TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS
CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA MARINA

"EFICACIA DE TRES VACUNAS INACTIVADAS EN JUVENILES DE GAMITANA (*Colossoma macropomum*) EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS CON *Aeromonas hydrophila*"

Tesis para optar el título profesional de:
BIÓLOGA MARINA

Presentado por:
Jhoanna Irma Coaguila Dávila (0000-0002-6109-5723)

Asesor:
Jefferson Yunis Aguinaga (0000-0002-1959-4350)

Lima – Perú
2023

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 05 de diciembre de 2023.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dr. José Alberto Iannacone Oliver
Integrante: Dra. Nathaly Enciso Benavides
Integrante: M.V. Gina Clarissa Casas Velásquez

Se reúnen para evaluar la tesis titulada: EFICACIA DE TRES VACUNAS INACTIVADAS EN JUVENILES DE GAMITANA (*Colossoma macropomum*) EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS CON *Aeromonas hydrophila*

Presentada por la tesista:

- Jhoanna Irma Coaguila Dávila

Para optar el Título Profesional de Biólogo Marino

Asesorada por: Dr. Jefferson Yunis Aguinaga

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de los estudiantes en la sustentación, concluyen de manera unánime (x) por mayoría simple ( ) calificar a:

Tesista: Jhoanna Irma Coaguila Dávila			Nota (escrito): Dieciséis
Aprobado ( )	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ( )	Desaprobado ( )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

Dr. José Alberto Iannacone Oliver
Presidente del jurado

ENCISO BENAVIDES NATHALY - Y20965223H

Dra. Nathaly Enciso Benavides
Miembro del jurado

Gina Clarissa Casas Velásquez

M.V. Gina Clarissa Casas Velásquez
Miembro del jurado

Dr. Jefferson Yunis Aguinaga
Asesor

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

ANEXO: FORMATO DE DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS / TRABAJO DE INVESTIGACIÓN[1]

Lima, 9 de diciembre del 2023

Señor,
Carlos Zavalaga Reyes
Director General de Investigación, Desarrollo e Innovación
Universidad Científica del Sur
Presente. –

De nuestra consideración,

Yo: Jhoanna Irma Coaguila Dávila, egresada de la carrera de Biología Marina de la Universidad Científica del Sur, en conjunto con el Dr Jefferson Yunis Aguinaga declaramos que este informe final de tesis titulado: EFICACIA DE TRES VACUNAS INACTIVADAS EN JUVENILES DE GAMITANA (*Colossoma macropomum*) EXPERIMENTALMENTE INFECTADAS CON *Aeromonas hydrophila*, sustentado para obtener el título de Biólogo Marino es original.

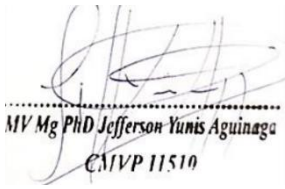
Es decir, no contiene plagio parcial ni total, cuando se utilizó información de fuentes externas se reconoció la autoría mediante la adecuada citación y los resultados obtenidos son producto entero de nuestra investigación y no han sido falseados ni fabricados. Todo esto en cumplimiento del Código de ética en la investigación, Reglamento del Comité de Integridad Científica, Reglamento de Propiedad Intelectual, Normas y procedimientos de los trabajos de investigación para la obtención de títulos profesionales y grados académicos [2], que afirmamos conocer en su totalidad.

Por ello, en caso de identificarse alguna situación de plagio, falsificación o fabricación de resultados, nos allanamos al proceso de investigación que establezca la Universidad y las posibles sanciones que pudieran surgir.

Firmamos en conformidad con lo declarado,



Firma tesista
DNI: 71629334



Firma del asesor de tesis
DNI: 43582709

[1] En conformidad con la Resolución del Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD
[2] Los documentos están en: https://investigacion.cientifica.edu.pe/reglamentos/

INFORME DE REVISIÓN DE ORIGINALIDAD

Título del documento evaluado. Eficacia de tres vacunas inactivadas en juveniles de Gamitana (Colossoma macropomum) experimentalmente infectadas con Aeromonas hydrophila

Autores. Jhoanna Irma Coaguila Davila.

Mecanismo de revisión de originalidad. Evaluación con Turnitin (ID 2264241746).

Resultado de la evaluación. 5%

Revisado por. Magaly Kelly Guerrero Huaracallo.

Comentarios sobre la revisión. Filtros usados: excluir fuentes de menos de 12 palabras.



Eficacia de tres vacunas inactivadas

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%	4%	2%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Marco Medina-Morillo, Giovanna Sotil, Caren Arteaga, Gabriela Cordero et al. "Pathogenic Aeromonas spp in Amazonian fish: Virulence genes and susceptibility in Piaractus brachypomus, the main native aquaculture species in Peru", Aquaculture Reports, 2023 Publicación	1%
2	Submitted to Universidad Cientifica del Sur Trabajo del estudiante	<1%
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
4	doczz.es Fuente de Internet	<1%
5	public4.pagefreezer.com Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi querida madre, Ledy Janet Gracias por tu amor y apoyo incondicional a lo largo de mi trayecto como estudiante y durante la realización de esta investigación.

A mi hermana Victoria "Viky" y a toda mi familia por sus motivaciones, oraciones y consejos que me han acompañado en cada etapa de mi vida y que han contribuido en mi desarrollo personal y profesional

Los quiero mucho

Los obstáculos en la vida nos hacen madurar,
Los éxitos nos hacen reflexionar,
y los fracasos nos hacen crecer

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Jefferson Yunis Aguinaga, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación y por compartir generosamente sus conocimientos. Aprecio enormemente que haya abierto las puertas de su entorno laboral, permitiéndome adquirir nuevos métodos y habilidades en el laboratorio que estoy segura de que serán fundamentales para mi futuro. Agradezco de todo corazón su confianza en mí, desde mis primeros días en la selva hasta la fase final de este proyecto, así como su inmensa paciencia.

Esta investigación no hubiera sido posible sin el apoyo fundamental del Biólogo Marco Medina. Le agradezco profundamente por su constante respaldo, valiosos consejos y recomendaciones, desde el momento en que ingresé al laboratorio hasta las etapas finales, incluyendo las ultimas simulaciones. También agradezco la oportunidad que me brindó para acompañarlo y aprender de las diversas pruebas que realizaba con sus tesistas.

Al Ingeniero Irving Quinto quien fue una pieza fundamental en mis resultados finales de esta investigación. Gracias por compartir tus conocimientos de histología y por la paciencia en enseñarme los procesos histológicos.

También quiero agradecer a la Dra. Giovanna Sotil, por su gran aporte en esta investigación, siendo una pieza clave en los Análisis moleculares.

Extiendo mi agradecimiento al Gerente General, Alex Gonzalez y al Jefe de Producción, Luis Gonzalez, de la empresa PUCAYAGRO E.I.R.L., por abrirme las puertas y permitirme llevar a cabo esta investigación. Agradezco su generosidad, paciencia y valiosos conocimientos que han enriquecido mi experiencia.

A los miembros del jurado, Dra. Gina Casas, Dr. Jose Iannacone y Dra. Nathaly Enciso, por sus valiosos comentarios que me ayudaron a mejorar el desarrollo del manuscrito.

Quiero dedicar un agradecimiento especial a mi querida mamá y mi abuelita, por estar a mi lado y brindarme la fuerza necesaria para avanzar en este camino. A mi familia, aunque lejos en distancia, siempre han estado cerca en espíritu y apoyo. Del mismo modo, agradezco a mis amigos de la universidad por los buenos momentos compartidos, y colegas/amigos del Instituto del Mar del Perú (Gabriela, Said, Lucia) quienes se tomaron el tiempo para brindarme su apoyo, compartir sus risas, motivaciones y conocimientos durante este trayecto.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

"Eficacia de tres vacunas inactivadas en juveniles de gamitana (*Colossoma macropomum*) experimentalmente infectadas con *Aeromonas hydrophila*"

"Efficacy of three inactivated vaccines in juveniles of gamitana (*Colossoma macropomum*) experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*"

Coaguila-Dávila J.[1],Yunis-Aguinaga J.1[1, 2]*

[1] Escuela de Biología Marina, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú
[2] Laboratorio de Patobiología Acuática, Instituto del Mar del Perú, Esq. Gamarra y Gral. Valle s/n, Callao, Perú.
*Corresponding authors: J. Yunis-Aguinaga. IMARPE E-mail: jyunis@cientifica.edu.pe Tel. (051) 940619247, Panamericana Sur Km 17, Lima, Perú.

Resumen

Aeromonas hydrophila es uno de los patógenos más importantes que afectan a los peces amazónicos y ha sido aislada en varias especies. En los últimos años, los acuicultores han informado sobre brotes en algunos peces de importancia en acuicultura. En el presente estudio, caracterizamos una *A. hydrophila* aislada de un brote en una piscigranja comercial de *Colossoma macropomum* (gamitana) cerca de la ciudad de Iquitos, Perú, la cual fue usada para la elaboración de tres vacunas experimentales. Para la caracterización de la bacteria se utilizaron técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares, incluyendo la detección de genes de virulencia. La preparación de estas vacunas se realizó usando los siguientes inactivadores: T2 formaldehído (BFO), T3 peróxido de hidrógeno (BPH) y T4 cloroformo (BCF). Posteriormente, se inmunizó con 0,1 mL de 1 x 10^9 UFC/pez por vía intraperitoneal (IP) a 45 peces por grupo. T1 (grupo control) se inyectó con 0,1 mL de PBS por vía IP. Luego de ocho semanas, los peces fueron desafiados con una cepa homologa y virulenta (8 x 10^7 UFC/pez). T2 y T3 presentaron mejor tasa de supervivencia en comparación con el grupo control (alrededor del 40% frente al 10% del grupo control) y no se encontraron diferencias entre los dos grupos vacunados ($p \geq 0,05$). Los peces del grupo T4 presentaron mortalidad temprana después de la vacunación probablemente debido a la irritación causada por los residuos de cloroformo, por lo tanto, no se incluyeron en las gráficas ni en la estadística. Se concluye que tanto la vacuna inactivada con formaldehido como la inactivada con peróxido de hidrógeno ofrecieron protección frente a un desafío experimental con *A. hydrophila* en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: Acuicultura; Aeromoniasis; Infección experimental; Pez amazónico; Vacuna inactivada.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Abstract

Aeromonas hydrophila is one of the most important pathogens affecting Amazonian fish and has been isolated from several species. In recent years, farmers have reported outbreaks in some important farmed fish in aquaculture. In the present study, we characterized an *A. hydrophila* isolated from an outbreak in a commercial *Colossoma macropomum* (gamitana) fish farm near the city of Iquitos, Peru, which was used for the preparation of three experimental vaccines. For the characterization of the bacterium, microbiological, biochemical and molecular techniques were used, including the detection of virulence genes. The preparation of these vaccines was carried using the following inactivators: T2 formaldehyde (BFO), T3 Hydrogen peroxide (BHP) and T4 chloroform (BCF). Subsequently, 45 fish per group were immunized with 0.1 mL of 1 x 10^9 CFU/fish intraperitoneally (IP). T1 control group was injected with 0.1 mL of PBS per IP. After eight weeks, the fish were challenged with a homologous and virulent strain (8 x 10^7 CFU/fish). T2 and T4 had a better survival rate compared to the control group (around 40% vs. 10% in the control group) and no differences were found between both vaccinated groups ($p \geq 0.05$). T4 group fish showed early mortality after vaccination probably due to irritation caused by chloroform residues, therefore they were not included in the graphs or statistics. It is concluded that both the formaldehyde-inactivated and hydrogen peroxide-inactivated vaccine offered protection against an experimental challenge with *A. hydrophila* under laboratory conditions.

Keywords: Aquaculture; Aeromoniasis; Experimental infection; Amazon fish; Inactivated vaccine.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

1. Introducción

La acuicultura en el Perú ha mostrado un aumento significativo durante los últimos años teniendo un crecimiento promedio del 13% (Fernández *et al.*, 2022), principalmente de la concha de abanico, langostino blanco y trucha. Para el 2016, la producción acuícola en la amazonia correspondió a 3,846 toneladas representando el 4% de la producción acuícola nacional, de la cuales cinco regiones son los principales actores como Amazonas, Loreto, Madre de Dios, San Martin y Ucayali (PRODUCE, 2019). En esta tendencia, podemos identificar que la piscicultura amazónica está cobrando un interés de desarrollo económico y seguridad alimentaria. Uno de los principales problemas que enfrentan los productores son las enfermedades infecciosas, principalmente los patógenos bacterianos que son responsables de la mortalidad en diferentes etapas de crecimiento de una amplia variedad de especies de peces (Swain *et al.*, 2003).

Aeromonas hydrophila, es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo, oxidasa positivo (Stratev & Odeyemi, 2016). Es uno de los patógenos oportunistas más ampliamente distribuido en el medio acuático. Se ha registrado la infección en varias especies, entre ellos *Labeo rohita*, *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, *Arapaima gigas*, entre otros. A pesar de la amplitud de la distribución de esta enfermedad, existen vacíos de información sobre la ocurrencia de esta en peces de América del Sur (Chandrarathna *et al.*, 2018; Gallani *et al.*, 2020; Medina-Morillo *et al.*, 2023).

Una de las especies nativas cultivadas en la Amazonia peruana es la gamitana (*Colossoma macropomum*). Alrededor del 60% de las empresas del sector cultivan esta especie en policultivos en la región de San Martín y Loreto teniendo una cosecha total de 410,6 y 363 toneladas respectivamente (PRODUCE, 2022). Este nivel de producción semi-intensiva puede conllevar al estrés y hacerlos susceptibles a la infección por patógenos oportunistas como *A. hydrophila*. Hasta la fecha el control estratégico durante la infección por el género *Aeromonas* ha ocasionado el uso indiscriminado de antibióticos (Proietti-Junior *et al.*, 2021). No obstante, su uso podría afectar a la microbiota intestinal y, por lo tanto, la respuesta inmune de los peces (Linh *et al.*, 2022), así como, generar resistencia a los medicamentos y por último afectar indirectamente la salud de los consumidores (Okocha *et al.*, 2018).

Los factores de virulencia de *A. hydrophila* que contribuyen a la patogenicidad incluyen genes como la aerolisina (*aer*), enterotoxina termoestable citotónica (*ast*), enterotoxina citotóxica (*act*) y hemolisina (*hly*) (Yousr *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2023) que son claves en la gravedad de la infección. La vacunación se ha convertido en un método seguro y aceptado para la prevención de muchas enfermedades bacterianas en peces de cultivo. Las vacunas inactivadas han mostrado buenos resultados en diversos ensayos de laboratorio, sin embargo, la aplicación de vacunas contra *A. hydrophila* no está disponible a nivel comercial, ya que existe variación en la expresión de genes virulentos en cepas de *Aeromonas* (Abdella *et al.*, 2023). A pesar de ello, este tipo de vacunas se pueden producir a bajo costo, son estables en condiciones de campo y no persisten en el medio ambiente ni en los peces vacunados (Sommerset *et al.*, 2005; Baxter, 2007, Ma *et al.*, 2019, Ramos-Espinoza *et al.*, 2020a).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Algunos estudios han mencionado que este tipo de vacunas proporciona efectos inmunitarios relevantes frente *A. hydrophila*. En términos de Porcentaje Relativo de Supervivencia (PRS), Bastardo *et al.*, (2012) indicaron un PRS de 58,36% para reproductores de trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Por otro lado, Ramos-Espinoza *et al.*, (2020b) reportaron un PRS de 46,6% en juveniles de tilapia (*O. niloticus*) infectados con la misma bacteria.

Debido a la creciente demanda y producción de esta especie; y consecuentemente con el reporte de brotes infecciosos, en el presente trabajo proponemos el aislamiento y caracterización de *A. hydrophila* y la evaluación de la eficacia de tres vacunas inactivadas en juveniles de gamitana (*C. macropomum*) experimentalmente infectadas con *A. hydrophila*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Localización

La elaboración de las vacunas se realizó en el laboratorio de Patobiología Acuática del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y la vacunación experimental se realizó en la Unidad Experimental de la empresa PUCAYAGRO E.I.R.L ubicado en el departamento de San Martin, Moyobamba, Calzada, Perú.

2.2. Cepa bacteriana

Aeromonas hydrophila utilizada en este estudio se aisló de gamitanas cultivada en una granja comercial infectadas naturalmente con signos clínicos de aeromoniasis (hemorragias, aletas erosionadas, úlceras, nado errático y melanización) en Maynas, Loreto, Perú. Se realizó la necropsia de los peces y se tomaron muestras de cerebro, riñón y bazo para el cultivo bacteriológico. Los aislados bacterianos se sembraron en Agar Tripteína Soya (TSA) y se cultivaron aeróbicamente a 28 °C durante 24 h. La misma fue almacenada en el banco de patógenos del IMARPE a -80°C.

2.3. Caracterización bioquímica

Las bacterias se sometieron a caracterización bioquímica según Sierra (1969), Gerhardt *et al.*, (1981), y la Sociedad Americana de Microbiología (ASM, 2023). Se realizaron pruebas de rutina (morfología de colonias, tinción de Gram, crecimiento en GSP, oxidasa, catalasa y pruebas de motilidad). Además, se realizaron pruebas de hemólisis, tolerancia a la temperatura, tolerancia a la sal, lipasas, ADNasas y proteasas (hidrólisis de elastina, gelatina y caseína). Luego, se utilizó el Analytical Profile Index (API) 20E y 20NE (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante excepto la temperatura de incubación que se fijó en 28°C para un análisis más

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

exhaustivo. El perfil API resultante se comparó utilizando API Web® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia).

2.4. Caracterización molecular

Para identificar la especie del aislado se confirmó mediante el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los genes 16S rRNA y DNA girasa subunidad B (*gyrB*). Las cepas de referencia utilizadas fueron ATCC 35654 y ATCC 35654. Las extracciones de ADN genómico total se obtuvieron mediante el método CTAB 2X (Abu Almakarem *et al.,* 2012). La PCR se realizó de acuerdo a lo descrito por Glocker *et al.,* (2005) con algunas modificaciones. Se realizó utilizando el kit GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix (PROMEGA®) considerando temperaturas de recocido de 52°C (16S) y 56°C (gyrB).

Los productos amplificados de los tamaños esperados para los genes 16S (~1400 pb) y gyrB (~1000 pb) se secuenciaron (para ambas cadenas) en un analizador genético ABI 3500 (Applied Biosystems® Sanger). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de nucleótidos del NCBI a través de la herramienta BLASTn. Finalmente, la bacteria se conservó en un ultracongelador a -80°C (Thermo Scientific, TSD) en una solución de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) con glicerol al 15 % (v/v) hasta su uso posterior.

2.5. Detección de genes de virulencia

Se evaluó la presencia de ocho genes de virulencia, aerolisina (*aer*), enterotoxina citotóxica (altA), enterotoxina citotóxica (*act*), hemolisina (*hly*), serina proteasa (*ser*), lipasa (*lip*), flagelina (*fla*) y elastasa (*ahyB*). Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el kit GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (PROMEGA®), con los tamaños esperados a amplificar indicados en la Tabla 1. Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con los protocolos indicados en las referencias de la Tabla 1, con algunas modificaciones. Se analizaron alícuotas de los productos amplificados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y las imágenes se obtuvieron en un fotodocumentador Fire Reader v10 (UVITEC). Los productos amplificados fueron considerados como presencia del gen (+), mientras que la ausencia de amplificación fue considerada como ausencia del gen (-).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de genes de virulencia de *Aeromonas hydrophila*.

Genes	Primer	Secuencia (5´- 3´)	Tamaño (pb)	Referencia
16S	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGTTACCTTGTTACGACTT	1400	Lane (1991)
gyrB	gyrB3F gyrB14R	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT TTGTCCGGGTTGTACTCGTC	900	Yáñez *et al.*, (2003)
aer	aerF aerR	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA ACGAAGGTGTGGTTCCAGT	309	Wang *et al.*, (2003)
altA	altA-F altA-R	TGACCCAGTCCTGGCACGGC GGTGATCGATCACCACCAGC	442	Sen & Rodgers (2004)
act	act-F act-R	AGAAGGTGACCACCAAGAACA AACTGACATCGGCCTTGAACTC	232	Sen & Rodgers (2004)
hly	hly-F hly-R	GCCGAGCGCCCAGAAGGTGAGTT GAGCGGCTGGATGCGGTTGT	130	Wang *et al.*, (2003)
ser	ser-F ser-R	CACCGAAGTATTGGGTCAGG GGCTCATGCGTAACTCTGGT	350	Nawaz et al., (2010)
lip	lip-F lip-R	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	382	Sen (2005)
fla	fla-F fla-R	TCCAACCGTYTGACCTC GMYTGGTTGCGRATGGT	608	Sen (2004)
ahyB	ahyB-F ahyB-R	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG	540	Sen (2005)

2.6. Peces y condiciones experimentales

Colossoma macropomum (~6 cm y 5 gr) se obtuvieron de una piscifactoría comercial y se colocaron en tanques de plástico de 100 L provistos de aireación constante. Antes del experimento, se confirmó que los peces eran negativos para la infección por *Aeromonas* sp mediante análisis bacteriológicos de muestras de cerebro, hígado, riñón y bazo en placas TSA. Los peces fueron alimentados diariamente (8:00 y 16:00) con un alimento comercial para esta especie (38% de proteína cruda) al 3% del peso corporal durante todo el estudio. La aclimatación de los peces en condiciones experimentales se realizó por un

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

periodo de tres semanas. Las condiciones de calidad del agua se mantuvieron dentro del rango óptimo para la especie: temperatura 28,10 ± 0,5 °C, oxígeno disuelto 6,11 ± 1,7 mg L^{-1} y pH 6,80 ± 0,1. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Científica del Sur, Lima, Perú (protocolo número 007-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2023). Además, se consideraron las pautas de "ARRIVE guidelines" para garantizar que la presente investigación sea completa (Percie du Sert *et al.*, 2020).

2.7. Producción de vacunas

2.7.1. Bacterias inactivadas con formaldehído (BFO)

Las colonias de *A. hydrophila* se incubaron en 300 ml de caldo TSB en un agitador incubador (150 rpm por 72 h a 28°C). Previo a la inactivación, se calculó el número de bacterias por recuento. Se procedió a diluir la suspensión bacteriana con 200 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7 (Ramos-Espinoza *et al.*, 2020b). Para la inactivación de la vacuna se agregó formaldehído a la suspensión bacteriana para obtener una concentración final del 3% (Gallage *et al.*, 2017). Luego las bacterias fueron incubadas a 4°C por 24 h, y después se lavaron tres veces con PBS (10 mL) por centrifugación (10.000 rpm por 10 min, a 4°C) para la obtención del inóculo. Cabe destacar que el número de bacterias confirmó por recuento en placa (1 x 10^9 UFC/pez). Para constatar la inactivación, se extrajo 100µl del inóculo para sembrar en medio Infusión de Cerebro y Corazón (BHI) e incubar a 28°C durante 72 h. La vacuna se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

2.7.2. Bacterias inactivadas con peróxido de hidrógeno (BPH)

Las colonias de *A. hydrophila* se incubaron en 300 ml de caldo TSB en un agitador incubador (150 rpm por 72 h, a 28°C). Se agregó peróxido de hidrógeno a la suspensión para obtener una concentración final del 5% (Ramos-Espinoza *et al.*, 2020b). Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS (10 mL) por centrifugación (10,000 rpm por 10 min, a 4°C). El número de bacteria se confirmó por recuento en placa (1 x 10^9 UFC/pez). La vacuna se almacenó a 4°C hasta su uso.

2.7.3. Bacterias inactivadas con cloroformo (BCF)

Las colonias de *A. hydrophila* se incubaron en 300 ml de caldo TSB en un agitador incubador (150 rpm por 72 h, a 28°C). Para la inactivación, se añadió cloroformo a la suspensión bacteriana hasta obtener la concentración del 3% (Anderson & Ross, 1972). Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS (10 mL) por centrifugación (10,000 rpm por 4°C por 24 h). El número de bacterias se confirmó por recuento en placa (1 x 10^9 UFC/pez). Hasta su uso la vacuna se almacenó a 4°C.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

2.8. Diseño experimental

Posterior al periodo de aclimatación, 180 individuos juveniles se distribuyeron al azar a cuatro grupos experimentales (15 peces por tanque), por triplicado. La distribución ha sido la siguiente: T1: Inyectados con PBS (grupo control), T2: vacunados con BFO, T3: vacunados con BPH, T4: vacunado con BCF.

La vacuna se inoculó a una dosis de 0,1 mL por vía intraperitoneal (IP). Previo a la vacunación, los peces fueron anestesiados con una solución de Tricaina (90 mg L^{-1}) por inmersión. Posterior a la vacunación los peces fueron regresados a sus propios tanques, con oxigenación hasta el inicio del desafío frente *A. hydrophila*.

La evaluación de la eficacia de la vacuna se realizó usando el porcentaje relativo de supervivencia (PRS) calculado con la fórmula: PRS (%) = [1-(mortalidad en peces vacunados % / mortalidad en peces control %)] x 100 (Amend, 1981, como se citó en Romstad *et al.*, 2013).

2.9. Reto frente a A. hydrophila

Los peces inmunizados, así como los peces de grupo control, fueron desafiados con 8 x 10^7 UFC/pez de la cepa homóloga de *A. hydrophila* (0,1 mL) luego de ocho semanas post-vacunación (PV) para determinar el efecto de la aplicación de la vacuna sobre la mortalidad post-desafío experimental (PD). Durante ese tiempo se realizó el monitoreo a diario para detectar los signos clínicos y mortalidad, así mismo, ante la presencia de peces muertos estos fueron extraídos para realizar la necropsia con la posterior extracción de muestras de los órganos.

2.10. Análisis histológicos

Se tomaron muestras de hígado, corazón y riñón de los peces moribundos para ser fijados en formol tamponado (10%) durante 48 h y luego se conservaron en alcohol al 70% para histopatología. Las muestras fueron procesadas para inclusión en parafina, se seccionaron en 4µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Luna, 1968). Los portaobjetos se examinaron utilizando un microscopio electrónico (Nikon E600).

2.11. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron usando el programa de R. Las curvas de supervivencia se analizaron mediante análisis de Kaplan-Meier y prueba de log rank con un nivel de significancia del 95%.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

3. Resultados

3.1. Aislamiento y Caracterización bioquímica de A. hydrophila

En el análisis microbiológicos de los ejemplares de gamitana infectados naturalmente se pudo recuperar bacterias en cultivos puros sobre placas de TSA. Los aislados bacterianos recuperados fueron Gram-negativos, con forma de bacilos cortos, oxidasa positivos, catalasa positivos y móviles. Las características bioquímicas con el Kit API 20E y API confirmaron rasgos fenotípicos que corresponde a la bacteria estudiada (Tabla 2). Un representante de las bacterias fue utilizado para los análisis posteriores. El aislado bacteriano seleccionado mostró resultados positivos para la hemolisina, caseína, y ADNasa en todas las temperaturas evaluadas. Los resultados negativos se observaron para la producción de gelatinasa y elastasa a 37°C.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de *Aeromonas hydrophila* aislada *de Colossoma macropomum*.

		A. hydrophila
Tinción de Gram		Bacilos cortos (-)
Catalasa		(+)
Oxidasa		(+)
Hemolisina	24°C[a]	+ α
	28°C	+ α
	32°C	+β
	37°C	+α
Motilidad	24°C[b]	+
	28°C	+
	32°C	+
	37°C	+
Caseína	24°C[c]	+
	28°C	+
	32°C	+
	37°C	+
Gelatina	24°C[d]	+
	28°C	+
	32°C	+
	37°C	-
Tween 80	24°C[e]	+
	28°C	+
	32°C	+
	37°C	+
Elastasa	24°C[f]	+
	28°C	+
	32°C	+
	37°C	-

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ADNasa	24°C[g]	+
	28°C	+
	32°C	+
	37°C	+
Cloruro de sodio 1%		+
Cloruro de sodio 2%		+
Cloruro de sodio 3%		+
Cloruro de sodio 4%		-
Crecimiento 24°C		+
Crecimiento 28%		+
Crecimiento 37°C		+
Crecimiento 42°C		+
Código API 20E		7047127
Código 20NE		7577754

3.2. Genes de virulencia

El ensayo de PCR mostro que la cepa aislada fue positiva para *fla*, *ahyB*, *lip*, *ser*, *hly*, *altA* (Tabla 3).

Tabla 3. Ausencia y presencia de genes de virulencia de *Aeromonas hydrophila*.

Especie	**Cepa**	**Número de accesión (GenBank)**	**Genes de virulencia**							
		Gen 16S	*aer*	*fla*	*ahyB*	*lip*	*act*	*ser*	*hly*	*altA*
A. hydrophila	26	OQ000943	-	+	+	+	-	+	+	+
A. ***hydrophila***		*ATCC 7966*	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) presencia del gen; (-) ausencia del gen

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

3.3 Confirmación molecular del aislado de A. hydrophila

La amplificación basada en PCR de los marcadores moleculares entre ellos el gen 16S rRNA y gyrB exploró la relación filogenética y la identificación de taxones microbianos específicos, de tal manera que el aislado identificado bioquímicamente fue positivo por nivel de género y especie en la prueba molecular.

3.4. Parámetros fisicoquímicos del agua

La temperatura se mantuvo entre 25,6°C y 26,3°C. Los niveles promedio de oxígeno (OD) en los cuatro tratamientos oscilaron entre 25,6 mg/L y 26,3 mg/L (Tabla 4). Los niveles de pH se mostraron homogéneos entre las diferentes unidades experimentales, el promedio fue de 6,9. Entre los días de muestreo el pH más bajo (6,5) se registraba en la mañana y el más alto (7,4) en la tarde. Los compuestos nitrogenados (NH_3 y NO^{2-}) estuvieron dentro de los rangos adecuados para el cultivo de gamitana.

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del agua registrados en las unidades experimentales de los cuatros tratamientos durante el periodo de estudio.

Parámetros fisicoquímicos	**Tratamientos**			
	1	**2**	**3**	**4**
Temperatura (°C)	25,6	26	26,3	26,3
Oxigeno (OD) (mg/L)	7,5	6,7	6,7	7,0
pH	6,8	6,9	6,9	6,9
Amoniaco NH_3 (ppm)	15 ppm	25 ppm	25 ppm	15 ppm
Nitrito NO^{2-}(ppm)	0,05 ppm	0,25 ppm	0,25 ppm	0,05 ppm
Nitrato	0 ppm	0 ppm	0 ppm	0 ppm

3.5. Eficacia de la vacuna

Durante el periodo de vacunación se presentó una alta mortalidad temprana en los peces del T4 en el 1er, 2do y 3er día. Durante el 1° día se observó signos clínicos que incluyeron congestión anal, cambios en la coloración de la piel, letargia y nado errático en círculo. Los peces del grupo T2 y T3 no presentaron cambios en el comportamiento ni mortalidad durante los siguientes días y antes del inicio del desafío bacteriano.

A las 12 h después del desafío bacteriano el registro de la mortalidad y signos clínicos se evidencio en el grupo T1 y los grupos vacunados T2, T3 y T4. La probabilidad de supervivencia del T1, T2, T3 y T4 fue de 10%, 48%, 50%, 0%, a los 15 días PD respectivamente. De acuerdo con los datos, el T2 y T3 presentaron mejor tasa de supervivencia en comparación con el T1, sin embargo, no se encontraron diferencias entre ellos ($p \geq 0,05$), a pesar de que el T3 presenta mejor supervivencia. Por lo tanto, en término

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

de PRS la eficacia de las vacunas inactivadas del T2, T3 fueron 39,7% y 42,11%, respectivamente (Figura 1).

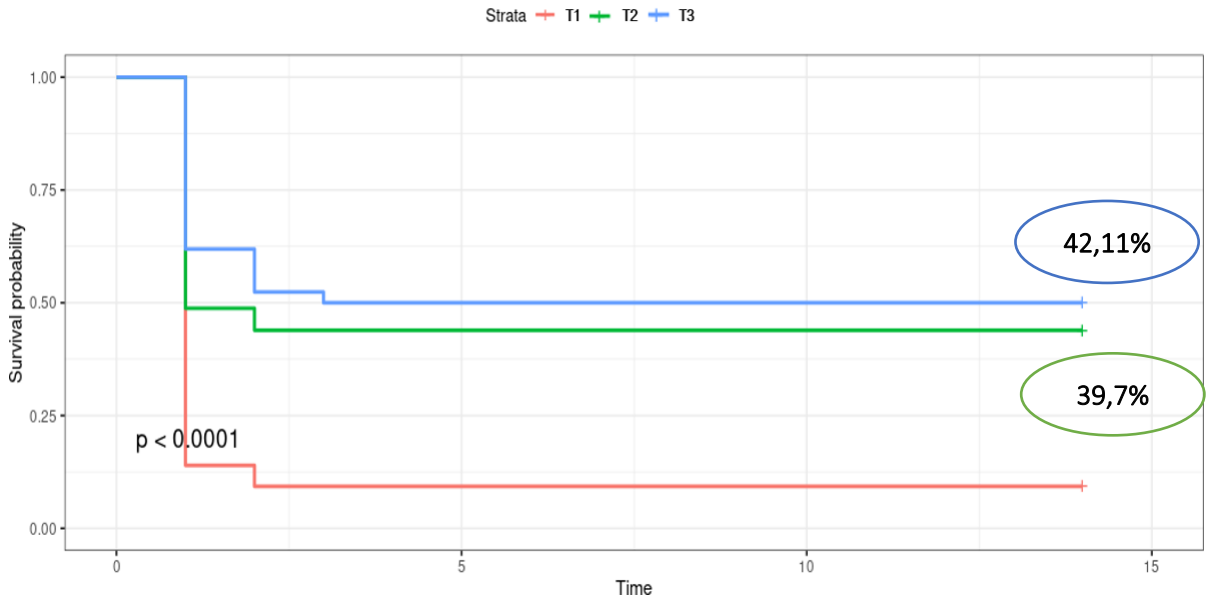


Figura 1. Valores del porcentaje de supervivencia de juveniles de *Colossoma macropomum* infectadas con *Aeromonas hydrophila* después de los 15 días PD. Los círculos muestran la eficacia de las vacunas en término de PRS %. T1: grupo control; T2: vacunados con BFO; T3: vacunados con BPH.

3.6 Signos clínicos de los peces infectados

La aparición de signos clínicos característicos de la aeromoniasis fueron observadas a las 12 h (PD). En el examen externo se observaron diferentes grados de lesiones en la piel y las aletas (Figura 2). Mientras que en la necropsia se observó daños en los órganos internos (Figura 3). La respiración irregular, consumo reducido de alimento, movimiento con pérdida de equilibrio, letargia, aislamiento y natación en la superficie del agua también fueron otros de los signos clínicos comunes registrados en el monitoreo.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

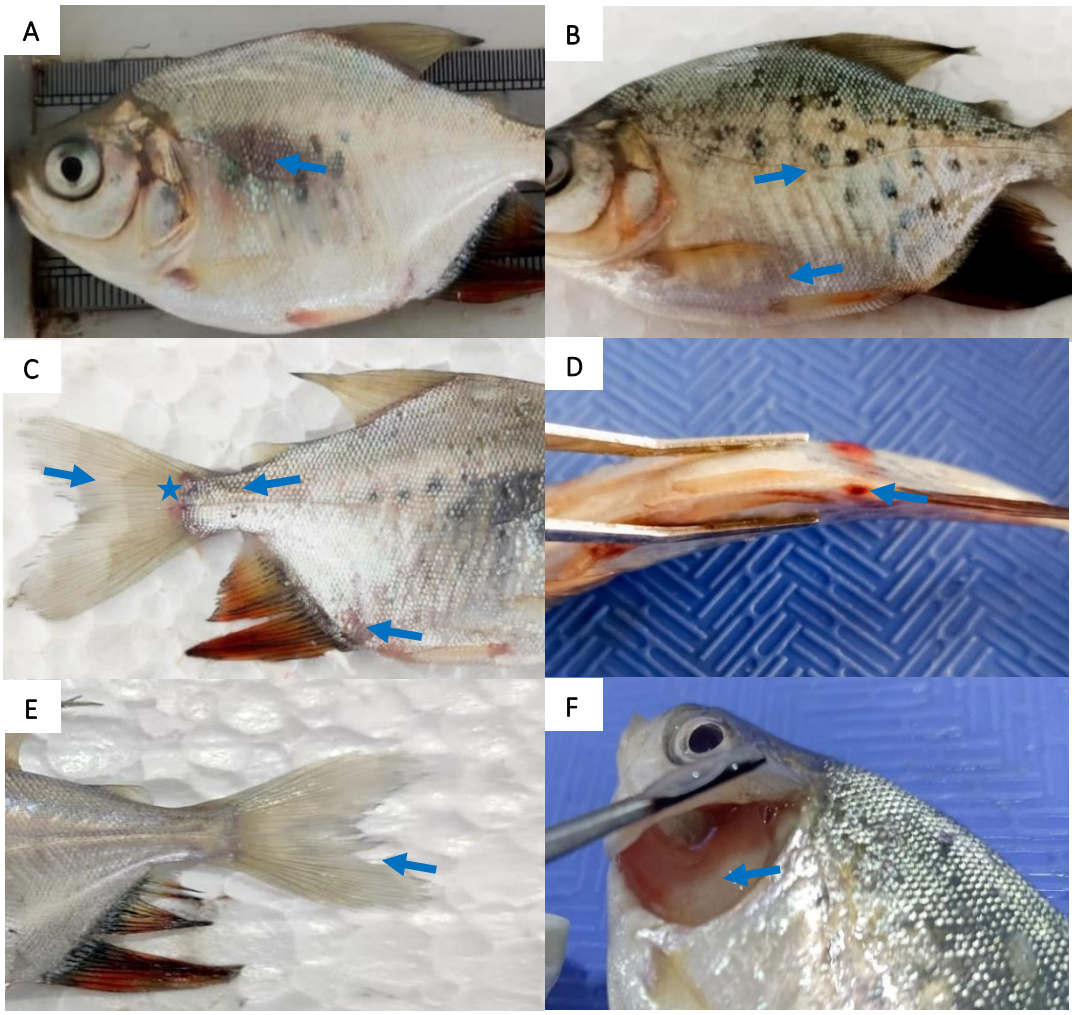


Figura 2. Signos clínicos macroscópicos externos en juvenil de gamitana (*Colossoma macropomum*) del grupo control infectadas por vía IP con *Aeromonas hydrophila* (8 x 10^7 UFC/pez). (A) zonas hemorrágicas multifocales (←); (B) descamación cerca de la aleta anal (←) y la línea lateral (→); (C) descamación en el pedúnculo caudal y cerca de la zona anal (←), focos hemorrágicos en el pedúnculo caudal (★) y despigmentación de la aleta caudal (→); (D) hemorragia en la zona anal (←); (E) erosión de la aleta caudal (←) y (H) branquias pálidas (←).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

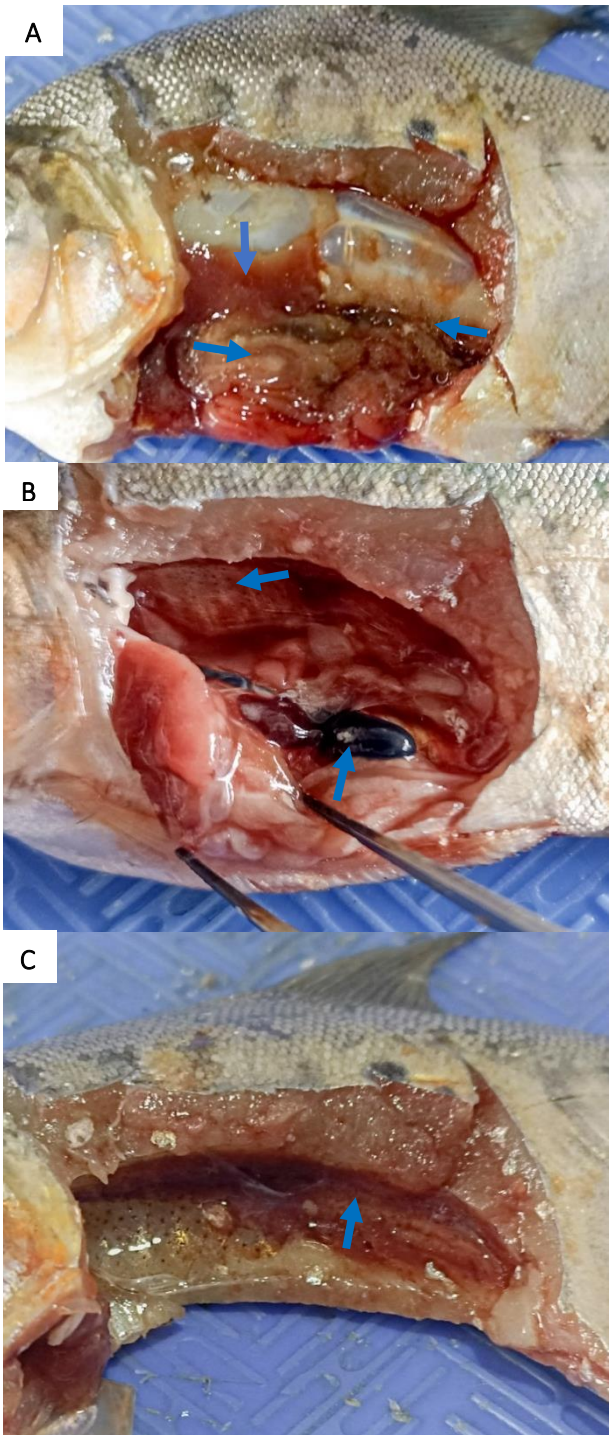


Figura 3. Signos clínicos macroscópicos internos en juvenil de gamitana (*Colossoma macropomum*) del grupo control infectadas por vía IP con *Aeromonas hydrophila* (8 x 10^7 UFC/pez). (A) Enteritis hemorrágica (→), hepatomegalia (↓), líquido hemorrágico en la cavidad abdominal (ascitis) (←); (B) esplenomegalia (↑), hemorragias petequiales multifocales en la pared superior de la cavidad abdominal (←); (C) renomegalia (↑).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

3.7. Histopatología

En el hígado se observaron congestión en los espacios sinusoidales y hemorragias multifocales. También, se verificó necrosis hepática leve y desorganización del tejido hepático, esto indica que hubo un acompañamiento de degeneración hidrópica de los hepatocitos (Figura 4A y 4B). En el pericardio se observaron hemorragias y engrosamiento (Figura 4C). En el riñón se observó, necrosis, hemorragias y nidos bacterianos dispersos en el tejido (Figura 4D).

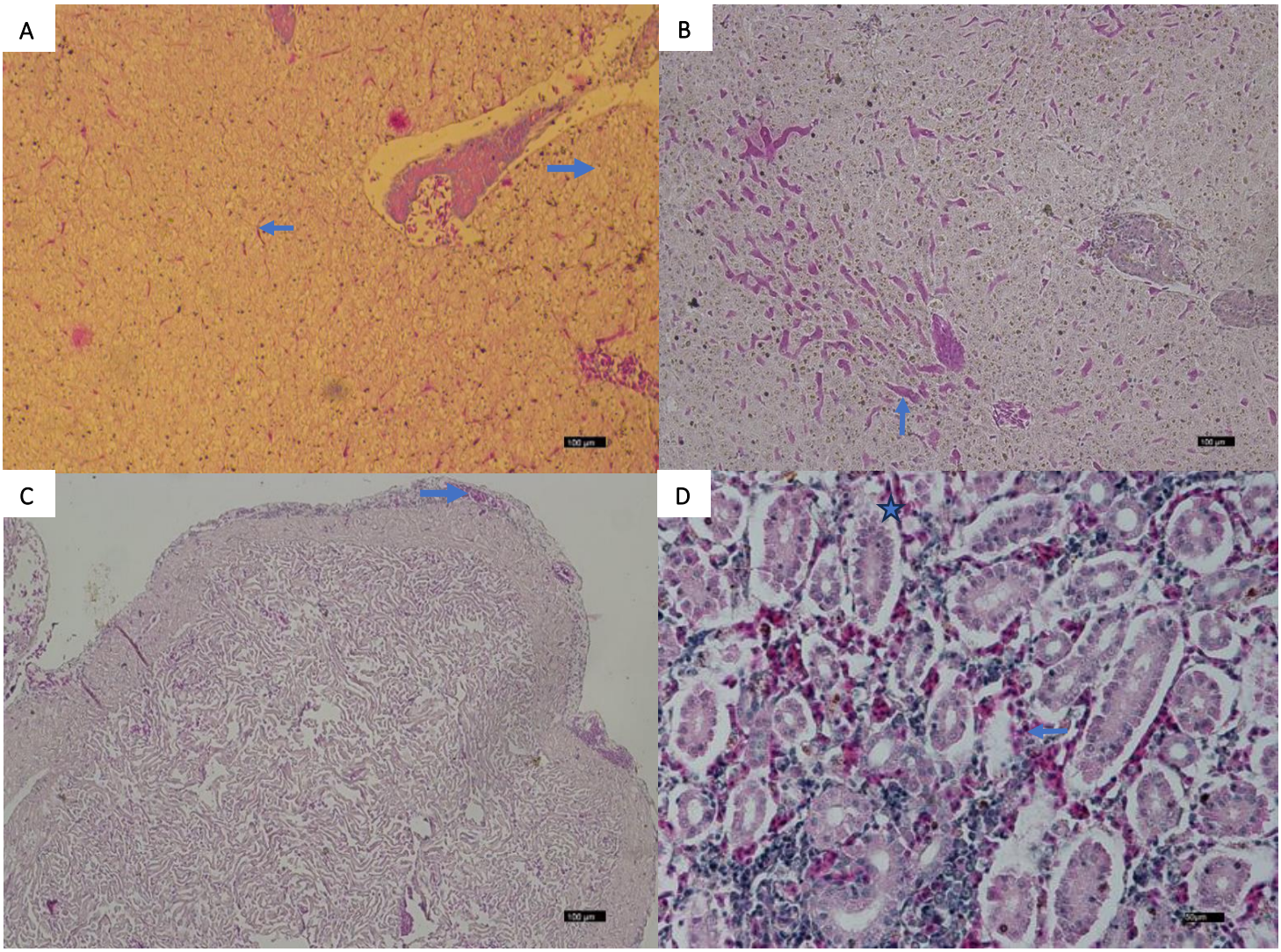


Figura 4. Examen microscópico de hígado, corazón y riñón del grupo control de gamitana (*Colossoma macropomum*) infectadas por vía IP con *Aeromonas hydrophila* (8 x 10^7 UFC/pez). Se observa (A) degeneración hidrópica del parénquima hepático (→) (barra: 100 µm) y congestión de los sinusoides (←); (B) congestión y hemorragia en los hepatocitos (↑) (bar: 100 µm); (C) hemorragia y engrosamiento del pericardio (→) (barra: 100 µm) y (D) necrosis (★) y hemorragia en el riñón (←) (barra: 50 µm).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

4. Discusión

En los últimos años la demanda por los recursos hidrobiológicos se ha incrementado, por lo que, en términos de producción ha generado condiciones de crianza intensiva, aumentando así la producción (PRODUCE, 2022). En consecuencia, el estrés y por consiguiente la alta ocurrencia y susceptibilidad a las infecciones por *Aeromonas* sp., viene siendo una de las principales causas de la alta mortalidad en peces de agua dulce (Chen *et al.,* 2020). A pesar de que en los últimos años se han desarrollado diferentes tipos de vacunas, las vacunas de células enteras muertas o inactivadas son las comunes en la industria acuícola. El proceso de producción de este tipo de vacunas es simple y asequible, lo cual los hace apreciables especialmente para peces que se cultivan en forma intensiva.

La temperatura de los tanques osciló en un rango de 26,6°C y 27,3°C, ya que el promedio ideal para la especie es de 26°C a 28°C. El pH se mantuvo en rangos iguales, sin embargo, los valores altos se le puede atribuir a la eliminación del CO_2 por parte de la degradación de las heces y respiración branquial. En cuanto al oxígeno disuelto, se encontró dentro de los rangos óptimos 5,0 mg/L OD – 6,5mg/L OD. Los valores encontrados en las variables fisicoquímicas del agua analizadas se encuentran dentro del rango de confort para peces tropicales y para esta especie (De Almeida-Val *et al.,* 1993; Kubitza, 2003).

En el presente estudio, *A. hydrophila* se aisló de cerebro, riñón y bazo de gamitana (*C. macropomum*). Las colonias de *A. hydrophila* en medio TSA tenían un color amarillo cremoso, redondo y superficie lisa. Todos los aislamientos eran Gram-negativos con forma de bacilos. Estos resultados se correlacionaron con estudios previos como el de Nahar *et al.,* (2016) & Dong *et al.,* (2017) quienes aislaron especies de *Aeromonas* de la Carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), Pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*), Tilapia del Nilo (*O. niloticus*) con las mismas características bioquímicas y morfológicas.

Se ha empleado estrategias moleculares para la identificar rápida y confiable de cepas de *A. hydrophila*. La amplificación basada en PCR de los marcadores moleculares entre ellos el gen 16S rRNA y *gyrB* confirmo la identificación del aislado por nivel de género y especie.

Al aplicar un método de infección por vía IP, el T2 y T3 mostro una probabilidad de supervivencia del 48% y 50% y un PRS de 39,47% y 42,11% a los 15 días PD, respectivamente. No se encontró diferencias entre estos dos grupos vacunados ($p \geq 0,05$), pero si hubo diferencias significativas entre T2 y T3 frente al T1 ($p \leq 0.0001$). Por lo tanto, podemos decir que ambas vacunas fueron capaces de conceder niveles significativos de protección. Al ser una infección directa, los patógenos pueden sobrepasar la primera barrera de defensa (piel y la mucosidad) teniendo una entrada a los vasos sanguíneos y órganos internos de preferencia (Theeraporn *et al.,* 2020).

Varios autores han descrito la dependencia de la eficacia sobre la vía de administración. Para Ramírez-Paredes *et al.,* (2019) la eficacia de la vacunación en Tilapia del Nilo contra la *Francisellosis noatunensis* era significativamente mayor cuando la vacunación fue mediante inyección. Wang *et al.,* (2020) observaron resultados similares contra *Streptococcus iniae*. De esta manera, en el presente trabajo, es posible que los niveles de anticuerpos fueron más altos debido a la inmunización intraperitoneal.

El valor de PRS del T2 se correlacionaron con estudios anteriores que utilizaron una vacuna inactivada con formaldehído. Por ejemplo, Vaz Farias *et al.,* (2020) indicó un valor

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

de PRS del 31,3% a los 15 días PD para *A. hydrophila* en el paco (*Piaractus mesopotamicus*). Un valor de PRS (39,7%) similar al del presente estudio se corroboró en la carpa común (*C. carpio*) (Alishahi *et al.,* 2019). En otras especies se han obtenido resultados mayores de PRS del 62,5%, 66,2%, 71% para *A. hydrophila* en la anguila americana (*Anguila rostrata*) (SongLin *et al.,* 2015), *Catla catla* (Chandran *et al.,* 2002) y rohu (*L. rohita*) (Sughra *et al.,* 2023), respectivamente. Por lo general, los estudios de vacunación en peces utilizan el formaldehido para inactivar a la bacteria. A pesar de ello, puede generar efectos negativos en la integridad de los epítopos y repercutir sobre la respuesta antigénica en la pared celular (Fan *et al.,* 2019), debido a que el método va a requerir a menudo de dosis múltiples, temperatura y tiempo (Sanders *et al.,* 2015). Así que podríamos decir que estas vacunas no siempre van a reflejar una alta eficacia.

Recientemente el peróxido de hidrógeno ha sido incluido como un nuevo método de inactivación de vacunas para bacterias comunes que afectan en la acuicultura, en particular, la Tilapia del Nilo. Se ha reportado una eficacia del 40,7% PRS contra una bacteria diferente (*Streptococcus agalatiae)* (Ramos-Espinoza *et al.,* 2020a), cuyo valor es cercano a lo obtenido del presente estudio (42,11% PRS; T3). Asimismo, otros autores han mencionado que el peróxido de hidrógeno es reconocido por ser menos tóxico en experimentos contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeroguinosa,* ya que conserva la estructura de los epítopos en comparación con el formaldehído (Fan *et al.,* 2019).

A partir de estos resultados se demostró que el cloroformo (T4) no proporcionaba ninguna ventaja sobre la inactivación con formaldehído y peróxido de hidrógeno, al parecer permitía la reactivación de la virulencia o no destruye al agente. Plotkin, (2000) & Lu *et al.,* (2010) indicaron que el cloroformo tiene un uso amplio en vacunas contra la rabia y consideran como un método alternativo que está relacionado al poco manejo y eliminación de grandes volúmenes, así como la capacidad de dañar la membrana bacteriana.

En nuestro estudio los tratamientos T2 y T3 demostraron tener una respuesta efectiva ofreciendo una alta inmunogenicidad que posiblemente pudo haber estimulado la respuesta celular y humoral de los peces frente al desafío. Según Nayak (2020) & Pretto-Giordano *et al.,* (2010) indica que la concentración de antígeno mínima usado pudo haber influido en la eficacia de las vacunas. La concentración (1 x 10^9 UFC/mL) usada en este estudio estuvo dentro del rango de otros valores reportados contra *A. hydrophila* (1,7 x10^7 UFC/mL –1x10^9 UFC/mL) cuya eficacia era 31,33% y 58% (Vaz Farias *et al.,* 2020; Zhang *et al.,* 2023), respectivamente. Las diferencias obtenidas en la eficacia frente al desafío con *A. hydrophila* es debido al estadio del pez y el método formulación de la vacuna. Aunque, Ramos – Espinoza *et al.,* (2020a) sugieren que la concentración de antígeno alta no aumenta la eficacia para este tipo de vacuna. Se ha observado que los niveles de anticuerpos séricos eran elevados a los 28 días post-vacunación mientras que los títulos de anticuerpos en el moco eran a las seis semanas después de la vacunación por vía IP (Grabowski *et al.,* 2004; Jiang *et al.,* 2016; Vaz Farias *et al.,* 2020). En el presente trabajo podemos deducir que la vacuna ha estimulado el aumento de anticuerpos específicos, la reducción de la carga bacteriana en el huésped, la respuesta rápida de las células inmunitarias y la reducción de los caracteres patológicos.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

De acuerdo con Midtlyng (2016), en los ensayos de vacuna el porcentaje de mortalidad debe ser >60 o igual para los grupos no vacunados y desafiados para garantizar la eficacia de la vacuna. Dado que la tasa de mortalidad del grupo control fue superior (84, 4%) a lo esperado, este evento se encuentra vinculado con los siguientes factores como el peso, la concentración bacteriana, factores de virulencia (enzimas y toxinas) y la temperatura del agua. Sin embargo, este último factor posiblemente pudo haber tenido una mayor influencia sobre la mortalidad en el grupo control. De acuerdo con Rahman *et al.*, (2001) & Shameena *et al.*, (2021) encontraron que la virulencia de *A. hydrophila* es mayor a los 17°C y 25°C ya que resultan en una baja respuesta fagocítica. Esto guarda relación con los resultados obtenido en el experimento, ya que los peces estuvieron sometidos a temperaturas similares, lo que explicaría la alta mortalidad observada en el grupo control. De acuerdo con Midtlyng (2016) y Ramos-Espinoza *et al.*, (2020b), los resultados obtenidos este estudio demostraron que estas dos vacunas (BFO y BPH) garantizaron niveles de protección para *C. macropomum* frente a una cepa homologa de *A. hydrophila* en condiciones experimental.

En este estudio, *C. macropomum* inoculado por vía IP mostró signos clínicos comunes como la despigmentación, descamación y congestión anal de las cuales también han sido reportados en otras especies de peces desafiados con *A. hydrophila* (Dias *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016), de igual manera para la especie en estudio se tiene informes sobre otros signos, como el aumento del líquido ascítico, lesiones ulcerativas en la piel y la hinchazón intestinal, que también fue reportada en la carpa herbívora (Song *et al.*, 2014). La concentración letal de *A. hydrophila* para juveniles de *C. macropomum* fue 8 x 10^7 UFC/pez que causaron una alta mortalidad significativa a las 12 h después del inicio del desafío. Estudios realizados en *L. rohita* mostro que concentraciones de 2,2 x 10^7, 2,2 x 10^8 y 2,2 x 10^9 UFC/mL con la misma bacteria causaron el 100% de la mortalidad a las 24 h después del desafío por vía IP (Bharadwaj *et al.*, 2013).

La patogenicidad puede atribuirse a los diferentes factores de virulencia que están relacionadas con la capacidad de adhesión, migración, replicación y evasión del sistema inmunológico del huésped causando lesiones (Marinho-Neto *et al.*, 2019). La presencia de los flagelos polares y laterales relacionada a la movilidad va a permitir a la bacteria desplazarse en ambientes líquidos y en superficies dando una mayor capacidad invasiva a los tejidos (Lowry *et al.*, 2014). Las enzimas proteolíticas resultan tener un papel en proporcionar nutrientes para la proliferación y contribuyen en la evasión de las defensas iniciales a nivel de la piel y tejidos blandos (Rincon *et al.*, 2016). De acuerdo con Ibrahem *et al.*, (2008) las observaciones en el examen macroscópico como el líquido hemorrágico en la cavidad y la presencia de hemorragias petequiales en la piel pueden ser atribuibles a la presencia de elastasas, caseínasa y gelatinasa que inducen la acción degenerativa en las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

La participación de las exotoxinas, endotoxinas y enterotoxinas son factores de virulencia cruciales en la aeromoniasis. Se han encontrado que en la mayoría de los aislamientos de *A. hydrophila* de tilapia, carpa, bagre de canal los genes de aerolosina (aer) y enterotoxina citotóxica (*act*) y la hemolisina (*hly*) eran las más prevalentes (Nhinh *et al.*, 2021; Ahangarzadeh *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2022) independiente del origen geográfico. El gen *aer* codifica la toxina formadora de poros que termina uniéndose a los receptores de la membrana de la célula diana causando la destrucción de la permeabilidad, la lisis osmótica y la muerte celular de las células epiteliales (Sha *et al.*, 2002). La producción de lipasas (*lip*) provocan daños en el epitelio intestinal (Pessoa *et al.*, 2020) y

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

participa en dañar la estructura de la membrana celular de los tejidos, particularmente, en combinación con el gen *aer* que facilita la colonización e induce más la necrosis celular (Chakraborty *et al.*, 2022).

La actividad hemolítica es considerada como una de las principales propiedades de cepas virulentas de *A. hydrophila* (Wang *et al.*, 2003). El gen *hly* induce la lisis de los glóbulos rojos seguido de anemia (Thomas, 2012; Monir *et al.*, 2020). Durante el diagnóstico en este estudio se pudo evidenciar despigmentación en las áreas distales del pez (por ejemplo, aleta caudal y branquias). Alaa El-Dein *et al.*, (2016) & Emeish *et al.*, (2018) explica que el gen *act* es conocida como una hemolisina, aerolisina y enterotoxina capaz de lisar eritrocitos, inducir apoptosis e inhibir la fagocitosis e inducir acumulación de fluidos en el intestino. La presencia de esta toxina y otros genes enterotóxicos pueden haber sido claves en los daños ocurridos a nivel del intestino. Sha *et al.*, (2002) encontró que en cepas de *Aeromonas* aislada habría una participación sinérgica de los genes *alt* y *ast*. El gen *ast* aumenta la permeabilidad vascular intestinal y el desprendimiento de la mucosa intestinal, mientras que el gen *alt* causa la secreción de líquido en el intestino (Chopra *et al.*, 2000).

En *C. macropomum*, el signo neurológico más común se encuentra la perdida de equilibrio y la reducción de la respiración. De acuerdo con Días *et al.*, (2016) indicó que la expresión de la acetilcolinesterasa propia de la bacteria actúa como un narcótico sobre el sistema nervioso central.

Algunos casos de peces infectados experimentalmente con *A. hydrophila* mostraron cambios histopatológicos como denegación vacuolar y necrosis celular (Hal & El-Barbary, 2020; Wang *et al.*, 2020). En este estudio, los resultados histopatológicos fueron similares a reportes anteriores. Por ejemplo, en los órganos internos se observaron necrosis en los túbulos renales, congestión de los sinusoides y presencia de hemorragia del tejido intersticial. Estas observaciones pusieron en evidencia la causa de la muerte en *C. macropomum*.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el grupo T2 y T3 tuvieron una respuesta eficaz y segura en juveniles de gamitana infectadas con *A. hydrophila*, similar a otros ensayos que desafiaron con la misma bacteria en otras especies que se cultivan en piscigranjas. Además, dentro del hallazgo se observó que el grupo T4 no sería un agente prometedor que favorezca la inmunidad protectora en la especie estudiada. Por otro lado, se sugiere que los estudios a futuro se enfoquen en evaluar estos métodos químicos de inactivación como el formaldehido y peróxido de hidrógeno, así como, otros métodos aplicando dosis altas de antígeno y el uso de adyuvantes para mejorar la eficacia de las vacunas y la respuesta inmunitaria en peces amazónicos durante la etapa de pre-cría.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Bibliografía

1. Abdella, B., Abozahra, N. A., Shokrak, N. M., Mohamed, R. A., El-Helow, E. R., 2023. Whole spectrum of *Aeromonas hydrophila* virulence determinants and the identification of novel SNPs using comparative pathogenomics. Scientific reports 13, 7712. https://doi.org/10.1038/s41598-023-34887-1

2. Abu Almakarem, A. S., Heilman, K. L., Conger, H. L., Shtarkman, Y. M., Rogers, S. O., 2012. Extraction of DNA from plant and fungus tissues in situs. BMC Research Notes 5(1), 266. https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-266

3. Ahangarzadeh, M., Ghorbanpour Najafabadi, M., Peyghan, R., Houshmand, H., Sharif, Rohani, M., Soltani, M., 2022. Detection and distribution of virulence genes in *Aeromonas hydrophila* isolates causing infection in cultured carpa. Veterinary Research Forum 13(1), 55-60. https://doi.org/10.30466/vrf.2020.115998.2761

4. Alaa El-Dein, O. A., Moustafa-Moustafa, E., Mamdouh-Zayed, M., 2016. Identification and characterization of virulence-associated gene from pathogenic *Aeromonas hydrophila* strains. World Vet J 6(4), 185-192.

5. Alishahi, M., Tollabi, M., Ghorbanpoor, M., 2019. Comparison of the adjuvant effect of propolis and Freund on the efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccine in common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Fisheries Sciences 18(3), 428-444. 10.22092/ijfs.2019.118393

6. Amen, D. F., 1981. Potency testing of fish vaccines. Fish biologics: serodiagnostics and vaccines. Dev Biol Stand 49, 447-454.

7. Anderson, D. P., Ross, A. J., 1972. Comparative Study of Hagerman Redmouth Disease Oral Bacterins. The Progressive Fish-Culturist 34, 4, 226-228. 10.1577/1548-8659(1972)34[226:CSOHRD]2.0.CO;2

8. Bastardo, A., Ravelo, C., Castro, N., Calheiros, J., Romalde, J. L., 2012. Effetiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish & Shellfish Immunology 32(5), 756-761. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.028.

9. Baxter, D., 2007. Active and passive immunity, vaccine types, excipients, and licensing. Occupational Medicine 57(8), 552-556. https://doi.org/10.1093/occmed/kqm110

10. Bharadwaj, A., Abraham, J., & Joardar, S. (2013). Immune effector activities in challenged rohu, *Lobeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas* bacterin. Aquaculture 392-395, 16-2. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.016.

11. Chakraborty, N., Das, B. K., Bera, A. K., Borah, S., Mohanty, D., Yadav, A. K., Kumar, J., Koushlesh, S. K., Chanu, T. N., Panda, S. P., Vallangi, R., 2022. Co-Prevalence of

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Virulence and Pathogenic Potential in Multiple Antibiotic Resistant *Aeromonas* spp. From Diseased Fishes with *In Silico* Insight on the Virulent Protein Network. Life 12(2), 1979. https://doi.org/10.3390/life12121979

12. Chandran, M. R., Aruna, B.V., Logambal, S. M., Dinakaran Michael, R., 2002. Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. Fish & Shellfish Immunology 13, 1-9. https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0374

13. Chandrarathna, H. P. S. U., Nikapitiya, C., Dananjaya, S. H. S., Wijerathne, C. U. B., Wimalasena, S. H. M. P., Kwun, H. J., Heo, G. J., Lee, J., De Zoysa, M., 2018. Outcome of co-infection with opportunistic and multidrug resistant *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* in zebrafish: Identification, characterization, pathogenicity, and immune responses. Fish & Shellfish Immunology 80, 573-581 https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.049

14. Chen, J., Liu, N., Zhang, H., Zhao, Y., Cao, X., 2020. The effects of *Aeromonas hydrophila* infection on oxidative stress, nonspecific immunity, autophagy, and apoptosis in the common carp. Developmental and comparative immunology 105, 103587. https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103587

15. Chopra, A. K., Xu, X., Ribardo, D., Gonzalez, M., Kuhl, K, Peterson, J. W., Houston, C. W., 2000. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. Infection and Immunity 68(5), 2808-18. https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2808-2818.2000

16. De Almeida-Val, V.M. F.,Val, A. L., 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. Comparative Biochemistry and Physiology B 105, 21-28. https://doi.org/10.1016/0305-0491(93)90164-Z.

17. Dias, M. K., Sampaio, L. S., Proietti-Junior, A. A., Yoshioka, E. T., Rodrigues, D. P., Rodriguez, A. F., Ribeiro, R. A., Faria, F. S., Ozório, R. O., Tavares-Dias, M., 2016. Lethal dose and clinical sings of *Aeromonas hydrophila* in *Arapaima gigas* (Arapaimidae), the giant fish from Amazon. Veterinary microbiology 188, 12-15. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.001

18. Dong, H. T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., Taengphu, S., Charoensapsri, W., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., Senapin, S. (2017). *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Journal of Fish Diseases 40(10), 1395-1403. https://doi.org/10.1111/jfd.12617

19. Emeish, W. F., Mohamed, H. M., Elkamel, A. A., 2018. *Aeromonas* Infections in African Sharptooth Catfish. Journal of Aquaculture Research & Development 9(9), 548. 10.4172/2155-9546.1000548

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

20. Fan, Y., Mu, Y., Lu, L., Tian, Y., Yuan, F., Zhou, B., Yu, C., Wang, Z., Li, X., Lei, S., Xu, Y., Wu, D., Yang, L., 2019. Hydrogen peroxide-inactivated bacteria induces potent humoral and cellular immune responses and releases nucleic acids. International immunopharmacology 69, 389-397. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.05

21. Fernández, R. O. Q., Cho, J., Zuta, J. V., Flores, S. G., Simón, A. E. C., Pipo, L. S. S., 2022. Estado actual da aquacultura na selva peruana: Caso de Loreto/Current status of aquaculture in the Peruvian jungle: The case of Loreto. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research 5(2), 2383-2401.https://doi.org/10.34188/bjaerv5n2-078

22. Gallage, S., Katagiri, T., Endo, M., Maita, M., 2017. Comprehensive evaluation of immunomodulation by moderate hypoxia in *S. agalactiae* vaccinated Nile tilapia. Fish and Shellfish Immunology 66, 445-454. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.041

23. Gallani, S., Ramos, G., Asane, I., de Oliverira, L., Kotzent, S., Hashimoto, D., Pilarski, F., 2020. Motile Aeromonas septicemia in tambaqui *Colossoma macropomum*: Pathogenicity, lethality and new insights for control and disinfection in aquaculture. Microbial pathogenesis 149, 104512. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104512

24. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Castilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B., 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology.

25. Glocker, E., Berning, M., Gerrits, M. M., Kusters, J. G., Kist, M., 2005. Real-time PCR screening for 16S rRNA mutations associated with resistance to tetracycline in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 49(8), 3166-70. https://doi.org/10.1128/aac.49.8.3166-3170.2005.

26. Grabowski, L. D., LaPatra, S. E., Cain, K. D., 2004. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. Journal of Fish Diseases 27(10), 573-581. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00576.x

27. Hal, A. M., El-Barbary, M. I., 2020. Gene expression and histopathological changes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. Aquaculture 526, 735392. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735392

28. Ibrahem, M. D., Arab, R. M. H., Mostafa, M. M., Rezk, M. A., 2008. Evaluation of different vaccination strategies for control of (MAS) in Nile Tilapia (*O. niloticus*) in Egypt. Pp.1157-1174 in H. Elghobashy, K. Fitzsimmons, and A. S. Diab, editors.

29. Ibrahim, I., Mahmmoud, E., Hussein, S., 2022. Revealing of Aerolysin and Cytotoxic enterotoxin genes in *Aeromonas hydrophila* isolated from (*Cyprinus carpio*) fish in Mosul, Iraq. Revista Electrónica de Veterinaria 23(3), 14-21. https://www.veterinaria.org/index.php/REDVET/article/view/170

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

30. Jiang, X., Zhang, C., Zhao, Y., Kong, X., Pei, C., Li, L., Nie, G., Li, X., 2016. Immune effects of the vaccine of live attenuated *Aeromonas hydrophila* screened by rifampicin on common carp (*Cyprinus carpio* L). Vaccine 34(27), 3087-3092. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.075

31. Kubitza, F., 2003. Qualidade de agua no cultivo de peixes e camarões. Jundiaí, 229 p.

32. Lane, D. J., 1991.16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E. Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York, 115-175.

33. Linh, N. V., Dien, L. T., Dong, H. T., Khongdee, N., Hoseinifar, S. H., Musthafa, M. S., Dawood, M. A. O., Van Doan, H., 2022. Efficacy of different routes of formalin-killed vaccine administration on immunity and disease of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Challenged with *Streptococcus agalactiae*. Fishes 7(6), 398. https://doi.org/10.3390/fishes7060398

34. Lowry, R., Balboa, S., Parker, J. L., Shaw, J. G. (2014). *Aeromonas* flagella and Colonisation Mechanisms. Advances in microbial physiology 65, 203-256. https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.007

35. Lu, Y. J., Yadav, P., Clements, J. D., Forte, Srivastava, A., Thompson, C. M., Seid, R., Look, J., Alderson, M., Tate, A., Maisonneuve, F. F., Robertson, G., Anderson, P. W., Malley, R., 2010. Options for inactivation, Adjuvant, and Route of Topical Administration of a Killed, Unencapsulated Pneumococcal Whole-Cell Vaccine. Clinical and Vaccine Immunology 17(6), 1005-1012. https://doi.org/10.1128/CVI.00036-10

36. Luna, L.G., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw -Hill Company, New York.

37. Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., Cain, K. D., 2019. A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms 7(11), 569. https://doi.org/10.3390/microorganismos7110569

38. Marinho-Neto, F. A., Claudiano, G. S., Yunis-Aguinaga, J., Cueva-Quiroz, V. A., Kobashigawa, K. K., Cruz, N. R. N., Moraes, F. R., Moraes, J. R. E., 2019. Morphological, microbiological and ultrastructural aspects of sepsis by *Aeromonas hydrophila* in *Piaractus mesopotamicus*. PLoS ONE 14(9), e0222626. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222626

39. Medina-Morillo, M., Sotil, G., Arteaga, C., Cordero, G., Laterça-Martins, M., Murrieta-Morey, G., Yunis-Aguinaga, J., 2023. Pathogenic *Aeromonas* spp in Amazonian fish:

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Virulence genes and susceptibility in *Piaractus brachypomus*, the main native aquaculture species in Peru. Aquaculture Reports 33, 101811. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101811

40. Midtlyng, P. J., 2016. Methods for measuring efficacy, safety, and potency of fish vaccine. In: Adams, A. (Ed.), Fish Vaccines. Springer Basel, pp. 119-142.

41. Ministerio de la Producción (PRODUCE)., 2019. Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2018, Oficina de evaluación de impacto y estudios económicos Lima - Perú.

42. Ministerio de la Producción (PRODUCE)., 2022. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2022, Oficina de evaluación de impacto y estudios económicos Lima – Perú.

43. Monir, M., Yusoff, S. M., Mohamad, A., Ina-Salwany, M. Y., 2020. Vaccination of Tilapia against Motile *Aeromonas* Septicemia: A review. Journal of aquatic animal health 32(2), 65-76. https://doi.org/10.1002/aah.10099

44. Munang'andu, H. M., Evensen, Ø., 2019. Correlates of protective immunity for fish vaccines. Fish & shellfish immunology 85, 132–140. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.03.060

45. Nahar, S., Rahman, M. M., Ahmed, G. U., Faruk, A. R., 2016. Isolation, identification, and characterization of *Aeromonas hydrophila* from juvenile farmed pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 4(4), 52-60.

46. Nawaz, M., Khan, S. A., Khan, A. A., Sung, K., Tran, Q., Kerdahi, K., & Steele, R. 2010. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. Food microbiology 27(3), 327-331. https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.11.007

47. Nayak, S. K., 2020. Current prospects and challenges in fish vaccine development in India with special reference to *Aeromonas hydrophila* vaccine. Fish & shellfish immunology 100, 283-299. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.01.064

48. Nhinh, D. T., Le, D. V., Van, K. V., Huong Giang, N. T., Dang, L. T., Hoai, T. D., 2021. Prevalence, virulence gene distribution and alarming the multidrug resistance of *Aeromonas hydrophila* associated with disease outbreaks in freshwater aquaculture. Antibiotics 10(5), 532. https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532

49. Okocha, R. C., Olatoye, I. O., Adedeji, O. B., 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. Public Health Reviews 39(1), 21. https://doi.org/10.1186/s40985-018-0099-2

50. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne,

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

W. J., Clark, A., Cuthill, I., C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., et al., 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. BJP British Journal of Pharmacology 117(16), 3617-3624. https://doi.org/10.1111/bph.15193

51. Pessoa, R. B. G., Marques, D. S. C., Lima, R. O. H. A., Oliveira, M. B. M., Lima, G. M. S., Maciel de Carvalho, E. V. M., Coelho, L. C. B. B., 2020. Molecular characterization and evaluation of virulence traits of *Aeromonas* spp. isolated from the tambaqui fish (*Colossoma macropomum*). Microbial Pathogenesis 147, 104273. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104273

52. Plotkin, S. A., 2000. Rabies. Clinical Infectious Diseases 30(1), 4-12. https://doi.org/10.1086/313632

53. Pretto-Giordano, L. G., Muller, E.E., Klesius, P., Silva, V. G., 2010. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil. Aquac. Res 41, 1539-1544. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02449.x

54. Proietti-Junior, A. A., Lima, L. S., Roges, E. M., Rodrigues, Y. C., Lima, K. V. B., Rodriguez, D. P., Tavares-Dias, M., 2021. Experimental co-infection by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandei* in pirarucu *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). Aquaculture Research 52(4), 1688-1696. https://doi.org/10.1111/are.15021

55. Pulpipat, T., Maekawa, S., Wang, P. C., Chen, S. C., 2020. Immune Response and Protective Efficacy of a Formalin-Killed *Francisella Noatunensis* Subsp. *Orientalis* Vaccine Evaluated through Intraperitoneal and Immersion Challenge Methods in *Oreochromis niloticus*. Vaccine 8(2), 163. https://doi.org/10.3390/vaccines8020163

56. Rahman, M. H., Suzuki, S., Kawai, K., 2001. The effect of temperature on *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. Journal of Applied Ichthyology 17(6), 282-285. https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00291.x

57. Ramírez-Paredes, J. G., Mendoza-Roldan, M. A., Lopez-Jimena, B., Shahin, K., Metselaar, M., Thompson, K. D., Penman, D. J., Richards, R. H., Adams, A., 2019. Whole cell inactivated autogenous vaccine effectively protects red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against fracisellosis via intraperitoneal injection. Journal of fish diseases 42(8), 1191-1200. https://doi.org/10.1111/jfd.13041

58. Ramos-Espinoza, F. C., Cueva-Quiroz, V. A., Yunis-Aguinaga, J., Alvarz-Rubio, N. C., Paganoti de Mello, N., & Engrácia de Moraes, J. R. (2020a). Efficacy of two adjuvants administrated with a novel hydrogen peroxide-inactivated vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia fingerlings. Fish & Shellfish Immunology 105, 350-358. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.051

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

59. Ramos-Espinoza, F. C., Cueva-Quiroz, V. A., Yunis-Aguinaga, J., & de Moraes, J. R. E. (2020b). A comparison of novel inactivation methods for production of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 528, 735484. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735484

60. Rincón, V. G., Fuenmayor, B. A., Castellano, G. M., Barrios, U. R., Coliná Ch. M., Nuñez, F. G., 2016. Factores de Virulencia en Cepas de *Aeromonas* spp. Kasmera *44*(2),121-33. https://produccioncientificaluz.org/index.php/kasmera/article/view/22504

61. Romstad, A. B., Reitan, L. J., Midtlyng, P., Gravningen, K., Evensen, ø., 2013. Antibody responses correlate with antigen dose and in vivo protection for oil-adjuvanted, experimental furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. salmonicida) vaccine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and can be used for batch potency testing of vaccines. Vaccine 31(5), 791-796.

62. Sanders, B., Koldijk, M., Schuitemaker, H., 2015. Inactivated Viral Vaccines. In: Nunnaly, B., Turula, V., Sitrin, R. (eds) Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45024-6_2

63. Sen, K., Rodgers, M., 2004. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. Journal of applied microbiology 97(5), 1077-1086. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02398.x

64. Sen, K., 2005. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. Can J Microbiol 51 (11), 957-966. https://doi.org/10.1139/w05-089

65. Sha, J., Kozlova, E. V., Chopra, A. K., 2002. Role of Various Enterotoxins in *Aeromonas hydrophila* Induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. Infection and Immunity 70(4), 1924-1935. https://doi.org/10.1128/IAI.70.4.1924-1935.2002

66. Shameena, S. S., Kumar, S., Kumar, K., Raman, R. P., 2021. Role of temperature and co-infection in mediating the immune response of goldfish. Microbial Pathogenesis 156, 104896. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104896

67. Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. Expert Review of Vaccines 4(1), 89-101. https://doi.org/10.1586/14760584.4.1.89

68. Song, X., Zhao, J., Bo, Y., Liu, Z., Wu, K., Gong, C., 2014. *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): An experimental model. Aquaculture 434, 171-178. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.015

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

69. SongLin, G., PanPan, L., JianJun, F., JinPing, Z., Peng, L., LiHua, D., 2015. A novel recombinant bivalent outer membrane protein of *Vibrio vulnificus* and *Aeromonas hydrophila* as a vaccine antigen of American eel (*Anguilla rostrata*). Fish & shellfish immunology 43(2), 477–484. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.017

70. Stratev, D., Odeyemi, O. A., 2016. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. Journal of Infection and Public Health 9(5), 535-544. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006

71. Sughra, F., Hafeez-ur-Rahman, M., Abbas, F., Altaf, I., 2023. Evaluation of three alum-precipitated *Aeromonas hydrophila* vaccines administered to *Lobeo rohita*, *Cirrhinus mrigala* and *Ctenopharyngodon idella*: immunokinetics, immersion challenge and histopathology. Brazilian Journal of Biology 83, e249913. https://doi.org/10.1590/1519-6984.249913

72. Swain, P., Nayak, S., Sahu, A., Meher, P., Mishra, B. (2003). High antigenic cross-reaction among the bacterial species responsible for diseases of cultured freshwater fishes and strategies to overcome it for specific serodiagnosis. *Comparative Immunology,* Microbiology, and Infectious Diseases 26(3), 199-211. https://doi.org/10.1016/s0147-9571(02)00059-0

73. Thomas, J. M., 2012. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors. International Scholarly Research Notices, 256261. https://doi.org/10.5402/2012/256261

74. Vaz Farias, T. H., Arijo, S., Medina, A., Pala, G., da Rosa Prado, E. J., Montassier, H. J., Pilarski, F., Antonio de Andrade Belo, M., 2020. Immune response induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Fish & Shellfish Immunology 101, 186-191. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.059

75. Wang, G., Clark, C. G., Liu,C., Pucknell, C., Munro, C. K., Kruk, T. M., Caldeira, R., Woodward, D., Rodgers, F. G., 2003. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 41(3), 1048-1054. https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1048-1054.2003

76. Wang, Q., Fu, T., Li, X., Luo, Q., Huang, J., Sun, Y., Wang, X., 2020. Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* vaccine. Fish & Shellfish Immunology 97, 382-389. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.12.021

77. Yáñez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J., Martínez-Murcia, A. J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53(3), 875–883. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02443-0

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

78. Yousr, A. H., Napis, S., Rusul, G. R. A., Son, R. (2007). Detection of aerolysin and hemolysin genes in Aeromonas spp. Isolated from environmental and shellfish sources by Polymerasa Chain Reaction. ASEAN Food Journal 14(2), 115-122.

79. Zhang, D., Xu, De-Hai., Shoemaker, C., 2016. Experimental induction of motile *Aeromonas* septicemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by waterborne challenge with virulent *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Reports 3, 18-23. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.11.003

80. Zhang, M., Zhang, T., He, Y., Cui, H., Li, H., Xu, Z., Wang, X., Liu, Y., Li, H., Zhao, X., Cheng, H., Xu, J., Chen, X., Ding, Z., 2023. Immunogenicity and protective efficacy of OmpA subunit vaccine against *Aeromonas hydrophila* infection in *Megalobrama amblycephala*: An effective alternative to the inactivated vaccine. Frontiers in Immunology 14, 1133742. 10.3389/fimmu.2023.1133742

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexos

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CON ANIMALES Y BIODIVERSIDAD

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

CONSTANCIA N° 007-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2023

El presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad de la Universidad Científica del Sur (CIEI-AB-CIENTÍFICA) da constancia que el proyecto de investigación, cuyos datos se registran a continuación, ha sido **aprobado**.

Código de registro:	**PRE-5-2022-00128**
Título:	**Eficacia de tres vacunas inactivadas en juveniles de gamitana (*Colossoma macropomum*) experimentalmente infectadas con *Aeromonas hydrophila***
Investigador(a):	**Jhoanna Irma Coaguila Dávila**

La aprobación del proyecto de investigación implica que el documento presentado a evaluación cumple con los lineamientos de Universidad en materia de investigación y ética, los cuales se sustentan en la normativa internacional vigente. Adicionalmente, en el contexto de la pandemia de enfermedad por COVID-19, le recomendamos cumplir con las normas publicadas por el estado peruano.

En tal sentido, esta aprobación carecerá de valor si es que el proyecto de investigación arriba indicado es modificado de cualquier forma. Toda enmienda, añadido, eliminación o eventualidad (eventos adversos, etc.) posterior a la fecha de aprobación debe ser reportado al CIEI-AB-CIENTÍFICA.

La vigencia de la aprobación de este documento es de dieciocho (18) meses (**hasta el 05 de julio de 2024**), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto. Cualquier trámite para su renovación deberá ser enviado antes del término de la vigencia de este documento, debiendo suspenderse todo desarrollo hasta que la renovación sea aprobada.

Villa El Salvador, 06 de enero de 2023

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR – Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad – UCSUR

Méd. Vet. Milena Paola Montenegro Veja
Presidenta (e)
Comité Institucional de Ética en Investigación
con Animales y Biodiversidad

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N° 001-DACBM-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2023

Lima, 09 de enero del 2023

Visto los proyectos de tesis presentados por los estudiantes de la Carrera de Biología Marina, se expide la presente Resolución:

CONSIDERANDO:

- Que, para optar el título profesional en Biología Marina, de la Carrera de Biología Marina de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur, es necesario la realización y sustentación de una tesis.
- Que, el Reglamento de Tesis pertinente, dispone que el Proyecto de Tesis debe ser presentado a la Carrera de acuerdo con el perfil aprobado, el cual debe ser dictaminado por el Comité de Investigación.
- Que, los estudiantes has cumplido con presentar su proyecto de tesis, bajo la asesoría de sus asesores.
- Que la Comisión de Grados y Títulos de la Dirección ha emitido una evaluación favorable y recomienda la inscripción del proyecto citado.

Se expide la resolución:

ESTUDIANTE:	**Juan Augusto Randu Tarrillo Vargas**
TÍTULO:	Evaluación de parámetros de crecimiento de Zea mays L. emplenado diferentes concentraciones de biofertilizantes a base de macroalgas "
ASESOR:	Paul Martín Baltazar Guerrero
N° REGISTRO:	PRE-5-2022-00136
N° CONSTANCIA ÉTICA:	001-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2023

ESTUDIANTE:	**María del Pilar Cholan Zegarra**
TÍTULO:	Determinación del flujo de masa total en el material particulado de la bahía del Callao
ASESOR:	Ursula María Neira Mendoza
CO ASESOR:	Patricia Mercedes Ayón Dejo
N° REGISTRO:	PRE-5-2022-00369
N° CONSTANCIA ÉTICA:	006-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2023

ESTUDIANTE:	**Jhoanna Irma Coaguila Dávila**
TÍTULO:	Eficacia de tres vacunas inactivadas en juveniles de gamitana (Colossoma macropomum) experimentalmente infectadas con Aeromonas hydrophila"
ASESOR:	Jefferson Yunis Aguinaga
N° REGISTRO:	PRE-5-2022-00128
N° CONSTANCIA ÉTICA:	007-CIEI-AB-CIENTÍFICA-2023

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Estando a lo dispuesto por el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Científica del Sur, el Reglamento de Tesis de la Carrera y a las normas vigentes, en uso de las atribuciones conferidas a la Carrera,

SE RESUELVE:

1º **APROBAR** los mencionados Proyectos de Tesis para optar el título profesional en Biología Marina.

2° Declarar a los estudiantes expeditos para la realización de los Proyectos de Tesis aprobados.

3° Nombrar a los docentes mencionados como Asesores y Co-Asesores, respectivamente, de los Proyectos de Tesis, que realizaran los estudiantes citados.

4º Disponer la inscripción de los proyectos de tesis aprobados en el Registro de Tesis para optar el Título Profesional de la Carrera de Biología Marina de la CIENTÍFICA.

Regístrese, comuníquese y archívese.

DIRECTORA ACADÉMICA

MG. NATHALY MARINA VARGAS LOPEZ
DIRECTORA ACADÉMICA
CARRERA BIOLOGÍA MARINA

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Aquaculture Reports <em@editorialmanager.com>
para mí

mié, 4 oct, 01:19

Traducir al español

This is an automated message.

Journal: Aquaculture Reports
Title: Experimental vaccination against Aeromonas hydrophila in Colossoma macropomum: bacterial characterization, lethal doses, and mortality
Corresponding Author: Dr Jefferson Yunis Aguinaga
Co-Authors: Jhoanna Coaguila; Carla Fernandez-Espinel; Violeta Flores-Dominick, Mg; Luis Gonzalez; Marco Medina-Morillo, Mg
Manuscript Number: AQREP-D-23-01100

Dear Jhoanna Coaguila,

The corresponding author Dr Jefferson Yunis Aguinaga has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Aquaculture Reports.

Submission Title: Experimental vaccination against Aeromonas hydrophila in Colossoma macropomum: bacterial characterization, lethal doses, and mortality

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: Yes, I am affiliated.

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright ; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement , effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at jefyunis@gmail.com.

Thank you,
Aquaculture Reports

More information and support
FAQ: What is copyright co-author verification?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/

Activar Windows
Ve a Configuración para activar Windows.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis