

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



EVIDENCIA DE *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* EN TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN CULTIVO DE Balsa JAULA EN EL LAGO TITICACA EN EL DISTRITO DE POMATA DEPARTAMENTO DE PUNO (PERÚ)

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura

DINA MAMANI ESTAÑA

Director de Tesis

JULIO LARENAS HERRERA

SANTIAGO - CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



EVIDENCIA DE *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* EN TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN CULTIVO DE Balsa JAULA EN EL LAGO TITICACA EN EL DISTRITO DE POMATA DEPARTAMENTO DE PUNO (PERÚ)

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias de la Acuicultura

DINA MAMANI ESTAÑA

Director de Tesis
JULIO LARENAS HERRERA

Profesores Evaluadores
MARIANA ACUÑA RETAMAR
JURIJ WACYK GONZALEZ
NELSON DIÁZ PÉREZ

Evaluadora externa
MARIEL CAMPALANS

SANTIAGO - CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

EVIDENCIA DE *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* EN
TRUCHAS ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) EN CULTIVO DE Balsa
JAULA EN EL LAGO TITICACA EN EL DISTRITO DE POMATA
DEPARTAMENTO DE PUNO (PERÚ)

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de:
Magister en Ciencias de la Acuicultura

DINA MAMANI ESTAÑA

	Calificaciones	FIRMA
DIRECTOR DE TESIS		
Julio Larenas Herrera Médico Veterinario. Mag.		
PROFESORES EVALUADORES		
Mariana Acuña Retamar Dra. Médico Veterinario
Jurij Wacyk González Ingeniero Agrónomo. Ph. D.
Nelson Díaz Pérez Dr. en Ciencias mención Biología
CONSEJERO EVALUADOR		
Mariel Campalans Dra. Ciencias de la Acuicultura

SANTIAGO - CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradezco a Dios por guiar mi camino en la realización y culminación de esta tesis, por darme soporte emocional y fortaleza.

Doy gracias a mi padre quien siempre me ha guiado con mucha paciencia en cada paso que doy en la vida, para alcanzar mis metas.

Y en especial a mi esposo Abel por haberme dado cariño y apoyo incondicional y a mi hija Avril Fernanda por la ternura que me brinda y comprensión motivo de mi vida.

Agradezco a mi Director de tesis, Dr. Julio Larenas Herrera, por haber confiado en mi persona para la realización y elaboración de esta tesis y por los conocimientos brindados, con gran paciencia, esmero, comprensión y apoyo incondicional.

Quiero dar gracias a la Dra. Mariana Acuña Retamar, quien con paciencia me ha brindado sus conocimientos en la parte experimental en laboratorio y culminación del objetivo de esta memoria de tesis.

Además, quiero agradecer al Dr. Marcos Godoy, por haber colaborado gentilmente sin dudar, con los controles positivos para la realización de la parte experimental, ya que fue fundamental durante la realización de la presente tesis.

Doy gracias a mi Coordinador del Programa de Magíster Dr. Nelson Díaz Pérez, por brindarme sus conocimientos y consejos durante todo el periodo del desarrollo del Magíster, que fueron de gran aporte para mi aprendizaje y persona.

También deseo agradecer a Miguel Sepúlveda por su apoyo en el laboratorio de manera gentil. Deseo agradecer a todos mis compañeros del laboratorio ya que me acompañaron y formaron parte de mi tesis.

DEDICATORIA

A mi mamá (q.e.p.d.) y aunque no se encuentre físicamente conmigo, yo sé que en todo momento al desarrollar este trabajo estuvo conmigo, en las investigaciones, en mis desvelos, en mis momentos más difíciles, por eso a ti madre también te dedico mi esfuerzo. Te amo, hasta luego porque algún día nos volveremos a encontrar.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
Índice de Contenido.....	iii
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Gráficos.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA.....	3
1.1 Acuicultura mundial.....	3
1.2 Acuicultura en Perú.....	4
2. PANORAMA SANITARIO DE LA TRUCHA EN PERÚ.....	6
3. PISCIRICKETTSIOSIS.....	7
3.1 Agente etiológico.....	8
3.2 Especies susceptibles.....	8
3.3 Signos clínicos.....	9
3.4 Transmisión.....	9
3.4.1 Horizontal.....	9

3.4.2 Vertical.....	10
3.5 Métodos de diagnóstico.....	11
4. YERSINIOSIS.....	11
4.1 Agente etiológico.....	12
4.2 Especies susceptibles.....	13
4.3 Signos clínicos.....	13
4.4 Transmisión.....	13
4.4.1 Horizontal.....	13
4.4.2 Vertical.....	14
4.5 Métodos de diagnóstico.....	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS.....	16
OBJETIVOS GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. Geografía del lugar de estudio y muestreo.....	17
2. Tamaño de muestra.....	18
3. Obtención de las muestras.....	19
3.1 Necropsia de los peces.....	19
4. Procesamiento de las muestras en laboratorio.....	21
4.1 Controles negativos.....	21
4.2 Controles positivos.....	22

4.3 Aislamiento del material genético.....	22
4.4 Cuantificación del ADN.....	23
4.5 PCR.....	24
4.5.1 Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	24
4.5.1.1 Gradiente de temperatura para PCR anidado <i>P. salmonis</i>	25
4.5.1.2 Electroforesis.....	26
4.5.2 Detección de <i>Yersinia ruckeri</i>	27
4.5.2.1 Gradiente de temperatura para PCR <i>Y. ruckeri</i>	28
RESULTADOS.....	29
Geografía del lugar de estudio y muestreo.....	29
Obtención de las muestras.....	29
Aislamiento y cuantificación del material genético.....	29
Gradiente de temperatura para la detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	31
Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	32
Gradiente de temperatura para PCR <i>Yersinia ruckeri</i>	35
Detección de <i>Yersinia ruckeri</i>	36
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIÓN.....	46
LITERATURA CITADA.....	47
ANEXOS.....	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Producción y utilización de la pesca y la acuicultura en el mundo.....	3
Tabla 2. Tamaño de muestra aleatoria en función de prevalencia estimada de un patógeno en el lote (Tomado de Manual de Pruebas de Diagnóstico Para los Animales Acuáticos, OIE, 2006).....	19
Tabla 3. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados para la primera y segunda amplificación de PCR anidado para la detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i>	26
Tabla 4. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados para la amplificación de PCR para la detección de <i>Yersinia ruckeri</i>	28
Tabla 5. Cuantificación del ADN de las muestras extraídas.....	30
Tabla 6. Presencia <i>P. salmonis</i> mediante PCR anidado en hígado, bazo y riñón de truchas arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) en proceso de cosecha obtenidas en el Lago Titicaca, Distrito de Pomata, Puno.....	32

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa del potencial acuícola en diversas regiones de Perú (PRODUCE, 2015)	4
Figura 2. Zona de estudio, Pomata, Lago Titicaca, Perú.....	17
Figura 3. Zonas de producción de trucha arcoíris del Distrito de Pomata y zona de muestreo (Modificado de PRODUCE 2009).....	18
Figura 4. Trucha arcoíris de aproximadamente 250 g. Se observa abierta la cavidad celómica y el hígado (H) con una moderada palidez.....	21
Figura 5. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en gel de agarosa al 2%.....	31
Figura 6. Detección de <i>Piscirickettsia salmonis</i> en gel de agarosa al 2%.....	34
Figura 7. Detección de <i>Yersinia ruckeri</i> en gel de agarosa al 2%.....	36
Figura 8. Detección de <i>Yersinia ruckeri</i> en gel de agarosa al 2%.....	37
Figura 9. Agentes etiológicos descritos en el Lago Titicaca asociado a cultivos de trucha arcoíris entre los años 2012 y 2013.	39

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Producción de trucha arcoíris en el Perú desde el año 2003 al 2015 expresadas en toneladas métricas (t) (PRODUCE, 2015)	5
Gráfico 2. Producción de trucha en los Departamentos de Puno-Junín (2004-2015) expresadas en toneladas métricas (t) (PRODUCE, 2015).....	6
Gráfico 3. Detección porcentual de <i>Piscirickettsia salmonis</i> mediante PCR anidado en hígado, bazo y riñón de truchas arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) en proceso de cosecha obtenidas en el Lago Titicaca, Distrito de Pomata Departamento de Puno, Perú.....	35

RESUMEN

La acuicultura en el Perú está creciendo marcadamente en los últimos años, siendo Puno uno de los Departamentos con mayor producción en el cultivo de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). A consecuencia de este crecimiento y la falta de producción de ovas nacionales, se ha incrementado su importación desde diferentes países. Al respecto, ello constituye un alto riesgo de introducción de agentes infecciosos que se transmiten por vía vertical como es la *Piscirickettsia salmonis*, que actualmente es el mayor problema sanitario asociado a altas tasas de mortalidad en la salmonicultura chilena. *P. salmonis* es una bacteria patógena que fue aislada por primera vez en el año 1989 y es el agente etiológico de la enfermedad denominada piscirickettsiosis. Actualmente dentro del cultivo de truchas arcoíris en Perú, la principal enfermedad en truchas es la yersiniosis, que es causada por el agente infeccioso *Yersinia ruckeri*, que genera altas pérdidas económicas. Sin embargo, los estudios sanitarios se han restringido a la zona de Junín y no a la del Lago Titicaca, particularmente en Puno, donde se concentra un 85% de la producción de esta especie. El objetivo de la presente investigación fue establecer la evidencia de los agentes patógenos, *P. salmonis* y *Y. ruckeri* en Puno, en el Distrito de Pomata. Se seleccionaron 43 peces de 250 g de peso en etapa comercial, durante el periodo de cosecha, los cuales no presentaban signos clínicos de enfermedad y fueron cultivados en balsa jaula. En todos los animales se muestrearon: hígado, bazo y riñón de acuerdo a los procedimientos establecidos por la OIE. Se realizó la técnica de la Reacción de la Cadena de Polimerasa Anidada (PCRa) para la detección de *P. salmonis*, utilizando dos juegos de partidores: Eub-A, Eub-B, y PS2S, PS2AS, resultando un producto de amplificación de 467 pb. Para *Y. ruckeri* se utilizó un PCR con cebadores YER8, YER10, lo cual genera un producto de 575pb. Las bacterias fueron detectadas en los tres tipos de muestras. En el caso de *P. salmonis* un 9,3% de los individuos resultaron positivos y la distribución porcentual por órganos fue de: hígado 6,9%, bazo 4,6% y riñón 6,9%. Para *Y. ruckeri* sólo un individuo fue positivo (2,3%) para todos los órganos. Este trabajo es la primera evidencia de la presencia de *P. salmonis* en Perú y de *Y. ruckeri* en el Lago Titicaca en el Distrito de Pomata, Puno.

Palabras clave: Piscirickettsiosis, Truchas arcoíris, PCR anidado, *Piscirickettsia salmonis*, *Yersinia ruckeri*.

ABSTRACT

Aquaculture in Peru has grown sharply in recent years, Puno is one of the departments with most production of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). As a result of this growth and the lack of national egg production, its import from different countries has increased. In this regard, there is a high risk of introduction of infectious agents transmitted by vertical transmission as *Piscirickettsia salmonis*, which is currently the biggest health problem associated with high mortality rates in Chilean salmon farming. *P. salmonis* is a pathogenic bacterium that was first isolated in 1989 and is the causative agent of Piscirickettsiosis disease. Currently in the cultivation of rainbow trout in Peru, the main disease in trout is yersiniosis, which is caused by the *Yersinia ruckeri* infectious agent, which generates high economic losses. However, health studies have been restricted to the area of Junín and not to Lake Titicaca, particularly in Puno, where 90% of the production of this species is concentrated. The aim of this research was to determine the presence of *P. salmonis* and *Y. ruckeri* pathogens in Puno, in the District of Pomata. 43 fish were selected of 250 g, at commercial stage at harvest time, with no clinical signs of disease and that were cultured in cage raft. In all animals the following were sampled: liver, spleen and kidney according to the procedures established by the OIE. Reaction technique of nested polymerase chain (PCRA) for detecting *P. salmonis* was performed using two sets of primers: Eub-A, B-Eub, and PS2S, PS2AS resulting amplification product of 467 bp. For *Y. ruckeri* PCR with primer YER8, YER10 was used, which generates a product of 575 bp. Bacteria were detected in all three types of samples. In the case of *P. salmonis* 9,3% of individuals tested positive and the percentage of distribution of organs was: 6.9% in liver, 4.6% in spleen and 6,9% in kidney. For *Y. ruckeri* only one individual was positive (2.3%) for all organs. This study is the first evidence of the presence of *P. salmonis* in Perú and of *Y. ruckeri* in Lake Titicaca, in the District of Pomata.

Keywords: Piscirickettsiosis, rainbow trout, nested PCR, *Piscirickettsia salmonis*, *Yersinia ruckeri*.

INTRODUCCIÓN

En Perú, dentro del ámbito continental, la principal especie cultivada de peces es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). La producción anual de trucha, en el año 2015, fue de 38.440 toneladas, la cual se concentra principalmente en los departamentos de Puno y Junín. Durante el 2015, el Departamento de Puno tuvo una producción de 33.000 toneladas mientras que Junín 898 toneladas (PRODUCE, 2015).

En Puno, el cultivo de truchas se realiza principalmente en jaulas flotantes en el Lago Titicaca y en las lagunas alto andinas, mientras que los cultivos en Junín, en su mayoría son pisciculturas con estanques de concreto en tierra. La comercialización se realiza mayormente en el mercado nacional y porcentajes menores son exportadas a Canadá, Noruega, Suecia, Alemania, Estados Unidos de América, entre otros (Chura y Mollocondo, 2009; PRODUCE, 2015).

En Perú el conocimiento de las enfermedades de la trucha aún está en fase de desarrollo, motivo por el cual estudios del estatus sanitario son de gran importancia para tomar medidas de mitigación adecuadas. Entre los problemas que más dificultan el cultivo, se encuentra en la insuficiente producción local de ovas de buena calidad, ya que los conocimientos de biotecnología de reproducción de peces son escasos. Es por ello que Perú se abastece de ovas embrionadas importadas de diferentes países del mundo, entre ellos Estados Unidos, Dinamarca, España, Irlanda y Chile (PRODUCE, 2015). Debido a la gran cantidad y origen de esas ovas, existen riesgos de importar agentes infecciosos que se transmiten vía vertical.

La importación de ovas embrionadas de trucha arcoíris desde Chile por parte de Perú, desde el mes junio de 2013 hasta el mes enero de 2015, fue de 2.680.000 unidades (SANIPES, 2015). Al respecto, sabiendo que la piscirickettsiosis o SRS es una enfermedad que se transmite vía vertical, es endémica y que es el principal problema sanitario de la salmonicultura en Chile (Rozas y Enriquez, 2014), lo anterior mencionado puede constituirse en un alto riesgo para Perú.

Actualmente en el Departamento de Puno gran parte de las concesiones para centros de cultivo es de origen informal (mayor a un 50%). Por otra parte, existen escasos permisos de habilitación sanitaria de “hatchery”, plantas de procesamiento de productos pesqueros acuícolas y almacenes de piensos autorizados sanitariamente. Además, la falta del cumplimiento de la regulación con respecto a las densidades de cultivo y la falta de laboratorios especializados en el diagnóstico de enfermedades de peces en la zona, determinan que no exista un programa oportuno de monitoreo (PRODUCE, 2015; SANIPES, 2015).

La enfermedad más prevalente en truchas, es la yersiniosis que afecta principalmente a las etapas de alevines y juveniles. Hasta la fecha, sólo existen antecedentes publicados de estudios prospectivos en la zona de Junín (Bravo y Kojagura, 2004). Sin embargo, existe poca información de enfermedades en el Lago Titicaca, Puno donde se concentra el 85 % de la producción de trucha (PRODUCE, 2015).

De acuerdo a lo anterior, en la presente tesis se realizó la detección de *P. salmonis* y *Y. ruckeri*, a partir de muestras de hígado, riñón y bazo, de truchas arcoíris (*O. mykiss*), las cuales se encontraban en el proceso de cosecha para ser comercializadas. Los animales provenían de una empresa que cultiva truchas en balsa jaula, en el lago Titicaca, Distrito de Pomata, Departamento de Puno, donde además se concentra una de las mayores zonas de producción. Para la detección de ambos patógenos se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA

1.1 Acuicultura mundial

La producción mundial de la pesca de captura continental y marítima para el año 2014 fue de 93,4 millones de toneladas métricas (t), mientras que la de acuicultura fue de 73,3 millones. La producción total para ese año alcanzó la cifra de 167,2 millones de toneladas (tabla 1) (FAO, 2016).

Entre los años 2013 y 2015 la pesca de captura fue de 56% y la producción proveniente de la acuicultura fue de 44%, según datos estadísticos proyectados para el 2025 la producción de pesca de captura sería de 48% mientras que la producción de la acuicultura llegaría a 52% de producción. El consumo mundial de la pesca entre los años 2013 y 2015 fue del 50% y el consumo de la producción provenientes de la acuicultura fue de 50% llegando a igualar el consumo de pesca en este último año. Para el año 2025 se estima que el consumo de la pesca sería de 43% mientras que el consumo de la producción de la acuicultura será de 57%. Teniendo en cuenta el comportamiento dinámico de la acuicultura en estos últimos años y la disminución de la pesca de captura a nivel mundial, es probable que el crecimiento futuro del sector pesquero derive principalmente de la acuicultura (FAO, 2016).

Tabla 1. Producción y utilización de la pesca y la acuicultura en el mundo

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
	<i>(Millones de toneladas)</i>					
PRODUCCIÓN						
Pesca de captura						
Continental	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Marítima	79,7	77,9	82,6	79,7	81	81,5
Pesca de la captura total	90,2	89,1	93,7	91,3	92,7	93,4
Acuicultura						
Continental	34,3	36,9	38,6	42	44,8	47,1
Marítima	21,4	22,1	23,2	24,4	25,5	26,7
Total de la acuicultura	55,7	59	61,8	66,5	70,3	73,8
PRODUCCIÓN PESQUERA MUNDIAL TOTAL	145,9	148,1	155,5	157,8	162,9	167,2
UTILIZACIÓN¹						
Consumo humano	123,8	128,1	130,8	136,9	141,5	146,3
Usos no alimentarios	22	20	24,7	20,9	21,4	20,9
Población (miles de millones)	6,8	6,9	7	7,1	7,2	7,3
Suministro de peces comestibles per capita (kg)	18,1	18,5	18,6	19,3	19,7	20,1

Nota: No se contabilizan las plantas acuáticas. Las cantidades totales pueden no coincidir debido al redondeo.

¹ Los datos de esta sección 2014 son estimaciones provisionales.

1.2 Acuicultura en Perú

El cultivo de la trucha arcoíris es una importante actividad económica en Perú. Los principales departamentos con alto potencial acuícola se encuentran en Puno, Piura y Tumbes (Figura 1). Del total comercializado a nivel nacional el 2015, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ocupa el primer lugar con un 90,04%, seguido por la tilapia (*Oreochromis spp*) 4,90%, el langostino (*Litopenaneus vannamei*) 2,16%, la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) 1,30%, también se cuenta con la producción de algunos peces amazónicos emergentes de gran importancia como el Paiche (*Arapaima gigas*), Paco (*Piaractus brachypomus*), y macroalgas que serían un 2,0%. En cuanto a la exportación el langostino lidera con un 67,69%, seguido de la concha de abanico con un 24,10%, luego la trucha con 7%, tilapia con un 1,07% y finalmente el Paiche con un 0,13% (PRODUCE, 2015).

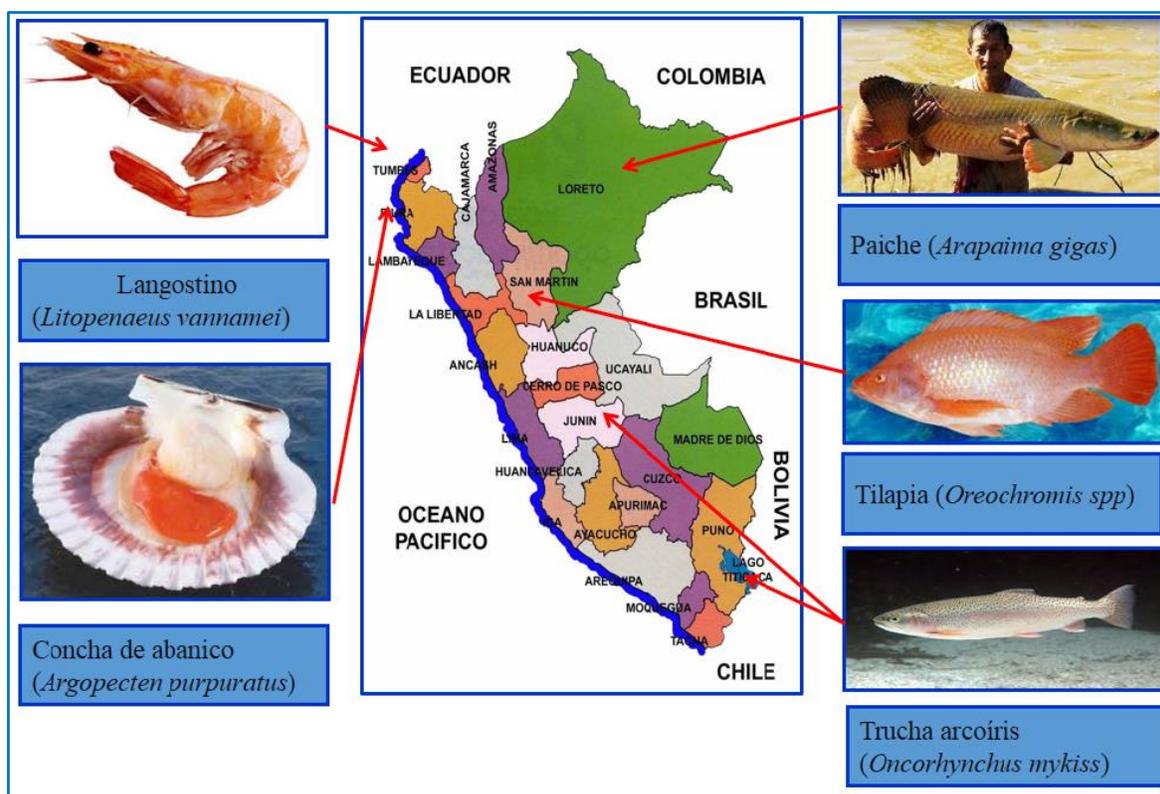


Figura 1. Mapa del potencial acuícola en diversos Departamentos de Perú (modificado de PRODUCE, 2015).

La producción acuícola en Perú para el año 2015 ascendió a más de 85.000 (t), de los cuales el 50% se consumió en el mercado interno, mientras que la restante fue exportada. Con respecto a la producción de truchas, ésta correspondió a un 45% del total producido, alcanzando una cifra récord de 38.440 t al 2015, a nivel nacional, lo cual demuestra un incremento sostenido de la producción entre los años 2003-2015 (Gráfico 1). La principal zona de producción durante el 2015, correspondió al Departamento de Puno con una producción de 33.000 (t) mientras que Junín sólo alcanzó las 898 (t) (Gráfico 2). El primer departamento mencionado, cuenta con un potencial de recursos hídricos sustentado en la existencia de 354 lagunas, 316 ríos, de los cuales el Lago Titicaca es el más importante por sus características limnológicas, que ofrece condiciones excepcionales para la crianza de truchas en jaulas flotantes (Chura y Mollocondo, 2009; MINCETUR, 2006; Flores *et al.*, 2016).

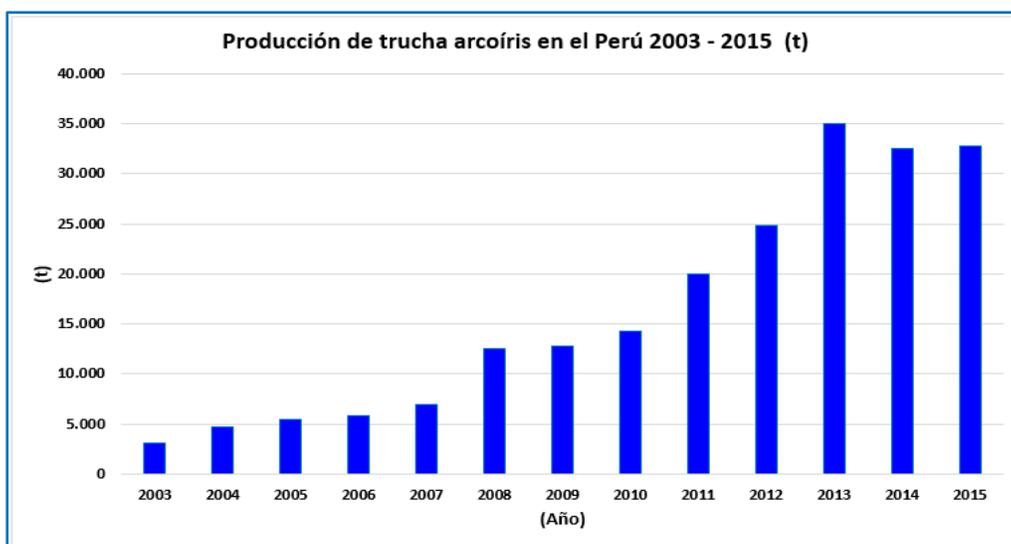


Gráfico 1. Producción de trucha arcoíris en el Perú desde el año 2003 al 2015 expresadas en toneladas métricas (t) (modificado de PRODUCE, 2015).

Las empresas acuícolas que realizan importantes aportes a esta producción en Puno son Piscifactoría de los Andes SAC, River Fish SA y Arapa San Pedro San Pablo SAC, siendo la primera empresa mencionada, la de mayor producción de trucha con un sistema moderno de crianza para destinarla como producto congelado, tanto para el mercado interno como externo.

Además, se provee de pequeñas empresas que, a diferencia, cuentan con infraestructura artesanal. Como principales mercados de la trucha de Puno son Estados Unidos y Canadá, (MINCETUR, 2006).

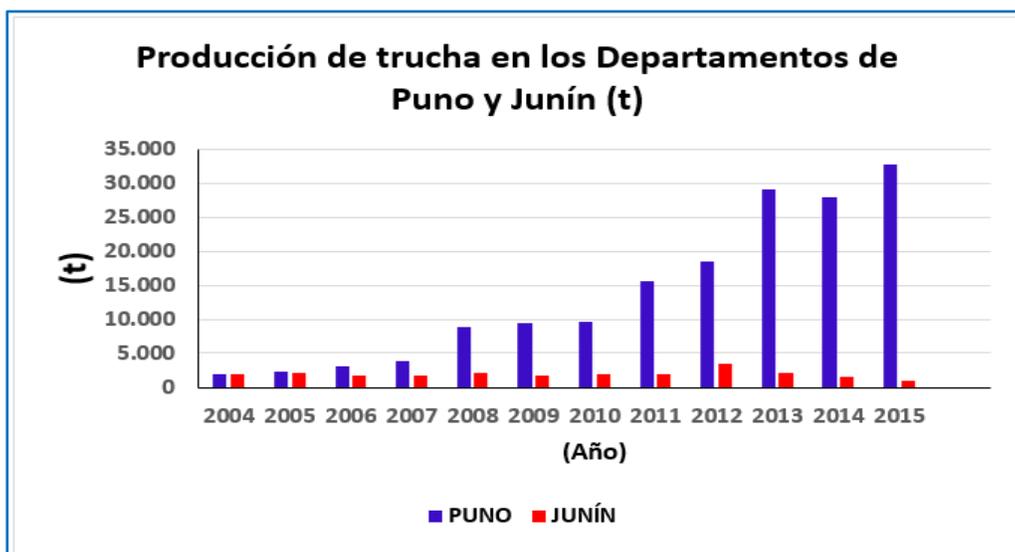


Gráfico 2. Producción de trucha en los Departamentos de Puno-Junín (2004-2015) expresadas en toneladas métricas (t) (PRODUCE, 2015).

2. PANORAMA SANITARIO DE LA TRUCHA EN PERÚ

En forma similar a lo que ocurre en otros países con un desarrollo incipiente de la acuicultura, los problemas sanitarios constituyen uno de los problemas más importantes para los centros de cultivo en Perú, sin embargo, se dispone de poca información acerca de estos (Bravo y Kojagura, 2004; Talavera, 2008). La manifestación de la enfermedad involucra la interacción continua del medio ambiente, el pez y los agentes patógenos. Si esta relación se mantiene en equilibrio, tendremos un pez saludable y eficiente en su crecimiento, por el contrario, si existe un desbalance se originan las enfermedades (Wedemeyer, 1970; Snieszko, 1974).

Dentro de los agentes etiológicos que se han detectado en Perú con respecto a la trucha en los departamentos de mayor producción, Puno y Junín, corresponden bacterias y agente virales. En la zona de Puno, *Flavobacterium psychrophilum* (Gonzales, 2009) y el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPN) (Castro *et al.*, 2014) y en Junín se han detectado enfermedades

asociadas con las bacterias *Yersinia ruckeri* y el hongo *Ichthyophonus hoferi* (Bravo y Kojagura, 2004; Sirvas *et al.*, 2011; Bastardo *et al.*, 2011; Sierralta *et al.*, 2013), *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas sp* y *Pseudomonas sp.* (Leon *et al.*, 2009), *Renibacterium salmoninarum* (Talavera, 2008), *Carnobacterium maltaromaticum* (Chiroque, 2014) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHN) (Castro *et al.*, 2014). Sin embargo, no existe información publicada en revistas indexadas con respecto a *Yersinia ruckeri*, en la zona de Pomata, a pesar de que es aparentemente el principal problema sanitario en trucha arcoíris en Perú.

3. PISCIRICKETTSIOSIS

La piscirickettsiosis o septicemia rickettsial salmonídea (SRS), adquirió relevancia a partir de 1989 en Chile, alcanzando mortalidades descritas de hasta un 90% en salmón coho (Bravo y Campos, 1989; Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.*, 1991). Posteriormente ha sido reportada en otros países como Canadá, Irlanda, Noruega, Estados Unidos y Escocia (Rodgen y Drinan, 1993; Olsen *et al.*, 1997).

La piscirickettsiosis genera pérdidas económicas al año de aproximadamente US\$450.000.000 por conceptos de mortalidad, tratamientos, antimicrobianos y vacunas, siendo la trucha arcoíris la especie con mayor mortalidad para el año 2012, siendo responsable de más de la mitad del total de las mortalidades asociadas con enfermedades infecciosas (Camussetti *et al.*, 2015). Durante el primer semestre del 2014, la enfermedad ocasionó mortalidades asociadas con causas infecciosas en salmón del Atlántico, salmón coho y trucha arcoíris respectivamente, siendo esta última la que mayor mortalidad presentó (SERNAPESCA, 2014).

La piscirickettsiosis es una patología que se presenta principalmente en el mar y estuario (Bravo y Campos, 1989; Fryer *et al.*, 1990) observándose mayor incidencia de la enfermedad, en otoño y primavera (Cvitanich *et al.*, 1991) la temperatura óptima de replicación de este agente en laboratorio oscila en 15 °C y 18 °C (Fryer *et al.*, 1990). Se reportan mortalidades

entre 6 a 12 semanas después de que los “smolts” son transferidos a la fase marina del ciclo productivo, pudiendo durar hasta 10 semanas y luego declinar (Cvitanich *et al.*, 1991).

Así mismo existe información del primer aislamiento de *P. salmonis* desde peces enfermos durante la fase de agua dulce de su ciclo de vida. Los peces afectados fueron obtenidos desde varias instalaciones de agua dulce localizadas en la isla de Chiloé. Las lesiones observadas fueron concordantes con las descritas previamente en los brotes en ambiente marino y las características de crecimiento *in vitro* del aislado correspondieron a las de *P. salmonis* (Gaggero *et al.*, 1995).

3.1 Agente etiológico

La enfermedad es causada por la bacteria intracelular facultativa denominada *Piscirickettsia salmonis*, perteneciente actualmente al orden Thiotrichales de la familia Piscirickettsiaceae (Fryer *et al.*, 1992). Este agente se replica en vacuolas citoplasmáticas de las células hospederas infectadas, es gramnegativa, inmóvil, aeróbica, de forma cocoide, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm . Es observada a menudo como anillos o pares de forma curva (Fryer y Hedrick, 2003). Mediante microscopía electrónica de transmisión se ha observado que el agente tiene en su superficie dos membranas, una externa ondulada y una interna citoplasmática (Fryer *et al.*, 1990; Rojas *et al.*, 2008).

3.2 Especies susceptibles

El agente afecta a diferentes especies de salmónidos cultivados principalmente en el sur de Chile, como salmón coho (*O. kisutch*), salmón chinook (*O. tshawytscha*), salmón del Atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*O. mykiss*) y salmón cereza (*O. masou*) (Cvitanich *et al.*, 1991; Bravo, 1994). También se ha encontrado la presencia del agente *P. salmonis* en especies silvestres cabrilla (*Paralabrax humeralis*) y el jurel (*Trachurus murphyi*) y choritos (*Mytilus chilensis*) (Correal, 1995; Venegas, 1996). pejerreyes de mar (*Odontesthes regia*) (Valdés, 2016).

3.3 Signos clínicos

La enfermedad cursa con signos inespecíficos (Fryer y Lannan, 1996). Generalmente los peces enfermos se ubican en la cercanía de la superficie del agua, preferentemente en las orillas de las balsas-jaulas (Bravo y Campos, 1989), tienen un nado lento, errático, descoordinado y a veces en tirabuzón (Larenas *et al.*, 1995). Presentan coloración corporal oscura y acentuada palidez branquial, lo que refleja una anemia severa, corroborada por los niveles de hematocrito que en peces moribundos corresponde a un 27% o menos (Bravo y Campos, 1989). Los peces moribundos presentan lesiones de piel como erosiones cutáneas y extensas áreas descamadas (Larenas *et al.*, 1995). En cuanto a las lesiones internas, las más consistentes con la enfermedad son la hepatomegalia, renomegalia y esplenomegalia, siendo característica de esta enfermedad la presencia de nódulos subcapsulares cremosos amarillentos en hígado, en cerca del 20% de los casos (Cvitanich *et al.*, 1991). Además, se describe la presencia de ascitis, palidez generalizada, hemorragias petequiales y equimóticas en intestinos, ciegos pilóricos y vejiga natatoria (Almendras y Fuentealba, 1997).

3.4 Transmisión

3.4.1 Horizontal

Esta vía ha sido demostrada experimentalmente tanto en agua de mar como en agua dulce, y en ausencia de vectores (Cvitanich *et al.*, 1991; Almendras y Fuentealba, 1997; Salinas, 1998). Larenas *et al.* (1997), demostraron en truchas arcoíris inoculadas experimentalmente con la bacteria, que la enfermedad produce mayores mortalidades cuando los individuos son sometidos a 14 °C en comparación a 18 °C y 8 °C. Además, en ese mismo trabajo se observó que el aumento de la densidad poblacional produce una mayor mortalidad.

Experimentalmente, la bacteria puede ser encontrada en heces, bilis y orina de truchas arcoíris aparentemente sanas como en moribundas. Esta eliminación es mayor en peces con signos clínicos (Salinas, 1998). En condición de cultivo, la bacteria se ha detectado en las heces de

salmones coho, en las etapas de alevín y engorda (Larenas *et al.*, 2005; Lillo, 2016), y en truchas arcoíris en agua salada (Peirano, 2015).

Diferentes investigadores han demostrado la transmisión horizontal en condiciones de agua dulce, la cual se ve incrementada por el aumento de la densidad poblacional y que conlleva a un mayor contacto entre los peces (Almendras y Fuentealba, 1997; Salinas, 1998). En relación con la penetración de *P. salmonis*, Smith *et al.* (1999), demostraron que las vías de ingreso de entrada más probables del agente, serían piel y branquias intactas. La alta mortalidad de peces inyectados en forma subcutánea, que obtuvieron, sugiere que los ectoparásitos pueden jugar un rol importante en la transmisión natural de la enfermedad.

3.4.2 Vertical

Los primeros antecedentes se originan en un estudio realizado por (Cvitanich *et al.*, 1991), quienes encontraron la presencia del agente en frotis de diversos órganos, incluidos ovarios, fluido ovárico y testicular de peces inoculados *in vitro*. Bravo (1994), describió el primer caso de piscirickettsiosis en agua dulce, que afectó a truchas arcoíris provenientes de ovas importadas desde los Estados Unidos de América y cultivadas en el Lago Llanquihue. El diagnóstico fue confirmado mediante Giemsa e inmunofluorescencia indirecta (IFI) donde se detectó el microorganismo en frotis de órganos de peces enfermos, motivo por el cual sugiere una posible transmisión vertical.

En un estudio realizado por Larenas *et al.* (1996), se obtuvieron ovas al estado de ojo infectadas con la bacteria, las cuales provenían de la cruce entre reproductores de trucha arcoíris machos y hembras inoculados intraperitonealmente IP con el microorganismo. La bacteria fue encontrada mediante IFI (inmunofluorescencia indirecta), en escasa a moderada cantidad dentro de la ova y fluido seminal, así como en el fluido ovárico de reproductores inoculados. En un trabajo similar, se ha demostrado la transmisión vertical en alevines de trucha arcoíris. La infección probablemente ocurre durante el proceso de fertilización (Larenas *et al.*, 2003; Solis, 2002).

Mediante el uso de microscopía electrónica de barrido, Larenas *et al.* (2003) observaron que, a los 45 segundos de contacto de las ovas con la bacteria, ésta puede adherirse a su superficie mediante unas prolongaciones que se les denominó “Complejo de Adhesión Piscirickettsial” (CAP). En tanto, a los cinco minutos de exposición, se evidenciaron bacterias en el interior de la ova. El CAP ha sido demostrado para las cepas LF-89 y SLGO-95 (Quinteros, 2005).

3.5 Métodos de diagnóstico

Las técnicas más utilizadas para la confirmación diagnóstica de *P. salmonis* son la tinción Gram y Giemsa. También se realiza la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Otro método es el aislamiento de *P. salmonis* en la línea celular CHSE-214, libre de antibiótico y fungistático (Fryer *et al.*, 1990; Lannan *et al.*, 1991). Esta última es de baja utilización, como rutina en el diagnóstico, debido a la alta probabilidad de contaminación de los cultivos celulares. La técnica de PCR anidada, desarrollada por Mauel *et al.* (1996), es la técnica recomendada por el Manual de Pruebas de Diagnóstico Para los Animales Acuáticos OIE (2006), para la identificación del agente y permite detectar las cinco cepas de *P. salmonis* reconocidas. Es una técnica rápida, sensible y específica. Produce un amplificado de 467 pares de bases (pb) y puede diferenciar cepas, lo cual no es posible mediante IFI.

4. YERSINIOSIS

Yersiniosis, enfermedad entérica de la boca roja o ERM (por su acrónimo del inglés “Enteric Redmouth Disease”), es un problema sanitario que genera un gran impacto económico en la producción de salmónidos, afectando principalmente a la trucha arcoíris en etapas de agua dulce (Ewing *et al.*, 1978; Tobback *et al.*, 2007; Orozova *et al.*, 2015). El agente etiológico fue aislado por primera vez en la década de 1950, en Estados Unidos de América (Rucker, 1966). A partir de esa fecha el patógeno se ha aislado de otras especies y ha sido detectado en diferentes partes del mundo, entre ellos América del Norte, Europa (Tobback *et al.*, 2007)

Australia (Bullock *et al.*, 1977), Sudáfrica (Bragg y Henton, 1986), Venezuela (Alvarez *et al.*, 1992) y en Chile y Perú (Bravo, 1993; Bravo y Kojagura, 2004).

En Perú, *Y. ruckeri* fue aislada y caracterizada por primera vez en el Departamento de Junín (Bravo y Kojagura 2004). Posteriormente también fue detectada por Bastardo *et al.*, (2011) y Sirvas *et al.*, (2012). Todos los estudios con respecto al agente etiológico de *Yersinia ruckeri* fueron detectadas en esta zona. Afecta principalmente el cultivo de trucha arcoíris produciendo importantes pérdidas económicas (Sierralta *et al.*, 2015).

4.1 Agente etiológico

Corresponde a la bacteria *Yersinia ruckeri*, un bacilo curvo de bordes redondeados gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, de un tamaño aproximado de 0,75 μm de diámetro y entre 1-3 μm de longitud, no posee cápsula ni forma esporas y a menudo presenta un flagelo (Ross *et al.*, 1966; Tobbach *et al.*, 2007).

Las diferentes cepas de *Y. ruckeri* han sido reportadas y categorizadas a base de los serotipos, biotipos y tipos de proteínas de membrana externa. En 1993, el esquema de tipificación se ha actualizado y la especie se subdivide en cuatro serotipos con diferentes subgrupos: El serotipo O1 se subdivide en dos subgrupos O1a (serotipo I) y O1b (serotipo III) y el serotipo O2 (serotipo II) en tres subgrupos O2a, O2b y O2c. Los serotipos restantes se designan como serotipo O3 (serovar V) y el serotipo O4 (serovar VI). La gran mayoría de epizootias en los salmónidos es causada por el serotipo móvil O1a (Romalde *et al.*, 1993).

La bacteria posee toxinas extracelulares como la proteasa Yrp1 que degrada las estructuras extracelulares y la membrana basal, causando alteración de la misma y provocando la erosión de los vasos capilares y por ende microhemorragias en ciertas áreas como la boca y el intestino. Así mismo, posee la hemolisina YhlA capaz de lisar los eritrocitos (Fernández *et al.*, 2003).

Por otro parte la ruckerbactina está relacionada con la adquisición de hierro, en condiciones de carencia de hierro in vitro, y también durante la infección. La capacidad de obtención del

hierro del medio ambiente es un requisito esencial para el desarrollo del proceso de infección por *Y. ruckeri* (Fernández *et al.*, 2004).

4.2 Especies susceptibles

Afecta a diferentes especies. Se ha descrito en carpa (*Cyprinus carpio*) (Enriquez *et al.*, 1987) también a los salmónidos, especialmente a la trucha arcoíris (Tobback *et al.*, 2007). En Chile se ha descrito en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) Bravo (1993). En Perú en trucha arcoíris (*O. mykiss*) (Bravo y Kojagura, 2004).

4.3 Signos clínicos

El agente patógeno puede afectar a los peces de todas las etapas del cultivo, pero es más aguda en los peces alevines y juveniles, normalmente es más crónica en peces adultos. Los brotes de la enfermedad comienzan con mortalidades de un nivel bajo, que se mantienen con el paso del tiempo lo que resulta en altas pérdidas, como síntomas clínicos se evidencia cambios en el comportamiento, incluyendo natación cerca de la superficie, letargia y pérdida de apetito. Otros signos externos incluyen exoftalmia y oscurecimiento de la piel, hemorragias subcutáneas en la boca y garganta. Además, al momento de la necropsia se pueden observar petequias en la superficie del hígado, páncreas, intestino ciegos pilóricos, vejiga y en los músculos laterales. A menudo existe esplenomegalia y congestión del bazo este puede llegar a ser de color casi negro (Tobback *et al.*, 2007). Además, el intestino grueso puede estar lleno de fluido opaco de color amarillento (Horne *et al.*, 1999).

4.4 Transmisión

4.4.1 Horizontal

La bacteria se transmite de forma horizontal, por contacto directo entre los peces. Se elimina por las heces de peces afectados y portadores hacia el ambiente acuático, pudiendo estar presente en el agua por largos períodos lo que dificulta su control en centros de cultivo (Hunter *et al.*, 1980; Fernández *et al.*, 2007). La bacteria puede sobrevivir por lo menos dos meses

fuera del huésped (Busch y Lingg, 1975). Las branquias son la principal puerta de entrada del patógeno, también puede invadir el tejido intestinal de trucha arcoíris (Tobback *et al.* 2009; Tobback *et al.*, 2010).

Se realizó el aislamiento de una cepa de *Y. ruckeri*, que fue capaz de formar biopelículas sobre los soportes sólidos los cuales se encuentran con frecuencia en los tanques de peces de granja de cultivo Coquet *et al.* (2002). Estas biopelículas son reportadas por ser una fuente de infección recurrente en las instalaciones de trucha arcoíris. La propagación también se ha ligado a vectores, que incluyen invertebrados acuáticos y aves (Willumsen, 1989).

4.4.2 Vertical

En un estudio realizado por Sauter *et al.* (1985), recuperaron *Y. ruckeri* de huevos no fertilizados desinfectados de salmón Chinook cuya descendencia experimentó una baja mortalidad desde la fertilización hasta las 12 semanas de alimentación. Ellos sugieren que *Y. ruckeri* puede transmitirse verticalmente.

El reciente descubrimiento de ADN de *Y. ruckeri* en huevos no fertilizados y fluido ovárico de salmón Chinook (*O. tshawytscha*), sugiere que el patógeno podría transmitirse verticalmente. Sin embargo en este estudio realizado no pudo comprobar la aparición de células bacterianas dentro del corion de la ova (Glenn *et al.*, 2015).

4.5 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico se basa en la observación de signos y síntomas junto al aislamiento del patógeno desde muestras de órganos sumado a la identificación. Diferentes métodos de diagnóstico se han desarrollado para *Y. ruckeri*, incluyendo cultivo en Agar Trypticase de Soya (TSA) (Sousa *et al.*, 2001). Puede crecer en una amplia gama de temperaturas, siendo el óptimo entre 20 a 28 °C Toback *et al.*, (2007). Para la caracterización bioquímica se utiliza el API 20E y la confirmación diagnóstica se realiza a través del uso de antisueros específicos en pruebas de aglutinación en placa y técnicas de IFI (Smith *et al.*, 1987). La técnica de PCR

proporciona resultados más confiables, más rápidos y se considera de alta sensibilidad comparado con los métodos convencionales, tiene la ventaja de ser capaz de detectar niveles bajos de *Y. ruckeri* y proporcionar así la posibilidad de detectar a los portadores asintomáticos, esencial para evitar la transmisión y propagación (Gibello *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta los riesgos sanitarios que conlleva la falta de reportes sanitarios en la zona de Pomata en el Departamento de Puno y la ausencia del cumplimiento de las normas sanitarias, permitirían entre otros la entrada de agentes y enfermedades infectocontagiosas a través de las ovas importadas, ya que casi el 100% de la producción de trucha arcoíris se sostiene en base a ellas y las altas densidades poblacionales de cultivo en la zona, en la presente tesis se realizó un estudio para establecer la evidencia de los agentes patógenos *P. salmonis* y *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando la técnica de diagnóstico de PCR.

HIPÓTESIS

Existe evidencia de *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivos de balsas jaula en la zona de Pomata del Lago Titicaca del Departamento de Puno, Perú.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERAL

Establecer la evidencia de los agentes patógenos *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivos de balsas jaula del Lago Titicaca en el Distrito de Pomata en el Departamento de Puno, Perú.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la evidencia de *Piscirickettsia salmonis* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivo de balsa jaula en el Distrito de Pomata, Departamento de Puno, Perú.
2. Establecer la evidencia de *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivo de balsa jaula en el Distrito de Pomata, Departamento de Puno, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Geografía del lugar de estudio y muestreo

La zona de estudio está ubicada en el Distrito de Pomata, Provincia de Chucuito, Departamento de Puno, ubicado al sur de Perú.

Las muestras fueron recolectadas desde un centro de cultivo intensivo de trucha arcoíris, cultivadas en balsas jaula, en la zona de Pomata en el Lago Titicaca. La empresa se ubica en la zona de Pomata a una altitud de 3.863 m.s.n.m y tiene una producción de 20 toneladas mensuales. La zona se caracteriza por tener un clima frío y seco. Las muestras fueron tomadas el 26 de febrero de 2015, en época de lluvias, con una temperatura promedio del agua entre 15 a 16 °C y oxígeno disuelto de 7 mg/L y con un pH de 8,38 (Cárdenas, 2013). La empresa abastece sus productos al mercado nacional e internacional (figuras 2 y 3).



Figura 2. Zona de estudio Lago Titicaca Distrito de Pomata Departamento de Puno, Perú.
(Foto. Dina Mamani)



Figura 3. Zonas de producción de trucha arcoíris del Distrito de Pomata y zona de muestreo (Modificado de PRODUCE 2009).

2. Tamaño de muestra

Debido a que no existe información de estudios de prevalencia en el Distrito de Pomata, Puno, para estimar el tamaño de la muestra se consideró los antecedentes de *Y. ruckeri* aportados por Bravo y Kojagura (2004) y Bueno (2012) en la zona de Junín, y los reportados por Larenas *et al.* (2003) para animales infectados verticalmente con *P. salmonis*. La prevalencia inferior estimada (10%), se utilizó para establecer un tamaño muestral teórico según recomendaciones de la OIE (2006) (Tabla 2). Considerando un lote de 4.000 animales, se estableció un número mínimo de 27 peces. Sin embargo, debido a las posibilidades en terreno se decidió finalmente aumentar el tamaño muestral a 43 peces.

Tabla 2. Tamaño de muestra aleatoria en función de prevalencia estimada de un patógeno en el lote (Tomado de Manual de Pruebas de Diagnóstico Para los Animales Acuáticos, (OIE, 2006)

Tamaño de lote	Tamaño de la muestra a prevalencia del 2%	Tamaño de la muestra a prevalencia del 5%	Tamaño de la muestra a prevalencia del 10%
50	50	35	20
100	75	45	23
250	110	50	25
500	130	55	26
1000	140	55	27
1500	140	55	27
2000	145	60	27
4000	145	60	27
10.000	145	60	27
100.000 o más	150	60	30

3. Obtención de las muestras

Las muestras de trucha arcoíris cultivadas en balsas jaula en la zona de Pomata en el Lago Titicaca, fueron seleccionados en un muestreo por conveniencia durante el proceso de faenamiento, antes de pasar a la planta de proceso la cual se encuentra ubicada a 10 minutos del centro de cultivo lugar donde se realizó la necropsia. Las cuales correspondieron a 43 peces de aproximadamente 250 g los individuos se encontraban en buena condición corporal y sin lesiones externas macroscópicas. Provenían de cosecha diaria para su comercialización, tomándose de cada individuo un “pool” de órganos constituidos por: hígado, bazo y riñón, los órganos fueron recolectados siguiendo las recomendaciones realizadas por la (OIE, 2006; Larenas y Acuña, 2014).

3.1 Necropsia de los peces

Las muestras fueron obtenidas a través de necropsias sobre un mesón de acero inoxidable previamente lavado y desinfectado. Se dispuso de 3 contenedores de cloro al 0,5% para desinfección continua de tijeras mayo, pinza diente de ratón y mango de bisturí. Se utilizaron

guantes desechables únicos para la manipulación de cada pez. Tras cada muestreo se desinfectó el mesón de necropsia y se colocó una bolsa de polietileno nueva para trabajar sobre ella. Antes de realizar la necropsia se colocó el pez encima de la bolsa y se realizó una previa limpieza del pez con un paño desechable embebido con etanol al 70%, posteriormente, se realizó un corte longitudinal con un bisturí en la línea ventral desde el punto medio, entre las aletas pectorales hasta unos 2 cm laterales al orificio anal. Manteniendo al pez en posición lateral derecha. A cada individuo se le extrajo trozos de hígado y bazo, para la extracción del riñón posterior se removió la vejiga natatoria y se extrajeron trozos de riñón de un tamaño no mayor a 0,5 cm³, los cuales después de ser cortados con la tijera fueron tomados con una pinza y estos fueron colocados en un tubo de transporte de 5 mL el cual contenía 3 mL de etanol al 70% el cual fue rotulado y enumerado indicando el número de pez previamente. Es importante señalar que, con el fin de evitar la contaminación entre peces, se utilizó instrumental quirúrgico diferente para la toma de muestra en el cual se realizó una limpieza y desinfección continua de materiales quitando residuos de tejidos en la tijera y bisturí para luego dejarlos en el contenedor con cloro al, 0,5% . En las necropsias se encontraron en algunos casos leve palidez hepática (Figura 4).

Durante la toma de muestras, se utilizó, además, dos hígados de pollo como controles negativos, uno a la mitad del muestreo y otro al final. Siguiendo el protocolo para cada pez muestreado se dejó un control negativo sobre el mesón de necropsia y se tomó un pequeño trozo de este para guardarlo en el tubo de transporte con etanol al 70%, terminado el muestreo de los peces se procedió a guardar la gradilla con las muestras en un “cooler” con bolsas de “gel ice pack” por debajo.

Una vez obtenidas las muestras estas fueron transportadas vía terrestre desde la zona de Pomata, Puno a la ciudad de Tacna y posteriormente fue llevado vía aérea al Laboratorio Nacional de Referencia Para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. En el laboratorio, las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta su procesamiento.

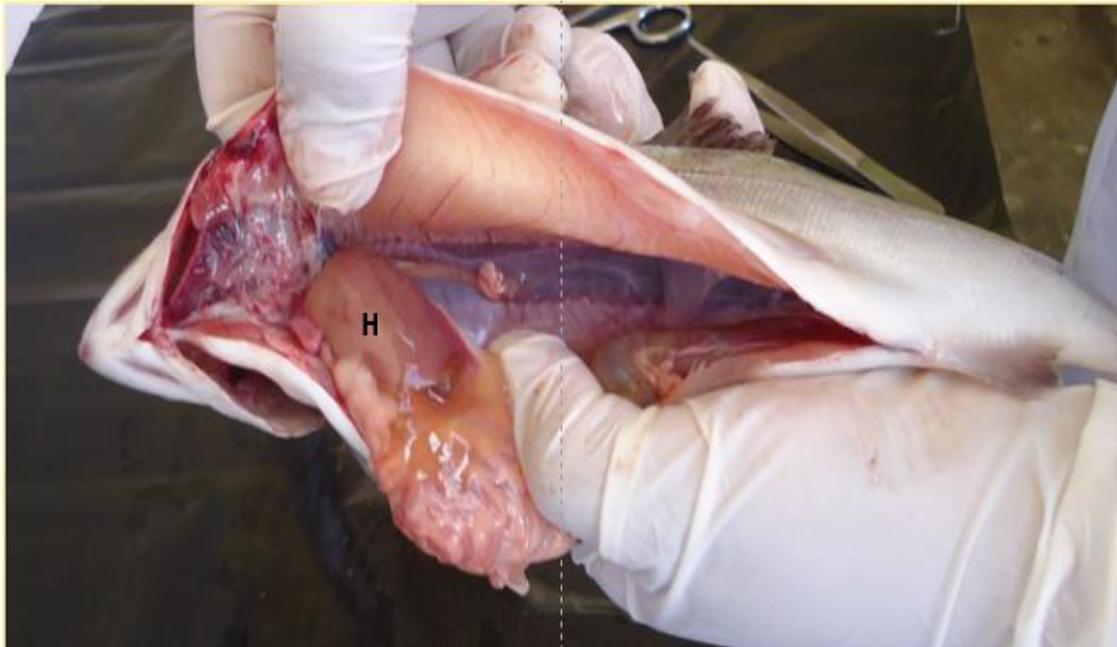


Figura 4. Trucha arcoíris de aproximadamente 250 g. Se observa abierta la cavidad celómica y el hígado (H) con una moderada palidez.

4. Procesamiento de las muestras en laboratorio

Una vez en laboratorio las muestras de hígado, bazo y riñón sumado a la incorporación de los controles negativos de toma de muestra y extracción (hígado de pollo), todas las muestras fueron sometidas a cuatro etapas: 1.- Aislamiento del ADN 2.- Cuantificación del ADN extraído, 3.- Amplificación del ADN mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa y 4.- Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

4.1 Controles negativos

Durante el procesamiento de las muestras se utilizaron diversos tipos de controles negativos como se explica para cada una de las etapas:

- Toma de muestra: hígado de pollo.
- Fase de extracción de ADN: hígado de pollo.
- Fase de amplificación: agua libre de DNAsas.

4.2 Controles positivos

Como control positivo para *P. salmonis*, se utilizó un aislado de campo obtenido a partir de hígado de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) mantenido en medio L-15 y 10% de suero fetal bovino, donado gentilmente por el Dr. Marcos Godoy del Laboratorio Etecma de Puerto Montt. Para la multiplicación de la bacteria en el laboratorio, se utilizó la línea celular CHSE-214, proveniente de embrión de salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), las cuales fueron propagadas usando el medio esencial mínimo (MEM), libre de antibióticos, incubada a 15 °C, según metodología establecida por Fryer *et al.* (1990). La bacteria se utilizó una vez que se observó un efecto citopático cercano al 100%. El sobrenadante fue titulado mediante la dilución punto final en placa, utilizando un título de 10^5 TCID₅₀/mL. Como control positivo, el medio de cultivo fue centrifugado a 5 min a 14.000 x g en una Super Mini Centrífuga Mini-14k (Lab- tec®), el “pellet” obtenido fue colocado en etanol al 70% y utilizado para la extracción de ADN.

Para *Y. ruckeri* como controles positivos se utilizó (ADN) de la bacteria donado también por el Laboratorio Etecma de Puerto Montt.

4.3 Aislamiento del material genético

Para aislar el ADN de cada una de las muestras de los peces (hígado, bazo y riñón) y controles, se utilizó el “kit” de extracción Wizard® (Promega). El procedimiento se realizó cumpliendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ADN desde tejido animal y de acuerdo al protocolo estandarizado del Laboratorio Nacional de Referencia para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Chile y siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante. El protocolo establece en forma resumida las siguientes etapas: Disgregación o fragmentación del tejido, lisis celular, precipitación proteica y purificación del ADN. Para ello se utilizó 12 mg de cada órgano. Para la lisis celular se empleó 600 µL de la solución “Nuclei Lysis Solution” y se homogeneizó el tejido de forma manual mediante el uso de pistilos dentro de tubos eppendorf de 1,5 mL. El lisado obtenido se incubó a 65 °C por 20 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min. Luego se

incorporó 3 μL de la solución “RNase Solution”, se incubó la mezcla a 37 °C por 20 min y luego se enfrió por 5 min en hielo. Se añadió 200 μL de la solución “Protein Precipitation Solution”, se agitó en vórtex a alta velocidad por 20 s, luego se centrifugó por 10 min a 14.000 x g en la Super Mini Centrífuga Mini (Lab- tec®) formándose un “pellet” blanco correspondiendo a la proteína precipitada, seguidamente se removió con cuidado el sobrenadante que contenía el ADN y fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 mL donde se agregó 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente. El tubo fue mezclado suavemente por inversión hasta que se formarán estructuras fibrilares de ADN, luego se centrifugó por 5 min a 14.000 x g a temperatura ambiente, obteniéndose al final de la centrifugación un pequeño “pellet” de color blanco. Se procedió a eliminar suavemente el sobrenadante invirtiendo el tubo y se añadió 600 μL de etanol 70% a temperatura ambiente, se invirtieron suavemente los tubos varias veces para lavar el ADN, se centrifugó por 5 min a 14.000 x g a temperatura ambiente y se eliminó el etanol cuidadosamente invirtiendo los tubos. Posteriormente se pusieron los tubos sobre papel absorbente por 15 min, se les agregó 100 μL de “ADN Rehydration Solution”, se incubó durante toda la noche a 4 °C período después del cual los extractos fueron mantenidos a -20 °C, luego se cuantifico el ADN extraído.

4.4 Cuantificación del ADN

Para la cuantificación del ADN de las muestras extraídas, se utilizó el “*kit*” comercial QuantiFluor® (Promega). El sistema de detección se basa en un fluorocromo patentado (fluoróforo QuantiFluor® dsDNA Dye) que se une al DNA de doble hebra y que se excita a 504 nm emitiendo una longitud de onda de 531 nm. Para la medición y cuantificación de DNA se utilizó el fluorímetro Quantus® (Promega).

4.5 PCR

4.5.1 Detección de *Piscirickettsia salmonis*

La bacteria fue detectada mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa anidada (PCRa) descrita por Mauel *et al.* (1996), con las modificaciones recomendadas por la OIE (2006) y de acuerdo a los protocolos estandarizados establecidos en el laboratorio Nacional de Referencia Para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas Universidad de Chile.

Durante la etapa de PCR anidada las muestras de ADN de órganos y sus respectivos controles (puntos 4.1, 4.2 y 4.3) fueron procesadas al interior de un gabinete de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BBC 86). La constitución del “Master mix” se preparó en un tubo eppendorf de 2 mL libre de nucleasas, previamente rotulado y sobre una gradilla de “IsoFreeze” (-20 °C) para contener la mezcla de “Mastermix” a utilizar en cada amplificación. Por cada muestra a amplificar (vale decir ADN de las muestras extraídas, cuantificadas y los controles de la técnica), en la amplificación se realizó a un volumen de 25 uL de reacción, en el “Mastermix” se dispuso el tubo eppendorf de 2 mL (6,5 µL de agua libre de nucleasas), (GoTaq® Colorless Master Mix 2X Promega con una concentración final de 1X, 12,5 µL constituido por Taq polimerasa dNTPs (200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y (10 µM de cada uno de los partidores universales de ADNr 16S bacteriano Eub-A, Eub-B y PS2S y PS2AS con una concentración final de 2,5 µL de cada partidor). Todos los reactivos señalados se encontraban almacenados a -20 °C.

Para cada muestra a procesar se dispuso de microtubos de 0,2 mL debidamente rotulados sobre un “Isofreeze” se le agregó 24 µL de la mezcla de PCR previamente preparada y homogenizada y 1 µL de cada muestra a procesar (controles y muestras de ADN extraídos o muestra de ADN amplificado en el caso de la segunda amplificación). Cada ciclo de PCR fue amplificado en un termociclador *PCR Touch 960* marca (Fermelo, Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd.).

Antes de la primera amplificación se configuró una pre-desnaturación inicial a 94 °C durante 2 min y luego cada ciclo de PCR tuvo 1 min de desnaturalación a 94 °C, hibridación a 60 °C por 2 min y extensión 72 °C por 3 min.

Para la primera amplificación se utilizaron los partidores universales de ADNr 16S bacteriano Eub-B (27F) (5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3') y Eub-A (1518R) (5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAN-CCR-CA-3') según Mauel *et al* (1996). Como producto de PCR se esperan fragmentos de ADN amplificados de ADN de 1.491 pb.

Para la segunda amplificación se utilizaron los pares de partidores específicos para el ADN de *P. salmonis* PS2S (223F) (5'-CTA-GGA-GAT-GAG-CCC-GCG-TTG-3') y PS2AS (690R) (5'-GCT-ACA-CCT-GAA-ATT-CCA-CTT-3') descritos por la OIE (2006) y diseñados a partir de la secuencia de 16S de ADNr de 5 cepas de *P. salmonis* (LF-89, EM-4-90, ATL-4-9, NOR-92, SGLO-94). Como producto de PCR se esperan fragmentos de ADN amplificados de 467 pb según Mauel *et al.* (1996). En la segunda amplificación las temperaturas y los tiempos variaron de acuerdo a un estudio previo de gradiente, lo que se expone en el punto 4.5.1.1. La temperatura de pre-desnaturación inicial fue 92 °C por 5 min, desnaturalación fue 94 °C por 1 min, hibridación 64,5 °C por 1 min y extensión 72 °C por 1 min. Una vez logrados los productos de PCRa, estos fueron mantenido en congelación -20 °C hasta el momento de la electroforesis. Los diferentes tiempos temperaturas, para cada una de las amplificaciones se muestran en la tabla 3.

4.5.1.1 Gradiente de temperatura para PCR anidado *P. salmonis*

Para la segunda amplificación, se realizó previamente un estudio de gradiente en el termociclador, con el fin de establecer la temperatura de alineamiento más adecuada de hibridación para los partidores, modificándose de esta manera lo establecida previamente por Mauel *et al.* (1996). Las temperaturas de hibridación que se utilizaron para el estudio de gradiente fueron: 59 °C, 61,2 °C, 62,5 °C, 63,8 °C, 64,5 °C y 65 °C. Para el cálculo de las temperaturas de hibridación de los oligos se realizó mediante el cálculo de Tm (“*Melting temperature*”) y se refiere a la temperatura a la que se hibridan o se pegan los oligonucleótidos

en los sitios que son complementarios. Este proceso dependerá principalmente del tipo de uniones (dobles o triples enlaces de hidrógeno) que formarán sus bases, y por eso la secuencia de cada oligo es la que se toma en cuenta para conocer cuál es la temperatura óptima para su alineamiento, para ello se utilizó la fórmula.

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

(G+C): número de G y de C en el cebador

(A+T): número de A y T en la imprimación

Una vez terminada la segunda amplificación, las muestras amplificadas fueron retiradas del termociclador y almacenadas a -20 °C de temperatura hasta la realización de la electroforesis.

Tabla 3. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados para la primera y segunda amplificación de PCR anidado para la detección de *Piscirickettsia salmonis*.

Primera Amplificación				Segunda Amplificación		
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturación	94	2	1	92	5	1
Desnaturación	94	1	35	94	1	35
Hibridación	60	2		64,5*	1	
Extensión	72	3		72	1	

* Temperatura utilizada de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de gradiente.

4.5.1.2 Electroforesis

Para la visualización de las muestras de ADN amplificado se realizaron electroforesis, realizadas en gel TBE (Tris, Borato y EDTA) de agarosa al 2% con la tinción Gel Red® (Biotium) como método de detección del ADN. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 a 3.000 pb (AccuRuler 100 pb ADN RTU Ladder, Maestrogen®). En el primer bolsillo

se cargó una solución compuesta por 2 µL del marcador y 2 µL de Orange/Blue (Promega) como colorante de carga. Los demás bolsillos se cargaron con una mezcla de 2 µL de Orange/Blue y 5 µL del ADN amplificado diluido 1:10 en “buffer” TBE 1X. La corrida de electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis (Fermelo®) a 70 V por 150 min utilizando una fuente de poder *Voltronic* (Nyxtechnik). Para la visualización de las bandas de ADN en el gel de agarosa al 2% se utilizó un sistema de fotodocumentación de geles (BioTop modelo Biosens SC750, Lab-tec) en el cual se obtuvieron las fotografías del gel de agarosa.

4.5.2 Detección de *Yersinia ruckeri*

La bacteria fue detectada mediante la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) descrita por Gibello *et al.* (1999), con modificaciones realizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia Para el Diagnóstico de Enfermedades de Especies Hidrobiológicas de la Universidad de Chile.

Durante esta etapa de PCR las muestras de ADN de órganos y sus respectivos controles (puntos 4.1, 4.2 y 4.3) fueron procesadas al interior de un gabinete de bioseguridad (BIOBASE, modelo 11231 BBC 86). El procedimiento de amplificación fue similar a los descrito para *P. salmonis* con la única diferencia que se utilizaron un juego de partidores específicos para la detección de ADN de *Yersinia ruckeri* por lo que se utilizaron los partidores cuyas secuencias son YER8 (5’GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3’) y YER10 (5’GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3) Gibello *et al.* (1999). En la amplificación se producen fragmentos de ADN de 575 pb.

Para la amplificación, la temperatura de hibridación se utilizó de acuerdo a un estudio de gradiente, lo que se expone en el punto 4.5.2.1 El tiempo de pre-desnaturación inicial fue de 92 °C por 5 minutos, desnaturalización fue 94 °C por 1 minuto, hibridación 61,2 °C por 1 minuto y extensión 72 °C por 1 minuto y tubo 35 ciclos.

Los diferentes tiempos y temperaturas, para cada una de las amplificaciones se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Temperaturas, tiempos y ciclos utilizados para la amplificación de PCR para la detección de *Yersinia ruckeri*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturación	92	5	1
Desnaturación	94	1	35
Hibridación	61,2*	1	
Extensión	72	1	

* Temperatura utilizada de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio de gradiente.

4.5.2.1 Gradiente de temperatura para PCR *Y. ruckeri*

Para la amplificación, se realizó previamente un estudio de gradiente, con el fin de establecer la temperatura más adecuada de hibridación para los partidores, modificándose de esta manera lo establecido previamente por Gibello *et al.* (1999). Las temperaturas de hibridación que se utilizaron fueron: 58,3 °C, 59,1 °C, 59,7 °C, 60,5 °C, 61,2 °C, 61,8 °C, 62,4 °C, y 62,5 °C (tabla 3). Una vez terminada la amplificación fueron retiradas del termociclador y almacenadas a -20 °C de temperatura hasta la realización de la electroforesis en gel de agarosa al 2%, tal cual fue mencionado para *P. salmonis* en el punto 4.5.1.1.

RESULTADOS

Geografía del lugar de estudio y muestreo

La zona de estudio está ubicada en el Distrito de Pomata, Provincia de Chucuito, Departamento de Puno, ubicado al sur de Perú. La empresa de donde fueron obtenidas las muestras, realiza un monocultivo intensivo en balsas jaulas metálicas, octogonales de 8 x 8 m, con una profundidad de 8 m y una densidad poblacional de producción de 15 kg/m³. La producción de la empresa es de 20 t mensuales. El centro de producción se encuentra cercano a otras empresas que producen en jaulas artesanales (la mayoría de madera), las cuales se encuentran a 60 m aproximadamente unas de otras.

Obtención de las muestras

Las truchas muestreadas provenían de ovas importadas de la empresa Troutlodge de EE. UU. y se encontraban en etapa de engorda y proceso de cosecha diaria para su comercialización con tiempo de producción de 6 meses de 250 g aproximado de peso.

El tamaño muestral en el presente estudio fue de 43 individuos, considerando tres análisis por cada uno de ellos (hígado, bazo y riñón). Mas dos controles negativos, los cuales fueron utilizados para la detección de *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri*.

Los animales muestreados estaban clínicamente sanos no presentaban lesiones externamente ni internamente, solo en un animal se pudo observar una leve palidez hepática.

Aislamiento y cuantificación del material genético

Una vez obtenido el extracto de ADN, se realizó la cuantificación de ADN utilizando el “kit” comercial QuantiFluor® (Promega). Los valores obtenidos se muestran en la tabla 5. Los valores de ADN se expresaron en ng/μL. Todos los valores de cuantificación obtenidos se consideraron suficientes para poder realizar la etapa de amplificación.

Tabla 5. Cuantificación del ADN de las muestras extraídas

°N PEZ	HÍGADO	BAZO	RIÑÓN
	H	B	R
1	3,72	25	198
2	14	103	11
4	94	68	68
5	15	81	79
6	101	110	202
7	37	51	219
8	219	199	210
9	103	109	152
10	121	211	97
11	50	193	137
12	141	9,3	98
13	214	214	202
14	194	143	205
15	213	142	211
16	210	218	214
17	111	20	90
18	30	105	106
19	9,7	8,7	72
20	44	72	47
21	95	167	137
22	90	154	12
23	32	88	62
24	85	143	28
25	93	142	40
26	28	162	195
27	11	55	89
28	35	34	80
29	38	7,1	72
30	57	97	188
31	17	53	23
32	190	173	22
33	1,99	146	41
34	24	185	185
35	74	70	102
36	3,85	208	124
37	62	183	185
38	18	219	144
39	3,96	159	51
40	12	0,0727	52
41	14	183	80
42	51	26	58
43	37	0,97	10

* Los valores se expresan en ng/μL.

Gradiente de temperatura para la detección de *Piscirickettsia salmonis*

En la gradiente de temperatura para la segunda amplificación de PCR anidado, de *P. salmonis* se usó un programa de procesamiento de imagen digital “Image J” Anexo 2 con el cual se realizó cuantificación de las bandas marcadas en el gel que se visualiza en la figura 5. mostrando una mejor cuantificación en el área ubicado en el (carril 9) donde se muestra la temperatura de 64,5 °C de hibridación, luego se trabajó la segunda amplificación de PCR anidado con esta temperatura para la detección de *P. salmonis*.

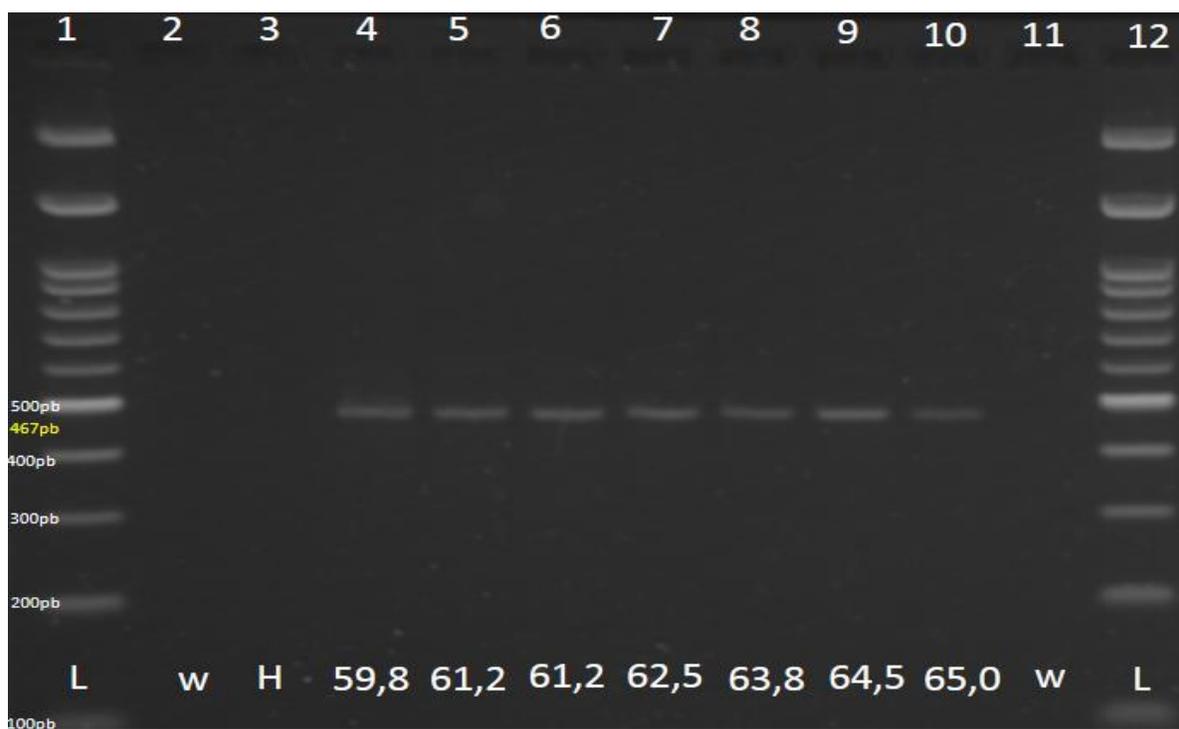


Figura 5. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en gel de agarosa al 2%. Las bandas se corresponden con 467 pb. En la parte superior de la fotografía se muestra la numeración de los carriles. El 1 y 12 son los marcadores de peso molecular (L= *Ladder*). El 2 y 11 corresponden al Control negativo (W= Agua libre de DNAsas). H= Hígado de perro (Control negativo de amplificación). Los carriles 4 al 10 corresponden a amplificación de *P. salmonis* a diferentes temperaturas de hibridación.

Detección de *Piscirickettsia salmonis*

Los controles de muestreo en terreno y de extracción resultaron negativos. Del total de animales muestreados, un 9,3% resultó positivo a la presencia de *P. salmonis*, solo un individuo fue positivo para todos sus órganos de estudio (tabla 6). El hígado, y el riñón fueron los órganos con mayor porcentaje de positividad (3/43, 6,9%), riñón (3/43, 6,9%) y bazo (2/43, 4,6%). La distribución porcentual por órgano y el total se muestra en el gráfico 3. Algunas muestras positivas se muestran en la Figura 6.

Tabla 6. Presencia *P. salmonis* mediante PCR anidado en hígado, bazo y riñón de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en proceso de cosecha obtenidas en el Lago Titicaca, Distrito de Pomata, Puno.

N° PEZ	Hígado	Bazo	Riñón	Resultado por individuo
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	+	+	+
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-

(Continúa)

(Continuación)

17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	+	-	-	+
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	-	-	-	-
42	+	-	+	+
43	+	+	+	+
Total analizados	43	43	43	43
Total positivos	3	2	3	4
% positivos	6,9	4,6	6,9	9,3

* El signo + significa animal positivo y el signo - indica animal negativo

Mediante la visualización del gel de agarosa, se determinó la positividad de las muestras al observarse una banda en gel de agarosa al 2% de 467 pb, de acuerdo a lo publicado por Mauel *et al.* (1996).

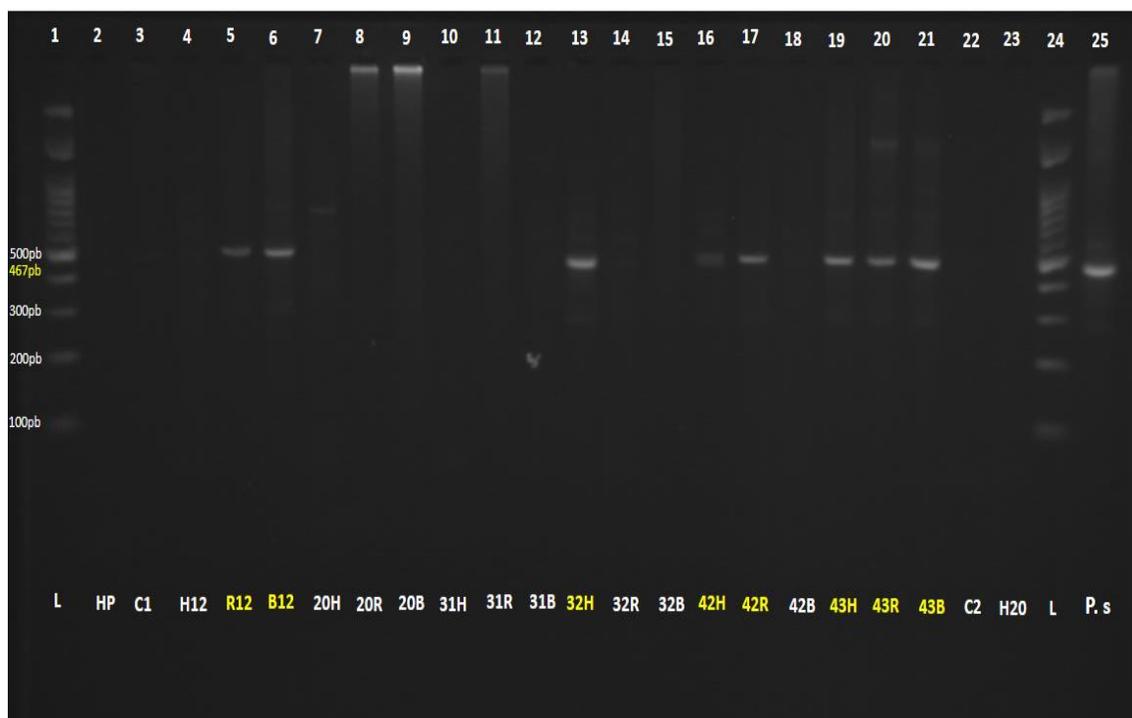


Figura 6. Detección de *Piscirickettsia salmonis*. Visualización de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las bandas se corresponden con 467 pb. Muestras de órganos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) obtenidas en el Lago Titicaca, Distrito de Pomata, Puno, Perú. H= Hígado; R= Riñón; B = Bazo. El número antes de la letra corresponde a la numeración del pez. En la parte superior de la fotografía se muestran los carriles. El 1 y 24 son los marcadores de peso molecular (L= *Ladder*). EL 2 corresponde al Control Negativo (HP= hígado de perro). El 3 y 22 corresponde al control de extracción. El 5-6-13-16-17-19-20-21 corresponden a muestras positivas de (P.s = *P. salmonis*). El 4-7-10-12-14-15-18) (corresponden a muestras negativas). El 8-9-11 muestras indeterminadas. El 23 corresponde al Control negativo (W= Agua libre de DNAsas). El 25 corresponde a un control positivo (P.s= *P. salmonis*).

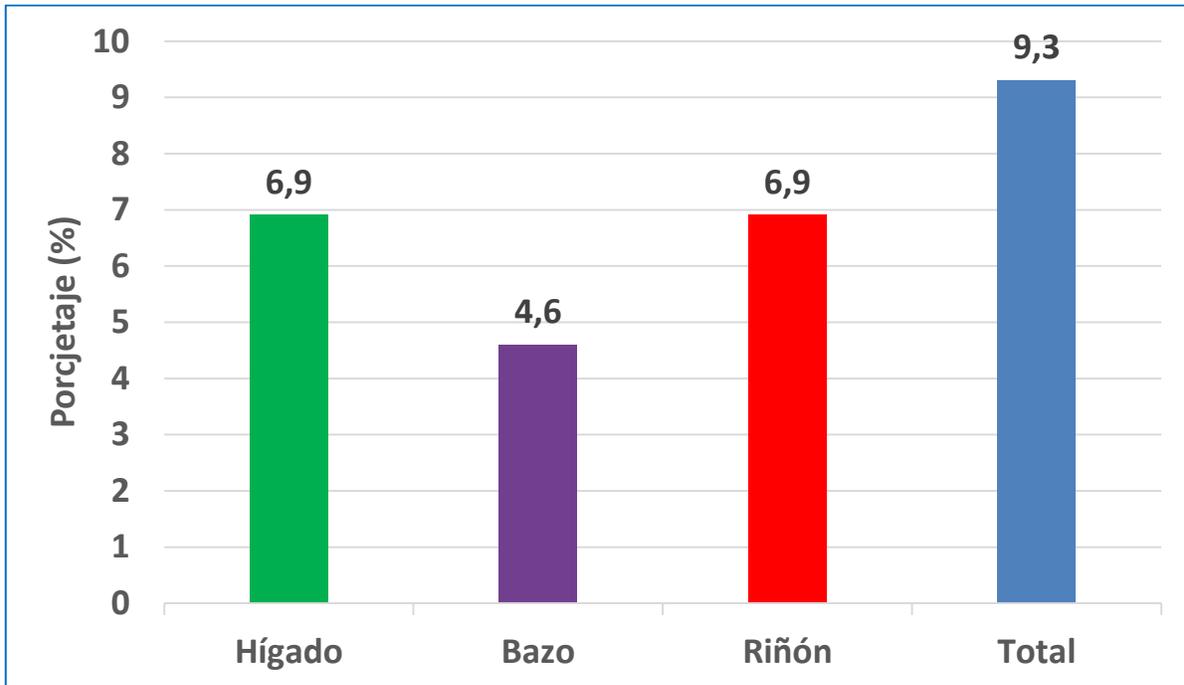


Gráfico 3. Detección porcentual de *Piscirickettsia salmonis* mediante PCR anidado en hígado, bazo y riñón de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en proceso de cosecha obtenidas en el Lago Titicaca, Distrito de Pomata Departamento de Puno, Perú. El total porcentual de animales positivos se muestra en la última columna a mano derecha.

Gradiente de temperatura para PCR *Yersinia ruckeri*

Para realizar el estudio de gradiente, se basó en lo publicado por Gibello *et al.* (1999), utilizando diferentes temperaturas de hibridación para los primers YER8 y YER10. Para establecer la banda de peso molecular se usó el programa de procesamiento de imagen digital “Image J”. Las bandas obtenidas se visualizan en la figura 7, mostrando un mejor resultado la cuantificación en el área ubicada en la temperatura de 61,2 °C (carril 9).



Figura 7. Detección de *Yersinia ruckeri* en gel de agarosa al 2%. Las bandas corresponden a 575 pb. En la parte superior de la fotografía se muestra la numeración de los carriles. El 1 y 14 son los marcadores de peso molecular (L = *Ladder*). El 2, 6, 7 y 13 corresponden al control negativo (W = Agua libre de DNAsas). Los de amplificación de *Y. ruckeri* a diferentes temperaturas corresponden al 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12. Las muestras 3, 4, 5 y 12 resultaron negativas, mientras que la 8, 9, 10 y 11 son positivas. De acuerdo al análisis de imagen mediante el software “Image J” se estableció 61,2 °C como la temperatura óptima de hibridación.

Detección de *Yersinia ruckeri*

Los controles de muestreo en terreno y de extracción resultaron negativos. Sólo un individuo resultó positivo en los tres órganos hígado, bazo y riñón que representa el 2,3% a la presencia de *Y. ruckeri* (1/43). El resultado del gel se observa en la figura 7.

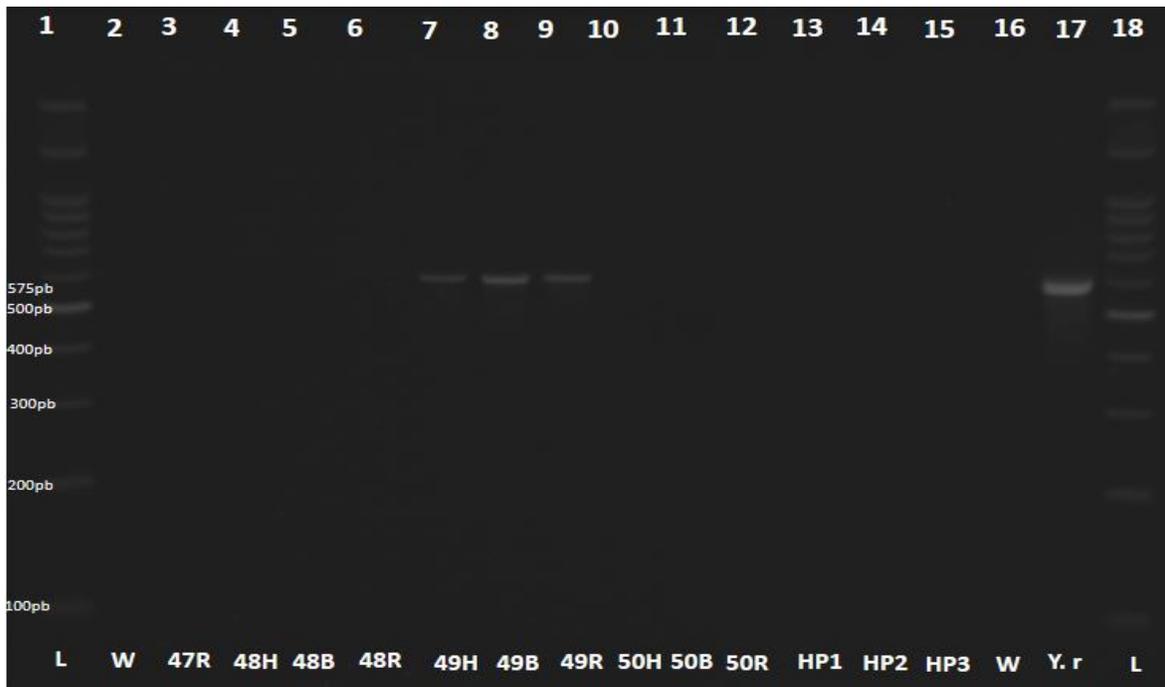


Figura 7. Detección de *Yersinia ruckeri* en gel de agarosa al 2%. Las bandas se corresponden con 575 pb. Muestras de órganos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) obtenidas en el Lago Titicaca, distrito de Pomata, Puno, Perú. H = Hígado; B = Bazo, R = Riñón. El número antes de la letra corresponde a la numeración del pez. En la parte superior de la fotografía se muestran los carriles. El 1 y 18 son los marcadores de peso molecular (L= *Ladder*). El 2 y 16 corresponde al control negativo (W= Agua libre de DNAsas). Los carriles 7, 8 y 9 corresponden a muestras positivas. El 17 es un control positivo (Y. r = *Yersinia ruckeri*). Las muestras del 3 al 6 y del 10 al 15 son muestras negativas.

DISCUSIÓN

La presente tesis tuvo como objetivo principal poder establecer la evidencia de *Piscirickettsia salmonis* y *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivos de balsas jaula del Lago Titicaca en el Distrito de Pomata, Departamento de Puno, Perú. Ambas bacterias se detectaron mediante la técnica de PCR en diferentes porcentajes, llamando la atención que fuera mayor para *P. salmonis* (9,3%) en relación a *Y. ruckeri* (2,3%). Esta sería la primera evidencia de *P. salmonis* en el Perú.

En Perú, *Y. ruckeri* ha sido descrita sólo en dos Departamentos del país, Puno y Junín. En el primero está asociado al cultivo en el Lago Titicaca y zonas aledañas, donde se cultiva principalmente la trucha en balsa jaulas. En el segundo, el cultivo se realiza principalmente en sistemas confinados en estanques en pisciculturas y ocasionalmente, en algunos lagos menores, en sistemas de jaulas.

Con respecto a *Y. ruckeri* en el Lago Titicaca, si bien se ha detectado el agente en diversas zonas, no había sido pesquisada en Pomata. A la fecha, se encuentra disponible un estudio que considera entre otros, el aspecto sanitario que afecta a las truchas cultivadas en el lago y que fue desarrollado en un informe denominado: “Estado de la Calidad Ambiental de la Cuenca del Lago Titicaca Ámbito Peruano” realizado por la “Comisión Multisectorial Para la Prevención y Recuperación Ambiental del Lago Titicaca y sus Afluentes (D.S. N° 075-2013-PCM), trabajo conjunto del Ministerio de la Producción y SANIPES. Esta investigación fue realizada debido a la presentación de una elevada mortalidad de truchas arcoíris (alevines y juveniles). Abarcó entre los años 2012 y 2013 y consideró la detección de agentes infecciosos, medicamentos, sustancias prohibidas y metales pesados en el tejido muscular. En términos generales el informe de la comisión evidencia la presencia de altas concentraciones de metales pesados y metaloides como influencia de la actividad minera y elevadas concentraciones de coliformes fecales debido a la concentración de población humana en las orillas del lago. En cuanto a la presencia de agentes patógenos en truchas, se detectó tres especies bacterianas:

Aeromonas salmonicida, *Flavobacterium psychrophilum* y *Yersinia ruckeri*, evidenciando una mayor incidencia en la zonas de Arapa y Juli. La distribución zonal de acuerdo al año y tipo de microorganismo encontrado se muestra en la figura 9. Recientemente, Sandoval *et al.* (2016) han descrito el primer brote de yersiniosis en el lago, que afectó a alevines de truchas de cultivo con una alta mortalidad y morbilidad (no especificada). La bacteria fue aislada e identificada mediante PCR, sin embargo, no se establece la zona muestreada ni el porcentaje de animales afectados (CMLT, 2014).

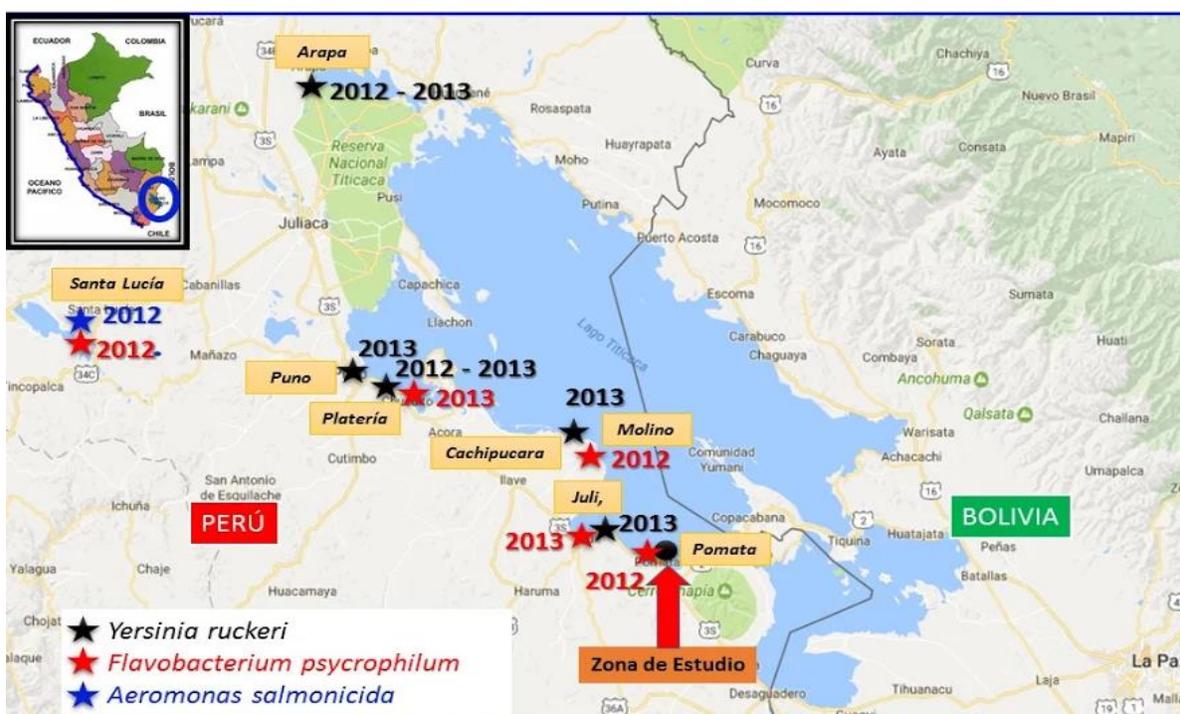


Figura 9. Agentes etiológicos descritos en el Lago Titicaca asociado a cultivos de trucha arcoíris entre los años 2012 y 2013. Los puntos marcados como una estrella representan los focos de detección del agente. En negro se muestra a *Yersinia ruckeri*, en rojo *Flavobacterium psychrophilum* y en azul *Aeromonas salmonicida*. La información se basa en el documento “Estado de la Calidad Ambiental de la Cuenca del Lago Titicaca Ámbito Peruano” (CMLT, 2014).

Reportes previos de agentes patógenos en el Lago Titicaca se circunscriben sólo a estudios en peces silvestres tales como *Orestias spp.* y especies introducidas asilvestradas: Truchas (arcoíris y café) y pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Wurtsbaugh y Tapia, 1988; Dejoux e Iltis, 1991). Al respecto, se ha descrito el parásito *Ichthyophthirius multifiliis* en *Orestias agassii* entre la zona de Pomata y Desaguadero (Wurtsbaugh y Tapia, 1988). No existen otros estudios disponibles en especies silvestres.

Como se mencionó anteriormente, los reportes relacionados con patógenos de cultivo en el Lago Titicaca son escasos (CMLT, 2014; Sandoval *et al.* 2016). Al respecto, no existen estudios de prevalencia en la zona que permitan establecer un tamaño muestral adecuado como base de un proceso de vigilancia y control de la enfermedad. Los estudios realizados durante el 2012 al 2013, no especifican el tamaño de las muestras ni el porcentaje de positividad a *Y. ruckeri* (CMLT, 2014). No existen más antecedentes publicados con respecto a esta bacteria en la zona de estudio.

Con respecto al Departamento de Junín, Bravo y Kojagura (2004) han demostrado la evidencia de presencia de *Y. ruckeri* en cultivos de trucha arcoíris. En dicho estudio, se analizaron, mediante cultivo bacteriológico, un total de 420 peces, considerando tanto peces enfermos como clínicamente sanos. Ello incluyó un total de 45 hatcheries, de los cuales un 68,9% resultó positivo a la bacteria.

Por otra parte, en un trabajo realizado por Bueno (2012), se muestreo un total de 20 truchas de cultivo, 10 de ellas sin síntomas. Los individuos provenían de una piscicultura de Junín, tomándose muestras de bazo, riñón y contenido intestinal. De los peces enfermos, así como de los clínicamente sanos, se logró aislar *Y. ruckeri*, identificándose a través de pruebas bioquímicas, 34 cepas en total. De los peces sanos se aisló la bacteria desde riñón en 9 individuos, lo que equivale a un 45%.

En esta tesis, se evidenció la presencia de *Y. ruckeri* en un solo pez de los 43 analizados, lo que correspondió a un 2,3% del total. Este valor es inferior a los trabajos publicados por Bueno (2012) en la zona de Junín. Como se explicó anteriormente, no existen datos de prevalencia en el Lago Titicaca que permitan comparar los resultados del presente estudio. Sin embargo, en el único trabajo disponible a la fecha (CMLT, 2014), no se detectó *Y. ruckeri* pero sí la presencia de *Flavobacterium psychrophilum* en la zona de Pomata (Figura 9). Ello podría indicar que en la zona de estudio la prevalencia es baja para el agente.

Para la identificación molecular de *Y. ruckeri*, se utilizó la metodología de PCR anidado recomendado por Gibello *et al.* (1999), la cual se basa en la amplificación de una región del ADN que codifica un sector del genoma asociado con el ARN 16S ribosomal. Sin embargo, se ha observado que en peces asintomáticos se reduce la sensibilidad de la técnica, atribuido a la existencia de sustancias inhibidoras en los tejidos y órganos de los animales, como hemoglobina y proteínas séricas de la sangre, grasas, glicógeno y determinados reactivos añadidos durante el procesamiento de la muestra (Gibello *et al.*, 1999; Gibello *et al.*, 2001; Sirvas *et al.*, 2011), ya que estas sustancias inhiben la reacción de PCR y actúan interfiriendo la lisis del microorganismo necesaria para la liberación del ácido nucleico a amplificar (Wilson, 1997). Por ello, Gibello *et al.* (2001) recomiendan realizar un PCR anidado, para aumentar la sensibilidad. Los resultados obtenidos en esta tesis no permiten descartar la posibilidad de interferencia.

Por otra parte, en el presente estudio se detectó por primera vez la evidencia de *P. salmonis* en truchas arcoíris clínicamente sanas, en etapa de cosecha, cultivadas en el Lago Titicaca. Los peces fueron detectados mediante la técnica de PCR anidada (PCRa) de acuerdo a lo descrito por Mauel *et al.* (1996) y modificada según la OIE (2006), en un porcentaje total de 9,3%. Hasta la fecha, la única información disponible corresponde a lo descrito por Yunis *et al.* (2015), quienes mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) no pudieron detectar al agente en la zona de Junín. Ellos analizaron un total de 180 truchas en forma aleatoria de tres pisciculturas, recolectándose muestras de riñón y bazo. Los tejidos fueron sometidos a la

prueba de (IFI). Todas las muestras resultaron negativas a *P. salmonis* a pesar de que algunos individuos presentaron lesiones a la necropsia. Las diferencias en el resultado obtenido, con el presente estudio, podría atribuirse a que corresponden a zonas distintas de muestreo y/o que la técnica diagnóstica utilizada es menos sensible que el PCRa.

El agente etiológico *P. salmonis*, produce la enfermedad denominada piscirickettsiosis o SRS, que produce altas mortalidades en la producción de salmónidos en Chile, según lo descrito por Rozas y Enríquez (2014). De acuerdo a Camussetti *et al.* (2015), las pérdidas económicas para la industria en Chile se han calculado que superan los 400 millones de dólares. En dicho análisis, no se incluyeron varios aspectos relevantes para su control, tales como gastos por el diagnóstico de laboratorio, valor agregado del alimento medicado, gastos asociados con el tratamiento de la mortalidad en sistemas de ensilaje y su retiro continuo desde los centros de cultivo, entre otros. Es por esto, que es muy probable que el valor obtenido esté incluso subestimado. A la fecha, no ha sido posible controlar la enfermedad con quimioterápicos y/o vacunas y los sistemas de vigilancia y control no han logrado reducir las mortalidades. En Chile, la infección por este microorganismo se considera enzoótica en las zonas de cultivo de salmónidos en el mar.

De lo anterior, se puede deducir las consecuencias, sanitarias, económicas y epidemiológicas que podría tener la diseminación de *P. salmonis* en el Lago Titicaca. Frente a esta primera detección, es de suma importancia establecer medidas de contingencia sanitaria que incluya entre otras un estudio prospectivo en las diversas zonas de cultivo que se encuentran en el lago, debiéndose considerar además, la detección en especies silvestres.

Si bien es cierto la piscirickettsiosis ha sido descrita principalmente en agua salada (Fryer *et al.*, 1990; Cvitanich *et al.* 1991; Larenas *et al.*, 1995), también hay evidencia ocasional de su presentación en agua dulce en salmónidos, según lo descrito por Bravo (1994) y Gaggero *et al.* (1995) en el Lago Llanquihue.

En la presente tesis se detectó la presencia del agente en agua dulce en animales asintomáticos, a diferencia de lo descrito por Bravo (1994) y Gaggero *et al.* (1995). No se encontraron lesiones macroscópicas atribuibles a ninguna de las bacterias estudiadas. Este resultado es concordante con lo observado por Larenas *et al.* (2003) y Larenas *et al.* (2005), quienes detectaron la *P. salmonis* mediante inmunofluorescencia indirecta en alevines de salmón coho (*O. kisutch*) y trucha arcoíris infectadas por transmisión vertical y que no presentaban signos, síntomas o lesiones macroscópicas e histológicas. Al respecto, ha sido común la observación de la presencia de esta bacteria en salmónidos de diferentes países del mundo sin presentación de la enfermedad (Brocklebank *et al.* 1992; Kent, 1992; Rodger y Drinnan, 1993; Olsen *et al.*, 1997). Generalmente, la presentación de piscirickettsiosis se ve favorecida por el estrés, altas densidades poblacionales, temperatura del agua (14 °C) y la presencia de otros agentes patógenos (Larenas *et al.*, 1997; Cvitanic *et al.*, 1991).

Debido a las características geográficas del Lago Titicaca, sugiere que *P. salmonis* ingreso mediante la importación de ovas. Al respecto, la información sobre la transmisión vertical de *P. salmonis* es escasa, sin embargo, la evidencia experimental y de terreno indica que ésta se produce, aunque se desconoce su importancia epidemiológica. Aparentemente, los alevines que se encuentran infectados por esta vía no demuestran signos clínicos, pero pueden diseminar el agente a través de las heces. Además, es importante destacar que en general los peces reproductores no se ven afectados por la enfermedad, salvo en aquellos casos donde la virulencia de la bacteria es alta. En tanto, el semen podría ser un factor de diseminación del microorganismo y potencialmente, se puede constituir en un factor de riesgo para zonas libres de la enfermedad o de una determinada cepa (Larenas *et al.*, 2015).

En este estudio, los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de positividad a *Piscirickettsia salmonis* en los órganos de trucha arcoíris fue de 6,9%, tanto para riñón e hígado y en bazo 4,6%. Sólo un individuo presentó positividad en los tres órganos. Según estos resultados se puede apreciar que el bazo no fue indispensable para la detección de peces asintomáticos.

Según lo descrito por Mauel *et al.* (1996), la técnica de PCR anidada aumenta la sensibilidad de la prueba en relación al PCR convencional, lo que permitiría detectar la presencia de la bacteria en estadios iniciales de la infección o desde peces portadores asintomáticos, así como las infecciones subclínicas. A la vez permite un diagnóstico rápido, de alta sensibilidad y especificidad, lo cual se pudo observar en este estudio con respecto a este agente.

Existen numerosos antecedentes de la presencia de *P. salmonis*, no asociado a enfermedad, en diversas especies de peces silvestres y moluscos (Correal, 1995; Venegas, 1996; Vargas, 2014; Contreras-Lynch *et al.*, 2015; Valdés, 2016). Estos estudios, sumado a los resultados de la presente tesis, sugiere la realización de trabajos posteriores buscando la presencia del agente en las especies silvestres presentes en el lago. Al respecto, existen 23 especies endémicas Wurtsbaugh (1988) y tres introducidas. Muchas de ellas se utilizan con fines comerciales, siendo las principales especies extraídas *O. bonariensis*, carachi amarillo (*O. luteus*), ispi (*Orestias ispi*) (IMARPE, 2007).

La detección de fragmentos asociados a *P. salmonis* en la presente tesis, implica necesariamente a futuro secuenciarlos con el fin de poder establecer si corresponde a una cepa en particular del lago y realizar un estudio de filogenia (Fryer *et al.* 1992; Mauel *et al.*, 1996; Marshall *et al.* 1998; Contreras-Lynch *et al.*, 2105). De esta manera, se podría conocer la procedencia del aislado ingresado al país.

Finalmente, en esta investigación se confirmó la evidencia de *P. salmonis* y *Y. ruckeri* en la zona de Pomata. Lo anterior sugiere establecer programas de monitoreos periódicos en las diferentes zonas e implementar programas de prevención y control de las enfermedades. Al respecto, en el año 2004, Bravo y Kojagura, en un brote de Yersiniosis propusieron la implementación de un programa de vacunación, entre otras medidas.

Por otra parte, las implicancias de la evidencia de *P. salmonis* en el Lago Titicaca, incluyen la probabilidad en el futuro de presentación de brotes, con las repercusiones económicas que

podría conllevar y la imposibilidad de controlar la enfermedad. Además, debido a la inespecificidad de la bacteria es posible que se llegasen a afectar especies silvestres, lo cual afectaría el patrimonio sanitario del lago. Por lo anterior, es de vital importancia establecer medidas inmediatas de vigilancia y establecer sistemas de control adecuados del ingreso de ovas al lago.

CONCLUSIÓN

Se estableció la evidencia de *Piscirickettsia salmonis* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) clínicamente sanas en cultivo de balsa jaula en el Distrito de Pomata, Departamento de Puno, Perú. Este es el primer hallazgo de este agente en Perú.

Se estableció la evidencia de *Yersinia ruckeri* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en cultivo de balsa jaula en el Distrito de Pomata, Departamento de Puno, Perú.

LITERATURA CITADA

Almendras, F. and C. Fuentealba. 1997. Salmonid rickettsial septicemia caused by *Piscirickettsia salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 29: 137-144.

Álvarez, J.; B. Austin, and D. Conroy. 1992. First outbreak of enteric redmouth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) cultured in Venezuela. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 6: 189-190.

Bastardo, A.; V. Sierralta; J. León; C. Ravelo and J. Romalde. 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.

Bueno, H. 2012. Caracterización Fenotípica y Molecular de Cepas de *Yersinia ruckeri* Aisladas de *Oncorhynchus mykiss*, del Centro Piscícola “El Ingenio” – Huancayo. Memoria para optar al título profesional de Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo. Lima, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. E. A. P. de Microbiología y Parasitología. U. Nacional Mayor de San Marcos. 75p.

Bullock, G. H. Struckey & E. Shotts. Early records of North American and Australian outbreaks of enteric redmouth disease. *Fish Health News*. 2: 96.

Busch, A. and A. Lingg. 1975. Establishment of an asymptomatic carrier state infection of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 12: 2429-2432.

Bragg, R. and M. Henton. 1986. Isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout in South Africa. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 6: 5 - 6.

Bravo, S. and M. Campos. 1989. Coho salmon syndrome in Chile. *American Fisheries Society/Fish Health Section Newsletter*. 17:3.

Bravo, S. 1993. Disease reported in pen reared salmonids from Chile. *American Fisheries Society/Fish Health Section Newsletter*. 3: 3.

Bravo, S. 1994. Piscirickettsiosis in fresh water. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 14 :137-138.

Bravo, S. y V. Kojagura. 2004. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*. 24: 104-108.

Brocklebank, J.; D. Speare; R. Armstrong; E. Trevor. 1992. Septicemia in farmed Atlantic and chinook salmon due to a rickettsia-like agent. *Fish Health Section Newsletter*. 20: 1.

Camussetti, M.; A. Gallardo; D. Aguilar y J. Larenas. 2015. Análisis de los costos por la utilización de quimioterápicos y vacunas en la salmonicultura. Piscirickettsiosis: una enfermedad sin contrapeso. *Salmonexpert*. 4: 46-49.

CMLT (Comisión Multisectorial Para la Prevención y Recuperación Ambiental del Lago Titicaca y sus Afluentes). 2014. [en línea]. <<http://www.minam.gob.pe/puno/wp-content/uploads/sites/55/2014/02/DS-N%C2%B0-075-2013-PCM-Creaci%C3%B3n-Comision-Multisectorial.pdf>>. (consultado: 04- 12 - 16).

Cárdenas, E. 2013. Determinación del factor de conversión alimentaria para tres dietas alimentarias de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y su relación con los parámetros de temperatura y pH en la zona de producción de faro – Pomata, Provincia de Chucuito Juli Región de Puno. Memoria Título para optar el grado académico de Master en Ciencias con mención en Gerencia, Auditoria Y Gestión Ambiental. Arequipa, Perú. U. Nacional de san Agustín de Arequipa Facultad de Cs Naturales y Formales. 54p.

Castro, T.; C. Peña y E. Mateo. 2014. first report of viral diseases in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. *The Biologist*. 1: 67-75.

Contreras-Lynch, S.; P. Olmos; A. Vargas; J. Figueroa; R. González-Stegmaier; R. Enríquez; A. Romero. 2015. Identification and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* in native fish from southern Chile. *Diseases of Aquatic Organisms* 115: 233-244.

Coquet, L.; P. Cosette; G. Junter; E. Beucher; J. Saiter y T. Jouenne. 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 26: 373-378.

Correal, P. 1995. Prospección de *Piscirickettsia salmonis* en fauna marina silvestre asociada al cultivo intensivo de salmónidos. Memoria título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 62p.

Cvitanich, J.; Garate O.; Smith, C. 1991. The isolation of rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch postulate. *Journal Fish Disease*. 2: 121-145.

Chiroque, T. 2014. Aislamiento e identificación bioquímica de *Carnobacterium maltaromaticum* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de cultivo en el departamento de Junín. Memoria Título Médico Veterinario. Lima, Perú. Fac. Md. Veterinaria. U. San Marcos. 102p.

Chura, R. y H. Mollocondo. 2009. Desarrollo de la acuicultura en el lago Titicaca Perú. *Revista Aqua TIC*. 31: 6-19.

Dejoux, C. & A. Iltis. 1991. El Lago Titicaca. Síntesis del conocimiento limnológico actual. ORSTOM. HISBOL. La Paz. Bolivia. 584 pp.

Enríquez, R. y J. Zamora. 1987. Aislamiento de *Yersinia ruckeri* de carpas (*Cyprinus carpio*) en Valdivia. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 1: 33-36

Ewing, W.; A. Ross; D. Brenner and G. Fanning. 1978 *Yersinia ruckeri* Sp. Nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28: 37-44.

FAO. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2016. The state of world fisheries and aquaculture contributing to food security and nutrition for all [en línea]. <<http://www.fao.org/publications/sofia/2016/en/>> (consultado: 11- 07 - 16).

Fernandez, L.; J. Lopez; P. Secades; A. Menendez; I. Marquez and J. Guijarro. 2003. In vitro and in vivo studies of the Yrp1 proteasa from *Yersinia ruckeri* and Its role in protective immunity against enteric redmouth disease of salmonids. *Applied and Environmental Microbiology*. 12: 7328-7335.

Fernández, L.; I. Márquez and J. Guijarro. 2004. Identification of specific in vivo-induced (ivi) genes in *yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Applied and Environmental Microbiology*. 9: 5199-5207.

Fernandez, L.; J. Mendez and J. Guijarro. 2007. Molecular virulence mechanisms of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Veterinary Microbiology*. (125):1-10.

Flores, E.; A.Yapuchura. 2016. Formación de clusters de productores de trucha y la articulación con el mercado objetivo en la Región de Puno – Perú. *Comuni@cción*.7: 38-48.

Fryer, J.; C. Lannan; L. Garces; J. Larenas, and P. Smith. 1990. Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathology*. 2: 107-14.

Fryer, J.; C. Lannan; S. Giovannoni, and N. Wood. 1992 *Piscirickettsia salmonis* Gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 120-26.

Fryer, J. and C. Lannan. 1996. rickettsial infections of fish. *Annual Review of Fish Diseases*. (6): 3-13.

Fryer, J.; and R. Hedrick. 2003. *Piscirickettsia salmonis*: A gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *Journal of Fish Diseases*. 5: 251-62.

Gaggero.; H. Castro; A. Sandino. 1995. First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during the freshwater stage of their life cycle. *Journal of Fish Diseases*. 18: 277-280.

Gibello, A.; M. Blanco; M. Moreno; M. Cutuli; A. Domenech; L. Domínguez and J. Fernández. 1999. Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 346-350.

Gibello, A.; M. Blanco; L. Domínguez y J. Fernández. 2001. Utilización de la PCR para el diagnóstico en ictiopatología. *Revista AquaTic*. 15: 1-16

Glenn, R.; P. Taylor; E. Pelton; S. Gutenberger; M. Ahrens; L. Marchant, and K. Hanson. 2015. 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: 44-54.

Gonzales, J. 2009. Flavobacteriosis on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Lake Titicaca, Puno, Perú. *The Biologist*. 2: 205 - 215.

Horne, M. and A. Barnes. 1999. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*) in woosuck PTK, Bruno DW, editors. Fish diseases and disorders. Viral, bacterial and fungal infections. Wallingford: CABI Publishing. 445-477.

Hunter, V.; M. Knittel and J. Fryer. 1980. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead Trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. Journal of Fish Diseases. 6: 467-72.

Kent, M. 1992. Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific northwest, Canadian Special Publication and Aquatic Sciences. 116: 17-19.

Lannan, C.; S. Ewing; J. Fryer. 1991. A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. Journal of Aquatic Animal Health. 3: 229-234.

Larenas, J.; L. Hidalgo; H. Garcés; J. Fryer y P. Smith. 1995. Piscirickettsiosis: Lesiones en salmón del Atlántico (*Salmo salar*) infectados naturalmente. Avances en Ciencias Veterinarias. 10: 53-58

Larenas, J.; C. Astorga; J. Contreras y P. Smith. 1996. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en ovas fertilizadas provenientes de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) experimentalmente infectadas. Archivos de Medicina Veterinaria. 28:161-166.

Larenas, J.; J. Contreras; S. Oyanedel; M. Morales y P. Smith. 1997. Efecto de la densidad poblacional y temperatura en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas con *Piscirickettsia salmonis*. Archivos de Medicina Veterinaria. 29: 113-119.

Larenas, J.; J. Bartholomew; O. Troncoso; S. Fernández; H. Ledezma; N. Sandoval; P. Vera; J. Contreras and P. Smith. 2003. Experimental vertical transmission of *Piscirickettsia salmonis* and in vitro study of attachment and mode of entrance into the fish ovum. Diseases of Aquatic Organisms. 56: 25-30.

Larenas, J.; E. Zamorano y P. Smith. 2005. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en heces de alevines de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) infectados por transmisión vertical Monografía Electrónica Patología Veterinaria. 1:59-67.

Larenas, J.; M. Acuña. 2014. Manual de Piscirickettsiosis. [en línea]. <<http://es.calameo.com/read/0008136160a8f2b92eb83>> (consultado: 11-07-2015).

Larenas, J.; J. Quinteros; M. Calderón; M. Acuña. 2015. Revisión sobre la evidencia de transmisión vertical de *Piscirickettsia salmonis*. SalmonExpert 4: 58-60.

León, J.; R. Ávalos and P. Milagros. 2008. *Flavobacterium Psychrophilum* y su patología en alevines de (*Oncorhynchus mykiss*) del centro piscícola el Ingenio, Huancayo. Revista Peruana de Biología. 2: 117-124.

Lillo, E. 2016. Determinación de la presencia y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en heces, hígado y riñón de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) en condiciones de cultivo en mar. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 31p.

Mauel, M.; S. Giovannoni and J. Fryer. 1996. Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*." Diseases of Aquatic Organisms. 26: 189-95.

Mauel M. & D. Miller. 2002. Piscirickettsiosis and piscirickettsiosis-like infections in fish: a review. Veterinary Microbiology. 87: 279-289.

Marshall, S., S. Heat, V. Henríquez, V. and Orrego, C. (1998). Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* via the PCR. Applied and Environmental Microbiology 8: 3066-3069.

MINCETUR (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo). 2006. Plan Operativo de la trucha Región Puno. Lima, Perú. [en línea]. <http://www.dirceturpuno.gob.pe/wp-content/uploads/2011/05/pop_trucha.pdf> >. (Consultado: 25 de julio de 2016).

OIE, World Organization For Animal Health. 2006. Piscirickettsiosis. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals*. 5: 250-256.

Olsen, A.; H. Melby; L. Speilberg; Ø Evensen and T. Håstein. 1997. *Piscirickettsia salmonis* infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Norway - epidemiological, pathological and microbiological findings. *Diseases of Aquatic Organisms*. 31: 35-48.

Orellana, H. 2008. Diseño y desarrollo de un algoritmo que permita estimar el tamaño de peces, aplicando visión por computadora, y propuesta para realizar la selección adecuada de dichos peces. Memoria para optar el título profesional de Ingeniero Electrónico. Lima, Perú. Facultad de Ciencias e Ingeniería. Pontificia Universidad Católica Del Perú. 93p.

Orozova, P.; V. Chikova; and I. Sirakov. 2015. Diagnostics and antibiotic resistance of *Yersinia ruckeri* strains isolated from trout fish farms in Bulgaria. *International Journal of Development Research*. 5: 3013-3019.

Palenzuela, W.; G. Trobridge; and J. Bartholomew. 1999. Development of a polymerase chain reaction diagnostic assay for *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonid fish. *Diseases Of Aquatic Organisms*. 36: 45-51.

Peirano, P. 2015. Determinación de la presencia y asociación de *Piscirickettsia salmonis* en heces, hígado y riñón de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en condiciones de cultivo en mar. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 29p.

PRODUCE. (Ministerio de la Producción). 2009. Informe final. Mejoramiento del catastro acuícola del Departamento de Puno efectuando acciones en diversas áreas del Lago Titicaca y de laguna Lagunillas [en línea]. <<http://faolex.fao.org/docs/pdf/per91837.pdf>> (consultado: 27-10-2015).

PRODUCE. (Ministerio de la Producción). 2014. Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2014. Región Puno, Perú [en línea]. <<http://www.produce.gob.pe/documentos/estadisticas/anuarios/anuario-estadistico-pesca-2014.pdf>>. (consultado: 05-07-2016).

PRODUCE. (Ministerio de la Producción). 2015. Estadística de la cosecha en acuicultura Región Puno, Perú [en línea]. <http://es.slideshare.net/rosahperez3/seminario-internacional-2015?next_slideshow=>1> (consultado: 11-07-2015).

Quinteros, J. 2005. Comparación en la presentación del complejo de adhesión piscirickettsial entre dos cepas de *Piscirickettsia salmonis*. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 54p.

Rodger, H.D., E.M. Drinan. 1993. Observation of a rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Ireland, *Journal of Fish Diseases*. 16: 361-369.

Rojas, V.; J. Olivares; R. del Río and S. Marshall. 2008. Characterization of a novel and genetically different small infective variant of *Piscirickettsia salmonis*. *Microbial Pathogenesis*. 5: 370-78.

Romalde, J. and A. Toranzo. 1993. Pathological Activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric redmouth (ERM) bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 3: 291-300.

Ross, A.; R. Rucker and W. Ewing. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology*. 4: 763-70.

Rozas, M. and R. Enríquez. 2014. Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of Fish Diseases*. 3: 163-88.

Rucker R. 1966. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de L' Office International des Epizooties*. 65: 825-830.

Salinas, G. 1998. Efecto de la densidad poblacional sobre la presentación y transmisión horizontal de piscirickettsiosis en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) inoculadas experimentalmente. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias 65p.

Sauter, R.; C. Williams; B. Celnik. And E. Meyer. 1985. Dept. of Microbiology and Immunology, Oregon health sciences university, etiology of early lifestage diseases, final report. [en línea]. <<http://www.efw.bpa.gov/cgi-bin/efw/FW/publications.cgi>>. (consultado: 10-05-2015).

SANIPES, (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera). 2015. Seminario internacional de la trucha [en línea]. <<http://es.slideshare.net/rosahperez3/seminario-internacional-de-la-trucha-2015-puno>> (consultado: 03 - 09 - 2015).

Sandoval, N.: L. LLanco; A. Manchego y F. Mesías. 2016. Determinación de *Yersinia ruckeri* y susceptibilidad antimicrobiana en alevines de truchas arcoíris cultivadas en el Lago Titicaca - Puno" [en línea]. <<https://www.was.org/meetings/ShowAbstract.aspx?Id=44523>> (consultado: 26 - 12 - 2016).

Sirvas, S.; C. Sánchez y C. Peña. 2011. Diagnóstico e identificación rápidos por PCR de *Yersinia ruckeri* aislada de (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de Canta, Lima, Perú. Revista Peruana De Biología. 3: 349-353.

Sierralta, V.; N. Sandoval; M. Talavera. 2015. Acuicultura. [en línea]. Recuperado en: <<http://www.cmv1.pe/wp-content/uploads/2015/11/Revista-CMVL3.pdf>> (Consultado: 06-05-2016).

Sierralta, V.; J. León; I. De Blas; A. Bastardo; J. Romalde; T. Castro y E. Mateo. 2013. Patología e identificación de *Yersinia ruckeri* en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en piscigranjas de Junín, Perú. Revista Aqua TIC. 38: 28-45.

Servicio Nacional de Pesca y acuicultura (SERNAPESCA). 2014. Informe sanitario salmonicultura primer semestre año 2014 [en línea]. <https://www.sernapesca.cl/presentaciones/PPT_Informe%20Sanitario_1er_Semestre_2014.pdf> (consultado el: 03 de setiembre de 2015).

Snieszko S. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes Journal Fish Biology. 6: 197-208.

SERNAPESCA. (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura). 2014. Informe sanitario. Salmonicultura en centros marinos, Primer semestre. [en línea]. <http://www.sernapesca.cl/presentaciones/PPT_Informe%20Sanitario_1er_Semestre_2014.pdf> (consultado: 11-07-2015).

Solis, A. 2002. Comparación del nivel de presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, fluido celómico y seminal de reproductores de salmónidos de la Décima Región de Chile. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 62p.

Smith, P.; P. Pizarro; P. Ojeda; J. Contreras; S. Oyanedel y J. Larenas. 1999. Routes of entry of *Piscirickettsia salmonis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*.) *Diseases of Aquatic Organisms*. 37: 165-172.

Smith, A.; O. Goldring y G. Dear. 1987. The production and methods of use of polyclonal antisera to the pathogenic organisms *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and *Renibacterium salmoninarum*. *Journal of Fish Biology*. 31: 225-226.

Sousa; Magariños; Eiras, Toranzo; Romalde. 2001. Molecular characterization of Portuguese strains of *Yersinia ruckeri* isolated from fish culture systems. *Journal of Fish Diseases*. 24: 152-159.

Solís, A. 2002. Comparación del nivel de presencia de *Piscirickettsia salmonis* en muestras de frotis renal, fluido celómicos y seminal de reproductores de salmónidos de la Décima Región de Chile. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 62p.

Talavera, L. 2008. Determinación de presencia de *Renibacterium salmoninarum* y caracterización renal de lesiones histopatológicas presentes en truchas arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en crianza comercial. Memoria Título Médico Veterinario. Lima, Perú. U. San Marcos. Fac. Md. Veterinaria 102p.

Tobback, E.; A. Decostere; K. Hermans; F. Haesebrouck and K. Chiers. 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. 30: 257-268.

Tobback, E.; A. Decostere; K. Hermans; J. Ryckaert; L. Duchateau; F. Haesebrouck; K. Chiers. 2009. Route of entry and tissue distribution of *Yersinia ruckeri* in experimentally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Diseases of Aquatic Organisms*. 84: 219-228.

Valdés, L. 2016. Vulnerabilidad del pejerrey de mar (*Odontesthes regia*) frente a *Piscirickettsia salmonis* en la Décima Región, Chile. Memoria para optar al título profesional de Magíster en áreas silvestres y conservación de la naturaleza. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza. 47p.

Vargas G. 2014. Detección de *Piscirickettsia salmonis* en peces silvestres del sur de Chile y en *Caligus rogercresseyi*. Tesis de grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Bioquímica y Título Profesional de Bioquímico. 147p.

Venegas, C. 1996. *Piscirickettsia salmonis*: Prospección en fauna marina asociada a cultivos de salmónidos infectados. Periodo invierno-primavera. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 95 p.

Wurtsbaugh, W.: y R. Tapia. 1988. Mass mortality of fishes in Lake Titicaca (Peru-Bolivia) associated with the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Transactions of the American Fisheries Society. 117: 213-217.

Wedemeyer, G. 1970. The role of stress in the disease resistance of fishes. symposium on disease of fish and shellfishes. Washington, D. C. American Fisheries Society. 55-30.

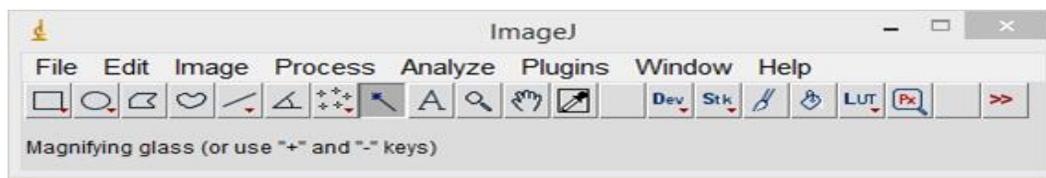
Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleid acid amplification. Applied and Environmental Microbiology. 3741-3751.

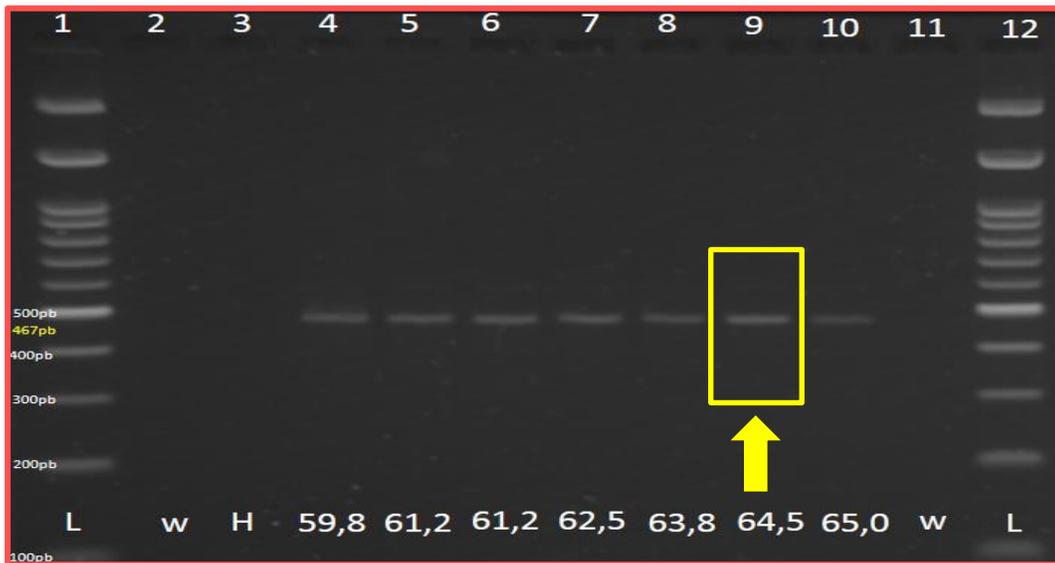
Willumsen, B. 1989. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. Journal of Fish Diseases. 3: 275-277.

Yunis, J.; J. Anicama; A. Manchego; N. Sandoval 2015. Presencia de *Piscirickettsia salmonis* en truchas de cultivo (*Oncorhynchus mykiss*) en Junín, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 1: 140-145.

ANEXOS

Anexo 1. Programa de procesamiento de imagen digital “Image J”





Gradiente de temperatura para la segunda amplificación de PCR anidado de *Piscirickettsia salmonis*.

Se usó un programa de procesamiento de imagen digital “Image J” con el cual se realizó cuantificación de las bandas marcadas en el gel que se visualiza en la figura mostrando una mejor cuantificación en el área ubicado en el (carril 9) donde se muestra la temperatura de 64,5 °C de hibridación para *P. salmonis*.

Results			
File	Edit	Font	Results
Area			
1	5204.933		
2	4187.426		
3	4187.184		
4	4667.326		
5	3378.376		
6	5433.569		
7	2646.719		

Según el programa “Image J” esta es el área cuantificada y considerada En el gel ya que corresponde a una mayor área dentro del resultado obtenido.