



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Determinación de patogenicidad de una cepa de  
Yersinia ruckeri procedente de un brote de yersiniosis  
en truchas “arcoíris” (*Oncorhynchus mykiss*) de una  
piscifactoría ubicada en Charcas, Puno, Perú**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Mauro Renato ESTRELLA ORTIZ

**ASESOR**

Nieves Nancy SANDOVAL CHAUPE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Estrella, M. Determinación de patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* procedente de un brote de yersiniosis en truchas “arcoíris” (*Oncorhynchus mykiss*) de una piscifactoría ubicada en Charcas, Puno, Perú [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

---

## **H0JA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS**

### **CÓDIGO ORCID DEL AUTOR**

0000-0002-4944-1611

### **CODIGO ORCID DEL ASESOR**

0000-0003-0112-9183

### **DNI DEL AUTOR**

46407462

### **DNI DEL ASESOR**

070011047

### **GRUPO DE INVESTIGACIÓN**

Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola: GRISANAC

### **INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIAL O TOTALMENTE LA INVESTIGACIÓN**

Innovate Perú: Proyecto N° 078 – InnovatePerú – IAPIP - 2017

### **UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN DEBE INCLUIR LOCALIDADES Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS**

Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Av. Circunvalación 28, San Borja 15021

Coordenadas geográficas: -12.081698, -76.987703

### **AÑO O RANGOS DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ**

Parte experimental: Agosto – Diciembre del 2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú, Decana de América  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **martes 18 de junio de 2019**, a las **12:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0120-EPMV/FMV-2019**, integrado por los siguientes profesores:

<b>MV MSc. Rosa Amelia Perales Camacho</b>	<b>Presidente de Jurado</b>
<b>MV Mg. Nieves Sandoval Chaupe</b>	<b>Asesor de la Tesis</b>
<b>MV Mg. Sonia Yenny Calle Espinoza</b>	<b>Miembro del Jurado</b>
<b>MV Mg. Juan José Siuce Moreno</b>	<b>Miembro del Jurado</b>

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **ESTRELLA ORTIZ, MAURO RENATO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“DETERMINACIÓN DE PATOGENICIDAD DE UNA CEPA DE *Yersinia ruckeri* PROCEDENTE DE UN BROTE DE YERSINIOSIS EN TRUCHAS “ARCOIRIS” (*Oncorhynchus mykiss*) DE UNA PISCIFACTORÍA UBICADA EN CHARCAS, PUNO, PERÚ”,**

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:05 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Rosa Amelia Perales Camacho: MV MSc. Prof. Principal. D.E

Nieves Sandoval Chaupe: MV. Mg. Prof. Principal. D.E

Sonia Yenny Calle Espinoza: MV Mg. Prof. Principal. D.E

Juan José Siuce Moreno: MV. Mg. Esp. Prof. Auxiliar. D.E







UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0120-EPMV/FMV-2019.

**PRESIDENTE:**

  
.....  
**ROSA AMELIA PÉRALES CAMACHO**

**MIEMBROS :**

  
.....  
**NIEVES SANDOVAL CHAUPE**  
**ASESOR DE LA TESIS**

  
.....  
**SONIA YENNY CALLE ESPINOZA**

  
.....  
**JUAN JOSÉ SIUCE MORENO**

San Borja, 02 de agosto de 2019

V° B°



  
.....  
**Dra. Daphne Ramos Delgado**  
**Directora**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**AGRADECIMIENTOS:**

A INNOVATE PERÚ, por el financiamiento de la tesis: Proyecto N° 078 –  
InnovatePerú – IAPIP – 2017

## INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	2
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
LISTA DE CUADROS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
I. INTRODUCCION.....	11
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	12
2.1. Acuicultura.....	12
2.1.1. Panorama de la acuicultura a nivel mundial.....	12
2.1.2. Panorama de la acuicultura a nivel nacional.....	16
2.2. Trucha arcoíris.....	18
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	18
2.2.2. Características generales y biológicas.....	20
2.2.3. Fases de desarrollo.....	20
2.2.4. Alimentación.....	21
2.2.5. Parámetros hídricos para crianza de truchas.....	21
2.3. Agente causal ( <i>Yersinia ruckeri</i> ).....	22
2.3.1. Antecedentes históricos.....	22
2.3.3. Características microbiológicas y perfil bioquímico.....	23
2.3.4. Sistema de tipificación.....	24
2.4 Yersiniosis o Enfermedad entérica de la boca roja (ERM).....	26
2.4.1 Hospederos y distribución geográfica.....	26
2.4.2 Transmisión.....	28
2.4.3 Patogénesis.....	30
2.4.4 Respuesta inmune contra <i>Y. ruckeri</i> .....	30
2.4.5. Signos clínicos y hallazgos patológicos.....	30
2.4.6 Diagnostico.....	31



2.4.7. Prevención y control .....	33
3.1 Tiempo, lugar y tipo de estudio .....	35
3.2 Animales de estudio, transporte, aclimatación y chequeo sanitario.....	35
3.3 Manejo del sistema de crianza experimental .....	36
3.4. Preparación del inoculo bacteriano .....	37
3.6 Evaluación de la patogenicidad.....	38
3.7 Análisis microbiológico y molecular de <i>Yersinia ruckeri</i> .....	40
3.8 Procesamiento histopatológico .....	40
4.1. Signos clínicos y Lesiones macroscópicas (internas y externas).....	41
4.2. Mortalidad.....	42
4.3. Confirmación del análisis microbiológico y molecular .....	44
4.4. Lesiones histopatológicas .....	46
V. DISCUSIÓN .....	66
VI. CONCLUSIONES .....	71
VII. LITERATURA CITADA .....	72
VIII. ANEXO.....	83

## RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo determinar la patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* proveniente de un brote en la localidad de Puno, para esto se registraron los signos clínicos, morbilidad, mortalidad, lesiones macroscópicas (internas y externas) y caracterización de las lesiones histopatológicas de truchas infectadas experimentalmente con este patógeno. Se utilizaron 100 alevinos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de peso promedio de 7,5 g y longitud promedio de 8,6 cm distribuidos en 5 grupos experimentales de 20 peces cada uno (un grupo control y cuatro desafiados), mantenidos en acuarios individuales con capacidad de 70 l. Se inocularon vía intraperitoneal (IP), con 0,1 ml de cepa de *Yersinia ruckeri* a concentraciones sucesivas de  $1 \times 10^5$  UFC/ml (T1),  $1 \times 10^6$  UFC/ml (T2),  $1 \times 10^7$  UFC/ml (T3),  $1 \times 10^8$  UFC/ml (T4) y el grupo control fue inyectado con PBS. Posteriormente se observaron signos clínicos, lesiones macroscópicas (internas y externas) y mortalidad durante 20 días. Los peces con mortandad reciente y sobrevivientes del estudio fueron necropsiados según la técnica recomendada por Espinosa de los Monteros y Labarta (1988), previa sedación con eugenol y eutanasia con sección medular. Posteriormente se aisló la bacteria a partir de riñón y bazo en agar tripticosa de soya incubada a  $24^\circ \text{C}$  por 48 horas, evidenciando colonias características de *Yersinia ruckeri* confirmadas mediante tinción Gram, pruebas bioquímicas y PCR convencional. También se colectaron muestras de riñón anterior, bazo, hígado, branquias, músculo e intestino posterior para el estudio histopatológico. Los grupos desafiados presentaron signos y lesiones característicos de yersiniosis; registrándose melanosis (73.5 %) y letargia (60 %) en mayor frecuencia, además de otros. Los signos clínicos se evidenciaron al 3° día post-infección en el grupo T4, y al 6°, 8°, 11° día post-infección para los grupos T3, T2 y T1 respectivamente. Las lesiones macroscópicas (internas y externas) más evidentes fueron hemorragia en la base de las aletas (78.75%), esplenomegalia (75%), hemorragia en intestino posterior (48,75%) y hemorragia en la cavidad oral (26,25%). Además, se registró mortalidad del 100% solo para el grupo T4 al 10° día, y 30%, 20%, 10% para los grupos T3, T2 y T1 respectivamente. Histopatológicamente, se evidenció mayor afección en bazo con presencia de melanomacrófagos, congestión e hiperplasia leucocitaria, riñón anterior con gotas hialinas en epitelio tubular, aumento de tejido linfoide, hígado con degeneración grasa, necrosis, separación de hepatocitos, intestino posterior con hiperplasia de células caliciformes, necrosis y epitelio disgregado. Se concluyó que la cepa de *Y. ruckeri* procedente de Puno, incluso en concentraciones bajas, tiene un nivel de patogenicidad elevada causando mortalidad y lesiones características de yersiniosis.

Palabras clave: ERM, hemorragia, *Oncorhynchus mykiss*, esplenomegalia.

### ABSTRACT

The present study aims to determine the pathogenicity of a strain of *Yersinia ruckeri* origin of an outbreak in Puno region, for this the clinical signs, morbidity, mortality, macroscopic lesions (internal and external) and characterization of the histopathological lesions of trout experimentally infected with this pathogen were recorded. 100 rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*) with average weight of 7.5 g and average length of 8.6 cm distributed in 5 experimental groups of 20 fish each, kept in individual aquariums with a capacity of 70 litres were used. The fish were inoculated intraperitoneally (IP), with 0.1 ml of the *Yersinia ruckeri* strain and successive concentrations of  $1 \times 10^5$  UFC/ml (T1),  $1 \times 10^6$  UFC/ml (T2),  $1 \times 10^7$  UFC/ml (T3),  $1 \times 10^8$  UFC/ml (T4) and the control group was injected with PBS. Subsequently, clinical signs, macroscopic lesions (internal and external) and mortality for 20 days were observed. The fish with the recent death and survival of the study were necropsied according to the technique recommended by Espinosa de los Monteros and Labarta (1988), after sedation with eugenol and euthanasia with the medullar section. Subsequently, the bacteria was isolated from kidney and spleen in trypticase agar of soybean incubated at 24 ° C for 48 hours, showing the characteristic colonies of *Yersinia ruckeri* confirmed by Gram stain, biochemical tests and conventional PCR. Samples of anterior kidney, spleen, liver, gills, muscle and posterior intestine were also collected for histopathological study. The challenged groups present signs and lesions characteristic of yersiniosis; registration of melanosis (73.5%) and lethargy (60%) more frequently, in addition to others. Clinical signs were evidenced on the 3rd day post-infection in the T4 group, and on the 6th, 8th, 11th day post-infection for the T3, T2 and T1 groups respectively. The most evident macroscopic lesions (internal and external) were hemorrhage at the base of the fins (78.75%), splenomegaly (75%), hemorrhage in the posterior intestine (48.75%) and bleeding in the oral cavity (26, 25 %). In addition, the proportion of 100% is indicated only for group T4 at day 10, and 30%, 20%, 10% for groups T3, T2 and T1 respectively. Histopathologically, there was evidence of a greater involvement in the spleen with the presence of melanomacrophagos, congestion and leukocyte hyperplasia, anterior kidney with hyal drops and tubular epithelium, increase in lymphoid tissue, liver with fatty degeneration, necrosis, pulse hepatocytes, posterior intestine with goblet cell hyperplasia, necrosis and disintegrated epithelium. It was concluded that the strain of *Y. ruckeri* from Puno, also in the lower parts, is highly pathogenic, production of it and lesions of yersiniosis.

Key words: ERM, hemorrhage, *Oncorhynchus mykiss*, splenomegaly

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Ranking mundial de la producción de acuicultura en miles de TM (2016)
- Cuadro 2.** Producción de los principales grupos de especies comestibles procedentes de la acuicultura mundial en miles TM, 2016
- Cuadro 3.** Producción mundial de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en TM (2016)
- Cuadro 4.** Producción de las principales especies de Acuicultura peruana según origen en TM, 2017
- Cuadro 5.** Clasificación taxonómica de la trucha arcoíris
- Cuadro 6.** Parámetros fisicoquímicos de agua para crianza de truchas
- Cuadro 7.** Clasificación taxonómica de *Yersinia ruckeri*
- Cuadro 8.** Medios de cultivo para *Yersinia ruckeri*
- Cuadro 9.** Características bioquímicas diferenciales entre cepas de *Yersinia ruckeri* correspondientes al biotipo 1 y biotipo 2
- Cuadro 10.** Sistema de tipificación hasta la fecha propuesto para *Yersinia ruckeri*
- Cuadro 11.** Presencia de *Yersinia ruckeri* aisladas en determinadas especies y alimentos
- Cuadro 12.** Parámetros fisicoquímicos del agua utilizados en el sistema de crianza experimental y en el estudio de patogenicidad
- Cuadro 13.** Distribución de grupos experimentales, diluciones bacterianas de *Y. ruckeri*, volumen inoculado y vía de administración.
- Cuadro 14.** Clasificación de la presencia de necrosis en riñón de acuerdo a severidad y extensión.
- Cuadro 15.** Frecuencia de signos clínicos en los diferentes grupos experimentales inoculados IP con cepas de *Y. ruckeri* procedente de Puno.
- Cuadro 16.** Frecuencia de lesiones macroscópicas (internas y externas) en los diferentes grupos experimentales inoculados IP con cepas de *Y. ruckeri* procedente de Puno.
- Cuadro 17.** Mortalidad de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) post- infección con la cepa *Y. ruckeri* inoculadas IP en los diferentes grupos.
- Cuadro 18.** Morbilidad post- infección de los grupos experimentales con cepas de *Y. ruckeri* provenientes de Puno a diferentes dosis
- Cuadro 19.** Características bioquímicas de una cepa de *Y. ruckeri* procedente de Puno.
- Cuadro 20.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en hígado de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales.
- Cuadro 21.** Frecuencia relativa y absoluta de degeneración grasa en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 22.** Frecuencia relativa y absoluta de infiltrado leucocitario en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 23.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 24.** Frecuencia relativa y absoluta de separación de hepatocitos en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 25.** Frecuencia relativa y absoluta melanomacrófagos en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 26.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 27.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia canalicular en hígado en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 28.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en bazo de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 29.** Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en bazo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 30.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en bazo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 31.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia leucocitaria en bazo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 32.** Frecuencia relativa y absoluta de dilatación de vasos sanguíneos en bazo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 33.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en bazo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 34.** Frecuencia relativa y absoluta de disminución linfoide en bazo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 35.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en riñón anterior de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 36.** Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 37.** Frecuencia relativa absoluta de gotas hialinas en epitelio tubular en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 38.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 39.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en riñón anterior en los diferentes grupos

experimentales.

**Cuadro 40.** Frecuencia relativa y absoluta de túbulos regenerados en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 41.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en intestino posterior de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 42.** Frecuencia relativa y absoluta en hiperplasia de células caliciformes en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 43.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia de enterocitos en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 44.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 45.** Frecuencia relativa y absoluta de epitelio disgregado en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 46.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en músculo de truchas arcoíris en diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 47.** Grado histopatológico y frecuencia relativa y absoluta de necrosis en músculo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 48.** Frecuencia relativa y absoluta de disgregación de fibras musculares en músculo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 49.** Frecuencia relativa y absoluta de células inflamatorias en músculo en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 50.** Frecuencia relativa y absoluta de dilatación de vasos en músculo en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 51.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en lamelas branquiales de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 52.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia y fusión lamelar en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 53.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en branquias en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 54.** Frecuencia relativa y absoluta de telangiectasia en branquias en los diferentes grupos experimentales

**Cuadro 55.** Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en branquias en los diferentes grupos experimentales.

**Cuadro 56.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia de células caliciformes en branquias en los



diferentes grupos experimentales

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** . Producción Mundial de Pesca y Acuicultura, FAO, 1950-2016

**Figura 2.** Producción acuícola mundial de peces comestibles y plantas acuáticas, FAO, 1990-2016

**Figura 3.** Producción de acuicultura en Perú según especie, 2017

**Figura 4.** Producción nacional de la trucha arcoíris (TM), 2008- 2017

**Figura 5.** Producción de trucha arcoíris (TM) por departamentos, 2017

**Figura 6.** Ejemplar de alevino de trucha arcoíris

**Figura 7.** Hallazgos patológicos de truchas arcoíris infectada experimentalmente con *Yersinia ruckeri*, 2018

**Figura 8.** Método de inoculación bacteriana vía intraperitoneal.

**Figura 9.** Características microbiológicas de una cepa de *Yersinia ruckeri* procedente de Puno, 2018.

**Figura 10.** Bandas de electroforesis producto de PCR de aislados bacterianos de *Y. ruckeri*, 2018.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BHIA:** Agar cerebro corazón (Del inglés: “Brian Hearth Infusion”)

**ERM:** Enfermedad entérica de la boca roja (Del inglés: “Enteric Red Mouth disease”)

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Del inglés: “Food and Agriculture Organization”)

**FMV-UNMSM:** Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

**H-E:** Tinción Hematoxilina y Eosina

**H<sub>2</sub>S:** Ácido sulfhídrico

**IP:** Intraperitoneal

**OMP:** Proteínas de membrana externa (Del inglés: “Outer membrane proteins”)

**PBS:** Tampón fosfato salino (Del inglés: “Phosphate buffered saline”)

**Ppm:** partes por millón.

**PRODUCE:** Ministerio de la Producción

**PROMPERU:** Ministerio de Comercio Exterior y Turismo

**Ppt:** partes por trillón.

**TM:** Toneladas métricas

**TSA:** Agar Tripticasa de soya (Del inglés: “Trypticase Soy Agar”)

**TSB:** Caldo Soya Tripticasa (Del inglés: “Trypticase Soy Broth”)

**UFC:** Unidad Formadoras de Colonia

**USD:** Dólar USA

**Yrp1:** Proteasa de yersinia (Del inglés: “*Yersinia ruckeri* protease 1”)

## I. INTRODUCCION

La acuicultura peruana es una actividad que en los últimos años ha experimentado un gran crecimiento, destacando en esta producción la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). (PRODUCE, 2018). La yersiniosis o ERM es una de las patologías bacterianas que más afecta la crianza de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) causada por el agente patógeno *Yersinia ruckeri*, bacteria Gram negativa que causa septicemia bacteriana y hemorragias externas e internas en el pez (Kumar *et al.*, 2015). Produce mortalidades graves de hasta 30-70%, provocando grandes pérdidas económicas (Furones *et al.*, 1993; Noga, 2010) ya sea directamente de peces muertos o indirectamente como restricciones comerciales por mala calidad del producto (Verschuere *et al.*, 2000).

En el Perú se han aislado distintas cepas de *Y. ruckeri* en varias regiones del Perú como Junín, Huancavelica, Áncash, Lima y Cusco (Bravo y Kojagura, 2004; Sirvas *et al.*, 2011; Flores, 2013; Sierralta *et al.*, 2013; Cueva 2015; Mamani, 2016; Sandoval, 2016; Mesías, 2017). Se determinó que existe el biotipo 1 y biotipo 2 en la región de Junín y Ancash, solo el biotipo 1 en Huancavelica. Además utilizaron un panel de alrededor de 18 pruebas bioquímicas, determinándose que había una variabilidad fenotípica entre las diferentes cepas de *Yersinia* provenientes de Ancash, Junín y Huancavelica, siendo más variable la procedente de Ancash. (López, 2012; Flores, 2013).

Debido a la variabilidad fenotípica de cepas de *Y. ruckeri* encontradas en el país (Flores 2013), falta de estudio de prevalencia, diferencias en la severidad de signología clínica en diferentes regiones y a los escasos estudios de patogenicidad de cepas locales, se propuso realizar el estudio de patogenicidad de una cepa de *Y. ruckeri* proveniente de Puno, departamento con mayor producción truchícola, para poder determinar si hay diferencias de patogenicidad y con ello establecer mejores acciones de mitigación y control de posibles brotes de esta enfermedad y así mismo, proponer programas de prevención asociados a la creación de vacunas.

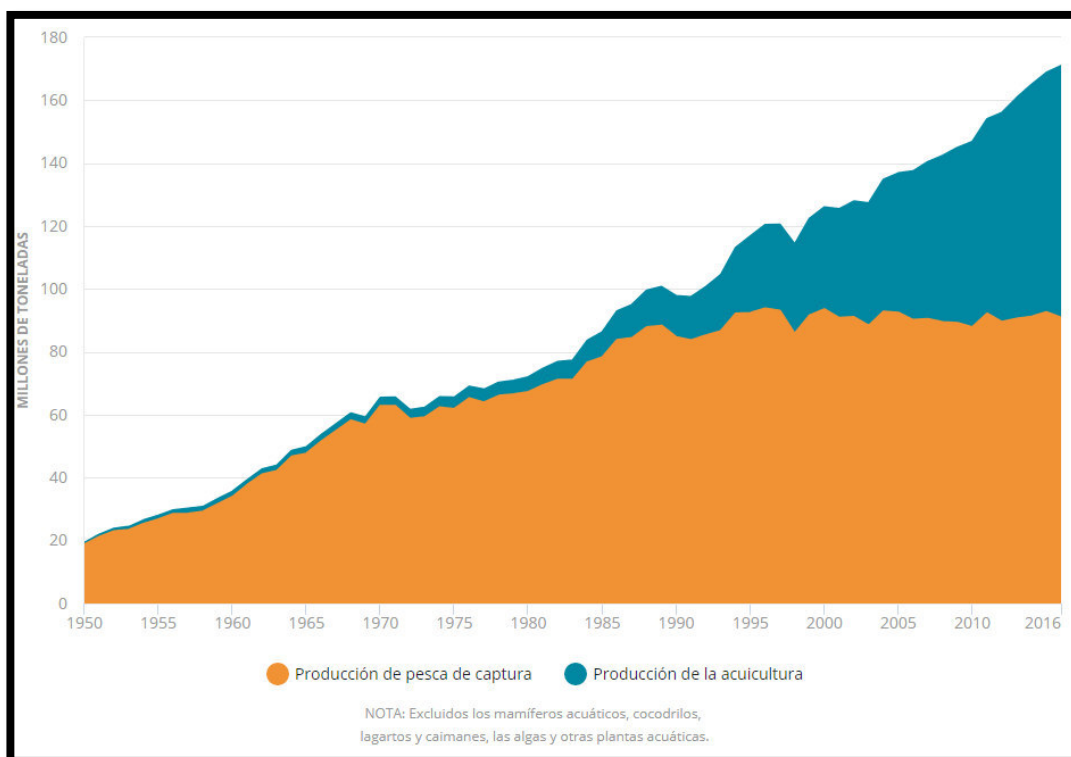
## II. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1. Acuicultura

Según FAO (2018) describe a la acuicultura como la siembra de especímenes acuáticos, incluyendo peces, crustáceos, moluscos y plantas acuáticas; durante el cual el hombre interviene en el proceso productivo, en etapas como la siembra, la alimentación, la protección de los depredadores, etc., incrementando los parámetros productivos.

#### 2.1.1. Panorama de la acuicultura a nivel mundial

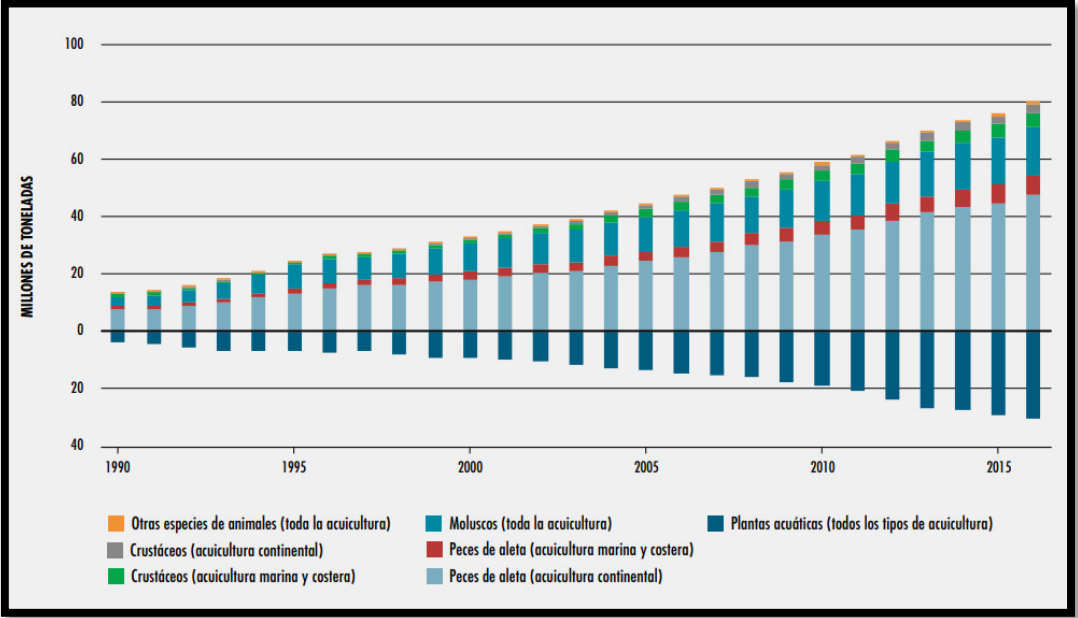
La producción de acuicultura mundial tiene un crecimiento importante y sostenido en estas últimas décadas, alcanzando junto con la producción de pesca de captura un aproximado de 171 millones de TM en 2016 (figura 1), a pesar de que ha desacelerado en estos últimos años, ya que tuvo un crecimiento anual del 5,8% entre 2010 y 2016, comparado con el 10,8% y 9.5% en las décadas de 1980 y 1990 respectivamente. En contraste, la producción de pesca de captura se estabilizó desde finales de los ochenta hasta el 2016, registrándose en este año 90.9 millones de TM (FAO, 2018).



Fuente: (FAO, 2018).

**Figura 1.** Producción Mundial de Pesca y Acuicultura, FAO, 1950-2016

En 2016, la producción mundial de la acuicultura incrementó a 110,2 millones de TM, estimadas en un valor aproximado de 243 500 millones de USD. En total la producción incluía 80 millones de TM de peces de consumo (231 600 millones de USD) y 30,1 millones de TM de plantas acuáticas (11 700 millones de USD), así como 37 900 TM de productos no destinados a consumo humano (214,6 millones de USD) (Figura 2) (FAO, 2018).



Fuente: (FAO, 2018).

**Figura 2.** Producción acuícola mundial de peces de consumo y plantas acuáticas, FAO, 1990-2016

En los últimos 20 años, Asia representó alrededor de 89% de la acuicultura mundial. No obstante, China fue disminuyendo gradualmente en su producción mundial, que ha pasado del 65% en 1995 a menos del 62% en 2016. Entre los principales países productores de acuicultura en el mundo, considerando los productos destinados a consumo humano fueron China, India, Indonesia, Bangladesh, Vietnam, seguidos por Egipto, Noruega, Chile, Tailandia y Myanmar. El 89,3% de la producción total de acuicultura mundial en 2016 lo conformaron estos 10 países mencionados (FAO, 2018). (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Ranking mundial de la producción de acuicultura en miles de TM (2016)

PAÍS	miles TM	%	Ingresos (miles de dólares)
<b>China</b>	49244	61,5	144701651
<b>India</b>	5700	7,1	10644800
<b>Indonesia</b>	4950	6,2	8974309
<b>Vietnam</b>	3625	4,5	9345987
<b>Bangladesh</b>	2204	2,8	5621080
<b>Egipto</b>	1326	1,7	1766749
<b>Noruega</b>	1371	1,7	7263688
<b>Chile</b>	1035	1,3	7867541
<b>Myanmar</b>	1000	1,3	1992111
<b>Tailandia</b>	960	1,2	2488403
<b>Otros</b>	8616	10,7	30917801
<b>Total</b>	<b>80031</b>	<b>100%</b>	<b>231584120</b>

Fuente: (FAO, 2018)

NOTA: Sólo se consideró productos destinados a consumo humanos excluyendo plantas acuáticas

La producción de acuicultura marina, costera y continental en 2016 estuvo conformado por 67,6 % de peces (54,1 millones de TM ), 21,4 % de moluscos (17,1 millones de TM de moluscos), 9,8 % de crustáceos (7,9 millones de TM) y 1,2 % de otras especies acuáticas (0,9 millones de TM) (FAO, 2018) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Producción de los principales grupos de especies comestibles procedentes de la acuicultura mundial en miles TM, 2016

ESPECIE/CATEGORÍA	ACUICULTURA MARINA Y COSTERA	ACUICULTURA CONTINENTAL	TOTAL(MUNDO)
<b>Peces de aleta</b>	6575	47516	<b>54091</b>
<b>Crustáceos</b>	4829	3033	<b>7862</b>
<b>Moluscos</b>	16853	286	<b>17139</b>
<b>Otros animales acuático</b>	407	531	<b>939</b>
<b>TOTAL(MUNDO)</b>	<b>28664</b>	<b>51367</b>	<b>80031</b>

Fuente: (FAO, 2018)



En 2016, la FAO registro 598 partidas de especies (se definen como especies cultivadas alguna vez en el mundo). Las especies registradas hasta el momento comprenden 369 peces de aleta (incluidos 5 híbridos), 109 moluscos, 64 crustáceos, 7 reptiles y anfibios (excluidos cocodrilos o caimanes), 9 invertebrados acuáticos y 40 algas acuáticas. A pesar de la gran variedad, solo 20 especies de peces de aleta representan 84,2% de la producción total de acuicultura mundial (FAO, 2018).

#### 2.1.1.1. Acuicultura mundial en truchas

Las principales especies de trucha que se cultivan en el mundo son: Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) y trucha marina (*Salmo trutta trutta*), siendo la más importante la trucha arcoíris por su demanda en el mercado externo, ubicada en el puesto 15 con 814091 TM (FAO, 2018).

En 2016, la producción mundial de truchas arcoíris llego a 814455 TM y tuvo ingresos por 3409 millones de dólares. Entre los principales países productores a nivel mundial de trucha arcoíris referente al año 2016, Irán ocupa el primer lugar de producción con 18,27%, seguido por Turquía con 13,85%, Chile con 12,3 %, Noruega con 9,47 y Perú en el 5to puesto con 6,41% (FAO, 2018) (Cuadro 3). A nivel de Sudamérica el Perú está entre los principales países productores de trucha arcoíris (*O. mykiss*) ocupando el segundo lugar con 25,97 %, después de Chile que tiene el 49,83 % (PRODUCE, 2018).

**Cuadro 3.** Producción mundial de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en TM (2016)

<b>País</b>	<b>TM</b>	<b>%</b>
<b>Irán</b>	148789	18,27
<b>Turquía</b>	112781	13,85
<b>Chile</b>	100211	12,30
<b>Noruega</b>	77151	9,47
<b>Perú</b>	52217	6,41
<b>Francia</b>	38617	4,74
<b>Italia</b>	34222	4,07
<b>China</b>	28920	3,55
<b>Rusia</b>	25848	3,17
<b>USA</b>	22005	2,70
<b>España</b>	17117	2,10
<b>Otros</b>	157883	19,37
<b>Total</b>	<b>814455</b>	<b>100%</b>

Fuente: FishStatJ – (FAO ,2018)

### 2.1.2. Panorama de la acuicultura a nivel nacional

El Perú tiene un área de 3,080 km de litoral marino y además tiene las condiciones climáticas e hidrológicas necesarias para el cultivo de diversas especies que posee, esto significa que tiene un gran potencial para el desarrollo acuícola nacional. A pesar de ello, aún se presentan diversas dificultades para alcanzar este objetivo (Miranda, 2017; Saldarriaga y Regalado, 2017).

Hasta el 2017, la acuicultura peruana ascendió a 100 mil TM, teniendo un crecimiento del 7.28% respecto al año anterior. Del total, 60 298,96 TM (60,3%) es proveniente de origen continental y 39 913,1 TM (39,7%) restante de origen marítimo (PRODUCE, 2018).

**Cuadro 4.** Producción de las principales especies de Acuicultura peruana según origen en TM, 2016 -2017

Origen	2016	2017
<b>TOTAL</b>	<b>93444,8</b>	<b>100211,7</b>
<b>CONTINENTAL</b>	<b>54925,6</b>	<b>60298,6</b>
Trucha	48594,3	54424,5
Tilapia	2913,1	2657,5
Paiche	400,9	217,8
Gamitana	1144,2	1046,6
Otros	1873,2	1952,3
<b>MARÍTIMO</b>	<b>38519,2</b>	<b>39913,1</b>
Concha de abanico	18501,5	13136,6
Langostinos	20013,3	26768,5
Otros	4,4	8,1

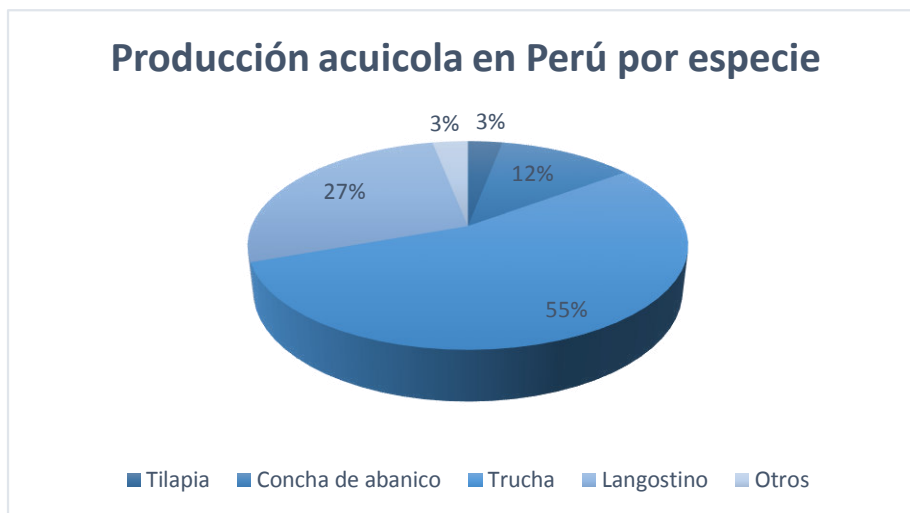
Fuente: PROMPERU 2017

La acuicultura nacional tiene como principales especies cultivadas a la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), concha u ostión abanico (*Argopecten purpuratus*), camarones peneidos o langostinos (*Litopenaneus vannamei*) y tilapia (*Oreochromis spp.*), además, se cultivan en menor porcentaje algunos peces amazónicos como la gamitana (*Colossoma macropomun*), paco (*Piaractus brachypomus*), sábalo cola roja (*Brycon erythropterum*) y paiche (*Arapaima gigas*).

La principal especie cultivada que ha impulsado este crecimiento es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En contraparte, la notable disminución de conchas de abanico por problemas productivos principalmente asociados a condiciones oceanográficas (Fenómeno del niño y marea roja), en la zona de Sechura, han dejado mortalidades de consideración afectando su producción anual. Por su parte, la producción de langostinos ha mostrado un crecimiento sostenido y estable, a una tasa del 10% de crecimiento promedio anual desde el año 2008, lo que ha permitido alcanzar la

cifra récord superior a las 26 000 TM como consecuencia de las inversiones en tecnificación de los campos productivos (PROMPERU, 2017; Saldarriaga y Regalado, 2017) (Figura 3).

En resumen, respecto al año 2016 la producción acuícola nacional de la trucha, langostino y tilapia tuvieron un incremento del 0,26%, 35,5% y 3,1% respectivamente. En contraste la concha de abanico tuvo una disminución del 43,1% (PRODUCE, 2018).



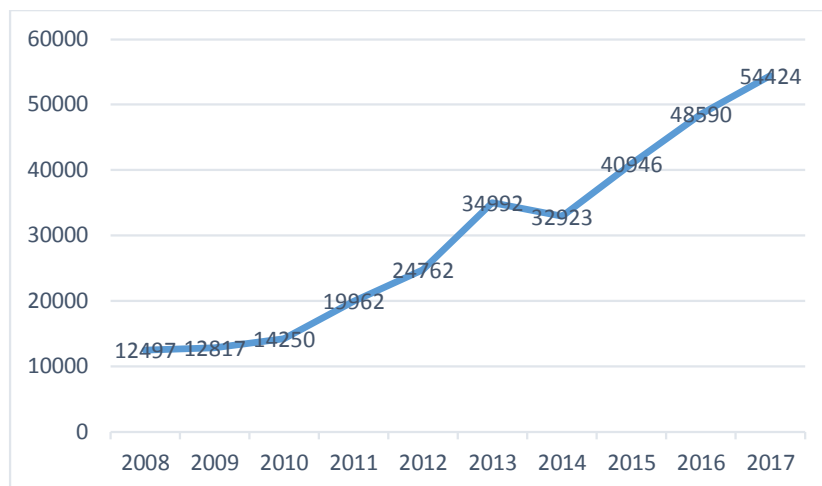
Fuente: (PRODUCE, 2018).

**Figura 3.** Producción de acuicultura en Perú según especie, 2017

#### 2.1.2.1. Acuicultura nacional en truchas

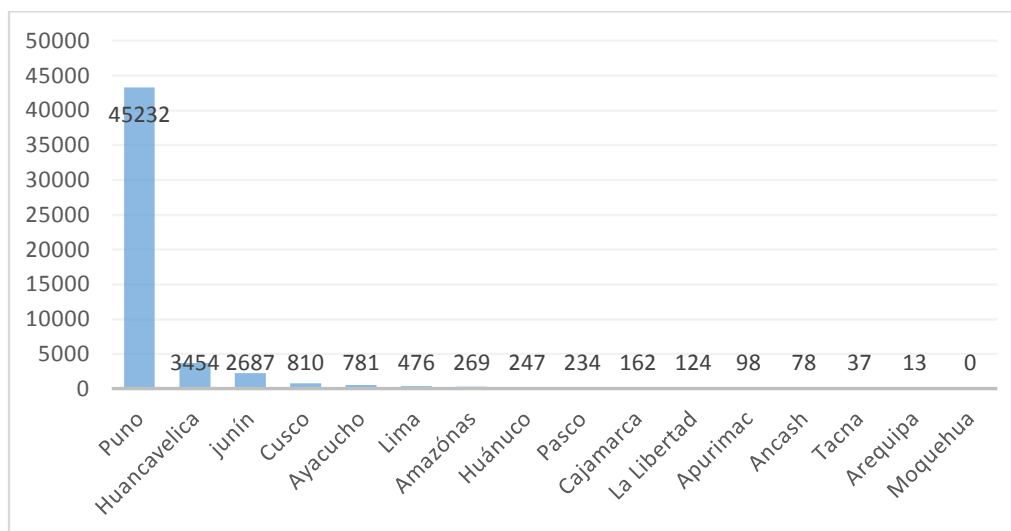
La producción acuícola nacional de trucha arcoíris, en estos últimos años ha tenido un crecimiento impulsado, teniendo un incremento del 339,1 % en esta última década (2010-2017) (Figura 4), desarrollándose mayormente en zonas altoandinas. Siendo Puno el mayor productor de trucha con más de 40 000 TM, representando un valor superior al 80% de la producción nacional.

Se ha destacado la importación de ovas para el desarrollo de esta especie, entre los principales países importadores esta EE.UU., Dinamarca, España y Gran Bretaña. Los principales departamentos de destino de ovas embrionadas en el año 2016 fueron Puno con el 78,5 % (176 921 millares), Huancavelica con el 7,8 % (17 545 millares), Junín con el 5,6 % (12 642 millares) y Lima con el 3,7 % (8 375 millares). Además, estos últimos departamentos son los de mayor producción truchícola en el país (PRODUCE, 2018) como lo muestra la figura 5.



Fuente: (PROMPERU, 2017)

**Figura 4.** Producción nacional de la trucha arcoíris (TM), 2008- 2017



Fuente: (PRODUCE, 2018)

**Figura 5.** Producción de trucha arcoíris (TM) por departamentos, 2017

## 2.2. Trucha arcoíris

### 2.2.1. Clasificación taxonómica

Inicialmente hubo varias modificaciones para la clasificación en especie y género de este espécimen, hasta que (Smith y Stearley, 1989) mediante estudios osteológicos, etológicos, bioquímicos y moleculares demostraron que la trucha arcoíris erróneamente clasificadas como *Salmo*

*gairdneri* o trucha Kamchatka tenía más afinidad con *Oncorhynchus mykiss*. En el cuadro 5 se puede observar la clasificación con más detalle.

**Cuadro 5.** Clasificación taxonómica de la trucha arcoíris

<b>TAXONOMÍA</b>	
<b>Reino</b>	Animal
<b>Phylum</b>	Chordata
<b>Subphylum</b>	Vertebrata
<b>Superclase</b>	Pisces
<b>Clase</b>	Osteichthyes
<b>Subclase</b>	Actinopterygii
<b>Orden</b>	Salmoniformes
<b>Familia</b>	Salmonidae
<b>Genero</b>	Oncorhynchus
<b>Especie</b>	Mykiss
<b>Nombre científico</b>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
<b>Nombre común</b>	“Trucha arcoíris”

Fuente: Smith y Stearley, 1989

### 2.2.2. Características generales y biológicas

Esta especie se caracteriza por tener el cuerpo cubierto con escamas finas de forma fusiforme, su coloración azul a verde oliva depende del hábitat, edad y estado de maduración sexual. Posee pequeñas manchas negras a manera de salpicado alrededor de la cabeza, lomo, flancos y aletas además el abdomen posee una tonalidad más clara en relación a todo el cuerpo. Como todos los salmónidos, tiene una aleta adiposa, generalmente de color negro. Además posee una franja lateral irisada rosácea longitudinal que recorre en ambos lados (FAO, 2005; Arregui, 2009). En la figura 6 se muestra un ejemplar de alevino de esta especie.

La trucha arcoíris es una especie de reproducción ovípara, esto quiere decir que la fecundación del ovulo y el espermatozoide se da externamente. Para esto los progenitores deben alcanzar la madurez sexual, la que se presenta aproximadamente a los 15 o 18 meses de edad en machos y en hembras mínimo 24 meses. Además el dimorfismo sexual se da en la etapa reproductiva, caracterizándose en el macho por poseer una prolongación a manera de “gancho” en el maxilar

inferior, con una curvatura dorsal del cuerpo, los cuales hacen que uno pueda distinguir fácilmente los machos de las hembras (Choquehuayta, 2008; De la Oliva, 2011).

Los salmónidos tiene una reproducción cíclica, esto quiere decir que se presenta una vez al año y en una determinada época. En Perú este periodo se presenta desde abril hasta setiembre, siendo los meses de junio y julio los de mayor actividad reproductiva. Los periodos de desove son anuales y esta comprendidos entre noviembre y febrero, dependiendo de los posibles cambios climáticos que puedan presentarse. Esta fase reproductiva se realiza en ambientes naturales y artificiales como en piscigranjas (Choquehuayta, 2008; De la Oliva 2011; López, 2012).



**Figura 6.** Espécimen de alevino de trucha arcoíris

### 2.2.3. Fases de desarrollo

El ciclo productivo de la trucha arcoíris comprende las siguientes etapas (De La Oliva, 2011; FONDEPES, 2014):

- **Huevo u ova:** Son huevos que eclosionaran entre 20 a 30 días después de la fecundación dependiendo de la temperatura del agua.
- **Larva:** Se da cuando concluye el proceso embrionario y eclosiona con un característico saco vitelino, la cual provee reservas alimenticias para su alimentación hasta que pueda recibir alimento exógeno. Esta fase puede durar aproximadamente 15 a 18 días.
- **Alevino:** Es la fase donde las larvas han agotado sus reservas y presentan una completa absorción del vitelo. Tienen una longitud de 5 a 10 cm pesando en  $\bar{c}$  promedio 12 g, esta etapa dura aproximadamente 3 meses variando con la temperatura del agua.
- **Juvenil:** En este estadio se absorbe todo el saco vitelino y empiezan a comer alimento por sí mismos. Se diferencian de los adultos porque todavía no maduran sexualmente. Tienen una longitud promedio de 10 a 17 cm pesando en promedio 68 g. Esta fase puede durar aproximadamente 2 meses en condiciones de crianza normal.



- **Adulto o engorde:** Durante esta etapa se da el proceso de engorde para ser comercializados. Es aquí donde se les suministra alimento con pigmentos derivados de la cantaxantina y astaxantina para lograr una carne de tonalidad asalmonada mejorando la presentación del producto, pueden tener una longitud promedio de 17 a 26 cm , pesando en promedio 250 g (tamaño de plato) en un periodo aproximado de 11 a 13 meses de crianza.

#### **2.2.4. Alimentación**

En estado silvestre la trucha es un animal carnívoro cuya alimentación se conforma de presas vivas como: Invertebrados, peces pequeños y algunos animales terrestres. Come insectos, renacuajo, crustáceos y gusanos que captura en el agua (Arregui, 2013).

La alimentación en la crianza de truchas debe ser de alto valor nutritivo puesto que reemplaza las necesidades de un pez carnívoro por naturaleza. En el mercado existen alimentos artificiales balanceados elaborados de origen animal y vegetal, los principales son de proceso extruido y pelletizado. La formulación del alimento y tasa de alimentación diaria, se hace de acuerdo a los requerimientos del pez, tomando como referencia determinados parámetros como: tamaño, peso y estadio sexual del animal. Por ejemplo, en estadio de alevines y pre juvenil necesitaran mayor cantidad de proteína que en peces de mayor tamaño. Asimismo, el requerimiento de la grasa será mayor a medida que el pez desarrolle (Choquehuayta, 2008).

#### **2.2.5. Parámetros hídricos para crianza de truchas**

Este espécimen se caracteriza por vivir en aguas de óptima calidad y cantidad. Habitan en aguas cristalinas con elevadas concentraciones de oxígeno disuelto y a baja temperatura dependiendo de la etapa de desarrollo, además con cierto movimiento de agua constante. La zona norte de la sierra peruana es propicio para el cultivo de esta especie, debido a que los cuerpos de agua presentan las condiciones antes descritas (de La Oliva, 2011).

Los parámetros físicos como la temperatura, oxígeno, transparencia, pH, turbidez, etc., pueden variar bruscamente a causa de posibles cambios climáticos. Los parámetros químicos, en contraste son mucho más estables y sus variaciones son mínimas, salvo contaminaciones químicas externas. (Municipalidad de Ragash, 2009). La calidad de agua para la crianza de truchas en acuicultura se puede apreciar en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Parámetros fisicoquímicos de agua para crianza de truchas

Parámetro	Rango óptimo
Oxígeno disuelto	6.0 - 8.5 ppm
Temperatura	9-14 °C
pH	6.6-7.9
Salinidad	0-35 ppt
Alcalinidad	80-180 ppm
Dureza total	60-300 ppm
CO <sub>2</sub>	< 2 ppm
Amonio	0.012 mg/ l
Nitrato	< a 0.55 mg/l
Sólidos disueltos	<400 mg/l
Sólidos suspendidos	<80 mg/l

Fuente: (FONDEPES, 2014; de la Oliva 2011)

### 2.3. Agente causal (*Yersinia ruckeri*)

#### 2.3.1. Antecedentes históricos

El aislamiento de *Yersinia ruckeri* se dio por primera vez durante la década de 1950 de truchas arco iris (*O. mykiss*), en el Valle “Hagerman” de Idaho, EE. UU., aunque lograron posicionarlo en la familia Enterobacteriaceae durante esos años, no llegaron a especificarlo taxonómicamente. (Rucker, 1966; Ross *et al.*, 1966).

En el Perú se reportó el primer caso de *Y. ruckeri* en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), durante un estudio sanitario en diferentes piscigranjas localizadas en la región de Junín. (Bravo y Kojagura, 2004).

#### 2.3.2. Posición taxonómica

Después de posicionarlo en la familia Enterobacteriaceae, estudios de hibridación del ADN y determinación de proporciones de guanina más citosina (G+C) lo confirmaron y además permitieron incluirla dentro del género *Yersinia*. Este aislado presentó 47.5–48.5 % de G + C, difiriendo claramente del género *serratia* 52–60% de G + C o *salmonella* 50-53% G+C y se encontró más cercano al género *Yersinia* 46–50% de G + C, sobre estas bases consideraron proponer una nueva especie del género *Yersinia*, llamándola *Yersinia ruckeri* (Ewing *et al.*, 1978). Sin embargo, posteriormente surgieron debates por su verdadera posición taxonómica. Diferentes investigadores

señalaron que el perfil bioquímico de *Y. ruckeri* tiene más similitud con los géneros *Serratia* y *Salmonella* (Llewellyn, 1980; Zorriehzahra *et al.*, 2017) además, pruebas serológicas de aglutinación comparativas con otras enterobacterias evidenciaron más afinidad con *Salmonella arizonae* (Green y Austin, 1983; Cueva, 2015).

Recientemente Kotetishvili *et al.* (2005) utilizaron la tipificación por secuencia de multilocus (MLST) de varias cepas y determinaron que *Yersinia ruckeri* fue más distante en términos genéticos dentro del género *Yersinia*. A pesar de ello, la edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (2005) incluye a este patógeno dentro del género *Yersinia*, manteniendo la posición taxonómica según lo escrito por Ewing *et al.*, 1978 observada en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Posición taxonómica de *Yersinia ruckeri*

TAXONOMÍA	
<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Phylum</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gammaproteobacteria
<b>Orden</b>	Enterobacteriales
<b>Familia</b>	Enterobacteriaceae
<b>Genero</b>	<i>Yersinia</i>
<b>Especie</b>	<i>Yersinia ruckeri</i>

**Fuente:** Ewing *et al.*, 1978

### 2.3.3. Características microbiológicas y perfil bioquímico

*Yersinia ruckeri* es una bacteria gram negativa anaerobio facultativo con extremos redondeados que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Aproximadamente tienen un diámetro de 0,5–0,8 µm y longitud de 1,0–3,0 µm (Tobback *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015). Además, este microorganismo no posee capsula, ni forma endosporas aunque la mayoría presenta flagelos, algunas cepas pueden dejar de ser funcionales a temperaturas inferiores a 9° C y otras no evidenciarse a 35° C (Bastardo, 2011; Davies y Frerichs, 1989). Este microorganismo puede ser aislado en diferentes medios a partir de diferentes órganos internos de peces enfermos (Cuadro 8). Las colonias incubadas por 24-48 h a una temperatura de 22° C tendrán un característico color crema brillante y un diámetro entre 1–1,5 mm. Sin embargo, este patógeno puede crecer en un rango amplio de temperaturas, siendo la temperatura óptima de 28° C (Tinsley, 2010).

Cuadro 8. Medios de cultivo para *Yersinia ruckeri*

Medio agar	Referencia o autor
Agar Tripticasa de soya	Stevenson y Daley, 1982
Agar nutritivo	Secades y Guijarro, 2007
BHIA	Arias <i>et al.</i> , 2007
Agar sangre Columbia	Gibello <i>et al.</i> , 2004
Agar MacConkey	Gibello <i>et al.</i> , 1999

Fuente: (Tinsley, 2010)

Como en otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, *Yersinia ruckeri* es fermentador de la glucosa, oxidasa negativa y nitrato reductor (Ross *et al.*, 1966), las características bioquímicas distintivas de otros géneros de *Yersinia* son la positividad con presencia de b-galactosidasa, lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa, mientras que son negativos cuando no producen H<sub>2</sub>S e indol. Además es fermentador de glucosa y manitol en contraste con ramnosa, sacarosa, melibiosa, inositol y la arabinosa que no se utilizan (Frerichs, 1984). Sobre este perfil bioquímico, *Yersinia ruckeri* puede identificarse positivamente a partir de tablas de diagnóstico y sistema de API 20 E (Tobback, 2007).

#### 2.3.4. Sistema de tipificación

Se ha categorizado diferentes cepas de este microorganismo en base a los biotipos, serotipos y los tipos de proteínas de la membrana externa (OMP) (Tobback, 2007). Hasta la actualidad no hay un procedimiento claro para diferenciar el biotipo 1 del biotipo 2, aparte de las pruebas de motilidad y actividad de la lipasa (Tinsley, 2010) el biotipo 1 son positivas para la motilidad y la actividad de la lipasa, mientras que las de Biotipo 2 son negativas para ambas pruebas (Ström-Bestor *et al.*, 2010). Las características que se han descrito en literatura para ambos biotipos se presentan en el cuadro 9.

Cabe resaltar que la mayoría de epizootias y mortalidad por yersiniosis están causadas por las cepas de biotipo 1 (García *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2007). En el Perú, López (2012) determinó la presencia de biotipo 1 y biotipo 2 en piscigranjas de la región de Junín. Posteriormente, Flores (2013) identificó el biotipo 1 en las localidades de Junín y Huancavelica, mientras que ambos biotipos fueron determinados en Ancash.

Cuadro 9. Características bioquímicas diferenciales entre cepas de *Yersinia ruckeri* correspondientes al biotipo 1 y biotipo 2

Prueba bioquímica	Biotipo 1	Biotipo 2
Motilidad	+	-
Reacción Voges-Proskauer	v	+
Prueba de rojo metilo	v	v
Producción de ácido a partir de sorbitol	v	v
Actividad de lipasa	+	-
Presencia de Gelatinasa	v	v
Crecimiento a 22 °C	+	+

+, - y v (variable) corresponde respectivamente a  $\geq 80\%$ ,  $\leq 20\%$  y 21-79% de respuestas positivas. Fuente: Tinsley, 2010

De grandis *et al.*, (1988), demostraron que las cepas de las serovariedades I, II y III (incluidas en el serotipo O1) así como las V y VI podían considerarse claramente como *Y. ruckeri*. Posteriormente, Davies (1990) reconoció 5 serotipos O (O1, O2, O5, O6 y O7) basados en antígenos O estables al calor. Hasta la actualidad Romalde *et al.*,(1993) realizaron una subdivisión en cuatro serotipos con diferentes subgrupos: el serotipo O1 se subdivide en dos subgrupos O1a (serovar I) y O1b (serovar III) y el serotipo O2 (serovar II) en tres subgrupos O2a O2b y O2c. Los serotipos restantes se nombraron como serotipo O3 (serovar V) y serotipo O4 (serovar VI). La clasificación hasta la actualidad se muestra en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Sistema de tipificación hasta la fecha propuesto para *Yersinia ruckeri*

SEROTIPOS De Grandis <i>et al.</i> ,(1988)	SEROTIPOS Davies (1990)	O-SEROTIPOS Romalde <i>et al.</i> ,(1993)
<b>I</b>	O1	O1a
<b>II</b>	O2	O2a
		O2b
		O2c
<b>III</b>	O1	O1b
<b>V</b>	O5	O3
<b>VI</b>	O6	O4
<b>No <i>Y.ruckeri</i></b>	O7	-

Fuente: Bastardo, 2012

Davies (1991) identificó 5 tipos de proteínas de membrana externa (OMP tipos 1-5) entre más de 100 muestras utilizando la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Posteriormente, Fouz *et al.*, (2006) describió otra agrupación clonal en función del tipo de serotipo, biotipo y proteína de membrana externa (OMP) clasificándolo en 6 grupos clonales principales, siendo útil para discriminar entre cepas de *Yersinia ruckeri*.

## 2.4 Yersiniosis o Enfermedad entérica de la boca roja (ERM)

La yersiniosis o también llamada enfermedad de la boca roja entérica (ERM), causada por *Yersinia ruckeri* (Rucker, 1966) y es una patología importante en la acuicultura mundial, en particular para los salmónidos y especialmente para la trucha arcoíris (*O. mykiss*) que es muy susceptible (Furones *et al.*, 1993). Las epizootias agudas pueden provocar mortalidades graves entre el 30-70% según el tamaño del pez, el estrés, la temperatura del agua y la susceptibilidad individual; además, puede asociarse con la virulencia de la cepa (Furones *et al.*, 1993; Noga, 2010).

### 2.4.1 Hospederos y distribución geográfica

Desde que Rucker, (1966) realizó el primer estudio de yersiniosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los EEUU, posteriores trabajos evidenciaron que este patógeno fue hallado en otras especies de peces en todo el mundo (Zorriehzahra, 2017). La enfermedad fue reportada en Canadá, Europa, América del Sur, Oriente Medio, China, India y Australia (Tobback *et al.*, 2007). Además, se ha podido aislar en otras especies que no son peces, como la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), las gaviotas (*Larus spp.*), las tortugas (Cheloniidae), los humanos (*Homo sapiens*) entre otras (Tobback, 2007; Willumsen, 1989; Farmer *et al.*, 1985; de Keukeleire *et al.*, 2014), también se ha aislado en fuentes alimentarias como leche, queso, pollo y carne picada (Özdemir y Arslan, 2015). En el cuadro se detallan las fuentes de aislamiento descritas para *Y. ruckeri* (cuadro 11). Estos numerosos informes demuestran que *Y. ruckeri* tiene un amplio rango de hospederos y distribución geográfica, y puede causar tanto epizootias como zoonosis (Kumar *et al.*, 2015).

Cuadro 11. Presencia de *Yersinia ruckeri* aisladas en determinadas especies y alimentos

Fuente de aislamiento	País	Referencia o autor
<b>Peces salmónidos:</b>		
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoíris)	USA	Rucker <i>et al.</i> , 1966
<i>O. kisutch</i> (Salmon coho)	USA	McDaniel (1971)
<i>O. tshawytscha</i> (Salmon real)	USA	McDaniel (1971)
<i>O. nerka</i> (Salmon rojo)	USA	Dulin <i>et al.</i> (1976)
<i>Salmo clarkii</i> (Trucha garganta cortada)	USA	McDaniel (1971)
<i>S. gairdneri</i>	Canada	McDaniel (1979)



<i>S. salar</i> (Salmón del Atlántico)	Canadá	McDaniel (1979)
<i>S. trutta</i> (trucha común)	Canada	McDaniel (1979)
<i>Salvelinus fontinalis</i> (Trucha de arroyo)	Canada	McDaniel (1979)
<i>S. malma</i> (La trucha Dolly Varden)	Canada	McDaniel (1979)
<i>Thymallus thymalus</i> (Timalo)	Italia	Michel <i>et al.</i> , 1986
<b>Peces no salmónidos:</b>		
<i>Notemigonus atherinoides</i>	USA	Mitchum (1981)
<i>Coregonus artedii</i>	Canadá	Stevenson y Daly (1982)
<i>Pimephales promelas</i>	Francia	Michel <i>et al.</i> (1986)
<i>Coregonus peled</i>	Finlandia	Rintamaki <i>et al.</i> (1986)
<i>C. muskum</i>	Finlandia	Rintamaki <i>et al.</i> (1986)
<i>Acipenser sturio</i> (esturión)	Francia	Vuillaume <i>et al.</i> (1987)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Francia	Michel <i>et al.</i> (1986)
<i>Sparus aurata</i>	Francia	Michel <i>et al.</i> (1986)
<i>Esoz lucius</i>	Alemania	McDaniel (1971)
<i>Anguilla anguilla</i>	Francia	Fuhrmann <i>et al.</i> (1984)
<i>Gobio gobio</i>	Francia	Vuillaume <i>et al.</i> (1987)
<i>Pollachius sp.</i>	Francia	Michel <i>et al.</i> (1986)
<i>Soleidae sp.</i>	Canadá	Vuillaume <i>et al.</i> (1987)
<i>Rutilys rutilus</i>	Irlanda	McDaniel (1979)
<i>Carassius auratus</i>	irlanda	McArdle y Dooley-Martyn (1985)
<b>Vectores:</b>		
<i>Larus argentatus</i> (gaviotas) , <i>Larus marinus</i>	Noruega	Willumsen (1989)
<i>Pollachius virens</i> (abadejo)	Noruega	Willumsen (1989)
<b>Otras fuentes accidentales:</b>		
<i>Ondatra zibethica</i> (rata de agua)		Stevenson y Daly (1982)
<i>Penaeus keraturus</i>		Sullivan (1981)
<i>Emys orbicularis</i> (tortuga de estanque europea)		Nowakiewicz <i>et al.</i> (2015)
<i>Necturus maculosus</i> (Mudpuppy común)	USA	Standish, 2018
Hombre ( <i>Homo sapiens</i> )	USA, Bélgica	Farmer <i>et al.</i> (1985); Keukeleire <i>et al.</i> 2014
<b>Alimentos:</b>		
Leche, Pollo, queso y carne picada		Özdemir y Arslan, 2015

### 2.4.2 Transmisión

La transmisión de la yersiniosis es principalmente horizontal, esto quiere decir que la transmisión se da de un pez enfermo a un pez sano por contacto directo, teniendo como medio de diseminación el agua así como peces portadores asintomáticos (Rucker *et al.*, 1966). La propagación de este patógeno se ha relacionado con vectores potenciales, incluyendo aves e invertebrados acuáticos (Willumsen, 1989).

Busch y Ling (1975) demostraron la presencia *Yersinia ruckeri* en intestino delgado, hasta en un 25% de truchas portadoras sobrevivientes. Además, factores estresantes importantes como la temperatura elevada, puede desencadenar una transmisión eficaz de peces portadores asintomáticos a peces sanos (Hunter *et al.* 1980). Además, se comprobó que siendo portador de yersiniosis pueden sobrevivir 2 meses después de infecciones experimentales (Tobback, 2007).

Este microorganismo es capaz de permanecer infectivo en el medio acuático, en las heces pueden estar presentes en ciclos de 36 a 40 días (Tinsley, 2010; Rodgers, 1992) o hasta 4 meses (Busch y Ling, 1975). También se ha recuperado en lodo de aguas residuales y bilis humana (Farmer *et al.*, 1985). Además, Coquet *et al.*, (2002) aisló *Yersinia ruckeri* de materiales usados en tanques de piscifactorías, demostrando la capacidad de colonización de este patógeno formando biopelículas (biofilm), la cual puede ser una fuente de infección recurrente durante largos periodos de tiempo.

La transmisión vertical no se ha demostrado con certeza (Tinsley, 2010), aunque se reportó *Yersinia ruckeri* en huevos no fertilizados de salmon Chinook (*Oncorhynchus tshawtscha*), siendo una posibilidad de transmisión, sin embargo no se evidenció más pruebas de este trabajo (Sauter *et al.*, 1985). Estudios recientes evidenciaron ADN de *Y. ruckeri* en fluidos ováricos y huevos no fertilizados de la especie mencionada anteriormente, indicando una transmisión vertical de yersiniosis de parte de las hembras hacia sus crías (Richard *et al.*, 2014).

### 2.4.3 Patogénesis

Ohtani (2014), mediante inmunohistoquímica y tomografía de proyección óptica se determinó que *Yersinia ruckeri* presenta la primera vía de infección en las lamelas secundarias de las branquias luego se propaga al sistema sanguíneo teniendo como vías secundarias piel e intestino. Todos estos órganos presentan una capa mucosa que sirve de barrera física primaria, presentando componentes como mucina y glicoconjugados los cuales sirven de adhesión para este patógeno logrando la penetración en tejidos más profundos y en músculos (Smith *et al.*, 2003).

Las bacterias pueden penetrar el epitelio branquial, que por estar altamente vascularizado puede diseminarse fácilmente a todo el cuerpo del pez (Ling *et al.*, 2001). La piel es una barrera

protectora más gruesa y compacta que las branquias o el intestino. Sin embargo, lesiones previas pueden facilitar la penetración epitelial o endocitosis del patógeno invadiendo al sistema sanguíneo y linfático (Spanggaard *et al.*, 2000; Olsson *et al.* 1996). La colonización del intestino puede ocurrir por el consumo de alimento o agua contaminado con el patógeno, en infección experimental por inmersión el intestino puede ser el primer órgano afectado (Bastardo, 2012; Méndez, 2012).

Al igual que otras enfermedades bacterianas septicémicas, *Y. ruckeri* causa hemorragia generalizada en los órganos externos e internos. Se ha observado tropismo tisular por yersiniosis en órganos hematopoyéticos, incluidos riñón anterior y posterior, hígado y bazo. Pero en las formas crónicas o agudas de Yersiniosis, se observaron cambios histopatológicos en otros órganos como el estómago, intestino, ciegos pilóricas, páncreas, vejiga natatoria, músculos del cuerpo y otros tejidos (Fadaeifard *et al.*, 2014; Zorriehzahra *et al.*, 2009).

#### **2.4.4 Respuesta inmune contra *Y. ruckeri***

Es importante conocer los mecanismos inmunológicos de los peces contra patógenos bacterianos, ya que es una herramienta que nos permite controlar y prevenir enfermedades futuras. Similar al mamífero pueden dividirse en sistema inmunitario innato o específico y sistema inmunitario adaptativo o inespecífico (Ellis, 1999; Toddbeck *et al.*, 2007)

Según Raida y Buchmann (2008) el sistema inmune específico es la primera barrera de protección contra yersiniosis. Los neutrófilos y los macrófagos están involucrados en la envoltura e internalización de las bacterias, matándolas mediante el proceso de la explosión respiratoria, también se ha observado una respuesta inflamatoria a *Y. ruckeri* en la cavidad corporal de la trucha arcoiris (Afonso, 1988; Neumann *et al.*, 2001). Además, los macrófagos también pueden producir óxido nítrico, que es un importante compuesto antibacteriano para *Y. ruckeri* (Campos-Pérez *et al.*, 2000).

Estudios de Niveles de expresión génica de los genes CXCd, citoquina, quimiocina, interleucina, receptor celular, inmunoglobulina, SCOS y CISH se han medido como resultado de la exposición con cepas *Y. ruckeri* biotipo 1 (Wiens, 2006; Chettri, 2011) y las cepas *Y. ruckeri* biotipo 2 utilizando técnicas cuantitativas por PCR en tiempo real (Wiens y Vallejo, 2010; Evenhius, 2012). Los descubrimientos recientes sugieren que la producción de anticuerpos específicos contra *Y. ruckeri* puede desempeñar un papel en la protección contra la enfermedad (Raida, 2011).

#### **2.4.5. Signos clínicos y hallazgos patológicos**

La yersiniosis en peces es una enfermedad septicémica que presenta la forma aguda y crónica. La forma aguda tiene más incidencia en la etapa de alevinaje y en periodos de aumento de temperatura de agua, a diferencia de la forma crónica que se da en peces de mayor edad. Como otras

septicemias bacterianas no hay signos clínicos específicos para esta enfermedad. Las hemorragias alrededor de la cavidad oral y signos patológicos a nivel intestinal llevaron a darle el nombre de Enfermedad Entérica de la Boca Roja, ERM (Enteric Redmouth Disease), aunque estos signos no son siempre evidentes (Tobback, 2007).

Presentan signos clínicos típicos de una enfermedad septicémica bacteriana, como hemorragias subcutáneas en toda la superficie del cuerpo, base de las aletas, línea lateral y cabeza. (Tobback, 2007; Avci y Birincioğlu, 2005; Şeker *et al.*, 2011). También pueden observarse hemorragias orbitales, que se ven como anillos hemorrágicos y pueden estar acompañados con exoftalmia (Zorriehzahra, 2017; Horne y Barnes 1999; Avci y Birincioğlu, 2005).

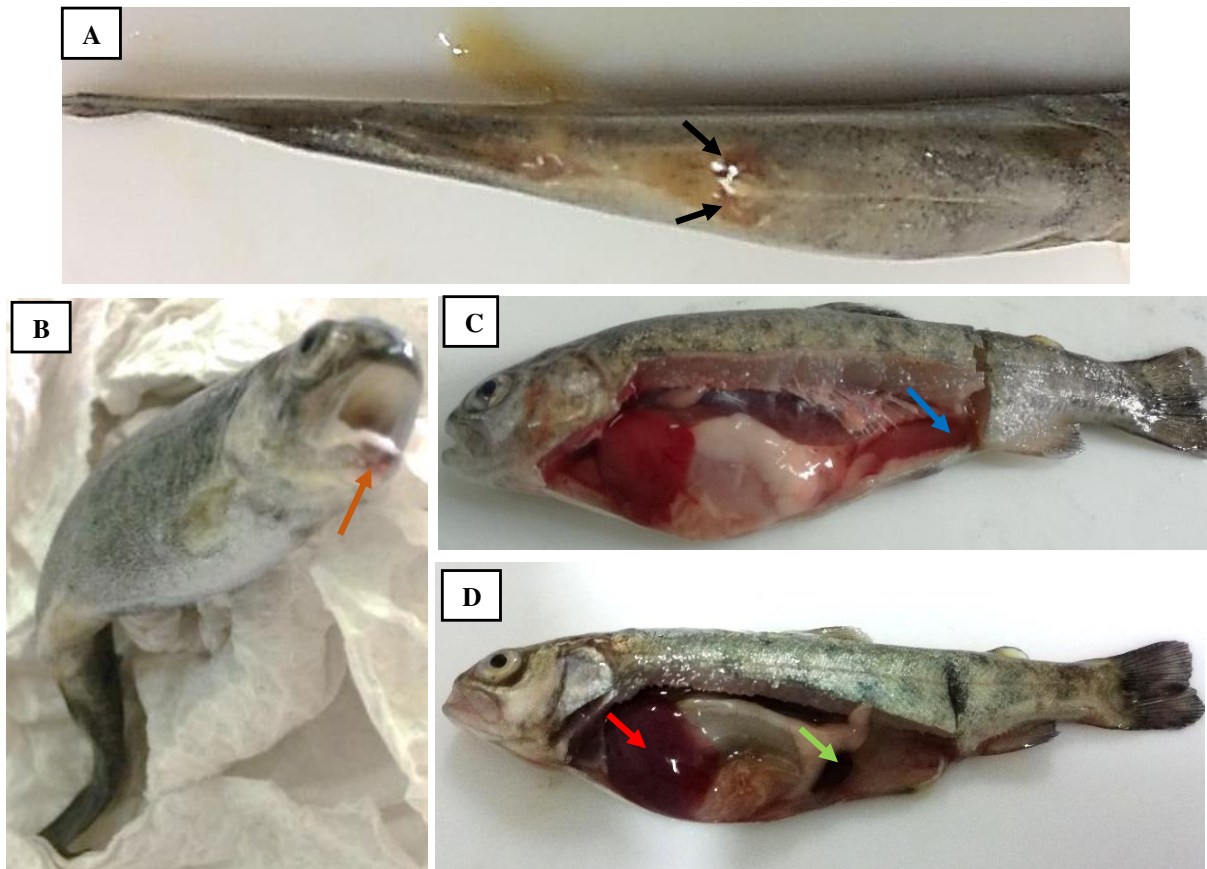
Además algunos signos observables reportados en diversos estudios fueron comportamiento letárgico, nado errático, inapetencia, anorexia, abdomen distendido, anorexia y oscurecimiento de piel (Carson y Wilson, 2002, Tobback, 2007; Şeker *et al.*, 2011; Woo y Bruno, 2011; Zorriehzahra, 2017). Şeker *et al.*, (2011) también consideró que la hemorragia del poro anal acompañado de prolapso anal, podría ser un signo específico de yersiniosis.

Las hemorragias petequiales internas a nivel superficial en musculatura lateral, hígado, , ciegos pilóricos, páncreas y vejiga natatoria , generalmente están presentes. El bazo, se observa de mayor tamaño y se torna más opaco. Hay una enteritis con acumulación de líquido espeso, opaco y purulento. El intestino posterior puede encontrarse hemorrágico y llenarse con un líquido amarillento opaco. (Horne y Barnes, 1999; Tobback, 2007).

Entre los hallazgos histopatológicos se describe una septicemia general con respuesta inflamatoria en la mayoría de órganos, particularmente en órganos vascularizados como son riñón, bazo, hígado, corazón y branquias (Rucker, 1966; Tobback, 2009). También es posible encontrar cambios histopatológicos en estómago, intestino, ciegos pilóricos, páncreas vejiga natatoria y músculo (Zorriehzahra *et al.*, 2009; Fadaeifard *et al.*, 2014).

En riñón puede estar afectado tanto la parte anterior como la posterior. Observándose congestión sanguínea, nefritis glomerular, túbulos renales degenerados y en regeneración, aumento de melanomacrófagos y hasta necrosis en ambas regiones (Horne y Barnes, 1999; Tobback, 2007; Tobback *et al.*, 2009; Woo y Bruno, 2011).

El hígado afectado puede presentar lipidosis de los hepatocitos, necrosis (Tinsley, 2010), en branquias, es notable encontrar edema, hiperemia, descamación de lamelas secundarias, hipotrofia e hiperplasia epitelial y lamelar (Adel *et al.*, 2014; Tobback, 2009).



**Figura 7.** Hallazgos patológicos de truchas arcoíris infectada experimentalmente con *Yersinia ruckeri*, 2018. A: hemorragias en base de aletas (flechas negras); B: Hemorragia en cavidad oral (flecha naranja); C: hemorragia en intestino posterior (flecha azul); D: Congestión hepática (flecha roja) con esplenomegalia (flecha verde)

#### 2.4.6 Diagnostico

Se han utilizado diferentes métodos de diagnóstico para *Yersinia ruckeri*, entre ellos están el aislamiento microbiológico, serología, perfil bioquímico, estudios de histopatología y técnicas de biología molecular (Kubilay y Timur, 2001; Altinok *et al.*, 2001; Bastardo *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015).

El aislamiento microbiológico es un método fenotípico tradicional que aún se emplea de manera rentable para diagnosticar infecciones por yersiniosis (Tinsley 2010; Austin *et al.*, 2003). Se toman muestras de bazo, corazón y preferiblemente riñón anterior, los cuales se pueden sembrar en medios de cultivos simples, como agar sangre, agar triptona y agar tripticasa de soya (TSA) incubándolos a 20-28°C durante 24 a 48 horas. Estos cultivos desarrollaran colonias blanquecinas

opacas características de *Yersinia ruckeri* con un diámetro de 2-3 mm (Tobback, 2007; Noga, 2010; Zorriehzahra, 2017). Así mismo, pueden crecer en agar Mac Conkey y xilosa lisina desoxicolato (XLD) o preferiblemente agar de desoxicolato de ornitina de ribosa (ROD), este último puede detectar yersiniosis en heces de peces portadores distinguiendo los biotipos 1 y 2, debido a las pocas colonias evidenciadas en la placa de cultivo (Tinsley, 2010). El medio shotts- waltman, es muy útil en los aislados de América del norte, es un medio selectivo basado en la hidrólisis positiva de Tween 80 y la fermentación negativa de sacarosa para este patógeno, pero no es tan eficaz en la identificación de aislados en otras áreas geográficas (Waltman y shotts, 1994; Austin y Austin 2007; Noga, 2010).

Este patógeno también puede identificarse utilizando características bioquímicas como el método de identificación API 20 E, la cual es usada de forma rutinaria con fines de identificación rápida (Tinsley, 2010). Sin embargo, se han producido problemas cuando analizan el biotipo 2 o nuevos biogrupos, además podría detectar falsos positivos con *Hafnia alvei* (De Grandis *et al.*, 1988; Austin *et al.*, 2003).

El diagnóstico por lesiones histopatológicas es un método de apoyo respecto a la falta de signos específicos de yersiniosis (Zorriehzahra, 2017). Diversos estudios determinaron cambios histopatológicos importantes como los ya mencionados anteriormente.

También puede detectarse eficazmente con procedimientos inmunológicos como ELISA, prueba de aglutinación y ensayo de inmunofluorescencia de anticuerpos indirectos (IFAT) (Smith, *et al.*, 1987; Woo y Bruno, 2011).

Las técnicas moleculares usadas incluyen el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Garcia *et al.*, 1998), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Saleh, 2008) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gibello *et al.*, 1999; Lejeune y Rurangirwa, 2000 Altinok, 2001).

La PCR es una prueba de diagnóstico simple y rápida basada en la amplificación selectiva de un fragmento de ADN del gen 16S rRNA de *Y. ruckeri* en tejidos de peces infectados o suspensiones bacterianas puras. Este método es más rápido y específico que el aislamiento microbiológico o API 20 E respectivamente. La duración de la técnica puede ser en promedio 8 horas en contraste con el aislamiento microbiológico que puede extenderse de 2 a 3 días (Gibello *et al.*, 1999)

Otros estudios determinaron mediante la técnica de qPCR, detectar niveles bajo de *Y. ruckeri* en muestras de heces fecales, siendo una alternativa no invasiva que sirve para la detección contra la yersiniosis asintomática (Ghosh *et al.*, 2018).

## 2.4.7. Prevención y control

### 2.4.7.1. Antibioterapia

El uso de agentes antimicrobianos se ha implementado en la acuicultura para el tratamiento de patógenos bacterianos desde hace varios años. Desafortunadamente, solo se usa limitados tipos de antibióticos de manera rutinaria, lo que posiblemente conllevó a facilitar la resistencia de antibiótico. (Kumar *et al.*, 2015). Los antibióticos usados con más frecuencia para controlar la yersiniosis en acuicultura son ácido oxolinico, oxitetraciclina, sulfametazina, cloranfenicol, sulfonamida potenciada (Bullock *et al.*, 1983) y más recientemente florfenicol (Michel, 2003).

Los microorganismos patógenos pueden ser transmitidos a través del agua. Por lo tanto, la desinfección es difícil o como en el medio marino, incluso imposible. Además, los efectos secundarios y los riesgos asociados con la quimioterapia redujeron el uso de antibióticos al uso terapéutico, e incluso a limitarlos (Gudding *et al.*, 2013).

Rucker (1966) describió los primeros tratamientos con sulfametazina durante 5 días, seguido de tres días de administración de cloranfenicol u oxitetraciclina. Posteriormente (Bullock *et al.*, 1983), uso una sulfonamida potenciada como tratamiento para casos experimentales y naturales en truchas arcoíris (*O. mykiss*) y salmon chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) con resultados efectivos. Por otro lado, Rodgers y Austin (1983) utilizaron ácido oxolínico para la profilaxis y el tratamiento de la yersiniosis en la trucha arcoíris.

Sin embargo, diversos estudios in vitro reportaron que *Y. ruckeri* desarrolla resistencia contra el ácido oxolínico, la oxitetraciclina y la sulfonamida potenciada (Rodgers, 2001). Así mismo, este microorganismo es resistente natural al antibiótico holomicina (Qin *et al.*, 2013).

### 2.4.7.2. Vacunación

Se ha desarrollado una vacuna de forma eficaz contra la yersiniosis en acuicultura, compuesta por células bacterianas muertas por formalina. Comercializada desde 1976, fue la primera enfermedad de peces en obtener una vacuna, estas pueden ser suministradas por inyección, vía oral, pulverización e inmersión; brindando niveles óptimos de protección (Bastardo, 2012). Palm *et al.*, (1998) comprobó que la vacunación via intraperitoneal (IP) proporciona mejores niveles de protección. Sin embargo, todavía se necesita investigación, particularmente en vista de la reducida eficacia contra los aislados de *Y. ruckeri* biotipo 2. (Tinsley, 2010)

El desarrollo de una vacuna bivalente con el uso de formalina biotipos inactivados 1 y biotipo 2 de *Y. ruckeri* que proporcionan una buena protección contra las cepas biotipo 2 en truchas arcoíris (*O. mykiss*) (Tinsley *et al.* (2011) y Deshmukh *et al.* (2012). En el Perú, se ha documentado una

vacuna compuesta por células bacterianas muerta contra *Y. ruckeri*, administrada por inmersión e IP demostrando tener buenos resultados en condiciones experimentales (Cueva, 2015). Recientemente, Marana *et al.*, (2019) desarrollo una vacuna multicomponente contra tres enfermedades bacterianas (yersiniosis, furunculosis, vibriosis) en condiciones experimentales. Demostrando que la vacuna produjo respuestas de anticuerpos específicos en truchas contra los diferentes antígenos bacterianos y expresión regulada de genes que codifican SAA, C3, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IgD y MHCII.

Otros estudios determinaron que el uso de vacunas vivas atenuadas contra patógenos bacterianos en peces brindó mayor protección que las bacterinas muertas utilizadas en la actualidad. La vacuna viva de *Y. ruckeri aroA* es un mutante atenuado, que ha demostrado ser eficaz en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Temprano *et al.*, 2005). Sin embargo, se debe tener cuidado en el uso de vacunas vivas porque puede facilitar la propagación de esta bacteria en ambientes acuáticos. Es necesario tener más estudios precisos de los peligros potenciales que pueda tener este tipo de vacunación (Vivas *et al.*, 2004).



### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Tiempo, lugar y tipo de estudio

El estudio de patogenicidad experimental, procesamiento y análisis de muestras se realizaron desde marzo hasta setiembre del 2018. La preparación del inóculo bacteriano, necropsias, procesamiento y análisis de muestras microbiológicas, histopatológicas y moleculares se llevaron a cabo en la Sección de Ictiopatología del Laboratorio de Embriología, Histología y Patología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Ubicada en el distrito de San Borja, Lima-Perú. La recepción, acondicionamiento y estudio de patogenicidad de las truchas se realizaron en la unidad de crianza experimental de dicha sección. El tipo de estudio realizado fue descriptivo, longitudinal, experimental y prospectivo.

#### 3.2 Animales de estudio, transporte, aclimatación y chequeo sanitario

Para el presente estudio se utilizaron 120 alevinos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) provenientes de una piscigranja localizado en la provincia de Canta, departamento de Lima, aparentemente sanos con antecedentes de estar libre de cualquier enfermedad. Los peces fueron traídos con 3 meses de edad, peso promedio de 7,5 g y longitud promedio de 8,6 cm. Las truchas fueron transportadas en dobles bolsas plásticas de polietileno con capacidad de 50 l, llenadas con 1/3 de agua y 2/3 de oxígeno artificial, posteriormente la bolsa fue sellada con doble liga en la parte superior y además en los extremos inferiores para que los peces no se introduzcan en esos vértices. Finalmente la bolsa con los peces fueron colocados en una caja de tecnopor con geles refrigerantes debajo de las bolsas para mantener la temperatura fría y oxigenación durante todo el recorrido, según los procedimientos de transporte de peces vivos recomendado por Berka (1986). Luego los peces fueron trasladados a la unidad de crianza experimental en un acuario de 500 l de capacidad previo acondicionamiento del agua y desinfección del área. Posteriormente, fueron aclimatados por 1 semana, durante ese periodo se analizaron 20 peces al azar para descartar la presencia de *Y.ruckeri* u otro patógeno, para esto se realizó la necropsia según la metodología de De los Monteros y Labarta (1988). Previa sedación con eugenol en inmersión a una dosis de 100 mg/ l (Ross y Ross, 2008) y posterior corte medular recomendado por la CCAC (2010).

Se colocó al pez en bandejas de plástico cerca a la flama del mechero de Bunsen, seguidamente se desinfectó externamente al espécimen con alcohol al 70 % y se cortó la aleta pectoral. Luego se colocó al espécimen sobre su lado derecho y se hizo una incisión con un bisturí en la zona inferior de la aleta cortada, después con una tijera estéril se cortó desde el punto de incisión hasta la zona dorsal (bordeando la zona opérculo) hasta encontrar cierta resistencia. De manera aséptica se hizo un corte a lo largo de la línea media ventral desde la altura de la línea pectoral hasta

el poro anal, seguido, se levantó la zona cortada con ayuda de pinzas para cortar la porción de pared corporal separándola de la masa visceral. Una vez expuesto los órganos de la cavidad abdominal se registraron las posibles lesiones encontradas y se realizó el aislamiento bacteriano a partir de riñón y bazo, con un ansa estéril se hizo la siembra mediante estrías en placas de agar tripticosa de soya (TSA) incubándolos a 24°C por 48 horas.

### 3.3 Manejo del sistema de crianza experimental

Para la recepción y mantenimiento de los peces se utilizó un acuario de 500 l de capacidad con su propio sistema para simular el ambiente de las truchas y para el estudio experimental se usó un sistema de recirculación de agua la cual conectaba a 5 acuarios con capacidad de 70 l cada una, estos últimos ubicados en fila de manera dependiente recirculando constantemente con los otros acuarios, equipados con un sistema de enfriamiento de agua, termómetros, filtros mecánicos y difusores de aire. Se alimentaron a los peces de acuerdo a su talla, peso y temperatura con una ración de 4.2 % de su peso vivo según el alimento comercial utilizado, por 3 veces al día. También, se evaluaron diariamente los parámetros físico-químicos del agua con un kit comercial antes y durante el experimento (cuadro 12).

Durante el estudio se utilizó alcohol al 70% para la desinfección de manos e hipoclorito de sodio para la limpieza de materiales de acuario (jarras, mallas, pediluvios, mangueras, entre otros), además se rotularon los instrumentos para cada acuario. Al término del estudio, se usó hipoclorito de sodio a una concentración de 6 g /l para la desinfección total de la instalación a fin de evitar la diseminación del agente (Thibaut ,2009).

Cuadro 12. Parámetros fisicoquímicos del agua utilizados en el sistema de crianza experimental y en el estudio de patogenicidad

Parámetro	Valor promedio
Temperatura	11 °C
Oxígeno disuelto	7,8 ppm
pH	7.7
Amonio	0,45 mg/l
Nitrito	0,010 mg/l
Dureza total	295 ppm

### **3.4. Preparación del inóculo bacteriano**

Se usó una cepa de *Y. ruckeri* proveniente de Puno con una mortalidad alta (>60%), aislada de bazo y riñón de alevinos de truchas arcoíris (*O. mykiss*) que presentan signos clínicos evidentes, confirmada por análisis microbiológico y molecular. Esta cepa fue preservada en glicerol al 30% mezclado con caldo de tripticasa de soya (TSB), ambas a la misma proporción. Mantenido en crioviales a una temperatura de congelación de -20 °C según lo recomendado por (Kumar *et al.*, 2013) adecuado para el laboratorio.

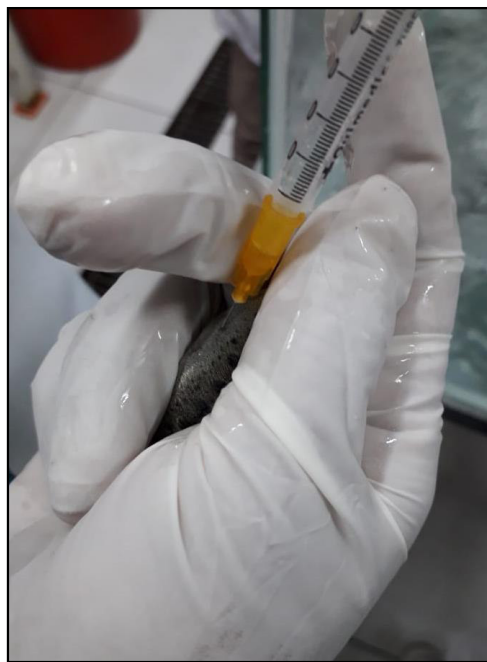
Para la reactivación bacteriana se retiró el criovial de congelación, se dejó descongelar a temperatura ambiente, seguidamente con el ansa en punta previamente flameada se transfirió la muestra bacteriana a caldo TSB incubando 48 horas a 24 °C para luego sembrar en agar tripticasa de Soya (TSA) incubado a las mismas condiciones. Posteriormente, se evidenció colonias bacterianas características de *Y. ruckeri*. Estas colonias se suspendieron en tampón de fosfato salino (PBS) hasta llegar a una concentración de  $1,2 \times 10^9$  UFC/ml según escala de Mc Farland. A partir de esta concentración se realizó diluciones decrecientes en base 10 para obtener los inóculos bacterianos.

### **3.5. Diseño experimental**

Los peces restantes se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales, con 20 peces por grupo, cuatro retados y un grupo control. Se sometieron a ayuno de 24 horas, seguidamente los peces fueron anestesiados en un acuario conteniendo agua y eugenol en inmersión a una dosis de 100 mg/l (Ross y Ross, 2008) durante aproximadamente 5 segundos hasta observar que el animal pueda ser manipulado. Luego se inoculó al grupo control PBS y a cada grupo retado una dilución sucesiva de la cepa de *Y. ruckeri* procedente de Puno a diluciones decrecientes de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  UFC/ml, medidas según la escala de Mc Farland (Cuadro 13). Se inyectó 0.1 ml de las diluciones bacterianas vía intraperitoneal (IP), en la línea media ventral entre las aletas pectorales, a una distancia equivalente al largo de las aletas pélvicas proyectadas cranealmente (Thibaut, 2009) usando jeringas de tuberculina. Por otro lado, los peces del grupo control fueron inoculados con PBS estéril. Cabe recalcar que los peces del grupo control fueron mantenidos en una fila distinta al de los grupos retados, sin compartir sistema de recirculación.

**Cuadro 13.** Distribución de grupos experimentales, diluciones bacterianas de *Y. ruckeri*, volumen inoculado y vía de administración.

<i>Grupo</i>	Número de peces	Inoculación	Volumen inoculado	Concentración UFC/ml	Dilución bacteriana/pez	Vía
<i>Control</i>	20	PBS	0.1 ml	-	-	IP
<i>T1</i>	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml	$1,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$ UFC	IP
<i>T2</i>	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$ UFC	IP
<i>T3</i>	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml	$1,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$ UFC	IP
<i>T4</i>	20	<i>Y. ruckeri</i>	0.1 ml	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$ UFC	IP



**Figura 8.** Método de inoculación bacteriana vía intraperitoneal

### 3.6 Evaluación de la patogenicidad

Se monitoreó diariamente a los peces post-inoculación de *Y. ruckeri* proveniente de Puno y se registraron los signos clínicos, lesiones externas e internas, % morbilidad y % mortalidad en un transcurso de 20 días.

### **3.7 Análisis microbiológico y molecular de *Yersinia ruckeri***

Los peces con mortandad reciente (lapso de 1 hora máximo) y sobrevivientes del estudio, fueron llevados al laboratorio para registrar posibles lesiones macroscópicas y realizar la necropsia según la técnica recomendada por Espinosa de los Monteros y Labarta (1988). Posteriormente, a partir de bazo y riñón, con un ansa estéril se hizo la siembra mediante estrías en placas de agar tripticasa de soya incubándolos a 24°C por 48 horas, aislándose e identificándose a las colonias presuntivas de *Y. ruckeri*, mediante características morfológicas, tinción Gram y pruebas bioquímicas convencionales.

Para confirmar la infección por *Y. ruckeri* se usó PCR convencional de las colonias bacterianas aisladas de bazo y riñón de todos los grupos desafiados (grupo T1, T2, T3, y T4) según el protocolo (Anexo 1).

### **3.8 Procesamiento histopatológico**

Para la evaluación de las lesiones histopatológicas producidas por las diluciones de *Y. ruckeri* procedente de Puno, se tomaron muestras de tejidos de riñón, bazo, intestino posterior, músculo, hígado y branquias de peces muertos y sobrevivientes del estudio. Todas las muestras fueron preservadas en formol al 10% para luego ser deshidratadas, aclaradas e incluidas en bloques de parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5-6µm de grosor con un micrótopo, estos se montaron sobre láminas portaobjetos, para teñirse con hematoxilina y eosina (H-E).

### **3.9 Análisis de datos de las lesiones histopatológicas**

Las lesiones histopatológicas fueron clasificadas por lesiones para cada órgano, según lo establecido por Reimschuessel *et al.* (1992) modificada por el laboratorio para anteriores estudios en truchas arcoíris, tal como se muestra en el ejemplo del cuadro 14. Estas lesiones fueron clasificadas de acuerdo al grado de afección según su extensión, los resultados se evaluaron estadísticamente usando análisis de frecuencia, con la finalidad de indicar el porcentaje de cada variable relacionado al total de la población.

**Cuadro 14.** Clasificación de la presencia de necrosis en riñón de acuerdo a severidad y extensión

<b>ÓRGANO: RIÑÓN</b>		
<b>GRADO</b>	<b>SEVERIDAD</b>	<b>EXTENSION</b>
<b>I</b>	Escasa presencia de necrosis	Multifocal, hasta 25% aproximadamente de toda la muestra.
<b>II</b>	Leve presencia de necrosis	Multifocal, por encima de 25% hasta 50% aproximadamente de toda la muestra.
<b>III</b>	Moderada presencia de necrosis	Difuso, por encima del 50% hasta 75% aproximadamente de toda la muestra.
<b>IV</b>	Severa presencia de necrosis	Difuso, por encima de 75% hasta aproximadamente el 100% de toda la muestra.

Fuente: Reimschuessel *et al.*, 1992

### **3.10 Consideraciones éticas**

La aplicación de eugenol para anestesia y sedación en peces es un método eficaz, seguro y de bajo costo para la toma de muestra, manejo y transporte en peces (Ross y Ross, 2008). Su uso en baños de inmersión como anestésico inicial hasta el punto de pérdida de equilibrio, seguida de un método físico como la sección medular para causar eutanasia es recomendado por la CCAC (2010).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Signos clínicos y Lesiones macroscópicas (internas y externas)

Los signos clínicos durante los 20 días del estudio (cuadro 15) iniciaron al 3 ° día , evidenciándose con mayor frecuencia melanosis (73.5 %), anorexia (60 %) y letargia (48.75%) para el grupo T4 y al 6 ° , 8 ° , 11 ° día post-infección para los grupos T3,T2 y T1 respectivamente. En cuanto a los signos de dilatación abdominal (41.25 %) y nado errático (37.5%) comenzaron al 6 ° día para el grupo T3 y T4, seguido al 11° día para los grupos T1 y T2. Por último la exoftalmia (7.5%) fue presentada en el 7° y 11 ° día post-infección sólo en el grupo T3 y T4 respectivamente (Cuadro 18).

Las lesiones macroscópicas (externas e internas) mas frecuentes encontradas a la necropsia, fueron hemorragia en base de las aletas, esplenomegalia, hemorragia en intestino posterior y hemorragia en cavidad oral. Seguido de hemorragia ocular, hemorragia en vejiga natatoria y congestión hepática con menor frecuencia. En el grupo C, no se registraron lesiones macroscópicas. En cuanto a signos clínicos solo se observó melanosis en un 60% (12/20) (Cuadro 16).

**Cuadro 15.** Frecuencia de signos clínicos en los diferentes grupos experimentales inoculados IP con cepas de *Y. ruckeri* procedente de Puno.

Signos clínicos	T1	T2	T3	T4	TOTAL CASOS	TOTAL ANIMALES	FRECUENCIA (%)
Melanosis	14	14	13	18	59	80	<b>73.75</b>
Anorexia	10	13	12	13	48	80	<b>60</b>
Letargia	3	8	14	14	39	80	<b>48.75</b>
Dilatación abdominal	7	7	6	13	33	80	<b>41.25</b>
Nado errático	3	9	8	10	30	80	<b>37.5</b>
Exoftalmia	0	0	2	4	6	80	<b>7.5</b>

**C: Control; T1: 1,2x10<sup>5</sup>; T2: 1,2x10<sup>6</sup>; T3: 1,2x10<sup>7</sup>; T4: 1,2x10<sup>8</sup> UFC/ml**

**Cuadro 16.** Frecuencia de lesiones macroscópicas (internas y externas) en los diferentes grupos experimentales inoculados IP con cepas de *Y. ruckeri* procedente de Puno.

<b>Lesión internas y externas</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>TOTAL CASOS</b>	<b>TOTAL ANIMALES</b>	<b>FRECUENCIA (%)</b>
Hemorragia en base de aletas	12	15	18	18	63	80	<b>78.75</b>
Esplenomegalia	10	14	16	20	60	80	<b>75</b>
Hemorragia en intestino posterior	10	9	10	10	39	80	<b>48.75</b>
Hemorragia en cavidad oral	0	2	7	12	21	80	<b>26.25</b>
Hemorragia ocular	0	2	9	10	21	80	<b>26.25</b>
Hemorragia en vejiga natatoria	1	3	3	7	14	80	<b>17.5</b>
Congestión hepática	0	3	3	4	10	80	<b>12.5</b>

**C: Control; T1: 1,2x10<sup>5</sup>; T2: 1,2x10<sup>6</sup>; T3: 1,2x10<sup>7</sup>; T4: 1,2x10<sup>8</sup> UFC/ml**

#### **4.2. Mortalidad**

Las mortalidades de las truchas arcoíris post-infección con *Y.ruckeri* para el grupo T4 empezaron al 5° día, diferenciándose de los grupos T3, T2 y T1 que fueron al 8°,12° y 15° día post-infección respectivamente.

Finalizado los 20 días de estudio, se registró una mortalidad del 100% solo para el grupo T4 hasta el décimo día, 30% para el grupo T3, 20% para el grupo T2 y 10 % para el grupo T1. No se registraron mortalidades en el grupo control C.

Además, con el registro de mortalidad se calculó la DL50 (dosis letal media) similar a la metodología que uso Meixner (2007), según el protocolo (Anexo 2).



**Cuadro 17.** Mortalidad de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) post- infección con la cepa *Y. ruckeri* inoculadas IP en los diferentes grupos.

Días post- infección	C	T1	T2	T3	T4
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	2
6	-	-	-	-	2
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	1	2
9	-	-	-	1	6
10	-	-	-	-	8
11	-	-	-	-	-
12	-	-	2	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	2	-	-	-
16	-	-	1	2	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	1	2	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
<b>TOTAL</b>	0	2	4	6	20
<b>MORTALIDAD</b>	<b>0%</b>	<b>10%</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>100%</b>

**C: Control; T1: 1,2x10<sup>5</sup>; T2: 1,2x10<sup>6</sup>; T3: 1,2x10<sup>7</sup>; T4: 1,2x10<sup>8</sup> UFC/ml**

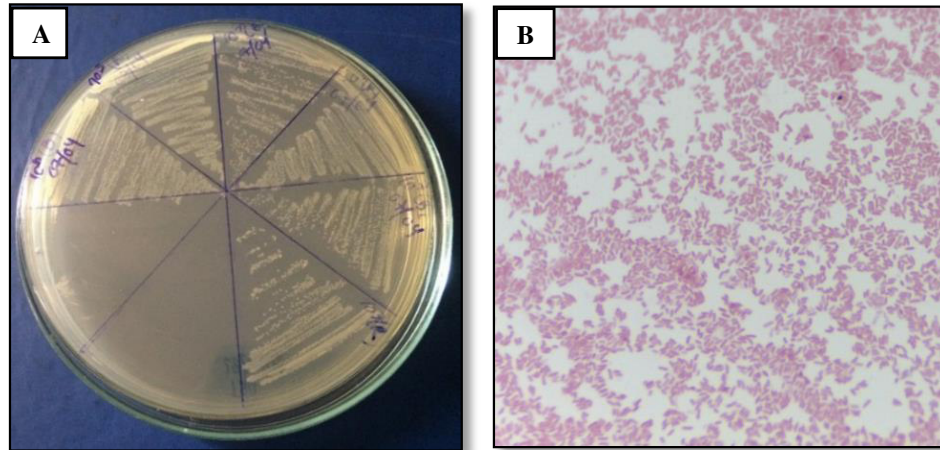
**Cuadro 18.** Morbilidad post- infección de los grupos experimentales con cepas de *Y. ruckeri* provenientes de Puno a diferentes dosis.

Días post-infección	C	T1	T2	T3	T4
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	4
4	-	-	-	-	4
5	-	-	-	-	5
6	-	-	-	2	3
7	-	-	-	4	4
8	-	-	4	3	-
9	-	-	7	3	-
10	-	4	2	2	-
11	-	2	2	3	-
12	-	2	2	3	-
13	-	-	1	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	1	-	-
17	-	-	1	-	-
18	-	3	-	-	-
19	-	3	-	-	-
20	-	2	-	-	-
<b>TOTAL</b>	0	16	20	20	20
<b>MORBILIDAD</b>	0%	80%	100%	100%	100%

**C: Control; T1: 1,2x10<sup>5</sup>; T2: 1,2x10<sup>6</sup>; T3: 1,2x10<sup>7</sup>; T4: 1,2x10<sup>8</sup> UFC/ml**

#### 4.3. Confirmación del análisis microbiológico y molecular

Las colonias bacterianas obtenidas mediante cultivo microbiológico de todos los peces muertos y sobrevivientes de los grupos retados (T1, T2, T3 y T4) presentaron morfología circular blanquecina opaca con un diámetro de 2-3 mm sugerente de *Y. ruckeri*. Se determinó que el microorganismo era bacilo Gramnegativo y las pruebas bioquímicas resultaron características de yersiniosis, tal como lo muestra la figura 9 y cuadro 19. Cabe resaltar que en el grupo C no se observó crecimiento de colonias bacterianas.

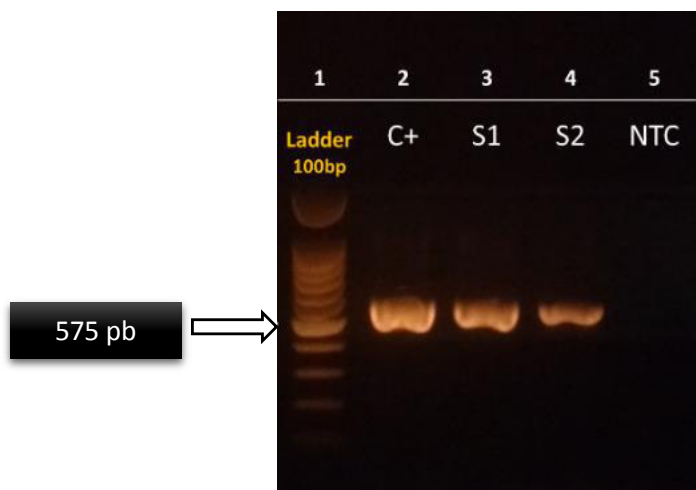


**Figura 9.** Características microbiológicas de una cepa de *Yersinia ruckeri* procedente de Puno, 2018. **A.** Colonias bacterianas aisladas de truchas infectadas experimentalmente con *Y. ruckeri*. **B.** Bacilo cortos Gramnegativo correspondientes a los aislados bacterianos

**Cuadro 19.** Características bioquímicas de una cepa de *Y. ruckeri* procedente de Puno

Prueba bioquímica	Resultado
<b>Producción de :</b>	
Oxidasa	-
Catalasa	+
H <sub>2</sub> S	-
Indol	-
Lisina descarboxilasa	+
motilidad	+
Test de rojo metilo	-
Reducción de nitrato	+
Reacción Voges- Proskauer	-
Urea	-
<b>Degradación de :</b>	
Glucosa	+
Lactosa	-
Sacarosa	-
Manitol	+
<b>Producción de ácido a partir de :</b>	
Esculina	-
ADN	-
Gelatina	+

Los resultados analizados por PCR convencional mostraron una banda positiva (banda de 575 pb) del genoma de *Y. ruckeri* obtenidas de colonias bacterianas aisladas de bazo y riñón de todos los grupos retados (grupo T1, T2, T3, y T4).



**Figura 10.** Bandas de electroforesis producto de PCR de aislados bacterianos de *Y. ruckeri*, 2018. Columna 1: Ladder 100 pb; columna 2: Control positivo; columna 3-4: Muestras positivas evidenciando la banda de 575 pb (S1 y S2); columna 5: control negativo (NTC)

#### 4.4. Lesiones histopatológicas

Se evaluaron 5 truchas por cada grupo experimental mediante análisis histopatológico. Con esta finalidad se colectaron los siguientes órganos por individuo: riñón, bazo, hígado, intestino posterior, músculo y branquias.

Las lesiones histopatológicas encontradas en hígado fueron degeneración grasa 92 % (23/25), infiltrado leucocitario 80% (20/25), presencia necrosis 80% (20/25), congestión 72% (18/25), hiperplasia de canalículos biliares 64% (16/25) y presencia de melanomacrófagos (10/25).

**Cuadro 20.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en hígado de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales

<b>Lesión/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
<b>Degeneración grasa</b>	3	5	5	5	5	<b>92</b>
<b>Infiltrado leucocitario</b>	0	5	5	5	5	<b>80</b>
<b>Necrosis</b>	0	5	5	5	5	<b>80</b>
<b>Congestión</b>	0	4	4	5	5	<b>72</b>
<b>Hiperplasia de canalículos</b>	0	4	3	4	5	<b>64</b>
<b>Presencia de melanomacrófagos</b>	1	2	3	1	3	<b>40</b>

**Cuadro 21.** Frecuencia relativa y absoluta de degeneración grasa en hígado en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	2	0	0	0	0
I	2	1	2	1	1
II	1	3	2	2	1
III	0	1	1	1	2
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
<b>%</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 22.** Frecuencia relativa y absoluta de infiltrado leucocitario en hígado en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
I	0	4	4	4	1
II	0	1	1	1	1
III	0	0	0	0	3
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
<b>%</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 23.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en hígado en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	0	0	0	0
I	0	3	1	1	0
II	0	2	4	3	3
III	0	0	0	1	2
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 25.** Frecuencia relativa y absoluta melanomacrófagos en hígado en los diferentes grupos experimentales

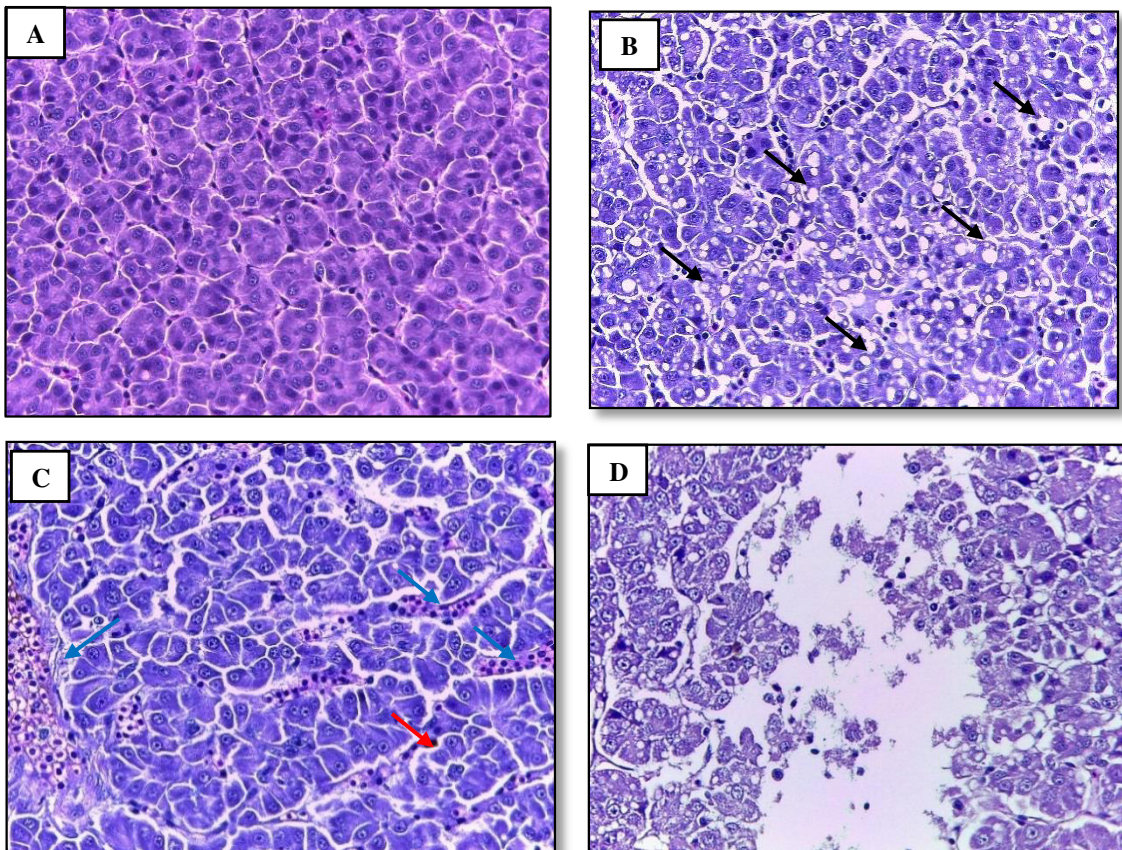
Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	4	3	2	4	2
Escaso	1	2	3	1	3
Leve	0	0	0	0	0
Moderado	0	0	0	0	0
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia	1/5	2/5	3/5	1/5	3/5
%	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>20</b>	<b>60</b>

**Cuadro 26.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en hígado en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	1	1	0	0
I	0	1	0	4	1
II	0	2	3	1	2
III	0	1	1	0	1
IV	0	0	0	0	1
Frecuencia	0/5	4/5	4/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 27.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia canalicular en hígado en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	1	2	1	0
I	0	2	2	3	4
II	0	1	1	0	1
III	0	1	0	1	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	4/5	3/5	4/5	5/5
%	0	80	60	80	100



**Figura 11.** Microfotografía Truchas arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri*. A: Hígado sin lesiones (grupo control). B: Degeneración grasa con evidencia de vacuolas de depósito graso (flechas negras). C: Presencia de melanomacrófagos (flecha roja) y congestión (flechas azules). D: severa necrosis de hepatocitos. H-E. 400X.



Las lesiones histopatológicas encontradas en bazo fueron presencia de melanomacrófagos en 92 % (23/25) congestión 44% (11/25), hiperplasia leucocitaria 25% (7/25), dilatación de vasos sanguíneos 20%(5/25), necrosis en 16%(4/25) y disminución linfoide en 12% (3/25).

**Cuadro 28.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en bazo de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5	Frecuencia (%)
Melanomacrófagos(CMM)	3	5	5	5	5	<b>92</b>
Congestión	0	1	3	3	4	<b>44</b>
Hiperplasia leucocitaria	0	0	2	2	3	<b>25</b>
Dilatación de vasos sanguíneos	0	0	2	1	2	<b>20</b>
Necrosis	0	0	1	1	2	<b>16</b>
Disminución linfoide	0	0	1	1	1	<b>12</b>

**Cuadro 29.** Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en bazo en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	2	0	0	0	0
I	3	3	4	1	1
II	0	2	0	3	2
III	0	0	1	1	2
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 30.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en bazo en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	4	2	2	1
I	0	0	0	0	0
II	0	1	3	2	0
III	0	0	0	1	2
IV	0	0	0	0	2
Frecuencia	0/5	1/5	3/5	3/5	4/5
%	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>80</b>



**Cuadro 31.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia leucocitaria en bazo en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	3	3	2
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	0	1	0
Moderado	0	0	2	1	2
Severo	0	0	0	0	1
Frecuencia	0/5	0/5	2/5	2/5	3/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>60</b>

**Cuadro 32.** Frecuencia relativa y absoluta de dilatación de vasos sanguíneos en bazo en los diferentes grupos experimentales

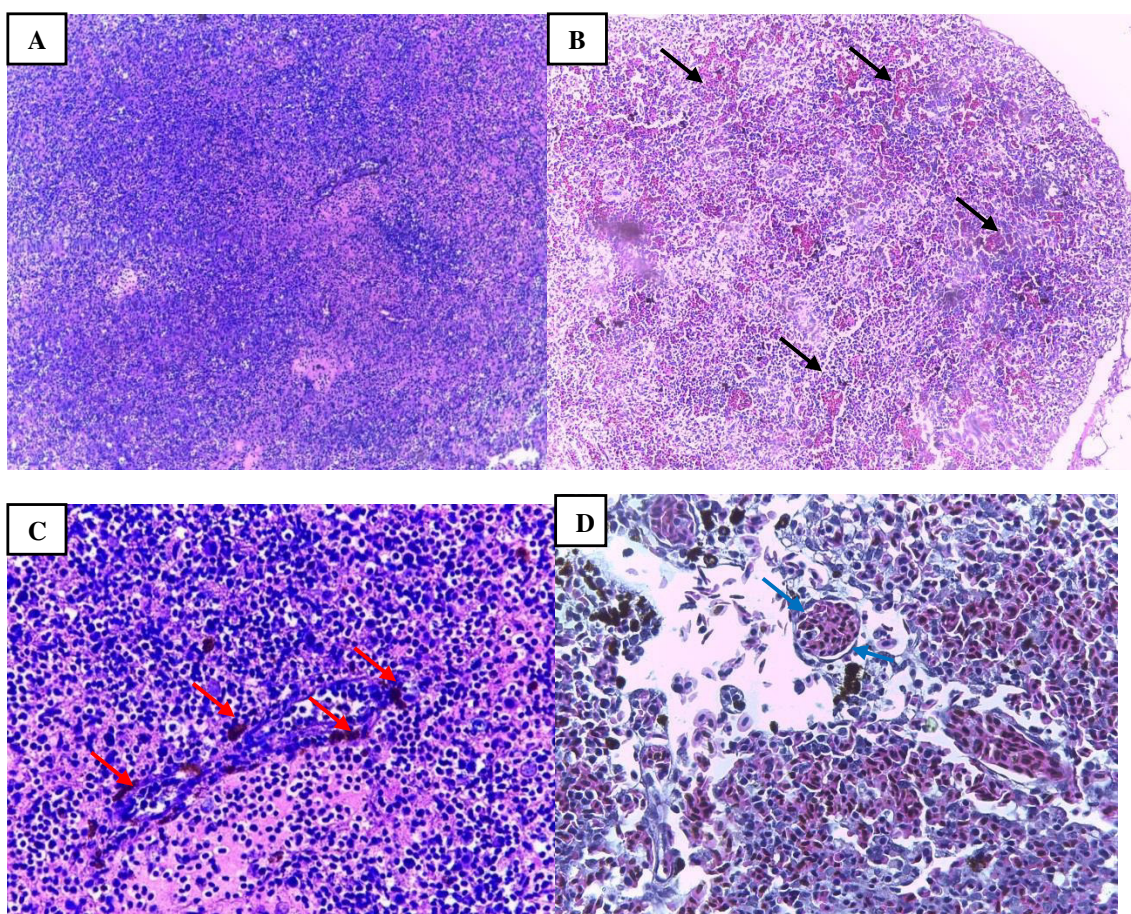
<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	3	4	3
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	2	0	0
Moderado	0	0	0	1	2
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	2/5	1/5	2/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

**Cuadro 33.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en bazo en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	4	4	3
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	0	1	0	0
Moderado	0	0	0	1	2
Severo	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	1/5	1/5	2/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

**Cuadro 34.** Frecuencia relativa y absoluta de disminución linfoide en bazo en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	5	1	1	1
I	0	0	0	0	0
II	0	0	1	1	1
III	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	1/5	1/5	1/5
%	0	0	20	20	20



**Figura 12.** Microfotografía de bazos de trucha arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri* A: Hiperplasia leucocitaria .B: Severa congestión esplénica (flechas negras). H-E. 100X C: Presencia de melanomacrófagos (flecha roja) D: Necrosis esplénica y dilatación de vasos sanguíneos (flechas azules). H-E. 400X.

Las lesiones histopatológicas encontradas en riñón anterior fueron presencia de melanomacrófagos en 96 % (24/25), gotas hialinas en epitelio tubular 80% (20/25), aumento de tejido linfoide 80 % (20/25), necrosis en 80%(20/25), congestión en 80 %(20/25) y túbulos regenerados en 72% (18/25).

**Cuadro 35.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en riñón anterior de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5	Frecuencia (%)
Presencia de melanomacrófagos	4	5	5	5	5	<b>96</b>
Gotas hialinas en epitelio tubular	0	5	5	5	5	<b>80</b>
Aumento de tejido linfoide	0	5	5	5	5	<b>80</b>
Necrosis	0	5	5	5	5	<b>80</b>
Congestión	0	5	5	5	5	<b>80</b>
Túbulos regenerados	0	3	5	5	5	<b>72</b>

**Cuadro 36.** Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	1	0	0	0	0
I	1	3	4	1	0
II	3	2	0	1	0
III	0	0	1	3	4
IV	0	0	0	0	1
Frecuencia	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 37.** Frecuencia relativa absoluta de gotas hialinas en epitelio tubular en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
I	0	1	2	0	1
II	0	3	0	1	1
III	0	1	3	3	3
IV	0	0	0	1	0
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 37.** Frecuencia relativa y absoluta de aumento de tejido linfoide en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
I	0	1	1	0	0
II	0	2	3	1	0
III	0	2	1	4	3
IV	0	0	0	0	2
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 38.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
I	0	4	0	0	0
II	0	1	2	1	0
III	0	0	3	4	4
IV	0	0	0	0	1
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

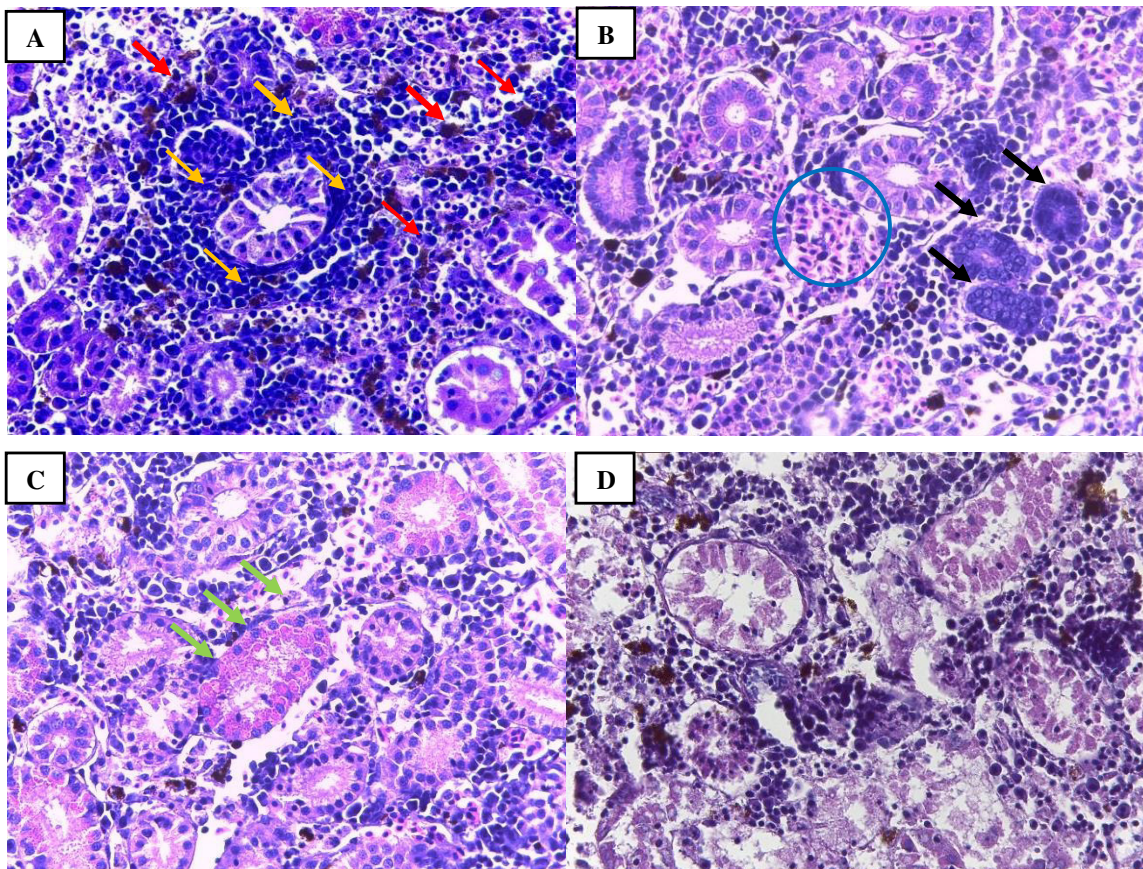
**Cuadro 39.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
I	0	3	3	2	0
II	0	2	1	1	1
III	0	0	1	1	3
IV	0	0	0	1	1
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 40.** Frecuencia relativa y absoluta de túbulos regenerados en riñón anterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
I	0	3	5	3	3
II	0	1	0	1	2
III	0	1	0	1	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>





**Figura 13.** Microfotografía de riñón anterior de trucha arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri*. A: Presencia de Melanomacrófagos (flechas rojas) e infiltración de tejido linfoide (flechas naranjas), B: Presencia de túbulos contorneados en regeneración (flechas negras) y congestión (circulo azul) flechas .C: presencia de gotas hialinas en los túbulos (flechas verdes). D: Severa necrosis tubular. H-E. 400X

A nivel intestinal las lesiones histopatológicas fueron hiperplasia de células caliciformes en 76%(19/25), hiperplasia de enterocitos en 60%(15/25), necrosis en 56%(20/25) y epitelio disgregado en 56%(14/25)

**Cuadro 41.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en intestino posterior de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5	Frecuencia (%)
Hiperplasia de células caliciformes	2	2	5	5	5	<b>76</b>
Hiperplasia de enterocitos	0	3	3	4	5	<b>60</b>
Necrosis	0	2	3	5	4	<b>56</b>
Epitelio disgregado	0	2	3	5	4	<b>56</b>

**Cuadro 42.** Frecuencia relativa y absoluta en hiperplasia de células caliciformes en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	3	3	5	5	5
I	2	2	2	2	2
II	0	0	2	3	2
III	0	0	1	0	1
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	2/5	2/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>40</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 43.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia de enterocitos en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	2	2	1	0
I	0	1	2	4	4
II	0	2	1	0	1
III	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	3/5	3/5	4/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>

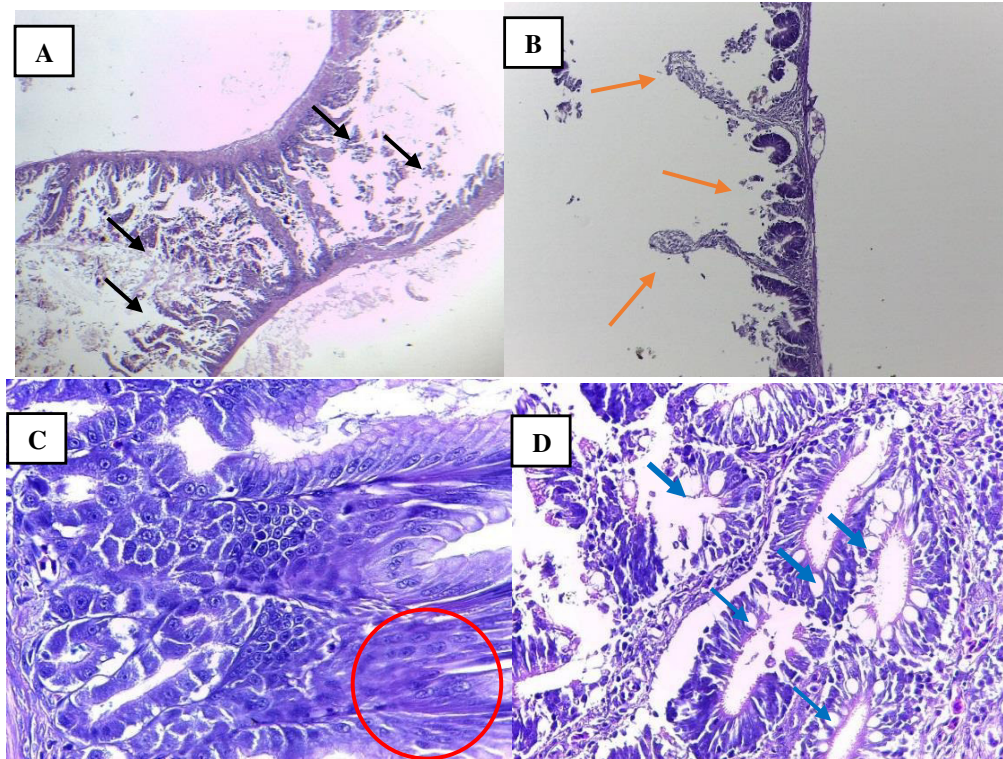
**Cuadro 44.** Frecuencia relativa y absoluta de necrosis en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	3	2	0	1
I	0	0	0	0	0
II	0	2	2	0	0
III	0	0	2	3	3
IV	0	0	1	2	1
Frecuencia	0/5	2/5	3/5	5/5	4/5
%	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>80</b>

**Cuadro 45.** Frecuencia relativa y absoluta de epitelio disgregado en intestino posterior en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	0	0	0	0
Escaso	0	0	0	0	0
Leve	0	2	2	3	1
Moderado	0	3	2	1	4
Severo	0	0	1	1	0
Frecuencia	0/5	2/5	3/5	5/5	4/5
%	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>80</b>





**Figura 14.** Microfotografía de intestino posterior de trucha arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri*. A: descamación epitelial (flechas negras) con moderada necrosis intestinal. H-E. 100X B: severa necrosis intestinal con rezagos de vellosidades (flechas naranjas) C: hiperplasia de enterocitos (círculo rojo). D: Hiperplasia de células caliciformes en vellosidades intestinales (flechas azules). H-E. 400X

En zonas musculares inoculadas se observaron las siguientes lesiones histopatológicas: necrosis en 16% (4/25), disgregación de fibras musculares en 12% (3/25), infiltración de células inflamatorias en 12% (3/25) y dilatación de vasos sanguíneos en 8% (2/25).

**Cuadro 46.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia en músculo de truchas arcoíris en diferentes grupos experimentales

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5	Frecuencia (%)
Necrosis	0	0	0	2	2	16
Disgregación de fibras musculares	0	0	0	1	2	12
Infiltración de células inflamatorias	0	0	0	1	2	12
Dilatación de vasos sanguíneos	0	0	0	1	1	8

**Cuadro 47.** Grado histopatológico y frecuencia relativa y absoluta de necrosis en músculo en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	5	5	3	3
I	0	0	0	1	1
II	0	0	0	1	2
III	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	5/5	2/5	2/5
%	0	0	0	80	80

**Cuadro 48.** Frecuencia relativa y absoluta de disgregación de fibras musculares en músculo en los diferentes grupos experimentales

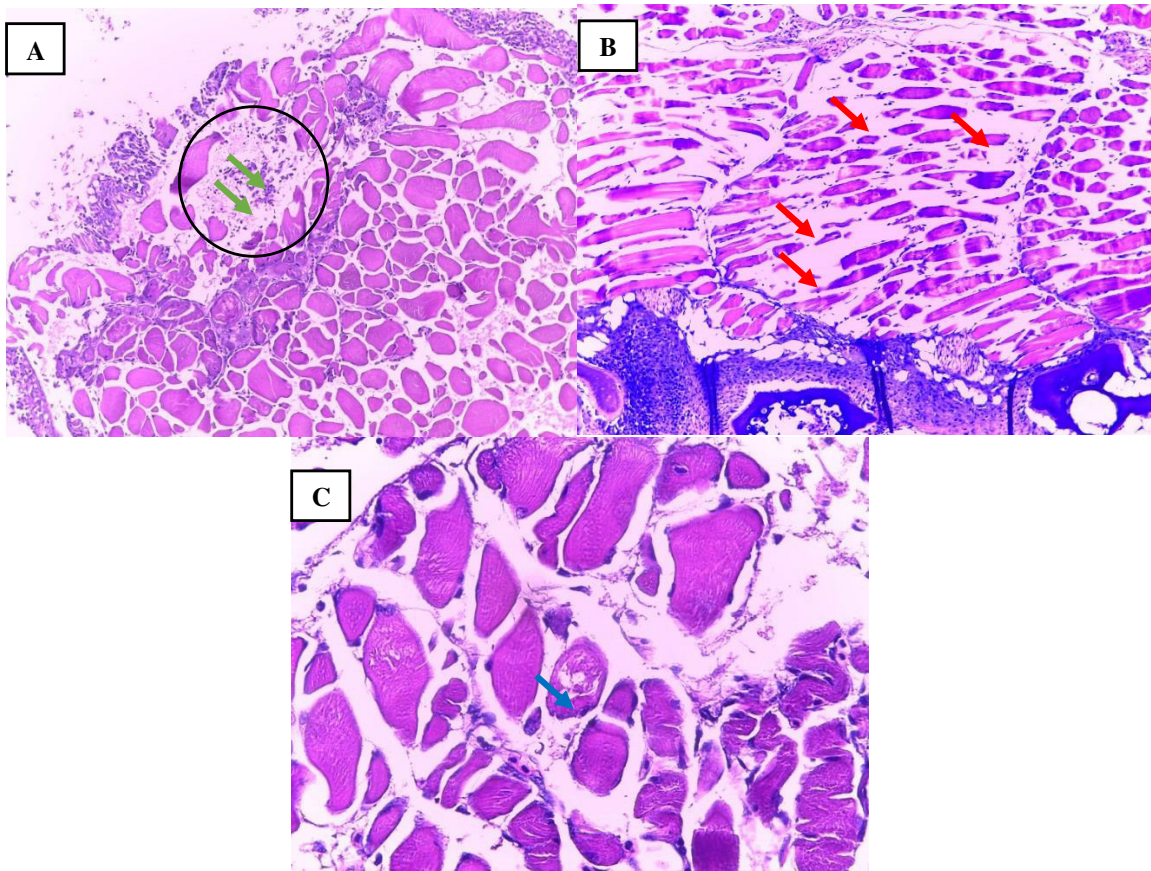
<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	5	4	3
I	0	0	0	0	2
II	0	0	0	1	1
III	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	1/5	2/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

**Cuadro 49.** Frecuencia relativa y absoluta de células inflamatorias en músculo en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	5	4	3
I	0	0	0	0	0
II	0	0	0	1	2
III	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	5/5	5/5	1/5	2/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

**Cuadro 50.** Frecuencia relativa y absoluta de dilatación de vasos en músculo en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	5	4	4
I	0	0	0	1	1
II	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>20</b>



**Figura 15.** Microfotografías de zonas musculares de trucha arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri*. A: Zona de necrosis muscular (circulo negro) rodeada de células inflamatorias (flechas verdes) B: Disgregación de fibras musculares (flechas rojas). H-E. 100X. C: Zona de necrosis muscular (flecha azul). H-E. 400X.

En branquias se observaron las siguientes lesiones histopatológicas: hiperplasia y fusión lamelar en 76% (19/25), congestión en 36% (9/25), telangiectasia en 12% (3/25), presencia de melanomacrófagos en 8% (2/25) e hiperplasia de células mucosas en 8% (2/25).

**Cuadro 51.** Alteraciones histopatológicas y frecuencia lamelar branquial de truchas arcoíris en los diferentes grupos experimentales

Lesión/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5	Frecuencia (%)
Hiperplasia y fusión lamelar	0	4	5	5	5	<b>76</b>
Congestión	0	2	2	2	3	<b>36</b>
Telangiectasia	0	0	0	1	2	<b>12</b>
Presencia de melanomacrófagos	0	0	0	1	1	<b>8</b>
Hiperplasia de células mucosas	0	0	0	0	2	<b>8</b>

**Cuadro 52.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia y fusión lamelar en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	1	0	0	0
I	0	3	4	3	0
II	0	1	1	1	1
III	0	0	0	1	4
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	4/5	5/5	5/5	5/5
%	<b>0</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Cuadro 53.** Frecuencia relativa y absoluta de congestión en branquias en los diferentes grupos experimentales

Grado/ Grupo experimental	C n=5	T1 n=5	T2 n=5	T3 n=5	T4 n=5
Normal	5	3	3	3	2
I	0	2	2	2	2
II	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	1
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	2/5	2/5	2/5	3/5
%	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>60</b>

**Cuadro 54.** Frecuencia relativa y absoluta de telangiectasia en branquias en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	5	5	5
I	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0
III	0	0	0	1	2
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>

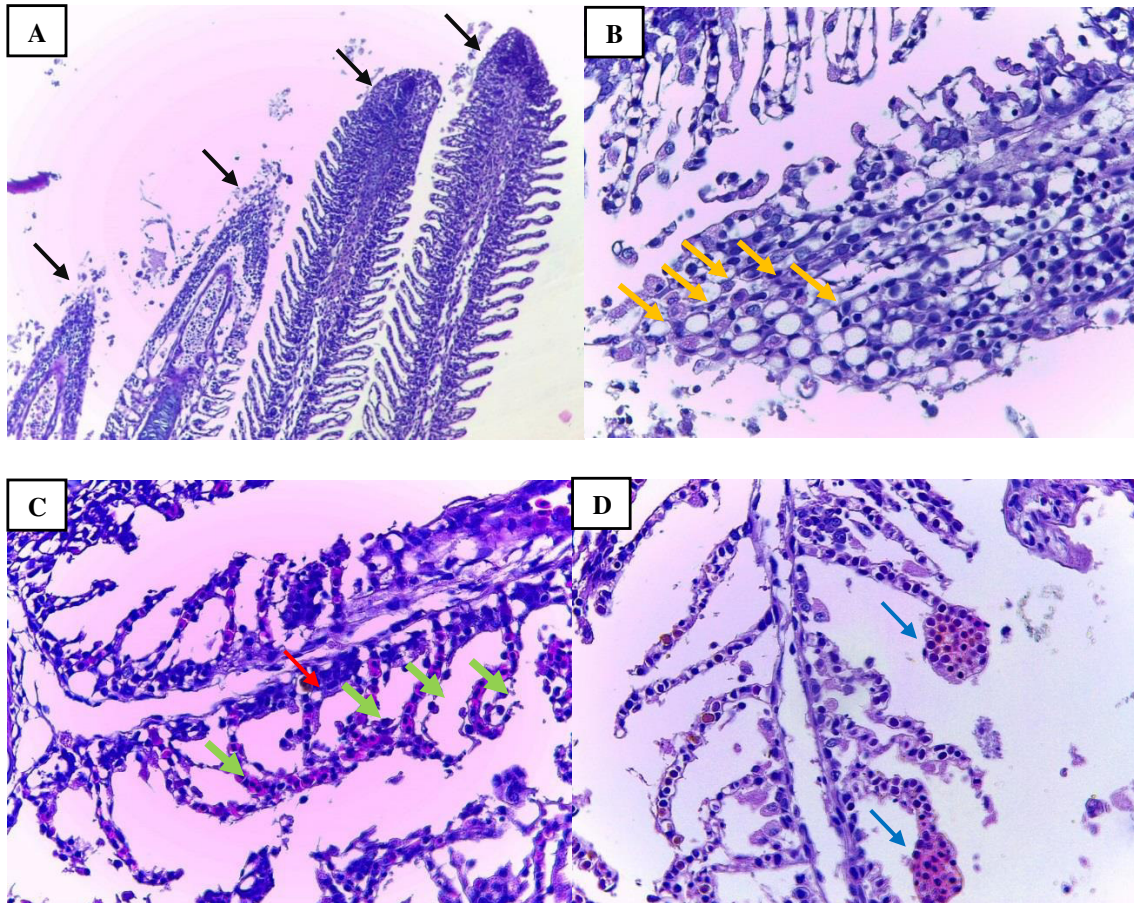
**Cuadro 55.** Frecuencia relativa y absoluta de melanomacrófagos en branquias en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	5	3	3
I	0	0	0	0	0
II	0	0	0	1	0
III	0	0	0	0	1
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Cuadro 56.** Frecuencia relativa y absoluta de hiperplasia de células caliciformes en branquias en los diferentes grupos experimentales

<b>Grado/ Grupo experimental</b>	<b>C n=5</b>	<b>T1 n=5</b>	<b>T2 n=5</b>	<b>T3 n=5</b>	<b>T4 n=5</b>
Normal	5	5	5	5	3
I	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	2
IV	0	0	0	0	0
Frecuencia	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5
%	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>40</b>





**Figura 16.** Microfotografías de branquias de trucha arcoíris desafiadas con *Y. ruckeri* (T4). A: Hiperplasia apical de lamelas en branquias con fusión lamelar (flechas negras) H-E. 100X. B: Hiperplasia de células mucosas (flechas naranjas). C: Presencia de melanomacrófagos (flecha roja) y congestión del epitelio lamelar (flechas verdes). D: Telangiectasia en el ápice lamelar (flechas azules). H-E. 400X.

## V. DISCUSIÓN

El estudio de cepas bacterianas locales que afectan a las principales especies acuícolas de producción es importante debido que al conocer la patogenicidad y distribución es posible tomar mejores acciones de mitigación y control de posibles brotes de una enfermedad. En este estudio, la cepa de *Y. ruckeri* aislada en alevinos de truchas enfermas ocasionó más del 60 % de mortalidad en la piscigranja de origen (Puno) y en condiciones experimentales, demostró signos clínicos y mortalidad característicos de yersiniosis.

Dentro de los signos clínicos observados, destacaron: melanosis, anorexia, letargia, dilatación abdominal, nado errático y exoftalmia, signos clínicos similares a los reportados por Cueva (2015) el cual evaluó una cepa de Ancash, Perú, con las mismas condiciones experimentales (Sandoval, datos no publicados). Posteriormente, Mesías (2017) reportó los mismos signos clínicos utilizando otra cepa local (Huaraz, Perú). En el estudio de Mesías (2017) se observaron a partir de las 12h post-infección, los primeros signos clínicos para el grupo G4 ( $4 \times 10^9$  UFC/ ml), difiriendo del presente trabajo la cual se presentó a partir de las 67h post-infección para el grupo T4 ( $1 \times 10^7$  UFC/ ml). Esto puede ser explicado debido a que en el trabajo mencionado usaron concentraciones bacterianas más elevadas para el último grupo diferenciándose del presente estudio. En cuanto al grupo de menor concentración bacteriana T1 ( $1 \times 10^4$  UFC/ ml) se observó en el día 10 post-infección a diferencia del estudio de Mesías (2017) la cual para G1 ( $1 \times 10^4$  UFC/ ml) fue en el día 3 post-infección. Akhlaghi *et al.* (2008), Tobback *et al.* (2009) y Şeker *et al.*, (2011), observaron signos clínicos similares en diferentes cepas de *Y. ruckeri* sin proporcionar datos del momento de aparición.

La anorexia fue el signo clínico con mayor presentación la cual podría asociarse a las hemorragias en intestino posterior evidenciadas causando falta de apetito progresivo. Esto signos también fueron reportados por Carson y Wilson (2002), Woo y Bruno (2011), Cueva (2015) y Mesías (2017).

La dilatación abdominal evidenciada por acumulación de líquido e inflamación intestinal fue demostrada también por Tobback (2007), Cueva (2015) y Mesías (2017). La natación errática presente en todos los grupos desafiados, posiblemente fue por encefalitis, semejante a lo reportado por Othani (2014) y Strøm *et al.*, (2018) quienes asociaron ese comportamiento a la detección de *Y. ruckeri* en cerebro. La exoftalmia fue observada en menor cantidad en los grupos de mayor



concentración bacteriana (grupos T3 y T4), y solo 2 peces del último grupo estaban acompañadas de hemorragia orbital, coincidiendo con lo encontrado por Avci y Birincioğlu (2005) y Mahjoor y Akhlaghi, (2012).

Rucker (1966) y Fuhrmann (1983) reportaron que la mortalidad en truchas arcoíris infectadas por vía IP con *Y. ruckeri*, se dio generalmente entre el quinto y décimo día post-infección. Otros estudios de similar metodología reportan la mortalidad por primera vez a los 6 días post-infección y una tasa máxima a los 9 días post infección (Busch y Ling, 1975). Mesías (2017) reportó la mortalidad en el día 2 post-infección en el grupo de mayor concentración bacteriana y en el de menor concentración en el día 7 post-infección. En el presente estudio, las mortalidades se presentaron por primera vez en el día 5 y finalizó 18 días post-infección alcanzando una tasa máxima en el día 10 post-infección, la cual difiere con este último estudio y se asemeja a los restantes descritos.

Las lesiones macroscópicas (internas y externas) de los grupos infectados con *Y. ruckeri* fueron inespecíficas, sin embargo, fueron características de una enfermedad septicémica bacteriana (Carson y Wilson, 2011). Principalmente fueron predominantes las hemorragias externas, como las evidenciadas en la base de las aletas, la cual estuvo presente en todos los grupos y fue la que presentó mayor incidencia, de manera similar a las reportadas también por Bastardo *et al.*, (2011); Mesías (2017). La hemorragia en cavidad oral, evidenció baja frecuencia en truchas con fase crónica en estudios realizados por Alvarez *et al.* (1992) y Troncoso *et al.* (1994), de manera similar a lo encontrado en este estudio.

En cuanto a lesiones internas, el bazo se observó más oscuro y con esplenomegalia, coincidiendo con lo reportado por Tobback, (2007), Avci y Birincioğlu, (2005), Cueva (2015) y Mesías (2017) que también inocularon vía intraperitoneal *Y. ruckeri*. Esto se puede explicar según Rucker (1966), Zorriehzaha *et al.*, (2009) y Fadaeifard *et al.*, (2014), debido a que este órgano hematopoyético tiene un tropismo tisular por *Y. ruckeri*. Por otro lado, las hemorragias vistas en este estudio son debidas a que *Y. ruckeri* presenta una metaloproteasa Yrp 1 que actúa hidrolizando proteínas de la matriz extracelular y muscular, causando alteraciones en la membrana y poros de los capilares sanguíneos, dando como consecuencia las hemorragias típicas de esta enfermedad, similar a lo determinado por Secades y Guijarro (1999) y Fernández (2003).

La congestión sanguínea presente en todos los grupos retados puede ser explicado a la pérdida de tejido hemopoyético causado por la necrosis, según lo reportado por Wobeser (1973); Tobback, (2009) y Woo y Bruno, (2011).

La presencia de gotas hialinas en el epitelio tubular en los grupos desafiados con *Y. ruckeri* podría ser por el proceso infeccioso sistémico que causa este patógeno, provocando la degeneración hialina de células epiteliales, la cual se observa como gránulos eosinofílicos de tamaño variable,

depositadas en citoplasma del tejido renal, así mismo, las lesiones en el túbulo pueden ser expresiones de daño en el glomérulo según Ferguson (2006), causando reabsorción del exceso de sustancias proteináceas filtradas por el glomérulo (Hibiya, 1982). Estos hallazgos fueron similares a los reportados por Cueva (2015) y Mesías (2017). Los túbulos en regeneración evidenciadas en todos los grupos retados, es posible observarlos en procesos infecciosos desafiados con *Y. ruckeri* similar a lo reportado por Tinsley *et al.*, (2011), Mahjoor y Akhlaghi (2012), Cueva (2015) y Mesías (2017), por otro lado Reimschuessel (2001) menciona que por ser animales jóvenes tienen mejor capacidad de regeneración tubular.

La degeneración grasa a nivel hepático fue el signo de mayor proporción y observada en todos los grupos. En el grupo C se evidencio de normal a leve, la trucha es una especie que soporta altos grados de lipidosis hepática y puede presentarse en animales sanos no considerándose patológico según Rosenthal (2013), sin embargo, también menciona que hay diferentes grados y el grado IV de degeneración grasa ya es patológico porque se acompaña de necrosis, haciendo al hígado de baja consistencia, muy pálido y las funciones pueden disminuir. Otros investigadores como Avcı y Birincioglu 2005, Tinsley *et al.*, 2011, demostraron en grupos de truchas retadas, leve a moderada lipidosis hepática mediante histopatología a partir del 13 día post-infección (forma crónica), lesión similar vista en los grupos T1, T2, T3 y T4, difiriendo de este estudio en el que se observó esta lesión en peces que murieron a los 9 días post-infección. Además, se puede presentar, posibles trastornos anémicos a causa de la acción de endotoxinas de *Y. ruckeri* y disminución del apetito, factores predisponente para causar lipidosis hepática (Jones y Hunt, 1990 y Lehman *et al.*, 1987; Halver, 1972) también presentes en los grupos retados. La separación de hepatocitos y congestión descritos es posible que sea causa de las vacuolas de depósito graso y la necrosis presentada en los grupos retados alterando la citoarquitectura normal del hígado.

En el tejido hepático también se evidenciaron en los grupos retados moderadas a severa necrosis focalizadas asociadas con infiltración de células mononucleares, coincidiendo con Furones (1993); Mahjoor y Akhlaghi (2012), Tinsley, (2010).

La descamación epitelial de la mucosa junto a la necrosis intestinal descrita en este trabajo en los grupos retados de mayor concentración bacteriana fueron similares a lo evaluado y determinado por Karatas *et al.*, (2004); Mahjoor y Akhlaghi (2012); Cueva (2015) y Mesías (2017). Esto se puede explicar a que *Y. ruckeri* es una Enterobacteria, la cual al ingresar al organismo del pez susceptible coloniza los enterocitos y mediante sus factores de virulencia produce lesión y necrosis de los mismos, causando enteritis necrótica y descamación de la mucosa hacia el lumen del intestino, impidiendo la absorción de los nutrientes y diarreas Tobback, (2009) y Woo y Bruno, (2011); Cueva (2015) y Mesías (2017).

En cuanto a nivel muscular, se evidencio lesiones como de escasa a leve necrosis asociados con infiltración de células inflamatorias solo en lo grupos de mayor concentración bacteriana (grupo III Y IV) y de menor proporción, difiriendo con Mesías (2017) y Cueva (2015), posiblemente por la vía de inoculación y concentración del inoculo bacteriano, ya que al penetrar en la musculatura los producto extracelulares (yrp1) de *Y. ruckeri* hidrolizan proteínas musculares según Secades y Guijarro (1999) y Fernández et al., (2003), causando una mayor lesión en la zona muscular con evidencias de disgregación en las fibras musculares y dilatación de vasos sanguíneos, comparada con la via IP aplicada en el presente trabajo.

Según Othani (2014) el tejido branquial es la vía de infección primaria para *Y. ruckeri*. En el presente estudio se evidencio hiperplasia con fusión de lamelas y congestión en todos los grupos retados con bacterias, coincidiendo con lo reportado por Avci y Birincioğlu (2005); el grupo C no evidencio lesión histológica, difiriendo a los estudios de Cueva (2015) y Mesías (2017) posiblemente debido a que la calidad del agua vistos en esos trabajos fueron adversas sugiriendo su relación con lesiones branquiales en los grupos no infectados. No siendo el caso de este estudio porque los parámetros fisicoquímicos del agua descritos en este trabajo fueron óptimos durante toda la investigación.

El aumento de melanomacrófagos descritos en bazo, riñón, hígado y branquias de los grupos desafiados puede estar relacionado al incrementando de la captación de antígenos, traduciéndose en depósitos marrones oscuros en teleósteos (Ferguson, 2006). En los grupos de mayor concentración, la melanosis fue más severa similar a lo reportado por Tobback *et al.*, (2009); Mahjoor y Akhlaghi (2012); Cueva (2015) y Mesías (2017). Cabe resaltar que también hubo presencia de melanomacrófagos en el grupo control; estos depósitos en el estroma del tejido hematopoyético del bazo, hígado y el riñón de salmónidos sanos fueron demostrados por Agius y Roberts (2003) y se explica porque los melanomacrófagos son células que conforman citoarquitecturalmente de manera normal esos tejidos (Takashima y Hibiya, 1995).

La virulencia de la cepa de *Y. ruckeri* estudiada en este trabajo se expresó en términos de dosis letal media (DL50). La DL50 ( $1 \times 10^{7.7}$  UFC/ml) de la cepa de Puno determinada en este trabajo fue poco menor a la descrita por la cepa de Huaraz estudiada por Cueva (2015), la cual fue  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Cabe resaltar que la dosis del presente estudio es similar a la reportada por Othani (2014) observándose mortalidad entre el día 3 y 12 post-infección, pero con la diferencia de que no fue por vía IP sino por inmersión. Además varias cepas de diferentes países evidenciaron menor dosis de inoculación bacteriana o DL50, entre ellos. Tinsley (2010) reportó que dosis de  $1 \times 10^4$  UFC/ml provocaron mortalidades entre 80-100% en el día 7 post-desafío. Otros trabajos reportan DL50 de

entre  $9.5 \times 10^3$  a  $9 \times 10^6$  UFC/ml (Romalde *et al.*, 1993),  $3.1 \times 10^2$  a  $6.3 \times 10^3$  UFC/ml (Fouz *et al.*, 2006) y  $5 \times 10^5$  UFC/ml (Raida y Buchmann, 2008). Las diferencias en el procedimiento experimental y ruta de infección pueden mostrar una variabilidad de la DL50 comparadas con estudios de diferente metodología (Bastardo, 2012).

## VI. CONCLUSIONES

1. La cepa de *Y. ruckeri* proveniente de Puno inoculada por vía IP a bajas dosis en condiciones experimentales presenta patogenicidad, causando elevada mortalidad, signos clínicos y lesiones característicos de yersiniosis en tejidos de truchas arcoíris.
2. La enfermedad de yersiniosis puede ser reproducida en alevinos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con un peso de 8-10 g, mediante inoculación IP.
3. La DL50 determinada para alevinos de truchas arco iris (*O. mykiss*) de peso promedio de 7,5 g y longitud promedio de 8,6 cm inoculadas IP con la cepa de *Y. ruckeri* procedente de Puno a diferentes dosis fue de  $10^{7,7}$  UFC/ml.

## VII. LITERATURA CITADA

1. **Adel M, Pourgholam R, Zorriehzahra R, Ghiasi M. 2014.** The effects of different levels of *Mentha piperita* on growth performance, body composition, intestinal bacteria and survival rate of *Oncorhynchus mykiss* in expose of *Yersinia ruckeri*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 24(1): 37-47.
2. **Afonso A, Lousada S, Silva J, Ellis AE, Silva MT. 1998.** Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. Dis Aquat Organ 34:27–37.
3. **Agius C, Roberts RJ. 2003.** Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. Journal of fish diseases 26(9): 499-509.
4. **Akhlaghi MM, Sharifi YH. 2008.** Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 9(4): 347-352.
5. **Altinok I, Grizzle JM, Liu Z. 2001.** Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. Dis Aquat Org 44:29-34
6. **Arias CR, Olivares-Fuster O, Hayden K, Shoemaker CA, Grizzle JM, Klesius PH. 2007.** First report of *Yersinia ruckeri* biotype 2 in the U.S.A. J Aquat Anim Health 19:35–40.
7. **Arregui L. 2009.** El cultivo de truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Madrid. cuaderno de acuicultura. 103 p.
8. **Austin B, Austin DA. 2007.** Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish (4th Ed.). Springer Praxis.Godalming, UK.
9. **Austin DA, Robertson PAW, Austin B. 2003.** Recovery of a new biogroup of *Yersinia ruckeri* from diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Systematic and Applied Microbiology 26(1): 127-131.
10. **Avci H, Birincioğlu SS. 2005.** Pathological Findings in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Experimentally Infected with *Yersinia ruckeri*. Turk J Vet Anim Sci. 29(6): 1321-1328.
11. **Bastardo A, Sierralta V, León J, Ravelo C, Romalde JL. 2011.** Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. Aquaculture 317: 229-232.

12. **Bastardo A. 2012.** Estudio polifásico del patógeno de peces *Yersinia ruckeri*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Filosofía: Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela. 302 p.
13. **Berka R. 1986.** The transport of live fish. A review. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations 48: 52 p.
14. Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*. 22: 25-34.
15. **Bravo S, Kojagura V. 2004.** First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Peru. *Bull. Eur Ass Fish Pathol* 24(2): 104-108.
16. Bueno H. 2012. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas de *Oncorhynchus mykiss*, del Centro Piscícola “El Ingenio” – Huancayo. Tesis de Grado de Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 75p.
17. **Bullock GL, Maestrone G, Starliper C, Schill B. 1983.** Potentiated sulphonamide therapy of enteric redmouth disease. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40: 101-102
18. **Busch RA, Ling AJ. 1975.** Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 32: 2429-2432.
19. **Campos-Pérez JJ, Ellis AE, Secombes CJ. 2000.** Toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to bacterial pathogens of fish. *Dis Aquat Organ* 43:109-115
20. **Carson J, Wilson T. 2009.** Yersiniosis in fish. *Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure*, 1-19.
21. **CCAC. Canadian Council on Animal Care. 2010.** CCAC guidelines on: euthanasia of animals used in science. 32 p.
22. **Chettri JK, Raida MK, Kania PW, Buchmann K. 2012.** Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*. *Dev Comp Immunol* 36:463–474.
23. **Choquehuayta H. 2008.** Puno. Manual de crianza de truchas en estanques y lombricultura. Proyecto Corredor Puno-Cusco. 91 p.
24. **Coquet L, Cosette P, Junter GA, Beucher E., Saiter JM., Jouenne T. 2002.** Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 26(4): 373-378.

25. **Cueva A. 2015.** Eficacia de dos métodos de administración de una vacuna contra *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de médico veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 85 p.
26. **Davies RL, Frerichs GN. 1989.** Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. J Fish Dis 12: 357-365.
27. **Davies RL. 1990.** O-Serotyping of *Yersinia ruckeri* with special emphasis on european isolates. Veterinary Microbiology 22: 299-307.
28. **Davies RL. 1991.** Outer membrane protein profiles of *Yersinia ruckeri*. Veterinary Microbiology 26: 125-140.
29. **De Grandis SA, Flett DE, Stevenson, RM. 1988.** Deoxyribonucleic-acid relatedness of serovars of *Yersinia-ruckeri*, the enteric redmouth bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 38:49- 55.
30. **De Keukeleire S, De Bel A, Jansen Y, Janssens M, Wauters G, Piérard D. 2014.** *Yersinia ruckeri*, an unusual microorganism isolated from a human wound infection. New microbes and new infections 2(4):134-135.
31. **De la Oliva G.2011.** Manual de buenas prácticas de producción acuícola en el cultivo de trucha arco iris. Huancayo. Perú. 58 p.
32. **Deshmukh S, Raida MK, Dalsgaard I, Chettri JK, Kania PW, Buchmann K. 2012.** Comparative protection of two different commercial vaccines against *Yersinia ruckeri* serotype O1 and biotype 2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet Immunol Immunopathol 145:379-385.
33. **Dulin MP, Huddleston T, Larson RE, Klontz GW. 1976.** Enteric redmouth disease. University of Idaho, Wildlife and Range Science, Bulletin N° 16. 15 p.
34. **Ellis AE. 1999.** Immunity to bacteria in fish. Fish and Shellfish Immunology 9: 291–308.
35. **Espinosa de los Monteros J, Labarta U. 1988.** Patología en acuicultura. Industrias graficas España SL Madrid. 550 p.
36. **Evenhuis JP, Cleveland BM .2012.** Modulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal immune gene expression following bacterial challenge. Fish Shellfish Immunol 146:8–17.
37. **Ewing EW, Ross AJ, Brenner DJ, Fanning GR. 1978.** *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. Int J Syst Bacteriol 28:37–44.
38. **Fadaeifard F, Sharifzadeh A, Raiss, M, Mazrooi H, Safari S, Moumeni M. 2014.** Molecular identification of *Yersinia ruckeri* isolates by polymerase chain reaction test in



- rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). European Journal of Experimental Biology 4(1): 1–4.
39. **FAO. 2005.** Programa de información de especies acuáticas. *Oncorhynchus mykiss*. Roma. [Internet], [2 agosto 2018]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus\\_mykiss/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es)
  40. **FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2018.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma. 233 p.
  41. **Farmer J, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury, MA, Fanning GR. 1985.** Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. Journal of clinical microbiology 21(1): 46-76
  42. **Ferguson HW. 2006.** Systemic pathology of fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease (No. V609 FERs). 368 p.
  43. **Fernández L, Lopez JR, Secades P, Menendez A, Marquez I, Guijarro JA. 2003.** In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. Appl. Environ. Microbiol 69(12): 7328-7335.
  44. **FishStatJ. 2017.** Estadísticas mundiales de pesca y acuicultura de la FAO.
  45. **Flores D. 2013.** Determinación de la diversidad fenotípica de *Yersinia ruckeri* en aislados de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo de las regiones de Junín, Ancash y Huancavelica. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 66p.
  46. **FONDEPES. 2014.** Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales. 1a ed. Lima: EINS Perú. 88 p.
  47. **Fouz B, Zarza C, Amaro C, 2006.** First description of non-motile *Yersinia ruckeri* serovar I strains causing disease in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), cultured in Spain. Journal of fish diseases 29(6): 339-346.
  48. **Frerichs GN. 1984.** Isolation and identification of fish bacterial pathogens. Institute of Aquaculture, University of Stirling.
  49. **Fuhrmann H, Bohm KH, Schlotfeld HJ. 1983.** An outbreak of enteric red mouth disease in West Germany. J Fish Dis 6: 309-311.
  50. **Furones MD, Rodgers CJ, Munn CB. 1993.** *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. Annual Review of Fish Diseases 3: 105-125.
  51. **Garcia JA, Dominguez L, Larsen JL, Pedersen K. 1998.** Ribotyping and plasmid profiling of *Yersinia ruckeri*. Journal of Applied Microbiology 85(6): 949–955.

52. **Ghosh B, Crosbie PB, Nowak BF, Bridle AR. 2018.** A highly sensitive, non-invasive qPCR-based strategy for direct quantification of *Yersinia ruckeri* in fish faeces. *Journal of fish diseases* 41(9): 1421-1428.
53. **Gibello A, Blanco MM, Moreno MA, Cutuli MT, Domenech A, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF. 1999.** Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Appl Environ Microbiol* 65:346–350.
54. **Gibello A, Porrero MC, Blanco MM, Vela AI, Liebana P, Moreno MA, Fernandez-Garayabal JF, Dominguez L. 2004.** Analysis of the Gyra gene of clinical *Yersinia ruckeri* isolates with reduced susceptibility to quinolones. *Appl and Environ Microbiol* 70: 599-602.
55. **Green M, Austin .1983.** The identification of *Yersinia ruckeri* and its relationship to other representatives of the Enterobacteriaceae. *Aquaculture* 34: 185-192.
56. **Gudding R, Van Muiswinkel WB. 2013.** A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & shellfish immunology* 35(6):1683-1688.
57. **Halver J. 1972.** Fish nutrition. Academic Press New York.
58. **Horne MT, Barnes AC. 1999.** Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections*. CABI Publishing, Wallingford 445–477.
59. **Hunter VA, Knittel MD, Fryer JL. 1980.** Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases* 3(6): 467-472.
60. **Jones T, Hunt R. 1990.** *Patología Veterinaria*. 5ta ed. Ed. Lea & Febiger.
61. **Karatas S, Candan A, Demircan D. 2004.** Enteric red mouth disease in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on the black sea coast of Turkey.
62. **Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG, Sulakvelidze A, Stine, OC. 2005.** Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J of Clin Microbiol* 43(6): 2674-2684.
63. **Kubilay A, Timur G. 2001.** Determination of antibody production by IFAT and ELISA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunized by *Yersinia ruckeri* bacterin. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 25: 437–445.
64. **Kumar G, Menanteau-Ledouble S, Saleh M, El-Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary research*. 46(1):103.
65. **Kumar S, Kashyap PL, Singh R, Srivastava AK. 2013.** Preservation and maintenance of microbial cultures. In *Analyzing Microbes* (pp. 135-152). Springer, Berlin, Heidelberg.

66. **Lehman J, Sturenberg FJ, Mock D. 1987.** The changes in haemogram of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) to an artificial and natural challenge with *Yersinia ruckeri*. *J Appl Ichthyol* 3: 174-183.
67. **Lejeune JT, Rurangirwa FR. 2000.** Polymerase chain reaction for definitive identification of *Yersinia ruckeri*. *J Vet Diagn Invest* 12: 558-561.
68. **Llewellyn LC. 1980.** Bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *J Fish Dis* 3: 29-39.
69. **López J. 2012.** Identificación de biotipos de *Yersinia ruckeri* aisladas en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa juvenil procedentes de dos piscigranjas de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 50 p.
70. **Mahjoor AA, Akhlaghi M. 2012.** A pathological study of rainbow trout organs naturally infected with enteric redmouth disease. *Asian Journal of Animal Sciences* 6(3): 147-153.
71. **Mamani D. 2016.** Evidencia de *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivo de balsa jaula en el Lago Titicaca en el distrito de Pomata Departamento de Puno (Perú). Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura. Santiago: Universidad de Chile. 61 p.
72. **Marana MH, Sepúlveda D, Chen D, Al-Jubury A, Jaafar RM, Kania PW, Buchmann K. 2019.** A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture. *Fish & shellfish immunology*.
73. **McArdle JF, Dooley Martin C. 1985.** Isolation of *Yersinia ruckeri* type I (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus* (L). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 5: 10-11.
74. **McDaniel DW. 1971.** Hagerman redmouth. *American Fishes U.S. Trout News* 15: 14-28.
75. **Meixner D. 2007.** Determinación de la dosis letal 50 (DL50) de una cepa nacional de *flavobacterium psychrophilum* en trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*) Tesis de Médico veterinario. Valdivia: Universidad austral de Chile. 33 p.
76. **Méndez J. 2012.** *Yersinia ruckeri*: genes relacionados con la virulencia y progresión del proceso infeccioso. España: Universidad de Oviedo. 195p.
77. **Mesías F. 2017.** Patogenicidad de una cepa móvil de *Yersinia ruckeri* procedente de Huaraz en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis de médico veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
78. **Michel C, Faivre B, Kinkelin P. 1986.** A clinical case of enteric redmouth in minnows (*Pimephales promelas*) imported in Europe as baitfish. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 6: 97-99.
79. **Michel C, Kerouault B, Martin C. 2003.** Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: Comparison of minimum inhibitory

- concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J Appl Microbiol* 95:1008-1015.
80. **Miranda. 2017.** PESCA Y ACUICULTURA PARA EL CONSUMO HUMANO EN EL PERÚ: *PRESENTE Y FUTURO* [Internet]. Disponible en: <http://www2.sni.org.pe/downloads/simposiopesca2017.pdf>
  81. **Municipalidad distrital Ragash. 2009.** Perú. Manual de Crianza de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). 25 p.
  82. **Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M. 2001.** Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 807-825.
  83. **Noga EJ. 2010.** Fish disease: diagnosis and treatment. 2da ed. John Wiley & Sons. 519 p.
  84. **Ohtani M, Villumsen KR., Strøm HK, Raida MK. 2014.** 3D visualization of the initial *Yersinia ruckeri* infection route in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by optical projection tomography. *PLoS One* 9(2): e89672.
  85. **Özdemir F, Arslan S. 2015.** Genotypic and phenotypic virulence characteristics and antimicrobial resistance of *Yersinia* spp. isolated from meat and milk products. *Journal of food science* 80(6): M1306-M1313.
  86. **Palm R, Landolt, ML, Busch RA. 1998.** Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, 157-166.
  87. **PRODUCE. 2018.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. Lima: PRODUCE. Informes anual estadístico. 200 p.
  88. **PROMPERÚ. 2017.** Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero y acuícola. Perú: Coordinación General de Pesca y Acuicultura. Informe anual estadístico. 85 p.
  89. **Qin Z, Baker AT, Raab A, Huang S, Wang T, Yu Y, Jaspars M, Secombes CJ, Deng H .2013.** The fish pathogen *Yersinia ruckeri* produces holomycin and uses an RNA methyltransferase for self-resistance. *J Biol Chem* 288:14688–14697.
  90. **Raida MK, Buchmann K. 2008.** Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 533-541.
  91. **Raida MK, Nylén J, Holten-Andersen L, Buchmann K. 2011.** Association between plasma antibody response and protection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *PLoS One* 6:e18832.

92. **Reimschuessel R, Bennett R, Lipsky M.1992.** Communications: A Classification system for histological lesions. *Journal of Aquatic Animal Health.* 4:135:143.
93. **Reimschuessel R. 2001.** A fish model of renal regeneration and development. *ILAR journal* 42(4): 285-291.
94. **Richard RA, Taylor PW, Pelton EH, Gutenberger SK, Ahrens MA, Marchant LM, Hanson K C. 2014.** Genetic evidence of vertical transmission and cycling of *Yersinia ruckeri* in hatchery-origin fall chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Fish and Wildlife Management* 6(1): 44-54
95. **Rintamäki P, Valtonen ET, Frerichs GN. 1986.** Occurrence of *Yersinia ruckeri* infection in farmed whitefish, *Coregonus peled* Gmelin and *Coregonus muksun* Pallas, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in northern Finland. *J Fish Dis.* 9: 137-140.
96. **Rodgers CJ .2001.** Resistance of *Yersinia ruckeri* to antimicrobial agents in vitro. *Aquaculture* 196:325–345.
97. **Rodgers CJ, Austin B.1983.** Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. *Veterinary Record* 112: 83.
98. **Rodgers CJ. 1992.** Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. *J Fish Dis* 15:243–254.
99. **Romalde JL, Magariños B, Barja JL, Toranzo AE. 1993.** Antigenic and molecular characterization of *Yersinia ruckeri* proposal for a new intraspecies classification. *System Appl Microbiol* 16: 411-419.
100. **Rosenthal S, Sandoval N, Gavidia C, Tabacchi L. 2013.** Frecuencia de lipidosis hepática en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 24(1): 118-124.
101. **Ross AJ, Rucker RR, Ewing WH. 1966.** Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can J Microbiol* 12(4): 763-770
102. **Ross LG, Ross B. 2008.** Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science. 240 p.
103. **Rucker RR. 1966.** Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull Off Int Epizoot* 308: 825-830.
104. **Saldarriaga M, Regalado F. 2017.** Potencial acuícola en el Perú. *Revista Moneda* 172: 34-39.
105. **Saleh M, Soliman H, El-Matbouli M. 2008.** Loop-mediated isothermal amplification as an emerging technology for detection of *Yersinia ruckeri* the causative agent of enteric red mouth disease in fish. *BMC Vet Res* 4: 31.

106. **Sandoval N, Llanco L, Manchego A, Mesías F. 2016.** Determinación de *Yersinia ruckeri* y susceptibilidad antimicrobiana en alevines de truchas arcoíris cultivadas en el lago Titicaca-Puno. En: LACQUA - SARA 2016. Lima: World Aquaculture Society.
107. **Sauter RW, Williams C, Celnik B, Meyer EA. 1985.** Etiology of early lifestage diseases. Department of Microbiology and Immunology, Oregon Health Sciences University, Final Report.
108. **Secades P, Guijarro JA. 1999.** Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. Appl and Environ Microbiol 65: 3969-3975.
109. **Şeker E, Karahan M, Sarıeyyüpoğlu M, Çetinkaya B. 2011.** Detection of *Yersinia ruckeri* by polymerase chain reaction (PCR) in infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). The Journal of Animal & Plant Sciences 21:570-574.
110. **Sierralta V, León J, De Blas I, Bastardo A, Romalde J, Castro T, Mateo E. 2013.** Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. Revis AquaTIC 38: 28-45.
111. **Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011.** Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. Rev Perú biol 18 (3): 349 – 353.
112. **Smith AM, Goldring OL, Dear G. 1987.** The production and methods of use of polyclonal antisera to the pathogenic organisms *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and *Renibacterium salmoninarum*. J. Fish Biol. 31: 225-226.
113. **Smith GR, Stearley RF. 1989.** The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts. Fisheries 14: 4-10.
114. **Stevenson, RM, Daly JG. 1982.** Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia-ruckeri*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 39:870-876.
115. **Strøm HK, Ohtani, Nowak B, Boutrup TS, Jones B, Raida MK, Bojesen AM. 2018.** Experimental infection by *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 induces brain lesions and neurological signs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of fish diseases 41(3): 529-537.
116. **Ström-Bestor M, Mustamäki N, Heinikainen S, Hirvelä-Koski V, Verner-Jeffreys D, Wiklund T. 2010.** Introduction of *Yersinia ruckeri* biotype 2 into Finnish fish farms. Aquaculture 308: 1-5.
117. **Takashima F, Hibiya, T. 1995.** An atlas of fish histology: normal and pathological features.

118. **Temprano A, Riano J, Yugueros J, Gonzalez P, De Castro L, Villena A, Naharro G. 2005.** Potential use of a *Yersinia ruckeri* O1 auxotrophic *aroA* mutant as a live attenuated vaccine. *Journal of fish diseases* 28(7): 419-427.
119. **Thibaut A. 2009.** Inoculación experimental de *Francisella* sp. Por diferentes vías en salmon del atlántico (*Salmo salar*). Tesis de Médico veterinario. Valdivia: Universidad austral de Chile. 33 p.
120. **Tinsley J, Lyndon A, Austin B. 2011.** Antigenic and cross-protection studies of biotype 1 and biotype 2 isolates of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J App Microbiol* 111: 8-16.
121. **Tinsley J. 2010.** Studies on pathogenicity of *Yersinia ruckeri* biotype 2 to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Tesis para obtener el grado de Doctor en Filosofía. Edimburgo: School of Life Sciences Heriot Watt University. 255 p.
122. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K. 2007.** *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis* 30:257–268.
123. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, Ryckaert J, Duchateau L, Haesebrouck F, Chiers K. 2009.** Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 84:219–228.
124. **Troncoso H, Miriam TM, Toledo B, María, S.** Aislamiento de *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. *Rev Avances en Medicina Veterinaria [revista en línea]* 1994 [acceso 10 de marzo de 2007]. Disponible en: [http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CD\\_A/avan\\_vet\\_seccion/0,1422,SCID%253D9073%2526ISID%253D437,00.html](http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CD_A/avan_vet_seccion/0,1422,SCID%253D9073%2526ISID%253D437,00.html).
125. **Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000.** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(4): 655-671.
126. **Vivas J, Carracedo B, Riaño J, Razquin BE, López-Fierro P, Acosta F, Naharro G, Villena AJ. 2004.** Behavior of an *Aeromonas hydrophila aroA* live vaccine in water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2702-2708.
127. **Vuillaume A, Brun R, Chene P, Sochon E, Lessel R. 1987.** First isolation of *Yersinia ruckeri* from sturgeon, *Acipenser baeri* Brandt, in south west of France. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 7: 18-19.
128. **Waltman WD, Shotts Jr EB. 1984.** A medium for the isolation and differentiation of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41(5): 804-806.
129. **Wiens GD, Glenney GW, LaPatra SE, Welch TJ. 2006.** Identification of novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) chemokines, CXCD1 and CXCD2: mRNA expression after *Yersinia ruckeri* vaccination and challenge. *Immunogenetics* 58:308–323.

130. **Wiens GD, Vallejo RL. 2010.** Temporal and pathogen-load dependent changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune response traits following challenge with biotype 2 *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol* 29:639–647
131. **Willumsen B. 1989.** Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases* 12(3):275-277.
132. **Wobeser G. 1973.** An outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. *J. Fisheries Res. Board Can* 30: 571-575.
133. **Woo PK, Bruno DW. 2011.** Fish diseases and disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. 2 nd ed. CAB International 106-112.
134. **Zorriehzahra MJ, Adel M, Torabi Delshad S. 2017.** Enteric redmouth disease: Past, present and future. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16(4): 1135-1156.
135. **Zorriehzahra MJ, Hassan HM, Gholizadeh M. 2009.** First occurrence of enteric redmouth diseases (ERM) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Hamedan Province in Iran. 1st International Congress on Health Management and Diseases of Aquatic, Tehran, Iran. September 2009.



## VIII. ANEXO

### Anexo N°1: Protocolo PCR convencional

Los procedimientos se realizan con la correcta indumentaria, la cual incluye mandil, mascarillas, guantes y cofias.

Consideraciones previas:

- Se debe poseer un cooler con hielo para mantener a baja temperatura los reactivos y las muestras utilizadas.
- El ADN de *Y. ruckeri* a amplificar deberá estar a una concentración de 50 ng/μl.
- La preparación del Mix de PCR de hacerse en un microtubo de 2ml de capacidad.

Composición del Mix de PCR por cada Muestra:

Componente	Cantidad
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 μl
Forward primer Yer3	2 μl
Reverse primer Yer4	2 μl
Agua libre de nucleasas	6.5 μl
Total del volumen	23 μl

Después adicionar la muestra:

Componente	Cantidad
<i>Y. ruckeri</i> ADN	2 μl

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 23 μl de Mix de PCR en microtubos.
2. Del ADN de la muestra extraer 2 μl y agregar al microtubo mezclando cuidadosamente con ayuda del pipeteador.
3. Asegurar los tubos tapándolos correctamente para evitar que se evapore el contenido.
4. Colocar los tubos en el termociclador.
5. Programar el termociclador con el protocolo sugerido por Del Cerro *et al.*, (2002)

N° Ciclos	Temp. (C°)	Tiempo
1	94	3 min.
40	94	40 seg.
	60	40 seg.
	72	40 seg.
1	72	5 min.
HOLD	4	Hasta retirar las muestras.

6. Al finalizar, los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis, utilizando gel de agarosa (1.5%) en buffer TBE 0.5X, sometidos a campo eléctrico de 100 V/cm durante 1 hora. Por último, se tiñeron con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, dando un tamaño aprox. de 575 pb.

### Anexo N°2: Método de cálculo para la DL 50

Para hallar la DL 50 se usó la fórmula de Reed y Muench, descrita de la siguiente manera:

$DL_{50} = (\log \text{ dilución con más del } 50 \% \text{ mortalidad}) + (\text{distancia proporcional} \times \log \text{ dilución})$

$$\text{Distancia proporcional (DP)} = \frac{\text{mortalidad} > 50\% - 50 \%}{\% \text{mortalidad} > 50\% - \% \text{mortalidad} < 50\%}$$

Factor de dilución = 10

Logaritmo (log) dilución = 1

$$\text{Distancia proporcional (DP)} = \frac{100\% - 50 \%}{100\% - 30\%} = 0,71$$

Factor de dilución = 10

Logaritmo (log) dilución = 1

$$DL50 = \log 10^7 + 0,71 \times 1$$

$$DL50 = 7,71$$