



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
FILOGENÉTICA DEL VIRUS DE LA  
TILAPIA DEL LAGO (TILV) Y  
ENCEFALOPATÍA Y RETINOPATÍA  
VIRAL EN TILAPIAS SIN SIGNOS  
CLÍNICOS EN 4 DISTRITOS DEL  
DEPARTAMENTO DE SAN MARTÍN.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN  
SANIDAD ACUÍCOLA

**MVZ. LISETH LUCERO HUAMANCHA  
PULIDO**

LIMA – PERÚ

2019

**ASESOR DE TESIS**

Armando Hung Chaparro

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por darme fortaleza y cuidar mis pasos, y a mi familia por su apoyo incondicional, amor y paciencia que me han brindado durante todo este camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización del presente estudio para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia subvencionado por Cienciactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015-FONDECYT-DE-PROMOCION2).

Agradecimiento especial al Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp) en Bangkok, Thailand, por la prestación de sus instalaciones, materiales y equipos para la realización del presente estudio. A la Dra. Saengchan Senapin, Dr. Ha Thanh Dong y todo su equipo de trabajo, por brindarme su apoyo y conocimientos. Muchas gracias por todo.

Agradezco a la Dra. Marcela Mora y el Dr. Armando Hung por su apoyo para la realización del presente estudio.

## INDICE

LISTA DE CUADROS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
III.	MARCO TEÓRICO.....	5
	1. Virus de la tilapia del lago (TiLV).....	6
	1.1. Distribución.....	7
	1.2. Mortalidad y morbilidad.....	8
	1.3. Signos clínicos e histopatología.....	8
	1.4. Vía de transmisión.....	9
	1.5. Técnicas de diagnóstico.....	9
	1.6. Control y prevención.....	10
	1.7. Situación en el Perú.....	11
	2. Encefalopatía y retinopatía viral o Necrosis nerviosa viral (VNN)....	12
	2.1. Distribución.....	13
	2.2. Transmisión.....	13

2.3. Signos clínicos e histopatología.....	14
2.4. Prevalencia.....	14
2.5. Control y prevención.....	15
2.6. Técnicas de diagnóstico.....	16
2.7. Antecedentes de VNN en tilapias.....	16
IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	19
V. OBJETIVOS.....	21
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
a. Tipo de estudio.....	22
b. Lugar de estudio.....	22
c. Criterios de inclusión.....	22
d. Tamaño de muestra.....	22
e. Recolección de muestras.....	23
f. Procesamiento de muestra y extracción de ARN.....	23
g. Detección de TiLV y VNN mediante el método RT-PCR.....	23
h. Amplificación de segmento del genoma TiLV.....	24
i. Análisis histopatológico.....	26
j. Consideraciones éticas.....	27

k. Plan de análisis de datos.....	27
VII. RESULTADOS.....	30
VIII. DISCUSIÓN.....	35
IX. CONCLUSIONES.....	42
X. RECOMENDACIONES.....	43
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	44
XII. ANEXOS	

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Secuencia de primers para detección de TiLV y VNN mediante RT-PCR semi-nested y nested respectivamente.....Pág. 28
- Cuadro 2. Secuencia de primers para secuenciamiento de segmentos de TiLV.....Pág. 29
- Cuadro 3. Tabla de muestras positivas para detección para TiLV por RT-PCR.....Pág. 33
- Cuadro 4. Porcentajes de identidad de nucleótidos y aminoácidos entre la cepa de Perú, Israel y Tailandia.....Pág. 34

## RESUMEN

La tilapia (*Oreochromis niloticus*) es una de los peces de mayor consumo en todo el mundo, ya que es una fuente de proteínas, micronutrientes y de fácil cultivo. En el presente estudio se investigó la presencia de dos enfermedades causantes de alta mortalidad en esta especie, la enfermedad del Virus de la tilapia del lago y Encefalopatía y retinopatía viral. Se muestrearon un total de 46 tilapias provenientes de 4 granjas de la localidades de Morales, Rumisapa, Las Palmas y Bello horizonte, pertenecientes al departamento de San Martín, región que presenta la mayor concentración de crianza de tilapia en nuestro país. El muestreo fue realizado en el mes de Febrero del 2018. Se extrajo órganos dianas como ojos, hígado y cerebro. Del total de muestras, 27 fueron usadas para la detección de estas enfermedades mediante el método semi-nested RT-PCR y 19 para el examen histopatológico. Se obtuvieron 4 muestras positivas a Virus de la tilapia del lago y todas las muestras fueron negativas para Encefalopatía y retinopatía viral. Posteriormente, se realizó el análisis molecular por secuenciamiento y filogenético de una muestra representativa a TiLV, el cual reveló que la cepa aislada es similar a la cepa Israelí. Los resultados ayudarán a realizar programas de prevención y control en el país, evitando así la propagación de las enfermedades mencionadas anteriormente.

**Palabras Claves:** Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Virus de la tilapia del lago, Encefalopatía y retinopatía viral

## ABSTRACT

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a source of proteins, micronutrients and easy to grow. In the present study, it were investigated two diseases that cause high mortality in this species, the Tilapia lake virus and Encephalopathy and retinopathy viral. 46 tilapias were sampled from 4 farms in the localities of Morales, Rumisapa, Las Palmas and Bello Horizonte, belonging to the department of San Martín, a region that has the highest concentration of tilapia farming in our country. The sampling was in the month of February 2018. Target organs were extracted as eyes, liver and brain. Subsequently, the detection of these diseases was performed using the semi-nested RT-PCR method and histopathology. Four positive samples were obtained from Tilapia lake virus and all samples were negative for Encephalopathy and retinopathy viral. Subsequently, molecular analysis was realized by sequencing and phylogenetic analysis of a sample representative of TiLV, which revealed that the isolated strain is similar to the Israeli strain. The results will help to carry out prevention and control programs in the country, thus preventing the spread of diseases previously mentioned.

**Palabras Claves:** Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Tilapia Lake Virus, Encephalopathy and retinopathy viral.

## I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, una de las principales especies de peces de mayor cultivo en el país es la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Esta se concentra en las regiones de San Martín, Piura, Tumbes, Cajamarca, Puno y Lima, siendo la región de San Martín la de mayor producción. Esta especie fue introducida al país luego de las investigaciones en cultivo realizadas con la trucha de arcoíris para el desarrollo de la acuicultura, se inició en las estaciones pertenecientes al Instituto del Mar del Perú en el departamento de San Martín, en donde se investigaba el cultivo de especies tropicales (Saldaña, 1985). Las características importantes de la tilapia en la producción acuícola es su alta capacidad reproductiva, alta precocidad, madurez sexual temprana, y adaptabilidad en diferentes tipos de crianza (FONDEPES, 2004), lo que permite que sea una especie de fácil manejo y que genera altas ganancias. En la actualidad, presentan problemas debido a la aparición de nuevas enfermedades virales, como el Virus de la tilapia del lago y Encefalopatía y retinopatía viral, ambas con alto porcentaje de mortalidad siendo de alta importancia en la crianza de esta especie.

En estos últimos años, el Virus de la tilapia del lago está causando pérdidas económicas en los principales países productores como Israel (Eyngor *et al.* 2014), Egipto (Fathi *et al.* 2017; Nicholson *et al.* 2017), Tailandia (Dong *et al.* 2017; Surachetpong *et al.* 2017), Ecuador (Ferguson *et al.* 2014; Bacharach *et al.* 2016), Colombia (Tsofack *et al.* 2017), India (Bechera *et al.* 2018), llegando a Perú en Noviembre del 2017, principalmente reportado por acuicultores del departamento de Piura ya que se presentaban casos de mortalidad repentina de tilapias y se desconocía la causa de este hecho (Vera A., 2017), posteriormente

fue reportada por SANIPES ante la OIE (OIE, 2018b), siendo la zona afectada Lancones perteneciente a la localidad de Sullana - Piura afectando al más del 50% de tilapias, causando mortalidades atípicas y encontrando peces con lesiones como úlceras en piel, exoftalmos y hepatitis sincitial. Esta enfermedad está relacionada al estrés, pero aún sigue en estudio la existencia de otros factores. Una de las medidas a tomar tras la aparición de esta enfermedad es la evaluación de las regiones de importancia en la crianza de tilapia, evitando que esta se propague en todo el Perú.

Al comienzo de la aparición del brote, no se conocía las causas de esta alta mortalidad en tilapias, por lo que se debe evaluar la probabilidad de tomar otras enfermedades como diagnóstico diferencial, tomando en cuenta lesiones y consecuencias similares, siendo esta, la enfermedad de Encefalopatía y retinopatía viral, También llamada Necrosis Nerviosa Viral (VNN), y que aún no ha sido reportada en Sudamérica, esta enfermedad afecta a más de 70 especies, siendo una de ellas la tilapia, uno de los factores desencadenantes para su aparición es el estrés, el cual puede estar asociado a los cambios climáticos que alteran la temperatura del agua. Causan lesiones como erosiones cutáneas, lesiones hepáticas como inflamación y vacuolización citoplasmática, sin necrosis celular, siendo una lesión que diferencia a las dos enfermedades en estudio (OIE., 2018a).

Los métodos más usados para la detección de TiLV y VNN es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) semi-nested y nested por su alta sensibilidad y especificidad, el protocolo a usar para la

detección de TiLV es dada por Dong *et al.* (2017a, 2017b) y para VNN es dada por Dalla Valle *et al.*, 2000.

Uno de los problemas que no permiten la eliminación de estas enfermedades es la escasez de tratamientos, así como medidas preventivas y de control que mayormente no son tomadas en cuenta en nuestro país, como puntos que permitan evitar un ingreso de la enfermedad, evaluando el ingreso de ovas, juveniles y adultos de tilapia antes del ingreso a granja, y tomando medidas de bioseguridad.

El objetivo de esta investigación es evaluar la presencia de estas dos agentes virales que causan alta mortalidad en tilapias, en animales aparentemente sanos, esta información será beneficiosa ya que se tomará importancia en la toma de muestras en animales sanos y así poder prevenir la aparición de las enfermedades y expansión de estas.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Debido a la aparición de casos de mortalidad repentina de tilapias reportada por los acuicultores de la región Piura en la localidad de Lancones en Noviembre del 2017, la alerta enviada por el Sistema Mundial de Información y Alerta de la FAO (SMIA) a los países productores de tilapias el 26 de Mayo del 2017 sobre la propagación de TiLV causante de altas mortalidades en tilapias cultivadas y silvestres (FAO, 2017) y la presencia confirmatoria de TiLV en países cercanos a Perú como Colombia y Ecuador, se busca detectar la presencia de dos enfermedades, Virus de la tilapia del lago y Encefalopatía y retinopatía viral, que causan más del 90% de mortalidad en tilapias cultivadas y silvestres.

Por lo que se evaluó la región de alta producción como el departamento de San Martín en las zonas de Morales, Rumisapa, Las Palmas y Bello Horizonte, debido a que no presentan reportes de mortalidades en las mencionadas zonas, se decidió evaluar la presencia de estas enfermedades en animales sanos y si esto desencadenaría en un futuro la aparición de estas enfermedades.

### III. MARCO TEÓRICO

La crianza de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) se remonta a la época de los antiguos egipcios, siendo especie íctica de las aguas tropicales nativa de África y Medio Oriente, una de sus principales características es su rápida adaptabilidad al cautiverio, así como la aceptación de diversas variedades de alimento, debido a estas características presenta un alto interés comercial a nivel mundial, siendo la tercera especie más cultivada (FONDEPES, 2004; Dirección de Acuicultura, 2014). Los mayores productores son China, Egipto, Tailandia, Ecuador, Colombia, etc. Estados Unidos es el principal importador, consumiendo 225,000 toneladas métricas de tilapia anualmente (Harvey D., 2016).

En el Perú, la crianza de la tilapia comenzó en los años setenta, siendo previamente introducida y promovida en los años 50 por la Dirección General de Caza y Pesca del Ministerio de Fomento y Agricultura, convirtiéndose en la segunda especie más cultivada, después de la trucha de arco iris, alcanzando 3,840 toneladas en el 2013 (Baltazar P. M., 2007). La especie de tilapia cultivada en el Perú es la *Oreochromis niloticus* conocida como la tilapia nilótica, perteneciente a la familia Cichlidae (Dirección General de Acuicultura, 2009).

La producción de tilapia en el Perú, se concentra en los departamentos de Piura, San Martín, Tumbes, Cajamarca, Puno y Lima, siendo los Departamento de Piura y San Martín los de mayor producción. En el país existen 668 centros acuícolas que cultivan tilapia, representando un total de 394.5 hectáreas destinadas a su producción, las cuales son comercializadas dentro de los propios departamentos y

para exportación (1.07%), convirtiéndose en la cuarta especie exportada (Baltazar P. M., 2007; Dirección de Acuicultura, 2014)

En la actualidad, uno de los desafíos en la crianza de tilapia son las enfermedades, causadas por bacterias, hongos y protozoos, los cuales han sido atenuados con tratamientos, a excepción de los virus como el Virus de la tilapia del lago que en el 2009 causaron pérdidas masivas, las cuales fueron descritas en Israel y Ecuador (Bacharach E., 2016). En el 2017 la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) alertó sobre la presencia de la enfermedad del Virus de la tilapia del lago (TiLV) en cinco países de tres continentes, las cuales fueron Egipto, Israel, Tailandia, Colombia y Ecuador.

### **1. Virus de la tilapia del lago (TiLV)**

La enfermedad del Virus de la tilapia del lago (TiLV) también conocida como hepatitis sincitial de la tilapia (SHT), es una enfermedad viral causada por un virus ARN monocatenario lineal de polaridad negativa, con envoltura y compuesto de 10 segmentos con regiones no codificantes, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae; esta clasificación se realizó con el segmento 1 del virus, el cual se alinea al segmento PB1 de la influenza A, B y C (Bacharach *et al.*, 2016; OIE, 2017a). Aunque el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) clasifica a TiLV como una nueva especie conocida como *Tilapia tilapinevirus* perteneciente al género llamado Tilapinevirus (Adams *et al.*, 2017), este pedido fue realizado el 18 de Julio del 2016 por Bacharach y su grupo de investigación (Bacharach *et al.*, 2016b), los cuales realizaron un estudio sobre la caracterización de este virus (Bacharach *et al.*, 2016) comparando todas las

secuencias de este virus con la familia Orthomyxoviridae observando que TiLV no está directamente relacionado a los Ortomixovirus, por lo que es considerado una nueva especie en un nuevo género, requiriendo estudios adicionales para su inclusión en una familia.

TiLV está siendo considerada para ser inscrita en la lista de enfermedades de la OIE (2017a), sin embargo, no cumple todos los criterios descritos en el capítulo 1.2 del Código Sanitario de los animales acuáticos. Pero si está incluido en la lista de enfermedades que deben ser reportadas según el sistema regional de Enfermedades trimestrales de los animales acuáticos (Quarterly Aquatic Animal Diseases - QAAD) de la NACA (Red de Centros de Acuicultura de Asia y el Pacífico) (Jansen *et al.*, 2018).

### **1.1. Distribución**

Esta enfermedad ha sido detectada por los países de Israel (Eyngor *et al.*, 2014), Ecuador (Ferguson *et al.*, 2014; Bacharach *et al.*, 2016), Colombia (Tsofack *et al.*, 2017), Egipto (Fathi *et al.*, 2017 ; Nicholson *et al.*, 2017), Tailandia (Dong *et al.*, 2017a ; Surachetpong *et al.*, 2017), India (Behera *et al.*, 2018), Indonesia (Koesharyani *et al.*, 2018), Uganda (Mugimba *et al.*, 2018) y Malasia (Amal *et al.*, 2018); y reportado por los países de Taipei Chino (OIE, 2017b), Israel (OIE, 2017c), Tailandia (OIE, 2017d), Malasia (OIE, 2017e), Filipinas (OIE, 2017f) y Perú (OIE, 2018b).

Fue descubierto y descrito por primera vez en Israel por Eyngor *et al.* (2014) en peces frescos y agua salobre; la fuente de origen del virus es desconocida (OIE, 2017a). Estudios *in vitro* demuestran que la temperatura apropiada para su

crecimiento es de 23°C a 30°C, y ocasionando mortalidad a temperaturas superiores a 25°C (Fathi *et al.*, 2017).

## **1.2. Mortalidad y morbilidad**

Afecta tanto a tilapias criadas en cautiverio como silvestres, como la tilapia silvestre (*Sarotherodon galilaeus*), tilapia cultivada (*Oreochromis niloticus*) y tilapia híbrida comercial (*O. niloticus* x *O. aureus*) causando mortalidad y morbilidad cercana al 90% en alevines y 9% en juveniles y adultos (Bacharach E., 2016; Eynigor *et al.*, 2014).

El Virus de la tilapia del lago, es un virus emergente que se asocia con mortalidades significativas desde el 80-90% en la tilapia cultivada, representando un riesgo para la industria global de tilapia de USD 7.5 mil millones, generando pérdidas económicas y alteración ecológica ya que esta especie sirve como control de mosquitos, algas y propicia un hábitat adecuado para la crianza de camarones (OIE, 2017a).

## **1.3. Signos clínicos e histopatología**

Los signos clínicos descritos por los investigadores de esta enfermedad en los países afectados son variables, pero en general los principales órganos afectados son los ojos, cerebro e hígado; se observan lesiones como piel erosionada, endoftalmitis, exoftalmia, encefalitis, palidez branquial, protuberancia en escamas, distensión abdominal, congestión del bazo y riñón, presentando a su vez letargo, pérdida del apetito y nado superficial. A nivel histopatológico se observan lesiones a nivel cerebral como hemorragias focales en las leptomeninges, congestión de los vasos capilares en sustancias blanca y gris, focos de gliosis y

manguitos perivasculares en la corteza cerebral, encefalitis, degeneración neuronal y edema, a nivel ocular se observa ruptura de la cápsula lenticular, y a nivel hepático se observa inflamación hepatocelular, hepatocitos gigantes multinucleados (hepatitis sincitial) y necrosis de los hepatocitos, también se pueden encontrar necrosis de las glándulas gástricas, hemorragia intersticial multifocal en el riñón, infiltración de linfocitos en túbulos renales y necrosis pancreática (Eyngor *et al.* 2014; Ferguson *et al.* 2014; Bacharach *et al.* 2016; Surachetpong *et al.* 2017).

#### **1.4. Vía de transmisión**

La transmisión de la enfermedad es de vía horizontal directa; se puede asociar al estrés causado por la transferencia de tilapias entre estanques y aumento de temperatura del agua. No se han identificado otros factores como por ejemplo alteraciones de salinidad (Ferguson *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017a). Es posible que los residuos sólidos y líquidos se encuentren contaminados por las concentraciones del virus en el ojo, cerebro e hígado, con posibilidad de encontrarse a nivel muscular (OIE, 2017a). Aún no está descrita la patogenia de esta enfermedad.

#### **1.5. Técnicas de diagnóstico**

Los métodos para el diagnóstico presuntivo son el cultivo del virus en células cerebrales primarias de Tilapia o en la línea celular E-11, induciendo efecto citopático por 5-10 días (Eyngor *et al.*, 2014; Tsofack K., 2016). Mientras que el método de confirmación es por medio de RT-PCR anidada realizada por Tsofack K. (2016) la cual presenta alta sensibilidad, siendo adecuada para la detección de

TiLV; esta prueba fue mejorada por Dong *et al.* (2017a) obteniendo 7.5 copias por reacción mediante RT-PCR. Existen diferentes métodos de PCR, pero aún no han sido validadas por lo que se debe complementar con la secuenciación del producto representativo para confirmación del agente (Jansen *et al.*, 2018).

## **1.6. Control y prevención**

No se ha descrito el tratamiento para esta enfermedad viral, pero un estudio realizado por Eyngor *et al.* (2014) observó que las tilapias que sobreviven a los brotes de TiLV son resistentes al siguiente brote, lo que esto demuestra que el pez crea una respuesta inmune contra la primera infección, sugiriendo la posibilidad de crear una vacuna como control de TiLV.

Las medidas de control y prevención son importantes debido a las consecuencias que trae la aparición de agente viral, según la alerta enviada por la FAO (2017), menciona medidas de bioseguridad para el traslado de tilapias vivas en países con TiLV positivo y desconocido, realizar pruebas de diagnóstico para la detección de TiLV, solicitar certificado sanitario que certifique la ausencia de dicha enfermedad, cuarentena y control antes del ingreso a granja con el fin de detectar mortalidades inusuales, en caso esto se produzca debe realizarse prueba de diagnóstico. En países con casos confirmados se debe iniciar programas de vigilancia activa que determine la extensión geográfica de infección y tomar medidas que evite la propagación de la enfermedad, iniciar campañas de información pública, asesoría a acuicultores sobre TiLV y la importancia de informar a las autoridades de bioseguridad sobre casos de alta mortalidad inusual, realizar detección de TiLV en casos con signos clínicos similares a los reportados

para TiLV. Para los países con estado desconocido de TiLV, se debe iniciar un programa de vigilancia activa que determine si la enfermedad está presente, así como la identificación de especies susceptibles y la distribución en el país, realizar campañas de información pública sobre la amenaza que representa TiLV y la importancia de reportar casos de mortalidad inusual.

### **1.7. Situación en el Perú**

En Perú, en Noviembre del 2017 se notificaron mortalidades inusuales en cultivos de tilapia y silvestres en el departamento de Piura, por lo que el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES realizó el análisis histopatológico y molecular de las tilapias afectadas obteniendo resultados positivos a TiLV. Posteriormente, SANIPES reportó los casos de mortalidad inusual causados por TiLV ante la OIE (OIE, 2018b), presentando el primer reporte de la primera localidad afectada de Lancones, Sullana – Piura, en la Manga – Poechos el 09/11/2017 (Notificación inmediata); a finales del mes de febrero del 2018 se reportaron mortalidades inusuales en centros de cultivo de la región San Martín, las cuales dieron positivo a TiLV, siendo reportado también ante la OIE, los dos últimos casos reportados ocurrieron en Mochumi, Lambayeque el 08/03/2018 (Reporte No. 5 – 14/02/2019) y en Bellavista, Jaén – Cajamarca ocurriendo el 08/09/2018 (Reporte No. 6 – 14/02/2019), demostrando que el agente viral esta diseminándose a nivel nacional. Estos reportes son los primeros presentados en Sudamérica.

Ante la alerta enviada por la FAO (2017) y los casos de mortalidad atípica, SANIPES emitió un plan de emergencia el cual explica las medidas a tomar,

como toma de muestra en zonas de producción de tilapia (Piura, San Martín, Tumbes, Lambayeque, Cajamarca y Lima), capacitación a toda la línea productiva de tilapia en controles preventivos como bioseguridad, buenas prácticas acuícolas e higiene y desinfección, restricción del movimiento fronterizo internacional y a nivel nacional de tilapias vivas en todas las fases y exigencia de certificados de inocuidad y salud emitidos por la autoridad sanitaria competente, de esta manera se fortalecen los controles sanitarios preventivos como medida que evite la diseminación del virus. Este plan también presenta el tamaño de muestra a tomar siguiendo las recomendaciones de la OIE, tomando como una prevalencia estimada para esta enfermedad del 2% - 20% con un nivel de confianza al 95%, considerando el 2% cuando el centro fue declarado en condición negativa por SANIPES y debe realizar muestreo cada 6 meses para mantener su condición, y 20% cuando el centro de producción se declaró con condición sanitaria positiva o sospechosa. Como se observa anteriormente, solo hay reportes e información por parte de SANIPES, pero aún no hay estudios publicados sobre esta enfermedad en Perú.

## **2. Encefalopatía y retinopatía viral o Necrosis nerviosa viral (VNN)**

La segunda enfermedad que se investigará en este estudio es Encefalopatía y retinopatía viral o también llamada Necrosis nerviosa viral (VNN), causada por un Betanodavirus, de la familia Nodaviridae, es un virión no envuelto, ARN de sentido positivo que consta de dos segmentos, el primer segmento llamado RNA 1 y el segundo segmento RNA 2. Se clasifica en 5 genotipos, estos son, RGNNV (Virus de la necrosis nerviosa del mero de manchas rojas), BFNNV (virus de la necrosis de *Veasper moseri*), TPNNV (virus de la necrosis nerviosa de *Takifugu*

*rubripes*) y JFNNV (virus de la necrosis nerviosa del jurel dentón). Este virus afecta a más de 70 especies marinas y de agua dulce, incluyendo a la tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*), causando mortalidad de 80-100%. Los brotes de esta enfermedad suelen suceder a altas temperaturas, por lo que se considera que el cambio climático puede causar propagación de este patógeno. El virus puede persistir largo tiempo en pescado congelado, siendo un riesgo potencial si se utiliza pescado crudo para la alimentación de otras especies, aunque en condiciones de desecación ocurre la inactivación del virus (7 días a 21°C) (Doan, Q. K. *et al.*, 2016; Munday *et al.*, 2002; OIE, 2018a).

### **2.1. Distribución**

La enfermedad ha sido reportada en el Sur y Este de Asia, Oceanía (Australia y Tahiti), Mediterráneo, Reino Unido, Noruega y Norteamérica (Canadá y Estados Unidos), registrándose altas mortalidades en las etapas larvales y juveniles. Aún no se observan casos en Sudamérica (OIE, 2018a).

### **2.2. Transmisión**

La transmisión es horizontal, a través de la columna de agua, contacto entre peces sanos y peces enfermos y/o asintomáticos, equipos y canibalismo, y vertical (reproductor a las crías) por medio del germoplasma, a su vez ha sido reportada su transmisión por vía reproductiva (gónadas y fluido ovárico). También se ha reportado VNN en gusanos de arena de la familia *Nereidae*, camgrejos y mejillones. La velocidad de transmisión puede estar influenciada por la edad, factores estresantes como las variaciones de temperatura del agua, calidad del agua, alimentación inadecuada, manejo, altas densidades de almacenamiento, y

virulencia de la cepa particular de Betanodavirus (Dalla Valle *et al.*, 2000; Doan, Q. K. *et al.*, 2016; Shetty, M., *et al.*, 2012).

Estudios demostraron que esta enfermedad afectaba de forma diferente en larvas y alevines de tilapias, siendo infecciosos para las larvas y causaban mortalidad, mientras que en alevines no se observó mortalidad ni signos clínicos, por lo que la interacción entre huésped, patógeno y virulencia depende de la etapa de ciclo de vida en la tilapia (Machimbirike *et al.*, 2019). VNN generalmente afecta principalmente en la etapa larval y juvenil.

### **2.3. Signos clínicos e histopatología**

Las lesiones afectan el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) y retina, presenta signos clínicos como natación errática o espiral, letargia, pérdida del apetito, anorexia, coloración oscura en la piel, hemorragias en tejido cerebral y en algunos casos erosiones cutáneas, hiperinflación de la vejiga natatoria. En la histopatología se observa son vacuolación y necrosis de las células nerviosas de la médula espinal, cerebro y retina, vacuolas intracitoplasmáticas en la materia gris del cerebro, picnosis, células basófilas, cariorrexis en células neuronales y presencia de células mononucleares, vacuolación en las capas nucleares bipolares y ganglionares de la retina, agregados focales de células similares a macrófagos que contenían partículas virales en el cerebro y retina; también se han descrito lesiones como endocarditis leve y degeneración y necrosis de células branquiales. En situaciones estresantes el virus puede presentarse en los órganos reproductivos (Machimbirike *et al.*, 2019; Munday *et al.*, 2002; OIE, 2018a).

### **2.4. Prevalencia**

Según la OIE, se describen pocos estudios de prevalencia en VNN. Como por ejemplo en un estudio realizado en Canadá, se observó que el virus se podía detectar por PCR en el 0.23% de la población de *Pleuronectes americanus* en medio silvestre; en Japón, se realizó un muestreo de 30 peces silvestres y cultivadas en dos bahías, las cuales confirmaron ser positivas a VNN (OIE, 2018a); y en Filipinas, se realizó un muestreo en el cual se considera un rango de 2 a 30 peces por especie, se estudio 21 especies y se obtuvo el 87% positivos para VNN por RT-PCR (De la Peña L., 2011).

## **2.5. Control y prevención**

No existe tratamiento para VNN en peces, por lo que es importante la prevención y el control de esta enfermedad para evitar brotes y diseminación en las granjas acuícola. Es importante tomar medidas de bioseguridad en todo el ciclo de producción, desinfección de huevos y larvas, lavado con agua ozonizada, luz ultravioleta o agua clorada, tratamiento del agua con ozono, lejía o UV, descanso y desinfección de los estanques, desinfección de las instalaciones y equipos, evitar alimentar a los peces con pescado crudo ya que puede estar infectado con VNN, tratamiento de ozono a artemia antes de alimentar los peces con esta. Debido a que VNN es de transmisión vertical, uno de los controles a tomar es la detección por medio de pruebas serológicas como ELISA, tomando como muestra el suero sanguíneo de los reproductores o método RT-PCR tomando muestra huevos o fluidos. Es importante evitar el estrés en los animales por lo que debe tener control en la densidad poblacional por estanque, alimentación adecuada y limpieza del estanque (Doan, Q. K. *et al.*, 2016; OIE, 2018a).

## **2.6. Técnicas de diagnóstico**

Los métodos de diagnóstico son diversos para esta enfermedad como el uso de métodos serológicos, microscopía electrónica, inmunohistoquímica, etc., pero no todas presentan una alta sensibilidad, especificidad, tiempo de detección rápida. Uno de los métodos de diagnóstico es el aislamiento del virus en cultivo celular, en células del pez cabeza de serpiente rayada (*Channa striata*) llamadas células SSN-1 y una línea celular clonada llamada E11, este método es usado conjuntamente con una prueba inmunológica como IFAT (prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos), inmunohistoquímica, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas) o una prueba molecular tipo PCR, lo que no permite que sea uno de los métodos más eficaces es el tiempo que requiere el cultivo y que no todas las cepas son fáciles de detectar por ausencia de efecto citopático. Debido a esto, los protocolos basados en PCR son los métodos mayormente usados ya que presentan una alta sensibilidad y especificidad pudiéndose detectar en peces con signos clínicos o subclínicos, así como rapidez en la obtención de resultados. Uno de los métodos más eficaces es RT-PCR en tiempo real ya que puede identificar los cuatro genotipos de VNN (Munday *et al.*, 2002; OIE, 2018a; Shetty *et al.*, 2012).

## **2.7. Antecedentes de VNN en tilapias**

Existen tres casos que fueron reportados en tilapia, el primero ocurrió en Francia por Bigarré *et al.* (2009). El betanodavirus causó altas mortalidades en una granja acuícola afectando a larvas de *O. niloticus* las cuales se cultivaban a 30 °C, las cuales fueron muestreadas y el agente etiológico se aisló para realizar la

inoculación experimental de esta cepa (FF139) en tilapias juveniles sanas, a su vez se usó Nodavirus aislado del pez lubina (V26), teniendo como resultado el 20% de mortalidad a los 14 días post infección. Las tilapias que fueron infectados con la cepa FF139 mostraron signos clínicos como flotación, natación errática, letargia, anorexia y coloración oscura. Las tilapias infectadas con la cepa V26 mostraron los mismos signos, pero con mortalidades. En la histopatología se observaron lesiones en el sistema nervioso central, cerebro, bulbo olfativo, médula espinal y el tejido de la retina, así como la vacuolación citoplasmática. Al realizar la secuenciación de la región T4 de los genes de la proteína de la cubierta de las cepas FF139 y V26, se observó en el árbol filogenético que el aislado se encuentra relacionado al virus de la necrosis nerviosa del mero de manchas rojas tipo RGNNV (Red-spotted grouper nervous necrosis virus), con una homología del 98% aproximadamente.

El segundo caso ocurrió en Tailandia en el 2011 investigado por Keawcharoen *et al.* (2015), en el cual también afectó a larvas de tilapia causando una tasa de mortalidad de 90-100%. Los signos clínicos fueron pérdida del equilibrio y natación tipo sacacorchos antes de morir. En la histopatología se observó degeneración vacuolar en ojos, médula espinal y cerebro, y necrosis neuronal. El citoplasma de los órganos afectados mostró inmunotinción positiva que indica inmunorreactividad de los anticuerpos contra el betanodavirus. La cepa aislada (Tilapia-CU-2011) fue secuenciada, dando como resultado la similitud con el genotipo RGNNV, con una homología de 93.07-93.88%.

El tercer caso ocurrió en Java Central, Indonesia en el 2015 por Prihartini *et al.* (2015), en este caso no se registró mortalidad en los alevines de *Oreochromis sp.*

y la mayoría no mostró signos clínicos aparentes, en algunos se observó natación errática y coloración oscura en la piel. La histopatología mostró vacuolas y cuerpos de inclusión en el cerebro y los ojos. Sin embargo, no todos los peces que dieron positivo para VNN mostraron síntomas clínicos. En el secuenciamiento se observó una homología del 99% con el genotipo RGNNV.

Las cepas aisladas en la tilapia en los tres casos tienen homología del 93-99%, siendo relacionadas fuertemente al Virus de la necrosis nerviosa del mero de manchas rojas (RGNNV - Red-spotted grouper nervous necrosis virus). La ausencia de signos clínicos en el tercer caso sugiere que la tilapia podría ser portadora potencial de la enfermedad VNN.

#### IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El principal problema en las explotaciones acuícolas lo constituyen las enfermedades, ya que altas mortalidades por infecciones virales amenaza la sostenibilidad de la crianza. Por ello, el presente estudio tiene como objetivo detectar la presencia de dos nuevos virus en Tilapias que inducen mortalidades considerables de 80-100%, y son el Virus de la tilapia del lago (TiLV) y la Encefalopatía y retinopatía viral en tilapias que no presentan signos clínicos y/o aparentemente sanas criadas en el Departamento de San Martín, debido a que TiLV es una enfermedad que ya ha sido reportada en Ecuador (Ferguson *et al.*, 2014; Bacharach *et al.*, 2016) y Colombia (Tsofack *et al.*, 2017) y a la cercanía que Perú tiene con los dos últimos países, resultando en una alta probabilidad que esta enfermedad llegue a nuestro país, ya que es una enfermedad muy contagiosa y de rápida propagación. Siendo Piura, la primera región afectada (OIE, 2018b), uno de los principales departamentos de producción de tilapia. Y la Encefalopatía y retinopatía viral presente en Asia-Pacífico, pero aún no reportada en Sudamérica.

Se estudiarán estas dos enfermedades ya que presentan signos clínicos y porcentaje de mortalidades similares, así como la posibilidad de detectar la presencia de estos agentes virales en tilapias aparentemente sanas y el análisis molecular como secuenciamiento y filogenética para observar la posible procedencia del agente viral. Es importante su estudio en la siguiente zona de principal producción de tilapia, la región San Martín, ya que hasta a inicios del mes de Febrero no se realizó detección ni reporte de TiLV ante la OIE, ni se tenía información sobre la posible procedencia del agente viral. Esta información será

beneficiosa ya que se tomará importancia en la toma de muestras peces sanos y así poder prevenir expansión y/ brotes de enfermedades que afecten a la producción de tilapias, así mismo saber la posible procedencia ayudará en el control de las enfermedades.

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Evaluar la presencia del Virus de la tilapia del lago (TiLV) y Encefalopatía y retinopatía viral en tilapias sin signos clínicos en 4 distritos del departamento de San Martín – Perú.

### Objetivos específicos

- Detectar mediante semi-nested RT-PCR la presencia del Virus de la tilapia del lago (TiLV) y Encefalopatía y retinopatía viral en tilapias sin signos clínicos en 4 distritos del departamento de San Martín.
- Evaluar mediante histopatología las lesiones asociadas al Virus de la tilapia del lago (TiLV) y Encefalopatía y retinopatía viral en tilapias sin signos clínicos en 4 distritos del departamento de San Martín.
- Determinar el grado de similitud de la cepa aislada del Virus de la tilapia del lago (TiLV) y Encefalopatía y retinopatía viral con otros aislados reportados mediante análisis filogenético.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **a. Tipo de estudio**

Estudio observacional descriptivo.

### **b. Lugar de estudio**

Laboratorio de Biología Molecular, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ – UPCH). Se realizó la elaboración de medios para el transporte y preparación de las muestras.

Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology (Centex Shrimp) – Bangkok, Thailand. Se realizó el procesamiento de las muestras, como extracción del material genético, detección por método RT-PCR semi-nested y nested, e histopatología de las muestras.

Centros de cultivo de tilapias en el departamento de San Martín. Se realizó la recolección de muestras en 4 centros de cultivo (Anexo 1).

### **c. Criterios de inclusión**

Se incluirán tilapias sin signos clínicos y/o lesiones de los criaderos de las zonas de San Martín. Serán muestreados al azar, de cualquier poza.

### **d. Tamaño de muestra**

El tamaño de muestra a tomar es de 42 tilapias como mínimo, se definió mediante la fórmula de detección de enfermedad. Se obtuvo una prevalencia mínima de 7%

de casos positivos a las enfermedades, con 95% del nivel de confianza y 5% del nivel de significancia. (Mugimba, K. K. *et al.*, 2018).

#### **e. Recolección de muestras**

Las tilapias (*Oreochromis niloticus*) fueron recolectadas de 4 centros de cultivo de las localidades de Morales, Rumisapa, Las Palmas y Bello Horizonte pertenecientes al departamento de San Martín – Perú, luego se realizó la identificación de la especie y características de cada animal. Las muestras fueron recolectadas a inicios de Febrero del 2018. En total se recolectaron 46 muestras, de las cuales son 18 alevines ( $\leq 2$  g) y 28 juveniles (80 - 100 g).

#### **f. Procesamiento de muestra y extracción de ARN**

Se realizó el sacrificio de los peces con eugenol a una dosis de 20 ppm (Charoendat *et al.*, 2009). Luego se realizó la necropsia para la extracción de los órganos internos diana como hígado, ojos y cerebro. Estas fueron preservadas en 95% de etanol a volumen de 1/10 por alevín y órganos en caso de juveniles para posteriormente ser usado en el diagnóstico de TiLV y VNN mediante RT-PCR (27 muestras). Las 19 muestras usadas para el diagnóstico histopatológico fueron fijados en formalina buffer al 10% por 24hrs, posteriormente transferidos a solución etanol al 70%. Para la extracción de ARN del pool de órganos/tilapia se usó Trizol reagent (Invitrogen®) siguiendo las indicaciones del autor de la solución, el producto final fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **g. Detección de TiLV y VNN mediante el método RT-PCR**

Luego de la extracción de ARN, se realizó la medición de la concentración de producto final en espectrofotómetro GENEQUANT® 100 (Biochrom) a un volumen de 70 ul (1ul de muestra + 69 ul de DEPC) en cada medición.

Se realizó la dilución del ARN total de cada muestra para ser usada como template en la detección mediante semi-nested y nested RT-PCR. Se trabajó a una concentración de 100ng. Se usaron los protocolos descritos previamente trabajados por Dong *et al.* (2017a, 2017b) para la detección del Virus de la tilapia del lago mediante RT-PCR semi-nested (Anexo 2). Se usó como control positivo un plásmido recombinante con el fragmento del segmento 3 de TiLV de 415bp y agua libre de nucleasas (PBE) como blanco. Para la detección de Encefalopatía y retinopatía viral o VNN se usó el protocolo nested RT-PCR descrito por Dalla Valle *et al.* (2000) (Anexo 3). Se usó como control positivo ARN extraído de lubinas infectadas con ERV y agua libre de nucleasas (PBE) como blanco. Los primers usados para TiLV y VNN se describen en el cuadro 1. Los controles positivos fueron proporcionados por el laboratorio del Center of Excellence for Shrimp Molecular Biology and Biotechnology – Bangkok, Thailand. Los productos amplificados obtenidos del PCR fueron sometidos en gel de agarosa 1.5% y teñidos con bromuro de etidio para posteriormente ser visualizados mediante electroforesis bajo luz ultravioleta; se usó marcador de peso molecular DNA ladder (New England Biolabs). Al observar por electroforesis se espera un tamaño de banda para TiLV de 415 bp y 250 pb, y para ERV de 605 bp y 255 bp.

#### **h. Amplificación de segmento del genoma TiLV**

Debido a que el genoma del Virus de la tilapia del lago presenta 10 segmentos, estos deben ser amplificados y posteriormente analizados por secuenciamiento. Por lo que se tomó 1 muestra representativa positiva a TiLV, la cual presentó amplicones de 415bp y 250bp. Se realizó la amplificación de los segmentos 1-10 usando como template el ARN de la muestra representativa seleccionada y los primers para cada segmento fueron diseñados para este estudio (Cuadro 2) a partir de 10 marcos de lectura abierta (Open reading frames – ORFs) del TiLV aislado en Israel (GenBank no. de acceso KU751814- KU751823) (Eyngor *et al.*, 2014). Se realizó con una reacción total de 25 ul, con 300 – 500 ng de ARN template, 300 nM de cada par de cebador/primer, 1 ul de SuperScript III reverse transcriptase (RT) y Platinum Taq DNA Polymerase mix (Invitrogen), y 1x de buffer. El protocolo de amplificación comienza a una temperatura de 45 o 50 °C durante 30 min y se desactiva a 94 °C durante 2 min. El termociclado se realizó luego durante 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 50 o 55 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante 1 min/1 kb seguido de una extensión final a 68 °C durante 5 min. Posteriormente se observó mediante electroforesis la amplificación de bandas para cada segmento que van desde 342 hasta 1,560 bp, luego estas fueron purificadas con FavorPrep™ GEL/PCR purification kit (Favorgen), para realizar el proceso de clonamiento. El proceso de clonamiento de ADN comienza con la ligación en un vector pGEM-T-easy (Promega) siguiendo el protocolo del producto Promega, posteriormente se realizó el proceso de transformación (Anexo 4), se seleccionó las colonias deseadas para la realización de PCR de estas y determinar la presencia o ausencia del ADN, estas colonias son de coloración blanca, ya que es probable que el ADN del segmento se encuentre insertado en el

plásmido, se usaron primers para el vector. Después de la verificación mediante PCR de colonias, se realizó la extracción de los plásmidos recombinantes con el kit FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction (Favorgen®) y se enviaron para la secuenciación del ADN (Macrogen®, Corea del Sur).

El procesamiento de las secuencias y alineaciones múltiples se realizaron con el software Geneious (Biomatters, Inc). Las secuencias de consenso de cada segmento del genoma de TiLV entre los 5 aislamientos virales de Perú (1 aislado), Israel (2 aislados) y Tailandia (2 aislados) se obtendrán después de recortar los extremos no alineados. El análisis de secuencia de múltiples locus (MLSA) de los genomas de TiLV se construirá mediante la concatenación de las secuencias del segmento 1 al segmento 10 de consenso y luego se comparó utilizando el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). Se evaluó la relación entre los 5 aislamientos mediante un análisis bootstrap de 1000 repeticiones. El árbol filogenético se construyó con el método de máxima probabilidad (Maximum Likelihood method) el cual es recomendado por el programa MEGA 7.

#### **i. Análisis histopatológico**

Los 19 tejidos conservados en la formalina mencionada anteriormente se sometieron a un procesamiento histopatológico estándar. Los cortes histológicos se trabajaron por inclusión en parafina y luego las secciones se tiñeron con H&E (hematoxilina y eosina) (Pacheco *et al.*, 2017), posteriormente se realizó la observación de las láminas bajo un microscopio de luz digital (Olympus DP73).

Se evaluó lesiones compatibles con las patogenicias de los virus. En el caso del Virus de la tilapia del lago se esperó encontrar lesiones como hepatocitos gigantes multinucleados (hepatitis sincitial) ya que el hígado es el tejido principalmente afectado, mientras que en Encefalopatía y retinopatía viral se esperó encontrar vacuolación y necrosis de las células nerviosas de la médula espinal, cerebro y retina.

#### **j. Consideraciones éticas**

El presente estudio fue evaluado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Fue aprobado en la sesión CIEA (Comité Institucional de Ética para el uso de animales) el día 21 de setiembre del 2018 con el código de inscripción 101809, por lo que los procedimientos usados para el desarrollo de la presente investigación están de acuerdo con las normas éticas del comité institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### **k. Plan de análisis de datos**

Los datos obtenidos como positivos y negativos fueron analizados y presentados en tabla para el Virus de la tilapia del lago y Encefalopatía y retinopatía viral.

**Cuadro 1.** Secuencia de primers para detección de TiLV y VNN mediante RT-PCR semi-nested y nested respectivamente.

	<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>bp</b>	<b>Referencia</b>	
<b>TiLV</b>	<i>1° RT-PCR</i>			415	Eyngor <i>et al.</i> , 2014  Tsofack <i>et al.</i> , 2016
	Nested ext-1	TATGCAGTACTTTCCCTGCC			
	ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA			
	<i>2° RT-PCR</i>			250	
	7450/150R/ME2	TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT			
	ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA			
<b>VNN</b>	<i>1° RT-PCR</i>			605	Dalla Valle <i>et al.</i> , 2000
	VNNV1	ACACTGGAGTTTGAAATTCA			
	VNNV2	GTCTTGTTGAAGTTGTCCCA			
	<i>2° RT-PCR</i>			255	
	VNNV3	ATTGTGCCCCGCAAACAC			
	VNNV4	GACACGTTGACCACATCAGT			

**Cuadro 2.** Secuencia de primers para secuenciamiento de segmentos de TiLV

<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Objetivo</b>	<b>bp</b>	<b>Referencia</b>
TiLV-S1-F	ATGTGGGCATTTCAAGAA	Amplificación del segmento 1	1560	Presente estudio
TiLV-S1-R	TTAGCACCCAGCGGTGGGCT			
TiLV-S2-F	ATGAGTCAGTTTGGGAAA	Amplificación del segmento 2	1374	
TiLV-S2-R	CTACTGATTTAGATCCATAT			
TiLV-S3-F	ATGGACTCGCGGTTCGCA	Amplificación del segmento 3	1260	
TiLV-S3-R	TTATCTCGCAAATGGGTGTA			
TiLV-S4-F	ATGGTGAGAACTACAAAG	Amplificación del segmento 4	1065	
TiLV-S4-R	CTATCTTCCAACAGCCCCCG			
TiLV-S5-F	ATGTTTCTCTTATCTCAG	Amplificación del segmento 5	1032	
TiLV-S5-R	TCAAGATAATGGAAGCAGAG			
TiLV-S6-F	ATGCATTTTTATCTACAG	Amplificación del segmento 6	954	
TiLV-S6-R	TCACATGTATTTATTGATTT			
TiLV-S7-F	ATGTCCTACAAGATTGGT	Amplificación del segmento 7	588	
TiLV-S7-R	TTAGAGTTCAAATGTGATCC			
TiLV-S8-F	ATGGCTCAAATTCCAACA	Amplificación del segmento 8	525	
TiLV-S8-R	TTATTTAAGCATTTACGGA			
TiLV-S9-F	ATGTCACGATGGATAGAA	Amplificación del segmento 9	351	
TiLV-S9-R	TCATAAAGTTTTATCGCCAG			
TiLV-S10-F	ATGAGTGTGGCAGATTAT	Amplificación del segmento 10	342	
TiLV-S10-R	CTAAGACTGCACGTCAAGAG			

## **VII. RESULTADOS**

Los ejemplares de tilapia sin signos clínicos, es decir aparentemente sano, con movilidad normal, apetito y sin lesiones, fueron recolectados en el mes de Febrero del 2018 en 4 granjas pertenecientes a las localidades de Morales, Las Palmas, Rumisapa y Bello Horizontes en el departamento de San Martín – Perú, de acuerdo con los productores no presentaron mortalidades anormales.

En este estudio, se muestrearon un total de 46 tilapias, de las cuales se extrajeron órganos dianas como cerebro, hígado y ojos, órganos principalmente afectados, para ser analizados mediante RT-PCR semi-nested (27) e histopatología (19).

### **Procesamiento de muestra y extracción de ARN**

Se realizó la extracción de ARN a partir de pool de hígado, ojos y cerebro por pez, posteriormente se evaluó la concentración de ARN mediante espectrofotometría obteniendo una mediana de 2002 ng/ul y rango intercuartilico de 734 - 4784 ng/ul con un grado de pureza A260/A280 promedio de  $1.3175 \pm 0.3674$ .

### **Detección de Encefalopatía y Retinopatía Viral por método RT-PCR nested**

No se obtuvieron bandas en el primer y segundo paso del método RT-PCR nested, lo que indica la ausencia de muestras positivas a Encefalopatía y Retinopatía Viral (Anexo 5, fig 1).

### **Detección de Virus de la tilapia del lago por método RT-PCR semi-nested**

Los resultados de detección indicaron que las 27 muestras analizadas, 4 muestras fueron positivas para TiLV. Las tilapias aparentemente sanas que resultaron

positivas para TiLV en este estudio se obtuvieron de 3 granjas ubicadas en Morales, Las Palmas y Bello Horizonte (Cuadro 3) y pertenecían a las etapas de alevino y juvenil. Todas las muestras presentaron las dos bandas de 415 bp y 250 bp (Anexo 5, fig 2).

### **Clonamiento y secuenciamiento de Virus de la tilapia del lago.**

Se seleccionó una muestra positiva a TiLV con presencia de amplicones de 415bp y 250 bp para la amplificación y análisis del genoma viral. Los amplificadores esperados de cada segmento de TiLV con tamaños desde 342 a 1.560 pb se amplificaron. Al ocurrir la amplificación de los 10 segmentos del genoma de TiLV en un solo procesamiento de amplificación demuestra que hay altas copias virales en la muestra. La secuencia obtenida de la muestra aislada fue depositada en la base de datos GenBank con números de acceso MK425010-415019, este fue comparado con los aislamientos virales de Tailandia e Israel ya que estos presentan su secuencia completa en la base de datos GenBank. Estos son los aislados Til-4-2011 (Número de acceso GenBank KU751814-751823) y AD-2016 (Número de acceso GenBank KU552131-552138, 552140, 552142) de Israel y de Tailandia son los aislados TV1 (Número de acceso GenBank KX631921-631930) y WVL18053-01A (Número de acceso GenBank MH319378-319387). El porcentaje de identidad de la secuencia de nucleótidos derivada de una alineación de secuencia múltiple de los 8,305 nucleótidos de consenso mostró que los aislamientos de TiLV Tailandia-Perú, Israel-Perú y Tailandia-Israel comparten 95.38-95.68%, 96.89-97.13%, 96.32-96.71%, respectivamente. Las cepas obtenidas en Perú compartieron una identidad de nucleótidos del 94.62 al 98.48% y una identidad de aminoácidos del 95.58 al 99.43% con las cepas de Tailandia, y

con las cepas de Israel compartió una identidad de nucleótidos del 95.77 al 98.45% y una identidad de aminoácidos del 96.55 al 99.49% entre los segmentos del genoma (Cuadro 4). El árbol filogenético (Anexo 6, fig 1) reveló una relación relativamente más estrecha entre los aislamientos de TiLV de Perú-Israel que los aislamientos de Perú-Tailandia.

### **Análisis histopatológico**

Luego de los resultados observados por el método RT-PCR, se procedió a analizar las histopatologías a las granjas positivas a TiLV. Debido a que la granja acuícola procedente de Rumisapa no resultó positiva a TiLV y VNN, no se evaluó la histopatología de esta. Se observó el tejido hepático, ya que es el principal órgano afectado por TiLV, y se encontró hepatitis sincitial (hepatocitos gigantes multinucleados) lesión común de esta enfermedad, células basófilas, pérdida de la estructura hepática (Anexo 7, fig 1). Estas lesiones fueron encontradas en 2 de 7 peces proveniente de la granja acuícola ubicado en la zona de Morales. No se encontraron lesiones típicas de infección por NNV (vacuolación y necrosis del cerebro y los ojos).

**Cuadro 3.** Tabla de muestras positivas para detección para TiLV por RT-PCR.

<b>Localidad</b>	<b>Granjas</b>	<b>TiLV positivos</b>	<b>Histopatología compatible a TiLV</b>	<b>VNN positivos</b>
Morales	Granja 1	1/10	2/7	0
Rumisapa	Granja 2	0/6	0/4	0
Las Palmas	Granja 3	1*/4	0/4	0
Bello Horizonte	Granja 4	2/7	0/4	0
<b>TOTAL</b>		<b>4/27</b>	<b>2/19</b>	<b>0/27</b>

\*Muestra usada para el secuenciamiento del genoma de TiLV

**Cuadro 4.** Porcentajes de identidad de nucleótidos y aminoácidos entre la cepa de Perú, Israel y Tailandia.

Segmento	% identidad de nucleótido	Perú GenBank acc. no/nt/aa/ Longitud del consenso	Tailandia - Perú			Israel - Perú		
			GenBank acc. no (Tailandia)	Identidad nt	Identidad aa	GenBank acc. no (Israel)	Identidad nt	Identidad aa
1	94.42-97.82%	MK425010/15 60 nt/519 aa/ 1559 nt	KX631921	94.87	98.46	KU751814	95.77	98.46
			MH319378	94.42	98.07	KU552131	95.96	98.27
2	94.47-98.07%	MK425011/13 74 nt/457 aa/ 1194 nt	KX631922	95.47	98.46	KU751815	96.65	98.69
			MH319379	94.47	97.74	KU552132	96.48	98.74
3	95.19-98.97%	MK425012/12 60 nt/419 aa/873 nt	KX631923	94.92	98.81	KU751816	97.06	99.28
			MH319380	95.19	98.62	KU552135	97.48	100
4	96.90-97.75%	MK425013/10 65 nt/354 aa/1065 nt	KX631924	97.09	99.15	KU751817	97.37	98.87
			MH319381	97.09	99.15	KU552133	97.56	99.15
5	94.26-98.24%	MK425014/10 32 nt/343 aa/854 nt	KX631925	94.62	97.35	KU751818	98.45	99.42
			MH319382	94.96	96.83	KU552136	96.60	99.30
6	94.13-98.11%	MK425015/95 4 nt/317 aa/ 954 nt	KX631926	94.65	95.58	KU751819	97.90	97.79
			MH319383	94.86	96.21	KU552134	97.90	97.48
7	94.39-98.47%	MK425016/58 8 nt/195 aa/588 nt	KX631927	94.90	96.92	KU751820	96.09	99.49
			MH319384	94.90	97.95	KU552137	96.60	98.97
8	97.14-98.67%	MK425017/52 5 nt/174 aa/525 nt	KX631928	98.48	99.43	KU751821	98.29	98.85
			MH319385	97.14	98.85	KU552138	98.48	99.43
9	97.44-99.15%	MK425018/35 1 nt/116 aa/351 nt	KX631929	98.01	99.14	KU751822	97.44	96.55
			MH319386	97.44	98.28	KU552140	97.72	97.41
10	97.37-99.12%	MK425019/34 2 nt/113 aa/ 342 nt	KX631930	97.66	97.35	KU751823	97.95	98.23
			MH319387	97.37	97.35	KU552142	97.66	99.12

nt, nucleótidos; aa, aminoácidos

Longitud de consenso, es la longitud de secuencia de nucleótidos de consenso utilizada para la construcción de MLSA y la comparación de segmentos individuales entre los 5 aislados de TiLV (1 Perú, 2 Tailandia, 2 Israel).

Se obtuvieron rangos de % de identidad de nucleótidos a partir de la comparación de secuencia de consenso de los segmentos genómicos respectivos.

## VIII. DISCUSIÓN

Se confirmó la presencia de TiLV en tilapias muestreadas en el departamento de San Martín, mediante prueba de PCR específica, secuencia del genoma e histopatología complementaria. Aunque la prevalencia del virus en Perú no está clara dado que falta mayor información en el país, la detección de este virus en peces cultivados aparentemente sanos y en ambas etapas muestreadas (alevines y juveniles) puede dar indicios de que probablemente la prevalencia del virus es alta. El presente estudio y publicaciones sobre infección subclínica de TiLV (Senapin et al., 2018) demuestran que TiLV no solo se encuentra en mortalidades inusuales masivas sino que también en poblaciones de peces de aspecto normal sin presencia de signos clínicos. Esta información es de importancia ya que ayudaría en mejorar las medidas de control y bioseguridad, como realizar la detección de TiLV antes del ingreso de tilapias a la granja acuícola, cuarentena de los animales, mayor regulación en el movimiento de tilapias a nivel nacional e internacional y cuidados más rigurosos en la crianza de los animales.

En las histopatologías realizadas a las muestras de las granjas con resultados positivos, se encontraron láminas con presencia de lesiones correspondientes a estado crónico, como infiltración de linfocitos y melanina, este resultado necesariamente no nos confirma que se trate de TiLV en estado crónico ya que puede ser causado por otros patógenos que hayan afectado a la tilapia como por ejemplo parásitos. Es por esta razón que no es considerada en el estudio.

Las lesiones observadas a nivel hepático fueron hepatocitos gigantes multinucleados (hepatitis sincitial), siendo esta la característica histopatológica

más común que se encuentra en las tilapias afectadas por TiLV (Tsofack *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017a; Behera *et al.*, 2018; Amal *et al.*, 2018).

El método de prueba confirmatoria que es mencionado por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) es una prueba RT-PCR semi-nested, cuyo autor es Dong *et al.*, 2017a, pero según Jansen *et al.*, 2018, es importante realizar la combinación del método de detección por PCR y el secuenciamiento del producto para confirmación de la presencia del virus, debido a que las pruebas moleculares existentes aún no han sido validadas. En el presente estudio se realizó el secuenciamiento del producto obtenido mediante el método RT-PCR semi-nested, obteniendo la amplificación de los 10 segmentos que contiene TiLV en la cepa de Perú, este resultado fue comparado con las cepas de Israel y Tailandia, ya que estas cepas presentan todo el genoma disponible, en total hay 4 genomas disponibles en la base de datos GenBank, 2 pertenecientes a Israel y 2 de Tailandia (Al-Hussinee *et al.*, 2018; Bacharach *et al.*, 2016; Surachetpong *et al.*, 2017). Se realizó el análisis basado en segmentos individuales (% identidad de nucleótidos y aminoácidos), el cual respaldó los datos derivados del MLSA de las secuencias del genoma completo, demostrando que el aislado del presente estudio y la cepa de Israel son similares, presentando un porcentaje de identidad mayor al 95%. También se observa que entre los 10 segmentos, el segmento 6 tenía una variabilidad de secuencia relativamente alta (94.13-98.11% de identidad de nucleótidos) mientras que el segmento 9 estaba más conservado (97.44-99.15% de identidad de nucleótidos).

El análisis filogenético basado en MLSA pudo agrupar estas cepas en dos clados, clado israelí y tailandés. La agrupación de la cepa de Perú en el clado israelí

sugiere que el virus de estos dos países podría tener el mismo origen, esto nos ayuda a tener un panorama sobre el probable ingreso del agente viral a nuestro país, siendo de importancia en el control de importación y procedencia de tilapias vivas para la crianza acuícola.

La secuencia completa obtenida de la muestra aislada fue depositada en la base de datos GenBank con números de acceso MK425010-415019, siendo el primer estudio que reporta toda la secuencia de la cepa TiLV encontrada en Perú.

La similitud entre las cepas de Perú e Israel es probable que se haya dado por el movimiento de tilapias desde África en 1944 llegando a más de 90 países. En 1988 lanzó un programa por el cual se transfirió germoplasma de *Oreochromis niloticus* (tilapia del Nilo) hacia el sudeste asiático, causando que el agente haya circulado en todo el mundo a través de la exportación e importación de peces vivos infectados en fase subclínica (Jansen *et al.*, 2018), y de esta manera haya llegado al Perú, ya que la crianza de esta especie comenzó entre los años 50 y 70 mediante la Dirección General de Caza y Pesca del Ministerio de Fomento y Agricultura (Baltazar P. M., 2007).

Para realizar comparaciones entre los países de Sudamérica, se necesita tener todo el genoma completo en la base de datos GenBank de los países afectados como Ecuador y Colombia, esto podría ayudarnos a tener mayor claridad sobre la identidad entre los países de este continente. De igual forma el tener la secuenciación de todos los países afectados a nivel mundial ayudaría en la comprensión de la evolución y el origen de TiLV.

Existen estudios en los cuales se analizaron el secuenciamiento de cepas aisladas de TiLV provenientes de Ecuador y cepa de Israel en el cual demuestran una similitud entre los dos países (Bacharach *et al.*, 2016; Tsofack *et al.*, 2016), siendo probable que la cepa de Ecuador también sea similar a la cepa aislada en el presente estudio y tengan el mismo origen.

El estrés es uno de los factores asociados al desencadenamiento de la aparición de la enfermedad del Virus de la tilapia del lago (Ferguson *et al.*, 2014), esto puede estar causado por alteraciones en el hábitat de la especie, como la temperatura, según Eynyor *et al.*, 2014, esto puede asociarse a brotes de enfermedades con estacionalidad. El aumento de temperatura en las localidades estudiadas perteneciente a San Martín- Perú, se da desde Noviembre hasta Marzo llegando a 33°C, según Senamhi (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrobiológica del Perú), siendo estos meses la época donde se detectaron casos de TiLV, por lo que la estacionalidad puede relacionarse a la aparición de la enfermedad en la región San Martín.

Las granjas acuícolas en el país generalmente hacen uso de los recursos hídricos como ríos para la crianza de los animales, por lo que puede ser una vía de ingreso del virus, al no tener un tratamiento previo antes de ser desechada el agua usada en el centro acuícola, esta puede llegar a una granja cercana e infectar a los peces, de igual forma el no tener un adecuado método de eliminación de peces muertos y que sean desechados en los ríos puede llegar a jaulas o centros de crianza causando el brote de la enfermedad. Por esta razón es importante las medidas de prevención como medidas de bioseguridad que incluyan tratamiento de agua y barreras en el ingreso y salida, desinfección, buenas prácticas de manejo.

Otro factor que puede haber ocasionado la aparición del agente viral en el país es la posibilidad de que esta enfermedad este afectando especies nativas que viven en el mismo hábitat de la tilapia en el Perú, y se presente como reservorio para la transmisión de la enfermedad, ya que existe reporte de TiLV con presencia de signos clínicos en carpas en Malasia (Abdullah *et al.*, 2018) y en el *Osphronemus goramy* (gurami gigante), el cual presentó signos clínicos de la enfermedad y lesiones histopatológicas en el hígado que se encuentran comúnmente en infecciones por TiLV, pero con mortalidad baja (Jaemwimol *et al.*, 2018). Por lo que debería tomarse importancia en la investigación de especies nativas frente a TiLV.

Es necesario realizar mayores estudios sobre la cepa TiLV peruana ya que sería importante conocer la virulencia y si está relacionada a la variación genética, ya que se ha visto variabilidad en el porcentaje de mortalidad entre los países afectados y las etapas en las que afecta este agente viral; y también observar si esta cepa afecta a otros órganos como bazo, estómago, riñón, páncreas y branquias, debido a que hay diferencias en las lesiones reportadas por los países afectados con TiLV.

Se han descrito diferencias en los signos clínicos entre los países afectados, en el caso de las cepas comparadas como Israel y Tailandia, los signos clínicos descritos en Israel son, letargo, alteraciones oculares, erosiones y oscurecimiento en la piel, a nivel histopatológico se observó endoftalmitis, focos de gliosis y manguitos perivasculares en la corteza cerebral y congestión renal; mientras que en Tailandia incluyen los signos clínicos mencionados anteriormente más hinchazón abdominal y palidez de las branquias e hígado, y lesiones

histopatológicas como necrosis pancreática e infiltración de linfocitos en los túbulos renales y células sincitiales en el cerebro (Jansen *et al.*, 2018). En Perú se reportaron lesiones como úlceras en piel, exoftalmos y opacidad ocular, y peces varados, a nivel histopatológico se observó hepatitis sincitial, infiltración de linfocitos perivasculares, melanomacrófagos, sincitos a nivel intestinal, manguitos perivasculares en el cerebro (OIE, 2018b). Esta diferencia puede darnos un indicio que hay probabilidad que la cepa de TiLV que afectan en distintos países presente variabilidad y que la predisposición por diversos tejidos puede variar.

No se encontraron muestras positivas a encefalopatía y retinopatía viral, pero esto no descarta que la enfermedad no se encuentre en el país ya que esta enfermedad ocurre en agua salinas y dulces, y existen estudios de tilapias con presencia del virus sin mostrar signos clínicos (Prihartini *et al.*, 2015), por lo que debería realizarse un monitoreo estratégico proactivo. Es posible detectar el virus con muestras de hígado, por lo que también se considera un órgano afectado por ERV. Al igual que TiLV esta enfermedad también es desencadenada por el estrés (Costa & Thompson, 2016). Debido a las similitudes entre estas dos enfermedades, se puede considerar a VNN como un diagnóstico diferencial en casos de alta mortalidad en tilapias.

El artículo de Machimbirike *et al.* (2019) menciona que además de TiLV, se han documentado otros siete virus en tilapias. Por lo tanto, el programa de vigilancia debe considerarse no solo para el TiLV sino también para otros virus, al menos en casos de muertes inexplicables y poblaciones de peces importados con el fin de evitar la propagación involuntaria de los agentes infecciosos.

Las limitantes que ocurrieron en este estudio fue la recolección de muestras ya que algunos productores no permiten el ingreso a sus granjas, otras de las limitantes fue el traslado de las muestras ya que algunas no se preservaron de manera adecuada y no se pudieron observar lesiones en la histopatología.

Los resultados positivos al Virus de la tilapia del lago (TiLV) obtenido en este estudio evidencian la presencia de TiLV en animales aparentemente sanos en el departamento de San Martín - Perú, siendo un punto importante que debe ser incluido en la prevención de esta enfermedad en todos los departamentos de mayor producción de tilapia en el país, ya que la presencia de estos casos puede ser un factor que cause la transmisión en el país, por lo que debe ser fundamental solicitar certificados sanitarios en el país, un punto que debe ser tomado como obligatorio en el movimiento de tilapias en exportaciones e importaciones.

## **IX. CONCLUSIONES**

- Se encontraron 4 muestras positivas por RT-PCR a Virus de la tilapia del lago en el departamento de San Martín – Perú. Estas muestras provienen de las localidades de Morales, Las Palmas y Bello Horizonte. Este hallazgo fue reportado ante SANIPES, entidad encargada de la sanidad acuícola en el país, posteriormente envían la notificación ante la OIE.
- Se encontraron lesiones típicas de TiLV en el tejido hepático, este es el principal órgano en el que afecta este patógeno. Se observaron lesiones en 2 muestras de la zona de Morales.
- Como resultado del análisis filogenético post secuenciamiento, se observó que el aislado obtenido en este estudio y el aislado israelí presentan un 76% de similitud y se encuentra dentro del clado de Israel, sugiriendo que posiblemente sean del mismo origen.

## **.X. RECOMENDACIONES**

- Es importante realizar más estudios sobre TiLV ya que aún no está claro si la virulencia del virus depende de la cepa o si necesita de factores inductores como factores ambientales para manifestarse la enfermedad en los peces.
- Se debería implementar el monitoreo de las tilapias aparentemente sanas en todas las edades, asimismo un análisis filogenético de las cepas virales ya que ayudaría a encontrar la probable fuente de inicio de la enfermedad y así realizar un control estricto del ingreso de ovas o larvas al país.
- Debido a que la línea celular para replicar el virus invitro es de los peces cabeza de serpiente (snakeheads) y existe reporte de TiLV con signos clínicos en carpas en Malasia. Esto puede dar la posibilidad de que otras especies puedan ser afectadas en estado de portadores o reservorios, por lo que se recomienda investigar este virus en especies nativas que vivan en el hábitat de la tilapia en el Perú.
- Con los resultados obtenidos para Encefalopatía y Retinopatía Viral, no confirma al 100% que la enfermedad no se encuentra en el país, por lo que se recomienda realizar la detección y monitoreo de esta enfermedad en otros lugares del país.
- Es importante realizar mayores estudios con respecto al muestreo evitando la mortalidad innecesaria, como por ejemplo la mucosa, el cual ya se está estudiando, ver si se puede detectar el virus de TiLV en animales sanos usando este tipo de muestreo.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdullah, A., Ramly, R., Mohammad Ridzwan, M. S., Sudirwan, F., Abas, A., Ahmad, K., Murni, Munira & Kua, B. C. 2018. First detection of tilapia lake virus (TiLV) in wild river carp (*Barbonymus schwanenfeldii*) at Timah Tasoh Lake, Malaysia. *Journal of fish diseases*. 41(9), 1459-1462.

Adams J., Michael, Lefkowitz J., Elliot, King Q. M., Andrew, Harrach Balázs, Harrison L., Robert, Knowles J., Nick, Kropinski M., Andrew, Krupovic Mart, Kuhn H., Jens, Mushegian R., Arcady, Nibert Max, Sabanadzovic Sead, Sanfaçon Hélène, Siddell G., Stuart, Simmonds Peter, Varsani Arvind, Zerbini Murilo, Francisco, Gorbalenya E., Alexander, Davison J., Andrew. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of virology*. 162(8), 2505-2538.

Al-Hussinee L, Subramaniam K, Ahasan MS, Keleher B, Waltzek TB. 2018. Complete genome sequence of a Tilapia lake virus isolate obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genome Announc.* 6(26): e00580-18. doi:10.1128/genomeA.00580-18.

Amal MNA, Koh CB, Nurliyana M, Suhaiba M, Nor-Amalina Z, Santha S *et al.* 2018. A case of natural co-infection of tilapia lake virus and *Aeromonas veronii* in a Malaysian red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. *Aquaculture* 485: 12–16.

Bacharach, E., Mishra, N., Briese, T., Zody, M. C., Tsofack, J. E. K., Zamostiano, R. Toussaint, N. C., Ng, J., Nitido, A., Corvelo, A., Nielsen, S. C., Horning, M., Del Pozo, J., Bloom, T., Ferguson, H., Eldar, A., & Lipkin, W. 2016. Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia. *MBio*, 7(2), e00431-16.

Bacharach, E., Mishra, N., Briese, T., Eldar, A., Lipkin, W.I., Kuhn, J.H., 2016b. ICTV Taxonomic Proposal 2016. 016a-dM.A.v2.Tilapinevirus. Create the Unassigned Genus Tilapinevirus. <http://www.ictv.global/proposals-16/2016.016a-dM.A.v2.Tilapinevirus.pdf>.

Baltazar, P. M. 2007. La Tilapia en el Perú: acuicultura, mercado, y perspectivas. *Revista Peruana de Biología*, 13(3), 267-273.

Behera BK, Pradhan PK, Swaminathan TR, Sood N, Paria P, Das A *et al.* 2018. Emergence of tilapia lake virus associated with mortalities of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture* 484: 168–174.

Bigarré, L., Cabon, J., Baud, M., Heimann, M., Body, A., Lieffrig, F., & Castric, J. 2009. Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *Journal of fish diseases*, 32(8), 667-673.

Charoendat, U., Areechon, N., Srisapoome, P., Chantasart, D. Efficacy of synthetic eugenol as an anesthetic for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). 2009. *Kasetsart Journal: Natural Sciences*, 43(5): 132-140.

Costa, J. Z., & Thompson, K. D. 2016. Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & shellfish immunology*, 53, 35-49.

Dalla Valle L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P. & Colombo L. 2000. Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of Fish Diseases* 23, 321–327.

De la Peña, L. D., Suarnaba, V. S., Capulos, G. C., & Santos, M. N. M. 2011. Prevalence of viral nervous necrosis (VNN) virus in wild-caught and trash fish in the Philippines. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*, 31, 129-138.

Dirección de Acuicultura. 2014. El cultivo de tilapia y su desarrollo en el Perú, de Ministerio de la Producción. [Acceso el 15 de septiembre del 2017]. Disponible en:[http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com\\_content&view=article&id=256:cultivotilapiaperu&catid=22:actividades&Itemid=76](http://rnia.produce.gob.pe/index.php?option=com_content&view=article&id=256:cultivotilapiaperu&catid=22:actividades&Itemid=76)

Dirección General de Acuicultura. 2009. Especies cultivadas en el Perú. De Ministerio de la Producción. [Acceso el 14 de Octubre del 2017]. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/boletines/FICHAS%20PRINCIPALES%20ESPECIES.pdf>

Doan, Q. K., Vandeputte, M., Chatain, B., Morin, T., & Allal, F. 2016. Viral encephalopathy and retinopathy in aquaculture: a review. *Journal of fish diseases*. 40(5), 717-742.

Dong, H.T., Siriroob, S., Meemetta, W., Santimanawong, W., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Khunrae, K., Rattanarojpong, T., Vanichviriyakit, R., Senapin, S.,

2017a. Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. *Aquaculture* 476, 111–118.

Dong, H.T., Siriroo, S., Meemetta, W., Santimanawong, W., Gangnonngiw, W., Pirarat, N., Khunrae, K., Rattanarojpong, T., Vanichviriyakit, R., Senapin, S., 2017b. A Warning and an Improved PCR Detection Method for Tilapia Lake Virus (TiLV) Disease in Thai Tilapia Farms. *Aquaculture*, 476(April), 111-118.

Eyngor, M., Zamostiano, R., Tsofack, J. E. K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., Lev, M., Huryitz, A., Galeotti, M., Bacharach, E. & Eldar, A. 2014. Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4137–4146. DOI: 10.1128/JCM.00827-14

Fathi M, Dickson C, Dickson M, Leschen W, Baily J, Muir F. 2017. Identification of tilapia lake virus in Egypt in Nile tilapia affected by ‘summer mortality’ syndrome. *Aquaculture* 473: 430–432.

Ferguson, H. W., Kabuusu, R., Beltran, S., Reyes, E., Lince, J. A., & Del Pozo, J. 2014. Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): a case report. *Journal of fish diseases*, 37(6), 583-589.

[FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2004. Especie de cultivo. En *Manual de Cultivo de Tilapia*. Lima - Perú: Alfredo R. Palomino Ramos. 33 p.

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Outbreaks of Tilapia Lake Virus (TiLV) Threaten the Livelihoods and Food Security of Millions of People Dependent on Tilapia Farming. FAO, Rome. Global Information and Early Warning System (GIEWS) Special Alert No. 338 -

Global, 26 May 2017. [Cited 28 Jan 2019.] Available from <http://www.fao.org/documents/card/en/c/3ce1da5b-1529-4e7c-8b88-7adfef8d138c/>

Gomez D.K., Sato J., Mushiake K., Isshiki T., Okinaka Y. & Nakai T. 2004. PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Disease*. 27, 603–608.

Harvey D. 2016. Aquaculture trade—recent years and top countries. United States Department of Agriculture, Washington, DC.

Jaemwimol, P., Rawiwan, P., Tattiyapong, P., Saengnual, P., Kamlangdee, A., & Surachetpong, W. 2018. Susceptibility of important warm water fish species to tilapia lake virus (TiLV) infection. *Aquaculture*. 497, 462-468.

Jansen, M. D., Dong, H. T., & Mohan, C. V. 2018. Tilapia lake virus: a threat to the global tilapia industry?. *Reviews in Aquaculture*. 15pp.

Keawcharoen, J., Techangamsuwan, S., Ponpornpisit, A., Lombardini, E. D., Patchimasiri, T., & Pirarat, N. 2015. Genetic characterization of a betanodavirus isolated from a clinical disease outbreak in farm-raised tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) in Thailand. *Journal of fish diseases*, 38(1), 49-54.

Koesharyani I, Gardenia L, Widowati Z, Khumaira K, Rustianti D. 2018. Studi kasus infeksi Tilapia lake virus (TiLV) pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Riset Akuakultur* 13: 85–92.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870–1874.

Machimbirike, V. I., Jansen, M. D., Senapin, S., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., & Dong, H. T. 2019. Viral infections in tilapines: More than just tilapia lake virus. *Aquaculture*. pp. 1-49

Mugimba K. K., Chengula A. A., Wamala S., Mwege E. D., Kasanga C. J., Byarugaba D. K, Mdegela R. H, Tal S., Bornstein B., Dishon A., Mutoloki S., David L., Evensen, Munang'andu H. M., 2018. Detection of tilapia lake virus (TiLV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria. *Journal of Fish Diseases*. 41(8), 1181-1189.

Munday, B. L., Kwang, J. and Moody, N. 2002 Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 25: 127–142.

Nicholson P, Fathi MA, Fischer A, Mohan C, Schieck E, Mishra N *et al.* 2017. Detection of tilapia lake virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015. *Journal of Fish Diseases* 40: 1925–1928.

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017a. Tilapia lake virus (TiLV) - A novel orthomyxo - like virus. *Aquatic Animal Health Code* 19th ed. 2 pp.

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2018a. Chapter 1.1.1. Viral encephalopathy and retinopathy. In: *OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, pp. 1-20.

Pacheco, M. M., Diego, M. A. P., & García, P. M. 2017. Atlas de Histología vegetal y animal. Alambique: Didáctica de las ciencias experimentales, (90), 76-77.

Prihartini Christi N., Yanuhar U. & Maftuch. 2015. Betanodavirus Infections in Tilapia seed (*Oreochromis sp.*), in Indonesia. Journal of Life Science Biomedicine. 5(4): 106-109.

Saldaña, G. 1985. Policultivo semi-intensivo experimental de gamitana *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) con tilapia nilótica *Oreochromis hornorum* (Trewavas, 1973) x *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1766) en estanques. Hidrobios, 12, 1-2 pp.

Senapin, S., Shyam, K. U., Meemetta, W., Rattanarojpong, T., & Dong, H. T. 2018. Inapparent infection cases of tilapia lake virus (TiLV) in farmed tilapia. Aquaculture, 487, 51-55.

Shetty, M., Maiti, B., Santhosh, K. S., Venugopal, M. N., & Karunasagar, I. 2012. Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. Indian Journal of Virology, 23(2), 114-123.

Surachetpong W, Janetanakit T, Nonthabenjawan N, Tattiyapong P, Sirikanchana K, Amonsin A. 2017. Outbreaks of tilapia lake virus infection, Thailand, 2015–2016. Emerging Infectious Diseases 23: 1031–1033.

Tsofack, J. E. K., Zamostiano, R. Watted, S., Berkowitz, E., Mishra, N., Briese, T., Lipkin, W.I., Kabuusu, R.M., Ferguson, H., del Pozo, J., Eldar, A., and Bacharach, E. 2016. Detection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in Clinical Samples by Culturing and nested reverse transcription - PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(3), 759-767.

Vera, Andrés. 2017. Pobladores de Lancones piden investigar muerte de peces en reservorio de Poechos. *El Regional Piura*, p. 1.

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017b. Tilapia Lake Virus Disease, Chinese Taipei. Immediate Notification. [Cited 20 April 2018.] Available from [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=240](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=240)

33

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017c. Hepatitis sincitial de la tilapia, Israel. Immediate Notification. [Cited 20 April 2018.] Available from [www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=23836](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=23836)

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017d. Tilapia Lake Virus Disease, Thailand. Immediate Notification. [Cited 20 April 2018.] Available from [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapEventSummary&reportid=23832](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=23832)

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017e. Tilapia Lake Virus Disease, Malaysia. Immediate Notification. [Cited 20 April 2018.] Available from [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=24809](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=24809)

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017f. Tilapia Lake Virus (TiLV), Philippines. Immediate Notification. [Cited 12 July 2018.] Available from [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=25278](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=25278)

[OIE] World Organisation for Animal Health. 2018b. Tilapia Lake Virus, Peru. Immediate Notification. [Cited 15 Oct 2018.] Available from [http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=26027](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=26027)

## XII. ANEXOS

### Anexo 1. Mapa de los sitios muestreados en el departamento de San Martín

(Fuente: Google Maps®)



### Anexo 2. Protocolo RT-PCR semi-nested para detección de TiLV (Fuente: Dong *et al.*, 2017b).

Step	Reagents	Volume (µl)	Thermocycler parameters
First RT-PCR	100-400 ng of total RNA	1.5	Reverse transcription
	2X buffer	12.5	50°C, 30 min
	10 µM primer Nested ext-1	1	Denaturation 94°C, 2 min
	10 µM primer ME1	1	25 cycles of
	SuperScript One-Step RT/Platinum <i>Taq</i> mix (Invitrogen)	0.5	▪ Denaturation 94°C, 30 s
	Sterile water	8.5	▪ Annealing 60°C, 30 s
	Total reaction	25	▪ Extension 72°C, 30 s
Semi-nested PCR	The first PCR product	1	Final 72°C, 5 min
	10X buffer	2	Denaturation 94°C, 2 min
	10 mM dNTP	0.4	25 cycles of
	10 µM primer 7450/150R/ME2	0.5	▪ Denaturation 94°C, 30 s
	10 µM primer ME1	0.5	▪ Annealing 60°C, 30 s
	<i>Taq</i> DNA polymerase (5 units/µl)	0.2	▪ Extension 72°C, 30 s
	Total reaction	20	Final 72°C, 5 min

**Anexo 3.** Protocolo RT-PCR nested para detección de VNN por Dalla Valle *et al.*  
(2000)

<b>Pasos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Vol.</b>	<b>Parámetros del termociclador</b>
1° RT-PCR	100-400 ng of total RNA	2 ul	Incubación 54°C por 30 min
	2X buffer	12.5 ul	Desnaturalización 94°C por 2 min
	0.4 mM primer VNNV1	1 ul	35 ciclos de
	0.4 mM primer VNNV2	1 ul	- Desnaturalización 95°C por 30 seg.
	SuperScript One-Step RT/Platinum Taq mix (Invitrogen)	0.5 ul	- Annealing 57°C por 30 seg.
	Sterile wáter	8 ul	- Extensión 72°C por 45 seg.
			Final 72°C por 10 min
Nested PCR	The first PCR product	2 ul	Desnaturalización 94°C, 5 min.
	5x PCR BIO	4 ul	30 ciclos de
	0.2 mM primer VNNV3	0.5 ul	- Desnaturalización 94°C por 30 seg.
	0.2 mM primer VNNV4	0.5 ul	- Annealing 62°C 30 seg.
	Taq PCR BIO	0.25 ul	- Extensión 72°C 30 seg.
	Sterile water	12.75ul	Final 72°C por 5 min

**Anexo 4.** Protocolo de transformación para secuenciamiento de TiLV (Fuente: Promega)

**2.D. Transforming Bacteria with Your Clone**

**Materials Required**

- Single-Step KRX Competent Cells (Cat.# L3002)
  - vector with ligated insert
  - uncut vector positive transformation control
  - cut vector negative transformation control
  - 17 × 100mm polypropylene tubes (BD Falcon Cat.# 352059) or 1.5ml microcentrifuge tubes
  - ice bath
  - 42°C water bath
  - 37°C shaking water bath or incubator
  - pipettors (0.5–10µl and 10–200µl) and appropriate sterile pipet tips
  - LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates
  - SOC medium
  - glass "hockey stick" for plating cells on selective plates
1. Prepare LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates (see Section 3).
  2. Centrifuge the ligation reactions briefly.
  3. Place the high-efficiency Single-Step KRX Competent Cells in an ice bath until just thawed (5 minutes). Mix cells by gently flicking the tube.
  4. Add the 2µl of the ligation reaction to one tube of thawed cells. Add 0.1ng of uncut plasmid to a second tube of thawed cells for the positive control tube. Add 0.1ng of cut plasmid to a third tube of thawed cells for the negative control. Gently flick the tubes and incubate on ice for 5 minutes.
  5. Heat-shock the cells for 15–20 seconds in a water bath at exactly 42°C. DO NOT SHAKE. Immediately return the tubes to ice for 2 minutes.
  6. Add 950µl of room temperature SOC medium to the ligation reaction transformations and 900µl to the transformation control tube. Incubate for 1.5 hours at 37°C with shaking (~150rpm).
  7. Plate 100µl of each transformation culture onto duplicate LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates. For the transformation control, a 1:10 dilution with SOC is recommended prior to plating.
  8. Incubate plates overnight at 37°C. Select white colonies.

**Anexo 5. Resultados de RT-PCR para TiLV y VNN**

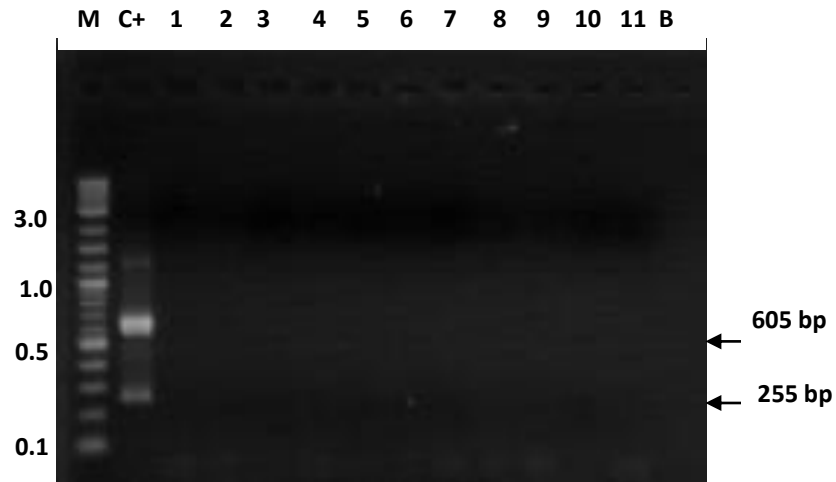


Figura 1. Muestras negativas para VNN mediante RT-PCR nested en muestras de peces aparentemente sanos. (M) marcador de ADN (New England Biolabs), Del 1-11 son muestras de peces, (C +) control positivo y (B) blanco. Fuente: propia

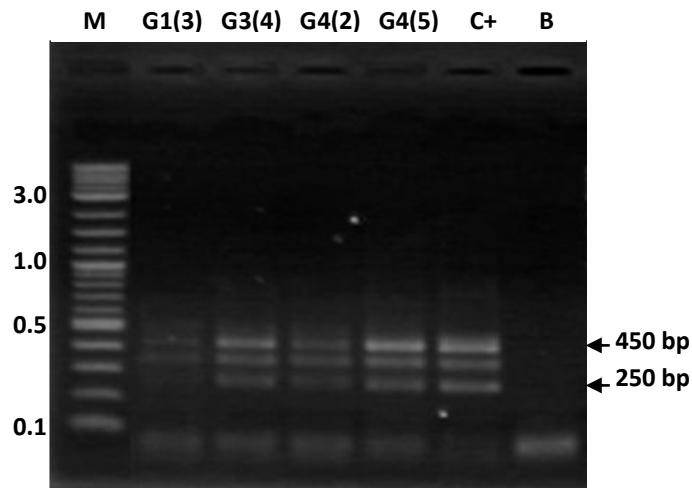


Figura 2. Muestras positivas para TiLV mediante RT-PCR semi-nested en muestras de peces aparentemente sanos. (M) marcador de ADN (New England Biolabs). Las muestras de peces de la granja 1 (muestra 3), la granja 3 (muestra 4) y la granja 4 (muestra 2 y 5) presentan muestras positivas para TiLV, la granja 3 (muestra 4) se seleccionó para secuenciarse. (C +) control positivo; (B) blanco. Fuente: propia

**Anexo 6.** Árbol filogenético del aislado de Perú, Tailandia e Israel. Relación entre los 5 aislamientos de TiLV de Perú (presente estudio), Israel (Til-4-2011 y AD-2016) y Tailandia (WVL18053-01A y TV1).

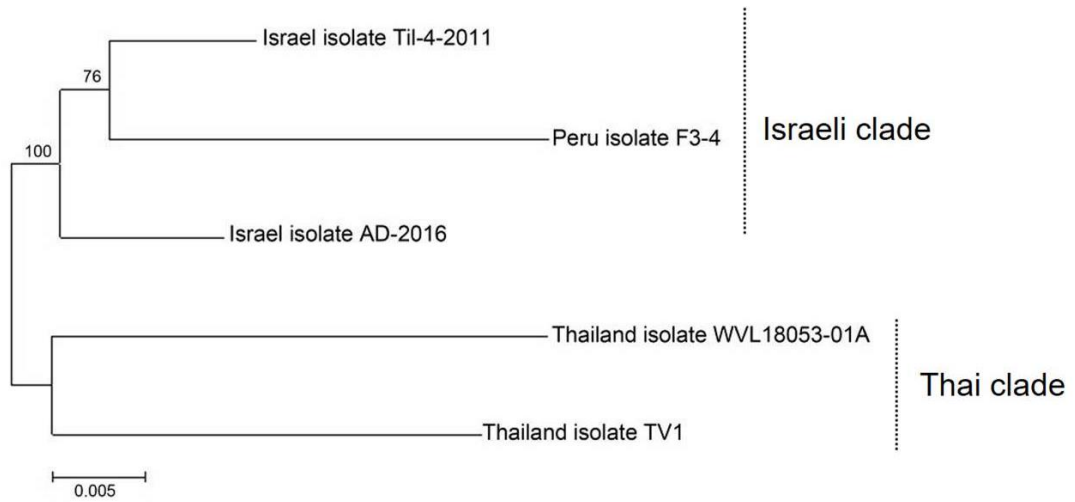


Figura 1. Se observa relación más estrecha entre los aislamientos de TiLV de Perú e Israel que los aislamientos de Perú y Tailandia.

**Anexo 7.** Histopatología de tejido hepático de tilapia proveniente de granja positiva a TiLV.

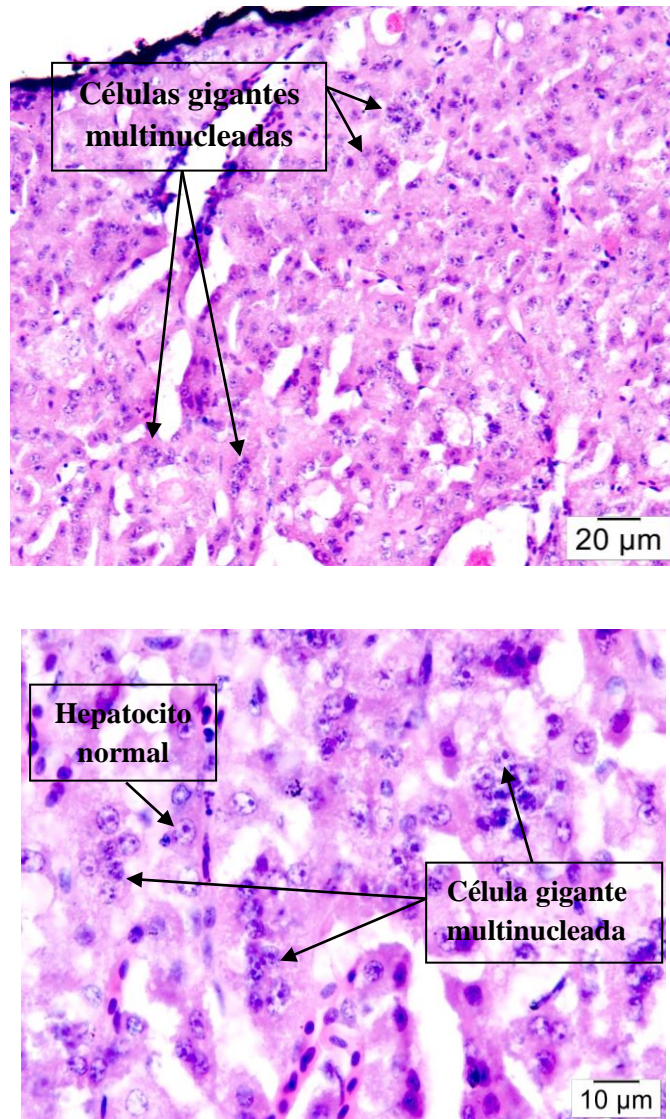


Figura 1. Histopatología de tejido hepático con tinción H&E en el cual se observa la presencia de hepatocitos gigantes con múltiples núcleos (Hepatitis sincitial) basófilos, pérdida de la estructura hepática, y células normales con un solo núcleo.