

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN

BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Identificación molecular, caracterización proteómica y evaluación experimental de la patogenicidad de una cepa de *Lactococcus garvieae* aislada de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* en un evento natural de mortalidad en la Amazonía peruana

TESIS

para optar el grado académico de Maestro en ciencias con mención en biotecnología molecular

Autor: Br. Adrian Edú Zatán Valdiviezo

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Identificación molecular, caracterización proteómica y evaluación experimental de la patogenicidad de una cepa de *Lactococcus garvieae* aislada de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* en un evento natural de mortalidad en la Amazonía peruana

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Saldarriaga Yacila, David Edilberto (Presidente)

Dr. Alvarado Bernuy, Adán (Secretario)

PhD. Diringer, Benoit Mathieu (Vocal)

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Identificación molecular, caracterización proteómica y evaluación experimental de la patogenicidad de una cepa de *Lactococcus garvieae* aislada de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* en un evento natural de mortalidad en la Amazonía peruana

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma:

Br. Zatán Valdiviezo, Adrian Edú (Autor)

Ph. D. Motte Darricau, Emmerik (Asesor)

Tumbes, 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes - Perú

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintiséis días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 12:00 horas, en EL AULA N° 1 DE LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNTUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 038-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila - Presidente; Dr. Adán Alvarado Bernuy - Secretario; Ph.D. Benoit Mathieu Diringér – Vocal y con Resolución Directoral N° 034-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: **Identificación molecular, caracterización proteómica y evaluación experimental de la patogenicidad de una cepa de *Lactococcus garvieae* aislada de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* en un evento natural de mortalidad en la Amazonía peruana**, presentada por el estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Adrian Edú Zatán Valdiviezo, asesorado por el Ph.D. Emmerik Motte Darricau.

Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 12:55 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

Tumbes, 26 de febrero de 2020

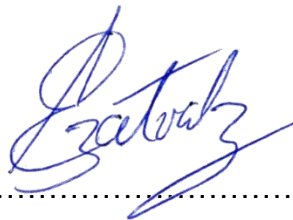
Dr. David Edilberto Saldarriaga Yacila
Presidente

Dr. Adán Alvarado Bernuy
Secretario

Ph.D. Benoit Mathieu Diringér
Vocal

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, **ADRIAN EDÚ ZATÁN VALDIVIEZO**, declaro que los resultados reportados en la tesis denominada **Identificación molecular, caracterización proteómica y evaluación experimental de la patogenicidad de una cepa de *Lactococcus garvieae* aislada de tilapia nilótica *Oreochromis niloticus* en un evento natural de mortalidad en la Amazonía peruana**, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro (hasta donde tengo conocimiento) no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, excepto al que se reconoce como tal a través de citas bibliográficas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, también, que en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita, la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y jurado calificador.



.....
Br. Adrian Edú Zatán Valdiviezo

DEDICATORIA

A mis padres.

Por el apoyo incondicional, la confianza depositada en mí y el amor sincero.

A pesar de la distancia están en mis pensamientos y corazón.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Casi al final de esta aventura, es imposible olvidarme de agradecer a quiénes de alguna manera influyeron en la culminación de esta investigación:

Agradezco a Dios, gracias por la vida, por los buenos y malos momentos, por permitirme estar cada día más cerca de cumplir mis metas.

Gracias a Eric Mialhe, por darme la oportunidad de participar en esta maestría.

Gracias a Emmerik Motte, mi asesor de tesis, por las dudas resueltas y recomendaciones dadas.

A Manuel Feria, Arnaldo Castañeda, Odalis Toledo y Jorge Aguilar, gracias por las enseñanzas, por dedicarme su tiempo, por la ayuda en momentos difíciles, por el apoyo para sacar adelante esta tesis y la paciencia en mi aprendizaje. Este camino no fue fácil, pero gracias a ustedes ha sido llevadero.

Gracias al personal técnico de INCABIOTEC SAC por la ayuda en el laboratorio.

RESUMEN

Un evento de mortalidad natural de tilapia nilótica en la laguna El Sauce, región San Martín, Perú, fue observado en el mes de noviembre del 2018. Una cepa bacteriana (L3-1 PB) fue aislada a partir de las lesiones en la piel de dos ejemplares de tilapia. Basados en la secuenciación del gen 16S ADNr y análisis filogenético, el aislado fue identificado como *Lactococcus garvieae*, y confirmado mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR utilizando cebadores específicos. Para demostrar la patogenicidad de la cepa, se realizó una infección experimental mediante inyección intraperitoneal con la bacteria (4.8×10^6 UFC/ml), causando una mortalidad acumulada del 50 %. Por otro lado, mediante la técnica de espectrometría de doble masa MALDI TOF-TOF se identificó secuencias de aminoácidos correspondientes a diversos factores de virulencia. Estos resultados sugieren que *L. garvieae* fue uno de los agentes causales de mortandad en la laguna El Sauce. Este es el primer reporte de *L. garvieae* en el Perú, donde el cultivo de tilapia continua en expansión, por lo tanto, es de suma importancia monitorear y proteger a esta especie de diversos agentes infecciosos.

Palabras claves: *Lactococcus garvieae*, tilapia, 16S ADNr, MALDI TOF-TOF

ABSTRACT

A natural mortality event of Nile tilapia in El Sauce lagoon, San Martin region, Peru, was observed in November 2018. A bacterial strain (L3-1 PB) was isolated from the skin lesions of two tilapia specimens. Based on the sequencing of the 16S rDNA gene and phylogenetic analysis, the isolate was identified as *Lactococcus garvieae*, and confirmed by PCR polymerase chain reaction using specific primers. To demonstrate the pathogenicity of the strain, an experimental infection was performed by intraperitoneal injection with the bacteria (4.8×10^6 UFC/ml) causing a cumulative mortality of 50%. On the other hand, by means of the MALDI TOF-TOF double mass spectrometry technique, amino acid sequences corresponding to various virulence factors were identified. These results suggest that *L. garvieae* was one of the causal agents of mortality in El Sauce lagoon. This is the first report of *L. garvieae* in Peru, where tilapia farming continues to expand, therefore, it is very important to monitor and protect this species from various infectious agents.

Keywords: *Lactococcus garvieae*, tilapia, 16S rDNA, MALDI TOF-TOF