

Revista peruana de biología 26(3): 301 - 310 (2019)
doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i3.15516>
ISSN-L 1561-0837; eISSN: 1727-9933
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Diseño y evaluación de la expresión de una potencial vacuna de ADN contra el virus de la Tilapia de Lago (TiLV)

TRABAJOS ORIGINALES

Presentado: 29/11/2018
Aceptado: 05/07/2019
Publicado online: 30/09/2019

Correspondencia:

*Autor de correspondencia

MCI: monicapaolacriollojoaquin@gmail.com

EM: motte.emmerik@gmail.com

MS: maxsa1002@gmail.com

JM: jorgemedina_CA@hotmail.com

BD: diringerb@yahoo.fr

GS: gsandovalp@unmsm.edu.pe

EM: ericmialhe@yahoo.fr

Design and evaluation of the expression of a potential DNA vaccine against Tilapia lake virus (TiLV)

Mónica Criollo-Joaquín*¹, Emmerik Motte^{1,2,3}, Max Salvatierra⁴, Jorge Medina², Benoit Diringer^{1,2}, Gustavo Sandoval⁵, y Eric Mialhe^{1,2,3}

1. Universidad Nacional de Tumbes, Perú.
2. Inca'biotec SAC, Calle Filipinas 212, Tumbes, Perú.
3. Concepto Azul SA, Guayaquil, Ecuador.
4. Biotecoop, Tumbes, Perú.
5. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, GIBIO-BES, Lima, Perú.

Otros datos de los autores / biografía:

ORCID Mónica Criollo_Joaquín:

ORCID Emmerik Motte: 0000-0001-9577-2887

ORCID Max Salvatierra:

ORCID Jorge Medina:

ORCID Benoit Diringer: 0000-0001-6129-1751

ORCID Gustavo Sandoval:

ORCID Eric Mialhe:

Citación:

Criollo-Joaquín M., E. Motte, M. Salvatierra, J. Medina, B. Diringer, G. Sandoval, y E. Mialhe. 2019. Diseño y evaluación de la expresión de una potencial vacuna de ADN contra el virus de la Tilapia de Lago (TiLV). *Revista peruana de biología* 26(3): 301 - 310 (Septiembre 2019). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i3.15516>

Palabras clave: : acuicultura; tilapia; homología estructural; expresión génica; neuraminidasa.

Keywords: aquaculture; tilapia; structural homology; gene expression; neuraminidase.

Resumen

El Virus de la Tilapia del Lago (TiLV), es un patógeno causante de mortalidades masivas tanto en poblaciones de tilapias cultivadas y silvestres alrededor del mundo. El desarrollo de una vacuna efectiva contra este patógeno emergente es imperativo para prevenir pérdidas económicas. En este trabajo se diseñó y evaluó un vector de expresión como una potencial vacuna de ADN contra este virus. Inicialmente, se realizó un análisis de enhebramiento para predecir las estructuras tridimensionales y las funciones de las proteínas del TiLV. Se encontraron homologías estructurales entre las proteínas correspondientes al segmento genómico 1 y al segmento genómico 4 del TiLV, con las proteínas de ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la influenza B (56%) y la proteína neuraminidasa que pertenece a la cápside del virus de la influenza A (12%), respectivamente. Se insertó el producto de PCR del gen neuraminidasa viral en el vector plasmídico de expresión pCMV. Finalmente, se inyectó el constructo plasmídico en juveniles de la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* y se midió su expresión mediante RT-PCR en tiempo real a las 8h, 16h, 24h, 72h después de la segunda inyección inmunizante. Se logró detectar expresión génica en los cuatro tiempos evaluados, con mayor expresión a las 16 horas post inyección. Estos resultados constituyen el primer paso para el desarrollo de una vacuna efectiva para la protección de los stocks de tilapias alrededor del mundo.

Abstract

Tilapia Lake Virus (TiLV) is a pathogen that causes massive mortalities in both cultured and wild tilapia populations around the world. The development of an effective vaccine against this emerging pathogen is imperative to prevent economic losses. In this work an expression vector was designed and evaluated as a potential DNA vaccine against this virus. Initially, a threading analysis was done to predict the three-dimensional structures and functions of the TiLV proteins. Structural homologies were found between the TiLV proteins corresponding to the genomic segment 1 and the genomic segment 4, with the RNA-dependent RNA polymerase proteins of the influenza B virus (56%) and the neuraminidase protein belonging to the influenza A virus capsid (12%), respectively. The PCR product of the viral neuraminidase gene was inserted into the expression plasmid vector pCMV. Finally, the plasmid construct was injected into juveniles of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and its expression was measured by real time RT-PCR at 8h, 16h, 24h, and 72h after the second immunizing injection. It was possible to detect gene expression in the four evaluated times and greater expression at 16 hours post injection. These results are the first step in the development of an effective vaccine for the protection of tilapia stocks around the world.

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con revistaperuana.biologia@unmsm.edu.pe.

Introducción

La tilapia agrupa diferentes especies de cíclidos, los cuales acupan el segundo lugar en producción piscícola a nivel mundial (FAO 2017). Actualmente las producciones de tilapias están severamente afectadas por un patógeno emergente conocido como el Virus de la Tilapia del Lago (TiLV) (Jansen et al. 2018). Este agente infeccioso ha ocasionado mortalidades masivas en poblaciones de tilapias cultivadas y silvestres en Israel, Ecuador, Colombia (Bacharach et al. 2016, Eyngor et al. 2014, Ferguson et al. 2014, Tsofack et al. 2016, Del-Pozo et al. 2017), Egipto (Fathi et al. 2017, Nicholson et al. 2017), Tailandia (Dong et al. 2017a, 2017b, Surachetpong et al. 2017), Filipinas (OIE 2017), Taiwán (FIS 2017), India (Behera et al. 2018), Malasia (Amal et al. 2018), Uganda, Tanzania (Mugimba et al. 2018) y Perú (SANIPES 2018).

Este virus, inicialmente incluido dentro de la familia Ortomixovirus, fue recientemente reclasificado en un nuevo grupo propio no asignado denominado Tilapinevirus (Adams et al. 2017). El virion del TiLV aislado de tejidos de tilapias infectadas de Israel y Tailandia (Eyngor et al. 2014, Tattiyapong et al. 2017a, Surachetpong et al. 2017) es muy similar a los ortomixovirus (Stoeckle et al. 1987, Desselberger et al. 1980), como el Influenzavirus (Cheville & Lehmkuhl 2009), y el Isavirus del salmón (Kibenge et al. 2004, Koren & Nylund 1997) y corresponde a un pequeño virus envuelto de 55-75 nm que protege un genoma de ARN de sentido negativo segmentado. El genoma del TiLV ha sido completamente secuenciado (10323 pb) y está constituido de 10 segmentos que presentan secuencias terminales 5' y 3' homólogas (Bacharach et al. 2016). A nivel nucleotídico y aminoacídico, el segmento 1 posee una homología de secuencia con la subunidad de la proteína básica 1 (PB1) de la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus influenza C que infecta a humanos y porcinos (Bacharach et al. 2016). Por el contrario, los otros segmentos del TiLV no tienen homología con ninguna secuencia de otros virus (Bacharach et al. 2016).

La vacunación es la principal fuente de inmunidad específica artificial contra agentes patógenos virales en acuicultura (Dalmo 2018). Hasta la fecha, no se dispone de vacunas efectivas contra el Virus de la Tilapia del Lago a pesar de su importancia comercial.

Entre los diferentes tipos de vacunas existentes, las vacunas de ADN o vacunas de tercera generación ofrecen numerosas ventajas sobre las vacunas convencionales; (1) no presentan riesgos asociados a la utilización de patógenos atenuados, (2) su desarrollo es simple y son menos costosas para producir, (3) son termoestables, (4) evocan respuestas inmunes celulares y humorales, (5) tienen mayor persistencia del inmunógeno y (6) la expresión *in vivo* asegura que la proteína se asemeje más a la estructura eucariota normal, con las modificaciones postraduccionales que la acompañan (Assefa 2018, Dalmo 2018, Evensen & Leong 2013; Gillund et al. 2008, Kurath 2008, Lorenzen & LaPatra 2005, Salgado-Miranda et al. 2013, Sepúlveda & Lorenzen 2016). Las vacunas de ADN consisten en un plásmido bacteriano que contiene

un promotor fuerte, el gen de interés (que codifica una proteína inmunogénica) y una secuencia de poliadenilación/terminación transcripcional. Entre los promotores fuertes, el más utilizado es el promotor viral de Citomegalovirus por su capacidad a promover la expresión en una amplia variedad de tejidos (Evensen & Leong 2013). El ADN plasmídico al entrar en las células se transcribe *in vivo* y dirige la síntesis del antígeno poliproteínico. La poliproteína transcrita se autoensambla en una estructura de cápside que se asemeja a la proteína del virus nativo y evoca la inmunidad del huésped (Kibenge & Kibenge 2016). Es posible potencializar la entrega de los plásmidos mediante la adición de transfectantes como la polietilenimina (PEI), la lipofectamina, nanopartículas, etc. (Chen et al. 2011, Rauta et al. 2016).

El desarrollo de vacunas de ADN requiere la identificación de los antígenos inmunogénicos, lo que hasta la fecha ha sido una limitante para TiLV debido a que sus proteínas no han sido caracterizadas.

Sin embargo, existen actualmente herramientas bioinformáticas que permiten identificar proteínas desconocidas o predecir su función comparando sus estructuras tridimensionales con bases de datos de proteínas conocidas. Esta metodología se basa en los principios claves; (1) que la estructura terciaria de la proteína está más conservada en la evolución que la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) y (2) que hay evidencia que en la naturaleza existe un número determinado y relativamente pequeño (1000-10000) de pliegues únicos en las proteínas (Koonin et al. 2002). Dentro de las herramientas bioinformáticas Phyre2 es uno de los servidores de predicción de estructura de proteínas más ampliamente utilizado (Kelley et al. 2015). Este tipo de metodología ha permitido, por ejemplo, la identificación exitosa de las proteínas del Isavirus del Salmón (Cottet et al. 2010).

Bajo este enfoque, en este trabajo se identificaron las proteínas inmunogénicas de TiLV, con la finalidad de diseñar y evaluar un vector de expresión como una potencial vacuna de ADN contra este virus.

Materiales y métodos

Colección de animales para el estudio.- Se utilizaron 90 tilapias (*Oreochromis niloticus*) de aproximadamente 40 g del Centro Experimental de Biotecnología para el Desarrollo Sustentable (CBDS) de Guayaquil-Ecuador. El trabajo experimental se llevó entre noviembre del 2017 y mayo del 2018. Grupos de 15 tilapias se colocaron en tanques de 250 L y fueron mantenidas con alimento balanceado comercial *ad libitum*. La temperatura de mantenimiento fue 25° C y ciclos naturales de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Las cantidades de amoníaco total se mantuvieron entre 0.25-2 ppm, los nitritos entre 0-0.5 ppm y el pH entre 7-7.5. Para la manipulación de los peces fuera del agua se utilizó como anestésico el acuestrol® a 13 mg/L, añadiéndose en el agua con abundante aireación.

Predicción de la estructura de las proteínas del

TiLV.- La predicción de las estructuras tridimensionales de las proteínas del TiLV se llevó a cabo, usando las secuencias de la base de datos de proteínas NCBI protein (Tabla 1), el programa PHYRE2 para el modelamiento estructural por enhebramiento (Kelley et al. 2015), el programa CN3D para el alineamiento y visualización de las estructuras tridimensionales, se realizó un alineamiento estructural de la cadena D de la neuraminidasa del Influenzavirus A (PBD ID 1W21) y la secuencia de aminoácidos del segmento 4 del TiLV (Número de acceso del NCBI AMR44596.1) y el programa Signal P para la predicción de los péptidos señales.

Diseño del plásmido recombinante pTiLV-4.- Se utilizaron diversas plataformas bioinformáticas para el diseño de primers (Primer blast) (Tabla 2), para el análisis de los sitios de restricción del vector y del inserto (NEBcutter) y para la construcción *in silico* del plásmido pTiLV-4 (UGENE) (Fig. 1). El Fragmento de ADN TiLV-4, que corresponde al gen predicho de la neuraminidasa del TiLV, está compuesto por una región Kozak consenso (Kozak 1986) y un marco de lectura abierto de 1065pb que codifica una proteína de 354 aminoácidos (aa) fue sintetizado por IDT (Integrated DNA Technologies, Estados Unidos). El plásmido molde seleccionado para la construcción de pTiLV-4, fue el pCMV-GFP (Addgene).

Construcción del plásmido recombinante pTiLV-4.- La construcción del plásmido recombinante pTiLV-4 se llevó a cabo en 3 etapas. Inicialmente se amplificó por PCR el fragmento de ADN TiLV-4 con una ADN polimerasa de alta fidelidad (PCR Phusion human specimen DNA polymerase -Thermo scientific), utilizando 1X de buffer de PCR (1.5 mM MgCl2 y dNTPs), 0.3 µM de cada cebador TiLV-4-Clo-F y TiLV-4-Clo-R, 0.5ul de ADN polimerasa y 0.5 ng del fragmento de ADN TiLV-4 en un volumen de reacción de 25 µL. Los ciclos de amplificación de la PCR fueron un ciclo inicial de denaturación a

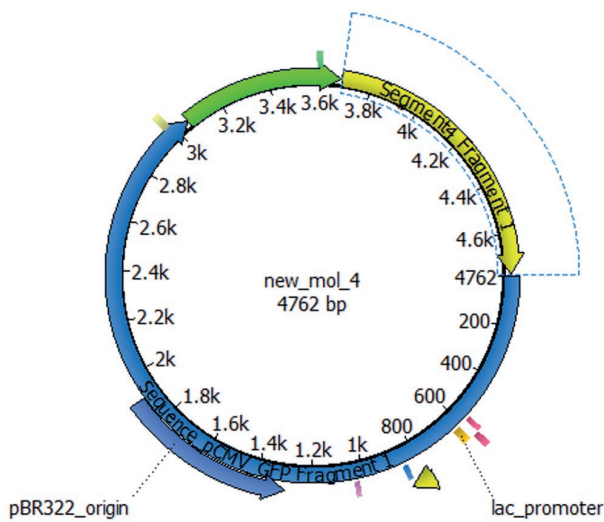


Figura 1. Mapa del plásmido pTiLV-4, diseñado en este estudio, de 4762pb. Gen neuraminidasa predicho (amarillo). Esqueleto de pCMV (azul y verde).

Tabla 1. Modelización de las proteínas por enhebramiento usando PHYRE2

Segmento	# accesoión	Longitud de los segmentos (bp)	ORF (pb)	Longitud de las proteínas (aa)	Proteína molde	Organismo	ID PDB	Cadena	Cobertura (%)	Identidad (%)	Confianza (%)	Función de la proteína	Péptido señal
TiLV-1	AMR44593.1	1641	1560	519	RNA polimerasa dependiente de RNA	<i>Influenzavirus B</i>	5FMZ	B	56	23	99.7	Transcripción	No
TiLV-2	AMR44594.1	1471	1374	457	Proteína reguladora sir3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2FVU	A	10	29	61.6	Transcripción	No
TiLV-3	AMR44595.1	1371	1260	419	Ribonucleasa D	<i>Escherichia coli</i>	1YT3	A	17	17	72.8	Hidrolasa, traducción	No
TiLV-4	AMR44596.1	1250	1071	356	Neuraminidasa	<i>Influenzavirus A</i>	1W21	D	12	44	25.2	Hidrolasa	1-12 aa
TiLV-5	AMR44597.1	1099	1032	343	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TiLV-6	AMR44598.1	1044	954	317	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TiLV-7	AMR44599.1	777	588	195	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TiLV-8	AMR44600.1	657	525	174	Tipo dominio N terminal YjeF	<i>Thermotoga maritima</i>	2AX3	-	64	27	48.3	Transferasa	No
TiLV-9	AMR44601.1	548	357	118	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TiLV-10	AMR44602.1	465	342	113	Proteína Ns5a	<i>Hepacivirus C</i>	2M5L	A	11	67	76.1	Proteína viral	No

98 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos a 98 °C por 1 s, 64 °C por 5 s y 72 °C por 17 s, y un ciclo final de extensión 72 °C por 1 min. Los productos de PCR, fueron migrados en un gel de agarosa 1.5% y las bandas fueron cortadas y purificadas mediante un kit de purificación (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Luego, se realizó una etapa de digestión enzimática del vector (pCVM-GFP) y del inserto (TiLV-4) con las enzimas XhoI y NotI (Thermo Scientific) utilizando 1X de buffer 0.10U NotI, 20 U XhoI y 0.5 – 1 µg de ADN en un volumen de reacción de 20 µL. La incubación se realizó a 37 °C por 6h, luego se inactivaron las enzimas a 80 °C por 20 min. Las bandas específicas que correspondían al pCMV sin GFP y los productos de la digestión del TiLV-4 fueron purificadas por utilizando un kit de purificación (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System - Promega).

Finalmente una etapa de ligación enzimática del ADN utilizando la enzima ligasa de ADN T4 (Thermo Scientific), utilizando 22 ng de vector lineal, 44 ng del inserto, 1X de buffer de la ligasa de ADN T4, y 2U de la ligasa T4 en un volumen de reacción de 20 µL. La incubación se realizó a 22 °C por 1 h, luego se inactivó la ligasa T4 a 65 °C por 10 min.

Obtención de colonias recombinantes pTiLV-4.-

La obtención de las colonias recombinantes pTiLV-4 se realizó mediante la transformación bacteriana de *E. coli* JM109 por shock térmico, utilizando 5 µL de la reacción de ligación y 50 µL de bacterias quimiocompetentes. La competencia bacteriana se realizó a partir de un cultivo de 25 mL de *E. coli* JM109 incubado a 37 °C, cuyo OD estaba entre 0.35 – 0.45. Se concentró el pellet celular por centrifugación a 3500 rpm por 30 min a 4 °C. Se agregó 10 mL de CaCl₂ (0.075 M) frío y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante. Se agregó 0.5 mL de CaCl₂ (0.075 M) frío y 15% de glicerol frío (75 µL), y se homogenizó. La transformación bacteriana se realizó mediante la incubación a 42 °C por 90 s e inmediatamente en hielo por 3 min. Se agregó 1 mL de caldo SOC (2% triptona, 0.5% de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucosa) y se incubó a 37 °C en

agitación a 200 rpm por 3h. Luego se sembraron 100 µL de cultivo en placas con agar LB +100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37 °C por 18 h.

Detección de colonias recombinantes.- Para detectar las colonias recombinantes, se seleccionaron colonias que crecieron en agar LB con ampicilina 100 µg/mL, se replicaron en 10 mL de caldo LB, se incubaron a 37 °C por 16 h. La extracción de plásmidos se realizó por el método de lisis alcalina. Se concentró el pellet celular por centrifugación a 3500 rpm por 30 min. Se resuspendió en 100 µL de buffer GTE (glucosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM) helado y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se añadió 200 µL de NaOH (0.2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló invirtiendo suavemente el tubo (5 veces) y se dejó en hielo por 5 min. Se añadió acetato de potasio 5M pH 4.8, se mezcló el tubo por inversión (5 veces) y se dejó en hielo 5 min. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm y se transfirió 400 µL del sobrenadante a un nuevo tubo. Se añadió 800 µL de etanol 95% helado y se dejó a temperatura ambiente por 2 min. Se concentró el pellet por centrifugación a 12000 rpm por 5min. Se lavó el sedimento con 1 mL de etanol 70% helado. Se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió en 30 µL de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). Se trató el ADN con 1 µL de solución de ARNasa 10 mg/ml y se incubó a 65 °C por 15 minutos.

Luego se realizó una PCR, utilizando 1x de buffer de PCR 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.3 µM de cada cebador TiLV-4-For y TiLV-4-Rev (Tabla S1), 1U de Taq polimerasa (Gene on) y entre 0.005-0.75 ng de ADN plasmídico. Se incluyó como control positivo al segmento TiLV-4. Los ciclos de amplificación de la PCR fueron un ciclo inicial de denaturación a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 58 °C por 40 s, 72 °C por 1.5 min y un paso final de extensión a 72 °C por 6 min. Los productos de la PCR fueron separados en gel de agarosa a 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Para detectar que el tamaño lineal del plásmido se realizó la digestión enzimática, utilizando 1x de buffer R 10X, 10U de enzima XhoI (Thermo scientific), 0.5 – 1 µg/ µL de ADN en un volumen de reacción de 20 µL. Se incubó a 37 °C por 5 h y luego se inactivó la enzima a 80 °C por 2 min.

Tabla 2. Primers utilizados para el diseño del plásmido recombinante pTiLV-4.

Genes	Primers	Secuencia	Longitud	TM (°C)	%GC	Tamaño de amplicones (pb)	Referencias
Neuramidinasa hipotética	TiLV-4-Clo-F	5' CATGCTCGAGCGCCACCATGGTGAGAACTACA 3'	32	73.4	56.2	1093	Diseñados en este proyecto
	TiLV-4-Clo-R	5' ATT GCG GCC GCC TAT CTC CCA ACA GCC C 3'	28	74.9	64.3		
	TiLV-4-For	5' ATCAAGGAAGGCACCAAGAAG 3'	20	61.5	50	560	
	TiLV-4_Rev	5' GTAGACCAACAACAACCAATAC 3'	24	61.5	41.7		
	qPCR-TiLV-4-F	5' GATTGAGACTTTGGAGGACGCC3'	22	64.7	54.5	163	
	qPCR-TiLV-4-R	5' CGGAGGCGGGATTATAGCAGT 3'	21	65.6	57.1		
β-actina	β-actin-qPCR-For-Ti	5' TCCAATTTATTGGCCTTCGTTGC 3'	23	60.4	43.5	114	Wang et al. 2014
	β-actin-qPCR-Rev-Ti	5' CTTCATTTCTGTGTGAGGGAGG3'	24	61.3	50		

Finalmente, se llevó a cabo una secuenciación del plásmido pTiLV-4 para determinar que el gen predicho de la neuraminidasa del TiLV clonado por PCR, estaba en el marco de lectura correcto. Se envió a secuenciar a la empresa Macrogen (EE.UU).

Preparación del complejo transfectante pTiLV-4/polietilenamina.- La colecta de plásmidos pTiLV-4 fue realizada utilizando el kit de extracción de plásmidos GENE JET Maxiprep (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las concentraciones del plásmido pTiLV-4 se midieron usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la primera dosis se utilizó una solución de 20 µg de plásmido pTiLV-4 más 70 µg de polietilenimina (PEI) a 1 µg/µL (polyscience, Inc) en un volumen de reacción de 150 µL de NaCl 150 mM mientras que para la segunda dosis se utilizaron 8 µg de plásmido pTiLV-4 más 24 µg de PEI a 1 µg/µL en un volumen de 150 µL. La solución de PEI se agregó a la solución de plásmido en ese orden. Esta solución se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente antes de ser utilizada. Para los grupos controles la solución PEI fue preparada de la misma manera, pero en vez del plásmido pTiLV-4 se agregó NaCl 150 mM.

Evaluación *in vivo* de la expresión del plásmido recombinante.- El diseño experimental consta de un grupo inyectado con la vacuna de ADN y un grupo control inyectado con PEI con 45 individuos cada grupo. Se administró 150 µL de la vacuna vía intramuscular en dos dosis en los días 1 y 20. Se colectó el tejido muscular de las tilapias inmunizadas a las 8, 16, 24, 72 horas después de la segunda inyección para evaluar la expresión génica del plásmido pTiLV por RT-PCR en tiempo real (RT-q PCR).

El ARN total se extrajo a partir del tejido muscular de 3 animales por grupo usando el método de Trizol-cloroformo (Trizol reagent, Thermo Scientific), luego un tratamiento con ADNasa (Thermo Scientific) para eliminar ADN genómico y plasmídico contaminante. A partir del ARN se realizó una reacción de retrotranscripción utilizando el kit de síntesis de la primera hebra de cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. La hebra de cDNA se utilizó para amplificar por qPCR el gen viral predicho de la neuroaminidasa del TiLV y el gen β-actina como control interno.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 25 µL, utilizando el kit de PCR cuantitativa Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2X) acorde a las instrucciones del fabricante con las siguientes especificaciones: 0.3 µM de cada cebador qPCR-TiLV-4-F y qPCR-TiLV-4-R ó β-actin-qPCR-For-Ti y β-actin-qPCR-rev-Ti (Tabla S1) y 1 µL de ADNc. Los ciclos de amplificación de la PCR en tiempo real fueron un ciclo inicial de denaturación a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. Un análisis de la curva de fusión fue realizado al final de cada perfil térmico de PCR para verificar la especificidad de los productos de la PCR. Cada muestra individual

se realizó por duplicado. La medición de la fluorescencia y la determinación de los valores del ciclo de umbral (Ct) fueron realizados en el termociclador StepOne™ de Applied Biosystems (Life technologies). La cuantificación relativa (RQ) se calculó de acuerdo a Livak et al. 2001 con el software StepOne™ v2.2.2 (Life technologies). Los gráficos fueron trabajados utilizando el programa GraphPad Prism 7.05.

Resultados

Predicción de la estructura de las proteínas del TiLV.- En el modelamiento de las proteínas hipotéticas del TiLV por enhebramiento (Tabla 1), la proteína predicha 1 tiene una homología estructural con la proteína RNA polimerasa dependiente de RNA de virus de influenza B con una cobertura de 56% y una confianza de 99.7% y participa en la transcripción de ARN viral. La proteína predicha 2 estaría involucrada en la transcripción, mientras que la proteína predicha 3 tiene función hidrolasa y estaría involucrada en el proceso de traducción. La proteína predicha 4 tiene una homología estructural con la cadena D de neuraminidasa del virus del Influenzavirus A del pato inglés con una cobertura de 12% y una confianza de 25.2%, se observa los dominios conservados entre las secuencias de aminoácidos de la neuraminidasa del Influenzavirus A y del segmento 4 del TiLV (Fig. 2); en el análisis de péptido señal resultó que los primeros 12 aminoácidos corresponden al péptido señal. La proteína predicha 8, tiene a una homología con Tipo dominio N terminal YjeF con función transferasa. La proteína predicha 10, tiene homología con la proteína Ns5a, que es una proteína viral. Las proteínas predichas de los segmentos 5, 6, 7, 9 no mostraron similitudes con otras proteínas conocidas.

Construcción del plásmido pTiLV-4.- El inserto que corresponde al gen predicho de la neuraminidasa del TiLV tiene un tamaño de 1079 pb (Fig. 3A). El vector que corresponde al plásmido CMV (sin GFP) tiene un tamaño aproximado de 3684 pb (Fig 3B). La ligación enzimática inserto-vector fueron transformadas en *E. coli* JM 109. Las colonias transformadas se seleccionaron por PCR, generando bandas de 560 pb, confirmando que contenían el inserto TiLV-4. El plásmido seleccionado fue adicionalmente linealizado mediante una digestión de restricción usando Xho I, dando como resultado un tamaño de 4762 pb (Fig 3C) confirmando el tamaño de la construcción teórica. La secuenciación del plásmido confirmó que no se introdujo mutaciones en el proceso de clonaje. El plásmido resultante, pTiLV-4, fue usado en este estudio.

Evaluación la expresión del gen viral predicho de la neuraminidasa del TiLV en tilapia.- En la cuantificación relativa por RT-PCR en tiempo real después de la segunda dosis inmunizante, las células transfectadas vía intramuscular con la solución pTiLV-4/ PEI, expresaron la proteína viral predicha de la neuraminidasa del TiLV a las 8, 16, 24 y 72h. La expresión fue mayor a 16h con un diferencial superior a 2000 veces que a las 8h y a las 24h la expresión disminuyó, pero fue mayor 2 veces

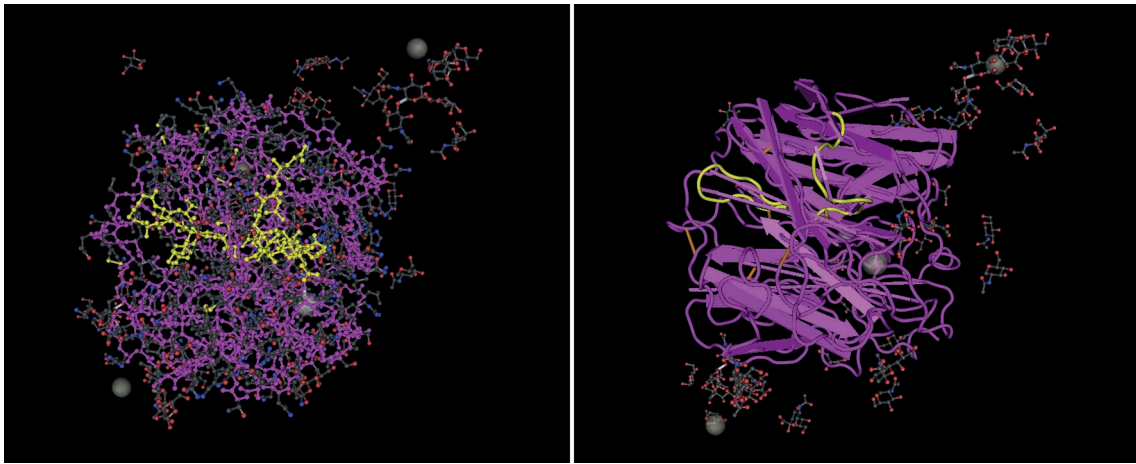


Figura 2. Homología de estructura entre la proteína predicha 4 del TiLV (N° accesión AMR44596.1) y la neuraminidasa del Influenzavirus A (PDB ID 1W21). (A) Diagrama de barras y esferas (B) Diagrama enroscado, resaltando las homolías de secuencia y estructura (amarillo).

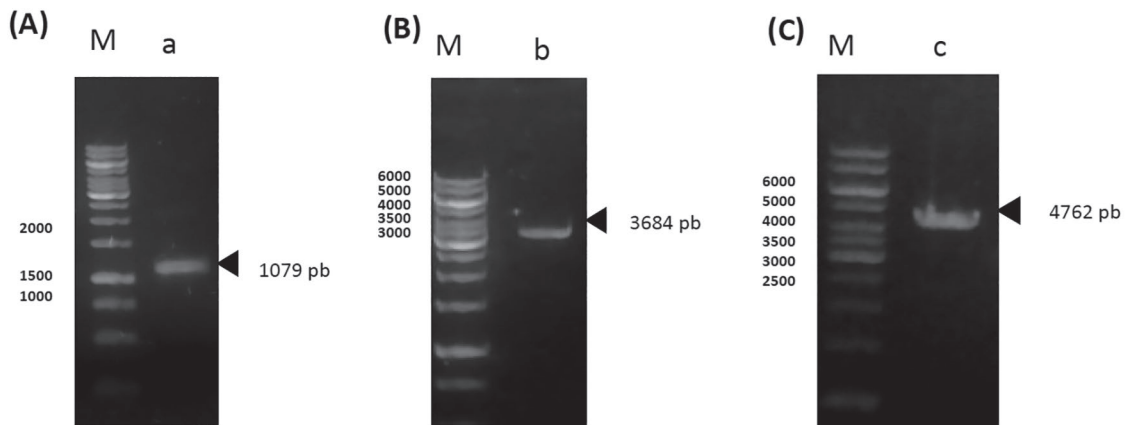


Figura 3. Construcción del plásmido pTiLV-4. (A) Línea a: inserto (TiLV-4) (B) Línea b: vector (plásmido pCMV sin GFP) (C) Línea c: Digestión de restricción del plásmido pTiLV-4 usando Xho I. M: Marcador de peso molecular 1Kb.

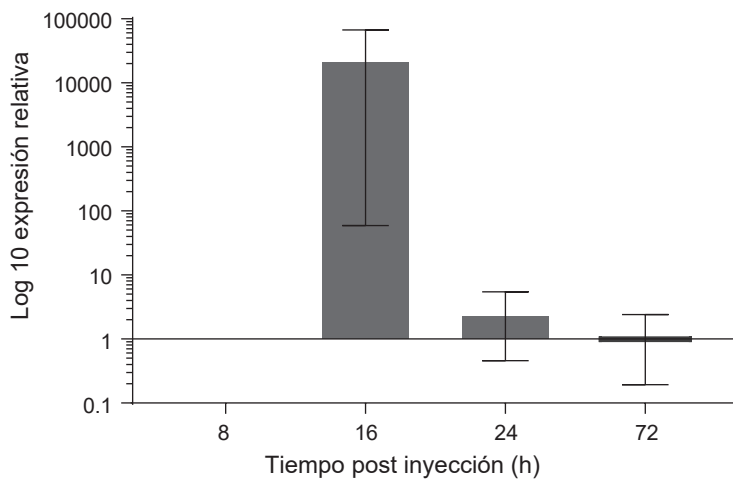


Figura 4. Expresión relativa del plásmido pTiLV-4 en peces transfectados después de la segunda dosis inmunizante a las 8h, 16h, 24h y 72h. Se utilizó como gen de referencia al β -actina y como tiempo calibrador, la expresión a las 8h.

que a las 8h y a las 72h se detectó menor expresión en 0.5 veces que a las 8h. No se detectó expresión génica en los controles inyectados con solución polietilimina (PEI) (Fig. 4).

Discusión

Mediante el análisis de homología de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para los 10 segmentos del TiLV se encontró que el segmento 1 tiene una homología con la secuencia que codifica para la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN, mientras que los otros 9 segmentos genómicos del TiLV no tienen homología con las secuencias de la base de datos (Bacharach et al. 2016). Sin embargo, por predicción estructural encontramos homología de las proteínas codificadas por los segmentos genómicos 1 y 4 con las proteínas de las bases de datos estructurales (Protein Data Bank).

La proteína predicha 1 del TiLV tiene una homología estructural con la proteína RNA polimerasa dependiente de RNA de virus de influenza B con 56% de cobertura, 23% y 99.7% de confianza. Esto concuerda parcialmente con resultados reportados donde se observó que segmento 1 posee una homología de secuencia de 37% de cobertura y 17% de identidad con la subunidad de la proteína básica 1 (PB1) de la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN del virus influenza C de la familia orthomyxoviridae (Bacharach et al. 2016).

La proteína predicha 4 del TiLV, tiene una homología estructural con la proteína neuraminidasa del virus de la influenza A del pato inglés con 12% de cobertura, 44% de identidad y 25.2% de confianza, esto puede deberse a que las proteínas de la cápside viral son altamente mutantes, pero mantiene dominios conservados dentro de un subtipo. (Eichelberger et al. 2018).

Se ha descrito el uso de las proteínas de la cápside viral hemaglutinina esterasa (HA) y neuraminidasa (NA) como antígenos contra el Isavirus y el Influenzavirus (Mikalsen et al. 2005, Caruffo et al. 2016). La NA desempeña un papel esencial en la replicación del virus al participar en la liberación de los viriones de las células infectadas al exterior, mediante la ruptura de azúcares que ligan a las partículas virales maduras (Cheville & Lehmküh 2009, Koren & Nylund 1997). La NA tiene además un beneficio adicional como antígeno de la vacuna, ya que muchos anticuerpos específicos de NA se unen a dominios que están bien conservados dentro de un subtipo, protegiendo contra virus heterólogos, lo que sugiere que la NA puede ser una buena opción para su inclusión en las vacunas universales contra Ortomixovirus (Eichelberger et al. 2018).

La expresión del plásmido pTiLV-4 fue mayor a las 16h en el tejido muscular y no fue sostenible en el tiempo, sin embargo en otros reportes la expresión de los plásmidos *in vivo* la expresión empieza a las 24h y se mantiene en el tiempo (Gao 2018).

Para mejorar la expresión y mantener en el tiempo hay varias posibilidades de trabajo, como evaluar el promotor utilizado para la expresión del gen. El plásmido

pTiLV-4 tiene un promotor de citomegalovirus (CMV), que es el promotor más utilizado porque impulsa la expresión en una amplia variedad de tejidos y las primeras vacunas efectivas incluyeron este promotor (Evensen & Leong 2013); y la secuencia consenso Kozak que es clave en la fijación del ribosoma para su traducción (Grzegorski et al. 2014, Kozak 1986). Sin embargo, para mejorar la eficiencia de transcripción de la proteína viral *in vivo* en el tiempo, sería interesante de evaluar promotores endógenos de la tilapia como β -actina, proteína de shock térmico, etc. (Er-Meng et al. 2008).

Para potenciar la respuesta inmunitaria se han descrito la coadministración de los plásmidos con adyuvantes moleculares (García-Valtanan et al. 2014, Li et al. 2015, Robertsen et al. 2016, Rivas-Aravena et al. 2015) o la entrega vía electroporación (Flingai et al. 2013), que se podría evaluar.

Los plásmidos al ser inyectados vía intramuscular ingresan a los miocitos y las células dendríticas, donde el gen codificado (neuraminidasa) por el plásmido es expresado. Los péptidos son procesados por la maquinaria celular, y presentados a los linfocitos T mediante el complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II. Se secretarán quimioquinas y citoquinas que activarán la respuesta de los macrófagos y la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Asimismo, se generarán los linfocitos T y B de memoria (Flingai et al. 2013). Será necesario realizar estudios similares sobre el plásmido pTiLV-4.

Se recomienda evaluar la inmunogenicidad, la especificidad y la eficacia de esta vacuna, i.e. probar que las tilapias vacunadas logren generar los anticuerpos adecuados de forma perdurable. Finalmente, sería muy acertado realizar análisis comparativos con otras secuencias proteicas de TiLV aislados de varios países para la creación de una vacuna universal.

Literatura citada

- Adams M.J., E.J. Lefkowitz, A.M. King, et al. 2017. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses (2017). *Archives of Virology*, 162: 2505-2538. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>
- Amal M.N.A, M.N.A Koh, M. Nurliyana, et al. 2017. A case of natural co-infection of Tilapia Lake Virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. *Aquaculture* 485(2): 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.019>
- Assefa A. & F. Abunna. 2018. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International* vol. 2018, Article ID 5432497, 10 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Bacharach E., N. Mishra, T. Briese, et al. 2016. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia. *mBio* 7(2):e00431-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-16>

- Behera B.K., P. K. Pradhan, T.R. Swaminathan, et al. 2018. Emergence of Tilapia Lake Virus associated with mortalities of farmed Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture* 484: 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.11.025>
- Caruffo M., C.Maturana, S. Kambalapally, et al. 2016. Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in *Salmo salar*. *Fish & shellfish immunology*, 54, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.009>
- Cheville N.F. & H. Lehmkuhl. 2009. Orthomyxoviruses. In: Cheville, NF, ed. *Ultrastructural Pathology*. Second ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell: 356-357.
- Chen J., Z. Li, H. Huang et al. 2011. Improved antigen cross-presentation by polyethyleneimine-based nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, 6, 77. <https://doi.org/10.2147/IJN.S15457>
- Cottet L., M. Cortez-San Martin, M. Tello et al. 2010. Bioinformatic analysis of the genome of infectious salmon anemia virus associated with outbreaks with high mortality in Chile. *Journal of virology*, 84(22), 11916-11928. <https://doi.org/10.1128/JVI.01202-10>
- Dalmo R.A. 2018. DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *Journal of fish diseases*, 41(1). 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfd.12727>
- Del-Pozo J., N. Mishra, R. Kabuusu, et al. 2017. Syncytial hepatitis of tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is associated with orthomyxovirus-like virions in hepatocytes. *Veterinary pathology*, 54 (1), 164-170. <https://doi.org/10.1177/0300985816658100>
- Desselberger U., V.R. Racaniello, J.J. Zazra, et al. 1980. The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene*, 8(3), 315-328. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(80)90007-4)
- Dong H.T., S. Siriroob, W. Meemetta, et al. 2017a. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative seminested RT-PCR for detection. *Aquaculture* 476: 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.019>
- Dong H.T., G.A. Ataguba, P. Khunrae, et al. 2017b. Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries in Thailand from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease. *Aquaculture* 479: 579-583. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.035>
- Eichelberger M. C., D. M. Morens & J. K. Taubenberger. 2018. Neuraminidase as an influenza vaccine antigen: a low hanging fruit, ready for picking to improve vaccine effectiveness. *Current opinion in immunology*, 53, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.025>
- Er-Meng Y., Y. Xing, W. Hai-Ying, et al. 2008. Isolation and primary function detection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) β -actin promoter. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 5(2), 141-146. <https://doi.org/10.1017/S1479236208002283>
- Evensen O. & J.A. Leong. 2013. DNA vaccines against viral diseases of farmed fish. *Fish Shellfish Immunol.* 35:1751-1758. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.1.218-227.2000>
- Eyngor M., Z. Rachel, J.E.K. Tsofack et al. 2014. Identification of a Novel RNA virus lethal to Tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*. 52(12): 4137-4146. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-14>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017a. *Global Aquaculture Production*. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en> (acceso 05/09/18).
- Fathi M., C. Dickson, M. Dickson M, et al. 2017. Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome. *Aquaculture* 473: 430-432. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.014>
- Ferguson H.W., R. Kabuusu, S. Beltran, et al. 2014. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report. *Journal of fish diseases* 37: 583-589. <https://doi.org/10.1111/jfd.12142>
- Flingai S., M. Czerwonko, J. Goodman, et al. 2013. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. *Fon-teirs in immunology* 4:354. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00354>
- FIS. 2017. Tilapia Lake Virus Affects Seven Farms in Taoyuan. <http://www.fis.com/Fis/Worldnews/worldnews.asp?monthyear=6-2017&day=19&id=92318&l=e&country=&special=&nb=1&df=1>. Acceso 08/08/2018.
- Gao, Y., Pei, C., Sun, X., Zhang, C., Li, L., & Kong, X. (2018). Plasmid pcDNA3.1-s11 constructed based on the S11 segment of grass carp reovirus as DNA vaccine provides immune protection. *Vaccine*, 36(25), 3613-3621. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.043>
- García-Valtanen P., A. Martínez-López, M. Ortega-Villaizan, et al. 2014. In addition to its antiviral and immunomodulatory properties, the zebrafish β -defensin 2 (zfbD2) is a potent viral DNA vaccine molecular adjuvant. *Antiviral research*, 101, 136-147. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.11.009>
- Garver K.A., S.E. LaPatra & G.Kurath. 2005. Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Diseases of aquatic organisms* 64:13-22. <https://doi.org/10.3354/dao064013>
- Grzegorski S.J., E.F. Chiari, A. Robbins, et al. 2014. Natural Variability of Kozak Sequences Correlates with Function in a Zebrafish Model. *PLoS ONE* 9(9): e108475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108475>
- Gillund F., R. Dalmo, T.C. Tonheim et al. A.I. Myhr. 2008. DNA vaccination in aquaculture-expert judgments of impacts on environment and fish health. *Aquaculture*, 284(1-4), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.044>
- Jansen M.D., H.T. Dong & C.V. Mohan. 2018. Tilapia lake virus: a threat to the global tilapia industry?. *Reviews in Aquaculture*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/raq.12254>
- Kelley L.A., S. Mezulis, C.M. Yates, et al. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
- Kibenge F., K. Munir, M. Kibenge, et al. 2004. Infectious salmon anemia virus: Causative agent, pathogenesis and immunity. *Animal Health Research Reviews*, 5(1), 65-78. <https://doi.org/10.1079/AHR200461>
- Kibenge F.S.B. & M.J.T. Kibenge. 2016. Orthomyxoviruses of fish. In *Aquaculture virology* (pp. 299-326). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00019-X>
- Koonin E.V., Y.I. Wolf & G.P. Karev. 2002. The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature* 420: 218-223. <https://doi.org/10.1038/nature01256>
- Koren C.W.R. & A. Nylund. 1997. Morphology and morphogenesis of infectious salmon anaemia virus replicating in the endothelium of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of aquatic organisms*, 29(2), 99-109. <https://doi.org/10.3354/dao029099>

- Kozak M. 1986. Point Mutations Define a Sequence Flanking the AUG Initiator Codon That Modulates Translation by Eukaryotic Ribosomes. *Cell* 44: 283-292. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
- Kurath G. 2008. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Revue scientifique et technique* 27: 175-196. <https://doi.org/10.20506/rst.27.1.1793>
- Li M.F., Y.X. Li & L. Sun. 2015. CD83 is required for the induction of protective immunity by a DNA vaccine in a teleost model. *Developmental and Comparative Immunology* 51:141-147. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.03.005>
- Livak K.J. & T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 25:402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lorenzen N. & S.E. LaPatra 2005. DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 24(1), 201. <https://doi.org/10.20506/rst.24.1.1565>
- Mikalsen A.B., H. Sindre, J. Torgersen et al. 2005. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. *Vaccine*, 23(41), 4895-4905. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.025>
- Mugimba K.K., A.A. Chengula, S. Wamala, et al. 2018. Detection of tilapia lake virus (TiLV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria. *Journal of fish diseases* 41:1181-1189. <https://doi.org/10.1111/jfd.12790>
- Nicholson P., M.A. Fathi, A. Fischer, et al. 2017. Detection of Tilapia Lake Virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015. *Journal of fish diseases* 40:1925-1928. <https://doi.org/10.1111/jfd.12650>
- OIE 2017. Disease notification report 25278, 23/11/2017. https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=25278
- Rauta P.R., B. Nayak, G.A. Monteiro, et al. 2017. Design and characterization of plasmids encoding antigenic peptides of Aha1 from *Aeromonas hydrophila* as prospective fish vaccines. *Journal of biotechnology*, 241: 116-126. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.019>
- Rivas-Aravena A., Y. Fuentes, J. Cartagena et al. 2015. Development of a nanoparticle-based oral vaccine for Atlantic salmon against ISAV using an alphavirus replicon as adjuvant. *Fish & Shellfish Immunology* 30:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.033>
- Robertsen B., C.J. Chang & L. Bratland. 2016. IFN-adjuvanted DNA vaccine against infectious salmon anemia virus: Antibody kinetics and longevity of IFN expression. *Fish & Shellfish Immunology* 54: 328-332. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.027>
- Salgado-Miranda C., E. Loza-Rubio, E. Rojas-Anaya et al. 2013. Viral vaccines for bony fish: past, present and future. *Expert review of vaccines*, 12(5), 567-578. <https://doi.org/10.1586/erv.13.38>
- SANIPES (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera). 2018. COMUNICADO N° 018 - 2018 - SANIPES, Ministerio de Producción, Perú. http://192.169.196.91/documentos/_COMUNICADO-N-018-2018-SANIPES.pdf
- Sepúlveda D. & N. Lorenzen. 2016. Can VHS Virus Bypass the Protective Immunity Induced by DNA Vaccination in Rainbow Trout? *PLoS ONE* 11 (4): e0153306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153306>
- Stoeckle M.Y., M.W. Shaw & P.W. Choppin. 1987. Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(9), 2703-2707. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2703>
- Surachetpong W., T. Janetanakit, N. Nonthabenjawan, et al. 2017. Outbreaks of Tilapia Lake Virus infection, Thailand, 2015-2016. *Emerging infectious diseases* 23: 6. <https://doi.org/10.3201/eid2306.161278>
- Tattiyapong P., W. Dachavichitlead & Surachetpong. 2017a. Experimental infection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*). *Veterinary microbiology*, 207, 170-177. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.014>
- Tsofack J.E.K., R. Zamostiano, S. Watted, et al. 2017. Detection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in clinical samples by culturing and nested RT-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 55: 759-767. <https://doi.org/10.1128/JCM.01808-16>
- Wang Y.T., H.Y. Huang, M.A. Tsai, et al. 2014. Phosphoglycerate kinase enhanced immunity of the whole cell of *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 250-259. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.09.008>

Agradecimientos:

Agradecemos a la Universidad Nacional de Tumbes por su aporte en la investigación, a Inca biotec SAC, que fue el lugar donde se llevó a cabo el desarrollo experimental del presente trabajo. También, nuestro agradecimiento a Sergio Barahona Padilla por la revisión del manuscrito. El presente artículo es parte de la tesis presentada por Mónica Paola Criollo Joaquin para obtener el grado de Maestro en Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional de Tumbes.

Rol de los autores:

MCJ concepción, desarrollo experimental de la investigación y elaboración del manuscrito. EMD concepción y asesoramiento en el desarrollo experimental. MS asesoramiento de la investigación. JM desarrollo experimental de la investigación. BD revisión del presente manuscrito. GS asesoramiento bioinformático. EM concepción del proyecto, asesoramiento de la investigación. MCJ, EMD, MS, JM, BD, GS y EM revisaron y aprobaron el manuscrito.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no incurrir en conflictos de intereses.

Fuentes de financiamiento:

Este trabajo fue financiado por una beca de maestría por parte de FONDECYT-CONCYTEC (Convenio de gestión N°000190-2015-FONDECYT de la Universidad Nacional de Tumbes) y el Círculo de Investigación en Biotecnología Molecular para el Desarrollo y la Sostenibilidad de los Sectores Acuícolas del Perú (asignación 132-2015-FONDECYT).

Aspectos éticos / legales:

Los autores declaran no haber necesitado un permiso específico para el presente trabajo. La acuicultura de tilapia en cautiverio se realizó de acuerdo con criterios internacionales para el bienestar animal.

