

Identificación y caracterización de *Aeromonas* sp patógenas aisladas de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) clínicamente enfermas cultivadas en piscigranjas del Perú

Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas* sp isolated from clinically diseased rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) raised in Peruvian fish farms

Jeferson Nuñure O.¹, Nieves Sandoval C.^{1,3}, Mauro Estrella O.¹,
Felipe Ramos E.¹, Antonio Herrera R.¹, Adhemir Valera A.¹,
Alberto Manchego S.²

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo la caracterización bioquímica e identificación molecular de cepas patógenas de *Aeromonas* sp aisladas de truchas arcoíris juveniles con signología compatible a aeromoniasis, cultivadas en seis piscigranjas de los departamentos de Junín (2), Pasco (2), Cajamarca (1) y Ancash (1), Perú. Se seleccionaron 60 truchas juveniles de 4-5 meses, con signología sugerente de brotes de aeromoniasis entre 2017 y 2018. Se realizó la eutanasia y necropsia y se registraron las lesiones externas e internas presentes. Se efectuó el aislamiento bacteriano de muestras de bazo y riñón anterior en agar TSA y GSP por 24-48 horas a 25 °C, se caracterizaron las colonias bacterianas mediante pruebas bioquímicas y se identificaron por PCR convencional utilizando cebadores específicos del gen ARNr 16S (*Aeromonas* spp.), *fstA* (*A. salmonicida*) y *gyrB* (*A. hydrophila*). Además, se realizó la secuenciación y se confirmó por análisis

¹ Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ E-mail: nsandovalc@unmsm.edu.pe

Recibido: 13 de octubre de 2020

Aceptado para publicación: 5 de mayo de 2021

Publicado: 24 de agosto de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

BLAST (NCBI). Las lesiones externas registradas fueron melanosis, aletas necróticas y hemorrágicas, úlceras en la piel y distensión abdominal. Las lesiones internas fueron hepatomegalia, esplenomegalia y hemorragia petequial en hígado, ciegos pilóricos y grasa peritoneal. Se aislaron 12 cepas en GSP (7 de Junín y 5 de Cajamarca), caracterizadas como *Aeromonas* spp, siendo negativas en las muestras de Pasco y Ancash. Las pruebas bioquímicas determinaron cuatro cepas como *Aeromonas salmonicida* y ocho como *Aeromonas* sp móviles, diferenciándose por pruebas de motilidad e indol. La identificación molecular por PCR determinó cuatro cepas *A. salmonicida* procedentes de Junín, una cepa *A. hydrophila* de Cajamarca y siete cepas móviles *Aeromonas* spp (3 de Junín y 4 de Cajamarca) que fueron negativas a la PCR de *A. salmonicida* y *A. hydrophila*. El análisis BLAST (NCBI) confirmó las cepas *A. salmonicida* y *Aeromonas* spp (identidad de 98-100%); además, la cepa de Cajamarca (identificada como *A. hydrophila* por bioquímica) presentó identidad de 95.65% con *A. hydrophila* subespecie *dhakensis*. En conclusión, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* subespecie *dhakensis* y otras *Aeromonas* móviles patógenas causan signología asociada a aeromoniasis en truchas arcoiris juveniles en las piscigranjas de Junín y Cajamarca. Es la primera vez que se detecta *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* en el país.

Palabras clave: *Aeromonas*, *Oncorhynchus mykiss*, pruebas bioquímicas, PCR, Perú

ABSTRACT

The present research aimed at the biochemical characterization and molecular identification of pathogenic strains of *Aeromonas* sp, isolated from juvenile rainbow trout with clinical signs compatible with aeromoniasis in six fish farms in Junín (2), Pasco (2), Cajamarca (1) and Ancash (1), Peru. In total, 60 juvenile trout of 4-5 months were selected, with suggestive signs of outbreaks of aeromoniasis between 2017 and 2018. Euthanasia and necropsy were performed and the external and internal lesions present were recorded. Bacterial isolation of spleen and anterior kidney samples was carried out on TSA and GSP agar for 24-48 hours at 25 °C, bacterial colonies were characterized by biochemical tests and identified by conventional PCR using specific primers of the 16S rRNA gene (*Aeromonas* spp.), *fstA* (*A. salmonicida*) and *gyrB* (*A. hydrophila*), and sequencing was performed and confirmed by BLAST analysis (NCBI). The external lesions were melanosis, necrotic and haemorrhagic fins, skin ulcers and abdominal distention. Internal lesions were hepatomegaly, splenomegaly, and petechial haemorrhage in the liver, pyloric cecum, and peritoneal fat. Twelve strains were isolated in GSP (7 from Junín and 5 from Cajamarca), characterized as *Aeromonas* spp, being negative in the Pasco and Ancash samples. The biochemical tests determined four strains as *Aeromonas salmonicida* and eight as mobile *Aeromonas* sp, differing by motility and indole tests. Molecular identification by PCR determined four *A. salmonicida* strains from Junín, one *A. hydrophila* strain from Cajamarca and seven *Aeromonas* spp mobile strains (3 from Junín and 4 from Cajamarca) that were negative to the PCR of *A. salmonicida* and *A. hydrophila*. BLAST analysis (NCBI) confirmed the strains *A. salmonicida* and *Aeromonas* spp (98-100% identity). Furthermore, the Cajamarca strain (identified as *A. hydrophila* by biochemistry) presented 95.65% identity with *A. hydrophila* subspecies *dhakensis*. In conclusion, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila* subspecies *dhakensis* and other pathogenic mobile *Aeromonas* produce symptoms associated with aeromoniasis in juvenile rainbow trout in the Junín and Cajamarca fish farms. It is the first time that *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* is detected in the country.

Keywords: *Aeromonas*, *Oncorhynchus mykiss*, biochemical tests, PCR, Peru

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es el sector de producción de alimentos con mayor nivel de crecimiento a nivel mundial. En el Perú, los principales recursos acuícolas son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), los langostinos (*Litopenaeus vannamei*) y las conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) (FAO, 2018; PRODUCE, 2018). Una patología que afecta el cultivo de la trucha arcoíris es la aeromoniasis, la cual es ocasionada por bacterias del género *Aeromonas* sp, y que provoca retraso en el crecimiento, mortalidad de peces y perjuicios económicos significativos (Zepeda-Velásquez, 2015). Las principales especies patógenas involucradas en la aeromoniasis son: *Aeromonas salmonicida*, agente etiológico de la forunculosis, y *Aeromonas hydrophila*, patógeno principal en la Septicemia por *Aeromonas* Móviles (MAS) (Cipriano, 2001; Janda y Abbott, 2010). En el Perú se han aislado cepas de *Aeromonas*; así, IMARPE (2008) y Baca (2012) aislaron *A. salmonicida* y *A. hydrophila* provenientes de truchas arcoíris clínicamente enfermas de piscigranjas de Junín. Al ser un problema sanitario constante, el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) incluyó la aeromoniasis dentro del Programa de Control de Enfermedades en Animales Acuáticos (SANIPES, 2016).

Las bacterias patógenas *Aeromonas* sp son cocobacilos gramnegativos que producen una signología que incluye nado errático, letargia e inapetencia, melanosis, lesiones externas (ulceraciones, lesiones necrohemorrágicas de aletas y distensión abdominal) e internas (septicemia y hemorragia en diversos órganos) (Noga, 2010). Las investigaciones previas sobre *A. salmonicida* en truchas realizaron aislamiento y caracterización bioquímica de las cepas; sin embargo, aún no se ha identificado molecularmente a *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y otras *Aeromonas* patógenas. La diversidad fenotípica y genética de estos patógenos (Cipriano, 2001)

reafirma la necesidad de realizar más estudios para controlarlos y prevenirlos. El objetivo del presente estudio fue caracterizar e identificar *Aeromonas* sp patógenas de truchas arcoíris presentes en varias regiones del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y Lugar de Estudio

El estudio fue de tipo descriptivo, e incluyó seis piscigranjas de truchas arcoíris ubicadas en las regiones de Junín (2), Pasco (2), Cajamarca (1) y Ancash (1) durante 2017 y 2018. El procesamiento de las muestras y la realización de las pruebas bioquímicas y moleculares se realizó en la Sección de Ictiopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV- UNMSM), en Lima.

Material Biológico

Se seleccionaron 60 truchas arcoíris juveniles (*O. mykiss*) de cultivo mediante muestreo de tipo no probabilístico (De Blas *et al.*, 2020) provenientes de Junín (20), Pasco (20), Cajamarca (12) y Ancash (8). Se tomó como criterios de inclusión a truchas juveniles de 4 a 5 meses, con signología sugerente de brotes de aeromoniasis (lesiones ulcerosas en la piel, melanosis, necrosis y hemorragias en aletas, distensión abdominal y comportamiento anómalo). En este caso, un muestreo intencionado es adecuado en el diagnóstico de enfermedades en poblaciones de peces que han presentado brotes de enfermedad o mortalidad reciente (Noga, 2010).

Toma de muestras

Los peces fueron anestesiados siguiendo las recomendaciones de CCAC (2010). Para esto, se realizó baños de inmersión en Eugenol por 3-5 minutos, con dosis de 60 mg disueltos en un 1 L de agua. El estado de anestesia se confirmó mediante la descoordinación

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas realizadas en colonias resultantes del cultivo de bazo y riñón anterior de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para caracterizar las principales *Aeromonas* sp

Prueba bioquímica	Sigla	Reacción (Buller, 2014)	
		<i>A. salmonicida</i>	<i>A. hydrophila</i>
Tinción Gram	GM	–	–
Oxidasa	OX	+	+
Catalasa	CAT	+	+
Hemólisis β	HE β	+	+
Motilidad	MOT	–	+
Pigmento marrón	PM	v	–
Ornitina descarboxilasa	ODC	–	–
Lisina descarboxilasa	LDC	+*	+
Arginina deshidrogenasa	ADH	+	+
Reducción de nitrato	NIT	+	+
Indol	IND	–	+
Citrato	CIT	–	+*
Urea	URE	–	–
Degradación de glucosa	GLU	+	+
Degradación de lactosa	LAC	–	–
Degradación de manitol	MAN	+	+
Degradación de gelatina	GEL	+	+
Sulfuro de hidrógeno	H ₂ S	–	–

(+): reacción positiva; (–): reacción negativa;

(+*): positivo en 60% de las cepas; (v): reacción variable

en el nado y reducción de la ventilación (opercular). Para el sacrificio de los peces se realizó el corte medular entre el cráneo y la médula espinal. La superficie del pez se desinfectó con torundas y alcohol al 70% previo a la necropsia. Se realizó una incisión estéril en la superficie del bazo y el riñón anterior, se efectuaron piquetes con asa de siembra bacteriológica estéril, para luego sembrar por agotamiento en placas Petri con agar TSA (Agar de Soja Triptica) y GSP (Glutamate Starch Phenol Agar). Para la identificación

se usaron las siglas: T (trucha), B (bazo), R (riñón anterior) y se enumeraron según el orden de necropsia de cada espécimen y rotulados con lugar y fecha.

Las placas se transportaron al laboratorio de la FMV-UNMSM a temperaturas entre 10 y 15°C dentro de un *cooler* con geles refrigerantes. Una vez en el laboratorio, las superficies de las placas fueron desinfectadas y se almacenaron en estufa a temperatura de incubación (25 °C) por 24-48 horas.

Cuadro 2. Detalles de los cebadores (*primers*) usados para la detección de *Aeromonas salmonicida* y *A. hydrophila* de colonias resultantes del cultivo de bazo y riñón anterior de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Especie	Gen que se busca amplificar	Cebadores (5' - 3')	Tamaño (pb)
<i>Aeromonas</i> sp	ARNr 16S (Persson <i>et al.</i> 2015)	<i>Fw</i> : CGACGATCCCTAGCTGGTCT <i>Rv</i> : GCCTTCGCCACCGGTAT	480 pb
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>fstA</i> (Beaz-Hidalgo <i>et al.</i> 2008)	<i>Fer3</i> : CGGTTTTGGCGCAGTGACG <i>Fer4</i> : AGGCGCTCGGTTTGGCTATCT	404 pb
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>gyrB</i> (Persson <i>et al.</i> 2015)	<i>Fw</i> : AGTCTGCCGCCAGTGGCGAC <i>Rv</i> : CGCCATCGCCTGTTCGAC	144 pb

Luego, las colonias resultantes fueron observadas y se seleccionaron aquellas con características similares a *Aeromonas* en medios TSA y GSP. Se debe observar colonias blanquecinas y circulares de 2-3 mm, el viraje amarillo del agar selectivo GSP producido por bacterias del género *Aeromonas*, así como la presentación del pigmento marrón en el medio TSA típico de *A. salmonicida*, aunque no todas las cepas la generan. Para asociar las colonias al género *Aeromonas* se utilizaron pruebas preliminares como la tinción Gram y las pruebas de oxidasa y catalasa (Buller, 2014).

Las bacterias con características similares a *Aeromonas* fueron sometidas a pruebas bioquímicas posteriores, siguiendo un esquema de caracterización bioquímica no automatizado conveniente en el estudio de bacterias del género *Aeromonas* (Buller, 2014) (Cuadro 1). La lectura de los resultados se realizó de 24-48 horas posteriores a la siembra de las pruebas bioquímicas e incubación en estufa (25 °C). Para la elaboración, uso de reactivos e interpretación de las pruebas bioquímicas se emplearon las descripciones de Brenner *et al.* (2005) y Buller (2014). Se priorizó la caracterización y diferenciación de

cepas *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y de las *Aeromonas* móviles, principalmente *A. hydrophila*.

Estudio Molecular

Se realizó PCR convencional para la confirmación de las cepas *Aeromonas* sp caracterizadas por pruebas bioquímicas. Se utilizaron cebadores específicos del gen ARNr 16S para identificar cepas *Aeromonas* sp con un producto de 480 pb. Para *A. salmonicida* los cebadores *Fer3* (*Forward*) y *Fer4* (*Reverse*) amplificaron el gen *fstA* (gen del receptor sideróforo férrico) de 404 pares de base (pb), y para *A. hydrophila* se emplearon cebadores a partir del gen *gyrB* (subunidad B de la ADN girasa) con un amplicón de 144 pb, como se detalla en el Cuadro 2.

Para la extracción de ADN bacteriano se empleó el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) y para la ejecución de la técnica de PCR se usó el kit comercial GoTaq Green Master Mix (Promega, USA). Para ambos kits se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.



Figura 1. (A) Lesiones externas en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): úlceras en piel, lesiones necro-hemorrágicas y distensión abdominal; (B) Lesiones internas: hepatomegalia, hemorragia petequeal en hígado, ciegos pilóricos y a nivel de grasa peritoneal

Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis (90 v durante 1-1.5 horas), utilizando gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X, marcador de peso molecular o «ladder». Adicionalmente se incluyeron controles positivos (cepas de *A. salmonicida* ATCC 33658 y de *A. hydrophila* ATCC 7966) y control negativo «NTC» (agua libre de nucleasas). Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador (DNR Bio-Imaging Systems, USA).

Se extrajeron y purificaron los productos obtenidos de la PCR de las cepas *A. salmonicida* y *A. hydrophila* con el kit co-

mercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Los productos se secuenciaron empleando el servicio de Macrogen Inc. (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se alinearon y contrastaron con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) empleando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Consideraciones Éticas

El estudio contempló las normas éticas para la investigación señaladas por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

RESULTADOS

Las truchas juveniles fueron seleccionadas por presentar signos clínicos y lesiones asociados a aeromoniasis, lesiones que fueron corroboradas de estar presentes durante la necropsia (Figura 1). Se registraron lesiones externas como melanosis (78.3%), necrosis de aletas (68.3%), ulceraciones epiteliales variadas (53.3%), hemorragia petequeal o equimótica en aletas (46.7%) y distensión del abdomen (28.3%). Asimismo, lesiones internas (Figura 2) como hepatomegalia (71.7%), esplenomegalia (63.3%), hemorragias petequeales en hígado (43.3%) y hemorragias petequeales en ciegos pilóricos (16.7%) y grasa peritoneal (16.7%) (Cuadro 3).

El cultivo y aislamiento bacteriano se efectuó en los medios TSA y GSP. En el medio TSA se obtuvieron 60 cepas bacterianas, de las cuales solo una desarrolló un pigmento color café tenue, tanto en los aislados de riñón anterior como en los de bazo. En el medio GSP, medio selectivo para *Aeromonas*, se pudo evidenciar el crecimiento de 12 aislados que viraron el medio rojo del agar a un color amarillo evidenciando la presencia de bacterias de este género (Cuadro 4).

Cuadro 3. Frecuencia de alteraciones patológicas macroscópicas observadas tras la necropsia de 60 truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con signología clínica de aeromoniasis

Alteraciones patológicas macroscópicas	Frecuencia	
	n	%
Externas		
Melanosis de la piel	47	78.3
Necrosis de aletas	41	68.3
Ulceraciones epiteliales	32	53.3
Hemorragia en aletas	28	46.7
Distensión abdominal	17	28.3
Internas		
Hepatomegalia	43	71.7
Esplenomegalia	38	63.3
Hemorragia petequial en hígado	26	43.3
Hemorragia petequial en ciegos pilóricos	10	16.7
Hemorragia petequial en grasa peritoneal	10	16.7

En la caracterización fenotípica de aislados del género *Aeromonas* se apreciaron colonias que presentaban desarrollo rápido (entre 24 y 48 horas), tamaño de 2-3 mm de diámetro, formas circulares con bordes definidos y coloración blanquecina o cremosa. La tinción Gram permitió la visualización de morfología bacteriana bacilar o cocobacilar y de coloración acidófila o gramnegativa típicas.

Las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa resultaron positivas para los 12 aislados de *Aeromonas* que, previamente, habían virado a amarillo el medio del agar GSP. Estas cepas provinieron de muestras de Junín (7 aislados) y Cajamarca (5 aislados), tanto de riñón anterior como de bazo. Todas las cepas *Aeromonas* sp presentaron similitudes en las siguientes pruebas bioquímicas: oxidasa

y catalasa positivas, hemólisis beta en agar sangre, arginina deshidrogenasa positivas, reducción de nitratos, metabolismo de la glucosa, manitol, degradación de la gelatina y ureasa negativa.

Las cepas R3, B4, R14 y R17 de Junín no presentaron motilidad (MOT) en medio SIM y eran indol negativas (presuntivos a *A. salmonicida*), mientras las cepas R5, B19, B20 de Junín y R9, B9, R10, B11 y B12 de Cajamarca eran móviles e indol positivas (característico de *Aeromonas* móviles). Las cepas *Aeromonas* sp presentaron resultados que diferían o eran variables para las pruebas bioquímicas: lisina descarboxilasa (LDC), ornitina descarboxilasa (ODC), lactato (LAC), citrato (CIT) y producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) relacionado a lo descrito por Abbott *et al.* (2003) y Buller (2014).

Cuadro 4. Caracterización preliminar de los aislados presuntivos a *Aeromonas* sp obtenidos de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con signología clínica de aeromoniasis procedentes de Junín y Cajamarca (Perú)

Origen	Especie	Cepa	Desarrollo		Colonias	Gram	Morfología	OX	CAT
			TSA	GSP					
Junín	<i>Aeromonas</i> spp	R3	Sí SPA	Sí VA	Circular 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		B4	Sí PM	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		R14	Sí SPA	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		R17	Sí SPA	Sí VA	Circular, 3 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		R5	Sí SPA	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		B19	Sí SPA	Sí VA	Circular, 3 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		B20	Sí SPA	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
Cajamarca	<i>Aeromonas</i> spp	B11	Sí NP	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		R9	Sí NP	Sí VA	Circular, 3 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		B9	Sí NP	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		R10	Sí NP	Sí VA	Circular, 3 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+
		B12	Sí SPA	Sí VA	Circular, 2 mm, blanquecinas	-	Bacilos y cocobacilos	+	+

R= Riñón anterior; B= Bazo; PM= Forma pigmento marrón; SPA= Sin pigmentación aparente; NP= No forma pigmentos; VA = Viraje amarillo; OX=oxidasa; CAT= catalasa

La interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas permitió discriminar las cepas de *Aeromonas* no móviles (como las cepas típicas de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) de las *Aeromonas* móviles (como las cepas de las presuntas *A. hydrophila*, *A. veronii* y *A. bestiarum*).

Además, dentro de las cepas caracterizadas como *Aeromonas* móviles se observaron perfiles bioquímicos similares a cepas de *A. hydrophila* (posteriormente confirmadas mediante técnicas moleculares), así como cepas presuntivas a *A. veronii* y *A. bestiarum* (Buller, 2014).

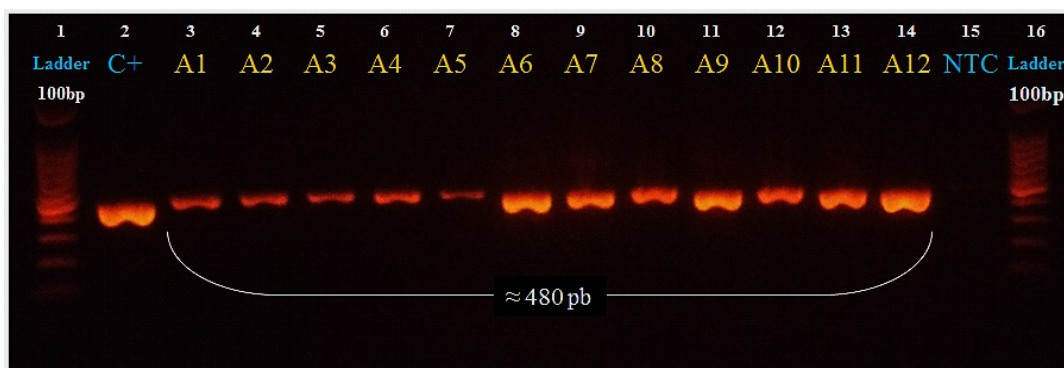


Figura 2. Electroforesis de producto de PCR de aislados *Aeromonas* sp presenta 12 muestras positivas a *Aeromonas* sp en columnas 3-14, control positivo de 480 pb en columna 2, control negativo en columna 15 y *ladder* en columna 1 y 16

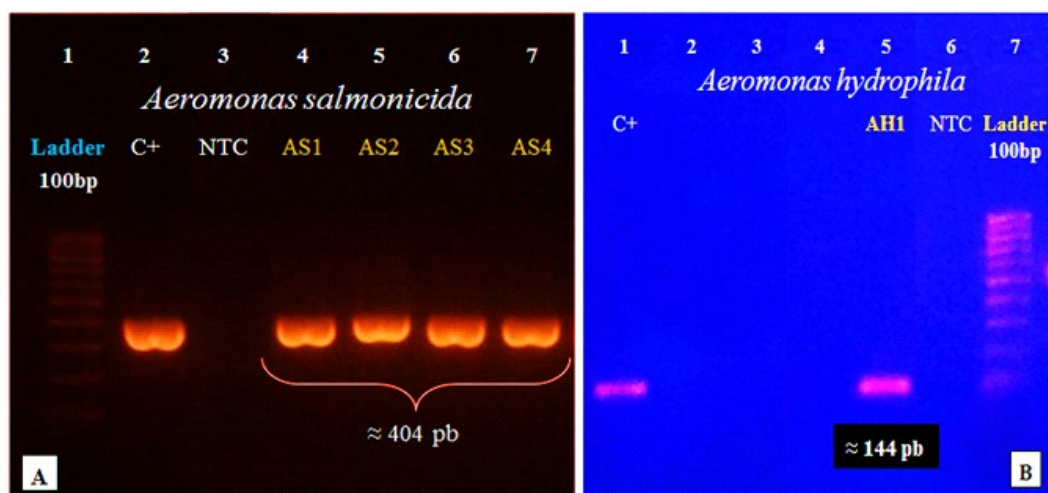


Figura 3. Electroforesis de producto de PCR (A) presenta 4 muestras positivas a *A. salmonicida* en columnas 4-7, control positivo de 404 pb en columna 2, control negativo NTC en columna 3 y *ladder* en columna 1; mientras (B) presenta 1 muestra positiva a *A. hydrophila*, control positivo de 144 pb en columna 1, control negativo NTC en columna 6 y *ladder* en columna 7

Se realizó PCR convencional a partir de las colonias de las presuntas *Aeromonas* obtenidas en la caracterización bioquímica. Para la identificación molecular se buscó obtener un producto de 480 pb. Para detectar *A. salmonicida* se generó un producto de 404

pb y para *A. hydrophila* un producto de 144 pb. Los resultados indican que siete cepas de Junín (R3, B4, R5, R14, R17, B19 y B20) y cinco cepas de Cajamarca (R9, B9, R10, R11 y B12) se engloban dentro del género *Aeromonas* (Figura 3). Posteriormente, se

identificó que las cepas R3, B4, R14 y R17 de Junín fueron positivas a *A. salmonicida*, mientras que la cepa B11 de Cajamarca fue positiva a *A. hydrophila* (Figura 4).

Se realizó el secuenciamiento de los productos de PCR y se realizó el alineamiento mediante el software ClustalX. El análisis bioinformático efectuado a través de BLAST (NCBI) confirmó las cepas *Aeromonas* spp y *A. salmonicida* utilizando los marcadores moleculares ARNr 16S y *fstA* respectivamente, las cuales mostraron un porcentaje de similitud de 98 a 100% con las secuencias almacenadas en la base de datos NCBI. Además, la cepa de Cajamarca identificada previamente como *A. hydrophila* mediante pruebas bioquímicas y PCR convencional (empleando el marcador molecular *gyrB*), evidenció una identidad de 95.6% con *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis* con los genes de *gyrB* presentes en el GenBank.

DISCUSIÓN

Esta investigación se orientó principalmente a la caracterización e identificación de cepas patógenas causantes de aeromoniasis en la truchicultura peruana: *A. salmonicida* (forunculosis) y *A. hydrophila* (Septicemia por *Aeromonas* móviles). Austin B y Austin D (2007) y Dallaire-Dufresne *et al.* (2013) indican que este problema sanitario genera retraso en el crecimiento, inmunosupresión, signología diversa, alta morbilidad (80-100%) y mortalidad (entre 0 y 80%). Los experimentos realizados por Zepeda-Velásquez *et al.* (2017) en México, resaltan la patogenicidad de *A. salmonicida* y *A. hydrophila*.

Las lesiones externas encontradas en la necropsia fueron similares a las descritas por Cipriano (2001), Noga (2010) y Baca (2012). Además, como indica Zepeda-Velásquez (2015), las lesiones externas halladas son compatibles tanto para forunculosis

como para la septicemia por *Aeromonas* móviles. De otra parte, las lesiones internas halladas se correlacionan con las descripciones de Roberts (2001), Kozińska (2007) y Baca (2012) en truchas afectadas con aeromoniasis. Las alteraciones más resalantes son las hemorragias de tipo petequeal o equimótica en riñón, bazo, hígado y tracto intestinal, tal y como lo describen Cipriano (2001) y Noga (2010).

Austin B y Austin D (2007) y Kozińska (2007) mencionan que en la patología ocasionada por *A. salmonicida*, no siempre conlleva la formación del forúnculo, sobre todo en infección aguda o subaguda en peces juveniles y en brotes epidemiológicos; lo que coincide con los hallazgos de este estudio. De hecho, *A. hydrophila* también puede ocasionar lesiones forunculosis (Zepeda-Velásquez, 2015). Además, en salmónidos como la trucha arcoíris la presentación de signos clínicos frente a una infección bacteriana cursa con signología general, no patognomónica (Kumar *et al.* 2015), y que se asemeja a lo ocasionado por *Yersinia ruckeri* (Sierralta, 2011) o *Flavobacterium psychrophilum* (León *et al.*, 2008) que cursan con melanosis, esplenomegalia, hepatomegalia, lesiones hemorrágicas multifocales, entre otras anomalías del comportamiento.

La caracterización bioquímica se separó en dos fases. La primera fase buscó aislar cepas *Aeromonas* spp en agar TSA y GSP (selectivo), y caracterizarlas observando la morfología macroscópica y microscópica, tinción de Gram, prueba de oxidasa y catalasa. Así, 12 cepas de *Aeromonas* sp provenientes de Junín y Cajamarca se desarrollaron en el agar GSP. El aislamiento de cepas de *Aeromonas* en la región Junín se correlacionan a lo hallado por IMARPE (2008) y Baca (2012). Sin embargo, hasta el momento no se habían reportado *Aeromonas* en truchas de cultivo en Cajamarca. La presentación del pigmento marrón soluble en TSA observado en una de las cuatro cepas *A. salmonicida*, descrito por Baca (2012) y

Buller (2014), varía por el contenido de triptona y la termolabilidad de la hidroxifenilpiruvato dioxigenasa, según lo descrito por Qiao *et al.* (2018).

La segunda fase usó un sistema no automatizado para caracterizar bioquímicamente cepas *Aeromonas* spp y separarlas por especies, ya que los sistemas automatizados aún no discriminan las especies de *Aeromonas* con las de *Vibrio* (Janda y Abbott, 2010; Latif-Eugenín, 2016). Además, las *Aeromonas* presentan una diversidad genética, bioquímica y antigénica que dificulta su caracterización patogénica (Cipriano, 2001). Así, la diferenciación se basó en la prueba de motilidad (en medio SIM) e indol, ya que *A. salmonicida* es una bacteria no móvil e indol negativa, todo lo contrario a las *Aeromonas* móviles, como *A. hydrophila*. Se diferenciaron cuatro cepas de Junín presuntivas a *A. salmonicida* y ocho *Aeromonas* móviles de Cajamarca. Las *Aeromonas* móviles reaccionaron variablemente a las pruebas ODC, LDC, LAC, CIT y H₂S, lo que sugirió la presencia de *A. hydrophila*, además de perfiles bioquímicos similares a las cepas patógenas *A. veronii* y *A. bestiarum* como los descritos por Abbott *et al.* (2003), Baca (2012) y Buller (2014).

Latif-Eugenín (2016) menciona que para la caracterización e identificación de *Aeromonas*, el Comité Internacional de Sistemática de Procariontes (ICSP) recomienda un estudio polifásico que incluya estudios de fenotipo, genotipo y, actualmente, estudios filogenéticos. Así, Baca (2012) caracterizó bioquímicamente siete cepas *A. salmonicida* y una cepa de *A. hydrophila* de Junín, pero, en el país aún no se han identificado bioquímicamente o molecularmente otras especies de *Aeromonas* móviles que afectan las truchas arcoíris de cultivo. Así, en el presente estudio se desarrollaron tres protocolos de detección molecular para *Aeromonas* sp, *A. salmonicida* y *A. hydrophila*.

Se emplearon cebadores específicos para la detección molecular de *Aeromonas* spp (ARNr 16S) y *A. hydrophila* (*gyrB*), basándose en el estudio efectuado por Persson *et al.* (2015). Para el caso de *A. salmonicida* se amplificó el gen *fstA*, diseñado por Beaz-Hidalgo *et al.* (2008), ya que marcadores moleculares como ARNr 16S o *gyrB* incluso identifican genotípicamente a otras *Aeromonas* (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2013a). La secuenciación de los productos del PCR y el análisis BLAST (NCBI) confirmaron las cepas *A. salmonicida* y *Aeromonas* spp, presentando una similitud de 98-100%, mientras la cepa B11 *A. hydrophila* de Cajamarca demostró una identidad de 95.6% con *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis*, siendo porcentajes de identidad aceptables, como se indica en los estudios de Martínez-Murcia *et al.* (2009) y Latif-Eugenín (2016).

Este estudio utilizó cebadores para identificar las principales *Aeromonas* patógenas que afectan la truchicultura, como lo describe Cipriano (2001), Noga (2010) y Baca (2012). Para esclarecer la divergencia genética a nivel intraespecie o interespecie de *A. hydrophila* y de otras *Aeromonas* móviles, Martínez-Murcia *et al.* (2011) recomiendan el empleo de genes como *gyrB* (empleado en este estudio), *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX* y *atpD*. Así, Beaz-Hidalgo *et al.* (2013b) y Colston *et al.* (2014) empleando estudios filogenéticos reclasificaron *A. hydrophila* subsp. *dhakensis* en *A. dhakensis* (estrechamente relacionado a *A. hydrophila*). Chen *et al.* (2016) indican que este microorganismo se distribuye en ambientes acuáticos de áreas tropicales y subtropicales, aislado de muestras de peces y humanos enfermos, demostrando una marcada virulencia para el desarrollo de bacteriemias e infecciones clínicas, descripciones que se asocian a la cepa aislada en Cajamarca.

Las siete cepas de *Aeromonas* móviles (identificadas como *Aeromonas* sp) presen-

taban perfiles bioquímicos similares a las cepas patógenas *A. veronii* y *A. bestiarum*. Esto se conjetura por las diferencias en las pruebas bioquímicas: ODC positivo y LAC negativo como presuntivo a *A. veronii* mientras LAC positivo y H₂S positivo como presuntivo a *A. bestiarum*, de acuerdo con lo descrito por Buller (2014). La idea de una infección natural ocasionada por distintas especies de *Aeromonas* es descrita por Baca en Junín (2012) y se ve reforzada por las descripciones de coinfección en peces de cultivo realizadas por Kozińska y Pekala (2012) y por Zepeda-Velásquez *et al.* (2015), quienes identificaron molecular e histopatológicamente *A. salmonicida*, *A. hydrophila* y *A. veronii* cohabitando e infectando truchas arcoíris de cultivo con signos clínicos de enfermedad.

El elevado aislamiento de colonias gramnegativas en medio TSA (42/60) se debió a *Yersinia ruckeri*, enterobacteria de frecuente presentación en la truchicultura del Perú, causante de yersiniosis («enfermedad de la boca roja») que genera signología similar (melanosis, esplenomegalia, hepatomegalia y hemorragias multifocales) y ha sido reportada en diversos estudios (Fernández, 2011; Sierralta, 2011; Sirvas *et al.*, 2011). Así, en la casuística del Laboratorio de Ictiopatología (FMV-UNMSM) se ha identificado *Y. ruckeri* además de *Flavobacterium psychrophilum*, causante de la enfermedad bacteriana del agua fría, ambas con signología similar; de allí que debe efectuarse el diagnóstico diferencial con estas enfermedades bacterianas, la caracterización por bioquímica y la identificación molecular.

Para concluir, el estudio demostró que distintas especies de *Aeromonas* causan aeromoniasis en truchas arcoíris en una misma piscigranja, y que puede existir infecciones mixtas, especialmente con *Yersinia ruckeri*, tornándose un problema sanitario relevante que afecta a la incipiente y poco tecnificada truchicultura nacional. Se precisan más estudios que identifiquen molecularmente, e incluso filogenéticamente, las es-

pecies de *Aeromonas* que afectan el desarrollo de la acuicultura peruana, en especial *Aeromonas* patógenas de truchas arcoíris.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento a Innovate -Perú por la subvención, la capacitación y el desarrollo del trabajo de tesis del primer autor mediante la ejecución del Proyecto N.º 078 – INNOVATEPERU – IAPIP – 2017.

CONCLUSIONES

- *Aeromonas salmonicida* está presente en las piscigranjas de Junín mientras *Aeromonas hydrophila* subespecie *dhakensis*, en las de Cajamarca. Ambas bacterias causan signología asociada a aeromoniasis en las truchas arcoíris juveniles y se presentan en baja frecuencia.
- Se detecta la presencia de otras especies de *Aeromonas* móviles, distintas a *A. hydrophila*, en las piscigranjas de Junín y Cajamarca; las cuales están involucradas en el desarrollo de aeromoniasis en truchas arcoíris juveniles y se presentan en baja frecuencia.

LITERATURA CITADA

1. **Abbott SL, Cheung WK, Janda JM. 2003.** The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol* 41: 2348-2357. doi: 10.1128/jcm.41.6.2348-2357.2003
2. **Austin B, Austin D. 2007.** Bacterial fish Pathogens. Diseases in farmed and wild fish. 4th ed. UK: Springer. 552 p.
3. **Baca, RF. 2012.** Aislamiento e identificación bioquímica de *Aeromonas salmonicida* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en fase juve-

- nil en una piscigranja de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 77 p.
4. **Beaz-Hidalgo R, Magi GE, Balboa S, Barja JL, Romalde JL. 2008.** Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fst* (ferric siderophore receptor) gene. *Vet Microbiol* 128 (3-4): 386-394.
 5. **Beaz-Hidalgo R, Magi GE, Balboa S, Barja JL, Romalde JL. 2008.** Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fst* (ferric siderophore receptor) gene. *Vet Microbiol* 128: 386-394. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.004
 6. **Beaz-Hidalgo R, Latif-Eugenín F, Figueras MJ. 2013a.** The improved PCR of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene differentiates the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* from other *Aeromonas* especies. *Vet Microbiol* 166: 359-363. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.028
 7. **Beaz-Hidalgo R, Martínez-Murcia A, Figueras MJ. 2013b.** Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys *et al.*, 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia *et al.*, 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Syst Appl Microbiol* 36: 171-176. doi: 10.1016/j.syapm.2012.12.007
 8. **Brenner DJ, Krieg NR, Garrity GM, Staley JT. 2005.** The Proteobacteria. Part A: Introductory essays. In: Garrity GM (ed). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 2. 2nd ed. New York: Springer. 1-304.
 9. **Buller NB. 2014.** Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals. A practical identification manual. 2nd ed. UK: CABI. 881 p.
 10. **[CCAC] Canadian Council on Animal Care. 2010.** CCAC Guidelines on euthanasia of animals used in science. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 36 p.
 11. **Chen PL, Lamy B, Ko WC. 2016.** *Aeromonas dhakensis*, an increasingly recognized human pathogen. *Front Microbiol* 7: 793. doi: 10.3389/fmicb.2016.00793
 12. **Cipriano RC. 2001.** *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. *Fish Dis Leaflet* 68: 1-25.
 13. **Colston SM, Fullmer MS, Beka L, Lamy B, Gogarten JP, Graf J. 2014.** Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. *MBio* 5: e02136. doi: 10.1128/mBio.02136-14
 14. **Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, Lafaille A, Charette SJ. 2013.** Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet Microbiol* 169: 1-7. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.025
 15. **De Blas I, Muniesa A, Vallejo A, Ruiz-Zarzuela I. 2020.** Assessment of sample size calculations used in aquaculture by simulation techniques. *Front Vet Sci* 7: 253. doi: 10.3389/fvets.2020.00253
 16. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2018.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Roma: FAO. 233 p.
 17. **Fernández C. 2011.** Determinación de *Yersinia ruckeri* y sus características lesionales anatómo - histopatológicas en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en etapa pre-comercial en una piscigranja de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 69 p.
 18. **[IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2008.** Anuario científico tecnológico 2008. Callao, Perú: Instituto del Mar del Perú. 176 p.
 19. **Janda J, Abbott S. 2010.** The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity and infection. *Clin Microbiol Rev* 23: 35-73. doi: 10.1128/CMR.00039-09

20. **Kozińska A, Pekala A. 2012.** Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. *Sci World J* 2012: 949358. doi: 10.1100/2012/949358
21. **Kozińska A. 2007.** Dominant pathogenic species of mesophilic Aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *J Fish Dis* 30: 293-301. doi: 10.1111/j.1365-2761.2007.00813.x.
22. **Kumar G, Menanteau»Ledouble S, Saleh M, El»Matbouli M. 2015.** *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Vet Res* 46: 2-6. doi: 10.1186/s13567-015-0238-4
23. **Latif-Eugenín FL. 2016.** *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal. Tesis Doctoral. España: Universitat Rovira I Virgili. 391 p.
24. **León J, Avalos R, Ponce M. 2008.** *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Rev Peru Biol* 15: 117-124.
25. **Martinez-Murcia A, Monera A, Alperi A, Figueras MJ, Saavedra MJ. 2009.** Phylogenetic evidence suggests that strains of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* belong to the species *Aeromonas aquariorum* sp. nov. *Curr Microbiol* 58: 76-80. doi: 10.1007/s00284-008-9278-6
26. **Martinez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, Lopez-Alvarez M, Lara E, et al. 2011.** Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Syst Appl Microbiol* 34: 189-199. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.014
27. **Noga EJ. 2010.** Fish disease, diagnosis & treatment. 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell. 410 p.
28. **Persson S, Al-Shuweli S, Yapici S, Jensen JN, Olsen KEP. 2015.** Identification of clinical *Aeromonas* species by *rpoB* and *gyrB* sequencing and development of a multiplex PCR method for detection of *Aeromonas hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, and *A. media*. *J Clin Microbiol* 53: 653-656. doi: 10.1128/JCM.01963-14
29. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2018.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2016. Lima: PRODUCE. 202 p.
30. **Qiao Y, Wang J, Wang H, Chai B, Rao C, Chen X, Du S. 2018.** 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase thermostability is responsible for temperature-dependent melanogenesis in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Appl Environ Microb* 85: e01926-18. doi: 10.1128/AEM.01926-18
31. **Roberts RJ. 2001.** Fish pathology. 3rd ed. London: WB Saunders. 472 p.
32. **[SANIPES] Organismo Nacional De Sanidad Pesquera. 2016.** Programa oficial de vigilancia y control de enfermedades en animales acuáticos: P01-SDSNA-SANIPES. [Internet]. Disponible en: <https://www.sanipes.gob.pe>
33. **Sierralta V. 2011.** Estado situacional de *Yersinia ruckeri* causante de «la enfermedad entérica de la boca roja» en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en piscigranjas de la sierra central del Perú. Tesis de Maestría. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 78 p.
34. **Sirvas S, Sánchez C, Peña C. 2011.** Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de *Oncorhynchus mykiss* procedentes de Canta, Lima, Perú. *Rev Peru Biol* 18: 349-353. doi: 10.15381/rpb.v18i3.451
35. **Zepeda-Velásquez AP. 2015.** *Aeromonas* spp.: la infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *AquaTIC* 42: 1-16.

36. **Zepeda-Velásquez AP, Vega-Sánchez V, Salgado-Miranda C, Soriano-Vargas E. 2015.** Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species. *Can J Vet Res* 79: 250-254
37. **Zepeda-Velásquez AP, Vega-Sánchez V, Ortega-Santana C, Rubio-Godoy M, Montes de Oca-Mira D, Soriano-Vargas E. 2017.** Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp in immersion experimentally-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Acta Trop* 169: 122-124. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.02.013