



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**IDENTIFICACIÓN DE GENES
ASOCIADOS A LA VIRULENCIA DE
Aeromonas salmonicida AISLADAS DE
TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus
mykiss*) PROCEDENTES DE
PISCIGRANJAS DEL PERÚ.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

DREIME TORO MONTENEGRO

LIMA - PERÚ

2020

ASESOR DE TESIS:

Dr. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

Dedicado a mis padres Emérita y Pablo, hermanos y demás seres queridos

AGRADECIMIENTOS

A (1):

Dios, en primer lugar, por ser la esperanza en los momentos difíciles, por darme sabiduría y paciencia para afrontar los obstáculos cotidianos, por cuidarme en cada viaje, cada paso y haberme dado la oportunidad de concluir este nuevo reto en mi vida personal y profesional.

Mis padres Emérita Montenegro y Pablo Toro, por su aliento y consejos que me permiten consolidarme como una persona de bien.

Mis hermanos, Elmer, Alexander, Benedicto, Mary y Gladis, por apoyarme moralmente en los buenos y malos momentos.

Mi asesor, Dr. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez por su colaboración y guía durante la ejecución de la presente tesis.

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

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

Dr. Jore Jöres de la University of Bern por donarme amablemente material necesario para la elaboración de la tesis.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

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

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III.	MARCO TEÓRICO	7
3.1.	<i>Aeromonas salmonicida</i>	7
3.2.	Mecanismos de infección por <i>A. salmonicida</i>	10
3.3.	Patogenicidad y factores de virulencia.	11
3.4.	Factores de virulencia de <i>A. salmonicida</i>	12
3.4.1.	Proteasas.....	12
3.4.2.	Lipasas.	14
3.4.3.	Capa A.	15
3.4.4.	Sistema de secreción tipo 3 (TTSS).	16
3.4.5.	Adquisición de hierro.....	19
3.4.6.	Biosíntesis de ácidos siálicos (Sias).	19
IV.	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	22
V.	HIPÓTESIS.....	23
VI.	OBJETIVOS.....	24
5.1.	Objetivo general.	24
5.2.	Objetivos específicos.	24
VII.	METODOLOGÍA.....	25
6.1.	Lugar de estudio.	25
6.2.	Tipo de estudio	25
6.3.	Criterios de inclusión y exclusión	25
6.4.	Tamaño de muestra.....	26
6.5.	Recolección y procesamiento de datos	26
6.5.1.	Reactivación de cepas bacterianas.....	26
6.5.2.	Eutanasia de los peces y aislamiento de bacterias.....	27
6.5.3.	Extracción de ADN	28
6.5.4.	Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación molecular de <i>A. salmonicida</i>	28
6.5.5.	Diseño de primers para la identificación de genes de virulencia de <i>A. salmonicida</i>	29

6.5.6.	PCR convencional para la identificación de genes de virulencia de <i>A. salmonicida</i>	30
6.6.	Plan de análisis de datos.....	31
6.7.	Consideraciones éticas	31
VIII.	RESULTADOS	33
7.1.	Identificación bioquímica y molecular (PCR) de <i>A. salmonicida</i>	33
7.2.	Detección de la presencia de genes de virulencia por PCR.	34
7.3.	Perfiles genéticos de <i>A. salmonicida</i>	40
IX.	DISCUSIÓN.....	42
X.	CONCLUSIONES	57
XI.	RECOMENDACIONES	58
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59
XIII.	ANEXOS.....	79
I.	Cepas de <i>A. salmonicida</i> conservadas en el cepario del laboratorio de parasitología de Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UPCH.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores para la identificación de los genes de virulencia de <i>A. salmonicida</i>	26
Tabla 2. Presencia de genes asociados a la virulencia de <i>A. salmonicida</i> detectados por Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR).....	29
Tabla 3. Perfiles genéticos de diferentes cepas de <i>A. salmonicida</i> en relación con la presencia de genes de virulencia.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura de aparato del sistema de secreción tipo 3 (TTSS). Membrana interna (IM); peptidoglicano (PGN); membrana de la célula hospedera (HM).....15
- Figura 2.** Tinción de Gram. Se observa la presencia de diplo bacilos de color rosado tenue.....27
- Figura 3.** Identificación molecular por PCR de *A. salmonicida* mediante la amplificación del gen ARNr 16s.....30
- Figura 4.** Identificación molecular del gen *vapA* de *A. salmonicida*31
- Figura 5.** Identificación molecular por PCR del gen *satA* de *A. salmonicida*.....31
- Figura 6.** Identificación molecular por PCR del gen *ascV* de *A. salmonicida*.....32
- Figura 7.** Identificación molecular por PCR del gen *aopO* de *A. salmonicida*.....32

Figura 8. Identificación molecular por PCR del gen *ahc2* de *A. salmonicida*.....33

Figura 9. Identificación molecular por PCR del gen *aopH* de *A. salmonicida*.....33

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Frecuencia de genes de virulencia de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú.....30
- Gráfico 2.** Perfiles genéticos de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Peru.....35
- Gráfico 3.** Perfiles genéticos por región de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú.....35

RESUMEN

El cultivo de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* es afectado por el patógeno *Aeromonas salmonicida*, responsable de los brotes de furunculosis, una de las enfermedades más prevalentes en la truchicultura peruana. En el presente estudio se identificó la presencia de genes asociados a la virulencia, cromosomales y plasmídicos, en 34 cepas patogénicas, confirmados bioquímica y molecularmente como *A. salmonicida*, procedentes de cuatro regiones del Perú: Junín, Cajamarca, Ancash y Puno. De los ocho genes analizados, se detectó la presencia de seis con un patrón muy variado. Las 34 cepas analizadas fueron positivas para los genes cromosomales, siendo el gen *vapA* (94%) el más frecuente, seguido de los genes *satA* (75%) y *ahe2* (65%). Los genes plasmídicos fueron los menos frecuentes (*ascV*, *aopH* y *aopO* con 35%, 29%, 35%, respectivamente). Se encontró 6 perfiles genéticos en relación con la presencia de genes de virulencia, lo cual permite sugerir la plasticidad genómica de este patógeno, aunque otros factores también pudieron haber influenciado en la heterogeneidad de los datos obtenidos. Los perfiles genéticos permitieron establecer el patotipo *vapA*⁺, *satA*⁺, *ahe2*⁺ *ascV*⁺, *aopH*⁺ y *aopO*⁺ que podría estar afectando el cultivo de trucha arcoíris. Los resultados muestran que las cepas de *A. salmonicida* en la acuicultura peruana presentan locus genéticos que codifican para los principales factores de virulencia: capa A, proteasas, lipasas y el sistema de secreción tipo 3.

Palabras Clave: *Aeromonas salmonicida*, *Oncorhynchus mykiss*, genes asociados a virulencia.

ABSTRACT

The culture of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* is affected by the pathogen *Aeromonas salmonicida*, responsible for outbreaks of furunculosis, one of the most prevalent diseases in rainbow trout farming in Peru. In the present study, the presence of both chromosomal and plasmid-associated virulence genes was identified in 34 pathogenic isolates, biochemically and molecularly confirmed as *A. salmonicida*, from four regions of Peru: Junin, Cajamarca, Ancash and Puno. Of the eight genes analyzed, the presence of six was detected with a very varied pattern. The 34 isolates analyzed were positive for chromosomal genes, the *vapA* gene (94%) being the most frequent, followed by the *satA* (75%) and *ahe2* (65%) genes. Plasmid genes were the least frequent (*ascV*, *aopH* and *aopO* with 35%, 29%, 35%, respectively). Six genetic profiles were found in relation to the presence of virulence genes, which suggests the genomic plasticity of this pathogen, however, other factors may have influenced the heterogeneity of the data obtained. The genetic profiles led to the establishment of the pathotype *vapA*⁺, *satA*⁺, *ahe2*⁺ *ascV*⁺, *aopH*⁺ y *aopO*⁺, which might be impacting negatively the rainbow trout culture. The results show that *A. salmonicida* isolates in Peruvian aquaculture have genetic loci that code for the main virulence factors: A layer, proteases, lipases and type 3 secretion system.

Keywords: *Aeromonas salmonicida*, *Oncorhynchus mykiss*, virulence-associated genes.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) tiene un rol indiscutible en la seguridad alimentaria a nivel mundial, regional y local debido a que es una fuente de proteína que permite combatir la desnutrición (FAO, 2012). Esta es una especie que pertenece a la familia de los salmónidos y es originaria de América del Norte, muy bien adaptada en el Perú especialmente en la sierra (AECI/PADESPA-FONDEPES, 2004), donde su cultivo se ha incrementado y ahora se desarrolla en 16 de los 24 departamentos del país y sirve de sustento económico para cientos de familias dedicadas al rubro (RNIA, 2017).

Sin embargo, esta realidad ha conducido al cultivo de truchas bajo sistemas intensivos de crianza, lo cual acompañado de deficientes prácticas de manejo ha dado lugar a la aparición de enfermedades, como la furunculosis, causada por el patógeno *Aeromonas salmonicida* que se caracteriza por la presencia de lesiones externas como hemorragia en las aletas y el orificio anal, descamación epidérmica, exoftalmia y palidez branquial; lesiones internas como ascitis sanguinolenta, renomegalia, enteritis, petequias en las vísceras y esplenomegalia (González, 2002).

A. salmonicida causa altas mortalidades en el cultivo de truchas, fluctuando entre 30 y 80% (González, 2002); es así como, muchos esfuerzos se han realizado para estudiar diferentes aspectos de este

agente patógeno con el fin de generar medidas adecuadas para frenar las infecciones causadas por esta bacteria. Entre ellos, el estudio de la diversidad de factores de virulencia es fundamental ya que esto permite comprender mejor como *A. salmonicida* interactúa con el hospedero a lo largo del proceso de infección (Nash et al., 2006).

Aeromonas salmonicida es una bacteria Gramnegativa, habiéndose caracterizados además varias subespecies. El secuenciamiento genómico de varias cepas de *A. salmonicida* ha dejado al descubierto la existencia de ciertos genes relacionados con la capacidad virulenta de este microorganismo. Entre los factores de virulencia de este patógeno están aquellos implicados en procesos de adherencia y evasión de la respuesta inmune, tales como la proteína de la capa A, codificada por el gen *vapA* y genes responsables por la biosíntesis de ácidos siálicos, entre ellos *neuB*. Otros tienen actividad citotóxica como la proteína serina proteasa (*ahc2*) y lipasa (*satA*).

Este patógeno también cuenta con un sistema de secreción tipo 3 (TTSS), cuyas proteínas tanto estructurales (*AscV*) y efectoras (*AopO*, *AopH*, entre otras) están codificadas por genes de origen plasmídico. Además, *A. salmonicida* es capaz de sintetizar sideróforos para el aprovechamiento de hierro. El gen *basB* forma parte del clúster de biosíntesis de sideróforos de esta bacteria.

Estudios realizados en otros países en cuanto a factores de virulencia (genes) de *A. salmonicida* demuestran una heterogeneidad en la distribución de estos (presencia/ausencia). Como parte de un programa de investigación para identificar genes de virulencia y candidatos para el desarrollo de vacunas, se construyó una micromatriz de ADN (DNA microarray) utilizando un subconjunto de 2024 genes del genoma de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* cepa A449 y se identificaron genes asociados con la síntesis y transporte de Sias (ácidos siálicos). Entre estos últimos se destacó el gen *neuB*, que codifica la enzima ácido siálico sintasa (Nash et al., 2006).

Jung-Schroers et al. (2018), analizaron un total de 12 factores de virulencia (12 genes) en 44 cepas de *Aeromonas* spp. mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR). En todas las cepas de *A. salmonicida* se identificó genes que codifican para lipasas (1), glicerofosfolípido: colesterol acil transferasa GCAT (1), serina proteasa (1), enterotoxina citolítica (1) y para el TTSS (2).

En un estudio, realizado por Hoel et al. (2017), quienes a partir de un total de 118 cepas de *Aeromonas* spp, de los cuales 87 fueron clasificados como *A. salmonicida*, obtenidos de muestras de sushi (una combinación de pescado y vegetales crudos) encontraron una mayor prevalencia de cierto grupo de genes de virulencia. Estos

correspondieron a genes que codifican para las toxinas formadoras de poro y hemolíticas en 99 y 98%, respectivamente, en todas las cepas.

En el Perú, se carece de estudios de cepas nacionales que permitan caracterizarlas en cuanto a sus genes de virulencia, información que puede ser utilizada para el desarrollo de medidas de prevención de esta enfermedad, como vacunas, acordes a los patógenos de habitan en nuestra realidad.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 10 años el cultivo de trucha arcoíris ha experimentado un crecimiento significativo, llegando a desarrollarse en 16 departamentos del país (PRODUCE, 2017a; RNIA, 2017). Este crecimiento ha ido de la mano con el aumento de sistemas intensivos de crianza, en los cuales los organismos en cultivo son confinados a espacios más reducidos, situación que junto a la aplicación de deficientes prácticas de manejo ha dado lugar a brotes de distintas enfermedades.

Los peces criados en sistemas acuícolas intensivos están sujetos a un mayor estrés que aquellos que se desarrollan en ambientes naturales. El alto contenido orgánico del medio ambiente, el bajo nivel de oxígeno disuelto y las densidades elevadas de cultivo incrementan la susceptibilidad de los peces a las infecciones. Es posible que los patógenos oportunistas causen pérdidas económicas significativas en estas condiciones (Bernoth, 1997; Dallaire-Dufresne et al., 2014). Una de las enfermedades que afectan a los salmónidos (salmón, trucha, etc.) es la furunculosis. La bacteria *A. salmonicida* ha sido catalogada como el agente causal de esta enfermedad sistémica caracterizada por una alta mortalidad, la cual fluctúa entre 30 a 80% de los peces (González, 2002; Janda y Abbott, 2010; Derome et al., 2016;). En el Perú, de acuerdo con los informes del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos

Hidrobiológicos, se han reportado diferentes enfermedades infecciosas, reportándose la furunculosis como una de las más frecuentes en varias regiones productivas de salmónidos como Puno, Junín, entre otros (SANIPES, 2016).

Con el fin de desarrollar enfoques adecuados (profilácticos), se han realizado muchos esfuerzos en estudiar diferentes aspectos de *A. salmonicida*, entre ellos, el estudio de la diversidad de factores de virulencia que le confieren a este patógeno la capacidad de evadir la respuesta inmune, es fundamental, ya que esto permite comprender mejor como *A. salmonicida* interactúa con el hospedero a lo largo del proceso de infección (Nash et al., 2006).

En este contexto, la detección de genes que codifican la expresión de factores de virulencia de este patógeno (*vapA*, *neuB*, *ahe2*, *satA*, *ascV*, *aopO*, *aopH* y *basB*), aisladas de trucha arcoíris cultivadas en el Perú, permitirá dilucidar si la virulencia de *A. salmonicida* está vinculada, en parte, a tales genes. Esto con el propósito de que futuras investigaciones sean orientadas hacia el desarrollo de medidas preventivas eficaces, como el desarrollo de vacunas.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Aeromonas salmonicida*.

Las bacterias del orden Aeromonadales pertenecen a la clase Gammaproteobacteria y a la familia Aeromonadaceae, donde se encuentra el género *Aeromonas* como representante. Las 26 especies contenidas en este género son bacilos anaerobios, gramnegativos y facultativos que incluyen especies no móviles, móviles, mesófilas y psicrófilas (Aravena-Román et al., 2012). Además, estos microorganismos tienen forma de bastón, miden aproximadamente $0.3 - 1.0 \times 1.0 - 3.5$ micras, no forman esporas y se adaptan a un amplio rango de temperatura entre 0 a 45 °C (Buller, 2014; Janda y Abbott, 2010). Castro et al. (2003), sostienen que la identificación bioquímica de las especies del género *Aeromonas* es compleja, por lo que es necesario el uso de técnicas moleculares para su confirmación.

A. salmonicida es una bacteria psicrófila (no crece a 37°C), no móvil, se caracteriza por ser catalasa y oxidasa positiva y está formada por cinco subespecies (*salmonicida*, *masoucida*, *pectinolytica*, *acromogenes* y *smithia*) (Boone et al., 2001; Castro et al., 2003). Se pueden distinguir entre cepas de *A. salmonicida* típicas, aquellas que al ser cultivados en agar TSA producen un pigmento intenso de color marrón-café luego de 24 a 48 horas, y atípicas, que se caracterizan por tener un crecimiento más lento (5 días) y pueden o no ser pigmentadas. Ambos tipos se encuentran ampliamente

distribuidos en cuerpos de agua dulce y agua marina (moderada salinidad), forman parte a la microbiota intestinal de peces sanos y son considerados como el agente causal de la furunculosis (Buller et al., 2004).

Los aislamientos de *A. salmonicida* pertenecientes a la subespecie *salmonicida* (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) generalmente se consideran cepas típicas y se vinculan con infecciones sistémicas en salmónidos causando la enfermedad furunculosis (Burr y Frey, 2007). Aunque todas las subespecies de *A. salmonicida* han sido implicadas en casos clínicos en peces, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* es más frecuente y por ende se asocia con mayor frecuencia a los brotes de enfermedades en salmónidos (Hiney y Olivier, 1999).

El nombre furunculosis, enfermedad sistémica y ulcerativa, deriva de los furúnculos que se generan en la piel y la musculatura de los peces afectados durante la etapa subaguda o crónica de la enfermedad, causada por cepas patogénicas de *A. salmonicida* (Austin y Austin, 2007). Aunque este signo clínico no siempre puede ser observado, las lesiones ulcerosas, que en la mayoría de los casos llega a penetrar la musculatura del pez, se constituyen como la característica clínica que permite la identificación de esta enfermedad (OIE, 2000). Se puede distinguir una etapa aguda, subaguda y crónica de la enfermedad. En la forma aguda, se produce rápidamente una septicemia que resulta de la formación de lesiones necróticas en la piel y sangrado en los órganos internos causando muerte

súbita por lo que las infecciones suelen ser fatales en aproximadamente tres días. La forma subaguda o crónica, que generalmente se presenta en peces adultos, presenta un inicio lento entre la aparición de los síntomas y la mortalidad y se caracteriza por la presencia de piel oscurecida, melanosis, pérdida de apetito, letargia y sangrado en las aletas, principalmente en la base (Boyd et al., 2003; Burr et al., 2005), lesiones internas como ascitis sanguinolenta, renomegalia, enteritis, petequias en las vísceras y esplenomegalia (González, 2002). Las úlceras, como característica más notable de esta etapa, se originan por lo general en las regiones laterales del hospedero, iniciándose como hemorragia cutánea, para luego dar lugar a una lesión blanca bordeada por tejido inflamatorio hemorrágico que finalmente termina en la piel ulcerada con exposición del tejido muscular (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017). También existe una forma latente, en la que los individuos son portadores subclínicos del patógeno (Plumb y Hanson, 2011).

En cuanto a la forma de transmisión, la forma horizontal, a través del agua contaminada, superficie de ovas infectadas, presencia de portadores vertebrados e invertebrados, equipos e indumentarias, es la principal. La transmisión vertical no ha sido claramente establecida. El aislamiento de *A. salmonicida* se obtiene inicialmente a partir de riñón anterior, bazo, lesiones de la piel o branquias sembrándose en agar tripticasa de soja (TSA) o caldo cerebro corazón. La identificación se realiza a través de aglutinación con

anticuerpos específicos, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y las técnicas de PCR de punto final y PCR en tiempo real.

3.2. Mecanismos de infección por *A. salmonicida*

Durante las infecciones ocurre una intensa interacción entre el huésped y los patógenos. Los microbios utilizan sus propias estrategias para sobrevivir y multiplicarse, combatiendo los mecanismos de defensa del sistema inmunitario del huésped. Las manifestaciones clínicas observadas durante las infecciones por *Aeromonas* sugieren que podría haber una red compleja de mecanismos patogénicos. Estudios recientes parecen reforzar esta hipótesis, dado que el grado de patogenicidad de este género depende, entre otros aspectos, de la cepa bacteriana y la ruta de la infección (Yu et al., 2005).

En los peces, la adhesión de las bacterias al mucus de las diferentes estructuras corporales es, por lo general, la primera etapa en las infecciones bacterianas (Jung-Schroers et al., 2018). Se considera que *A. salmonicida* ingresa al cuerpo del huésped a través de múltiples sitios, incluyendo la piel, branquias y el intestino, para diseminarse rápidamente a los órganos internos y causar la muerte de los organismos infectados (Farto et al., 2011). Para causar enfermedad, *A. salmonicida* debe expresar una serie de factores que le permitan superar las defensas del huésped. Varios mecanismos de virulencia presentes en *A. salmonicida* han sido caracterizados tiempo atrás

(Chu et al., 1991; Sakai et al., 1985) mientras otros han sido descubiertos más recientemente al secuenciar su genoma (Reith et al., 2008).

3.3. Patogenicidad y factores de virulencia

La patogenicidad se describe como la habilidad de un microorganismo para infectar el hospedero y causar enfermedad. Los factores de virulencia son moléculas que asisten a la bacteria para colonizar, replicar y diseminarse a nivel celular dentro del hospedero (Cross, 2008; Sharma et al., 2017), los cuales son codificados por genes cromosomales, ADN bacteriófago o plásmidos. Los factores de virulencia pueden estar alojados en islas de patogenicidad (PAIs) y/o plásmidos. Los PAIs son clústeres de genes que codifican factores de virulencia encontrados en el cromosoma bacteriano mientras los plásmidos son clústeres de genes extracromosomales que se encuentran dentro del citoplasma bacteriano (Zachary, 2017).

La mayoría de las bacterias tienen un solo cromosoma, pero pueden contener múltiples de copias de un mismo o diferentes plásmidos. Los plásmidos se replican independientemente de la división celular y, cuando una bacteria que los contiene se divide, estos elementos genéticos se distribuyen al azar en las dos bacterias resultantes. Cepas bacterianas que carecen de PAIs y/o plásmidos que cargan genes de virulencia usualmente no causan enfermedad, además, el número y tipo de factores de virulencia

en una cepa bacteriana está constantemente cambiando. Esto se da a través de selección de aquellos factores que favorecen la sobrevivencia de la bacteria en el hospedero (Zachary, 2017). Cada género bacteriano, y las cepas dentro de ese género, tienen su propio y único perfil de factores de virulencia, de tal manera que se han identificado cientos de estos factores en los diferentes géneros bacterianos.

3.4. Factores de virulencia de *A. salmonicida*

Tanto en los plásmidos como en el cromosoma de *A. salmonicida* se han identificado varios genes que codifican proteínas con capacidad citotóxica (exotoxinas), moléculas que cumplen papel en la evasión inmune, otras secretadas que afectan el metabolismo del huésped (proteínas efectoras) y algunas adicionales que confieren una ventaja competitiva frente a otros patógenos (captura de hierro, por ejemplo). (Dallaire-Dufresne et al., 2014; Lee y Ellis, 1990).

3.4.1. Proteasas

Un importante factor de virulencia son las proteasas, grupo de enzimas cuya función fisiológica normal es proveer nutrientes peptídicos al microorganismo a través de la hidrólisis de substratos poli peptídicos en moléculas más pequeñas, que luego pueden ser aprovechadas por la bacteria (Lebrun et al., 2009) Sin embargo, al ejecutar tal acción, estas proteasas

contribuyen a la patogénesis dado que el proceso de captura de nutrientes del huésped puede ocasionar daños como lesiones en sus tejidos (Sakai, 1985). Las proteasas son producidas por un amplio número de organismos y juegan un papel importante en la regulación del metabolismo, así como también en las enfermedades infecciosas.

Existen varias formas de clasificar a las proteasas. Una de ellas está basada en el grupo funcional presente en el sitio catalítico. De acuerdo a esta clasificación, se puede distinguir cuatro grupos distintos: Serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas, las cuales presentan residuos de serina, ácido aspártico, cisteína o un ion metálico divalente, respectivamente, presente en el sitio catalítico (Lebrun et al., 2009).

A. salmonicida produce muchos tipos de proteasas, entre ellas una serina proteasa codificada por el gen *ahc2* (Beaz-Hidalgo y Figueras, 2013; Meng et al., 2017). Estas enzimas se consideran un factor de virulencia importante dado que están involucradas en la licuefacción de los tejidos musculares de los peces infectados, causando la aparición de furúnculos (Coleman y Whitby, 1993; Dallaire-Dufresne et al., 2014; Fyfe et al., 1986). Además, algunos trabajos demostraron que mutantes deficientes en proteasas se convierten en avirulentos y que las inyecciones peritoneales de proteasas purificadas pueden ser letales (Lee y Ellis, 1990; Sakai, 1985).

3.4.2. Lipasas

Las lipasas, o triacilglicerol hidrolasas, son enzimas producidas por una amplia gama de bacterias. La función más resaltante de las lipasas para un microorganismo es la digestión de los lípidos para la obtención de nutrientes. Estas enzimas pueden ayudar a las bacterias a crecer bajo condiciones limitadas de carbohidratos o en ambientes donde los lípidos son la única fuente de carbono. Las lipasas favorecen el crecimiento (provisión de nutrientes) y viabilidad de especies patógenas. Esta última se da a través de ácidos grasos libres generados por la actividad lipolítica que pueden alterar la capacidad mitogénica en las diferentes células inmunes (Stehr et al., 2003; Tomas, 2012).

Las lipasas también ejercen un rol importante en la virulencia. Una de ellas, la glicerofosfolípido: colesterol acil transferasa (GCAT), es codificada por el gen *satA* (Lee y Ellis, 1990). Experimentalmente, esta lipasa, en combinación con una proteasa, que activa la liberación de proenzimas de GCAT, reproduce la formación de furúnculos sangrantes en los peces. GCAT hidroliza los fosfolípidos de la membrana, lo que resulta en la lisis de los eritrocitos de los peces. También puede unirse a lipopolisacáridos (LPS) para constituir el complejo GCAT-LPS, el cual tiene un alto peso molecular y es considerada la toxina más letal producida por *A. salmonicida* (Lee y Ellis, 1990; Vipond et al., 1998).

3.4.3. Capa A

Una propiedad asociada a la patogenicidad en *Aeromonas* es la habilidad para producir capas superficiales proteicas paracristalinas (capa S). Estas capas de superficie bacterianas sirven como una interface entre la célula y su ambiente, razón por la cual juegan un rol importante en la interacción patógeno-hospedero (Noonan y Trust, 1997). Cepas patogénicas de *A. salmonicida* poseen una colección de proteínas de superficie llamada capa A (A-layer en inglés), mientras que cepas carentes de la proteína A son avirulentos, por lo que se establece un rol central de la capa A como factor de virulencia (Udey y Fryer, 1978; Kay et al., 1981).

La capa A, codificada por el gen *vapA*, es una proteína estructural compleja que se asocia con el LPS en la superficie celular (Chart et al., 1984). La hidrofobicidad de la superficie de la bacteria es incrementada por esta proteína confiriendo resistencia a la citotoxicidad de los macrófagos, permitiendo la adherencia a estos y la autoaglutinación bacteriana. La capa A también proporciona protección contra el complemento y se ha demostrado su papel en el proceso de adhesión a diferentes líneas celulares de salmón, carpa y trucha arcoíris (Garduño et al., 2000).

3.4.4. Sistema de secreción tipo 3 (TTSS)

El sistema de secreción tipo III (TTSS) es definido como una nanomáquina, parecido a una aguja, que está embebida en la membrana de un gran número de bacterias Gramnegativas. A través de este sistema se da la translocación de proteínas efectoras (toxinas) directamente desde el citoplasma de la bacteria al de la célula huésped con el fin de alterar o manipular la función celular del hospedero (Puhar y Sansonetti, 2014).

El TTSS es una estructura compleja compuesta de varias subunidades llamadas proteínas estructurales. Existen proteínas adicionales conocidas como translocadoras, que sirven para translocar otro grupo de proteínas hacia el citoplasma de la célula hospedera. Las proteínas translocadas se llaman efectoras dado que ellas son los factores de virulencia que ejecutan los cambios en las células hospederas, permitiendo al patógeno invasor colonizar, multiplicarse, y en muchos casos persistir crónicamente en el hospedero (Coburn et al., 2007).

Los componentes estructurales del TTSS consisten de dos anillos que proveen una vía continua a lo largo de las membranas interna y externa de la bacteria, incluyendo la capa de peptidoglicano; una estructura tipo aguja que está asociado con el anillo de la membrana externa y se proyecta desde la superficie bacteriana. La longitud de esta aguja varía entre los diferentes patógenos. Las proteínas efectoras son transportadas a través de la

aguja hacia la célula hospedera, a través de los poros formados por las proteínas translocadoras en la membrana de la célula huésped (figura 1) (Coburn et al., 2007).

A. salmonicida, tiene un sistema de secreción tipo tres (TTSS) (Burr et al., 2002) y el plásmido pAsa5 transporta los 36 genes que codifican la estructura del complejo en forma de aguja y sus proteínas reguladoras, excepto la proteína AexT, la cual es codificada por un gen cromosomal (Boyd et al., 2003; Reith et al., 2008; Bergh et al., 2013).

Los efectores de TTSS desestabilizan el citoesqueleto de actina, previenen la comunicación celular y la transducción de señales que permite a las bacterias evadir la fagocitosis (Mota y Cornelis, 2005). Hasta la fecha, se han descrito cuatro efectores TTSS de *A. salmonicida*: AexT (Braun et al., 2002; Stuber et al., 2003a), AopH y AopO (Dacanay et al., 2006; Fast et al., 2009), y AopP (Fehr et al., 2006). La proteína AopO es una serina treonina quinasa codificada por el gen *aopO* y está asociada con la virulencia de esta bacteria (Dacanay et al., 2006).

En cuanto a AopH, esta es una tirosina fosfatasa codificada por *aopH*. Las proteínas efectoras AopH y AopO muestran una similitud significativa con YopH y YopO del género *Yersinia*. De manera general, los efectores secretados actúan directamente sobre las vías de señalización intracelular dirigiéndose a ciertas proteínas. Los efectos posteriores son la

inhibición de la señalización paracrina y la modulación de la fagocitosis, permitiendo que las bacterias superen las respuestas inmunes innatas y adquiridas (Dacanay et al., 2006; Reith et al., 2008).

Otros genes del TTSS importantes en la virulencia son *ascV* y *ascC*. Estudios han demostrado que la eliminación de *ascV*, que codifica una proteína de la base del TTSS situada en la membrana interna, produce una pérdida completa de la virulencia (Burr et al., 2005; Dacanay et al., 2006; Bergh y Frey, 2013). Además, este es un gen que sirve como indicador de la presencia de la maquinaria de secreción tipo III (Stuber et al., 2003a). De manera similar, la eliminación del gen *ascC*, que codifica una proteína del poro de la membrana externa del TTSS, se asocia con la pérdida completa de patogenicidad (Dacanay et al., 2006; Fast et al., 2009).

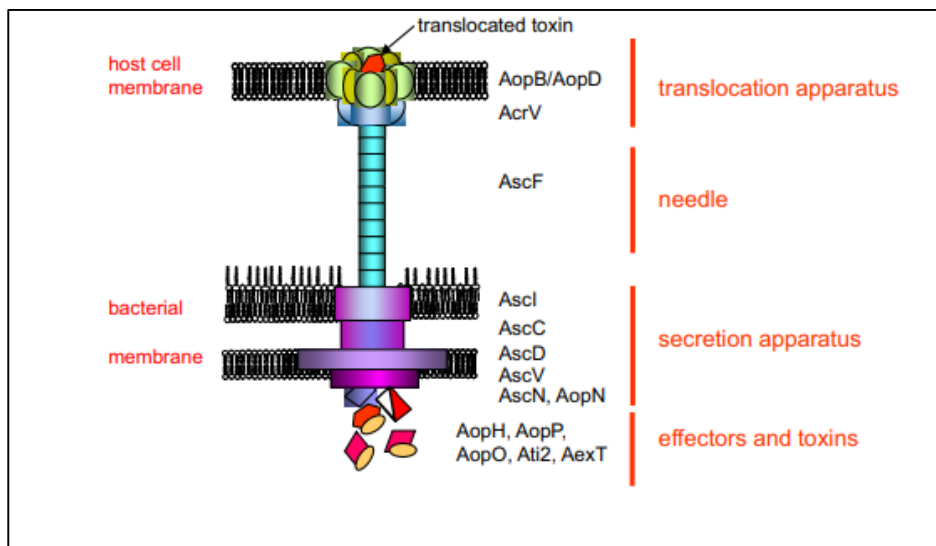


Figura 1. Estructura de aparato del sistema de secreción tipo 3 (TTSS) de *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (Frey y Origgi, 2016)

3.4.5. Adquisición de hierro.

La adquisición de hierro es reconocida como uno de los pasos clave en la supervivencia de patógenos bacterianos dentro de sus huéspedes, y contribuye significativamente en la patogénesis. En *A. salmonicida* se ha identificado el gen *fstA*, implicado en el funcionamiento de los receptores de sideróforos férricos, responsables por la absorción de hierro (Beaz-Hidalgo et al., 2008). En lo que respecta a la capacidad de sintetizar sideróforos, algunos patógenos bacterianos pueden obtener hierro por medio de estas moléculas (Crosa y Walsh, 2002). Recientemente se ha descrito el grupo de genes de *A. salmonicida* involucrados en la biosíntesis de sideróforos de tipo catecol (Beaz-hidalgo et al., 2008; Najimi et al., 2009). Entre ellos están los genes *basB* y *basC* que codifican sintetetasas de péptido no ribosomal implicados en la biosíntesis de tales proteínas.

3.4.6. Biosíntesis de ácidos siálicos (Sias).

Muchas bacterias patógenas pueden biosintetizar ácidos siálicos (Sias, del inglés sialic acids), usarlas para la mimetización molecular y, por lo tanto, para evadir el sistema inmunitario del huésped (Preston et al., 1996). Los ácidos siálicos o nonulosónicos están presentes en todas las membranas mucosas de los vertebrados. Entre las bacterias, la capacidad de catabolizar el ácido siálico como fuente de carbono está presente principalmente en las especies comensales de animales, pero también entre

las patógenas (Lubin et al., 2012). Los ácidos siálicos pueden ser utilizados de varias maneras; por ejemplo, varias especies de bacterias patógenas han demostrado decorar sus superficies celulares con ácido siálico para evitar que el sistema inmunitario del huésped las reconozca; así también pueden utilizar esta molécula como única fuente de carbono, hecho que se mostró por primera vez en *Clostridium perfringens* (Varki, 1992, 2008; Vimr et al., 2004; Vimr y Lichtensteiger, 2002).

En otros estudios, el genoma completo de la cepa *Aliivibrio salmonicida* LFI1238 revela que posee la capacidad de sintetizar dos Sias, entre ellos, ácido neuramínico (Neu) y ácido legionamínico. El genoma de esta bacteria contiene tres copias de un grupo de genes homólogos al grupo de genes Neu de *Escherichia coli*, que participa en la síntesis de Sias que se encuentra en la cápsula de *E. coli*. El primer grupo de genes Neu (Neu1) se asemeja al de *E. coli* tanto en la secuencia como en la disposición de los genes y es probablemente responsable de la síntesis de Neu en *Aliivibrio salmonicida* LFI1238 (Hjerde et al., 2008).

Como parte de un programa de investigación para identificar genes de virulencia y candidatos para el desarrollo de vacunas, se construyó una micromatriz de ADN (DNA microarray) utilizando un subconjunto de 2024 genes del genoma de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* cepa A449. Se identificó genes asociados con la síntesis y transporte de Sias, entre ellos el gen *neuB*, que codifica la enzima ácido siálico sintasa (Nash et al., 2006).

Por todo lo anterior, queda claro que *A. salmonicida*, como cualquier otro patógeno, cuenta con una gran diversidad de factores de virulencia, que pueden ser únicos para este patógeno, por lo que existe la necesidad de estudiar estos microorganismos provenientes de acuicultura peruana, específicamente del cultivo de trucha arcoíris.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El cultivo de salmónidos como la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* juega un rol muy importante a nivel mundial. En los últimos años, esta actividad productiva ha generado gran interés en los acuicultores del Perú especialmente en las regiones Puno, Junín, Huancavelica, Ayacucho y Cusco (RNIA, 2017) no sólo porque se presenta como una fuente proteica para los pobladores, sino también porque se consolida como una alternativa de desarrollo económico (PRODUCE, 2015; 2016).

Debido a la alta rentabilidad que genera esta actividad acuícola, los sistemas de crianza de trucha han sido intensificados generando altas producciones de alrededor de 54,424 toneladas en el 2017 (PRODUCE, 2017b). Sin embargo, en muchos casos, los centros piscícolas cuentan con pobres sistemas de manejo técnico y sanitario lo que ha permitido la aparición de enfermedades causadas mayormente por bacterias, entre ellas la furunculosis, causada por el patógeno *Aeromonas salmonicida*, la cual genera altas mortalidades, entre el 30-80 %, principalmente en la forma aguda de la enfermedad.

En el Perú hay un vacío en cuanto a estudios acerca de la caracterización genética de cepas patogénicas nacionales de *A. salmonicida* aisladas, por lo que es importante ahondar los conocimientos en cuanto al modo de interacción entre este patógeno y el hospedero. Una forma de

lograr esto es mediante el estudio de genes que pueden estar vinculados a la virulencia de esta bacteria.

Con los resultados de esta investigación, se pueden tomar acciones direccionadas a encontrar medidas efectivas para prevenir y controlar las infecciones ocasionadas por *A. salmonicida* mediante el desarrollo de estrategias de control de la furunculosis basándose en la utilización de antígenos específicos para el desarrollo de vacunas. Esta acción junto a la implementación de buenas prácticas de manejo permitirá menguar las mortalidades y por ende las pérdidas económicas en el cultivo de trucha arcoíris en el Perú ocasionada por esta bacteria patogénica.

V. HIPÓTESIS

Todas las cepas de *A. salmonicida* aisladas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en Perú, presentan al menos 2 genes asociados a virulencia seleccionados en este estudio.

VI. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

- Identificar genes asociados a la virulencia en cepas patogénicas de *Aeromonas salmonicida* aisladas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con signos clínicos de furunculosis procedentes de piscigranjas del Perú.

5.2. Objetivos específicos.

- Detectar mediante PCR la presencia de los genes: *vapA*, *neuB*, *ahe2*, *satA*, *ascV*, *aopO*, *aopH* y *basB* en cepas patogénicas de *A. salmonicida* aisladas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) procedentes de piscigranjas del Perú.
- Establecer patotipos en relación con los perfiles de los genes de virulencia de cepas patogénicas de *A. salmonicida* aisladas de trucha arcoíris (*O. mykiss*) procedentes de piscigranjas del Perú.

VII. METODOLOGÍA.

6.1. Lugar de estudio.

Las cepas de *A. salmonicida* empleadas en el presente trabajo de investigación fueron facilitadas por el Laboratorio de Parasitología de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se incluyeron cepas recientemente aisladas. Todas las cepas han sido obtenidas de 7 centros acuícolas ubicadas en las regiones de Junín (4), Cajamarca (1), Ancash (1) y Puno (1), las cuales fueron caracterizadas por medio de pruebas bioquímicas y moleculares, a través de la amplificación del gen ARNr 16S por Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), siendo clasificadas dentro del género *Aeromonas*, especie *salmonicida*.

Las muestras fueron procesadas en el mismo Laboratorio.

6.2. Tipo de estudio

La presente investigación es de tipo básica – descriptiva, transversal.

6.3. Criterios de inclusión y exclusión

Fueron incluidas cepas de *A. salmonicida* previamente confirmadas mediante pruebas bioquímicas y PCR, que forman parte del cepario del

laboratorio de Parasitología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y otras recientemente aisladas y confirmadas por las pruebas antes mencionadas.

Se excluyó otras especies bacterianas o aislados de *A. salmonicida* procedentes de animales asintomáticos o aparentemente sanos.

6.4. Tamaño de muestra

Se trabajó con el total de la población objetivo, la cual estuvo conformada por 28 cepas de *A. salmonicida* (cepario) aisladas en el periodo julio-septiembre del 2018 y otras 8 recientemente aisladas en octubre del 2019, todas provenientes de truchas arcoíris (*O. mykiss*) con signos clínicos sugestivos de furunculosis cultivadas en diferentes piscigranjas del Perú.

6.5. Recolección y procesamiento de datos

6.5.1. Reactivación de cepas bacterianas

Las cepas de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) cultivadas en Perú fueron reactivadas en Agar de Soja Trípico (Tryptic Soy Agar, TSA) y agar selectivo GSP (Glutamate Starch Phenol Red Agar) (Sigma-Aldrich, USA). Las cepas fueron

incubadas a 22-24 °C durante 24-48 h (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017). Se realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa, seguido de la tinción de Gram. Los cultivos madre se mantuvieron congelados a -80°C.

6.5.2. Eutanasia de los peces y aislamiento de bacterias.

Con la finalidad de enriquecer el número de cepas se incluyeron 8 adicionales procedentes de un centro acuícola en la localidad de Chupaca-Junín. Para ello, 25 truchas arcoíris con signos clínicos sugestivos de furunculosis fueron capturadas, de las cuales 10 fueron juveniles y 15 peces adultos, con un peso y talla promedio (longitud) de 153 gr y 17 cm, respectivamente, para los primeros; y 1.65 kg y 28.5 cm, para los segundos. Los especímenes, siguiendo lo recomendado por Noga (2010), fueron eutanasiados con sobre dosis de Eugenol (50 mg/L) por un periodo de 4-5 minutos y luego sacrificados a través de un corte en el cordón espinal.

Se realizó la necropsia de los especímenes y se sembraron en placas, con agar TSA (Liofilchem, USA), repiques de riñón anterior, bazo y de las regiones ulceradas de la piel. Las placas fueron incubadas a 20°C por 24-48 horas. Las colonias presuntivas de *A. salmonicida* fueron repicadas nuevamente en agar TSA y GSP para confirmar resultados (Orvay, 1993 y Barbara *et al.*, 2008). Seguidamente se realizó las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa y tinción de Gram observándose las células bacterianas con un microscopio óptico ZEISS.

6.5.3. Extracción de ADN

El ADN fue extraído de cultivos bacterianos puros (una colonia de cada aislado) empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega-USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN fueron evaluadas utilizando el equipo nanodrop (Thermo Scientific, USA). Para medir la concentración, se realizaron lecturas de las muestras a 260 nm, en donde una densidad óptica de 1 corresponde a 50 µg/ul de ADN de doble cadena. La pureza del ADN se calculó teniendo en cuenta la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm (longitud de onda a la que se realiza la lectura de proteínas). La relación A260/A280 entre 1.7–2.0 fue considerado como un valor de pureza aceptable. El ADN extraído fue conservado a -20°C para usos posteriores.

6.5.4. Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación molecular de *A. salmonicida*.

Para la amplificación del ADN se emplearon los cebadores AS1 (5'-GGCCTTTCGCGATTGGATGA-3') y AS2 (5'-TCACAGTTGACACGTATTAGGCGC-3') según lo establecido por Hoie et al. (1997). Las reacciones fueron trabajadas a un volumen final de 20 µl: 2X del buffer PCR, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 0.5 U Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0.4 pmol de cada cebador y 50 ng ADN molde. El protocolo de PCR fue de la siguiente manera: una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C por 4 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C

por 1 min, alineamiento a 50 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min; y una etapa de extensión final a 72°C por 10 min. Las cepas *A. salmonicida* ATCC® 33658 y *E. coli* ATCC® 25865 fueron utilizadas como control positivo y negativo, respectivamente, en cada reacción.

Los amplicones generados (271 bp) fueron analizados por electroforesis (80 V/cm durante 1 hora) en geles de agarosa (Calbiochem, Alemania) al 1%. DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) de peso molecular 100 bp fue utilizado como marcador. La tinción se realizó con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) por 15-20 minutos, seguidamente el gel fue lavado con agua destilada. Las bandas de ADN fueron visualizadas con transiluminador de luz UV (DNR Bio-Imaging Systems, USA) y fotografiadas con el sistema Kodak (EDAS, DC-120).

6.5.5. Diseño de primers para la identificación de genes de virulencia de *A. salmonicida*.

Para la detección de los genes *ascV*, *aopO*, *aopH*, *vapA*, *ahe2* y *satA* se utilizaron primers referenciados. Para los genes *neuB* y *basB* se diseñaron primers utilizando el programa Primer3 (tabla 1), para lo cual se obtuvo la secuencia de los genes desde la base de datos del Genbank correspondiente a la cepa *A. salmonicida* 0449. El mejor par de primers para cada gen se eligió teniendo en cuenta los parámetros de longitud (17-28 nt), temperatura de melting (T_m), el cual estuvo entre 50-60°C, el % GC (40-60%), también se verificó que los primers no formen dímeros o

heterodímeros. Luego el mejor par de primers de cada gen fue evaluado con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mediante el análisis de los parámetros E-valor (<0.02), cobertura de la secuencia problema (query cover) y el porcentaje de identidad ($>70\%$).

6.5.6. PCR convencional para la identificación de genes de virulencia de *A. salmonicida*.

Las amplificaciones del ADN bacteriano, previamente extraído, fue realizado a través de una PCR punto final o convencional para cada gen en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Para ello, los volúmenes finales de las reacciones fueron de 20 μL : 2,5 μL de 10 x buffer PCR, 1 μL de dNTP (0,2 mM), 1,5 μL de MgCl_2 (1,5 mM), 1 μL de cada primer (0,4 mM), 0,25 μL de polimerasa (Platinum Taq polimerase, Invitrogen), y 1 μL de DNA (50 ng). El termociclador fue programado de la siguiente manera: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$ (5 min); seguido de 30 ciclos de amplificación con temperaturas de desnaturalización de 94 $^{\circ}\text{C}$ (por 1 min), hibridación a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min para los genes *ascV*, *satA* y *ahe2*, 56 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min para los genes *aopO* y *aopH*, 58 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min par el gen *vapA*, *neuB* y *basB*. Se aplicó 1 ciclo final de 72 $^{\circ}\text{C}$ (10 min).

A. salmonicida ATCC® 33658 fue usada como control positivo para todos los genes excepto para el gen *ascV*, dado que no se pudo

amplificar en esta cepa en estudios previos (Burr y Frey, 2007; Lago et al., 2012). Para el gen *ascV* se utilizó la cepa *A. salmonicida* JF2267 la cual fue suministrada por el Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty - University of Bern. Agua libre de nucleasas fue incluida como blanco y *E. coli* ATCC® 29473 como control negativo.

El análisis de los amplicones generados fueron mediante electroforesis y fotografiados como lo indicado previamente en el punto 6.5.4. Los amplicones fueron de tamaños variados dependiendo del gen (tabla 1).

6.6. Plan de análisis de datos

Los resultados fueron analizados con estadística descriptiva (distribución de frecuencias). El manejo de datos recolectados en campo, tablas y representaciones gráficas se realizaron con el programa Microsoft Excel 2016.

6.7. Consideraciones éticas

Este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la UPCH con el número de registro 104021.

Tabla 1. Cebadores para la identificación de los genes de virulencia de *A. salmonicida*.

Gen	Secuencia de nucleótidos 5' – 3'	Amplicón	T° alineamiento (°C)	Referencia
<i>ascV</i>	F-> 5'-GCCCGTTTTGCCTATCAA-3'	870	57	(Burr y Frey, 2007)
	R -> 5'-GCGCCGATATCGGTACCC-3'			
<i>aopO</i>	F-> 5'-CGAGACAGACAAGTTTGC-3'	401	54	Burr y Frey, 2007)
	R -> 5'-TGTCGTTGTGGACTATCC-3'			
<i>aopH</i>	F -> 5'-TCAATCAGGACGATGTCTG-3'	518	56	Burr y Frey, 2007)
	R -> 5'-GTTGGCATTGAGATCTGC-3'			
<i>satA</i>	F -> 5'-CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG-3'	487	55	(Soler <i>et al.</i> , 2002)
	R -> 5'-GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT-3'			
<i>vapA</i>	F -> 5'-GGGTAAGCTGTTCCAGTTGAGTTTG-3'	555	59	(Meng <i>et al.</i> , 2017)
	R -> 5'-CTTGAAGGCAGAAACATCACCAGTC-3'			
<i>ahe2</i>	F -> 5'-GCCTGGTGGATGTGAACAAGAC-3'	392	50	(Meng <i>et al.</i> , 2017)
	R -> 5'-TGATCGACCTGCGTGCTGGA-3'			
<i>neuB</i>	F -> 5'-GATCTGCTGGAATCCCTCGA-3'	543	56	Este estudio
	R -> 5'-ATGGTGCGCAGGTTGTATTC-3'			
<i>basB</i>	F -> 5'-GCAGTATTGAATAGCCCGCC-3'	500	53	Este estudio

F: Forward; R: Reverse

VIII. RESULTADOS

7.1. Identificación bioquímica y molecular (PCR) de *A. salmonicida*.

De las 28 cepas de *A. salmonicida* presentes en el cepario, fueron reactivados 26. Las dos cepas restantes (Junín y Ancash) no fueron incluidos por problemas de contaminación. Además, se lograron incorporar 8 cepas adicionales, los cuales junto con los anteriores resultaron positivos para las pruebas de oxidasa y catalasa. La tinción de Gram reveló la presencia de diplobacilos de un color rosado tenue (Gudmundsdottir y Bjornsdottir, 2017). (Figura 2). Las 34 cepas analizadas en este estudio y la cepa control *A. salmonicida* ATCC® 33658 fueron confirmados molecularmente (Figura 3).

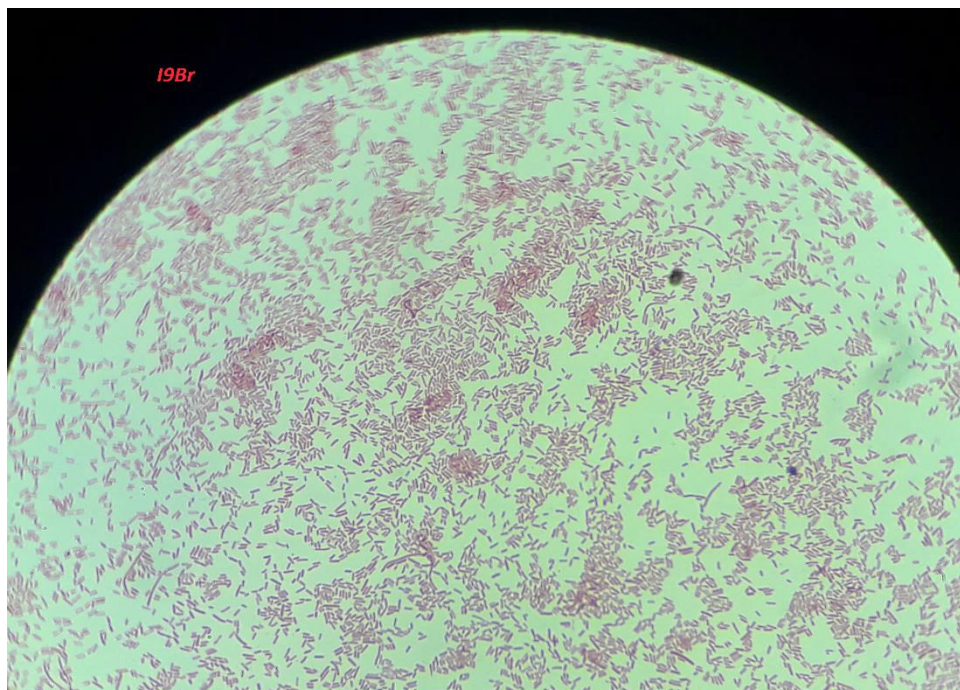


Figura 2. Tinción de Gram. Se observa la presencia de diplo bacilos de color rosado tenue.

7.2. Detección de la presencia de genes de virulencia por PCR.

Los resultados de PCR para los diferentes genes de virulencia cromosomales y plasmidiales se muestran en la tabla 1. Se logró detectar solo 6 genes (*vapA*, *satA*, *ahe2*, *ascV*, *aopO* y *aopH*) distribuidos de manera variada, en donde las 34 cepas (100%) fueron positivas para al menos 2 genes que codifican factores de virulencia. De las 34 cepas analizadas, 7 (21%) fueron positivas para los 6 genes considerados en el presente estudio. Los genes *neuB* y *basB* no fueron identificados. Se encontró que el gene cromosomal *vapA* (94%) fue el más prevalente, seguido de los genes *satA* (76%) y *ahe2* (65%) (Gráfico 1; Figuras 4, 5 y 6).

En cuanto a los genes plasmídicos, se pudieron detectar solo en 15 (44%) de las 34 cepas, los cuales corresponden fundamentalmente a las 8 cepas adicionales incorporados a este estudio procedentes de Junín y 7 aislados que eran parte del cepario (Tabla 1 y Figuras 7, 8 y 9). Sin embargo, también se presentó una variabilidad en la presencia de estos genes en este grupo (n=15). El gen estructural *ascV* fue identificado en 12 de las cepas anteriormente mencionados, sin embargo, la presencia de los genes efectores *aopO* y *aopH* fue más heterogénea.

Tabla 2. Presencia de genes asociados a la virulencia de *A. salmonicida* detectados por Reacción en la Cadena de la Polimerasa (PCR)

Código aislado	Región	Genes cromosomales					Genes plasmídicos		
		vapA	satA	ahe2	neuB	basB	ascV	AopH	AopO
n=34		32	26	22	0	0	12	10	12
I9Br	Junín	+	-	+	-	-	+	-	+
I9Rr	Junín	+	-	+	-	-	+	-	+
T12B	Junín	+	-	+	-	-	+	-	+
P23B	Junín	+	+	+	-	-	-	-	-
P24B	Junín	+	+	-	-	-	-	-	-
P8B	Junín	+	+	-	-	-	-	-	-
6R	Huaraz	+	+	-	-	-	-	-	-
5B	Huaraz	+	+	-	-	-	-	-	-
DE1B	Junín	+	+	-	-	-	-	-	-
DE3B	Junín	+	-	+	-	-	+	-	+
C12B	Puno	+	-	+	-	-	-	+	-
C18R	Puno	+	-	+	-	-	-	+	-
C18B	Puno	-	+	+	-	-	-	-	-
C15R	Puno	+	-	+	-	-	-	+	-
K5B	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
K16R	Cajamarca	-	+	+	-	-	-	-	-
K16P	Cajamarca	+	+	+	-	-	-	-	-
K7R	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
K22P	Cajamarca	+	+	+	-	-	-	-	-
K6P	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
K19B	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
K19R	Cajamarca	+	+	+	-	-	-	-	-
K14P	Cajamarca	+	+	+	-	-	-	-	-
K21B	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
K23B	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
K29B	Cajamarca	+	+	-	-	-	-	-	-
CHR2	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+
CHR3	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+
CHB5	Junín	+	-	+	-	-	+	-	+
CHR8	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+
CHR9	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+
CHL12	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+
CHL13	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+
CHL14	Junín	+	+	+	-	-	+	+	+

+: resultado positivo; -: resultado negativo

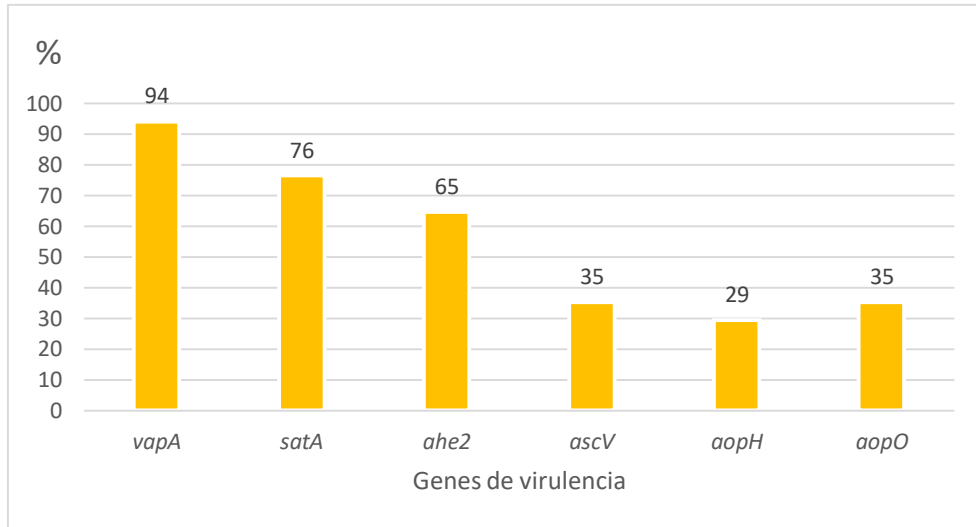


Gráfico 1. Frecuencia de genes de virulencia de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú.

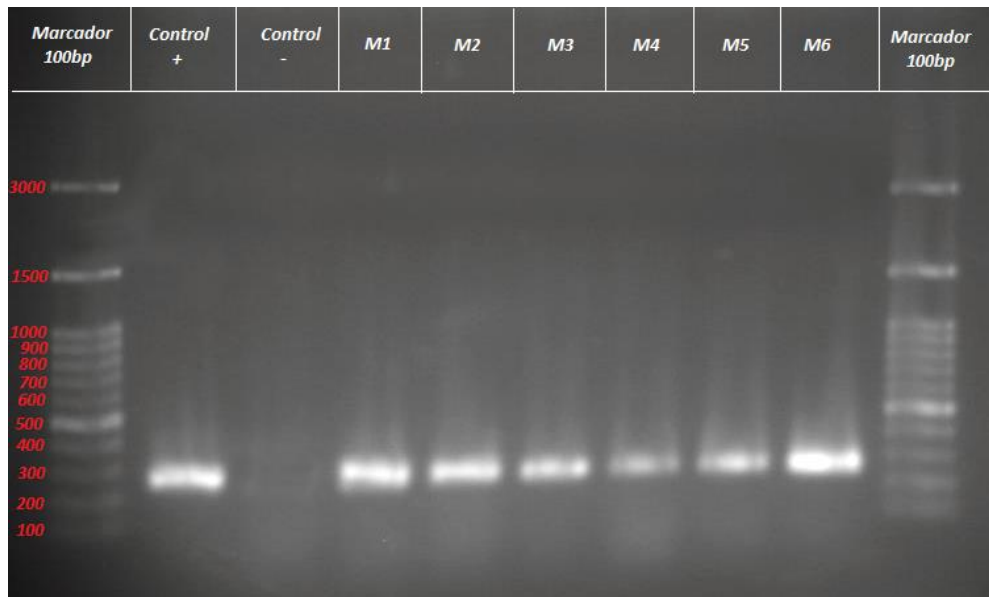


Figura 3. Identificación molecular por PCR de *A. salmonicida* mediante la amplificación del gen ARNr 16s. Se observa un amplicón de 271 bp. Carril 2: control positivo: *A. salmonicida* ATCC® 33658. Carril 3: control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas.

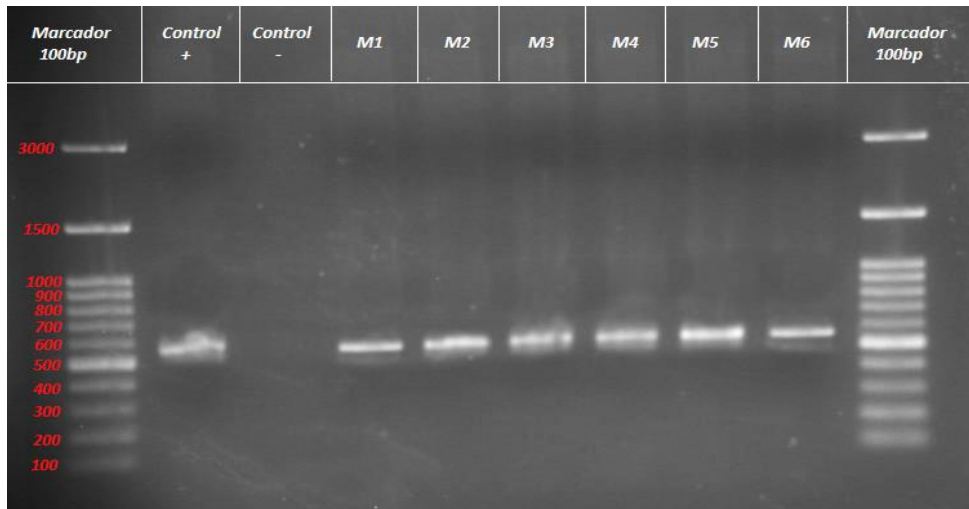


Figura 4. Identificación molecular del gen *vapA* de *A. salmonicida*. Se observa un amplicón de 550 bp. Carril 2: control positivo *A. salmonicida* ATCC® 33658. Carril 3: Control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas.

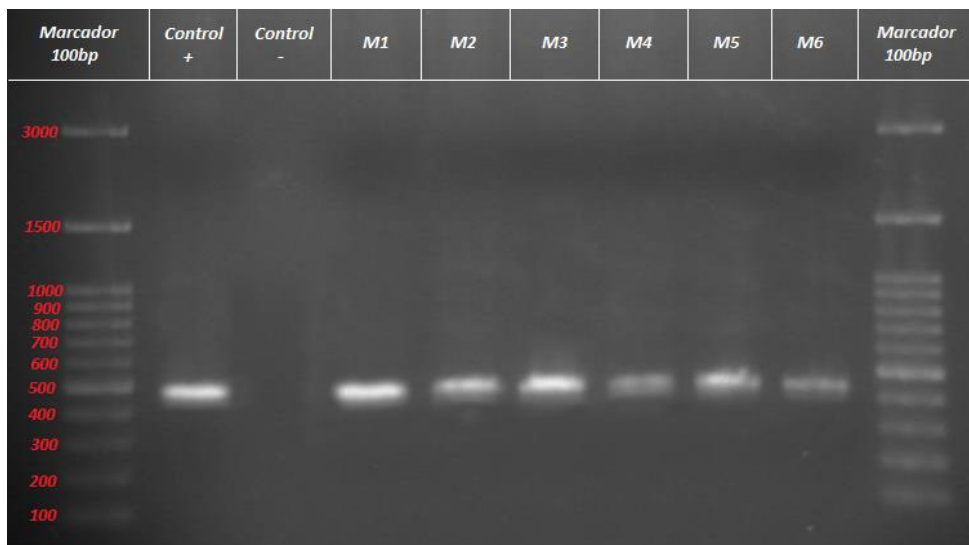


Figura 5. Identificación molecular por PCR del gen *satA* de *A. salmonicida*. Se observa un amplicón de 487 bp. Carril 2: control positivo *A. salmonicida* ATCC® 33658. Carril 3: Control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas.

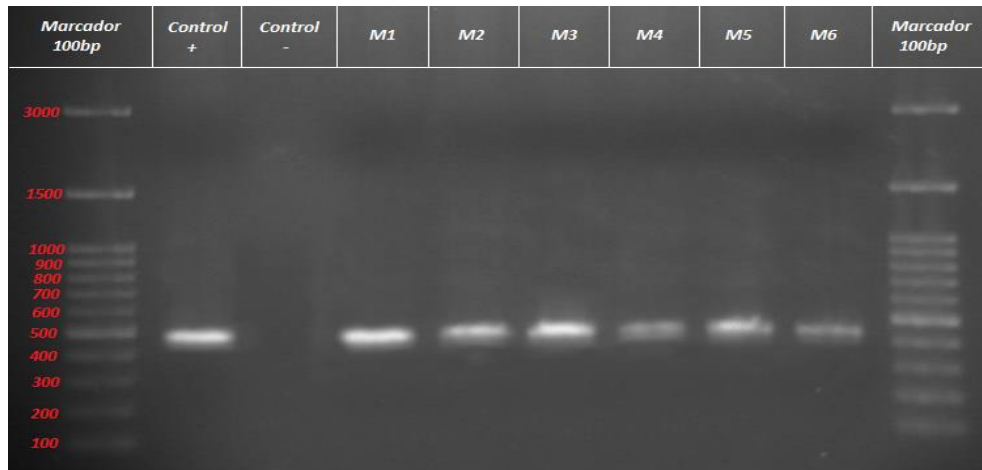


Figura 6. Identificación molecular por PCR del gen *ahe2* de *A. salmonicida*. Se observa un amplicón de 390 bp. Carril 2: control positivo *A. salmonicida* ATCC® 33658. Carril 3: Control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas

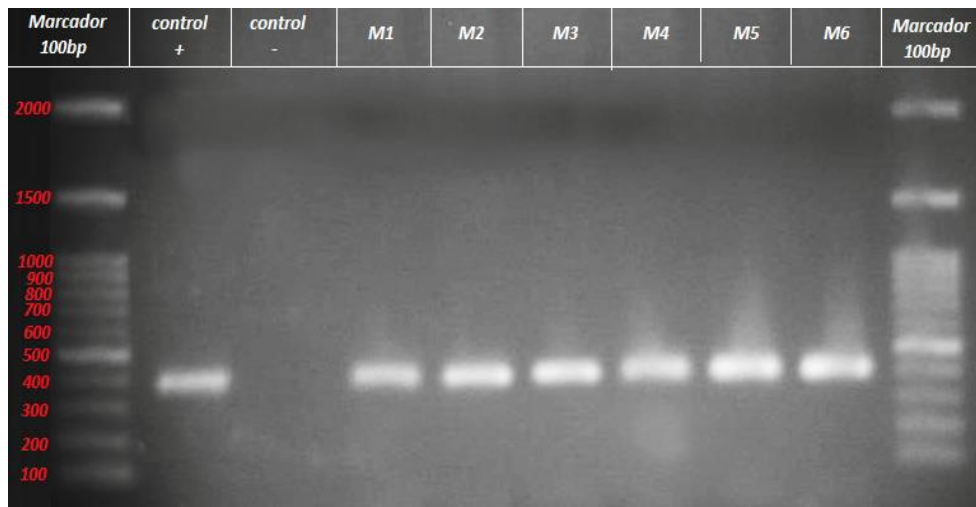


Figura 7. Identificación molecular por PCR del gen *aopO* de *A. salmonicida*. Se observa un amplicón de 401 bp. Carril 2: control positivo *A. salmonicida* JF2267. Carril 3: Control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas.



Figura 8. Identificación molecular por PCR del gen *ascV* de *A. salmonicida*. Se observa un amplicón de 879 bp. Carril 2: control positivo *A. salmonicida* JF2267. Carril 3: Control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas.



Figura 9. Identificación molecular por PCR del gen *aopH* de *A. salmonicida*. Se observa un amplicón de 518 bp. Carril 2: control positivo *A. salmonicida* JF2267. Carril 3: Control negativo *E. coli* ATCC® 29473. M1-M6: muestras analizadas.

7.3. Perfiles genéticos de *A. salmonicida*.

Se encontró 6 perfiles genéticos con base en la posesión de genes de virulencia (Tabla 3). Solo el 21% de las cepas fueron agrupados en el perfil genético A1, el cual comprende los 6 genes detectados en el estudio (Grafico 2). Los perfiles genéticos restantes (A2, A3, A4, A5 y A6) carecen de dos o más genes de virulencia, siendo A5 el perfil mejor representado con 32%.

Las cepas de las regiones de Cajamarca, Ancash y Puno fueron distribuidas en los perfiles genético A3, A4, A5 Y A6, mientras que los de Junín fueron incluidos fundamentalmente en los perfiles A1 y A2 (Gráfico 2).

Tabla 3. Perfiles genéticos de diferentes cepas de *A. salmonicida* en relación a la presencia de genes de virulencia.

Perfil	Gen						N	%
	vapA	satA	ahe2	ascV	aopH	AopO		
A1	+	+	+	+	+	+	7	21
A2	+	-	+	+	-	+	5	18
A3	+	-	+	-	+	-	3	9
A4	+	+	+	-	-	-	5	15
A5	+	+	-	-	-	-	12	32
A6	-	+	+	-	-	-	2	6
Total							34	100

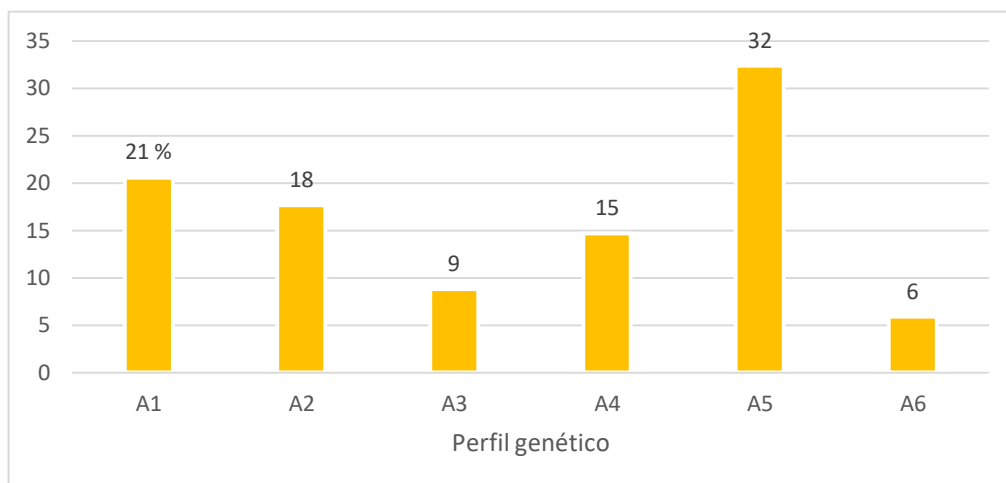


Gráfico 2. Perfiles genéticos de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú.

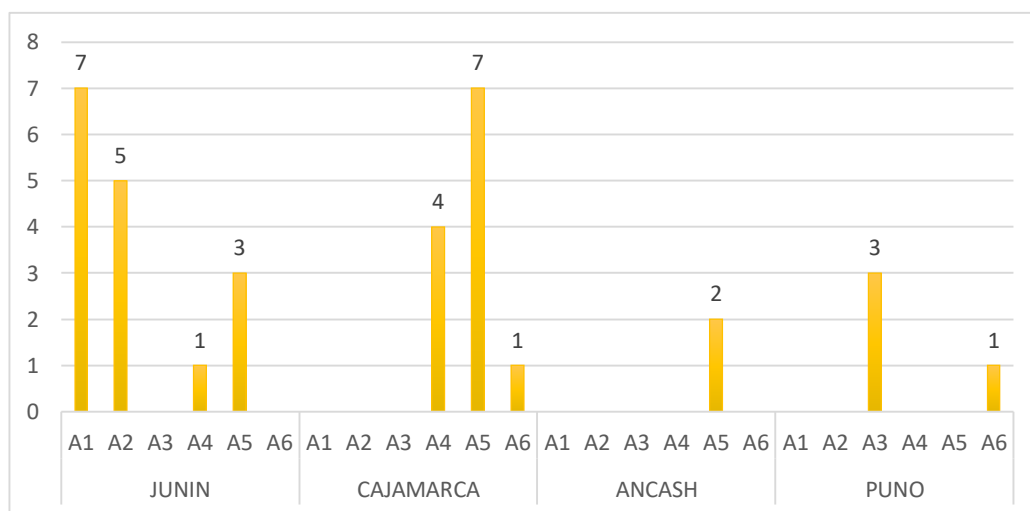


Gráfico 3. Perfiles genéticos por región de *A. salmonicida* aisladas de truchas arcoíris de la Sierra del Perú.

IX. DISCUSIÓN

La capacidad de un patógeno para causar enfermedad en un huésped es el resultado de una combinación de factores como la resistencia a las amenazas del medio ambiente y a las defensas del hospedero, mecanismos de obtención de recursos limitantes, entre otros. Existe una gran variedad de componentes bacterianos, por lo general específicos para cada cepa; involucrados en la adhesión, crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos, algunos de estos factores son muy dañinos y por lo tanto se les llama factores de virulencia (Lebrun et al., 2009).

El patógeno *Aeromonas salmonicida* ha sido aislado de diferentes especies de peces, principalmente salmónidos, y muestra una amplia variación en cuanto a su virulencia debido a la presencia muy heterogénea de genes asociados a tal característica, en donde los efectos causados por los factores de virulencia (codificado por genes) determinan el grado de agresividad de una determinada cepa (Nash et al., 2006).

Por primera vez en el Perú, mediante el empleo de la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR), se investigó la presencia de 8 genes de virulencia (la mayoría de ellos asociados con los diferentes estadios de infección en salmónidos) en cepas patogénicas de *A. salmonicida*, aisladas de trucha arcoíris con signos clínicos sugestivos de furunculosis, de diferentes centros de cultivo de 4 regiones del país. La presencia de varios de estos genes ha sido estudiada en cepas aisladas en otros países,

principalmente en salmón, pero no la combinación de genes estudiados en la presente investigación para la especie trucha arcoíris *Onchorynchus mykiss*. En la truchicultura peruana, actividad ampliamente desarrollada en 16 de los 24 departamentos del Perú, la furunculosis ha sido reportada como una de las enfermedades más prevalentes (36%), según el informe del Plan Nacional de Vigilancia Sanitaria de los Recursos Hidrobiológicos del SANIPES (2016).

Los 6 genes detectados (de un total de 8), con sus respectivas diferencias de frecuencia, revelan que la virulencia de microorganismos patógenos, en este caso *A. salmonicida*, varía no solo en función del género, sino también entre especie, subespecies y tipo de cepa bacteriana (Chao et al., 2013). En general se observó un grado más alto de variabilidad en los genes asociados con elementos móviles como plásmidos mientras que los genes cromosomales mostraron un nivel más bajo de variabilidad (Tabla 2).

La ausencia de los genes *neuB* y *basB* en las 34 cepas, probablemente pueda deberse a algún error durante el ensayo (como la ausencia de complementariedad de los primers). En ese sentido, es importante señalar que en un estudio utilizando microchips (DNA microarrays), en cepas de *Aeromonas*, donde se analizó más de 2000 genes asociados a virulencia, se encontró que la mayoría de genes relacionados con la biosíntesis de carbohidratos de superficie (ácidos siálicos, *neuB*) estuvieron en bajas copias o ausentes (Nash et al., 2006). Esto sugeriría que

el producto de estos genes no es tan relevante en la patogenia de la furunculosis de la trucha arcoíris.

El gen cromosomal *vapA*, que codifica para una subunidad proteica de la capa superficial (capa S), fue el más frecuentemente identificado (94%) en las cepas. Se sabe que la capa S de *Aeromonas* spp. puede jugar un rol importante en la virulencia, dado que está en contacto directo con las células del hospedero y los diferentes factores del sistema inmune (Noonan y Trust, 1997). La incapacidad de secretar las subunidades de la capa S, tales como la proteína VapA, se debe en parte a las condiciones de cultivo, que según lo reportado por Ishiguro et al. (1981), cultivar *A. salmonicida* a elevadas temperaturas (cerca de 25°C) resultó en la pérdida de la capa S y por lo tanto de su virulencia. Si bien este gen fue el más frecuente, no se puede atribuir como el único o principal factor de virulencia responsable de la aparición de la enfermedad, dada la complejidad en la patogenia de *A. salmonicida* (Albert et al. 2000).

En este estudio solo dos cepas de la colección del cepario procedentes de Puno y Cajamarca fueron negativas para el gen *vapA*, probablemente debido a que en estas dos cepas (y otros 3 de la región Cajamarca) luego de la reactivación se observó una aparente contaminación en placa, por lo que fue necesario realizar repiques adicionales para obtener un cultivo puro. Además, al no observar un buen crecimiento a 22°C, se les incubó a 24°C. La inactivación de este gen *vapA* puede ocurrir por la

inserción de dos secuencias de inserción (ISAS1 y ISAS2), muy estudiadas en el genoma de *A. salmonicida* o por la eliminación parcial del gen bajo ciertas condiciones estresantes de cultivo (Belland y Trust, 1985; Gustafson et al., 1994; Reith et al., 2008). Sin embargo, en las otros 3 cepas que pasaron por el mismo proceso, si se detectó la presencia de tal gen; por lo que, además de la temperatura, otros factores pueden haber influido en una aparente mutación de este gen en las dos cepas antes señalados.

El gen *satA* (76%) fue el segundo más frecuente y codifica para la lipasa glicerofosfolípido: colesterol acil transferasa (GCAT). La principal función de las lipasas es la actividad lipolítica, es decir, digieren lípidos que luego son aprovechados por las bacterias para crecer en ambientes donde las grasas son la única fuente de carbono tal como fue demostrado para especies de *Staphylococcus* (Stehr et al., 2003). Comparando nuestros resultados con los detectados en otras especies de *Aeromonas*, la frecuencia de este gen es superior a lo obtenido por Oliveira et al. (2012), quienes identificaron por PCR 4 genes de virulencia en 119 cepas de *Aeromonas hydrophila*, entre ellos una lipasa que estuvo presente en un 57.89%, lo cual probablemente se deba al número de cepas analizadas o bien a la especie del patógeno y al hospedero de donde fueron obtenidos, el cual fue de lesiones, riñón e intestino de pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*). La lipasa codificada por el gen *satA* (GCAT) ha sido asociada con la inducción del shock circulatorio, causante de la muerte de los peces con un cuadro de furunculosis, dado que luego de una inyección intravascular de GCAT se observó una coagulación

diseminada en los vasos sanguíneos (coagulopatía por consumo) (Salte et al., 1992)

En tercer lugar, se detectó el gen *ahe2* (65%), que codifica para una proteasa. Este resultado es superior a lo obtenido por Hu et al. (2012), quienes trabajaron con 5 genes de virulencia e identificaron una serina proteasa (*ahp*) en el 51% de las cepas, lo cual podría explicarse por el mayor número de cepas (202), con respecto al presente estudio, lo que incrementó la variabilidad. La función real de las proteasas es proveer al patógeno con nutrientes de origen peptídico mediante la hidrólisis de estos. No obstante, al ejecutar esta función, se convierten en factores de virulencia dado que contribuyen a la patogénesis de un microorganismo. Además, son consideradas como los principales factores de virulencia entre todos los demás factores extracelulares (Secades y Guijarro, 1999). En el caso de *A. salmonicida* se le asocia con la aparición de furúnculos, probablemente por la degradación de tejidos musculares y/o componentes celulares (Lebrun et al., 2009; Coleman y Whitby, 1993; Dallaire-Dufresne et al., 2014; Fyfe et al., 1986). Del mismo modo, al igual que la lipasa GCAT (*satA*), la proteasa Ahe2 ha sido vinculada con shock circulatorio en peces luego de la inyección de esta proteína purificada (Salte et al., 1993).

Si bien estos genes fueron los más frecuentes, no se puede asegurar que tales genes estén relacionados exclusivamente con la capacidad virulenta de estas cepas de *A. salmonicida*. En estudios previos se ha

demostrado que los productos codificados por los genes *vapA*, *tapA*, *aexT*, *satA* y *aspA* en cepas patogénicas de *A. salmonicida* aislados de salmónidos, no fueron determinantes en la virulencia de este patógeno (Vipond et al. 1998, Masada et al. 2002, Dacanay et al. 2006, Austin y Austin 2007, Boyd et al. 2008).

Se ha demostrado que, además de proteínas secretadas hacia el ambiente extracelular, *A. salmonicida* es capaz de translocar toxinas directamente hacia el citosol de las células del pez a través de un sistema de secreción tipo III (TTSS) (Burr et al., 2002). Una vez que las proteínas efectoras de TTSS se encuentran en el citoplasma de las células hospederas ejercen su función de manera variada, alterando el citoesqueleto o interfiriendo con las vías de señalización, por lo que este sistema se ha convertido en un importante factor de virulencia de *A. salmonicida* (Mota y Cornelis 2005; Burr et al., 2002; 2003b; Stuber et al., 2003a)

En las cepas de la región Junín, se ha podido corroborar la presencia del sistema de secreción tipo III (TTSS). Esto debido a que se detectó el gen estructural *ascV*, el cual es un indicador de la presencia de la maquinaria del TTSS (Stuber et al., 2003a). Sin embargo, no se detectó este gen en las cepas de piscifactorías de Puno, Cajamarca y Ancash. En cuanto a los genes que codifican para las proteínas efectoras del TTSS (*aopO* y *aopH*), se observó la presencia del primero en las cepas de Junín (aquellos que fueron positivos para *ascV*) pero no del gen *aopH*. Ocurrió el caso

opuesto en 3 cepas de Puno antes mencionados, en los cuales se detectó el gen *aopH*, pero el gen *aopO* estuvo ausente. Estos resultados coinciden con los de estudios previos, en donde no todas las cepas que poseían genes efectores de TTSS tenían el locus genético que codifica para la maquinaria del TTSS, evidenciado por la ausencia del gen *ascV*. Además, en los mismos estudios, se concluyó que la presencia de un gen efector y la ausencia de otro en una misma cepa indica que estos genes no siempre están vinculados (Stuber et al., 2003b).

El hecho de haber encontrado el gen *ascV* en varias cepas en el presente estudio es de gran importancia ya que, según lo señalado por Zachary (2017), cepas bacterianas que carecen de plásmidos de virulencia generalmente no tienen la capacidad de causar enfermedad. Además, la importancia de este sistema de secreción tipo III y sus proteínas efectoras ha sido confirmada por estudios *in vivo* en truchas arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Burr et al., 2005), y salmón del atlántico, *Salmo salar* (Dacanay et al., 2006). En estos estudios se inactivó el TTSS mediante mutaciones puntuales en los genes que codifican para los componentes de la maquinaria de TTSS, obteniéndose como resultado una virulencia atenuada de *A. salmonicida*. Aún más importante a lo antes mencionado, es el hecho de que el periodo de incubación de la furunculosis podría estar dominada, en primera instancia, por el efecto inmunosupresor del TTSS, lo cual permite que *A. salmonicida* evada la respuesta inmune y se disemine primero en órganos linfoides; mientras que en los estadios posteriores de la enfermedad

(asociados a la mortalidad por paro circulatorio) se da la multiplicación desmesurada y diseminación bacteriana en los demás órganos del pez (Bergh y Frey, 2013; Farto et al., 2011), asistido por la alta producción de otros factores de virulencia tales como la serina proteasa Ahe2 (Salte et al., 1993) y la lipasa GCAT (Salte et al., 1992). Esto permite generar un enfoque apropiado en el desarrollo de medidas, principalmente vacunas u otras opciones terapéuticas que frenen la estrategia inmunosupresora del TTSS al inicio de la enfermedad. Varios estudios reportaron que la manipulación experimental de genes que codifican para las subunidades de este sistema de secreción produjeron, por ejemplo, atenuación de la virulencia de *A. piscícola* (Vilches et al., 2008; Beaz-Hidalgo et al., 2009; Vilches et al., 2009; Khajanchi et al., 2010), hecho que también podría funcionar para otras especies como *A. salmonicida*. Para sustentar esto, podemos mencionar el trabajo de Bergh et al. (2013), en el cual se obtuvo un mejor nivel de protección luego de inmunizar peces con bacterinas de *A. salmonicida* con mutaciones en el gen *ascV*, que expresaba bajos niveles de todos los componentes de TTSS (inmunosupresores), observándose un 25% de sobrevivencia más que aquellos individuos vacunados con el tipo salvaje.

Los genes no detectados en algunas cepas, pero si en otros, pueden estar relacionados, en parte, con el hecho de que en *A. salmonicida*, la pérdida de genes únicos u operones es muy frecuente (Najimi et al. 2009). Sin embargo, otros genes ausentes en algunas cepas en el presente estudio, no significa necesariamente la carencia de tales factores de virulencia en

este patógeno que afectan la actividad acuícola en la sierra peruana. Esto debido a que varias cepas del presente estudio fueron reactivadas del cepario, por lo que es probable que, en el transcurso del cultivo, la manipulación y la temperatura de incubación (22 °C) pudo haber influido en la pérdida o reorganización de ciertos genes o elementos genéticos móviles, principalmente plásmidos lo cual dificultó su detección. Esto fue evidenciado en el presente estudio por la ausencia de los genes plasmidiales estructurales (*ascV*) y efectores (*aopO* y *aopH*) de la maquinaria del TTSS, fundamentalmente en el grupo de las cepas reactivadas. Estudios han demostrado que cepas de *A. salmonicida* cultivadas a temperaturas superiores a 20°C tienden a perder elementos genéticos extracromosomales como el plásmido psAs5, en el cual encuentran los genes del TTSS, o bien puede darse reorganizaciones por secuencias inserción. Este evento ha sido principalmente estudiado en la cepa *A. salmonicida* ssp *salmonicida* A449 (Burr et al., 2003b; Stuber et al., 2003b; Bergh y Frey, 2013; Emond et al., 2015). No obstante, en las cepas adicionales (8), los cuales fueron cultivados a 20°C, no se observó la pérdida o reorganización del plásmido. Esto pudo ser corroborado por la presencia de cepas positivas para los genes *ascV*, *aopH* y *aopO*.

Sin embargo, ante lo señalado anteriormente, es importante recalcar, que el número y tipo de factores de virulencia en una cepa bacteriana está constantemente cambiando. Esto se da a través de selección genética de esos factores que favorecen la sobrevivencia de la bacteria en el

hospedero o a ciertas condiciones del medio ambiente (Zachary, 2017). Con fines comparativos y para sustentar el enunciado anterior podemos referirnos a los brotes causados por *A. hydrophila*, que a diferencia de *A. salmonicida*, están vinculados, entre otros factores, al incremento de la temperatura, lo cual conlleva a la producción de factores de virulencia tales como citotoxinas y hemolisinas (Swann y White, 1991; Mateos et al., 1993; Janda y Abbott, 2010). Por ejemplo, cuando la temperatura se eleva a 37°C la actividad de las citotoxinas y hemolisinas se incrementa, sin embargo, otros factores como las proteasas disminuyen (Yu et al., 2007). En otras palabras, para explotar al máximo la susceptibilidad del hospedero debido al incremento de la temperatura, los factores de virulencia de *Aeromonas* spp. han evolucionado de tal manera que su expresión es dependiente de este parámetro (Merino et al., 1992; González-Serrano et al., 2002), hecho que probablemente no sea el caso para *A. salmonicida*, por lo menos en las observaciones hechas en el laboratorio (Ishiguro et al., 1981; Belland y Trust, 1985; Gustafson et al., 1994; Reith et al., 2008).

Aparentemente no existe o no se podría establecer una relación entre la presencia de los genes de virulencia y el área geográfica de donde fueron aislados, dado que el número de cepas por región no es homogéneo. Sin embargo, de manera notable, como se ha venido describiendo, las cepas aisladas de diferentes centros piscícolas de la región Junín fueron incluidos principalmente en el perfil A1 (Gráfico 3), el cual representa los 6 genes detectados en este estudio, seguido del perfil A2, el cual fue negativo

solamente para los genes *satA* y *aopH*. Las cepas de las demás regiones como Cajamarca, Puno y Ancash (todos estos reactivados del cepario) fueron incluidos en los perfiles restantes (A3, A4, A5 y A6), los cuales carecen de uno o más genes, principalmente de origen plasmídico. Sin embargo, no se puede descartar que estas cepas no hayan tenido tales genes (*ascV*, *aopH* y *aopO*), ya que muchas veces el manipuleo reiterativo de cepas de laboratorio (conservadas en cepario) puede llevar a la obtención de datos poco fehacientes o bien estos resultados puede deberse a la plasticidad genómica de *A. salmonicida*, patógeno en cuyo genoma se ha observado la actividad de por lo menos 4 secuencias de inserción (ISs) entre ellas ISAS1, ISAS2, ISAS5 y ISAS11, que junto a otros factores pueden estar jugando un rol importante en la inestabilidad genómica (Tanaka et al., 2013; Trudel et al., 2013). En general, estos elementos de inserción ejercen un papel en la evolución bacteriana mediante la inactivación de genes y cambios estructurales en el genoma (Touchon y Rocha, 2007). Teniendo en cuenta este argumento, ISs pueden afectar la virulencia a través de la expansión de regiones flanqueantes, inactivación y eliminación de genes, reducción y reordenación genómica e incorporación de genes adicionales (Siguier et al., 2006).

No obstante, basados en los resultados descritos se puede sugerir un patotipo *vapA*⁺, *satA*⁺, *ahe2*⁺ *ascV*⁺, *aopH*⁺ y *aopO*⁺ que puede estar afectando la truchicultura peruana, o al menos a los centros piscícolas de Junín, una de las regiones pioneras en el cultivo controlado de trucha

arcoíris. En un estudio de genómica comparativa se analizó por bioinformática 41 *Aeromonas veronii* de diferentes áreas geográficas, encontrándose varios sistemas de secreción conservados, entre ellos el sistema de secreción tipo tres en 30 de los 41 genomas estudiados, sugiriendo un patotipo principalmente en base a estos sistemas y en menor grado a otros factores de virulencia (adhesión, toxinas, anti fagocitosis, evasión inmune) que estarían impactando negativamente la acuicultura de las zonas donde han sido aisladas (Tekedar et al., 2019a). En otra investigación similar, se comparó la distribución de sistemas de secreción en 55 *A. hydrophila*, aislados en su mayoría de peces, encontrándose en todos los genomas los sistemas tipo 1 (T1SS), 2 (T2SS), pili tipo 4 (T4P) y 6 (T6SS), aunque este último incompleto, mientras el sistema de secreción tipo 3 no fue detectado en los aislados de acuicultura, pero si en aquellos provenientes de sedimento; por lo que se concluyó que los tres primeros sistemas mencionados serían importantes factores de virulencia de *A. hydrophila*, que afecta el cultivo de peces como el salmón y carpa en los países de Canadá, EEUU y China de donde fue obtenidos mayormente este patógeno (Tekedar et al., 2019b).

Si bien estos genes identificados no sean los únicos responsables de asistir a la bacteria *A. salmonicida* durante el proceso de infección, podemos establecer un modelo de patogenicidad en base al patotipo obtenido y teniendo en cuenta la literatura científica. Por lo tanto, truchas arcoíris cultivadas bajo condiciones estresantes se encuentran

inmunocomprometidas, lo cual, junto a la presencia de ulceraciones o lesiones en la piel o secreción mucosa alterada, proveen al patógeno la oportunidad de adherirse e invadir los tejidos (Bergh y Frey, 2013). *A. salmonicida*, una vez en contacto con células del hospedero, interactúa con estas mediante la proteína de la capa A (VapA). Esta proteína que forma parte de la capa superficial también la protege del sistema del complemento de la trucha arcoíris y los efectos de células fagocitarias. Así mismo, el contacto célula bacteriana- célula hospedera permitiría que el TTSS (AscV) se active y se dé la translocación de proteínas efectoras (AopO, AopH) hacia el citoplasma de la célula hospedera, alterando el citoesqueleto (filamentos de actina) y por ende la fisiología de la célula, bloqueando las vías de señalización encargadas de establecer una respuesta inmune. Estos procesos iniciales le darían ventaja para entrar en el torrente sanguíneo (septicemia) y diseminarse rápidamente a los diferentes órganos como el riñón anterior, en donde inhiben la función linfopoyética (proliferación y maduración de linfocitos) (Dautremepuits et al., 2006), para posteriormente llegar al bazo, hígado y la musculatura (Farto et al., 2011; Bergh y Frey, 2013). Durante el transcurso de estos procesos, las lipasas como la GCAT (SatA) también ejerce su actividad lipolítica, obteniendo nutrientes para la bacteria o colaborando en los procesos de adhesión a las células hospederas mediante la degradación de componentes de membrana liberando así otros receptores (Stehr 2003). La proteasa (Ahe2) actúa de forma similar en la provisión de nutrientes mediante la hidrólisis de polipéptidos. Al ejecutar estas funciones, lipasas y proteasas, contribuyen a la patogenicidad de *A.*

salmonicida provocando lesiones y licuefacción de tejidos etc. siendo responsables de la aparición de furúnculos, signo característico de la enfermedad en su fase crónica y que también han sido asociadas con la muerte súbita por shock circulatorio en la etapa aguda (Salte et al., 1993; Salte et al., 1992).

En el presente estudio se propuso identificar un conjunto de genes asociados a la virulencia de *A. salmonicida*, utilizando la técnica de PCR. Hecho que puede significar el primer paso de todo un gran proyecto que apunta al desarrollo de medidas de prevención que se ajusten a la realidad de la actividad acuícola en el Perú, principalmente de la trucha arcoíris. La importancia del uso de la técnica molecular PCR para la identificación de genes se justifica cuando se cuenta con un gran número de cepas bacterianas que necesitan ser analizadas para llegar a un consenso en cuanto a la presencia o ausencia de un gen en particular, y en donde la secuenciación de genomas completos resulta poco viable por diferentes factores, principalmente económicos (Deekshit et al., 2019).

La identificación de estos genes implicados en virulencia y con posteriores estudios de expresión genética, permitirá intuir sobre los mecanismos de interacción entre el patógeno *A. salmonicida* y el hospedero trucha arcoíris. Conociendo estos aspectos, se pueden definir blancos o antígenos para la búsqueda y desarrollo de inhibidores de uso farmacéutico o profiláctico (Nash et al., 2006). Por ejemplo, de acuerdo con lo discutido

previamente, debido a su fuerte asociación con la translocación de factores de virulencia por muchas *Aeromonas* spp, terapias dirigidas a controlar el inicio de la furunculosis mediante la inhibición de la expresión del TTSS y sus proteínas efectoras podría representar un excelente blanco contra *A. salmonicida*. Sin embargo, dado que una enfermedad es el resultado de un efecto acumulativo con la contribución de muchos factores de virulencia, estos genes detectados en diferentes cepas de *A. salmonicida* que afectan la truchicultura peruana, pueden servir como candidatos para estudios relacionados a vacunología reversa u otro programa cuyo objetivo sea el desarrollo de vacunas, sistemas de delivery de antígenos y otras herramientas para un mejor manejo de la salud de las truchas arcoíris cultivadas en el Perú.

X. CONCLUSIONES

- Los genes cromosomales *vapA*, *satA* y *ahc2* fueron los más frecuentes en los aislados de *A. salmonicida*.
- La presencia de los genes plasmídicos *ascV*, *aopH* y *aopO* confirman la presencia de un sistema de secreción tipo 3 (TTSS) en *A. salmonicida* aislados de trucha arcoíris en Perú.
- El perfil genético A1 (presencia de genes *vapA*, *satA*, *ahc2*, *ascV*, *aopH* y *aopO*) puede ser usado como referencia para futuras investigaciones en el desarrollo de vacunas contra *A. salmonicida*.

XI. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de infección convencional (desafíos intraperitoneales y por inmersión) y expresión para determinar si algún perfil genético encontrado en este estudio es adecuado para predecir la virulencia de estos aislados de *A. salmonicida*.

- Seguir estudiando estas u otras combinaciones de genes de virulencia de *A. salmonicida* aisladas de otras zonas geográficas del Perú, relacionando los signos clínicos con los genes de virulencia y patotipos encontrados, con el fin de enriquecer la información y comprender mejor la diversidad de estos factores de virulencia que permita sentar las bases hacia el desarrollo de medidas eficaces y reproducibles de acuerdo con nuestra realidad.

- Dado que el presente estudio es de tipo exploratorio, es necesario que en futuras investigaciones se incremente el tamaño de muestra, así como mejorar los protocolos de muestreo.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K.A., Chopra, A.K., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A.S., Islam, M.S. (2000). Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J Clin Microbiol*, 38, 3785–3790.

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

Austin, B., Austin, D. (2007). Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish (5th ed.). New York: Springer. p. 499.

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

Barbeau, X., Sarty, D., Tanaka, K. H., Denoncourt, A. M., Lagu, P., Reith, M. E., Charette, S. J. (2013). *Aeromonas salmonicida* Ati2 is an effector protein of the type three secretion system. *Microbiology*, 159, 1937–1945.

Beaz-hidalgo, R., Enrico, G., Balboa, S., Barja, J., Romalde, J. (2008). Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Vet Microbiol*, 128(4), 386–394.

Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *J Fish Dis*, 36(4), 371–388.

Belland, R.J., Trust, T.J., 1985. Synthesis, export, and assembly of *Aeromonas salmonicida* A-layer analyzed by transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 163, 877–881.

Bergh, P. V., Frey, J. (2013). Minireview *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* in the light of its type-three secretion system. *Microb Biotechnol*, 7(5), 381–400.

Bergh, P. V., Heller, M., Braga-lagache, S., Frey, J. (2013). The *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* exoproteome: determination of the complete repertoire of Type-Three Secretion System effectors and identification of other virulence factors. *Proteome Sci*, 11(1), 42.

Bernoth, E.M., 1997. Furunculosis: the history of the disease and of disease research. In: Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng, P., Olivier, G., Smith, P. (Eds.), *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research*. Academic Press, London, pp. 1–20.

Boone, D.R., Castenholz, R.W., Garrity, G.M., 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*/George M. Garrity, Editor-in-Chief, 2nd edition. Springer, New York.

Boyd, J., Williams, J., Curtis, B., Kozera, C., Singh, R., Reith, M. (2003). Three small , cryptic plasmids from *Aeromonas salmonicida*, 50, 131–144.

Boyd J., Dacanay A., Knickle L.C., Touhami A., Brown L.L., Jericho M.H., Johnson S.C., Reith M. (2008). Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Infect Immun*, 76:1445-1455.

Braun, M., Stuber, K., Schlatter, Y., Wahli, T., Kuhnert, P., Frey, J. (2002). Characterization of an ADP-Ribosyltransferase Toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida*. *J Bacteriol*, 184(7), 1851–1858.

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

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

Burr, S. E., Pugovkin, D., Wahli, T., Segner, H., Frey, J. (2005). Attenuated virulence of an *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model. *Microbiology*, 151, 2111–2118.

Burr, S., Stuber, K., Wahli, T., Frey, J. (2002). Evidence for a type III secretion system in *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida*. *J Bacteriol*, 184(21), 5966–5970.

Carvalho, M. J., Martínez-Murcia, A., Esteves, A. C., Correia, A., Saavedra, M. J. (2012). Phylogenetic diversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Aeromonas* spp. from untreated waters for human consumption. *Int. J. Food Microbiol*, 159, 230–239.

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

Chao N., Dong Y., Yuelan W., Hongguang R., Yuan J., Wei Z., Beiping L., Yiyong Ch., Junjie Y., Zhixian G., Long L. (2013). Common and pathogen-specific virulence factors are different in function and structure. *Virulence*, 4(6), 473-482.

Chart, H., Shaw, D. H., Ishiguro, E. E., Trust, T. J. (1984). Structural and immunochemical homogeneity of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide. *J Bacteriol*, 158(1), 16–22.

Chu, S., Cavaignac, S., Feutrier, J., Phipps, M., Kostrzynska, M., Kay, W. W., Trust, J. (1991). Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem*, 266(23), 15258–15265.

Coburn, B., Sekirov, I., Finlay, B. B. (2007). Type III Secretion Systems and Disease. *Clin Microbiol Rev*, 20(4), 535–549.

Coleman, G., Whitby, W. (1993). A comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* with those of other subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites. *J Gen Microbiol*, 139(2), 245–249.

Crosa, J., Walsh, C. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2), 223–249.

Cross, A. S. (2008). What is a virulence factor ? *Crit Care.*, 12(6), 196.

Dacanay, A., Knickle, L., Solanky, K. S., Boyd, J. M., Walter, J. A., Brown, L. L., Reith, M. (2006). Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida*. *Microbiology*, 152, 1847–1856.

Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V, Lafaille, A., Charette, S. J. (2014). Virulence , genomic features , and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* , the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol*, 169(2), 1–7.

Dautremepuits, C., Fortier, M., Croisetiere, S., Belhumeur, P., Fournier, A. (2006) Modulation of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*) cellular immune system after *Aeromonas salmonicida* challenge. *Vet Immunol Immunopathol*, 110, 27–36.

Deekshit V.K., Jazeela K., Chakraborty G., Rohit A., Chakraborty A., Karunasagar I. (2019) Mismatch amplification mutation assay-polymerase chain reaction: A method of detecting fluoroquinolone resistance mechanism in bacterial pathogens. *Indian J Med Res*;149:146-50.

Derome, N., Gauthier, J., Boutin, S., Llewellyn, M. (2016). Opportunistic pathogens of fish. In C. J. Hurst (Ed.), *The rasputin Effect: When commensals and symbionts become parasitic* (3rd ed.). New York: Springer. p. 649.

Emond-Rheault J.G., Vincent A.T., Trudel M.V., Frey J., Frenette M., Charette S.J. (2015). AsaGEI2b: a new variant of a genomic island identified in the *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* JF3224 strain isolated from a wild fish in Switzerland. *FEMS Microbiol Lett* 362: fmv093.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2012). Estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. 251 p. [Internet]. [Acceso 14 de mayo 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2727s.pdf>

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2010). United Nations Fisheries and Aquaculture Department. Species fact sheets: *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)., Rome, Italy.

Farto, R., Milton, D. L., Bermúdez, M. B., Nieto, T. P. (2011). Colonization of turbot tissues by virulent and avirulent *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* strains during infection. *Dis Aquat Org*, 95, 167–173.

Fast, M., Tse, B., Boyd, J., Johnson, S. (2009). Mutations in the *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* type III secretion system affect Atlantic salmon leucocyte activation and downstream immune responses. *Fish Shellfish Immunol*, 27(6), 721–728.

Fehr, D., Casanova, C., Liverman, A., Blazkova, H., Orth, K., Dobbelaere, D., Burr, S. (2006). AopP , a type III effector protein of *Aeromonas salmonicida* , inhibits the NF- k B signalling pathway Printed in Great Britain. *Microbiology*, 152(9), 2809–2818.

Fyfe, L., Finley, A., Coleman, G. (1986). A study of the pathological effect of isolated *Aeromonas salmonicida* extracellular protease on Atlantic salmon , *Salmo salar* L . *J Fish Dis*, 9, 405–409.

Garduño, R., Moore, A., Olivier, G., Lizama, A., Kay, W. (2000). Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas Salmonicida* : Role of the S-layer. *Can J Microbiol*, 46(7), 660–668.

González E. (2002). Descripción de la furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subespecie achromogenes y subespecie salmonicida en salmón del atlántico (*Salmo salar*). Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Santiago de Chile. 44 p.

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

Gustafson, C.E., Chu, S., Trust, T.J., 1994. Mutagenesis of the paracrystalline surface protein array of *Aeromonas salmonicida* by endogenous insertion elements. *J. Mol. Biol.* 237, 452–463.

Hiney M, Olivier G (1999): Furunculosis (*Aeromonas salmonicida*). In Fish Diseases and Disorders III: Viral, Bacterial and Fungal Infections Edited by: Woo PTK, Bruno DW. Oxford: CAB Publishing; 341-425

Hjerde, E., Lorentzen, M., Holden, M., Seeger, K., Paulsen, S., Bason, N., Thomson, N. (2008). The genome sequence of the fish pathogen *Aliivibrio salmonicida* strain LFI1238 shows extensive evidence of gene decay. *BMC Genomics*, 9, 616.

Hoel, S., Vadstein, O., Jakobsen, A.N. (2017). Species Distribution and Prevalence of Putative Virulence Factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from Fresh Retail Sushi. *Front. Microbiol*, 8,931.

Ishiguro, E.E., Kay, W.W., Ainsworth, T., Chamberlain, J.B., Buckley, J.T., Trust, T.J. (1981) Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. *J. Bacteriol*, 148, 393–400.

Janda, J. M., Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: Taxonomy , pathogenicity and infection. *Clin. Microbiol. Rev*, 23(1), 35.

Kay W.W., Buckley J.T., Ishiguro E.E., Phipps B.M., Monette J.P. Trust T.J. (1981) Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology*, 147, 1077–1084.

Khajanchi, B. K., Fadl, A. A., Borchardt, M. A., Berg, R. L., Horneman, A. J., Stemper, M. E. (2010). Distribution of virulence factors and molecular fingerprinting of *Aeromonas* species isolates from water and clinical

samples: suggestive evidence of water-to-human transmission. *Appl. Environ. Microbiol*, 76, 2313–2325V.

Kingombe, C. I. B., Huys, G., Tonolla, M., Albert, M. J., Swings, J., Peduzzi, R., et al. (1999). PCR detection, characterization, and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 5293–5302.

Jung-schroers, V., Steinhagen, D., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F. (2018). Diagnostic methods for identifying different *Aeromonas* species and examining their pathogenicity factors , their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus. *J Fish Dis*, 42(2), 189–219.

Lago, E. P., Nieto, T. P., y Farto, R. (2012). Virulence factors of *Aeromonas salmonicida subsp . salmonicida* strains associated with infections in turbot *Psetta maxima*. *Dis Aquat Org*, 99, 145–151.

Lebrun, I., Pereira, A. S., Pereira, A., Perpetuo, E. A. (2009). Bacterial Toxins : An Overview on Bacterial Proteases and their Action as Virulence Factors. *Mini Rev Med Chem*, 9(7), 820–828.

Lee, K., Ellis, A. E. (1990). Glycerophospholipid : Cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolysin of *Aeromonas salmonicida* : LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J Bacteriol*, 172(9), 5382–5393.

Lubin, J., Kingston, J., Chowdhury, N., Boyd, E. (2012). Sialic acid catabolism and transport gene clusters are lineage specific in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*, 78(9), 3407–3415.

Masada C.L., LaPatra S.E., Morton A.W., Strom M.S. (2002) An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ*, 51:13-25.

Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., Paniagua, C. (1993). Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 111–118.

Meng, L., Du, Y., Liu, P., Li, X., Liu, Y. (2017). Involvement of LuxS in *Aeromonas salmonicida* metabolism, virulence and infection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 64, 260–269.

Merino, S., Camprubi, S., Tomas, J.M. (1992). Effect of growth temperature on outer membrane components and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infect. Immun.*, 60, 4343–4349.

Mota, S. J., Cornelis, G. (2005). The bacterial injection kit: Type III secretion systems. *Ann Med*, 37(4), 234–249.

Najimi, M., Lemos, M., Osorio, C. (2009). Identification of iron regulated genes in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* : Genetic diversity and evidence of conserved iron uptake systems. *Veterinary Microbiology*, 133(4), 377–382.

Nash, J., Findlay, W., Luebbert, C., Mykytczuk, O., Foote, S., Taboada, E., Brown, L. (2006). Comparative genomics profiling of clinical isolates of *Aeromonas salmonicida* using DNA microarrays. *BMC Genomics*, 7, 43.

Ng, W. K., Romano, N. (2013). A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Reviews in Aquaculture*, 5(4), 220–254.

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

Noonan, B., Trust, T. J. (1997). The synthesis , secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A . hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 154, 1–7.

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

Oliveira, S. T. L., Veneroni-gouveia, G., Costa, M. M. (2012). Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish 1. *Pesq. Vet. Bras.*, 32(8), 701–706.

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

Plumb, J., Hanson, L. (2011). *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes* (3rd ed.). Ames: Wiley-Blackwell. p. 492.

Preston, A., Mandrell, E., Gibson, B., Apicella, M. (1996). The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 22(3), 139–180.

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

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

[PRODUCE] Ministerio de la Producción. (2016). *Anuario estadístico pesquero y acuícola 2015*. Ministerio de la Producción. Perú. 196p.

[PRODUCE] Ministerio de la Producción. (2015). Diagnóstico de vulnerabilidad actual del sector pesquero y acuícola frente al cambio climático. Tomo 3: Diagnostico actual del sector pesca y acuicultura. 88p.

Puhar, A., Sansonetti, P. J. (2014). Type III secretion system. *Current Biology*, 24(17), R784–R791.

[RNIA] Red Nacional de Información Acuícola. (2017). Perú: cosecha de recursos hidrobiológicos de la actividad de acuicultura según departamento y especie, 2006-2017 (tm).
http://rnia.produce.gob.pe/images/cosecha_por_region_2006_2017.pdf

Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Brown, L. L. (2008). The genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics*, 18(9), 427.

Sakai, D. K. (1985). Loss of virulence in protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun*, 48(1), 146–152.

Salte, R., Norberg, K., Arnesen, J.A., Odegaard, O.R., Eggset, G. (1992) Serine protease and glycerophospholipid – cholesterol acyltransferase of *Aeromonas salmonicida* work in concert in thrombus formation – In vitro the process is counteracted by plasma antithrombin and alpha-2-

macroglobulin. J Fish Dis, 15: 215–227.

Salte, R., Norberg, K., Odegaard, O.R., Arnesen, J.A., Olli, J.J. (1993) Exotoxin-induced consumptive coagulopathy in Atlantic salmon, *Salmo salar* L – Inhibitory effects of exogenous antithrombin and alpha(2)-macroglobulin on *Aeromonas salmonicida* serine protease. J Fish Dis, 16: 425–435.

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

Secades, P., Guijarro J. A. (1999). Purification and characterization of an extracellular protease from fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl. Environ. Microbiol., 65 (9), 3969-3975.

Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N. (2017). Bacterial Virulence Factors : Secreted for Survival. Indian J Microbiol, 57(1), 1–10.

Siguiet, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. Nucleic Acids Res., 34:D32–6.

Soler, L., Figueras, Y., Chaco, M. R., Jose, M., Marco, F., Martinez-murcia, A. J., Guarro, J. (2002). Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffi* recovered from freshwater and seawater. *Immunol Med Microbiol*, 32(3), 243–247.

Stehr, F., Kretschmar, M., Kröger, C., Hube, B., Schäfer, W. (2003). Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 347–355.

Stuber, K., Burnens, P., Kuhnert, P., Frey, J. (2003a). Detection of type III secretion genes as a general indicator of bacterial virulence. *Mol Cell Probes*, 17(1), 25–32.

Stuber, K., Burr, S., Braun, M., Wahli, T., Frey, J. (2003b). Type III secretion genes in *Aeromonas salmonicida* subsp . *salmonicida* are located on a large thermolabile virulence plasmid. *J Clin Microbiol*, 41(8), 3854–3856.

Swann, L., White, M. (1991). Diagnosis and treatment of “*Aeromonas hydrophila*” Infection of Fish. Urbana, IL: Illinois-Indiana Sea Grant Program.

Tanaka K.H., Frenette M., Charette S.J. (2013) IS-mediated loss of virulence by *Aeromonas salmonicida*: a tangible piece of an evolutionary puzzle. *Mobile genetic elements* ;3(1):e23498

Tekedar, H. C. T., Kumru, S., Blom, J., Perkins, A. D., Griffin, M. J., Abdelhamed, H., Lawrence, M. L. (2019a). Comparative genomics of *Aeromonas veronii*: Identification of a pathotype impacting aquaculture globally, 1–25.

Tekedar, H. C., Abdelhamed, H., Kumru, S., Blom, J., Karsi, A., Llewellyn, M. S., Lawrence, M. L. (2019b). Comparative genomics of *Aeromonas hydrophila* secretion systems and mutational analysis of hcp1 and vgrG1 genes from T6SS, 9, 1–13.

Tomas, J. M. (2012). The main *Aeromonas* pathogenic factors. *ISRN Microbiol*, 2012, 256–261.

Touchon, M. y Rocha, E.P. (2007) Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes. *Mol Biol Evol*, 24(4),969–81.

Trudel M.V., Tanaka K.H., Filion G., Daher R.K., Frenette M., Charette S.J. (2013). Insertion sequence AS5 (ISAS5) is involved in the genomic plasticity of *Aeromonas salmonicida*. *Mobile genetic elements*. 3(3):e25640.

Udey, J.L. Fryer, L.R. (1978) Immunization of fish with bacterins of *Aeromonas salmonicida*. *Marine Fisheries Review* 40,12–17.

Varki, A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology*, 2(1), 25–40.

Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*, 14(8), 351–360.

Vilches, S., Wilhelms, M., Yu, H. B., Leung, K. Y., Tomas, J. M., y Merino, S. (2008). *Aeromonas hydrophila* AH-3 AexT is an ADP-ribosylating toxin secreted through the type III secretion system. *Microb. Pathog*, 44, 1–12.

Vilches, S., Jimenez, N., Tomas, J. M., Merino, S. (2009). *Aeromonas hydrophila* AH-3 type III secretion system expression and regulatory network. *Appl. Environ. Microbiol*, 75, 6382–6392.

Vimr, E., Kalivoda, K., Deszo, E., Steenbergen, S. (2004). Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(1), 132–153.

Vimr, E., Lichtensteiger, C. (2002). To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol*, 10(6), 254–257.

Vipond, R., Bricknell, I., Durant, E., Bowden, T., Ellis, A., Smith, M., MacIntyre, S. (1998). Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infect Immun*, 66(5), 1990–1998.

Yu, H. B., Zhang, Y. L., Lau, Y. L., Yao, F., Vilches, S., Merino, S., Leung, K. Y. (2005). Identification and characterization of putative virulence genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl Environ Microbiol*, 71(8), 4469–4477.

Yu, H.B., Kaur,R., Lim,S.M., Wang,X.H., Leung,K.Y.(2007). Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. *Proteomics* 7, 436–449.

Zachary, J. F. (2017). Mechanisms of Microbial Infections. In M. D. McGAVIN and J. F. ZACHARY (Eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*, 6th ed., pp. 510–512. Elsevier.

XIII. ANEXOS.

I. Cepas de *A. salmonicida* conservadas en el cepario del laboratorio de parasitología de Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UPCH.

Código en cepario	Región	Provincia/Centro acuícola	Órgano muestreado
I9Br	Junín	Ingenio	Bazo
I9Rr	Junín	Ingenio	Riñón
T12B	Junín	Ingenio	Bazo
DE1B	Junín	Ingenio	Bazo
DE3B	Junín	Ingenio	Bazo
P23B	Junín	Jauja	Bazo
P24B	Junín	Jauja	Bazo
P8B	Junín	Jauja	Bazo
CHR2	Junín	Chupaca	riñón
CHR3	Junín	Chupaca	riñón
CHB5	Junín	Chupaca	Bazo
CHR8	Junín	Chupaca	riñón
CHR9	Junín	Chupaca	riñón
CHL12	Junín	Chupaca	Lesión de piel
CHL13	Junín	Chupaca	Lesión de piel
CHL14	Junín	Chupaca	Lesión de piel
K5B	Cajamarca	Cajamarca	Bazo
K16R	Cajamarca	Cajamarca	Riñón
K16P	Cajamarca	Cajamarca	Lesión de piel
K7R	Cajamarca	Cajamarca	Riñón
K22P	Cajamarca	Cajamarca	Lesión de piel
K6P	Cajamarca	Cajamarca	Lesión de piel
K19B	Cajamarca	Cajamarca	Bazo
K19R	Cajamarca	Cajamarca	Riñón
K14P	Cajamarca	Cajamarca	Lesión de piel
K21B	Cajamarca	Cajamarca	Bazo
K23B	Cajamarca	Cajamarca	Bazo
K29B	Cajamarca	Cajamarca	Bazo
C12B	Puno	Puno	Bazo
C18R	Puno	Puno	Riñón
C18B	Puno	Puno	Bazo
C15R	Puno	Puno	Riñón
6R	Ancash	Huaraz	Riñón
5B	Ancash	Huaraz	Bazo