



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Evaluación experimental de una vacuna polivalente  
para la prevención de furunculosis y septicemias  
causadas por *Aeromonas salmonicida* en alevines de  
trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Marisol Arelis PIZARRO GIRAO

**ASESOR**

Nieves Nancy SANDOVAL CHAUPE

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

## Referencia bibliográfica

---

Pizarro, M. Evaluación experimental de una vacuna polivalente para la prevención de furunculosis y septicemias causadas por *Aeromonas salmonicida* en alevines de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2019.

---

## **H0JA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS**

### **CÓDIGO ORCID DEL AUTOR**

0000-0002-4234-3154

### **CODIGO ORCID DEL ASESOR**

0000-0003-0112-9183

### **DNI DEL AUTOR**

74158226

### **DNI DEL ASESOR**

070011047

### **GRUPO DE INVESTIGACIÓN**

Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola: GRISANAC

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

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

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

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

Av. Circunvalación 28, San Borja 15021

Coordenadas geográficas: -12.081698, -76.987703

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

Parte experimental: Agosto – Diciembre del 2018



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

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

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, **lunes 17 de junio de 2019**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0098-EPMV/FMV-2019**, integrado por los siguientes profesores:

<b>MV. PhD Gavidia Chucán César Miguel</b>	<b>Presidente de Jurado</b>
<b>MV Mg. Nieves Sandoval Chaupe</b>	<b>Asesor de la Tesis</b>
<b>MV MSc. Rosa Amelia Perales Camacho</b>	<b>Miembro del Jurado</b>
<b>MV. Mg. Juan José Siuce Moreno</b>	<b>Miembro del Jurado</b>

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **MARISOL ARELIS, PIZARRO GIRAO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

**“EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE UNA VACUNA POLIVALENTE PARA LA PREVENCIÓN DE FURUNCULOSIS Y SEPTICEMIAS CAUSADAS POR *Aeromonas salmonicida* EN ALEVINES DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)”;**

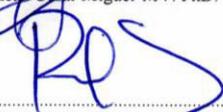
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

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

Siendo las **13:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

  
.....  
Gavidia Chucán César Miguel MV. PhD. Prof. Principal. D.E

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

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

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





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0098-EPMV/FMV-2019.

**PRESIDENTE:**

  
.....  
GAVIDIA CHUCÁN CÉSAR MIGUEL

**MIEMBROS :**

  
.....  
NIEVES SANDOVAL CHAUPE  
ASESORA DE LA TESIS

  
.....  
ROSA AMELIA PERALES CAMACHO

  
.....  
JUAN JOSÉ SIUCE MORENO

San Borja, 07 de agosto de 2019

V° B°





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

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

## DEDICATORIA

**Esta tesis se la dedico a:**

*A mis padres por su inmenso amor y por siempre estar a mi lado apoyándome, siendo mi principal motivación para dar lo mejor de mí.*

*A mi hermano y a Karen, por su compañía y apoyo incondicional y a mis abuelas por ser el ejemplo de fortaleza y por su gran amor*

*A mis familiares por siempre tener buenos deseos para mí, por disfrutar de mis logros, y en especial a mis tíos en el cielo: Rodolfo y Vicky por demostrarme su cariño desde pequeña, están siempre en mi corazón.*

*A mi motivación de 4 patas, Perlita, porque desde que llegó a mi vida se ganó un gran lugar en mi corazón y le dio una chispa de alegría y amor incomparable.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la fuerza necesaria ante las adversidades, por mostrarme siempre que lo bueno esta ahí aun en los peores momentos y por ser mi guía.

A mi asesora de tesis, la Doctora Nieves y al Doctor Manchego por su apoyo y confianza a lo largo del desarrollo de la Tesis y por ser algo más que maestros, también amigos. Por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación en la vida y en nuestra profesión.

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

A mis amigos de toda la vida: Fiorella, Emma y Marco M. por todos los momentos vividos y por su amistad incondicional.

A mis amigos de Universidad aquellos que empezaron el camino conmigo, y aquellos que permanecieron hasta el final por su amistad sincera y apoyo durante la carrera: Karubya, Yoshi, Marco, Víctor, Adheli, Ana.

A aquellas personitas que se volvieron especiales en poco tiempo, pudiendo conocer las maravillosas personas y amigas que son: Milagros, Majo, Ale.

A Sasha, por ser mi ángel guardián en la tierra y la luz en el momento que más lo necesité.

A las maravillosas personas que conocí en el laboratorio de Ictiopatología, por las palabras de aliento, por su amistad y el gran apoyo durante el desarrollo de esta tesis y por los hermosos momentos compartidos: Adhemir, Felipe, Nathaly, Tatiana, Carol, Jeferson y Mauro.

“La vida está llena de colores, no te quedes en el gris de los problemas”

## INDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN .....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
GENERALIDADES .....	2
2.1.    Acuicultura .....	2
2.2.    Estado actual de la acuicultura mundial.....	2
2.3.    Estado actual de la acuicultura nacional .....	6
2.4.    Trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) .....	8
<b>2.4.1.    Taxonomía</b> .....	8
<b>2.4.2.    Características biológicas</b> .....	9
<b>2.4.3.    Crianza en el Perú</b> .....	10
2.5.    Aeromonas salmonicida .....	11
<b>2.5.1.    Antecedentes históricos</b> .....	11
<b>2.5.2.    Taxonomía</b> .....	14
<b>2.5.3.    Características morfológicas</b> .....	15
2.6.    Epidemiología .....	19
<b>2.6.1.    Rango de hospedadores</b> .....	19
<b>2.6.2.    Distribución geográfica</b> .....	19
<b>2.6.3.    Frecuencia y prevalencia</b> .....	20
<b>2.6.4.    Factores predisponentes</b> .....	20
2.7.    Patogénesis .....	21
<b>2.7.1.    Ruta de infección</b> .....	21
<b>2.7.2.    Factores de virulencia</b> .....	22
2.8.    Aspectos clínicos y patológicos .....	25

<b>2.8.1.</b>	<b>Signos clínicos</b> .....	25
<b>2.8.2.</b>	<b>Lesiones macroscópicas:</b> .....	26
<b>2.8.3.</b>	<b>Lesiones microscópicas</b> .....	27
2.9.	Diagnóstico.....	27
<b>2.9.1.</b>	<b>Microbiológico</b> .....	27
<b>2.9.2.</b>	<b>Serológico</b> .....	28
<b>2.9.3.</b>	<b>Molecular</b> .....	29
2.10.	Control y prevención .....	29
2.11.	Sistema inmune en peces .....	31
<b>2.11.1.</b>	<b>Inmunidad innata inespecífica:</b> .....	32
<b>2.11.2.</b>	<b>Inmunidad específica o adquirida</b> .....	34
<b>2.11.3.</b>	<b>Órganos linfoides</b> .....	36
2.12.	Factores que impiden un buen desarrollo de la inmunidad y de la respuesta inmunológica.....	38
2.13.	Reacción inflamatoria.....	40
2.14.	Vacunación en peces .....	40
<b>2.14.1.</b>	<b>Microbiológico:</b> .....	41
<b>2.14.2.</b>	<b>Tipos de vacunas según la vía de administración:</b> .....	43
2.15.	Uso de adyuvantes .....	45
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1.	Localización y periodo del estudio .....	47
3.2.	Transporte y descarte de agentes infecciosos de los animales usados para el estudio .....	47
3.3.	Metodología.....	48
<b>3.3.1.</b>	<b>Establecimiento de la dosis letal (DL50)</b> .....	48
<b>3.3.2.</b>	<b>Cálculo de las UFC para el desafío experimental</b> .....	49
<b>3.3.3.</b>	<b>Preparación del antígeno vacunal</b> .....	51
<b>3.3.4.</b>	<b>Animales usados en el estudio</b> .....	52
<b>3.3.5.</b>	<b>Condiciones de crianza</b> .....	53
<b>3.3.6.</b>	<b>Diseño experimental</b> .....	53
<b>3.3.7.</b>	<b>Procedimiento de vacunación</b> .....	54
<b>3.3.8.</b>	<b>Desafío experimental</b> .....	55
<b>3.3.9.</b>	<b>Criterios para evaluar la eficacia de la vacuna</b> .....	56
<b>3.3.10.</b>	<b>Análisis de información</b> .....	56
IV.	RESULTADOS .....	57
4.1.	Mortalidad pos vacunación .....	57
4.2.	Signos clínicos y lesiones macroscópicas pos desafío.....	57

4.3.	Mortalidad post desafío .....	59
4.4.	Evaluación histopatológica.....	61
V.	DISCUSIÓN.....	65
VI.	CONCLUSIONES.....	70
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	71
VIII.	ANEXOS .....	79

## RESUMEN

En las piscigranjas las infecciones bacterianas endémicas son causadas por diferentes especies, sin embargo durante un brote de enfermedad uno de los patógenos predomina, siendo causante de la epizootia. Este proyecto evalúa la eficacia de una vacuna polivalente preparada previamente en el laboratorio, con cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilum*, procedentes de Truchas arcoíris durante brotes de enfermedad. El estudio se llevó a cabo en el centro experimental de la sección de ictiopatología, empleando 270 alevines, distribuidos en 6 acuarios (n=45/acuario), dos grupos controles, uno con vacunación falsa vía IP y otro con vacunación falsa vía INM, un grupo vacunado vía intraperitoneal (IP) y un grupo vacunado vía inmersión (IM) cada uno con sus repeticiones. En el grupo inmunizado vía intraperitoneal se inyectó 0.1 ml de la vacuna y para el grupo inmunizado vía inmersión, se sumergió durante 1 minuto en una dilución de 1:10 de la vacuna. Luego de 28 días fueron desafiados con la bacteria *Aeromonas salmonicida* por vía IP a la dosis de  $10^8$  (100 dosis letal 50) 0.1ml/pez y se observó a diario las reacciones que presentaron durante 21 días, durante ese periodo se efectuó la necropsia y el análisis microbiológico y como prueba complementaria examen histopatológico.

El grupo con falsa vacunación vía INM registró un % de muertes de 91.1%, 100% para el grupo con falsa vacunación vía IP, 45.5% vía inmersión y 25.5 % vía intraperitoneal. No hubo diferencia significativa entre los dos controles ni entre cada grupo vacunado y su repetición, pero si hubo diferencia significativa en la sobrevivencia entre grupos (control, vacunado IP y vacunado INM) ( $p = 0.0000$ ).

Con el estudio histopatológico se pudo observar las lesiones características de *Aeromonas salmonicida*.

**Palabras claves:** *Oncorhynchus mykiss*, alevines, *Aeromonas salmonicida*, vacuna polivalente, inmersión, intraperitoneal

## ABSTRACT

In fish farms endemic bacterial infections are caused by different species, however during an outbreak of disease one of the pathogens predominates, being the cause of the epizootic. This project evaluates the efficacy of a polyvalent vaccine previously prepared in the laboratory, with strains of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* and *Flavobacterium psychrophilum*, from rainbow trout during outbreaks of disease. The study was carried out in the experimental center of the ictiopathology section, using 270 fingerlings, distributed in 6 aquariums (n = 45 / aquarium), two control groups, one with false vaccination via IP and another with false vaccination via INM, a group vaccinated via intraperitoneal (IP) and an immunized group via immersion (IM) each with their repetitions. In the immunized group intraperitoneally injected 0.1 ml of the vaccine and for the immunized group via immersion, it was immersed for 1 minute in a 1:10 dilution of the vaccine. After 28 days they were challenged with the bacterium *Aeromonas salmonicida* by intraperitoneal route at the dose of  $5 \times 10^8$  (100 lethal dose 50) and the reactions that occurred during 21 days were observed daily, during this period the necropsy was performed and samples taken from organs for microbiological culture and as a complementary test histopathological examination.

Accumulated mortality was 91.1% for the control group with false vaccination via INM, 100% for the control group with false vaccination via intraperitoneal, 45.5% via immersion and 25.5% via intraperitoneal. There was no significant difference between the two controls or between each vaccinated group and its repetition, but there was a significant difference in survival between groups (control, IP vaccination and vaccinated INM) ( $p = 0.0000$ ).

With the histopathological study it was possible to observe the characteristic lesions of *Aeromonas salmonicida*.

**Keywords:** *Oncorhynchus mykiss*, Rainbow trout, alevines, *Aeromonas salmonicida*, vacuna polivalente, inmersión, intraperitoneal

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Producción acuícola de peces comestibles por región (TM, porcentaje del total mundial).	12
Cuadro 2.	Ranking mundial de países productores de Truchas arcoíris durante el año 2016	13
Cuadro 3.	Producción de truchas arcoíris a nivel de América latina	14
Cuadro 4.	Clasificación taxonómica de la Trucha arcoíris	16
Cuadro 5.	Etapas de crianza de Trucha arcoíris.	18
Cuadro 6.	Taxonomía de <i>Aeromonas</i> spp.	22
Cuadro 7.	Pruebas bioquímicas diferenciales entre géneros relacionados con las Aeromonadales	25
Cuadro 8.	Características fenotípicas de <i>Aeromonas salmonicida</i>	25
Cuadro 9.	Características diferenciales de las subespecies de <i>A. Salmonicida</i>	26
Cuadro 10.	Identificación y procedencia de cepas seleccionadas y usadas en la preparación de la vacuna.	60
Cuadro 11.	Pesos (gr) y tallas (cm) promedio por grupo al momento de la vacunación	61
Cuadro 12.	Promedio de parámetros fisicoquímicos del agua durante el estudio	62
Cuadro 13.	Distribución de peces por grupos (Controles y vacunados)	63
Cuadro 14.	Mortalidades por grupo de los controles y vacunados de Truchas arcoíris, pos desafío con <i>Aeromonas salmonicida</i> (21 días de observación pos vacunación).	69
Cuadro 15.	Porcentajes de sobrevivencia de los peces vacunados con una vacuna polivalente contra enfermedades producidas por <i>Yersinia ruckeri</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> y <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en Trucha arco iris.	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Producción acuícola mundial de peces comestibles y plantas acuáticas, 1990-2016	111
Figura 2.	Tasa media de crecimiento anual del volumen de producción de la acuicultura (excluidas las plantas acuáticas) (FAO, 2016).	11
Figura 3.	Principales especies cosechadas en Perú en el año 2017 (PRODUCE, 2017)	15
Figura 4.	Producción acuícola por departamento en Perú en el año 2017 (PRODUCE, 2017)	15
Figura 5.	Anatomía de la Trucha arcoiris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	17
Figura 6.	Cultivo nacional de Truchas en el periodo 2008 -2017 (PROMPERU 2018)	19
Figura 7.	Cultivo nacional de Truchas arcoíris en el periodo 2008 -2017 (PROMPERU 2018)	19
Figura 8.	Tinción Gram de <i>Aeromonas</i> spp. observada microscópicamente	23
Figura 9.	Etapas durante la infección con <i>Aeromonas</i> a través de heridas de piel	30
Figura 10.	Hemorragias sistémicas generalizadas visibles a través de los órganos, bazo agrandado (flecha) y hemorragias petequiales en el hígado (punzón)	35
Figura 11.	Cepa de <i>Aeromonas salmonicida</i> cultivada en agar sangre, con pigmentación marrón.	36
Figura 12.	Curva de crecimiento de la cepa <i>Aeromonas salmonicida</i> procedente de Puno	59
	Método de recuento en placas por plaqueo para hallar las UFC.	59
Figura 13.	Conteo de colonias a partir de la placa donde el rango se encuentre entre 30 – 300 colonias.	60
Figura 14.		64
Figura 15.	Materiales y procedimiento para la Vacunación vía intraperitoneal (A, B); materiales y procedimiento para la vacunación vía inmersión (C, D)	
	A: Congestión branquial, palidez hepática, B: Congestión branquial, dilatación de ciegos pilóricos, Congestión intestinal., congestión hepática	67
Figura 16.		
Figura 17.	A: Congestión branquial, palidez hepática, B: Congestión branquial, dilatación de ciegos pilóricos, Congestión intestinal., congestión hepática	67
Figura 18.	Lesiones características de <i>Aeromonas salmonicida</i> en peces de los grupos controles con falsa vacunación.	71
Figura 19.	Comparación de supervivencia entre el grupo control INM y el grupo control IP.	72
Figura 20.	Comparación de supervivencia entre el grupo vacunado vía INM y el grupo vacunado vía IP	73
Figura 21.	Comparación de supervivencia entre grupo control, vacunad INM y vacunado vía IP	73

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo para el examen de necropsia	87
ANEXO 2: Programa de alimentación AQUATECH TRUCHAS	88
ANEXO 3: Parámetros de agua adecuados para crianza de truchas	89
ANEXO 4: Resultados obtenidos con el software STATA para comparar la supervivencia según el análisis de Kaplan meier y log Rank	90

## LISTA DE ABRAVIATURAS

INM	Inmersión
IP	Intraperitoneal
PRS	Porcentaje relativo de supervivencia
CMM	Centro melanomacrófago
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
PRODUCE	Ministerio de la Producción
LPS	Lipopolisacáridos
g	Gramos
ml	Mililitro
cm	Centímetro
TM	Toneladas métricas
DI	Inmersión directa
HI	Hiperosmótica

## INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector de producción que ha ido en desarrollo con el paso de los años, registrándose, según informes de la (FAO, 2018), una producción de 80 millones de toneladas a nivel mundial en el 2016.

Perú cuenta con un alto potencial acuícola basado en sus condiciones climáticas e hidrobiológicas.

Entre las principales especies cultivadas, la Trucha Arcoíris es de gran importancia por su demanda en el mercado externo. Entre los años 2011 y 2016 la producción de Truchas Arcoíris a nivel mundial registró una producción de 792817 TM en el 2011 y 814455 TM aproximadamente en el año 2016.

La acuicultura ha traído muchos beneficios en la economía, pero de la misma manera la crianza intensiva predispone a los peces a múltiples enfermedades. Una de las enfermedades bacterianas que puede provocar grandes pérdidas en la crianza de Truchas Arcoíris es la Forunculosis, que tiene como agente causal a *Aeromonas salmonicida*. Esta enfermedad es de rápida diseminación, la ruptura de los forúnculos disemina rápidamente la enfermedad produciendo pérdidas económicas porque afecta al filete y sobre todo porque produce altas mortalidades, por esta razón se necesitan medidas preventivas, siendo una buena alternativa el uso de vacunas. Es por esta razón que se elaboró una vacuna polivalente, con varias cepas de bacterias incluyendo la de *Aeromonas salmonicida*, de diferentes zonas del Perú para ver su efectividad contra este agente patógeno.

Se han realizado estudios en otros países donde se ha evaluado la efectividad de vacunas contra diferentes agentes bacterianos que representan un problema en la acuicultura, probándose las vacunas a través de diferentes vías. La mayoría de estudios coincide en que la vacunación intraperitoneal es más efectiva que la vacunación vía oral o vía inmersión; así también, se usan junto con adyuvantes que aumentan los niveles de protección durante períodos de tiempo más largos (Villumsem *et al.*, 2013). Sin embargo la vacuna IP, es menos práctica porque depende del uso de equipos propios para esta actividad y de experiencia para la manipulación de la misma y del pez a vacunarse, siendo mucho más ventajosa en este aspecto las vacunas vía inmersión.

## **GENERALIDADES**

### **2.1. Acuicultura**

El término acuicultura hace referencia al cultivo de organismos acuáticos en zonas costeras y en el interior, donde el hombre interviene en el proceso de producción, crecimiento y comercialización de organismos acuáticos animales o vegetales de aguas dulces o salobres (peces, moluscos, crustáceos o plantas acuáticas) (Saldarriaga *et al.*, 2017; FAO, 2019).

A nivel mundial, la acuicultura se ha convertido en una de las actividades productivas de mayor crecimiento, durante las últimas décadas. Este crecimiento permite mantener la sostenibilidad de recursos marítimos ante la demanda mundial de pescado (Saldarriaga y Regalado, 2017).

Es un sector de producción de alimentos de rápido crecimiento y representa el 50 por ciento del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial (Maíz, 2010; FAO, 2019).

### **2.2. Estado actual de la acuicultura mundial**

Durante el 2016 la producción mundial de la acuicultura alcanzó un aproximado de 171 millones de toneladas, lo que representa el 43 %. Entre 1961 y 2016, el aumento anual medio del consumo mundial de pescado comestible fue de 3,2%, superando al crecimiento de la población que fue 1,6% y también al 2,8% de consumo de carne procedente de todos los animales terrestres juntos. En el año 2015, el porcentaje de proteína animal consumida por la población mundial procedente de carne de pescado fue 17% (FAO, 2016).

Entre los años de 1980 y 1990 se registró un crecimiento elevado de la producción acuícola mundial (11.3% y 10% respectivamente); en el 2016, fue de 80 millones de toneladas de pescado comestible. Durante este año el país con mayor producción de pescado comestible fue China, seguido por la India, Indonesia, Viet Nam, Bangladesh, Egipto y Noruega (FAO, 2016).

En el 2016 la producción mundial de la acuicultura registró un aumento en la producción, con 80 millones de toneladas de peces comestibles (FAO, 2016). (Figura 1)

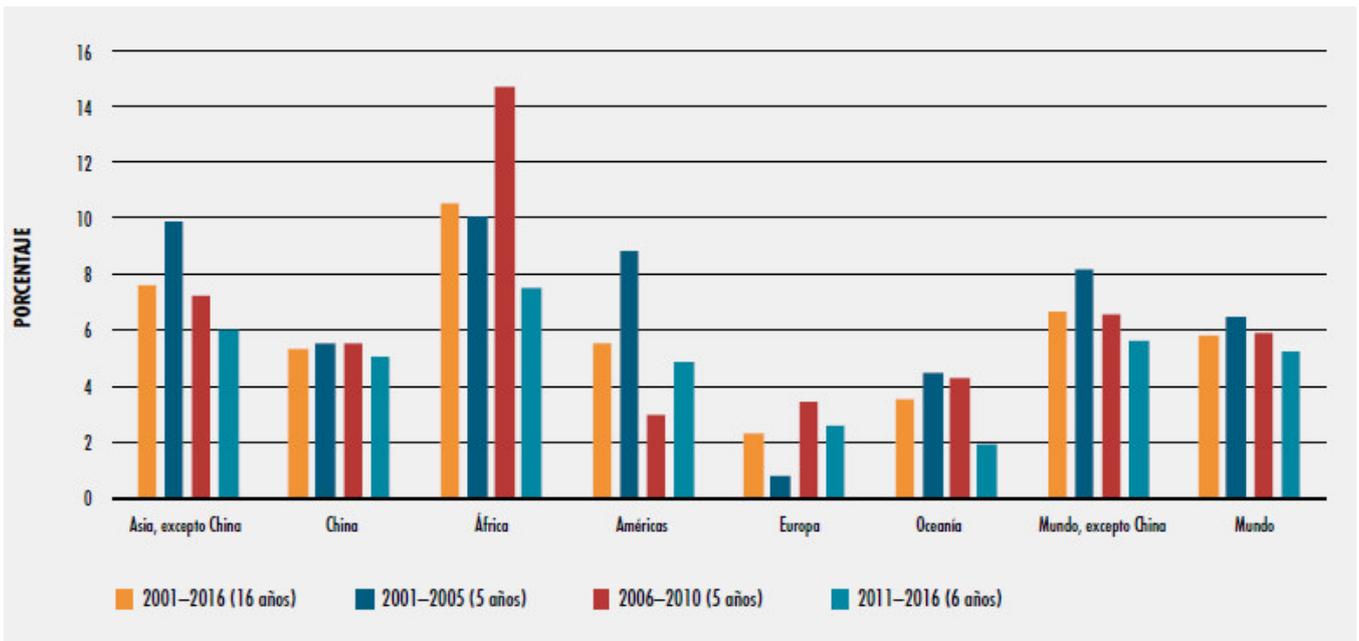


Figura 1. Producción acuícola mundial de peces comestibles y plantas acuáticas, 1990-2016 (FAO, 2016).

En el periodo 2001-2016 el crecimiento anual descendió moderadamente a 5.8%, pero se registró un crecimiento de 2 dígitos en algunos países como África entre el 2006 y 2010 (FAO, 2016). (Figura 2)

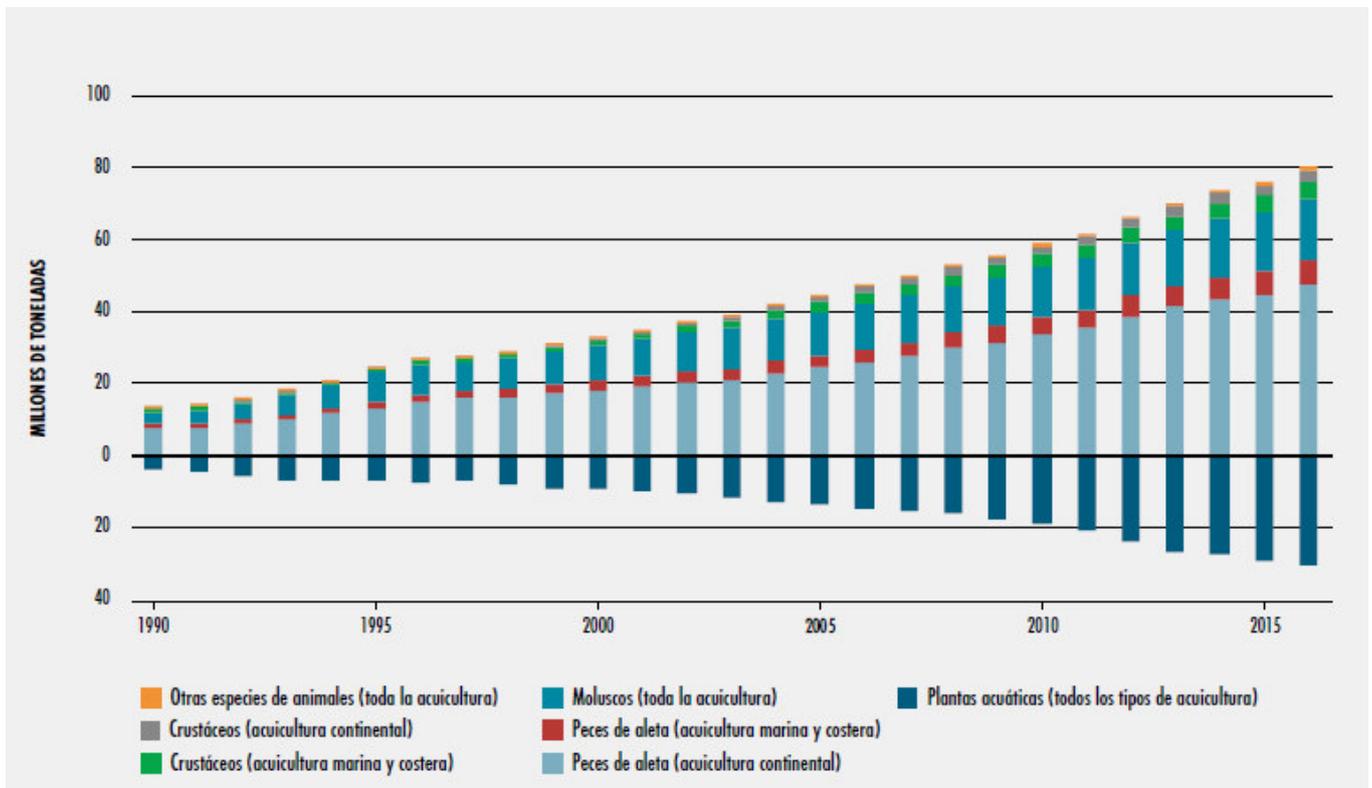


Figura 2. Tasa media de crecimiento anual del volumen de producción de la acuicultura (excluidas las plantas acuáticas) (FAO, 2016)

En la distribución por continentes, la acuicultura representa entre el 17% y el 18% de la producción total de pescado en África, Europa y las Américas, y un 12,8% en Oceanía. La producción acuícola de Asia, sin contar a China aumentó en una proporción de 40,6% en el 2016, comparado al año 2000 donde se registró un porcentaje de 19.3 % (FAO, 2016).

En los últimos 20 años, el continente con mayor producción acuícola a nivel mundial ha sido Asia (89% de la producción acuícola mundial). Así también se ha registrado un aumento en la producción total mundial en África y las Américas, y una leve disminución en Europa y Oceanía. Los principales países productores: Bangladesh, Chile, Egipto, la India, Indonesia, Nigeria, Noruega y VietNam, han aumentado su producción mundial en las últimas décadas, a diferencia de China que ha ido disminuyendo su producción gradualmente, ha pasado del 65% en 1995 a menos del 62% en 2016 (FAO, 2016). (Cuadro 1).

Cuadro 1. Producción acuícola de peces comestibles por región (miles de toneladas; porcentaje del total mundial) (FAO, 2016).

	<b>1995</b>	<b>2000</b>	<b>2005</b>	<b>2010</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>África</b>	110	400	646	1286	1772	1982
	0.5%	1.2%	1.5%	2.2%	2.3%	2.5%
<b>Las Américas</b>	920	1423	2177	2514	3274	3348
	3.8%	4.4%	4.9%	4.3%	4.3%	4.2%
<b>Asia</b>	21678	28423	39188	52452	67881	71546
	88.9%	87.7%	88.5%	89%	89.3%	89.4%
<b>Europa</b>	1581	2051	2135	2523	2941	2945
	6.5%	6.3%	4.8%	4.3%	3.9%	3.7%
<b>Oceanía</b>	94	122	152	187	186	210
	0.4%	0.4%	0.3%	0.3%	0.2%	0.3%

El cultivo de Trucha Arcoíris en el mundo ha adquirido gran importancia debido a la gran demanda en el mercado a nivel mundial. Entre los años 2011 y 2016 se registró crecimiento en la producción de Truchas Arcoíris, en el año 2011 una producción de 792817 TM y en el año 2016, 814455 TM aproximadamente (FAO, 2016).

Durante el 2016 los 5 primeros países productores de Truchas arcoíris en el Ranking mundial fueron: Irán 18.27% (148789 TM), Turquía 13.85% (112781 TM), Chile 12.3% (100210 TM), Noruega 9.47% (77151 TM), Perú 6.41 (52217 TM).

Cuadro 2. Ranking mundial de países productores de Truchas arcoíris durante el año 2016 (Ministerio de la Producción 2018)

<b>2016</b>		
<b>Irán</b>	148789	18.27%
<b>Turquía</b>	112781	13.85%
<b>Chile</b>	100211	12.3%
<b>Noruega</b>	77151	9.47%
<b>Perú</b>	52217	6.41%
<b>Francia</b>	38617	4.74%
<b>Dinamarca</b>	34222	4.2%
<b>Italia</b>	33115	4.07%
<b>China</b>	28920	3.55%
<b>Rusia</b>	25848	3.17%
<b>Estados Unidos</b>	22005	2.7%
<b>España</b>	17117	2.1%
<b>Finlandia</b>	14665	1.8%
<b>Polonia</b>	13924	1.71%
<b>Reino Unido</b>	12761	1.57%
<b>Suecia</b>	9487	1.16%
<b>Alemania</b>	9022	1.11%
<b>México</b>	8874	1.09%
<b>Colombia</b>	7043	0.86%
<b>Japón</b>	5113	0.63%
<b>Otros</b>	42572	5.23%

En países de América durante el año 2016, la producción fue de 201092 TM, que representa el 24.69% de la producción mundial de Truchas arcoíris; Perú se encuentra en el segundo lugar con 25.97% y Chile en el primer lugar con 49.83% (FAO, 2016). (Cuadro 3)

Cuadro 3. Producción de truchas arcoíris a nivel de América latina (FAO, 2016).

	<b>2016</b>	<b>%</b>
<b>Chile</b>	100211	49.83%
<b>Perú</b>	52217	25.97%
<b>Estados Unidos</b>	22005	10.94%
<b>México</b>	8874	4.41%
<b>Colombia</b>	7043	3.5%
<b>Ecuador</b>	4761	2.37%
<b>Brasil</b>	1682	0.84%
<b>Bolivia</b>	1634	0.81%
<b>Argentina</b>	1540	0.77%
<b>Costa rica</b>	949	0.47%
<b>Venezuela</b>	167	0.08%
<b>Panamá</b>	9	0.00%
<b>TOTALES</b>	201092	100.00

### 2.3. Estado actual de la acuicultura nacional

El Ministerio de producción (PRODUCE) registra en Perú entre los años 2006 y 2015 la producción acuícola del país creció, en el 2006 se registró una producción de 28.387 toneladas métricas (TM) y en el 2015, 85.000 TM. Óscar Domínguez, director de Acuicultura del PRODUCE, menciona que las causas del aumento en la producción, se deben a una mayor demanda externa e interna de recursos hidrobiológicos y al incremento de personas dedicadas a la actividad acuícola. Las principales especies que lideran el mercado son la trucha (54.6%), los langostinos (27.4%), conchas de abanico (11.4%) y la tilapia (3%) (PRODUCE).

Del año 2015 al año 2016, hubo un crecimiento de 2.7%, alcanzando en el año 2016 una producción de 93.4 mil toneladas (Miranda, 2017). En el 2017, el porcentaje de crecimiento respecto al 2016 fue de 0.26 %. Según las especies cultivadas, la producción incrementó en 5% en truchas arcoíris, langostinos en 34.5%, y disminuyó en 43.1% en conchas de abanico y 3.1% en tilapia (PRODUCE, 2017).

En los últimos 10 años, hasta el 2017, la producción de trucha arcoíris fue de 339, 1 % (PRODUCE, 2017).

En el año 2017 se registró que las principales especies cosechadas fueron: Truchas (54.6%), Langostino (27.4%), Conchas de abanico 11.9%, Tilapia (3%), otros (3.1%) (PRODUCE, 2017). (Fig.3)



Figura 3. Principales especies cosechada en Perú en el año 2017 (PRODUCE, 2017)

La producción por departamento en el Perú, en el año 2017 registró una mayor producción en el departamento de Puno (45233 TM), Tumbes (24471 TM), Ancash (10347 TM) y Piura (5048 TM) (PRODUCE, 2017)

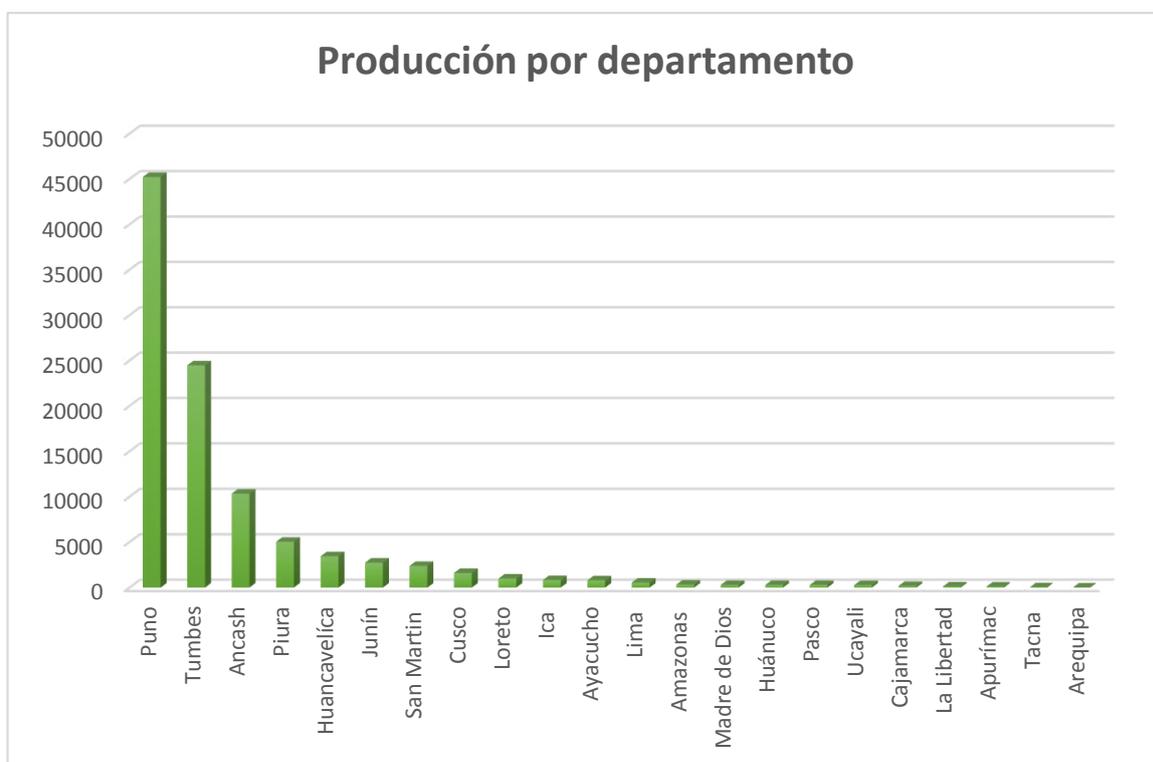


Figura 4. Producción acuícola por departamento en Perú en el año 2017 (PRODUCE, 2017)

## 2.4. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

### 2.4.1. Taxonomía

“Trucha” deriva de dos géneros: Salmo y Onchorhynchus. Las Truchas y salmones del Pacífico se encuentran dentro del género *Oncorhynchus* (Arregui, 2013).

Se originó en la costa Oeste Americana, también es llamada “*Oncorhynchus mykiss*”, pero antiguamente recibió el nombre de *Salmo gairdneri* por Richardson en 1936. Esta denominación fue cambiada en 1989 debido a que la especie “*gairdneri*” era la misma que la especie “*mykiss*” encontrada en Rusia (Arregui, 2013).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

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

## 2.4.2. Características biológicas

Las Truchas Arcoíris tienen el cuerpo de forma alargada, fusiforme (forma de huso). Tiene una coloración entre azul y verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella, con pequeñas manchas negras que cubren todo el cuerpo (FAO, 2009). (Figura 5)

La coloración varía según el hábitat donde se encuentran, tamaño y condición sexual. En lugares con sombra adquieren un color plomo oscuro, pero en zonas con rayos de sol presentan un color más claro (Maíz *et al.*; 2010).

Las que viven en corrientes tienen una coloración más intensa; las que viven en lagos tienen una coloración más plateada y más brillante. Se pueden distinguir fácilmente de *Oncorhynchus clarki* (Trucha “cutthroat”) porque no presentan dientes hioideos (FAO, 2009).

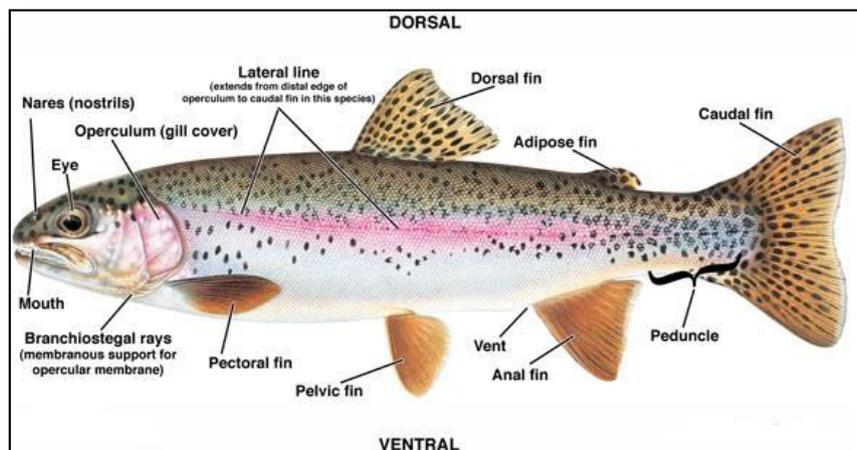


Figura 5. Anatomía de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Su crecimiento es rápido, soportan temperaturas entre 0 - 27°C, pero para la fase de crecimiento y desove el rango óptimo de temperatura es 9-14°C. A los 3-4 años recién llegan a la madurez (FAO, 2009). La crianza de Truchas arcoíris tiene varias etapas, ver cuadro 5.

- Etapa de alevinaje: Esta etapa se considera desde que la trucha llega al centro de cultivo con una medida aproximada de 5 cm hasta alcanzar los 10 cm y pesar 12 gr.
- Etapa juvenil: Durante esta etapa las truchas tienen una medida desde los 10 a 17 cm y un peso promedio de 68 gr,

- Etapa de engorde: Tiene una duración de 3 meses, durante esta etapa los peces se encuentran en una talla entre 17 cm a 26 cm, llegando a pesar 250 gr.

Cuadro 5. Etapas de la crianza de Truchas arcoíris (FONDEPES, 2014)

Siembra	más de 5 cm
Alevinaje I	3.5 - 5 cm
Alevinaje II	5 - 8 cm
Alevinaje III	8 - 12 cm
Juvenil I	12 - 14 cm
Juvenil II	14 - 17 cm
Engorde I	17 - 20 cm
Engorde II	20 - 26 cm (2 - 3 meses)
Cosecha	26 cm, 250-350 gr.

### 2.4.3. Crianza en el Perú

En 1928 fue introducida al Perú, a través de los departamentos de Junín y Pasco, luego se sembró en diferentes cuerpos de agua fría de la sierra a partir de los 2000 m.s.n.m, su rusticidad ha permitido su distribución en toda la zona alto andina. La crianza de estas especies se realiza a nivel semi intensivo e intensivo, usándose lagos y lagunas para el cultivo de esta especie, en estanques de tierra o concreto, o en jaulas flotantes (FAO, 2016).

Las ovas embrionadas son importadas de los Estados Unidos de Norteamérica, Dinamarca, Chile, Gran Bretaña y España (FAO, 2016).

En el año 2011, se registró una producción de Truchas Arcoíris de 19962 TM y en el 2016, 52217 TM, con una tasa de crecimiento del 21% anual durante ese periodo (FAO, 2016).

La cosecha de Truchas arcoíris ha crecido de forma directamente proporcional al paso de los años, pero en el año 2014 se observa una disminución de la producción. Durante el 2017 hubo una producción de 54424 TM (PROMPERÚ, 2018) (Figura 6).

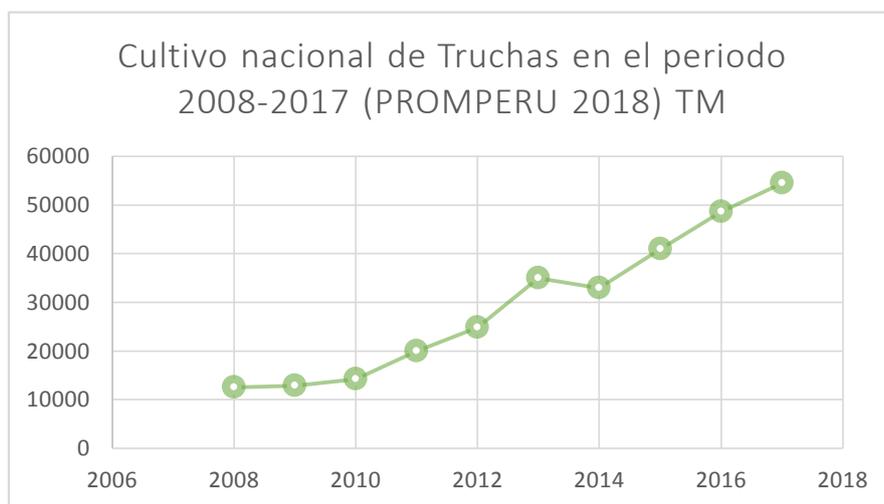


Figura 6. Cultivo nacional de Truchas en el periodo 2008 -2017 (PROMPERU, 2018)

Diversas regiones del Perú se dedican a la crianza de Truchas arcoíris. Según registros del Ministerio de producción (2016) Puno es la región con mayor producción (43298 TM), seguida por Huancavelica (3704 TM) y Junín (2263 TM). (Figura 7)

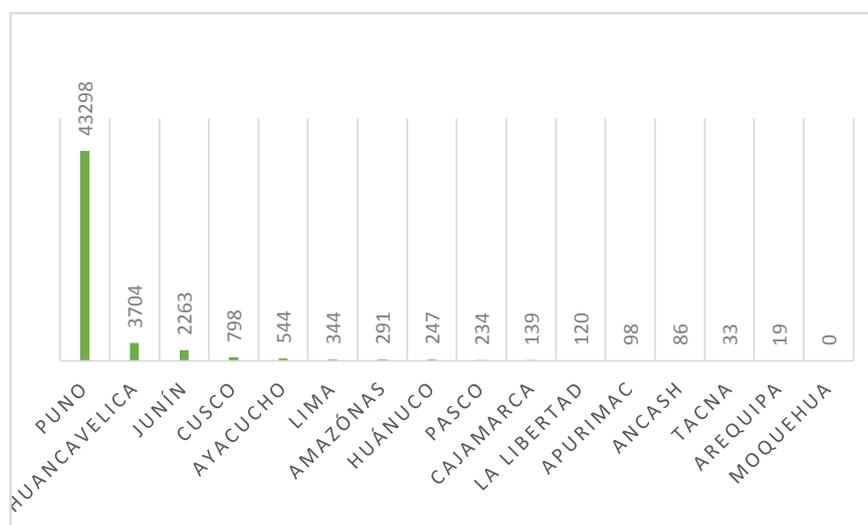


Figura 7. Cultivo de Trucha arcoíris por regiones a nivel nacional (PROMPERU, 2017).

## 2.5. Aeromonas salmonicida

### 2.5.1. Antecedentes históricos

*Aeromonas* spp. son bacterias gram negativas que afectan la salud de los peces de agua dulce. Dentro del género *Aeromonas* se encuentran dos grupos: El primer grupo psicrófilo e inmóvil, conformado por *Aeromonas salmonicida*, de importancia patógena para los peces; el

segundo grupo conformado principalmente por *Aeromona hydrophila* y *Aeromona sobria*, son mesófilos y móviles, y patógeno para los peces y el hombre (Janda y Duffey, 1988).

El periodo de incubación es de 4 a 8 días. En el caso de los peces que superan la infección, pasan a ser portadores sin signos clínicos. La transmisión puede darse a través de la piel o por vía respiratoria o digestiva (FAO, 2011).

Sanarelli (1981) describió por primera vez una cepa del género *Aeromonas*, durante un estudio de inmunidad en ranas, atribuyéndose la septicemia provocada a *Bacillus hydrophilus fuscus*. También se hizo el aislamiento de *Aeromonas* de agua, peces enfermos y leche (Alperi VA, 2009). Desde este año *Aeromonas* es reconocido como agente etiológico de varias especies de peces y ocasionalmente de mamíferos, reptiles, anfibios y pájaros (Castro *et al.*, 2002).

En 1943, Stainer recién define el Género *Aeromonas*, antes de su definición y desde su aislamiento fue incluida en varios grupos como *Proteus*, *Bacillus*, *Acromobacter*, *Pseudomonas* ó *Vibrio* (Alperi, 2009)

Desde 1965 se incluyó al género *Aeromonas* dentro de la familia *Vibrionaceae*. A mediados de los años 70, se dividió al género *Aeromonas* en dos grupos teniendo en cuenta algunas características como la temperatura de crecimiento, motilidad, capacidad de producir pigmento en medio TSA, o de producir indol. Se dividió en un grupo mesófilo (35-37°C), en el que se encuentra *Aeromonas hydrophila* y el grupo psicrófilo (22-28°C), donde se encuentra *Aeromonas salmonicida* patógena principalmente de peces (Alperi, 2009)

En 1984 Baumann y Schubert, reasociaron el ARNr-ADN entre géneros pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, durante esta evaluación se encontró varias diferencias en el género *Aeromonas*. Colwell *et al.* (1986) confirmaron la diferencia evolutiva del género *Aeromonas* con la familia *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* mediante análisis de secuencias de los genes del ARNr 5S y 16S, llegando así a formarse la Familia *Aeromonadaceae*. (Alperi, 2009)

*Aeromonas* spp. presenta diferentes especies, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas veronii* son patógenos oportunistas de los humanos y también afecta a

peces; *A. salmonicida* es patógeno de peces y causa una enfermedad denominada furunculosis. (Seethalakshmi *et al.*, 2008).

La furunculosis es causada por *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, ocasionando úlceras cutáneas y procesos septicémicos en salmónidos (Dallaire *et al.*, 2014; Zepeda *et al.*, 2017). La infección que provoca son de gran importancia en la crianza de salmónidos (Trucha arco iris y salmón) por las grandes pérdidas económicas que ocasiona (Haahr *et al.*, 2017).

Emmerich y Weibel en 1894, aislaron por primera vez a *Aeromonas salmonicida* en un cultivo de truchas. (González, 2002).

En un estudio realizado por Zepeda *et al.* (2017) se aisló *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* y *A. veronii*, de lesiones en piel. Se desafió a los peces vía inmersión con estos patógenos, resultando una mortalidad significativa (8,8%, 12,2%, 18,8% y 8,8%, respectivamente).

Sniezko *et al.* (1938) publicó el primer informe de uso de vacunas para prevención de enfermedades, en carpas inmunizadas con *Aeromonas punctata*. El primer informe en inglés fue escrito por Duff en 1942, quien mostró protección contra *Aeromonas salmonicida* en truchas inmunizadas por inoculación parenteral y por administración oral (Gudding y Van, 2013).

Los signos se da en dos presentaciones, una con manchas cutáneas rojas de forma y tamaño diferentes, conocida como “Maculosa” y la otra más severa, conocida como la forma “ascítica”, donde hay destrucción del tejido, exoftalmia, dilatación abdominal, enrojecimiento de las aletas y el ano, prolapso anal, líquido sanguinolento en la cavidad abdominal, Palidez o congestión hepática, inflamación renal, aumento de tamaño del bazo, enteritis y hemorragia intestinal (FAO, 2011).

El “forúnculo” es la lesión que caracteriza la enfermedad, aparece como una elevación en la piel, que puede ulcerarse liberando un fluido serosanguinolento causando septicemia (Haahr *et al.*, 2017); en la histopatología, los órganos con mayor irrigación (riñón, bazo e

hígado) pueden presentar necrosis debido a la presencia de colonias bacterianas que mediante una exotoxina ejercen acción leucocitolítica (Romano *et al.*, 2008).

En un curso hiperagudo se presentan con muerte súbita en crías de salmónidos. En casos crónicos el progreso de la enfermedad es lento llegando el agente a diseminarse a diferentes órganos afectando bazo, riñón, intestino, hígado y branquias (Menanteau, 2016).

### 2.5.2. Taxonomía

En el pasado, las especies de *Aeromonas* se colocaron junto con las especies *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides* en la familia *Vibrionaceae*. Sin embargo, los estudios genéticos respaldan la colocación de aeromonas en una familia propia llamada *Aeromonadaceae* (Igbinsosa *et al.*, 2012).

Las especies de *Aeromonas* spp. se dividen principalmente en dos grupos: Móviles y no móviles. Las aeromonas móviles son agentes causantes de enfermedades en humanos, animales terrestres y peces, también se les denomina grupo mesófilo, crecen bien a temperaturas de 35-37°C, en este grupo se encuentra *Aeromonas hydrophila* (Zepeda, 2015; Duman *et al.*, 2018).

Las *Aeromonas* spp. no móviles crecen a temperaturas entre 22 a 25 °C, llamadas también psicrófilas. A este grupo pertenece *Aeromonas salmonicida* (Zepeda, 2015; Duman *et al.*, 2018).

Cuadro 6. Taxonomía de *Aeromonas* spp. (Zepeda, 2015, Beaz *et al.*, 2013)

<b>Género</b>	<b>Aeromonas</b>
<b>Familia</b>	Aeromonadaceae
<b>Orden</b>	Aeromonadales
<b>Clase</b>	Gamnaproteobacteria

Las especies de *Aeromonas* que se consideran patógenos oportunistas de humanos y peces son: *A. caviae*, *A. hydrophila* y *A. veronii*. *A. salmonicida* es patógeno de peces y causa la forunculosis. (Seethalakshmi *et al.*, 2008).

*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* es un patógeno bacteriano importante para los peces, que fue originalmente aislado en una granja de agua dulce alemana por Emmerich y

Weibel (1894) y recibió el nombre de *Bacterium salmonicida*. Posteriormente fue propuesto por Griffin *et al.* (1953) para colocar la bacteria en el género *Aeromonas* y reclasificar el nombre de la especie como *Aeromonas salmonicida*. El género de *Aeromonas* también ha pasado por muchas reclasificaciones taxonómicas hasta que finalmente Colwell *et al.* (1986) lo clasificó en la familia *Aeromonadaceae* (Barktova, 2016).

Aunque las especies de *Aeromonas salmonicida* se pensó en primer lugar que era homogénea, por el uso de bioquímicos y métodos moleculares hasta ahora se ha dividido en cinco subespecies: *salmonicida*, *masoucida*, *acromogenes*, *smithia* y *pectinolytica*. Las cuatro últimas subespecies son denominadas "atípicas", mientras que la subespecie *salmonicida* es la única conocida como "típica" y es la causante de la furunculosis (Barktova, 2016).

### 2.5.3. Características morfológicas

Esta bacteria al ser teñida con tinción Eosina – Hematoxilina, puede observarse al microscopio como cocobacilos o bacilos pequeños Gram negativos de coloración eosinofílica, miden aproximadamente  $0.3 - 1.0 \times 1.0 - 3.5$  micras (Zepeda, 2015). (Figura 8)

Figura 8. Tinción Gram de *Aeromonas* spp. observada microscópicamente



### 2.5.4. Tipificación

#### 2.5.4.1. Fenotipificación:

Para el estudio fenotípico del agente se toman en cuenta sus características fisiológicas (temperatura, oxígeno, pH), morfológicas (forma, color, dimensión) y

bioquímicas (metabolismo de sustratos, presencia de enzimas, resistencia a antibióticos). (Alperi, 2009).

El género *Aeromonas* spp. es gram negativo por lo cual las bacterias se tiñen de un color acidófilo, producen catalasa y citocromo oxidasa, hay licuefacción de gelatina en la mayoría de los casos, es positiva para los siguientes carbohidratos y glucósidos: glicerol, glucosa, fructosa, galactosa, manitol, manosa, maltosa, dextrina, glucógeno, almidón, aesculina y salicina, así como también se reportó que es positivo en L-arabinosa pero negativo en D-arabinosa y no puede convertir triptófano en indol. La producción de gas por *A. salmonicida* durante la fermentación de glucosa puede ser débil en algunas cepas, es negativa a la producción de ácido a partir de manitol y positivo a la hidrólisis en la aesculina (Bartkova, 2016).

Cuadro 7. Pruebas bioquímicas para diferenciar entre géneros de la familia Aeromonadales (Escarpulli *et al.*, 2003)

Pruebas bioquímicas diferenciales					
Pruebas bioquímicas	Géneros				
	Vibrio	Aeromonas	Plesiomonas	Pseudomonas	Enterobacterias
<b>Oxidasa</b>	+	+	+	+	-
<b>Fermentación de glucosa</b>	+	+	+	-	+
<b>Sensible a 0/129</b>	s/s	R/R	S/S	NA	NA
<b>Crecimiento en TCBS</b>	+	-	-	-	-
<b>Crecimiento en NaCl</b>					
<b>0%</b>	-	+	+	NA	+
<b>3%</b>	-	+	+	NA	-
<b>6%</b>	+	-	+	NA	-
<b>Ácido de inositol</b>	-	-	+	NA	v

+ = La mayoría de las cepas son positivas, - = La mayoría de las cepas son negativas, R= resistente, S= sensible, NA= No aplicable

Cuadro 8. Características fenotípicas de *Aeromonas salmonicida* (Bergeys's, 1997; Galanina *et al.*, 2012)

<i>Aeromonas salmonicida</i>	Según manual Bergey`s, 1997 (Galanina <i>et al.</i> , 2012)
Tinción gram	-
Oxidasa	+
Movilidad	-
Oxidación / fermentación de glucosa	+
Formación de pigmento	Brown
Formación de indol	-
Formación H <sub>2</sub> S	-
Hidrolisis de gelatina	+
Hidrolisis de esculina	+
Hidrolisis de úrea	-
VP	-
Fenilalanin diseminasa	-
Arginina dihidrolasa	+
Lisina descarboxilasa	-
Ornitina descarboxilasa	-
Arabinosa	a
Lactosa	-
Sacarosa	-
Dulcitol	-
Sorbitol	-
Inositol	-
Maltosa	a
Xilosa	-
Glicerina	a
	a=Formación de acido

Fenotípicamente 5 subespecies pertenecen a *A. salmonicida*: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *pectinolutica* y *A. salmonicida* subsp. *smithia* (Bartkova, 2016).

La única subespecie que produce pigmento marrón en agar TSA es *A. salmonicidas* subsp. *salmonicida*; la única VP positiva es *A. salmonicida* subsp. *masoucida*; producción de indol positiva en *A. salmonicida* subsp. *masoucida* y *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, la hidrólisis de esculina y la fermentación de manitol son positivas en las subespecies *salmonicida* y *masoucida* (Miñana, 2003).

(Cuadro 9)

Cuadro 9. Características diferenciales de las subespecies de *A. salmonicida* (Miñana, 2003).

<i>A. salmonicida</i> subsp.	Pigmento	VP	Indol	Fermentación de Manitol	Hidrólisis de esculina
<i>achromogenes</i>	-	-	+	-	-
<i>masoucida</i>	-	+	+	+	+
<i>salmonicida</i>	+	-	-	+	+
<i>Smithia</i>	-	-	-	-	-

#### 2.5.4.2. Genotipificación

Fenoespecie se denomina a las especies bioquímicamente diferentes y genoespecies o grupos de hibridación (HG) a las especies que se diferencian genéticamente, su determinación puede realizarse mediante pruebas de hibridación de DNA total. Para realizar la genotipificación se requiere de técnicas moleculares (Escarpulli, 2002).

- a) **Gen 16 S ARNr en la taxonomía del género *Aeromonas*:** El gen ARNr es La identificación de especies bacterianas se logra mediante un marcador molecular como el gen ARN ribosomal. el gen 16 S RNAr que representa al género *Aeromonas*, tiene un rango de semejanza del 96.7 al 100%, lo que genera dificultad en la separación de las especies altamente relacionadas (Alperi, 2009).
- b) **Genes Housekeeping:** Los genes Housekeeping se encargan de codificar proteínas que son importantes para que la bacteria logre sobrevivir. Estos genes permiten que las diversas especies de *Aeromonas* puedan diferenciarse. La secuenciación del gen *gyr B* codifica la subunidad b de la girasa de ADN, el gen de mantenimiento *rpo D* también permite identificar especies de *Aeromonas*. La clasificación más confiable de los aislados de *Aeromonas* se da por la secuenciación de siete genes de mantenimiento (*gyrB*, *rpoD*, *recA*, *dnaJ*, *gyrA*, *dnaX*, *atpD*) (Alperi, 2009 ; Vicente, 2014)

#### 2.5.4.3. Serotipificación

Los estudios demuestran que aeromonas pertenecientes a los serogrupos O: 11, O: 16, O: 18 y O: 34 están asociados con la mayoría de los casos de bacteriemia (Janda *et al.*, 2010).

## 2.6. Epidemiología

### 2.6.1. Rango de hospedadores

Existen diversos hospederos, variadas especies poiquilothermas como: La tilapia (*Oreochromis sp Orinoquia*), carpa común (*Cyprinus carpio*), pez gato (*Ictalurus punctatus*), anguila común (*Anguilla anguilla*), pez dorado (*Carassius auratus*), carpa Koi (*Cyprinus carpio koi*), lenguado (*Solea solea*), salmón del atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*oncorynchus mykiis*), pez roca negro (*Sebastes schlegeli*), cocodrilos (*Crocodylus niloticus*), rana (*Rana tigerina* y *R. rugulosa*) y en el mamífero lobo marino (*Otaria flavescens*); animales terrestres como: Pollos, cerdos, gatos, perros y humanos; también se han aislado de algunos alimentos como verduras, pescado congelado, leche, carne de bovino y embutidos (Zepeda, 2015; Beaz *et al.*, 2013).

### 2.6.2. Distribución geográfica

El género *Aeromonas* se encuentra en casi todos los nichos ambientales, incluidos hábitats acuáticos, peces, alimentos, mascotas domésticas, aves y suelo. El ambiente acuático es el hábitat natural de las aeromonas y se pueden aislar de los ríos, lagos, estanques, aguas subterráneas, aguas superficiales y cloradas (Ching *et al.*, 2019).

El género se distribuye en depósitos de agua contaminada o limpia, sistemas acuáticos con un porcentaje de salinidad no muy elevado y también puede encontrarse en la flora intestinal de peces que no están enfermos (Zepeda, 2015).

El patógeno se distribuye a nivel mundial, con excepción de Nueva Zelanda y Australia. Se han ubicado principalmente al Norte en zonas templadas como Japón, USA, Canadá y Europa (centro y Norte) (Gonzales, 2002). En Chile se presentaron casos de forunculosis en salmónidos por primera vez en 1995. (Bravo, 1999).

### **2.6.3. Frecuencia y prevalencia**

Según estudios realizados donde se evaluaron 32 muestras de pescado comercializado se encontró el 48.87 % infectado con *A. salmonicida* y *A. hydrophila*, presentándose una mayor prevalencia de *Aeromonas salmonicida* (31.25%) en comparación con *A. hydrophila* (15.6%) (Seethalakshmi *et al.*, 2008).

### **2.6.4. Factores predisponentes**

#### *2.6.4.1. Factores del agente*

*Aeromonas salmonicida* es un patógeno que tiene la capacidad de ingresar en los macrófagos, sobrevivir dentro y replicarse, evadiendo así la respuesta inmune. Factores que dan virulencia al agente son los LPS y flagelos polares ubicados en la superficie celular, desempeñando un importante papel en la adherencia de la bacteria a las células del epitelio del hospedero. El pili tipo IV es otro factor de importancia para la virulencia, permite la adherencia, motilidad, colonización en el epitelio (Zepeda, 2015).

Son bacterias enteropatógenas, poseen propiedades de virulencia, como la capacidad para producir enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas y / o capacidad para invadir las células epiteliales (Seethalakshmi *et al.*, 2008).

#### *2.6.4.2. Factores ambientales*

La temperatura influye en el desarrollo del patógeno, no hay crecimiento de la bacteria a temperaturas que se encuentran sobre los 37° C; requiere permanecer en el hospedador pero puede sobrevivir por un corto periodo en el ambiente según las condiciones del agua (temperatura, pH, niveles de detritus del agua) (Gonzales, 2002).

#### *2.6.4.3. Transmisión*

La transmisión del agente puede darse de forma horizontal, de peces infectados a peces inmunocomprometidos; otra forma de transmisión es por diseminación del agente en el medio ambiente a través de excretas o materia orgánica que contiene el microorganismo; los peces con presencia de forúnculos pueden diseminar la enfermedad en el agua al

lacerarse la piel, lo que ocasiona salida de sangre, bacterias y tejido necrótico, esta forma es el principal foco de infección en brotes de la enfermedad (Zepeda, 2015).

#### 2.6.4.4. Periodo de incubación

La temperatura óptima para el crecimiento de *Aeromonas salmonicida* se encuentra entre 22 – 25 °C de acuerdo a lo mencionado en el Manual de Sistemática de Bergey (Brenner *et al.*, 2005). Sin embargo, el crecimiento de *A. salmonicida* a 25 °C, puede inactivar algunos genes que proporcionan virulencia a la bacteria (Daher *et al.* 2011, Stuber *et al.*, 2003). Por ello se sugiere que la incubación debe realizarse a temperaturas menores de 20°C para análisis *in vitro* (Daher *et al.*, 2011).

## 2.7. Patogénesis

### 2.7.1. Ruta de infección

El ingreso de este agente a las granjas, se da mediante animales que se encuentran sanos o que son portadores de la enfermedad y liberan el agente al ambiente poniendo en riesgo a los demás animales (Allejo y Ellis, 1989; Zepeda, 2015).

La infección por *Aeromona salmonicida* se da principalmente por transmisión horizontal, teniendo como las rutas de infección más comunes a las vías digestivas, piel lesionada y branquias (Gonzales, 2002, Jutfelt *et al.*, 2008; Coscelli, 2014). La transmisión vertical a través de fluidos reproductivos también podría ocurrir, pero es una probabilidad escasa (González, 2002).

Durante la infección de la piel por el patógeno *Aeromona* se observan tres etapas principales; primero se da el acoplamiento y colonización inicial de la herida, en la segunda etapa se da la elaboración de proteasas y degradación de material proteico como fuente de energía, la cual ayuda a la multiplicación de bacilos; en la tercera etapa se da la migración de *Aeromonas spp.* a tejidos más profundos por quimiotaxis (Janda *et al.*, 2010).

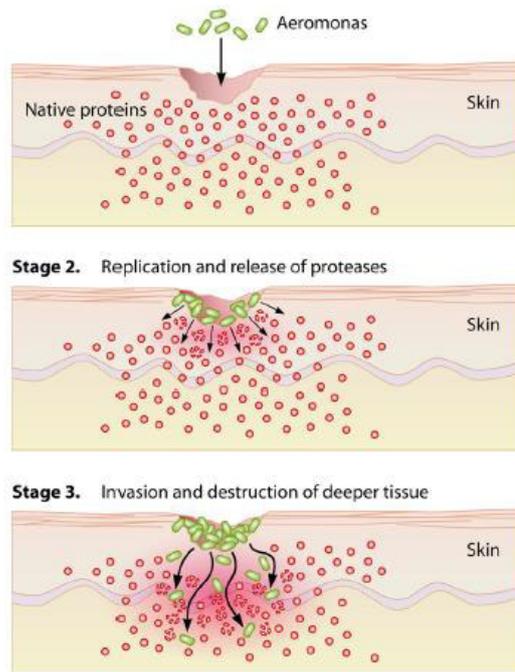


Figura 9. Etapas durante la infección con *Aeromonas* a través de heridas de piel (Janda *et al.*, 2010)

### 2.7.2. Factores de virulencia

Las bacterias poseen factores de virulencia que le permiten infectar al huésped, estos factores deben superar los mecanismos de defensa del huésped (Dallaire *et al.*, 2013).

Algunos de los componentes de *A. salmonicida* que tienen gran importancia porque permiten la unión de células huésped y la entrada en el huésped son las adhesinas, la capa superficial y los pili (Bartkova, 2016).

#### 2.7.2.1. Capa A:

Es una estructura proteica compleja, se encuentra codificada por el gen vap A y está asociada a lipopolisacáridos en la superficie celular, posee una estructura tetragonal, tiene la capacidad de aumentar la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, permite la autoaglutinación bacteriana, adherencia a macrófagos de peces, y resistencia a la citotoxicidad de macrófagos. También recepciona bacteriófagos y enmascara los receptores fagos de la membrana externa (Dallaire *et al.*, 2013, Beaz, 2013). Otra de sus funciones es dar protección del sistema de complemento (Dallaire *et al.*, 2013).

#### 2.7.2.2. *Pilis o fimbrias:*

Son estructuras más cortas que los flagelos, que permiten que la bacteria se adhiera a las células o tejidos del hospedador.

*Aeromonas salmonicida* presenta el pili tipo I y tipo IV; el pili tipo I potencia la colonización del hospedador; el pili tipo IV interviene en la adherencia a las células epiteliales, así como también en las funciones de colonizar e invadir la célula. Ciertos estudios demuestran que el pili Tap D es importante para la viabilidad de *A.salmonicida*, y el pili TapA tiene la función de estimular la respuesta inmune (Beaz, 2013).

#### 2.7.2.3. *Moléculas extracelulares:*

Algunas de estas moléculas son aerolisinas, nucleasas, proteasas y fosfolipasas (Dallaire *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2018).

Las proteasas contribuyen en la multiplicación y proliferación de la bacteria, así como también al desarrollo de la enfermedad ya que disminuye las defensas del huésped y proporciona nutrientes al patógeno. Estos nutrientes pueden provocar lesiones dérmicas. Algunas proteasas como Asp A pueden ser letales ya que se encargan de licuar tejidos musculares, provocando así la aparición de forúnculos. Esta proteasa al unirse a lipasas como la CGAT (colesterol aciltransferasa), activa la liberación de proenzimas que provocan la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana, lisando los eritrocitos del pez, dando como resultado forúnculos sangrantes (Dallaire *et al.*, 2013).

La aerolisina tiene un efecto citolítico ya que forma poros a nivel de la membrana de las células huésped y también causa gastroenteritis en los animales ya que provoca que se acumulen fluidos (Castro *et al.*, 2002).

Las lipasas como lip, lip H3, pla y plc se encargan de alterar las membranas plasmáticas del huésped (Khor *et al.*, 2015).

El glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (GCAT) es un factor de virulencia importante de *Aeromona salmonicida*. Todas las cepas de *aeromona* poseen el gen GCAT, pero no todas resultan ser virulentas, lo que indica que no es el único factor que da la virulencia a esta bacteria. (Beaz *et al.*, 2013). Esta toxina también puede agregarse a los

LPS, creando un Complejo GCAT / LPS que es aún más tóxico que el GCAT por sí mismo (Bartkova, 2016).

#### 2.7.2.4. Exotoxinas:

Son activamente secretadas por las bacterias, e inducen los signos de infección sistémica aguda, se encargan de lisar la célula huésped y tienen actividad de proteasa.

#### 2.7.2.5. Endotoxinas:

Al igual que los lipopolisacáridos, son componentes principales de la pared celular de las bacterias gram negativas; se encargan de inducir la respuesta inmune innata (Jutfelt *et al.*, 2008). Son estructuras inmunomoduladoras responsables de la inflamación. Hay tres dominios: El O-polisacárido (antígeno O) (estimula la producción de Ac específicos), el núcleo oligosacárido y el lípido A (unido a la membrana bacteriana externa) (Beaz *et al.*, 2013). Cerca de 97 serogrupos diferentes entre las *Aeromonas* son reconocidos basados en los antígenos ubicados en la región O del LPS. Los serotipos que prevalecen en diferentes zonas geográficas y están relacionados con casos de gastroenteritis e infecciones sistémicas son: O: 34, O: 11 y O: 16 (Castro *et al.*, 2002).

#### 2.7.2.6. Sistemas de secreción:

Las bacterias gram negativas poseen 6 tipos de sistemas de secreción; en el caso del *Aeromonas salmonicida* se han descrito 3 tipos: T2SS, T3SS y T6SS (Bartkova, 2016).

El tipo T2SS, es una vía general de secreción, tiene la función de secretar toxinas y degradar enzimas; en *Aeromonas* este tipo de sistema de secreción es usado para el transporte, a este grupo pertenecen las Aerolisinas, amilasas, ADNas y proteasas (Beaz y Figueras, 2013; Bartkova, 2016).

T6SS permite la inyección de las proteínas efectoras en el citoplasma de las células huésped (Bartkova, 2016).

El tipo T3SS, está conformado por proteínas dispuestas a manera de agujas que permite que las toxinas sean transferidas del citoplasma del agente patógeno al citoplasma celular del huésped. Sin este sistema *Aeromonas salmonicida* no puede causar infección en

el huésped; estas toxinas previenen la fagocitosis e inducen la apoptosis (Beaz y Figueras, 2003; Dallaire *et al.*, 2013; Bartkova, 2016). T3SS es el único factor de virulencia demostrado ser esencial para la virulencia y toxicidad de *A. salmonicida*, ya que la inactivación en estudios de las proteínas estructurales T3SS en *A. salmonicida* siempre la han convertido en cepas no virulentas.

Tanto los genes asociados a T3SS como a T6SS están además situados en el cromosoma así como los plásmidos (Bartkova, 2016).

En *Aeromonas* spp. se han identificado las siguientes toxinas efectoras: 1 AexT (ADP-toxina ribosilante), el AopP (que inhibe el factor nuclear kappa B, regulador de citoquinas), la AopH (una tirosina fosfatasa), la Aop O (una serina / treonina quinasa codificada en el plásmido pAsa5) y la AexU (una toxina similar a AexT) (Beaz y Figueras, 2013; Bartkova, 2016).

La proteína Aop O se encuentra sobreexpresada en procesos infecciosos, pero su inactivación no altera la virulencia de este patógeno. Esta proteína es homóloga a la proteína YopO/YpkA de *Yersinia* que se encarga de romper los filamentos de actina, induciendo la apoptosis e inhibe la activación de proteínas Rac, impidiendo de esta manera la fagocitosis (Menanteau *et al.*, 2016).

Tanto las proteínas efectoras como las proteínas estructurales de T3SS se cree que desempeñan un papel en la supervivencia de *A. salmonicida* dentro de la célula huésped, pero al compararlas solo las proteínas estructurales demostraron ser vitales para la virulencia (Bartkova, 2016).

## **2.8. Aspectos clínicos y patológicos**

### **2.8.1. Signos clínicos**

La aparición de signos clínicos son dependientes del tiempo y curso de la infección, la presentación puede ser de forma hiperaguda, aguda o crónica (Menanteau *et al.*, 2016); los casos hiperagudos se presentan en su mayoría en alevines con muerte súbita, y algunas veces puede observarse signos clínicos como oscurecimiento de la piel, exoftalmia, abdomen distendido, y en animales de mayor edad pueden no presentar lesiones forunculosis en piel pero si una

septicemia hemorrágica. El forúnculo puede llegar a ulcerarse, liberando un fluido sanguinolento en el agua, lo que ocasiona que el agente se disemine (Coscelli *et al.*, 2014; Zepeda, 2015; Menanteau *et al.*, 2016).

En la forma aguda se observaba, letargia, anorexia además de petequias y hemorragias en el exterior, principalmente en la base de las aletas así como en los órganos internos (Menanteau *et al.*, 2016). En la forma crónica la infección avanza lentamente, se presentan forúnculos, puede presentarse prolapso del ano. Las mortalidades no son muy altas (Zepeda, 2015; Menanteau *et al.*, 2016).

### 2.8.2. Lesiones macroscópicas:

La infección por *Aeromonas salmonicida* en peces provoca hiperpigmentación de la piel, exoftalmia, petequias, úlceras o “forúnculos” en la piel, ascitis, hemorragia en la base de las aletas y branquias (Beaz *et al.*, 2013; Zepeda, 2015; Jung S, 2018). Los forúnculos según la gravedad pueden extenderse hasta la zona abdominal (Zepeda, 2015).

A nivel del intestino se puede observar hemorragia, necrosis y presencia de mucus; en el corazón puede encontrarse infiltrado líquido en el pericardio; el bazo e hígado pueden presentar cambios de color, el bazo puede observarse de una coloración rojo cereza y el hígado de una coloración gris, estos órganos también pueden presentar aumento del tamaño (Figura 10) (Zepeda, 2015).



Figura 10. Hemorragia sistémicas generalizadas visibles a través de los órganos, bazo agrandado (flecha) y hemorragias petequiales en el hígado (punzón) (Menanteau *et al.*, 2016).

### **2.8.3. Lesiones microscópicas**

En las capas de la piel como la epidermis de los peces infectados con *A. salmonicida* pueden presentarse colonias bacterianas, observándose como agregados basófilos distribuidos de forma focal o multifocal con presencia de macrófagos, así también pueden observarse focos de necrosis licuefactiva al centro de las lesiones. En el intestino puede observarse petequias a nivel de la superficie y degranulación de eosinófilos en la mucosa intestinal; en tejido cardíaco se puede observar necrosis cardíaca tóxica, principalmente en los atrios con agregados basófilos localizados de manera focal; en riñón y bazo puede haber una severa depleción linfocitaria (Zepeda, 2015).

## **2.9. Diagnóstico**

El diagnóstico está basado en los signos clínicos (forunculosis crónica) y en el aislamiento e identificación en el laboratorio del organismo causante de la enfermedad (Gonzales, 2002).

### **2.9.1. Microbiológico**

El aislamiento debe hacerse de los órganos y la siembra en placas con agar TSA, GSP o Mueller - Hinton a 20-25 °C durante 24-48 horas (González, 2002). El agar Sangre también puede ser usado (Menanteau *et al.*, 2016).

Las colonias que crezcan en las placas darán un diagnóstico presuntivo, se debe observar morfología, tinción, motilidad y producción de pigmento de las colonias (González, 2002). Las colonias de *A. salmonicida* asemejan la cabeza de un alfiler en cuanto al tamaño después de 18 a 24 h en 18°C, pero se vuelve circular, convexo, entero, y friable con un diámetro de 1 a 2 mm después de 3 días. (Dallaire *et al.*, 2013; Bartkova, 2016).

Según Post (1983), algunas cepas pueden presentar una pigmentación marrón (Figura 11), o pueden no presentarlo debido a pH y temperaturas extremas (González, 2002).



Figura 11. Cepa de *Aeromonas salmonicida* cultivada en agar sangre, con pigmentación marrón

El cultivo de esta bacteria en Agar sangre durante 2 a 4 días da colonias que se vuelven de color grisáceo y forman una zona de hemólisis alrededor de ellas debido a la producción de la hemólisis  $\beta$  (Bartkova, 2016).

Para identificar el género mediante pruebas microbiológicas se pueden realizar pruebas básicas como la producción de catalasa y Citocromo oxidasa y licuefacción de gelatina. Generalmente la bacteria también ha sido reportada de ser positivo para los siguientes carbohidratos y glucósidos: Glicerol, glucosa, fructosa, galactosa, manitol, manosa, maltosa, dextrina, glucógeno, almidón, esculina y salicina, así como ser positivo en L-arabinosa pero negativo en D-arabinosa y no poder convertir triptófano en el indol. Sin embargo, la producción de gas por *A. salmonicida* a partir de la fermentación de glucosa puede ser débil en algunas cepas o no producirse (Bartkova, 2016).

*A. salmonicida* tiene la capacidad de autoaglutinarse en medios líquidos estáticos y en forma colonias "lisas" y "ásperas" en medios sólidos. Estas características se basan generalmente en la presencia o ausencia de la matriz de proteínas de superficie asociada a la virulencia se denomina capa A. *A. salmonicida* es positivo en la capa A. cepas autoaglutinantes y formando colonias "rugosas" (Bartkova, 2016).

### 2.9.2. Serológico

El diagnóstico serológico es de gran importancia, actualmente se utilizan las pruebas IFAT, ELISA, PCR, siendo ELISA una prueba de alta sensibilidad y especificidad.

### 2.9.3. Molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite el diagnóstico rápido para la identificación de diversos patógenos, es un método de gran sensibilidad y especificidad; amplifica regiones específicas de ADN bacteriano, Miyata *et al.* (1996) identificaron a través de esta técnica en peces a *Aeromonas salmonicida*, diferenciándolo de otros patógenos que también afecta a estos animales como: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *Edwardsiella tarda*, *Enterococcus seriolicida*, *Pasteurella piscicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri*.

Análisis realizados usando marcadores como las secuencias de los genes 16S rRNA y 5S rRNA, RFLPs y a los resultados de la hibridación DNA-RNA, demuestran que la filogenia del género *Aeromonas* spp. presenta una evolución diferente al de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, por lo que *Aeromonas* spp. fue cambiada a la familia *Aeromonadaceae*. Otros marcadores que también se usan son el rpoD y el gyrB (Sánchez *et al.*, 2017).

En estudios realizados se consideró al gen rpoD como una guía para identificar y determinar la taxonomía del género *Aeromonas* (Beaz *et al.*, 2010; Khor *et al.*, 2015).

### 2.10. Control y prevención

Las medidas que se tomen en cuenta para la prevención de la enfermedad deben tener presente tres factores importantes: El agente, el huésped y el medio ambiente (Gudding y Van, 2013).

En un brote causado por *Aeromonas* spp. se debe considerar medidas sanitarias básicas como el pronto retiro de los peces muertos y de peces moribundos que presenten signos de la enfermedad. Así también se debe tener un adecuado control del ambiente donde se encuentran los peces, los parámetros del agua deben estar dentro del rango adecuado (baja salinidad, temperatura no mayor de 17° C, pH, oxigenación mínima de 5.5 ppm, amonio inferior a 0.02 ppm y cantidad de contaminantes orgánicos) (Zepeda, 2015).

El uso de antibióticos no es recomendable debido a que podría causar alteraciones en la presentación de la enfermedad, además elevados gastos para la aplicación, el depósito del producto

en el músculo del pez, el posible desarrollo de resistencia bacteriana, la contaminación de ambientes acuáticos y la forma de administración (vía oral) ya que los peces enfermos tienen un apetito reducido o nulo (Zepeda, 2015).

Ya se ha demostrado la resistencia de los peces a diversos antibióticos como: Oxitetraciclina, sulfadiazina, trimetoprima, ácido oxolínico, Antibióticos betalactámicos (penicilina, ampicilina, amoxicilina), cefalosporinas de segunda y tercera generación florfenicol, quinolonas. Esto representa un grave problema debido a que estos fenotipos de resistencia podrían transferirse entre algunas bacterias patógenas (Menanteau *et al.*, 2016; Grajales *et al.*, 2018).

En acuicultura también se ha probado el uso de probióticos como por ejemplo *Carnobacterium* sp. que se encontró que era antagonista tanto para *A. hydrophila* como para *A. salmonicida* (Robertson, 2000), aislamientos de *Lactobacillus plantarum* y *L. fermentum* inhibieron la adhesión de varios patógenos de peces, entre ellos, *A. hydrophila* y *A. salmonicida* (Balcazar *et al.*, 2008), *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* también mejoraron la supervivencia de la trucha arco iris a la infección por *A. salmonicida* (Balcazar *et al.*, 2009). Garcés *et al.* (2015) investigó el *Lactobacillus pentosus* H16 marino contra *Vibrio alginolyticus* y *A. salmonicida*, descubriendo que la cepa probiótica no solo tenía actividad antimicrobiana contra ambos patógenos, sino que también podía reemplazarlos, lo que ilustra el mecanismo de inhibición competitiva (Menanteau *et al.*, 2016). A pesar de estos ejemplos, nuestra comprensión de los mecanismos de acción de los probióticos todavía es limitada. Además, los beneficios de los probióticos han sido variables y algunos resultados han sido difíciles de replicar; también se desconoce qué tan efectiva sería su acción en una producción intensiva a gran escala. Además, ha habido preocupaciones acerca de los probióticos que actúan como patógenos oportunistas en peces estresados (Menanteau *et al.*, 2016).

El uso de vacunas en acuicultura es una herramienta que ayuda en la prevención de enfermedades debido a que estimula al sistema inmune del pez para que responda al agente patógeno, asegurando una producción eficiente sin daños sobre el medio ambiente (Zepeda, 2015).

La vacunación como forma de prevención de enfermedades se dio desde 1938 posiblemente por Snieszko quien publicó un artículo sobre la inmunidad protectora en carpas inmunizadas con

*Aeromonas punctata*. El artículo fue publicado en polaco, lo que hizo difícil su acceso para todo el mundo. Duff en 1942, escribió el primer informe donde describe la protección contra *Aeromonas salmonicida* en truchas inmunizadas por inoculación parenteral y por administración oral (Gudding y Van, 2013).

Se han hecho diversos estudios sobre las vacunas y su vía de aplicación, teniendo presente que es necesario conocer el sistema inmune de los peces y el manejo que se debe tener para obtener resultados favorables. Hasta ahora la vacunación es la mejor alternativa en la crianza de peces.

### **2.11. Sistema inmune en peces**

El sistema inmune de los peces está condicionado por el medio ambiente particular, pero también por su condición poiquiloterma (Tort *et al.*, 2003).

El Sistema inmune se puede dividir en: Innato o inespecífico y adquirido o específico, ambos conformados por una parte humoral y una celular. Ciertos factores pueden influenciar en el desarrollo de una buena respuesta inmune, estos factores pueden intrínsecos o inherentes del pez como la edad y el estado sanitario, o factores extrínsecos como la temperatura, variaciones estacionales y parámetros físico-químicos del agua provocando estrés en el pez y colapso del sistema inmune y otros sistemas (Olabuena, 2000).

La inmunidad innata es desarrollada durante las primeras etapas de vida del pez y ejerce respuesta ante cualquier agente patógeno. La inmunidad específica por su parte se produce ante la presencia de un agente patógeno en concreto (Olabuena, 2000; Penagos *et al.*, 2008).

La inmunidad innata y la inmunidad específica actúan casi al mismo tiempo en presencia de un agente patógeno, pero existen diferencias entre las diversas especies, en mamíferos la inmunidad específica es la principal, mientras que en los peces la inmunidad innata es considerada como el principal productor de mecanismos de defensa ante un agente patógeno, pero a la vez también es capaz de producir anticuerpos específicos frente al agresor (Olabuena, 2000).

### **2.11.1. Inmunidad innata inespecífica:**

El sistema innato es el mecanismo inmunológico más temprano y que se caracteriza por ser no específica es decir no depende de reconocimiento previo de las estructuras superficiales del invasor. También tiene la ventaja de ser inducible por moléculas externas, pero al mismo tiempo es constitutiva y reacciona dentro de una escala de tiempo muy corto (Tort *et al.*, 2003).

Es la primera línea de defensa al igual que en los mamíferos. Compuesta por factores humorales y celulares (Penagos *et al.*, 2008)

En los peces la respuesta inmune innata, mediada por sistema de complemento y otros elementos tiene gran importancia ya que los peces son organismos poiquilotermos, y dependen de la temperatura adecuada para activar sus funciones inmunitarias adaptativas, como la producción de anticuerpos, dependiendo solo de su defensa innata. Así también, cuando no hay un funcionamiento completo de la inmunidad adquirida, los factores de coagulación y la actividad del complemento incrementan su actividad (Jima *et al.*, 2008; Godoy, 2010).

#### *2.11.1.1. Factores humorales:*

La primera barrera de defensa entre el pez y su ambiente está conformada por el epitelio y el mucus. La piel se encuentra recubierta por el moco lo cual le provee de protección ya que contiene diversos componentes antimicrobianos y probablemente antiparasitarios: Carbohidratos, lisozimas y proteasas, lectinas, proteína reactiva C, interferones, eicosanoides, transferrina, péptidos como piscidinas, somatostatina y ACTH, y diversos carbohidratos (Penagos *et al.*, 2008). La producción de mucosidad se incrementa en situaciones de estrés (Tort *et al.*, 2003).

El factor complemento cuenta con una serie de proteínas séricas que tienen funciones de defensa. Se encuentran recubriendo patógenos y agentes extraños al cuerpo, permitiendo que el organismo los reconozca y sean destruidos por las células fagocíticas; también estimulan la contracción del músculo liso, la dilatación de vasos sanguíneos y quimiotracción de células de defensa, permitiendo iniciar la respuesta inflamatoria. Estas proteínas también lisan agentes patógenos mediante la perforación de sus membranas.

Cumple una función bactericida en peces pero solo en cepas que no poseen virulencia que son Gram negativas (Godoy, 2010).

#### 2.11.1.2. Factores celulares:

- Macrófagos: La función principal de fagocitosis en los peces esta dada por los macrófagos que están encargados de secretar citoquinas proinflamatorias, responsables de presentar los antígenos en la respuesta inmune específica. Se presentan en las etapas tempranas de inflamación, *Straptococcus* spp. y *Aeromonas* spp. usan los macrófagos como medio de transporte para llegar a diferentes órganos, evitando así su destrucción. En teleósteos los macrófagos se encuentran en gran cantidad en tejido esplénico, renal y otros tejidos como la mucosa olfatoria (Penagos *et al.*, 2009).
- Leucocitos granulares: Son también denominados neutrófilos (heterófilos), eosinófilos (acidófilos) y basófilos como en los mamíferos. Los neutrófilos tienen función de fagocitosis y actividad quimiotáctica y bactericida, pero son reducidas a comparación de los neutrófilos de mamíferos, por lo que los peces manifiestan inflamaciones necrótico – hemorrágicas más que de licuefacción. Los peces pueden sintetizar “trampas” extracelulares (NETs) conformada por componentes nucleares y gránulos de proteína que capturan y eliminan bacterias. (Penagos *et al.*, 2009). Por otro lado, los eosinófilos de los peces también conocidos como células granulares eosinofílicas (CGEs) están asociadas al tejido conectivo en piel, branquias, sistema gastrointestinal y sistema nerviosos central incluyendo el nervio óptico. No se conoce claramente su función, pero están presente en procesos inflamatorios liberando su contenido granular, asemejando la función de los mastocitos en mamíferos (Ferguson, 2006; Penagos *et al.*, 2008).
- Centros melanomacrófaos (CMMs): Están conformados por macrófagos que producen y almacenan pigmentos como lipofuccina, melanina y hemosiderina. En los peces se encuentra presente principalmente en tejido esplénico, renal, hepático, de gónadas, timo y tiroides. En procesos infecciosos aumenta el número de CMMs, quienes atrapan grandes cantidades de antígeno o de bacterias completas aumentando su coloración (Penagos *et al.*, 2008).

- Células Rodlet: Son células secretorias presentes solo en los peces. Tienen forma ovalada con un núcleo dispuesto hacia un lado, una cápsula fibrosa debajo de la membrana celular y filamentos en el citoplasma direccionados hacia el vértice de la célula. Se encuentran en gran número en tejido epitelial, branquial, intestinal, conectivo, ductos biliares, bulbo arterioso y en menor cantidad en sangre, cerebro y bulbo olfatorio (Ferguson, 2006; Penagos *et al.*, 2009). Aumentan en cantidad en procesos infecciosos o por factores estresantes (Schmachtenberg, 2007).
- Las Células NK: Similar a las células de los mamíferos, tienen una función citotóxica inespecífica de diversas células blanco sin necesitar que sean previamente reconocidas. En los peces teleósteos se han encontrado células NK en el riñón cefálico o pronefros, el bazo, la sangre periférica y el timo, y efectúan la lisis de células blanco humanas, de ratón y de estos mismos peces (Olabuenaga, 2000).

### **2.11.2. Inmunidad específica o adquirida**

Representada por anticuerpos (Ac) e inmunoglobulinas (Ig).

#### *2.11.2.1. Inmunidad humoral:*

La inmunidad humoral adquirida en peces, al igual que en los mamíferos, se encarga de reconocer los antígenos solubles circulantes y unirlos a células B diferenciadas (células de memoria y células plasmáticas) para que respondan produciendo y secretando anticuerpos específicos a los antígenos presentes en el organismo del pez (Penagos *et al.*, 2009).

#### *2.11.2.2. Inmunidad celular:*

Este tipo de inmunidad adquirida mediada por células se encarga de reconocer los antígenos mediante las células T que se encuentran en la superficie de las células presentadoras de antígenos, en conjunto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que permiten la activación de los linfocitos T citotóxicos

(LTC, CD8+), células T helper (LTA, CD4+) que secretan citoquinas y células supresoras. En los mamíferos el MHC I y MHC II, presentan antígenos que son reconocidos por las células T CD4 y CD8 respectivamente, pero no se conoce si se da de igualmente en los peces (Penagos *et al.*, 2008).

En una infección hay subgrupos de células activadas que sintetizan citocinas lo que desencadena una respuesta inmunitaria. La interleucina 2 (citocinas tipo Th1), IFN- $\gamma$  (interferón gamma), TNF- $\alpha$  (Factores de necrosis tumoral alfa) y TNF- $\beta$  (Factor de necrosis tumoral  $\beta$ ) activan macrófagos estimulando así la respuesta inmunológica frente a patógenos intracelulares, induciendo la diferenciación de células T e incrementando la presentación de antígenos. IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, son citosina tipo Th2, encargadas de activar células B, lo que estimula que los anticuerpos sean producidos (Godoy, 2010).

La única Ig presente en los peces óseos y cartilagosos es de la clase "IgM like", presente en el mucus, se supone que es sintetizada localmente (Olabuenaga, 2000).

Las inmunoglobulinas se encuentran en el plasma, el moco y la bilis y se observa un incremento durante procesos infecciosos. En ocasiones los anticuerpos no pueden ser detectados en sueros, pero ante una infección los niveles de anticuerpos en moco y bilis en truchas se encuentran elevados (Penagos *et al.*, 2009).

Los glóbulos blancos de los peces también están conformados por células no granulocíticas como los linfocitos que intervienen en la respuesta inmune mediada por células. Los linfocitos son células importantes en la respuesta inmunológica, representan el 50 – 80% del total de leucocitos, son pequeñas con un núcleo redondo a oval, no poseen la función de fagocitosis. Su producción se da en mayor cantidad en el pronefros y en el timo, presentándose dos tipos: Los linfocitos B y T (Olabuenaga, 2000).

Otros tipos celulares que participan en la inmunidad mediada por células son los macrófagos, estas células se diferencian en diversos tipos celulares con sus respectivas funciones:

- Células citotóxicas o “Killer”: Lisan células que no son propias del organismo del animal, mediante contacto físico directo entre la célula T y la célula blanco.
- Células supresoras: Controlan la producción de anticuerpos y de linfoquinas.
- Células colaboradoras o "helper": Cuando se presenta un agente patógeno aumenta la capacidad de defensa ayudando en la producción de anticuerpos y liberando factores solubles o linfoquinas.

La naturaleza del Ag influye en la respuesta de los Acs, siendo importante su conocimiento para la investigación inmunológica y la producción de vacunas. Para que los antígenos posean una mayor eficacia deben tener un alto peso molecular, una estructura estable y deben ser moléculas químicamente complejas y no inertes. Ejemplos de inmunógenos efectivos en teleósteos son los complejos virales y bacterianos y los antígenos tipo eritrocito, por su parte las proteínas solubles son escasamente inmunógenas (Penagos *et al.*, 2009).

### **2.11.3. Órganos linfoides**

En los animales vertebrados, el sistema inmune está conformado por órganos linfoides primarios, encargados de la producción celular, y los órganos linfoides secundarios, que se encargan la respuesta inmune. Los órganos linfoides primarios y secundarios en los peces difieren de la clasificación en mamíferos, en los cuales el hígado fetal, el timo y la médula ósea son los órganos linfoides primarios y el bazo, nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) son considerados órganos linfoides secundarios. Los peces no poseen médula ósea, siendo el riñón anterior el que cumple la función hematopoyética principal, y el timo encargado de la producción de linfocitos T. El bazo es el órgano linfoide secundario, debido a que el pez carece de nódulos linfáticos. Así también carecen de Placas de Peyer que son estructuras organizadas presentes en los mamíferos. Es por esta razón que algunos autores piensan que los peces no poseen un verdadero MALT como los mamíferos (Tafalla *et al.*, 2016; Leal, 2017).

#### 2.11.3.1. Timo:

Este órgano se encarga de la producción y maduración de linfocitos, no tiene la función de capturar antígenos (Olabuenaga, 2000).

Se encuentra ubicado debajo del epitelio de la faringe, de manera dorsolateral e interna de las cámaras branquiales; está conformado principalmente por timocitos que son linfocitos en maduración (Olabuenaga, 2000; Leal, 2017).

Este órgano involuciona con el paso del tiempo. Se encuentra bien diferenciado en salmónidos juveniles y aislado del medio exterior por una capa de células epiteliales simples, posiblemente con poros de 20 µm de diámetro en Truchas arcoíris (*O. mykiss*). Su localización superficial lo hace susceptible a infecciones por bacterias u hongos (Olabuenaga, 2000).

#### 2.11.3.2. Riñón:

Este órgano cumple la función de la médula ósea en mamíferos, ya que se encarga de la eritropoyesis, granulopoyesis y linfopoyesis. Se encuentra ubicado longitudinalmente y adherido a la columna vertebral desde la cabeza hasta la mitad del cuerpo del pez, y se divide en cuatro partes: Hematopoyética, retículo endotelial, endocrina y secretora. En el pez, el riñón craneal o pronefros se bifurca en dos lóbulos, no posee nefronas y cumple una función únicamente hematopoyética, dándose en este lugar la diferenciación de eritrocitos, linfocitos B y monocitos (Olabuenaga, 2000). El riñón posterior, posee tejido renal e inmunitario (Leal, 2017).

Este órgano está conformado por diversos tipos de leucocitos, como macrófagos, melanomacrófagos y granulocitos, así como también células linfoides en todos sus estadios evolutivos, predominando las IgM+ (linfocitos B). En truchas, se ha observado que en el riñón craneal se encuentran células B precursoras y en el riñón posterior se encuentran linfocitos B diferenciados a células plasmáticas (Leal, 2017)

### 2.11.3.3. *Bazo:*

Es un órgano linfoide secundario, en los peces a diferencia de los mamíferos, la pulpa roja y blanca no están tan diferenciadas. La pulpa blanca se encuentra poco desarrollada, en esta zona se encuentran abundantes centros melanomacrófagos (CMM). Se encarga de filtrar la sangre, destruir los eritrocitos, presentar antígenos y producir células de defensa (Leal, 2017).

En los elipsoides del bazo se encuentran macrófagos, encargados de la fagocitosis, que contienen pigmentos de color oscuro, principalmente melanina y se denominan melanomacrófagos; al agregarse forman los centros melanomacrófagos (CMM). El aumento en número y tamaño de estos centros se da en peces crónicamente enfermos, debido a un excesivo catabolismo. En estos CMM se depositan productos finales del metabolismo (como los fosfolípidos) y también de antígenos. La melanina producida se encarga de capturar los radicales libres de oxidación protegiendo a los tejidos de estos productos. También están presentes en otros órganos como el hígado y riñón, y algunas veces pueden presentarse en la tiroides y las gónadas (Olabuenaga, 2000).

## **2.12. Factores que impiden un buen desarrollo de la inmunidad y de la respuesta inmunológica**

En las especies ícticas, se ha observado tanto en animales de vida silvestre como de producción intensiva, que los mecanismos de defensa pueden disminuir causando inmunosupresión con una disminución de células leucocitarias tanto en tejidos como en sangre circulante. Esta inmunosupresión puede deberse a factores que causan estrés en la producción intensiva como la calidad del agua y el manipuleo frecuente de los animales por parte del hombre durante las etapas de desove, clasificación de los peces y limpieza de las pozas de cría (Ortega *et al.*, 1999).

Los cambios de temperatura y ambientales afectan la respuesta inmunológica. Si la temperatura se encuentra sobre el rango óptimo, la fase de inducción es más corta y hay una respuesta inmune más alta; a bajas temperaturas la fase de inducción toma mayor tiempo, hay baja producción de anticuerpos con una deficiente o nula respuesta inmune (Olabuenaga, 2000). Las

temperaturas que no son aceptables debido a que el sistema inmune no puede ejercer una respuesta, son a 4 °C para los salmónidos y especies de agua fría; en las carpas a 14 °C y en especies de aguas templadas o cálidas entre 12-14 °C, con excepción del catfish donde no se acepta una temperatura de 22 °C (Penagos *et al.*, 2009).

Avtalion (1981), menciona que durante el proceso de inmunización y posterior a este la temperatura debe mantenerse sobre el nivel crítico, para que la producción de anticuerpos se dé normalmente, sin verse afectada la respuesta inmune por la temperatura del ambiente (Penagos *et al.*, 2009). Así también la temperatura es un factor que al no encontrarse en sus valores adecuados, no permite el buen crecimiento de la cría; temperaturas bajas, retardan el desarrollo completo del sistema inmunitario del pez. En la Trucha arco iris (*O. mykiss*) se ha demostrado, que la producción y estabilidad de los anticuerpos depende de la temperatura, presentándose una pobre respuesta inmunitaria en periodos de temperaturas muy bajas a pesar de que se mantengan constantes (Penagos *et al.*, 2009).

El sistema inmune en el pez se encuentra completamente desarrollado entre los 2 a 10 meses posteriores a la incubación, pero se ha hallado Ac en algunos peces de 15 – 21 días y con un peso de 0.15 – 0.3 g (Olabuenaga, 2000).

La tolerancia inmunológica también puede darse en los peces al igual que en los mamíferos, antes que el sistema inmunológico se encuentre completamente desarrollado. Olabuenaga (2000), menciona que se ha demostrado que la producción de Ac contra antígenos T dependientes y de células citotóxicas se desarrollan recién 4 semanas después de la eclosión, y el establecimiento de una memoria inmunológica y la producción de anticuerpos contra Ag T dependientes, se desarrolla 8 semanas después de la eclosión. Por lo tanto si se realiza la inoculación de un Ag T dependiente antes de este periodo se produce la tolerancia inmunológica (Olabuenaga, 2000).

En estudios de vacunación se logró una mayor duración de la inmunidad y desarrollo de la memoria inmunológica en inmunización por inmersión de trucha arco iris con un peso de 4 g (Gudding y Van, 2013).

### **2.13. Reacción inflamatoria**

La reacción inflamatoria es una respuesta al daño de un tejido, se da en todos los vertebrados. Durante este proceso se da la dilatación de los vasos con aumento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad vascular, exudación de plasma y leucocitos en los tejidos que han llegado por migración (Olabuenaga, 2000).

Durante una reacción inflamatoria los neutrófilos son las primeras células que migran a los tejidos causando severos daños debido a que liberan enzimas y radicales libres, el material inerte y propio del antígeno es fagocitado por los macrófagos, los linfocitos generalmente no se presentan en reacciones inflamatorias excepto que se dé una respuesta inmune mediada por células. Puede presentarse un enquistamiento del área afectada en caso el proceso inflamatorio no neutralice completamente el daño tisular, acompañándose por agregados de calcio, fibras de colágeno y pigmentación (Olabuenaga, 2000)

### **2.14. Vacunación en peces**

Muchos avances se han realizado después de los estudios realizados por Jenner y Pasteur en el siglo XVIII-XIX, sobre procedimientos de vacunación.

Las vacunas están compuestas por agentes bacterianos o virales que han pasado por un proceso de atenuación o inactivación, es decir están muertos o se encuentran en fracciones, pudiendo inocularse en seres vivos que estén aparentemente sanos y corren el riesgo de presentar una enfermedad debido a que son susceptibles a ciertos patógenos, teniendo como finalidad generar respuesta a estos agentes patógenos creando una memoria inmunológica (inmunidad activa) en el organismo del ser vivo inmunizado (González y Pérez; 2005).

El uso de vacunas en programas de crianza de peces es nuevo. A partir de los años 70 se empezó a desarrollar las vacunas comerciales debido a la importancia que empezó a tener el cultivo de peces. Se desarrollaron vacunas del tipo bacterinas contra las principales bacterias que afectan en la crianza de peces (*Vibrios*, *Yersinia*, *Aeromonas*) (Muzquiz, 2007).

Snieszko *et al.* (1938) publicó el primer informe del uso de vacunas como prevención de enfermedades. En sus estudios logró obtener inmunidad protectora en Carpas inmunizadas con *Aeromonas punctata* (Gurring *et al.*, 2013).

Duff en 1942 fue el primero en probar una vacuna contra *Aeromonas salmonicida*, vía oral y parenteral llegando a obtener buenos resultados (Smith, 1995; Gudding *et al.*, 2013).

En Truchas arcoíris se conocen vacunas autorizadas contra las siguientes enfermedades: Furunculosis (*A. salmonicida*), vibriosis (*L. anguillarum* y *V. ordalii*), invierno-úlceras (*M. viscosa*), yersiniosis-ERM (*Y. ruckeri*), lactococosis (*L. garvieae*), flavobacteriosis (*F. columnare*), piscirickettsiosis (*P. salmonis*) y IPN (Brudeseth *et al.*, 2013).

La clasificación de las vacunas se puede basar en determinados criterios:

- Microbiológico (Depende la naturaleza del agente, composición).
- Vía de administración.

#### **2.14.1. Microbiológico:**

##### *2.14.1.1. Según su naturaleza:*

Las vacunas son preparadas con el patógeno de la enfermedad contra la cual se quiere dar inmunidad; previamente se elimina el poder patógeno de estos agentes infecciosos mediante ciertos procedimientos pero se mantiene su capacidad inmunógena (González y Pérez, 2005).

Las vacunas pueden ser víricas o bacterianas, y estas se dividen en vacunas de microorganismos vivos atenuados o vacunas de microorganismos muertos o inactivados. Las vacunas de microorganismos muertos o inactivados pueden clasificarse en enteras (conformadas por la bacteria o el virus completo) o por subunidades (conformadas por fracciones bacterianas o víricas) (González y Pérez, 2005).

- Las vacunas vivas o atenuadas: Conformadas por agentes patógenos que tienen la posibilidad de replicarse “in vivo” en el hospedero semejante a la forma natural, generando un proceso infeccioso con escasos síntomas lo que provoca una respuesta inmune celular y humoral, parecida pero menor a la presentada durante una infección

natural. El microorganismo logra atenuarse después de varios pasajes sucesivos en animales o medios de cultivo, eliminando así la capacidad de provocar enfermedad pero su capacidad inmunogénica permite dar protección por un periodo largo y a una dosis mínima. Este tipo de vacunas tienen las desventajas de ser inestables, reactógenas difíciles de producir y que es probable que provoque la enfermedad en el organismo que recibió la vacuna o que se disemine a otro individuo (González y Pérez; 2005).

- Las vacunas de microorganismo muertos o inactivados: Conformados por microorganismos que han sido inactivados por métodos térmicos o químicos, o están compuestas por fracciones o subunidades del patógeno, lo que la hace incapaz de transmitirse a otro organismo. Tiene la ventaja de que es más tolerable, fácil de fabricar y ofrece mayor seguridad. Entre sus desventajas se tienen una menor capacidad de inducir una respuesta inmune en comparación con las vacunas vivas, necesitando de la agregación de adyuvantes para incrementar y de dosis de refuerzo para que la protección sea a largo plazo (González y Pérez, 2005).

Las vacunas sean atenuadas o inactivadas pueden estar compuestas por patógenos enteros o por células enteras. Las vacunas de subunidades como los toxoides o anatoxinas, los antígenos purificados y los polisacáridos capsulares (González y Pérez; 2005).

- Vacunas de células enteras: Los microorganismo que serán usados para la vacuna son atenuados por pases sucesivos en animales o en medios de cultivo; o por inactivación física (Calor) o química (fenol o el formol).
- Vacunas de subunidades o fracciones: Determinados componentes del microorganismo (proteínas, péptidos, carbohidratos, toxinas) son purificados o sintetizados. Al igual que las vacunas inactivadas, tienen las mismas ventajas y desventajas, pero son menos reactógenas.
- Las vacunas de toxoides o anatoxinas: Las bacterianas poseen toxinas que participan en los procesos infecciosos, pero mediante diversos procesos logran ser purificadas en

cultivos bacterianos y detoxificadas por acción del calor, el glutaraldehído o el formol. Este tipo de vacunas logra inducir una respuesta inmunológica más larga de 10 años aproximadamente si la dosis es la adecuada.

- Vacunas recombinantes: Elaboradas a partir de la clonación de genes de diferentes patógenos que codifican proteínas antigénicas específicas (y por tanto producen respuesta inmune) en una célula huésped (Coronado, 2017). En el ámbito de la acuicultura, se han tratado de desarrollar vacunas recombinantes de tipo subunitario, es decir vacunas conformadas por un único antígeno que produce el máximo efecto protector en el pez. Su ventaja es que contiene sólo un componente del patógeno el cual está muy bien definido químicamente y es más estable lo cual elimina el riesgo de una virulencia residual o una reactivación de la virulencia. Sin embargo, no ha tenido resultados satisfactorios (Muzquiz, 2007).
- Vacunas sintéticas: Conformada por polipéptidos que se encargan de copiar la secuencia primaria de aminoácidos del antígeno (Coronado, 2017).

#### *2.14.1.2. Tipos de vacuna de acuerdo a su composición:*

De acuerdo a su composición, uno o más antígenos de la misma o de diferentes especies pueden conformar una vacuna. Cuando la vacuna se compone de un antígeno de un solo microorganismo es llamada vacuna monocompente; cuando se compone de varios antígenos de la misma especie es llamada vacuna multicompetente. Y se denomina vacunas polivalentes cuando están compuestas por varios serotipos o serogrupos de un mismo microorganismo (González y Pérez; 2005).

#### **2.14.2. Tipos de vacunas según la vía de administración:**

Según las vías de administración pueden ser inyectables, orales, intranasales (González y Pérez; 2005).

En peces las vías usadas para realizar la vacunación son: Vía oral a través del alimento, vía inmersión en agua con la vacuna diluida, vía inyección intraperitoneal para lo cual es necesario que el pez tenga un peso aproximado de 10 g, vía inyección intramuscular

que es usada mayormente en vacunas de ADN y administración oral. Otras técnicas usadas son la inoculación vía anal (Penagos *et al.*, 2009).

La vacunación vía oral permite la vacunación de un gran número de peces al mismo tiempo sin necesidad de causar el estrés provocado por el manejo, pero su eficacia no es la mejor, además de que se corre el riesgo de que no todos los peces consuman la misma cantidad. (Jutfelt *et al.*, 2008). La baja eficacia puede deberse a que el antígeno es destruido en el ambiente gástrico (Embregts y Forlenza, 2016).

La vacunación vía inmersión permite la inmunización de un gran número de peces con un manejo mínimo, pero causa estrés en el animal al momento de cambiarlos al recipiente de vacunación; la mayor absorción de la vacuna mediante esta vía se da a través de la piel a comparación de las branquias, permaneciendo la mayoría de las partículas en estos tejidos 24 días después de la inmunización (Moore *et al.*, 1998; Penagos *et al.*, 2009). Se cree que el uso de vacunaciones sucesivas por inmersión exponiendo a los peces a ultrasonografía o provocando heridas a nivel de las aletas incrementa la eficacia de la vacunación (Penagos *et al.*, 2009). La inmunización por inmersión puede realizarse por varios métodos como infiltración hiperosmótica (HI), inmersión directa (DI) y pulverización. Para el método de vacunación con HI se deben sumergir los peces en una solución que puede ser úrea o cloruro de sodio por un corto tiempo y luego se sumergen en la vacuna. Para la vacunación por DI los peces son transportados a peceras con agua conteniendo la vacuna y se dejan ahí por un corto periodo de tiempo. Otras formas son la vacunación por rociado donde los peces se colocan en una cinta transportadora y rociado, y la vacunación por baño donde el nivel de agua disminuye, ofrece la ventaja de un estrés de manejo cero, pero la desventaja de requerir grandes cantidades de vacuna (Plant *et al.*, 2011). La vacuna administrada en el agua a altas concentraciones, ayuda a que el antígeno penetre en los peces. Con soluciones más diluidas se necesita un mayor tiempo de inmersión ya que los peces necesitan tomar las moléculas de la vacuna a medida que las encuentran en el agua (Tatner y Horne, 1985). En estudios realizados por Tatner se observa que los

tiempos de inmersión a una concentración de 1:10, sean menores o mayores no influyen en la absorción de la vacuna (Tatner, 1987).

En cuanto a la vacunación vía inyección intraperitoneal es la forma de vacunación más fiable debido a que cada pez recibe la misma cantidad de dosis de la vacuna, así como también aumenta la intensidad y duración de la respuesta inmune, pero entre sus desventajas está que no refleja el modo natural de infección, no permite que los mecanismos inmunes ubicados en otras zonas del pez como la piel, respondan, además que se requiere de un mayor número de personas y provoca más estrés en los animales (Smith, 1995; Jutfelt *et al.*, 2008, Brudeseth *et al.*, 2013). Actualmente la vacunación vía inyección intraperitoneal administrada con un adyuvante de aceite mineral ha resultado ser un buen método para inmunización contra la furunculosis de peces salmónidos debido a que genera altos niveles de protección (Villumsem y Raida, 2013).

La inmunización anal ha presentado mejores resultados que la vía oral debido a que al no pasar por el tracto digestivo los antígenos no son afectados, pero al igual que la vacunación por vía intraperitoneal, la práctica es difícil (Penagos *et al.*, 2009).

La industria acuícola, ha probado vacunas que contienen como antígeno primario a *Aeromonas salmonicida*, lo que ha llevado a una gran disminución de los brotes de furunculosis (Jutfelt *et al.*, 2008).

### **2.15. Uso de adyuvantes**

Los adyuvantes son sustancias que se administran conjuntamente con la vacuna con la finalidad de aumentar su inmunogenicidad y protección, lo que puede ayudar a disminuir la dosis de la vacuna; ayuda en la presentación del antígeno al sistema inmune, al secuestrar los antígenos presentes en la vacuna y liberarlos lentamente. Los adyuvantes también producen una inflamación leve lo que estimula la aparición de células presentadoras. (Martínez, 2012).

La introducción de vacunas a base de aceite en la década de 1990 resultó en una reducción significativa de los brotes de la furunculosis así como reducción del uso de vacunas de inyección y

de inmersión a base de agua. El uso de adyuvantes de base de agua y aceite dan una alta eficacia y larga duración de la protección (Brudeseth *et al.*, 2013).

- Emulsiones con aceites: Se usan aceites de origen mineral, depositándose en la zona de inoculación, donde se libera lentamente el Ag estimulando la aparición de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Puede ocasionar algunos efectos adversos como generar una reacción inflamatoria, formar úlceras o granulomas en la zona de inyección.
- Sales de aluminio: Las partículas de aluminio absorben el antígeno y se deposita en el lugar de la inyección. Fija el complemento pero ocasiona granulomas.
- Metabolito de la vitamina A: Participan en la diferenciación de células del sistema inmune y modulan la respuesta inmune en mucosas (Sánchez., 2001).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización y periodo del estudio

El experimento y análisis de las muestras fue desarrollado entre los meses de agosto y diciembre del 2018.

La crianza de los alevines de Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se realizó en la Unidad experimental del Laboratorio de Ictiopatología dentro de las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La vacuna fue preparada en la sección de Inmunología veterinaria; la vacunación, desafío y periodo de observación fue realizado en el área de experimentación del Laboratorio de Ictiopatología.

Las necropsias y el estudio histopatológico se realizaron en la sección Ictiopatología del laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos del departamento de Lima.

#### 3.2. Transporte y descarte de agentes infecciosos de los animales usados para el estudio

El experimento fue realizado con un total de 270 alevines de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), provenientes de un criadero ubicado en la Provincia de Canta en el departamento de Lima, aparentemente sanos sin antecedentes de enfermedades por *Aeromonas* spp.

El transporte de los alevines se realizó en bolsas de plástico de 60 L, colocadas en cajas de tecnopor con geles refrigerantes. Las bolsas contenían un tercio de agua y los dos tercios restantes constituido con oxígeno puro; estas bolsas fueron cuidadosamente selladas (Wabnitz *et al.*, 2003; Cueva, 2015).

La unidad experimental se encontraba debidamente desinfectada con Biosanit aqua, (10 ml/litro de agua) y a 11°C de temperatura al momento de la llegada de los alevines.

Antes de iniciar al experimento, al llegar los peces fueron colocados en una pecera de cuarentena de 500 L durante dos semanas, con un adecuado sistema de aireación, un sistema enfriador de agua

y filtros. Durante este periodo, se efectuó una evaluación sanitaria con el propósito de descartar la presencia de *Aeromonas* spp. Esta evaluación consistió en observar el comportamiento de los alevines, así también se eligió al azar 15 alevines, los cuales fueron sacrificados con eugenol disuelto en agua en sobredosis (100 mg/L) y antes de efectuar la necropsia se realizó el corte de la médula, según el método de eutanasia de la CCAC (2010). La necropsia fue realizada de acuerdo al método descrito por Noga (2010).

El riñón craneal y bazo de cada pez fueron sembrados asépticamente en placas con TSA y GSP y se incubaron a 25°C durante 24 - 48 h, periodo en el que no se observó crecimiento bacteriano en las placas sembradas, lo cual confirmó que los alevines estaban sanos.

### **3.3. Metodología**

#### **3.3.1. Establecimiento de la dosis letal (DL50)**

Antes de la vacunación se estableció la dosis letal (DL50) para la cepa de *A. salmonicida*, teniendo un grupo control y los grupos desafiados con la cepa bacteriana de *A. salmonicida* a diferentes concentraciones de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Los peces fueron inoculados vía IP con 0.1 ml del inóculo. El otro grupo solo recibió solución salina estéril al 0,9%. Se registró las muertes por un periodo de 21.

El desafío fue realizado con una cepa patógena de *A. salmonicida* obtenida en un brote en Truchas arcoíris (*O. mykiss*) procedente de Puno. La cepa fue reactivada y posteriormente replicada en placas con TSA. Las colonias crecieron con características de *Aeromonas salmonicida*, se les realizó tinción gram, prueba de oxidasa y catalasa para confirmación. Las diluciones de la bacteria se realizó en solución salina estéril (NaCl 0.9%).

Se mantuvieron a los peces en peceras de 50 L a 11-12 °C, en condiciones adecuadas.

Se realizó la necropsia de los peces muertos y se eutanasiaron los moribundos, sembrándose muestras de riñón anterior y bazo en medios de cultivo de agar TSA y GSP, dejadas en incubación a 25°C durante 24 horas. La DL50 determinada para este experimento resultó ser  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

### 3.3.2. Cálculo de las UFC para el desafío experimental

Se evaluó la dinámica de crecimiento de la cepa de *Aeromonas salmonicida* procedente de Puno mediante espectrofotometría, evaluando la longitud de onda cada 2 horas. Mediante este procedimiento se observó los puntos en los cuales la cepa inicia su crecimiento (Figura 12)

Con los datos obtenidos en la curva de crecimiento, se calculó las UFC usando los puntos donde la cepa inició su crecimiento. Para el conteo de las UFC se utilizó el método de recuento en placas por plaqueo, que consiste en hacer diluciones seriadas  $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$  (Figura 13 )

Para este procedimiento se reactivó la cepa de *A. salmonicida* en un tubo de ensayo con caldo TSB y se comparó la turbidez con la escala de Mc Farland 3, una vez que la turbidez era similar se extrajo 1 ml del caldo con la cepa incubada y se colocó en un frasco con 250 ml de TSB; se llevó a incubar a 25 °C por el tiempo determinado en la curva donde la bacteria inicia su fase de crecimiento. Después de las horas correspondientes se rotuló nueve tubos para realizar las diluciones y se colocó 9 ml de PBS en cada uno. Se extrajo 1 ml del frasco con TSB y la cepa inoculada y se colocó en el primer tubo ( $10^{-1}$ ), de este tubo se mezcló cuidadosamente y se extrajo 1 ml para el siguiente tubo ( $10^{-2}$ ). Este paso se realizó para las siguientes diluciones hasta llegar a la dilución  $10^{-9}$ . Por cada dilución se extrajo 0.1 ml y se colocó en placas con medio de cultivo TSA, cada una con sus dos repeticiones. Luego de colocar 0.1 ml en cada placa se diseminó por todo el medio con un ansa triangular. El mismo procedimiento se hizo con las demás diluciones y se dejó incubando todas las placas debidamente rotuladas por 24 horas a 25 ° C. El conteo se realizó a partir de la dilución donde se observaron colonias en el rango de 30 a 300. De igual forma se realizó el plaqueo en el segundo punto seleccionado de la curva.

Se usó la siguiente fórmula para hallar las UFC.

$$\frac{N^{\circ} UFC}{ml sembrado} \times FD (inversa) = UFC$$

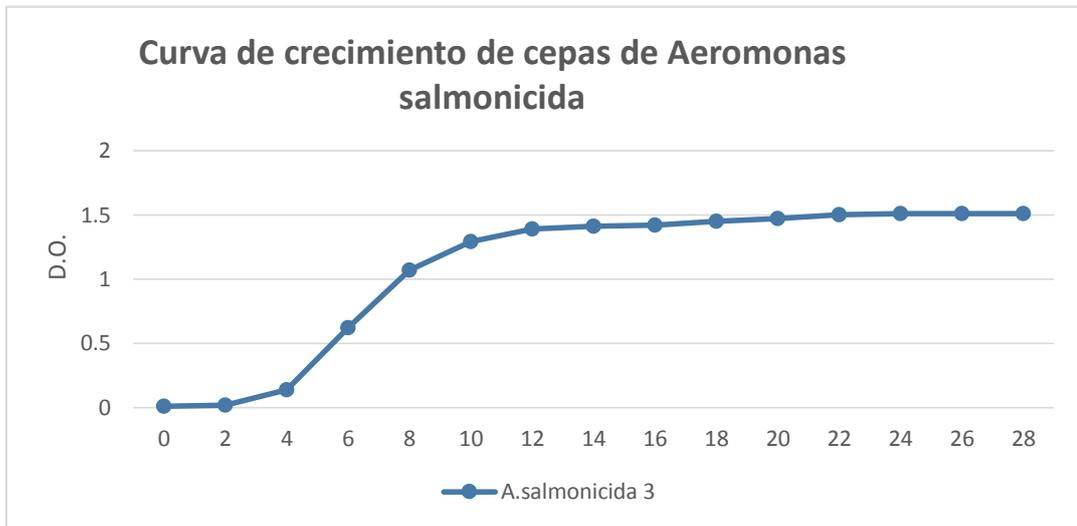


Figura 12. Curva de crecimiento de la cepa *Aeromonas salmonicida* procedente de Puno

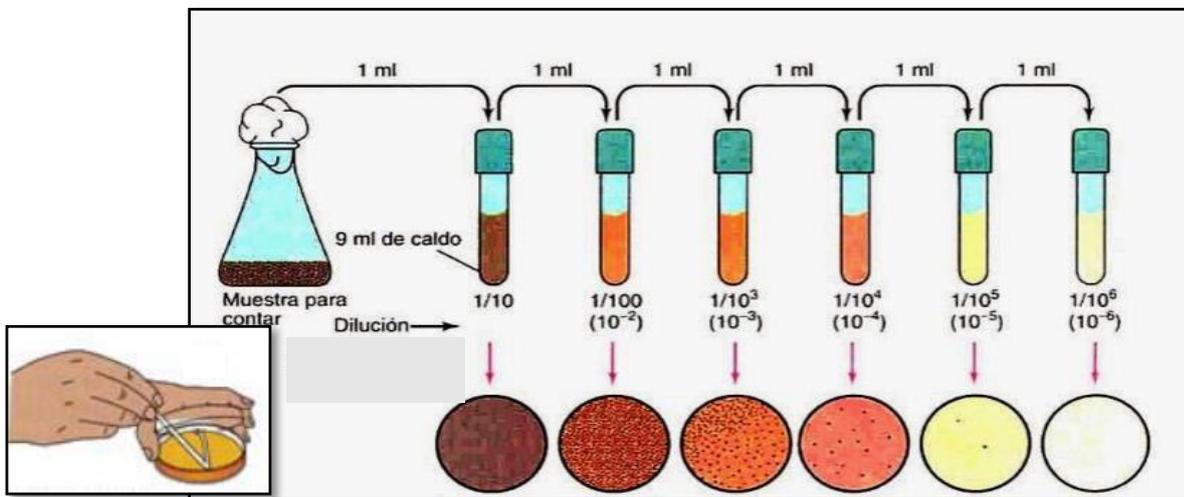


Fig. 13. Método de recuento en placas por plaqueo para hallar las UFC.

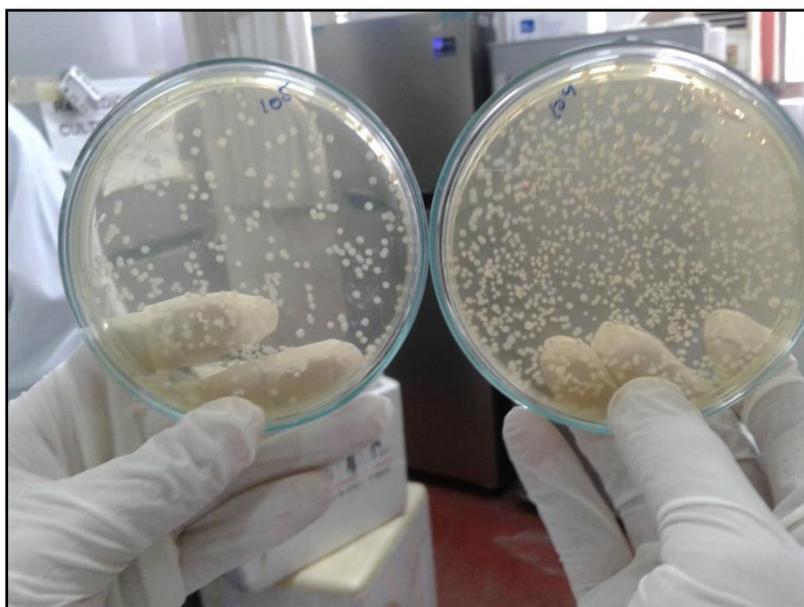


Fig.14. Conteo de colonias a partir de la placa donde el rango se encuentre entre 30 – 300 colonias.

### 3.3.3. Preparación del antígeno vacunal

Para la preparación del antígeno vacunal se usaron cepas bacterianas de *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilum*, aisladas de brotes de diferentes lugares del Perú, por el laboratorio de Ictiopatología, de la FMV-UNMSM. Estas cepas fueron conservadas en un cepario en viales con caldo TSB y glicerol a -20°C. (Cuadro 10)

Cuadro 10. Identificación y procedencia de cepas seleccionadas y usadas en la preparación de la vacuna.

CEPAS SELECCIONADAS	PROCEDENCIA
<i>Aeromona Hydrophyla</i>	Cajamarca
<i>Aeromona salmonicida</i>	Puno
<i>Yersinia ruckeri</i>	Huaraz
<i>Yersinia ruckeri</i>	Huaraz
<i>Yersinia ruckeri</i>	Puno
<i>Yersinia ruckeri</i>	Junín

Se reactivaron las cepas en 10 ml de caldo TSB y se dejó en incubación por 24 -48 horas, luego se sembró en caldo TSB y se dejó en incubación a temperatura de 24 - 25°C *Aeromona salmonicida* y *Yersinia reuckeri* a 15 ° C por 24 a 48 horas, *Flavobacterium psychrophilum* por por 48 -72 horas. Posteriormente se realizó la inactivación química con 10% de formaldehído al 40% seguida de una inactivación a 60°C por 30 minutos para asegurar la inactivación de las cepas.

Se realizó la centrifugación de cada cepa sembrada en su caldo respectivo para obtener dos fracciones: El pellet, que contiene las bacterias (antígeno somático); y el sobrenadante que es rico en exotoxinas bacterianas (antígeno extracelular).

A los sobrenadantes (antígeno extracelular), se les agregó sulfato de amonio al 40%, se homogenizó y dejó en refrigeración por 1 hora; luego fueron centrifugados, recolectándose los pellets. Se realizó la diálisis del antígeno extracelular y la sonicación del antígeno somático.

Finalmente, se unieron antígeno somático y extracelular en tubos falcon de 50 ml, y se agregó un adyuvante, metabolito de la vitamina A.

#### 3.3.4. Animales usados en el estudio

Se usaron 270 alevines de truchas arcoíris registrando el peso y talla de cada uno, por grupo en el momento de la vacunación. (Cuadro 11)

Cuadro 11. Pesos (gr) y tallas (cm) promedio por grupo al momento de la vacunación

	Talla promedio (cm)	Peso promedio (gr)
<b>Vacunados IP</b>	10.5	8.5
<b>Vacunados INM</b>	10.5	9
<b>Control</b>	9.5	9.8

### 3.3.5. Condiciones de crianza

Se mantuvo a los peces dentro de peceras de 50 L, con aire acondicionado en el área experimental para mantener la temperatura adecuada en el ambiente y enfriadores de agua (chillers) para enfriar el agua usada en el recambio, se contó con un sistema de recirculación para el grupo vacunado y otro para el grupo control, cada pecera con sus respectivos filtros. Diariamente se realizó el recambio parcial de agua (25-50%) con agua libre de cloro y enfriada mediante chillers. Su alimentación fue 3 veces al día con alimento comercial a una ración de 4.2% de su peso vivo. También se llevó un registro diario de las constantes fisicoquímicas del agua (Cuadro 12).

Cuadro 12. Promedio de parámetros fisicoquímicos del agua durante el estudio.

<b>Parámetros del agua</b>	<b>Valor promedio</b>
<b>Temperatura</b>	11.4
<b>pH</b>	7.8
<b>Oxígeno disuelto</b>	9 ppm
<b>Amoníaco Nitrogeno</b>	2.5 ppm
<b>Nitrito nitrógeno</b>	0.165 ppm
<b>Alcalinidad</b>	80 ppm
<b>Dureza</b>	185 ppm

### 3.3.6. Diseño experimental

Se distribuyeron al azar los alevines de truchas arcoíris en seis grupos. Un grupo control para la vacunación vía inmersión (INM) y un grupo control para la vacunación vía inyección intraperitoneal (IP). Ambos grupos controles recibieron una falsa vacunación, uno por inmersión en agua sin la vacuna y el otro por inyección con solución salina estéril al 0.9% vía IP. Los

otros dos grupos fueron vacunados vía INM e inyección IP. Los grupos vacunados tenían sus respectivas repeticiones. Se colocaron 45 peces en cada pecera. (Cuadro 13)

Cuadro 13. Distribución de peces por grupos (Controles y vacunados)

<b>GRUPOS</b>	<b>Nº de peces</b>	<b>Vía de vacunación</b>
<b>Control 1 (C1)</b>	45	Falsa vacunación por inmersión con agua.
<b>Control 2 (C2)</b>	45	Inyección IP de solución salina 0.9 %
<b>Vacunado 1 y 2</b>	45 cada grupo	INM (Inmersión)
<b>Vacunado 1 y 2</b>	45 cada grupo	IP (Intraperitoneal)

A los 28 días post vacunación se realizó el desafío con la cepa bacteriana de *Aeromonas salmonicida* procedente de Puno. Se observaron y registraron las mortalidades pos desafío a partir de las 24 horas de la inoculación de la bacteria hasta los 21 días posteriores. Se realizaron necropsias registrando las lesiones, así como también análisis microbiológico y pruebas bioquímicas respectivas.

### 3.3.7. Procedimiento de vacunación

Estudios previos realizados en Truchas arcoíris por Romer *et al.* (2013) y Haahr *et al.* (2017), describen la metodología usada para la vacunación vía inmersión y vía intraperitoneal, estas metodologías fueron usadas para el presente estudio.

Previa a la vacunación, los alevines estuvieron en ayuno 24 horas antes. Cada grupo se encontraba debidamente señalado, con los materiales respectivos para la vacunación vía inmersión e intraperitoneal.

Para el método de inmersión se retiró a los alevines de sus peceras y se les sumergió por 1 minuto en el agua conteniendo la vacuna diluida en una proporción de 1:10, preparada en otra pecera. Luego de este tiempo se devolvieron a sus peceras iniciales.

Para la vacunación vía intraperitoneal. Se homogenizó la vacuna y se reguló su temperatura a 15 - 20 ° C. Se preparó dos peceras, la primera que contenía eugenol (100mg/L)

diluido en el agua, donde se colocaron los peces para sedarlos. Una vez sedados se realizó la vacunación por inyección IP a dosis de 0.1 ml/alevín, luego se les colocó en la segunda pecera de recuperación, que contenía agua y oxigenación, para después totalmente recuperados de la sedación pasarlos a su pecera correspondiente. La inyección IP se realizó colocando la aguja de forma perpendicular a  $\frac{3}{4}$  de la longitud de la aleta pélvica delante de la base de la aleta, máximo 10 mm por delante, y en la línea media del pez.

El grupo control de los vacunados vía inmersión, fue retirado de su pecera y colocado en otra con solo agua de contenido, con el fin de provocar el mismo estrés que el grupo que sí fue inmunizado vía inmersión. El grupo control de la vacunación vía intraperitoneal, fue anestesiado y se realizó la inyección IP pero con solución salina estéril al 0.9

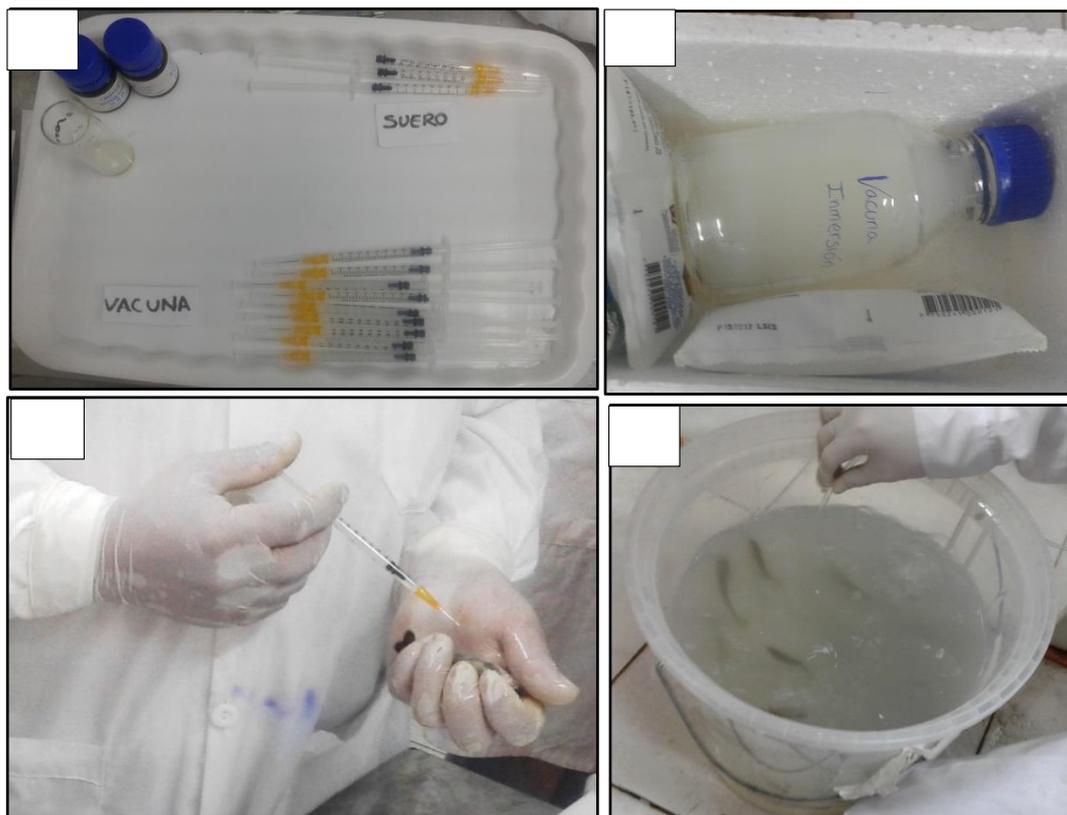


Figura 15. Materiales y procedimiento para la Vacunación vía intraperitoneal (A, B); materiales y procedimiento para la vacunación vía inmersión (C, D)

### 3.3.8. Desafío experimental

28 días después de la inmunización se realizó el desafío de los alevines de Truchas arcoíris, mediante inyección intraperitoneal inoculando 0.1 ml/pez de un cultivo puro de

*Aeromonas salmonicida* 10<sup>8</sup> UFC en cada grupo (Controles, vacunados vía INM, vacunados vía IP), previa sedación.

Se observó y registró diariamente el comportamiento y lesiones que presentaban, se realizó las necropsias de los alevines moribundos y de los alevines muertos, en el caso de los alevines moribundos se realizó la eutanasia con sobredosis de eugenol disuelto en agua, seguido del corte medular

Durante la necropsia se tomaron muestras asépticas de riñón craneal y bazo, y se sembraron en placas con TSA y GSP e incubaron a 25 - 30 ° C por 24 para el análisis microbiológico. También se colectó muestras de branquias, hígado, bazo, riñón e intestinos, y fueron colocadas en un frasco con formol al 10 % para posteriormente realizar el análisis histopatológico.

### **3.3.9. Criterios para evaluar la eficacia de la vacuna**

- **Porcentaje de sobrevivencia:** Desde el día en que se realizó el desafío hasta 21 días después se monitorearon a diario los signos clínicos y el número de muertos observados.
- **Porcentaje de Mortalidad y sobrevivencia acumulada:** La evaluación de la mortalidad y la supervivencia acumulada en cada grupo pos desafío se realizó durante 21 días después del reto y se halló si existía diferencia significativa entre grupos.

Se colectaron muestras de branquias, hígado, bazo, riñón craneal e intestino de los peces muertos y moribundos.

Se analizó la frecuencia de lesiones (externas, internas y observadas histopatológicamente) por grupo.

### **3.3.10. Análisis de información**

Las tasas de supervivencia acumulada después de los 21 días de evaluación fueron analizadas mediante la prueba de supervivencia de Kaplan Meier y prueba de log Rank con la finalidad de hallar diferencias significativas entre grupos. Se consideró estadísticamente significativo cuando en la evaluación  $p < 0.05$  a un nivel de significancia del 95%. Para estos análisis se usó el software STATA.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Mortalidad pos vacunación

Después de la vacunación y durante los 28 días de observación no se registró mortalidad.

### 4.2. Signos clínicos y lesiones macroscópicas pos desafío.

Después de la vacunación se observó a los alevines de Truchas arcoíris durante 28 días pos vacunal, no evidenciándose mortalidad en ninguno de los grupos vacunados tanto de la vía de inmersión (IM) como de la vía intraperitoneal (IP).

#### 4.2.1. Signos clínicos y lesiones macroscópicas pos desafío:

Posterior a los 28 días pos vacunación se realizó el desafío con la cepa de *A. salmonicida*, observándose: En todos los peces de grupos controles y en menor cantidad 22.2% (20 /90) en los vacunados vía INM, evidenciaron letargia al día siguiente del desafío. Los grupos vacunados vía intraperitoneal no presentaron este signo clínico. Algunos peces en todas las peceras presentaron exoftalmia, siendo 5.5% (5/90) en control, 2.2% (2/90) en vía IM y 2.2% (2/90) en vía IP.

Hubo mortalidad a las 24 horas post desafío en todos los grupos de estudio (Control y vacunados por ambas vías), pero en menor cantidad en los vacunados vía IP. En todos los grupos la mortalidad disminuyó a partir del cuarto días

A la necropsia, se evidenció externamente melanosis, exoftalmia, poro anal hemorrágico, enrojecimiento a nivel del poro anal y base de las aletas, úlceras en el lugar de punción, petequias en la lengua, dilatación abdominal (Cuadro 14). Internamente se observó esplenomegalia, congestión hepática, congestión intestinal, renomegalia, ascitis, branquias congestionadas, ciegos pilóricos dilatados (Cuadro 15). Figura 16 y 17

Externamente las lesiones macroscópicas que se presentaron en mayor porcentaje fueron melanosis 35.5% (48/135), aletas hemorrágicas 31.1% (42/135), congestión branquial 19.3% (26/135), dilatación abdominal 14% (19/135).

Las lesiones macroscópicas internas en alevines muertos observadas en mayor porcentaje fueron esplenomegalia 50.4% (68/135), hemorragia intestinal 40% (54/135), congestión hepática 45.2% (61/135), enteritis 43.7% (59/135). Figura 17.



Figura 16. A: Dilatación abdominal, B: Petequias en la lengua, C: Exoftalmia y melanosis, D: Aletas y poro anal hemorrágico.

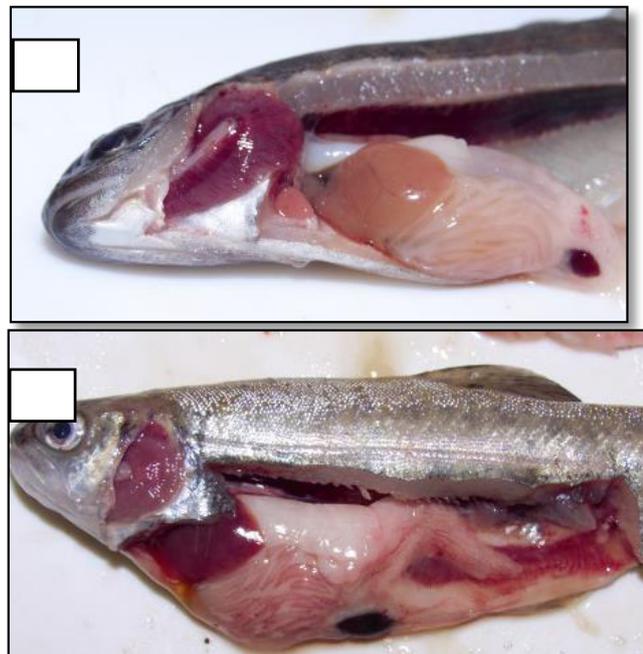


Figura 17. A: Congestión branquial, palidez hepática, B: Congestión branquial, dilatación de ciegos pilóricos, Congestión intestinal., congestión hepática

### **4.3. Mortalidad post desafío**

#### **4.3.1. Vacunados vía inmersión:**

- Grupo control desafiado: A las 24 horas pos desafío, se registró un porcentaje de mortalidad de 33.3% (15/45), a las 72 horas (3 días) la mayoría de peces habían muerto, registrándose un porcentaje de mortalidad de 77.7% (35/45). Las mortalidades continuaron hasta el día 8. El porcentaje de mortalidad final fue de 91.1%, con una sobrevivencia de 8.8% (4/45) después de los 21 días de evaluación.
- Grupo inmunizado vía inmersión y desafiado: Uno de los grupos inmunizados vía INM registro a las 120 horas (5 días) un porcentaje de mortalidad de 35.5% (16/45), las mortalidades continuaron en menor número hasta el día 10 después del cual no se registraron más muertes. El porcentaje de mortalidad hasta el día 10 fue de 46.6% (21/45), obteniéndose una sobrevivencia de 53.3% (24/45).

El segundo grupo inmunizado (repetición) vía INM registró a las 120 horas (5 días) un porcentaje de mortalidad de 33.3% (15/45), las mortalidades continuaron pero en menor número hasta el día 10, los días posteriores no hubieron más muertos. La mortalidad registrada en este grupo fue de 44.4% (20/45), con una sobrevivencia de 55.5% (25/45).

#### **4.3.2. Vacunados vía intraperitoneal:**

- Grupo control desafiado: A las 24 horas pos desafío, se registró un porcentaje de mortalidad de 37.3% (17/45), a las 72 horas la mayoría habían muerto, registrándose un porcentaje de mortalidad de 80% (36/45). Las mortalidades continuaron hasta el día 9 donde murió el último pez, obteniendo un 100% de mortalidad.
- Grupo inmunizado vía intraperitoneal y desafiado: El primer grupo inmunizado vía IP registró a las 120 horas (5 días) un porcentaje de mortalidad de 6.6% (3/45), las mortalidades continuaron hasta el día 10, obteniéndose un porcentaje de mortalidad de 26.6% (12/45) y una sobrevivencia de 73.3% (33/45)

El segundo grupo inmunizado vía IP registró a las 120 horas (5 días) un porcentaje de mortalidad de 6.6% (3/45), las mortalidades continuaron hasta el día 10, obteniéndose

un porcentaje de mortalidad de 24.4% (11/45), con una sobrevivencia de 75.5 % (34/45).

Cuadro 14. Mortalidades por grupo de los controles y vacunados de Truchas arcoíris, pos desafío con *Aeromonas salmonicida* (21 días de observación pos desafío)

21 días pos desafío con <i>Aeromonas salmonicida</i>							
	Control INM	Control IP	INM 1	INM2	IP1	IP2	TOTAL
<b>30/08/2018</b>	15	17	0	0	0	0	32
<b>31/08/2018</b>	8	10	6	6	1	0	32
<b>01/09/2018</b>	12	9	4	4	1	1	32
<b>02/09/2018</b>	2	3	3	3	1	2	16
<b>03/09/2018</b>	3	2	3	2	0	0	12
<b>04/09/2018</b>	0	0	0	2	0	1	3
<b>05/09/2018</b>	0	3	2	1	1	2	9
<b>06/09/2018</b>	1	0	2	1	7	3	16
<b>07/09/2018</b>	0	1	0	0	0	1	2
<b>08/09/2018</b>	0	0	1	1	2	1	5
<b>09/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>10/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>11/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>12/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>13/09/2018</b>		0	0	0	0	0	0
<b>14/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>15/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>16/09/2018</b>		0	0	0	0	0	0
<b>17/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>18/09/2018</b>		0	0	0	0	0	0
<b>19/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>20/09/2018</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>21/09/2018</b>		0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL DE MUERTOS</b>	41	45	21	20	12	11	

Cuadro 15. Porcentajes de supervivencia de los peces vacunados con una vacuna polivalente contra enfermedades producidas por *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* y *Flavobacterium psychrophilum* en Trucha arco iris.

GRUPOS	TOTAL	Muertos registrados (30/08-14/09)	Vivos al final (14/09/18)	% Supervivencia	% total de supervivencia por grupos
IP2	45	11	34	75.50%	74.40%
IP1	45	12	33	73.30%	
INM2	45	20	25	55.5%	54.4%
INM1	45	21	24	53.3%	
CONTROL INM	45	41	4	8.80%	8.80%
CONTROL IP	45	45	0	0%	0%

#### 4.4. Evaluación histopatológica

En los peces del grupo control que fueron retados con la cepa de *Aeromonas salmonicida* para evidenciar la patogenicidad de la cepa y su viabilidad, se produjeron lesiones características de la infección como congestión generalizada, hemorragias petequiales en bazo, hígado, degeneración hídrica y grasa hepática, fusión de lamelas y necrosis de epitelio branquial, severa necrosis y descamación del epitelio intestinal, lo cual confirma que la cepa empleada estaba activa y era patogénica, por lo que se usó como desafío en los peces vacunados después de los 28 días posterior a la inmunización con la vacuna polivalente (Figura 18). Al realizar la evaluación histopatológica de los tejidos de los peces en mención, se observó un incremento en el número de células linfoides, evidenciándose hiperplasia de linfocitos tanto en el bazo como del tejido linfohematopoyético del riñón en los peces vacunados. Así mismo se observó un incremento de los centros melanomacrófagos en el bazo y riñón anterior siendo mayor en este último, lo cual indica que ha habido una mayor estimulación del sistema inmune de los peces vacunados en respuesta al inoculo de la bacteria usada como desafío, debido a que ya existe una memoria inmunológica creada por el antígeno vacunal.

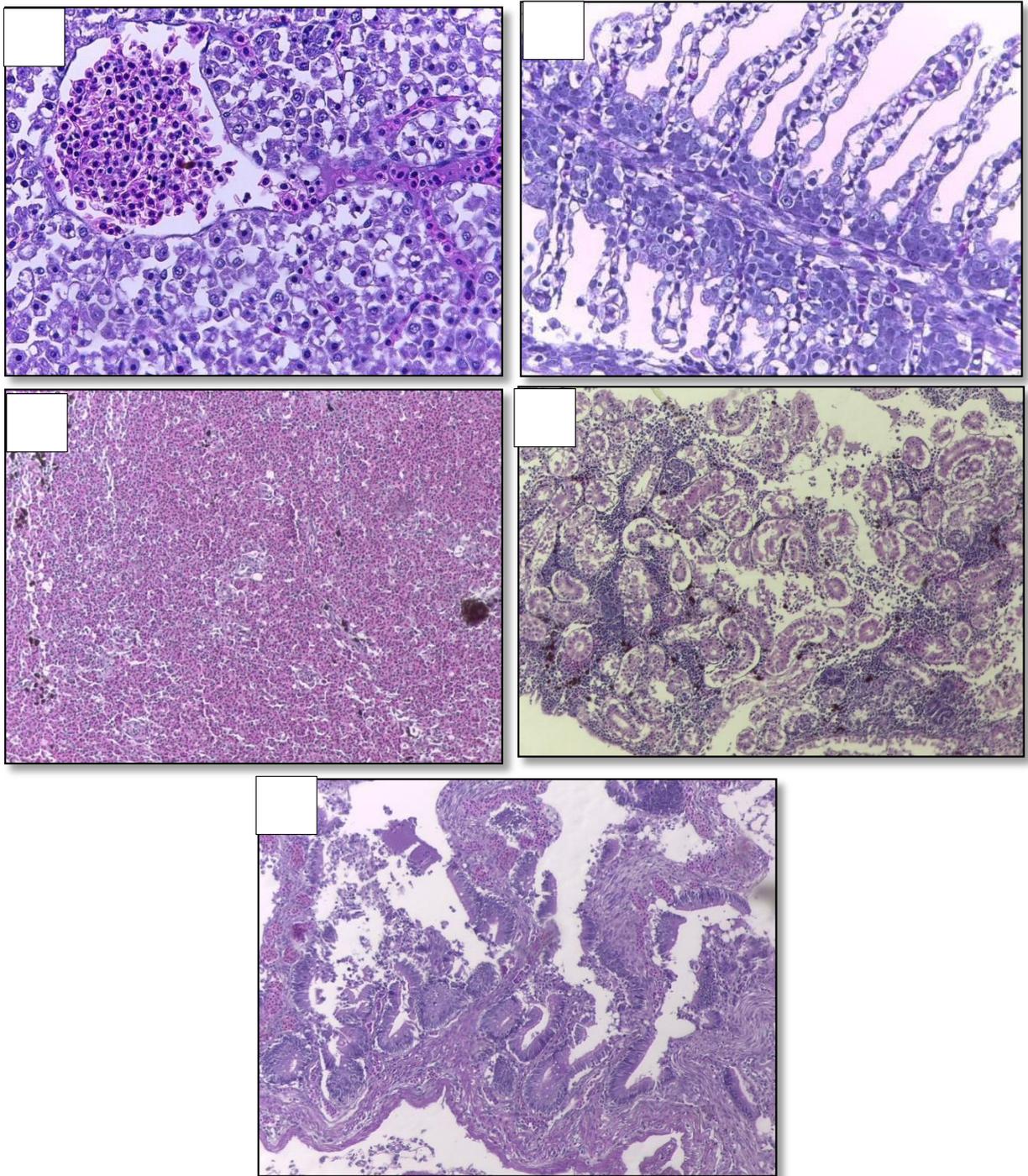


Figura 18. Lesiones características de *Aeromonas salmonicida* en peces de los grupos controles con falsa vacunación. A: Severa Degeneración hidrópica y grasa en hígado, moderada congestión. B: Moderada fusión de lamelas, edema, necrosis del epitelio branquial. C: Severa congestión generalizada en bazo. D: Necrosis en parénquima renal. E: Severa necrosis y descamación de epitelio intestinal.

#### 4.5. Análisis de los resultados

La supervivencia acumulada por grupo fue comparada usando el método de Kaplan Meier y prueba de Log-Rank. Entre los grupos vacunados y sus repeticiones respectivas no se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) por lo que se agruparon los datos de cada vía para realizar el análisis estadístico. Los grupos controles (falsa inmunización por inmersión y por inyección intraperitoneal con PBS) fueron comparados con las mismas pruebas, no presentaron diferencia estadística por lo que se trabajó como uno solo ( $p = 0.2070$ ). Figura 19

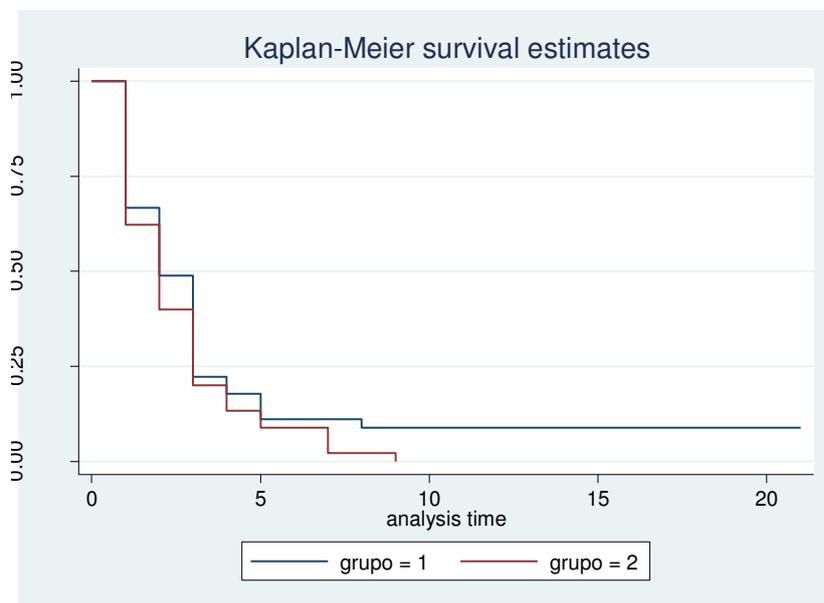


Figura 19. Comparación de supervivencia entre el grupo control INM y el grupo control IP.

La comparación de supervivencia entre el grupo que recibió vacunación vía inmersión (INM) y el grupo que recibió vacunación vía intraperitoneal (IP) se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.0197$ ). (Figura 20)

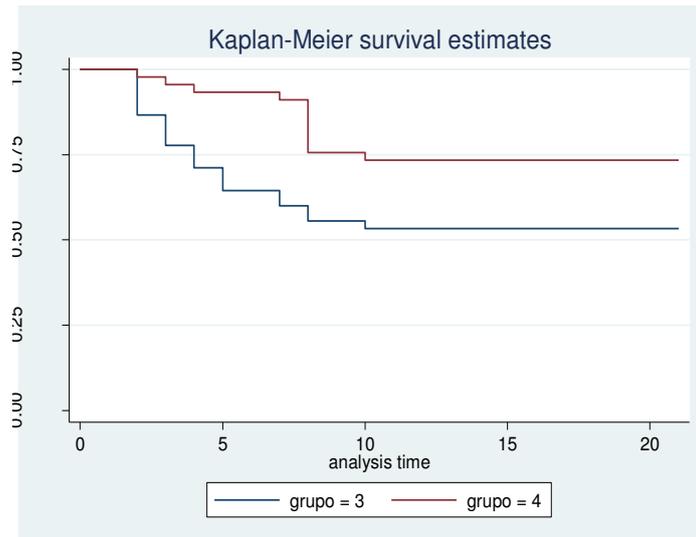


Figura 20 Comparación de supervivencia entre grupo vacunado vía INM (Grupo 3) y grupo vacunado vía IP (Grupo 4).

También se realizó un análisis entre los tres grupos (Control, vacunado vía inmersión y vacunado vía intraperitoneal) encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos ( $p = 0.0000$ ). Figura 21.

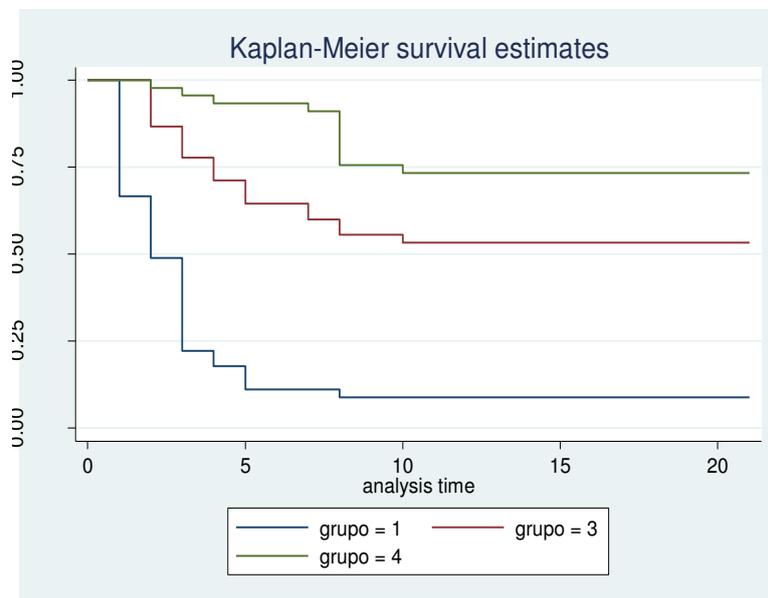


Figura 21. Comparación de supervivencia entre grupo control (Grupo 1), grupo vacunado vía INM (Grupo 3), grupo vacunado vía IP (Grupo 4).

## V. DISCUSIÓN

La vacuna polivalente mostró una buena protección frente al reto de una *Aeromona* con demostrada patogenicidad ya que contiene una gran cantidad de antígenos de exotoxinas, somáticos y otras proteínas extracelulares productos del metabolismo de las *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida* inactivadas y con un adyuvante metabolito de la vitamina A; también contiene Ag somáticos y extracelulares de *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophylum* que no afectaron su respuesta inmune. En *Paralichthys olivaceus* (lenguado japonés) se ha utilizado experimentalmente vacunas polivalentes de *E. tarda*, *V. anguillarum*, *S. iniae* y *V. harveyi* en donde se sugieren un mecanismo de protección basado en la inmunidad humoral inducido por vacunas de células completas inactivadas, y que existe un efecto inmunoestimulador mutuo y específico entre *E. tarda* y *V. anguillarum*, que permite que la vacuna divalente induzca una inmunidad protectora efectiva contra *E. tarda* y *V. anguillarum* (Sun *et al.*, 2011).

Existen estudios que indican una inhibición de la respuesta inmune específica cuando se usan vacunas polivalentes con aceite mineral que contienen antígenos de *A. salmonicida*, *Listonella anguillarum* y serotipos Th y Fd de *Flavobacterium psychrophilum* en truchas arco iris (Nikoskelainen *et al.*, 2007). Este mismo estudio mostró que la respuesta inmune inespecífica que incluye fagocitosis y estallido oxidativo en monolitos fueron eficientes en las primeras tres semanas, otorgándole un estímulo antibacteriano inespecífico a la vacuna. La presencia de *Y. ruckeri* y el inmunoestimulante presente en la vacuna polivalente podrían disminuir este efecto inhibitorio en nuestro caso.

Se ha demostrado que las proteínas secretadas de *A. hydrophila* contiene antígenos que estimulan la respuesta inmune y pueden ser candidatos a vacunas (Zhou *et al.*, 2010), y al incorporarse las proteínas extracelular de *A. hydrophila* y *A. salmonicida* a la vacuna polivalente también incrementa su efecto inmuno activante mejorando la protección durante el reto.

En la vacuna polivalente en estudio todos los antígenos somáticos fueron lisados por sonicación por lo que se unió al adyuvante metabolito de la vitamina A para mejorar su acción antigénica, debido

a que se ha determinado que las *A. hydrophila* lisadas demuestran que inducen a una protección cuando son preparadas junto al adyuvante completo de Freund's y que disminuye tremendamente cuando es colocada sin adyuvante (Lapatra *et al.*, 2010).

La vacuna usada es una vacuna inactivada, los antígenos administrados ingresan por vía extracelular según Munang *et al.* (2015) estimulando la inmunidad mediada por células con la producción de CD4<sup>+</sup> y respuestas inmunes humorales, mientras que las vacunas vivas de virus y ADN ingresan por vía intracelular estimulando respuestas de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, es probable que por este motivo ofrezca una mejor protección que las vacunas inactivadas, permitiendo una inmunidad protectora por un periodo de tiempo más largo, debido a que tienen la capacidad de replicarse y son más inmunogénicas a comparación de las vacunas inactivadas, pero no es tan frecuente su uso porque se corre el riesgo de que se revierta su virulencia.

La vacunación vía inmersión presentó un mayor porcentaje de mortalidad los primeros 5 días pos infección (44.4 %) en comparación con la vacunación vía intraperitoneal donde la mortalidad en los 5 primeros días fue baja (6.6%) demostrando una diferencia según la vía de inoculación, esto correlaciona con autores que determinan que la vacunación por inmersión tiene un mejor efecto estimulante de la respuesta inmune (Santos *et al.*, 2005); sin embargo otros estudios determinan que existe igual protección en truchas vacunadas intraperitonealmente con vacunas compuestas con adyuvante de aceite mineral y con inmersión pero observan una menor producción de anticuerpos específicos y que existirían otros mecanismos asociados a la protección (Villumsen y Raida, 2013).

En el estudio la vacuna polivalente colocada por inmersión dio una protección de 55.6% contra *A. salmonicida*, similar ocurre en tilapias donde la asociación entre *A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae* con *Pseudomonas fluorescens* en vacunas polivalentes inoculadas por inmersión incrementa su efecto protector comparado con vacunas monovalentes (Osman *et al.*, 2009). Los tipos de antígenos bacterianos que se usaron incluyen antígenos de *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilum* lo cual podría ser la causa de la diferencia de los resultados, si bien los antígenos de *Y. ruckeri* producen una buena protección contra yersiniosis vía inmersión (Chettri *et al.*, 2013) no se tienen los mismo

resultados con *Flavobacterium columnare* cuando se une a antígenos de *E. ictaluri* que dan una protección de 33.0 a 59.7% de sobrevivencia (Shoemaker *et al.*, 2006).

La vacuna polivalente produce una mayor protección por vía intraperitoneal (93.4% de sobrevivencia). Es debido a que por la vía intraperitoneal los antígenos de *Aeromonas* inducen una fuerte respuesta inmune sistémica debido a la rápida exposición de los antígenos a los macrófagos presentes en el bazo y riñón anterior por lo que su respuesta inmune humoral dependiente de los linfocitos Th2 es muy fuerte y origina la resistencia y sobrevivencia a infecciones por *Aeromonas* (Zhan *et al.*, 2011)

Estudios realizados por Haar *et al.* (2016), donde se usaron vacunas experimentales inyectadas vía IP, compuesta por proteínas recombinantes codificadas por el genoma de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* y un adyuvante (Adyuvante de Freund), registraron supervivencias entre 70 y 83%. Esta vacuna fue comparada con una vacuna comercial administrada también por vía IP la cual tuvo una supervivencia de 72%. Estos porcentajes de supervivencia son similares al alcanzado por la vacunación IP (74.4%) en este estudio, donde se usó cepas bacterianas inactivadas junto con un metabolito de la vitamina A como adyuvante.

La vacunación vía inmersión se aplicó en el agua diluida 1/10, dejándose a los alevines por 1 minuto en la solución. Tatner (1987) comparó los tiempos de inmersión en una vacuna diluida 1/10, reportando que no hay diferencia significativa en el tiempo en el que el pez es dejado en inmersión en la solución siempre que la concentración de la vacuna no sea limitante. Cuando se use vacunas más diluidas se debe incrementar el tiempo de inmersión. Para nuestro trabajo la dilución tenía altas concentraciones de antígenos por lo tanto no fue un factor limitante el tiempo de inmersión y se utilizó 1 minuto como tiempo adecuado. La captación del antígeno en una vacunación oral no está bien establecida pero estudios indican que además de las branquias que se considera el órgano principal, participan el intestino, la línea dorsal y la piel siendo esta la de mayor área por lo que el tamaño del pez influye en la captación de antígeno (Nakanishi y Ototake, 1997); por lo que en nuestro estudio al ser alevines de 9 gramos en promedio, han captado menos antígenos que los estudios donde la vía de inmersión no muestra diferencia con los de inyección por utilizar peces de mayor tamaño. En los estudios de Press *et al.* (1996) encontraron que el antígeno de la vacunación de inmersión contra *A.*

*salmonicida* no estaba tan ampliamente distribuido en los peces, como se ve después de la vacunación IP. Además, al trabajar con bacterinas de *A. salmonicida* radiomarcadas, Tatner (1987) ha demostrado que una gran fracción de la bacterina captada por los peces después de la inmunización en baño, podría ubicarse en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, se desconoce el destino de los antígenos después de la inmunización en baño, ya que Press *et al.* (1996) no pudieron detectar antígenos de *A. salmonicida* en el intestino posterior, el bazo o el hígado, 2 semanas después de la inmunización.

Los controles que representaban a las vías de inoculación (INM e IP), no presentaron diferencia significativa, debido a que el inóculo bacteriano fue realizado en ambas por vía IP, el único factor de diferencia en estos grupos fue el estrés causado para igualar el estrés de los grupos que fueron vacunados. Al tener mortalidades similares en ambos grupos controles observamos que la bacteria es realmente patógena, causando los signos clínicos y lesiones características de *Aeromonas salmonicida*.

En ambos grupos vacunados las mortalidades cesaron el día 10 pos infección obteniendo un porcentaje de supervivencia de 54.4 % en vacunados vía INM y de 74.4% en los vacunado vía IP. Estos datos confirman al igual que en otros estudios que la vacunación vía IP confiere una mayor protección que la vacunación vía INM (Villumsem *et al.*, 2013), esto puede deberse a que el antígeno es administrado al pez de manera más directa ingresando a la vía sanguínea y diseminándose a los órganos, lo cual estimula más rápido la inmunidad específica en el animal, mientras que en la vía inmersión el antígeno vacunal necesita ser captado en piel y branquias y después ser absorbido. Así también la inmunidad sistémica inducida por la vacunación vía IP actúa como una barrera que bloquea la propagación de la infección a los órganos dando una mayor protección al animal.

En un experimento realizado por Marana *et al.* (2018) se usó una vacuna polivalente compuesta por 5 cepas bacterianas inactivadas en formalina con adición de un adyuvante de aceite mineral administrada vía IP, se realizó el desafío con *Aeromonas salmonicida*, mediante punción de la aleta caudal, registrándose una mortalidad de 60.6% en el grupo control que solo fue inyectado con solución salina, en el grupo vacunado la mortalidad acumulada fue de 3.2% y en el grupo donde se usó vacuna comercial fue de 3.3 %. Los porcentajes de mortalidad obtenidos en el presente estudio con la vacuna administrada vía IP fueron mayores (25.5%), esto podría deberse a que el reto bacteriano se hizo vía IP,

ingresando directamente el patógeno al organismo del pez, a diferencia de una infección a través de heridas en la piel donde se encuentran los mecanismos de defensa del moco y el patógeno necesita superar esta barrera para ingresar al organismo y diseminarse a los demás órganos (Cipriano *et al.*, 1994).

En cuanto a los signos clínicos, al día siguiente del desafío algunos alevines de los grupos controles y de los vacunados vía inmersión se observaron aletargados y con melanosis. Las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en alevines de truchas arcoíris infectados con la bacteria *A. salmonicida*, son lesiones características de este patógeno de acuerdo a lo encontrado por estudios previos realizados por Zepeda *et al.* (2015) donde infectó truchas arcoíris con diferentes especies de *Aeromonas* spp. incluyendo *Aeromonas salmonicida*. La evaluación histológica de los peces vacunados mostraron un incremento de centros melanomacrófagos en el bazo y riñón anterior así como un incremento de células linfoides concordando con la protección a la infección en donde la respuesta humoral con anticuerpo es esencial (Zhan *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2003) sugirieron que la causa de la citotoxicidad de las especies de *Aeromonas* y sus productos extracelulares pueden ser multifactoriales y que los productos (hemolisinas  $\alpha$  y  $\beta$ , aerolisina, ACT, ALT y enterotoxinas AST, proteasas y RNasas) pueden actuar solos o en concierto para su neutralización con anticuerpos específicos, necesario para no causar daño. Se debe tener en cuenta también que la composición de los productos extracelulares de diferentes cepas de *A. salmonicida* y a sus subpasajes in vitro podría modificar su virulencia, así la *A. hydrophila* el medio de cultivo y las condiciones de temperatura afectan su virulencia (Khalil y Mansour, 1997).

Villumsem *et al.* (2013) menciona que el uso de vacunas administradas con un adyuvante, como aceite mineral, proporcionan altos niveles de protección durante períodos de tiempo más largos, secuestra el antígeno, y los presenta al sistema inmune liberándolo lentamente. También producen una leve inflamación estimulando la aparición de células presentadoras. En este estudio se usó un metabolito de la vitamina A previamente probado en el laboratorio, donde se comprobó que no resultó tóxico para los peces. Un estudio realizado por Cueva (2015) donde usó este mismo adyuvante pero con antígenos de *Yersinia ruckeri* mostró resultados similares a nuestro estudio.

## VI. CONCLUSIONES

La preparación de una vacuna polivalente contra las principales enfermedades en la crianza de Truchas arcoíris (*Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilum*) es una gran alternativa para disminuir las pérdidas económicas a causa del gran porcentaje de mortalidades causado por este patógeno así como también evita problemas de resistencia antimicrobiana a causa del mal uso de antibióticos.

El uso de la vacuna en alevines de Truchas arcoíris fue elaborado con antígenos somáticos, exotoxinas y proteínas extracelulares de las bacterias *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* y *Flavobacterium psychrophilum*, además se adicionó un adyuvante (metabolito de la vitamina A). La vacuna no causó mortalidad durante los 28 días de evaluación pos vacunación.

La evaluación de la sobrevivencia acumulada por desafío mediante el uso del software STATA usando el método de Kaplan meier y análisis de supervivencia de Log Rank evidencia que hay diferencia significativa entre el grupo control y los grupos vacunados por diferentes vías (IP e INM), así como entre ambos grupos vacunados. El mayor porcentaje de sobrevivencia se encontró en el grupo vacunado vía IP.

La frecuencia de lesiones histopatológicas fueron mayores en el grupo control, siendo menor en los grupos vacunados vía INM y vía IP.

La vacuna vía INM y vía IP estimulan el sistema inmune innato y específico, ofreciendo protección en alevines de Truchas arcoíris, siendo mayor en la vacunación vía IP.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Arregui Maraver L. 2013. El cultivo de la Trucha arcoíris. Fundación observatorio español de acuicultura. Madrid. 106 p.
2. Artículo en revista electrónica Gonzáles HJ, Perez QJ. 2005. Clasificación de las vacunas Asociación española de vacunología [Internet], [18 agosto 2006]. Disponible en: <http://www.vacunas.org/clasificacion-de-las-vacunas/>
3. Artículo en revista electrónica PLOS ONE. 2015. Phenotypic and Genetic Diversity of Aeromonas Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia [Internet] [28 diciembre 2015]. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145933>
4. Artículo en Revista electrónica. Smith SP. 1995. Vacunación en acuicultura. Tecno Vet 3 [Internet] [Diciembre 1995]. Disponible en: [http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet\\_articulo/0,1409,SCID%253D9712%2526ISID%253D429,00.html](http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9712%2526ISID%253D429,00.html).
5. Balcazar JL, De Blas I, Vendrell D, Muzquiz JL, Ruiz Z. 2009. Effect of Lactococcus lactis CLFP 100 and Leuco nostoc mesenteroides CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). J Mol Microbiol Biotechnol 17(3): 153–157.
6. Balcazar JL, Vnedrell D, De Blas I, Ruiz ZI, Muzquiz JL, Girones O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture 278: 188–191
7. Beaz HR, Figueras MJ, Romalde JL. 2012. Expresión génica en peces a causa de infecciones causadas por *Aeromonas* spp. Revista Aquatic 37: 113-122.
8. Beaz HR., Figueras JM. 2013. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. J fish dis 36(4):371–388.
9. Brudeseth EB, Wiulstrod R, Fredriksen BN, Lindmo K, Lokling KE, Bordevik M, Steine, Klevan A, Gravningen K. 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. Fish & Shellfish immunology. 1-10.

10. Castro EG, Aguilera GA, Giono CS, Hernández RC, Rodríguez CM, Soler FM, Aparicio OG, Figueras FM. 2002. El género *Aeromonas* ¿Un patógeno importante en México? *Enfermedades infecciosas y microbiología* 22(4): 206-216.
11. CCAC. 2010. CCAC guidelines on: Euthanasia of animals used in science. ISBN: 978-0-919087-52-1. OTTAWA, Canadá. 32p
12. Chettri JK, Deshmukh S, Holten-Andersen L, Jafaar RM, Dalsgaard I, Buchmann K. 2013. Comparative evaluation of administration methods for a vaccine protecting rainbow trout against *Yersinia ruckeri* O1 biotype 2 infections. *Vet Immunol Immunopathol* 154 (1–2): 42–7.
13. Cipriano RC, Ford LA, Jones TE. 1994. Relationship between resistance of salmonids to furunculosis and recovery of *Aeromonas salmonicida* from external mucus. *J Wildl Dis* 30: 577–80.
14. Coscelli GA, Bermúdez R, Losada A, Faílde L, Santos Y, Quiroga M. 2014. Acute *Aeromonas salmonicida* infection in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Histopathological and immunohistochemical studies. *Aquaculture* 430: 79-85.
15. Dallaire DS, Tanaka KH, Trudel MV, Lefaille A, Charette SJ. 2014. Review: Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Vet microbiology* 169(1-2): 1-7.
16. Ferguson HW. 2006. *Systemic Pathology of Fish*. 2ª ed. Scotian Press.
17. FONDEPES. 2014. *Manual de crianza de truchas en ambientes convencionales*. Lima. 88 p.
18. Galanina E, Lomakina V. 2012. Studies of Prevalence Rate of Furunculosis Caused by Infection by *Aeromonas salmonicida* in Salmonids of the Southern Part of Sakhalin Island. *Biology bulletin* 39 (5): 409-415 pp.
19. Garrity GM., Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ª ed. New York: Springer. 1106 p.
20. Godoy. 2010. Inmunología de los peces óseos. *Rev. mex. de cienc. pecuarias* 1 (1).
21. Grajales HS. 2018. Reporte de caso de *Aeromonas salmonicida* en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) en caldas, colombia. *Bol cient mus hist nat.* 22 (1): 76-85.

22. Gudding R, Van MW. 2013. A history of fish vaccination Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* (3): 1-6.
23. Gudding R., Muiswinkel VW. 2013. A history of fish vaccination Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol* 5(6):1-6.
24. Igbinosa IH, Igumbor EU, Aghdasi F, Tom M, Okoh A. 2012. Emerging Aeromonas Species Infections and Their Significance in Public Health. *The Scientific World Journal*. DOI: 10.1100/2012/625023. 13p.
25. Informe técnico [PROMPERÚ]. Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo. 2017. Desarrollo del comercio exterior pesquero y acuícola en el Perú. Lima: PROMPERÚ. Serie de Informes Técnicos. 85 p.
26. Jung SV, Jung A, Ryll M, Bauer J, Teitge F, Steinhagen D. 2018. Diagnostic methods for identifying different Aeromonas species and examining their pathogenicity factors, their correlation to cytotoxicity and adherence to fish mucus. *J fish dis* 42(2): 189-219.
27. Khalil AH, Mansour EH. 1997. Toxicity of crude extracellular products of Aeromonas hydrophila in tilapia, Tilapia nilótica. *Letters in Applied Microbiology* 25: 269-272.
28. Lapatra SE, Plant KP, Alcorn S, Ostland V, Winton J. 2010. An experimental vaccine against Aeromonas hydrophila can induce protection in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *J Fish Dis*. 33(2):143-51.
29. Maíz PA, Valero LL, Briceño PD. 2010. Elementos prácticos para la cría de truchas en Venezuela. *Mundo Pecuário* VI (2): 157-168.
30. Marana H, Sepúlveda D, Chen D, Al-Jubury A, Jaafar RM, Kania PW, Henriksen NH, Krossdy B, Dalsgaard I, Lorenzen N, Buchmann K. A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture. *Fish and shellfish immunology*. DOI: 10.1016/j.fsi.2019.03.001
31. Martínez MA, Yañez MA, Catalán V, Apraiz D, Figueras M. 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus Aeromonas based on gyrB gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 875–883.
32. Menanteau LS, Kumar G, Saleh M, El – Matbouli M. 2016. *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Dis. Aquat Org* (120): 49-68.

33. Menanteau LS, Kumar G, Saleh M, Matbouli M. 2016. *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. *Diseases of aquatic organisms* (120): 49–68.
34. Ministerio de la Producción [PRODUCE]. 2018. *Acuicultura de la Trucha arcoíris: Importación de ovas embrionadas y su importación a nivel nacional*. 35p.
35. Miranda A. 2017. *Pesca y acuicultura para el consumo humano en el Perú: Presente y futuro*. [Internet][Octubre del 2017]. Disponible en: <http://www2.sni.org.pe/downloads/simposiopesca2017.pdf>
36. Munang HM, Evensen O. 2015. A Review of Intra- and Extracellular Antigen Delivery Systems for Virus Vaccines of Finfish. *Journal of immunology research*. 1-19.
37. Munang HM, Mutoloki S, Evensen O. 2015. A Review of the Immunological Mechanisms Following Mucosal Vaccination of Finfish. *Front Immunol* 6:427.
38. Munang HM, Mutoloki S, Evensen O. 2015. An overview of challenges limiting the design of protective mucosal vaccines for finfish. *Front Immunol*. 6:542
39. Nakanishi T, Ototake M. 1997. Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. *Dev Biol Stand* 90:59-68.
40. Nikoskelainen S, Verho S, Jarvinen S, Madetoja J, Wiklund T, Liliua EM. 2007. Multiple whole bacterial antigens in polyvalent vaccine may result in inhibition of specific responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 22: 206-217.
41. Noga EJ. 2010. *Fish diseases Diagnosis and treatment*. 2º ed. USA: Wiley Blackwell. 495 p.
42. Olabuenaga SE. 2000. Sistema inmune en peces. *Revista Scielo* 64 (2).
43. Ortega, C., Fernández, A.B., de Blas, I., Muzquiz, J.L., Crespo, L. y de La Rosa, A. 1999. Estimulación de la Inmunidad Innata en Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) infectadas con *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida*. *Revista Aquatic*. *Revista Aquatic* 6.
44. Osman KM, Mohamed LA, Abdel RE, Soliman WS. 2009. Trials for Vaccination of Tilapia Fish Against *Aeromonas* and *Pseudomonas* Infections Using Monovalent, Bivalent and Polyvalent Vaccines. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1 (4): 297-304.
45. Penagos G, Barato P, Iregui C. 2008. Sistema inmune y vacunación de peces. *Acta biol. Colomb.* 14 (1): 3-24.

46. Plant K, La Patra S. 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental and Comparative Immunology* 35: 1256–126.
47. Press CM, Evensen O, Reitan LJ, Landsverk T. 1996. Retención de los componentes de la vacuna de la furunculosis en el salmón del Atlántico, *Salmo salar* L., siguiendo diferentes vías de administración de la vacuna. *Journal of fish diseases*. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1996.tb00128.x>
48. Resumen de conferencia. Villumsen KR, Raida MK. 2013. Different immunization routes induce protection against *Aeromonas salmonicida* through different immune mechanisms in rainbow trout. En: *International Conference of Fish and Shellfish Immunology*. Vigo, Spain.
49. Resumen de Congreso. Muzquiz MJ. 2007. Estado Actual de la Acuicultura Continental en España. En: *XI Congreso Nacional de acuicultura*. Zaragoza.
50. Resumen de Jornada. Coronado MJ. 2017. Componentes y tipos de vacunas. II Jornada de actualización de vacunas. España: Universidad de Huelva.
51. Rodgers CJ. 1990. Immersion vaccination for control of fish furunculosis. *Dis Aqua org* (8): 69-72.
52. Ross LG, Ross B. 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3ª ed. USA: Blackwell. 213 p.
53. Sanchez VA, Rodríguez LI, Wu GX. 2017. Revisión de la caracterización de aeromona spp. y su importancia clínica. *Bolivian Journal of chemistry* 34 (5): 132-137.
54. Santos Y, García - Márquez S, Pereira PG, Pazos F, Riaza A, Silva R. 2005. Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): Evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J Fish Dis* 28(3):165–72.
55. Schmachtenberg O. 2007. ¿Centinelas epiteliales o parásitos protozoarios? *Revista Chilena de Historia Natural*. 80: 55-62
56. Seethalakshmi I, Subashkumar R, Saminathan P. 2008. Distribution of Putative Virulence Genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida* Isolated from Marketed Fish Samples. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 3 (2): 145-151.

57. Shoemaker CA, Klesius PH, Evans JJ. 2007. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs with monovalent *Flavobacterium columnare* vaccine and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine 25(6): 1126 – 31.
58. Sitio Web Portal América economía. Sepa cómo se ha desarrollado la industria de la acuicultura en el Perú. Portal: América economía. [Internet], [5 diciembre 2016]. Disponible en: <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/sepa-como-se-ha-desarrollado-la-industria-de-la-acuicultura-en-el-peru>
59. Suarez QW, Herrera AF. 2012. Determinación de factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* spp., aisladas a partir de pescado. Revista MVZ Córdoba 17(1):2846-2851.
60. Sun Y, Liu CS, Sun L. 2011. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*, Fish & Shellfish Immunology 31(4):595-599.
61. Tafalla C, Leal E., Yamaguchi T, Fischer U. 2016. T cell immunity in the teleost digestive tract. Dev Comp Immunol 64: 167-177.
62. Tatner MF, Horne MT. 1985. The effects of vaccine dilution, length of immersion time, and booster vaccinations on the protection levels induced by direct immersion vaccination of brown trout, *Salmo trutta*, with *Yersinia ruckeri* (ERM) vaccine. Aquaculture, 46: 11-18.
63. Tatner MF. 1987. The quantitative relationship between vaccine dilution, length of immersion time and antigen uptake, using a radiolabelled *Aeromonas salmonicida* bath in direct immersion experiments with rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquaculture 62 (3-4): 173-185.
64. Tesis Gonzáles KE. 2002. Descripción de la furunculosis producida por *Aeromonas salmonicida* subespecie *achromogenes* y subespecie *salmonicida* en salmón del atlántico (*Salmo salar*). Tesis de Médico Veterinario. Valdivia: Universidad Austral de Chile. 44p.
65. Tesis Leal CE. 2017. Caracterización de la respuesta inmunitaria en mucosas y su modulación a través de la dieta en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 193 p.

66. Tesis Martínez SA. 2012. Modulación de la respuesta inmune en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) frente a distintas estrategias vacunales antivirales. Tesis de Doctorado en ciencias. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid. 162 p.
67. Tesis Miñana G. 2003. Diversitat fenotípica i genotípica del gènere *Aeromonas*. Tesis de Biólogo. Barcelona: Universidad de Barcelona. 235 p.
68. Tizard I. 2019. Inmunología veterinaria. 10ª ed. Barcelona: Elsevier.
69. Tort L, Balash J, Mackensie S. 2003. Fish immune system; A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*. Vol. 22 (3): 277-286.
70. Vega VF, Guerrero GS, Mejía AA, Quevedo MR, Chong CO, Badillo ZD. 2017. Manual de prácticas de los laboratorios de acuicultura experimental y calidad de agua. 1ª ed. Jalisco. 203 p
71. Villumsen KR, Raida MK. 2013. Long-lasting protection induced by bath vaccination against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1649-1653.
72. Wang G, Clark C, Liu C, Pucknell C, Munro C, Kruk T, Caldeira R., Woodward D, Rodgers F. 2003. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1048-1054.
73. Wiklund T, Dalsgaard I. 1998. Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species. *Dis Aquat org*. Vol 32:49-69.
74. Zepeda VA, Vega SV, Salgado MC, Sortiano VE. 2015. Histopathological findings in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) naturally infected with 3 different *Aeromonas* species. *Canadian journal of veterinary research*. 79:250–254.
75. Zepeda VA. 2015. *Aeromonas* spp.: La infección en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y su aislamiento en México. *Revista Aquatic* 42: 01-16.
76. Zhang Z, Niu C, Storset A, Børgwald J, Dalmo RA. 2011. Comparison of *Aeromonas salmonicida* resistant and susceptible salmon families: a high immune response is beneficial for the survival against *Aeromonas salmonicida* challenge. *Fish Shellfish Immunol*. (2011) 31:1–9.

77. Zhou L, Wang X, Liu Q, Wang Q, Zhao Y, Zhang Y. 2010. A novel multivalent vaccine based on secretory antigen-delivery induces protective immunity against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biotechnology* 146: 25–30.

## VIII. ANEXOS

### ANEXO 1: Protocolo para el examen de necropsia (Según Noga, 2010)

#### Materiales:

- Tijeras y pinzas estériles.
- Hojas de bisturí N° 10)
- Mechero bunsen
- Guantes de látex o nitrilo desechables.

#### Procedimiento:

- Previa desinfección externa del pez coloque el pez en posición de reclinación lateral en una bandeja de plástico cerca al flameado del mechero bunsen, luego proceda a cortar la aleta lateral para permitir una mejor disección.
- Usar un bisturí para hacer una incisión en el punto de intersección entre la línea media ventral y la perpendicular a la misma altura de la aleta cortada.
- Seguidamente cortar con una tijera estéril de manera perpendicular desde el punto de incisión hasta la parte dorsal hasta encontrar cierta resistencia (bordeando el opérculo).
- Posteriormente hacer una incisión longitudinal a lo largo de la línea media ventral hasta el ano, pero sin llegar a él y sin perforar el intestino.
- Levantar la zona cortada con ayuda de unas pinzas, cortar la porción de pared corporal separándola de la masa visceral.
- Identificar y examinar los órganos in situ (intestinos, hígado, bazo, gónadas, el corazón y vejiga natatoria)
- Registrar las posibles anomalías macroscópicas. Refleje la vejiga natatoria ventralmente y examine el riñón anterior y posterior.
- En cuanto a la masa encefálica se corta con un par de tijeras afiladas o cuchillo en sentido anterior al cráneo dorsal exponiendo el cerebro.
-

## ANEXO 2: Fórmula para el cálculo de la cantidad de alimento

Fórmula: (Alimento g/día)

$$x = \frac{\text{Temperatura} * n^{\circ} \text{ de peces} * \text{peso promedio}}{100}$$

## ANEXO 3: Parámetros de agua adecuados para crianza de truchas

Parámetros del agua	Rango adecuado (FONDEPES, 2014)
Temperatura	11 - 16 °C
pH	6.5 - 8
Oxígeno disuelto	6.5 - 9 ppm
Amoniaco Nitrogeno	< 0.02 mg/dl
Alcalinidad	80 - 180 ppm
Dureza	60-300 ppm

**ANEXO 4: Resultados obtenidos con el software STATA para comparar la supervivencia según el análisis de Kaplan meier y log Rank.**

**Grupo control INM y control IP**

Time	Beg. Total	Fail	Net Lost	Survivor Function	Std. Error	[95% Conf. Int.]	
grupo=1							
1	45	15	0	0.6667	0.0703	0.5092	0.7838
2	30	8	0	0.4889	0.0745	0.3374	0.6241
3	22	12	0	0.2222	0.0620	0.1150	0.3514
4	10	2	0	0.1778	0.0570	0.0833	0.3010
5	8	3	0	0.1111	0.0468	0.0407	0.2213
8	5	1	0	0.0889	0.0424	0.0284	0.1931
21	4	0	4	0.0889	0.0424	0.0284	0.1931
grupo=2							
1	45	17	0	0.6222	0.0723	0.4646	0.7455
2	28	10	0	0.4000	0.0730	0.2582	0.5379
3	18	9	0	0.2000	0.0596	0.0989	0.3265
4	9	3	0	0.1333	0.0507	0.0541	0.2485
5	6	2	0	0.0889	0.0424	0.0284	0.1931
7	4	3	0	0.0222	0.0220	0.0018	0.1015
9	1	1	0	0.0000	.	.	.

**Log-rank test for equality of survivor functions**

grupo	Events observed	Events expected
1	41	45.65
2	45	40.35
Total	86	86.00

chi2(1) = 1.59  
Pr>chi2 = 0.2070

**Grupo vacunado vía INM (Grupo 2) y el grupo vacunado vía intraperitoneal IP (Grupo 4)**

Time	Beg. Total	Fail	Net Lost	Survivor Function	Std. Error	[95% Conf. Int.]	
grupo=3							
2	45	6	0	0.8667	0.0507	0.7271	0.9378
3	39	4	0	0.7778	0.0620	0.6264	0.8737
4	35	3	0	0.7111	0.0676	0.5551	0.8208
5	32	3	0	0.6444	0.0714	0.4867	0.7648
7	29	2	0	0.6000	0.0730	0.4427	0.7260
8	27	2	0	0.5556	0.0741	0.3998	0.6860
10	25	1	0	0.5333	0.0744	0.3787	0.6657
21	24	0	24	0.5333	0.0744	0.3787	0.6657
grupo=4							
2	45	1	0	0.9778	0.0220	0.8525	0.9968
3	44	1	0	0.9556	0.0307	0.8338	0.9887
4	43	1	0	0.9333	0.0372	0.8074	0.9780
7	42	1	0	0.9111	0.0424	0.7803	0.9657
8	41	7	0	0.7556	0.0641	0.6022	0.8565
10	34	1	0	0.7333	0.0659	0.5785	0.8388
21	33	0	33	0.7333	0.0659	0.5785	0.8388

grupo	Events observed	Events expected
3	21	14.59
4	12	18.41
Total	33	33.00

chi2(1) = 5.43  
Pr>chi2 = 0.0197

**Grupo Control, grupo vacunado vía INM (Grupo 2) y el grupo vacunado vía IP (Grupo 4)**

Time	Beg. Total	Fail	Net Lost	Survivor Function	Std. Error	[95% Conf. Int.]	
grupo=1							
1	45	15	0	0.6667	0.0703	0.5092	0.7838
2	30	8	0	0.4889	0.0745	0.3374	0.6241
3	22	12	0	0.2222	0.0620	0.1150	0.3514
4	10	2	0	0.1778	0.0570	0.0833	0.3010
5	8	3	0	0.1111	0.0468	0.0407	0.2213
8	5	1	0	0.0889	0.0424	0.0284	0.1931
21	4	0	4	0.0889	0.0424	0.0284	0.1931
grupo=3							
2	45	6	0	0.8667	0.0507	0.7271	0.9378
3	39	4	0	0.7778	0.0620	0.6264	0.8737
4	35	3	0	0.7111	0.0676	0.5551	0.8208
5	32	3	0	0.6444	0.0714	0.4867	0.7648
7	29	2	0	0.6000	0.0730	0.4427	0.7260
8	27	2	0	0.5556	0.0741	0.3998	0.6860
10	25	1	0	0.5333	0.0744	0.3787	0.6657
21	24	0	24	0.5333	0.0744	0.3787	0.6657
grupo=4							
2	45	1	0	0.9778	0.0220	0.8525	0.9968
3	44	1	0	0.9556	0.0307	0.8338	0.9887
4	43	1	0	0.9333	0.0372	0.8074	0.9780
7	42	1	0	0.9111	0.0424	0.7803	0.9657
8	41	7	0	0.7556	0.0641	0.6022	0.8565
10	34	1	0	0.7333	0.0659	0.5785	0.8388
21	33	0	33	0.7333	0.0659	0.5785	0.8388

grupo	Events observed	Events expected
1	41	14.59
3	21	27.30
4	12	32.11
Total	74	74.00

chi2(2) = 74.45  
Pr>chi2 = 0.0000