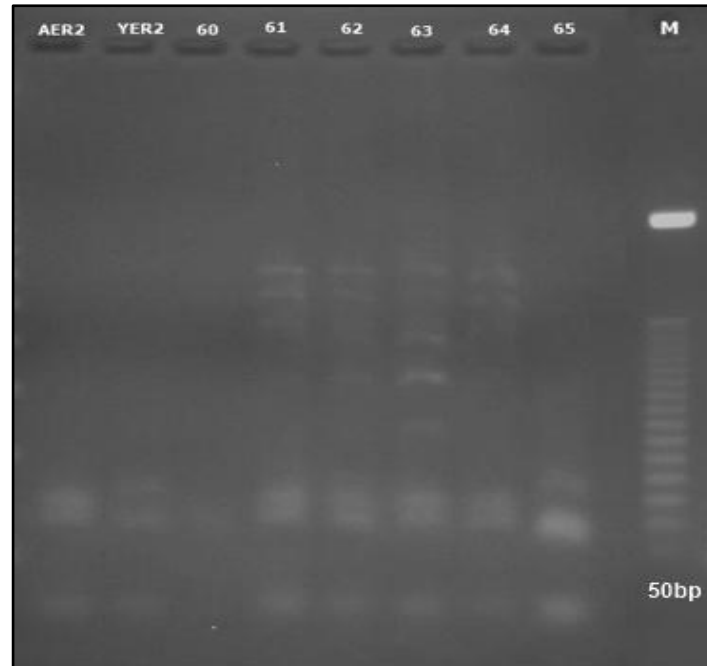


Figura 10. Digestión enzimática de amplicones LAMP: AER2 (digestión de amplicones de AER2), YER2 (digestión de amplicones de YER2), digestión de amplicones LAMP dúplex AER2-YER2 resultantes de la amplificación a 60, 61, 62, 63, 64, 65°C.

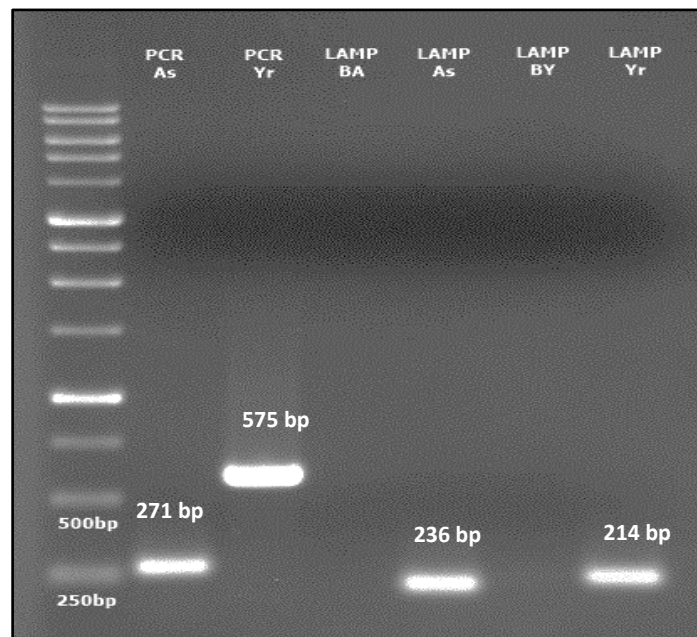


Figura 11. Desempeño de los primers LAMP forward (F3) y reverse (B3) en reacción PCR: PCR As (primers PCR para *A. salmonicida*), PCR Yr (primers PCR para *Y. ruckeri*), LAMP BA (blanco primers de AER2), LAMP As (control positivo primers de AER2), LAMP BY (blanco primers YER2), LAMP Yr (control positivo primers de YER2)

8.7. Evaluación de especificidad y sensibilidad analítica de los primers

LAMP

8.7.1. ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

Se evaluó la especificidad analítica de los primers con cepas bacterianas relacionadas con *Yersinia Ruckeri* y *Aeromona salmonicida*. El set AER1 mostró amplificación con ADN de *A. caviae*, *F. psychrophilum*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El set AER2 amplificó para *A. caviae*, *V. vulnificus*. El set YER1 amplificó para *A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *Y. enterocolítica* por último el set YER2 amplificó para *A. caviae* y *V. vulnificus* los resultados se muestran en la Figura N° 12.

8.6.1. SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Los resultados demostraron que la Técnica Gold Estándar PCR, logró detectar hasta 10^{-4} en *A. salmonicida* y 10^{-3} en *Y. ruckeri* (Figura N° 13). En cambio, la sensibilidad analítica del set de primers AER2 para *Aeromonas salmonicida* detectó hasta 10^{-10} y el set de primers YER2 logró detectar hasta 10^{-9} (Figura N° 14).



Figura 12. Especificidad analítica de los sets de primers: AER1, AER2, YER1 y YER2 con, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli*, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, *F. psychrophilum*, *R. salmoninarum*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *V. vulnificus*, *Y. enterocolitica*

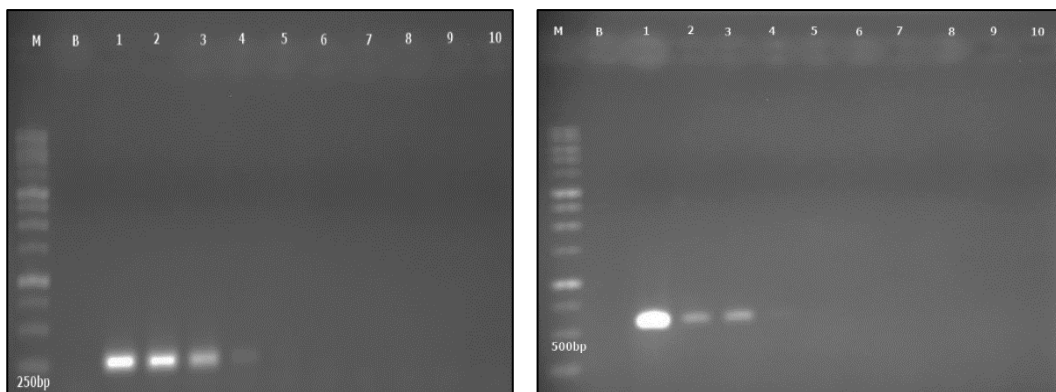


Figura 13. Sensibilidad analítica de la técnica Gold Estándar PCR (10^{-10}): a. Panel de dilución de *A. salmonicida* b. Panel de dilución de *Y. ruckeri*

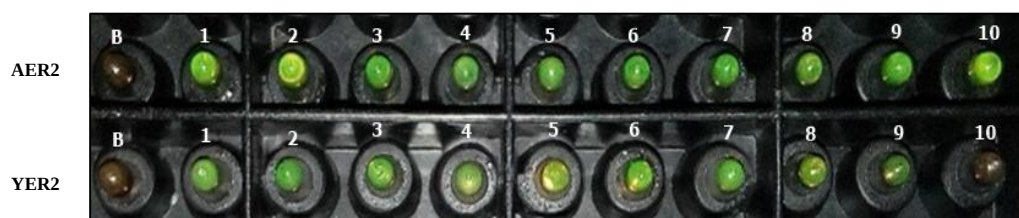


Figura 14. Sensibilidad analítica del set de primers AER2 y YER2 (10^{-10}): B (blanco), 1-10 (diluciones)

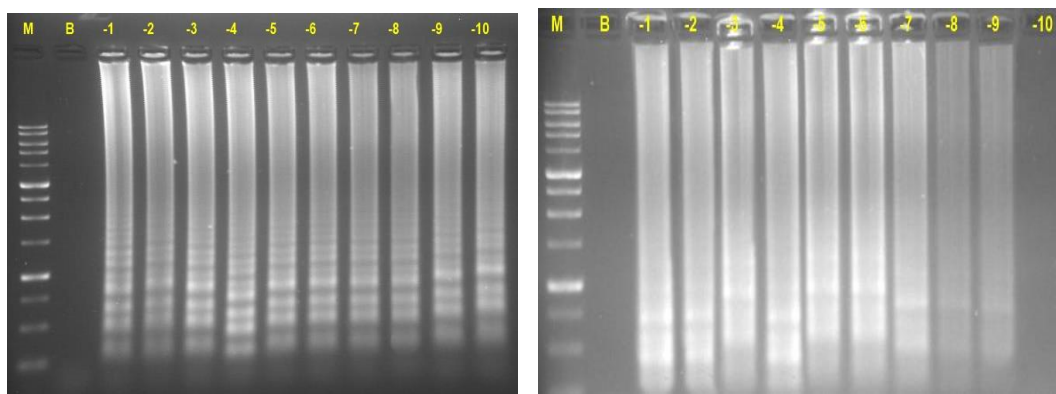


Figura 15. Sensibilidad analítica revelada mediante electroforesis: (a) Sensibilidad analítica de set de primers AER2 para *A. salmonicida*, (b) Sensibilidad analítica del set primers YER2 para *Y. ruckeri*.

8.7. Resultados de la detección de PCR vs LAMP dúplex en cepas presuntivas

8.7.1. APLICACIÓN DE PCR EN LA DETECCIÓN DE CEPAS PRESUNTIVAS DE *A. SALMONICIDA* Y *Y. RUCKERI*

Mediante la Técnica Gold Estándar PCR se evaluaron 28 cepas presuntivas de *Aeromonas salmonicida* y de *Yersinia ruckeri*, obteniendo resultados positivos para todas las muestras y en ambos casos (Tabla N°8).

8.7.2. APLICACIÓN DE LAMP DÚPLEX EN LA DETECCIÓN DE CEPAS PRESUNTIVAS DE *A. SALMONICIDA* Y *Y. RUCKERI*

En esta etapa se procesó las mismas cepas presuntivas que se utilizaron en la detección por PCR. Inicialmente se procesó cada muestra en una reacción simple, obteniendo resultados positivos de las 28 cepas de ambas especies bacterianas. Posteriormente, las muestras de las cepas bacterianas fueron corridas en una reacción dúplex, donde también se observaron resultados positivos en todas las muestras procesadas (Tabla N°8).

Tabla 8. Resultados de las pruebas de detección de las cepas presuntivas de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, ensayadas en PCR, LAMP simple y LAMP dúplex.

Nº	PCR				LAMP				LAMP DÚPLEX	
	CÓD. CEPAS A.S	A. salmonicida PCR	CÓD. CEPAS Y.R	Y. ruckeri PCR	CÓD. CEPAS A.S	A. salmonicida LAMP	CÓD. CEPAS Y.R	Y. ruckeri LAMP	COMBINACIÓN DE CEPAS PRESUNTIVAS	RESULTADO COLORIMÉTRICO
1	C12B	+	PR2	+	C12B	+	PR2	+	C12B-PR2	+
2	C18B	+	PR5	+	C18B	+	PR5	+	C18B-PR5	+
3	C18R	+	PR4	+	C18R	+	PR4	+	C18R-PR4	+
4	DEIB	+	3B	+	DEIB	+	3B	+	DEIB-3B	+
5	I9BM	+	12B	+	I9BM	+	12B	+	I9BM-12B	+
6	I9RB	+	A18B	+	I9RB	+	A18B	+	I9RB-A18B	+
7	T12B	+	F2B	+	T12B	+	F2B	+	T12B-F2B	+
8	F16	+	F8B	+	F16	+	F8B	+	F16-F8B	+
9	P8B	+	DE4B	+	P8B	+	DE4B	+	P8B-DE4B	+
10	P24B	+	PB11	+	P24B	+	PB11	+	P24B-PB11	+
11	P23B	+	R18R	+	P23B	+	R18R	+	P23B-R18R	+
12	C15R	+	F10R	+	C15R	+	F10R	+	C15R-F10R	+
13	6R	+	F11R	+	6R	+	F11R	+	6R-F11R	+
14	5B	+	F12B	+	5B	+	F12B	+	5B-F12B	+
15	DE3B	+	F12R	+	DE3B	+	F12R	+	DE3B-F12R	+
16	D3	+	F14B	+	D3	+	F14B	+	D3-F14B	+
17	K5B	+	F17B	+	K5B	+	F17B	+	K5B-F17B	+
18	K6P	+	F18R	+	K6P	+	F18R	+	K6P-F18R	+
19	K7R	+	F18B	+	K7R	+	F18B	+	K7R-F18B	+
20	K14R	+	T20B	+	K14R	+	T20B	+	K14R-T20B	+
21	K16P	+	A6R	+	K16P	+	A6R	+	K16P-A6R	+
22	K16R	+	F2R	+	K16R	+	F2R	+	K16R-F2R	+
23	K19B	+	F4R	+	K19B	+	F4R	+	K19B-F4R	+
24	K19R	+	F6R	+	K19R	+	F6R	+	K19R-F6R	+
25	K21B	+	F8R	+	K21B	+	F8R	+	K21B-F8R	+
26	K22P	+	F14R	+	K22P	+	F14R	+	K22P-F14R	+
27	K23B	+	F17R	+	K23B	+	F17R	+	K23B-F17R	+
28	K29B	+	2R	+	K29B	+	2R	+	K29B-2R	+

IX. DISCUSIÓN

El campo de la salud exigió que las pruebas de detección molecular sean lo más eficientes, rápidas y de interpretación fácil (Bodulev y Sakharov, 2020). En cambio, en el campo de la sanidad acuícola son poco usadas y desarrolladas. Sin embargo, hay investigaciones importantes para incrementar el interés en el desarrollo de nuevas pruebas alternativas que superen las desventajas técnicas, logísticas y económicas de las pruebas de detección tradicional. Esta investigación apunta a la base del estudio de pruebas rápidas enfocada en la detección múltiple.

Siendo el objetivo principal estandarizar la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles dúplex para la detección simultánea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia Ruckeri* en cepas aisladas de Trucha arcoíris; uno de los puntos críticos en la ejecución de este trabajo fue seleccionar el gen adecuado para diseñar los primers LAMP, pues son responsables de la especificidad que puede ofrecer el ensayo, donde también compromete la alta diversidad genética entre cepas de la misma especie, y en vista de eso se optó por elegir genes con alta conservación génica y evitar genes propensos a mutaciones. Considerando los genes cromosomales como los más estables y contrariamente los plásmidicos ya que, ceden fácilmente a las mutaciones de sus bases genéticas. Cabe recalcar que LAMP ya ha sido desarrollada individualmente para la detección de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*. No obstante, las especies acuícola y las condiciones ambientales de cultivo son diferentes a los lugares donde se realiza la truchicultura en Perú.

La investigación de LAMP en la detección de *A. salmonicida*, fue aplicada en el cultivo de Bacalao del Atlántico basada en la detección del gen *gyrB* (Kulkarni *et al.*, 2009); un gen housekeeping que codifica la subunidad B del ADN girasa, enzima responsable de la topología en el proceso de replicación, transcripción y recombinación y ha demostrado gran utilidad en la diferenciación taxonómica e identificación de especies dentro del género *Aeromonas* (Soler *et al.*, 2004).

En este trabajo para, la detección de *A. salmonicida* se eligió el gen *vapA*, un gen que codifica la capa A de la membrana celular de la bacteria que se encuentra en contacto directo con las defensas del hospedero (Chart *et al.*, 1984) y también tiene la capacidad de aumentar la hidrofobicidad, la adherencia a los macrófagos, la resistencia a la citotoxicidad de los macrófagos (Garduño *et al.*, 2000), y la protección contra el sistema del complemento (Munn *et al.*, 1982).

Si bien ambos genes son buenos candidatos, pero se desestimó el uso de *gyrB* por ser un gen plasmídico en cambio, *vapA* es un gen cromosomal que adicionalmente puede brindar información sobre, la presencia de un gen de virulencia que podría estar expresándose o no en el hospedero.

Con respecto a la detección de *Y. ruckeri* que, realizaron Saleh *et al.*, 2008 basaron su detección en los genes *yruI/yruR*, que codifican parte del sistema quorum sensing de la bacteria y es un apoyo para la invasión celular.

En este trabajo se inclinó por el gen *rucC-rupB* uno de los genes cromosomales implicados en la absorción de hierro que, el patógeno utiliza

del huésped (Fernández *et al.*, 2007). En este caso ambos son genes de virulencia ubicados en el cromosoma, pero se optó por el gen *rucC-rupB*.

Las Técnicas Gold Estándar elegidas se basan en la detección en el gen ARNr 16S, este gen no fue considerado en este trabajo porque, a pesar de ser un gen altamente conservado no permite la separación correcta entre especies estrechamente relacionadas (Vipin y Prasun, 2015). Basado en esta premisa los resultados del BLASTn confirmaron que el gen ARNr 16S agrupa especies de las mismas familias.

Por otro lado, durante la etapa de diseño de primers LAMP se detectó *in silico* la formación de un dímero entre el primer FIP de AER2 y el primer FIP de YER2. Sin embargo, no se observó un resultado falso positivo en la etapa de pruebas dúplex.

La especificidad evaluada para *A. salmonicida* en el trabajo de Kulkarni *et al.*, 2009 no mostró amplificación con muestras de *Y. ruckeri*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas sp.*, *Francisella piscicida* y *Psychrobacter sp.* por otro lado Saleh *et al.*, 2008 confrontó la especificidad para *Y. ruckeri* con *Yersinia. aldovae*, *Yersinia. enterocolítica*, *Yersinia. frederiksenii*, *Yersinia. intermedia*, *Yersinia. kristensenii*, *Aeromonas. salmonicida*, *Aeromonas sorbia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Renibacterium salmoninarum* y *Flavobacterium columnare*, las cuales no mostraron reacciones cruzadas.

En cambio, la especificidad analítica de este estudio fue analizada frente *A. caviae*, *A. hydrophila*, *E. coli*, Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa, *F. psychrophilum*, *R. salmoninarum*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *V. vulnificus*,

Y. enterocolítica. De las cuales no se observó reacciones cruzadas, a excepción de las muestras de *A. caviae* y *V. vulnificus*, tanto en la detección de *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*. Teniendo en cuenta que, en el análisis de PrimerBlast no se observó afinidad de los primers con dichas especies; de esto se infiere que siempre habrá un margen de error predispuesto en la herramienta bioinformática PrimerBlast.

Con respecto a, *A. caviae* es una especie bacteriana considerada no patógena, debido al bajo porcentaje de mortalidad que genera; un estudio experimental reportó tan solo un 3.3% de mortalidad frente a otras especies de *Aeromonas* (Zepeda-Velázquez *et al.*, 2017). Otro estudio analizó este género dentro el microbiota del intestino de Trucha arcoíris y no evidenciaron esta especie, pero si *A. hydrophila* y *A. sobria* (Sugita *et al.*, 1994). Por ende, se puede inferir que esta especie es candidata en convertirse en una bacteria oportunista si se presentaran condiciones óptimas para su crecimiento. En ese caso, este estudio se limitaría a la detección de *Aeromonas sp.*

Asimismo, se reportó *V. vulnificus*, bacteria de aguas marinas aislado en granjas de trucha en Dinamarca (Pedersen *et al.*, 2008), tampoco fue considerada como un patógeno de Trucha arcoíris, pero si una especie oportunista ya que, se presentó bajo cuadro de estrés frente a un aumento de la temperatura que se dio después del cambio de ambientes de cultivo. En el Perú el cultivo de Trucha arcoíris se realiza en aguas dulces, por lo cual no se vería limitado la aplicación de este ensayo de detección.

La sensibilidad analítica en este estudio fue de 10^{-10} y 10^{-9} para *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*, respectivamente y los ensayos desarrollados por Kulkarni *et al.*, 2009 y Saleh *et al.*, 2008, demostraron sensibilidad de hasta 1 picogramo de ADN. En cambio, la sensibilidad analítica obtenida por la técnica de PCR solo detectó hasta 10^{-4} para *A. salmonicida* y hasta 10^{-3} para *Y. ruckeri*. Estos resultados confirman la alta sensibilidad del ensayo LAMP.

Para evidenciar que la técnica LAMP dúplex puede amplificar las dos muestras de ADN de manera efectiva y discriminante entre *A. salmonicida* y *Y. ruckeri*. Se optó por realizar digestión enzimática, cortando regiones dentro de las secuencias amplificadas. No obstante, se encontró bandas inespecíficas en los resultados de la digestión enzimática de amplicón de LAMP dúplex, esto se debe a la cantidad alta de amplicados que la enzima no logró cortar. Sin embargo, se logró observar el tamaño de los fragmentos esperados.

X. CONCLUSIONES

1. Al finalizar este trabajo se logró estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada Por Bucles Dúplex para la detección simultánea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri* en cepas aisladas de *Oncorhynchus mykiss* “Trucha arcoíris”, el cual aporta un ensayo alternativo a los métodos de detección de bacteriana.
2. Se logró diseñar un protocolo LAMP dúplex para la detección simultánea de *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*, en base a los genes vapA de *Aeromonas salmonicida* y rucC-rucB de *Yersinia ruckeri*.
3. De la optimización en la temperatura, LAMP demostró ser un ensayo no restrictivo, por lo tanto, garantiza su uso de equipos básicos de temperatura.
4. La especificidad analítica de los primers diseñados para LAMP dúplex logró discriminar entre principales patógenos de Trucha arcoíris, contaminación ambiental y manipulación.
5. La sensibilidad analítica de la técnica LAMP fue superior a la prueba de PCR convencional en *Aeromonas salmonicida* y *Yersinia ruckeri*.

XI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar el ensayo en un proceso de validación con el objetivo de detectar los agentes microbianos a partir de muestras biológicas.
- Proponer el uso tiras reactivas cromatográficas como medio de observación de resultados multiplex a fin de visualizar resultados fácilmente.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, Klesius PH. 2007. First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the USA. J Aquat Anim Health 19: 35-40.
2. Austin B, Austin DA, Dalsgaard I, Gudmundsdóttir BK *et al.* 1998 Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. Syst Appl Microbiol 21: 50–64
3. Austin B, Austin DA. 2007. Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish. 4ta edición. Reino Unido: Springer-Praxis.
4. Austin B, Austin DA. 2016. Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish. 6ta edición. Suiza: Springer International. 761 p.
5. Avci H, Birincioglu SS. 2005. Pathological findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 29: 1321-1328.
6. Barnes AC. 2011. Fish diseases and disorders: Viral, bacterial and fungal infections. 3era edición: Reino Unido. CABI. 484-511.
7. Beaz-Hidalgo R, Alperi A, Buján N, Romalde J, Figueras JM. 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Systematic and Applied Microbiology. 33(3): 149-153.
8. Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ. 2012. Molecular Detection and Characterization of Furunculosis and Other *Aeromonas* Fish Infections, Health and Environment in Aquaculture. España: Intech. 414.

9. Bernoth EM, Ellis A, Midtlyng P, Olivier G, Smith P. 1997. Furunculosis Multidisciplinary Fish Disease Research: New York. Academic Press, 529 pág.
10. 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.
11. Buchmann K, Nielsen ME, Nielsen CV. 2003. Immune responses against *Yersinia ruckeri* have no effect on colonization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by *Gyrodactylus derjavini* (Mikailov, 1975). J Fish Dis: 26. 183-186.
12. Busch RA, Lingg AJ. 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish Res. Board Can. 32: 2429–2432.
13. Castro G, Ramos F, Uribe J, Manchego A, Sandoval N. 2017. Aislamiento de *Yersinia ruckeri* en Truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) provenientes de una piscigranja de la ciudad Chachapoyas, Amazonas. Lima: SANIPES-PRODUCE.
14. Chart H, Shaw DH, Ishiguro EE, Trust TJ. 1984. Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 158: 16-22.
15. Cerro L, Manchego A, Ñuñure J, Pihue J, Sandoval N. 2017. Estudio de sensibilidad antibiótica de diferentes cepas de *Yersinia ruckeri* procedentes de diferentes regiones del país. Lima: SANIPES-PRODUCE.

16. Davies RL. 1991. Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. Veterinary Microbiology. 26: 125–140.
17. Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. 2014. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. Vet Microbiol. 169(1-2): 1-7.
18. Fernández L, Méndez J, Guijarro JA. 2007. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. Vet. Microbiol. 125: 1-10.
19. Flores K. 2013. Determinación de la diversidad fenotípica de *Yersinia ruckeri* en aislados de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de las regiones de Junín, Ancash y Huancavelica. Tesis de pregrado. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
20. [FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. Manual de cultivo de Trucha en ambientes convencionales. Lima-Perú.
21. Fujiwara-Nagata E, Eguchi M. 2009. Desarrollo y evaluación de un ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle para la detección rápida y simple de *Flavobacterium psychrophilum*. Revista de enfermedades de los peces. 32 (10): 873–881.
22. Gahlawat SK, Ellis AE, Collet B. 2009. Un método sensible de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de *Renibacterium salmoninarum*, agente causante de la enfermedad renal bacteriana en salmónidos. Revista de enfermedades de los peces. 32 (6): 491-497.

23. Garduño RA, Moore AR, Olivier G, Lizama AL, Garduno E, Kay WW. 2000. Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. *Can. J. Microbiol.* 46: 660-668.
24. Gonzáles E. 2002. Descripción de la furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*). Tesis de pregrado. Valdivia-Chile. Universidad Austral de Chile. 44.
25. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques.* 46: 167-172.
26. Gunimaladevi I, Kono T, LaPatra SE, Sakai M. 2005. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious Hematopoietic Necrosis. *Arch Virol.* 150: 899–909.
27. He L, y Xu H. 2011. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. *Aquaculture*, 311(1-4), 94–99.
28. Hiney M, Olivier G. 1999. Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*) in Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 3era edición. New York: CABI. 341-425.
29. Hunter VA, Knittel MD, Fryer JL. 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri*. *J. Fish Dis.* 3: 467–472.

30. Kulkarni A, Marlowe Ch, Caipang A, Brinchmann M, Korsnes K, Kiron V. 2009. Loop-mediated isothermal amplification – an assay for the detection of atypical furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in Atlantic cod, *Gadus morhua*. Journal of rapid methods & automation in microbiology. 17. 476–489.
31. Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015. *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. Veterinary Research. 46 (1): 103.
32. Lin F, Liu L, Hao G, Sheng P, Cao Z, Zhou Y, Chen K. 2018. The development and application of a duplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick method for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus isolated in China. Molecular and Cellular Probes. 40. 1–7.
33. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem biophys res commun. 289: 150-154.
34. Munn CB, Ishiguro EE, Kay WW, Trust TJ. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. Infect. Immun. 36: 1069-1075.
35. Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol cell probes. 16: 223-229.

36. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yoneakawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of ADN. Nucleic acids research. 28(12).
37. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. J microbiol. 53: 1-5.
38. [OIE]Organización Internacional de Salud Animal. 2000. World Animal Health in 2000: Reports on the Animal Health Status and Disease Control Methods and Tables on Incidence of List A Diseases. 33–37.
39. [OIE]Organización Internacional de Salud Animal. 2018. Manual de las pruebas de diagnóstico para los animals acuáticos. 1–18.
40. Pedersen K, Skall HF, Lassen-Nielsen AM, Nielse TF, Henriksen NH, Olesen NJ. 2008. Surveillance of health status on eighth marine Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farm in Denmark in 2006. J Fish Dis. 31(9): 659-667.
41. PromPerú. 2018. Informe Especializado Oportunidades para la trucha en el mundo. Departamento de inteligencia de mercados-Lima.
42. Raida M, Larsen J, Nielsen M, Buchmann K. 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (BioPlus2B). J Fish Dis. 26: 495-498.
43. Rodgers CJ. 1992 Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. Journal of Fish Diseases. 15: 243–254.

44. Romalde JL, Toranzo AE. 1993. Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiol Lett. 112: 291-300.
45. Ross JM, Rucker RR, Ewing WH. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Canadian Journal of Microbiology. 12.
46. Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. 2008. La amplificación isotérmica mediada por bucle como una tecnología emergente para la detección de *Yersinia ruckeri*, el agente causante de la boca roja entérica en los peces. BMC veterinary research. 4(1): 31.
47. 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.
48. Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011. Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. Rev Peru Biol. 18 (3): 349 – 353.
49. Soler L, Yañez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, Figueras MJ, Martinez-Murcia AJ. 2020. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. Int. J. Syst. Microbiol. 54: 1511-1519.
50. Soliman H, Elmatbouli M. 2006. Amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP) para la detección rápida del

- virus de la septicemia hemorrágica viral (VHS). Veterinary microbiology. 114 (3-4): 205–213.
51. Soliman H, Midtlyng PJ, El-Matbouli M. 2009. Sensitive and rapid detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification. Journal of virological methods. 158(1-2): 77-83.
 52. Sugita H, Nakamura T, Tanaka K, Deguchi Y. 1994. Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with microplate hybridization method. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3036-3038.
 53. Takada K, Sakaguchi Y, Oka C, Hirasawa M. 2005. New rapid polymerase chain reaction-immunochromatographic assay for *Porphyromonas gingivalis*. Journal of periodontology. 76: 508–512.
 54. Távara C. 2019. Expresión de genes de la respuesta inmune local y sistémica frente a la infección por *Flavobacterium psychrophilum* en Trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* en la provincia de Puno- Perú”. Tesis de Mestría. Lima-Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
 55. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. J Fish Dis 30: 257-268.
 56. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesesbrouck F, Chiers K. 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ. 84: 219-228.

57. Tobback E, Decostere A, Hermans K, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010a. In vitro markers for virulence in *Yersinia ruckeri*. J Fish Dis. 33: 197-209.
58. Tobback E, Hermans K, Decostere A, Van Den Broeck W, Haesebrouck F, Chiers K. 2010b. Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ. 90: 175-179.
59. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat. Protoc. 3(5). 877-882.
- Trangoni M, Gioffré A, Cravero S. 2017. A Closed-tube Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Visual Endpoint Detection of *Brucella spp.* and *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Diagnostic Bacteriology. 221–229.
60. Vipin k, Prasun K. 2015. Genome Wide Search for Biomarkers to Diagnose *Yersinia* Infections. Indian J Microbiol.
61. Wiklund T, Dalsgaard I. 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish hosts. Diseases of Aquatic Organisms. 32: 49-69.
62. Yu L, Hu Y, Zhang X, Sun B. 2013. Desarrollo de un método de amplificación isotérmica mediada por un bucle triple para la detección rápida *in situ* de tres especies de *Vibrio* asociadas con enfermedades de los peces. Acuicultura. 414-415.

63. Zepeda-Velasquez AP, Veja-Sánchez V, Ortega-Santana C, Rubio-Godoy M, de Oca-Mira DM, Soriano-Varggas E. 2017. Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas sp.* in immersion experimentally-infected Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Acta Trop.* 169: 122-124.