Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Caracterización molecular del segmento 4 del virus de la tilapia del lago (TILV) aislados de tilapias procedentes de centros de cultivo en el Perú

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Acuícola

AUTOR

Shirley Marie PALACIOS HUAYTA

ASESOR

Mg. Nieves Nancy SANDOVAL CHAUPE

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

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

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

Referencia bibliográfica

Palacios S. Caracterización molecular del segmento 4 del virus de la tilapia del lago (TILV) aislados de tilapias procedentes de centros de cultivo en el Perú [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Shirley Marie Palacios Huayta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41710121
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5526-9512
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Nieves Nancy Sandoval Chaupe
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07011047
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-0112-9183
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	15725076
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Hermelinda Rivera Gerónimo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07969704
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Yessica Lisette Ortega Asencios
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42062482

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.4 Histología, Embriología, Ictiopatología y Patología Veterinaria
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Sanidad Acuícola-GRISANAC
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. A18081221 PCONFIGI
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria País: Perú Departamento: LimaProvincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Circunvalación Cdra. 28 s/n Latitud: -12.08121 Longitud: -76.98775
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2019
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS MODALIDAD VIRTUAL PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SANIDAD ACUÍCOLA

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 10:00 horas del día viernes 10 de setiembre del 2021, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo, Mg. Yessica Lisette Ortega Asencios y la Mg. Nieves Nancy Sandoval Chaupe (Asesora), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis titulada:

"Caracterización molecular del segmento 4 del virus de la tilapia del lago (TILV) aislados de tilapias procedentes de centros de cultivo en el Perú", presentado por la Bachiller:

SHIRLEY MARIE PALACIOS HUAYTA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **EXCELENTE, 19 (DIECINUEVE)** _____

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Acuícola, a la Bachiller Shirley Marie Palacios Huayta.

Siendo las 12:15 horas del día viernes 10 de setiembre de 2021, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

UNMSM Firmado digitalmente por MATURRANO HERNANDEZ Abelardo Lenin FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 25.10.2021 16:38:07 -05:00

…….
Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández (P.P.D.E.)
Presidente

……..……..
Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo (P.P.D.E.)
Miembro

…….
Mg. Yessica Lisette Ortega Asencios
Miembro externo

UNMSM Firmado digitalmente por SANDOVAL CHAUPE Nieves Nancy FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.10.2021 23:07:42 -05:00

..……..
Mg. Nieves Nancy Sandoval Chaupe (P.P.D.E.)
Miembro (Asesor)

UNMSM Firmado digitalmente por GAVIDIA CHUCAN Cesar Miguel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 26.10.2021 10:27:35 -05:00

……
Dr. Cesar Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres por ser mi ejemplo de perseverancia y superación.

A mis bebes (S&G) que me acompañaron todas esas noches de estudio y en los momentos difíciles de mi vida, siendo los causantes de muchas sonrisas y carcajadas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque hace posible superar cada obstáculo en la vida, permitiéndome cumplir mis anhelos.

A mis padres por estar conmigo en cada paso que doy y ser mi motivación de seguir alcanzando mis sueños…los amo mucho.

A la Mg. Nieves Sandoval, por haberme otorgado su confianza desde un primer momento y haber accedido asesorarme en este trabajo de investigación, siempre dispuesta a absolver mis dudas y animándome a seguir.

A los Mg. Alberto Manchego Sayán y Mg. Gina Castro Sanguinetti, por su apoyo crucial en la realización de la tesis.

A todo el grupo de tesistas y personal del laboratorio que hicieron más llevadero está etapa, generando un ambiente agradable de trabajo.

A los PhD. Luis Luna Espinoza y PhD. Miguel Rojas Montes por impartir sus conocimientos y brindarme consejos durante ésta etapa de formación profesional.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de UNMSM por financiar económicamente mi tesis, a través del Proyecto "Diversidad genómica de las cepas del virus de la tilapias del lago (TiLV) detectadas en centros de productores de tilapia en el Perú", con código: A18081221 – PCONFIGI.

ÍNDICE

DEDICATORIA ii

AGRADECIMIENTOS iii

ÍNDICE vi

RESUMEN v

ABSTRACT viii

LISTA DE CUADROS ix

LISTA DE FIGURAS x

I.INTRODUCCIÓN 1

II.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

2.1. Definiciones 3

2.2. Estado de la acuicultura 3

2.2.1. En el mundo 3

2.2.2. En el Perú 6

2.3. Tilapia (*Oreochromis spp.)* 12

2.3.1. Clasificación taxonómica 12

2.3.2. Morfología 14

2.3.3. Alimentación 14

2.3.4. Reproducción 14

2.3.5. Introducción en el Perú 16

2.4. ENFERMEDADES EN TILAPIAS 17

2.4.1. Estrés y enfermedades en tilapia 18

2.4.2 Enfermedades virales 18

2.4.2.1 Virus de la tilapia del lago (TiLV) 19

Agente etiológico 20

Clasificación taxonómico 20

Vías de transmisión 21

Especie susceptible 21

Factores de riesgo 22

Signos clínicos e histopatología 22

Distribución Geográfica 24

Métodos de diagnóstico 25

Control 25

TiLV en el Perú 28

III. MATERIALES Y MÉTODOS 26

3.1. Lugar de Estudio 26

3.2. Material Experimental 26

3.3. Metodología 27

3.3.1. Extracción de ARN 27

3.3.2. Síntesis de ADNc 27

3.3.3. RT-PCR anidada para el diagnóstico del TiLV 28

3.3.4. RT- PCR para la amplificación del segmento 4 del TiLV 29

3.3.5. Electroforesis en gel de agarosa 30

3.3.6. Secuenciación 30

3.3.7. Análisis de secuencia de nucleótidos y análisis filogenético de TiLV 31

3.3.8. Análisis de estructura de la proteína hipotética 31

IV.RESULTADOS 32

4.1. Detección del TiLV en el Perú 32

4.2. Análisis de secuencia del segmento 4 del TiLV 33

4.3. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de TiLV 34

4.4. Análisis de estructura de la proteína hipotética 36

V. DISCUSIÓN 38

VI. CONCLUSIONES 42

VII. RECOMENDACIONES 43

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 44

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo la caracterización molecular del segmento 4 del virus de la tilapia del lago (TiLV) y determinar su posible función. El estudio se realizó con muestras positivas, provenientes de tilapias de cultivo de los departamentos de Piura y San Martín, en un brote ocurrido a finales del 2017 e inicios del 2018.Se seleccionaron al azar, cinco muestras positivas a TiLV, de un total de veintiséis muestras positivas provenientes del brote.El diagnóstico de éstas muestras se realizó a través de RT-PCR anidado con cebadores diseñados dirigidos al segmento 3 y los productos de PCR fueron secuenciados. Para la amplificación y análisis del segmento 4 del genoma del TiLV, se realizó un RT- PCR, donde se diseñaron los cebadores específicos. La secuenciación se hizo con la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur), mediante secuenciación bidireccional por el método de Sanger automatizado. Para el análisis filogenético, se utilizó el programa MEGA 7.Las características de la proteína hipotética se realizó con el programa Phyre2 y el software TMpred. Se obtuvieron, cuatro secuencias con una longitud de 1190 pb, siendo comparadas por 02 secuencias de Israel y 01 de Tailandia, cepas referenciales correspondientes al segmento 4 de TILV publicadas Gen bank. Así mismo, se compararon con una cepa peruana obtenida de tilapias asintomáticas. El análisis filogenético del segmento 4, determino la presencia de un genogrupo TiLV en nuestro entorno, asimismo que, las muestras positivas peruanas presentan mayor relación genética con el clado de cepas de Israel. En el análisis de distancia genética se determinó una identidad nucleotídica de 99.7-100% entre las 4 muestras positivas peruanas, el 97.5-97.7% con cepas de Israel y el 97.0-97.1% con cepas de Tailandia. La proteína hipotética obtenida a partir del segmento 4, tiene una región con homología estructural con la proteína neuraminidasa N6 del virus de Influenza A, con 12 % de cobertura, 44% de identidad y 25,2 % de confianza y presenta una ubicación transmembrana.

Palabras claves: TiLV, segmento 4, RT-PCR, análisis filogenético

ABSTRACT

The aim of this study was to molecular characterization of segment 4 of the lake tilapia virus (TiLV) and to determine its possible function.The study was carried out with positive samples, detected in farmed tilapia from the departments of Piura and San Martín in an outbreak that ocurred in 2017-2018.During this outbreak, a total of twenty six TiLV positive samples werw obteined , from wich five TiLV positive samples were selected. The diagnosisi of these samples was carried out trough a nested RT-PCR with primers directed to segment 3 and the PCR products were sequenced. For the amplification and analysis of segment 4 of the TiLV genome, an RT-PCR was performed where specific primers were designed. The sequencing was done by Macrogen Inc.(South Korea), by bidirectional sequencing using the automated Sanger method. For the phylogenetic analysis, the MEGA 7 program was used. The characteristics of the hypothetical protein were performed with the Phyre2 program and the TMpred software. Four sequences with a length of 1190 bp were obtained and compared with two sequences from Israel and one from Thailand ,reference strains corresponding to segment 4 of TILV published Gene bank. The phylogenetic analysis of segment 4 determined the presence of a local TiLV genogroup ,in addition to indicating that the Peruvian samples have a greater genetic relationship with the clade of Israel strains.The genetic distance analysis shows that the 4 positive Peruvian samples showed nucleotide identity values of 99.7-100% between them, determining that the outbreaks of both departments are produced by the same viral strain, and have an identity of 97.5-97.7% with strains from Israel and 97.0-97.1% with strains from Thailand. The hypothetical protein from TiLV segment 4 was determined to have structural homology to the neuraminidase N6 protein from influenza A virus with 12% coverage, 44% identity, and 25.2% confidence and presents a transmembrane location.

Key words: tilapia, TiLV, segment 4, RT-PCR, phylogenetic analysis

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Producción y utilización de la pesca y la acuicultura a nivel mundial (millones de toneladas)

Cuadro 2: Producción obtenida a partir del cultivo de las principales categorías comestibles según el continente, 2016 (miles de toneladas, en peso vivo)

Cuadro 3. Especies de peces cultivados con mayor producción a nivel mundial (miles de toneladas, en peso vivo)

Cuadro 4. Producción acuícola nacional obtenida en el período del 2008-2017 (toneladas)

Cuadro 5. Venta interna de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie 2008-2017 (TM)

Cuadro 6. Cosecha de tilapia en el Perú según departamento, 2017 (TM)

Cuadro 7. Identificación y origen de las cinco (05) muestras positivas utilizadas para la secuenciación del segmento 4 del TiLV en Perú

Cuadro 8. Cebadores específicos utilizados para el diagnóstico de TiLV por RT-PCR anidada. Los cebadores amplifican secuencias específicas del segmento 3 del genoma de TiLV.

Cuadro 9. Cebadores específicos diseñados para la amplificación del segmento 4 del TiLV en el Perú

Cuadro 10. Secuencias del segmento 4 del TiLV depositado en Gen Bank

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura.

Figura 2. Especies acuícolas con mayor producción nacional ,2017

Figura 3. Especies acuícolas exportadas, 2017

Figura 4. Especies acuícolas con mayor comercio en el interior del Perú ,2017

Figura 5. Primera clasificación de tilapias realizado por Trewavas (1983) (a) *T.zilli.* (b) *S.galilaenus* (c) *O.niloticus*

Figura 6. Diferenciación sexual externa en *Oreochromis sp.*

Figura 7. Primeras especies de tilapias introducidas en el Perú (a) *Tilapia rendalli,* (b) *Oreochromis niloticus, (*c) *Oreochromis hornorum, (*d) *Oreochromis mossambicus*

Figura 8 . Mortalidad masiva en tilapias híbridas comerciales (*O. niloticus x O. aureus*) en un centro de cultivo en Israel (Agosto 2013)

Figura 9. Se observa la exoftalmia en tilapias enfermas con TiLV

Figura 10. Se observan erosiones y úlceras dérmicas multifocales (puntas de flecha) en tilapias híbridas comerciales (*O. niloticus x O. aureus*).

Figura 11. Se observa distensión abdominal en tilapias enfermas con TiLV

Figura 12. Hígado. Se muestras hepatocitos con múltiples núcleos (flechas). Mayor aumento de células gigantes sincitiales (cajas cuadradas). Tinción H&E, 1000 X; barras de escala, 20 µm.

Figura 13. RT-PCR anidada para el segmento 3 del genoma de TiLV. Resultados de electroforesis de siete muestras positivas denominadas T1- T7. **(14a)** Producto de PCR de 491 pb de longitud en la primera ronda de PCR **y (14b)** bandas de 250 pb de longitud en PCR anidada

Figura 14. . Electroforesis de los productos de la prueba RT-PCR para el secuenciamiento del segmento 4 del virus de la tilapia del lago(TiLV).(A) Se observan bandas de 724pb (carril 1 y carril 4) y bandas de 686 pb (carril 2 y carril 5)de las muestras T4 Y T8 respectivamente.(B) Se observan bandas de 724pb (carril 1 y carril 4) y bandas de 686 pb (carril 2 y carril 5)de las muestras T7 Y T24 respectivamente.(C). Se observa las bandas de 724pb (carril 1) y 686 pb (carril 2) de la muestra T28.

Figura 15. Análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del segmento 4 de TiLV de Perú (círculos azules) y secuencias de referencia de Israel (rojo) y Tailandia (amarillo). Método de

Neighbor-Joining, Bootstrap de 1000 réplicas, método de Kimura de 2 parámetros. Software MEGA v7.0.26.

Figura 16. Reporte del programa Phyre2 del segmento 4 de TILV

Figura 17. TM pred output para segment 4 de TILV. TMPRED.10087.8194.seq.

I.- INTRODUCCIÓN

La tilapia es una rica fuente de proteínas y micronutrientes de alta calidad; debido a esto, su consumo ha incrementado por parte de la población en el mundo (FAO, 2018). En el Perú, el cultivo de tilapias presenta grandes perspectivas de desarrollo; siendo, los departamentos de San Martín y Piura, los que presentan un mayor potencial para su óptimo crecimiento (Hurtado, 2012; PRODUCE 2017). Por lo tanto, se ha convertido en la segunda especie más cultivado del Perú y del mundo (PRODUCE, 2017; FAO, 2020). Sin embargo, la intensificación de su producción, puede causar la aparición de estrés, haciéndolos susceptibles a diversos agentes infecciosos (Schmittou *et al*., 2004). Entre ellos, los virus son el principal obstáculo para el desarrollo sostenible de la tilapia cultivada (Dong *et al.,* 2017a; Surachetpong *et al.,* 2017; Amal *et al.*, 2018; Behera *et al.,* 2018).

En los últimos años, se ha identificado un nuevo virus que afecta a la tilapia cultivada y silvestre, denominado virus de la tilapia del lago (TiLV) (Eyngor *et al.*, 2014, Ferguson *et al*., 2014; Bacharach *et al*., 2016; Del Pozo *et al*., 2017). Ha sido notificado en 16 países de tres continentes con mayor producción de tilapia: África, Asia y América del sur (Jansen *et al*., 2018; Chaput *et al.,* 2020). Produce mortalidad y morbilidad cercana al 90% en alevines y, 9% en juveniles y adultos (Eyngor *et al.,* 2014; Bacharach *et al*., 2016;), generando así, grandes pérdidas económicas a los productores de tilapias a nivel mundial (OIE, 2017a).

Eyngor *et al.* (2014), lo describió como un nuevo miembro de la familia *Orthomyxoviridae.* Sin embargo, debido a que TiLV no está directamente relacionado con ninguno de los ortomixovirus actualmente clasificados; el Comité Internacional de Taxonomía de Virus determinó que se requería establecer un nueva especie Tilapia tilapinevirus , género denominado Tilapinevirus, de la familia Amnoonviridae (Adams *et al*., 2017). Los ortomixovirus tienen sus proteínas inmunogénicas y neutralizantes en las proteínas hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). Las HA desempeñan funciones vitales en la entrada del virus al unirse al ácido siálico en las superficies de las células epiteliales, lo que promueve la unión de la envoltura con la membrana celular. En cambio, la NA escinde el ácido siálico en las proteínas del virión para evitar la acumulación y facilita la liberación de virus de las células infectadas (Wagner *et al.*, 2002). En el virus de la influenza (prototipo de la familia) la hemaglutinina (HA) está codificado en el segmento 4 y neuroaminidasa (NA) en el segmento 6; mientras que, en los Isavirus (Anemia infecciosa del Salmón), la hemaglutinina (HA) está codificada en el segmento 6 y el segmento 4 codifica la polimerasa ácida putativa (PA) (Plarre *et al*. 2012).

Como existen pocos estudios acerca de este nuevo virus, ya detectado en el Perú (OIE, 2018b; SANIPES, 2018a); es necesario, realizar trabajos de investigación que involucren, la determinación de la caracterización molecular de este nuevo virus, con énfasis en los segmentos que puedan codificar aquellas proteínas inmunogénicas como: HA,NA. Por lo que, se hace indispensable, poder adquirir estos conocimientos; para poder establecer, como métodos preventivos , la elaboración de vacunas. Debido a esto, se propone realizar un estudio más amplio para determinar: la caracterización molecular del segmento 4 del TiLV ,su proteína putativa y su posible función.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Definiciones

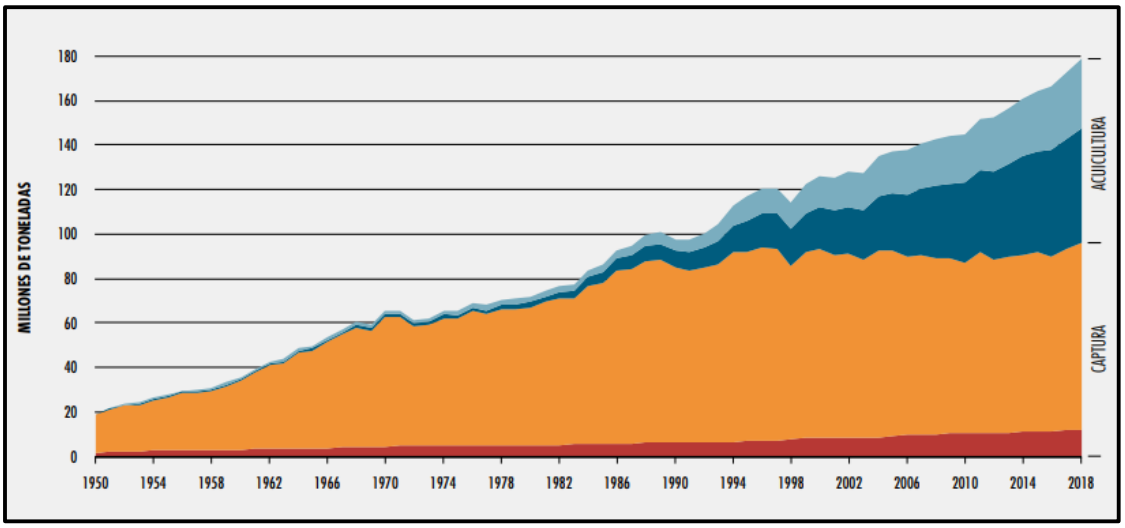
Se define como acuicultura al cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y algas en ambientes de agua dulce y agua de mar (El-Sayed, 2006).Mientras que, la FAO (2020) denomina a la producción obtenida a partir de peces, crustáceos, moluscos y otros animales acuáticos (no mamíferos ni reptiles), como producción pesquera, donde queda exenta la producción de las algas y otras plantas acuáticas.

2.2. Estado de la Acuicultura

2.2.1. *En el mundo*

En los últimos años, se ha evidenciado un aumento en la actividad de la acuicultura. La producción pesquera proveniente de la acuicultura registra un incremento; en comparación, a la producción obtenida de la pesca de captura, que muestra una estabilidad en su producción desde finales de la década de 1980 (Figura 1) (FAO, 2020).

En el año 2018, la producción mundial pesquera, alcanzó un máximo de 179 millones de toneladas aproximadamente. Siendo destinado 156 millones de toneladas al consumo humano, con lo que se estima un 20,5 Kg per cápita. El 46 % de ésta producción, equivalentes a 82,0 millones de toneladas, provenían de la acuicultura, con un valor estimado de 250 000 millones de dólares (Cuadro 1) (FAO, 2020)



Nota: Excluidos los mamíferos acuáticos, cocodrilos, lagartos y caimanes, las algas y otras plantas acuáticas.

Figura 1. Producción mundial de la pesca de captura y la acuicultura. Fuente: FAO, 2020

Cuadro 1: Producción y utilización de la pesca y la acuicultura a nivel mundial (millones de toneladas) Fuente: FAO, 2020

	1986–1995	1996–2005	2006–2015	2016	2017	2018
	Promedio anual					
	(en millones de toneladas, peso vivo)					
Producción						
Pesca de captura						
Continental	6,4	8,3	10,6	11,4	11,9	12,0
Marina	80,5	83,0	79,3	78,3	81,2	84,4
Total de la pesca de captura	**86,9**	**91,4**	**89,8**	**89,6**	**93,1**	**96,4**
Acuicultura						
Continental	8,6	19,8	36,8	48,0	49,6	51,3
Marina	6,3	14,4	22,8	28,5	30,0	30,8
Total de la acuicultura	**14,9**	**34,2**	**59,7**	**76,5**	**79,5**	**82,1**
Total mundial de la pesca y la acuicultura	**101,8**	**125,6**	**149,5**	**166,1**	**172,7**	**178,5**
Utilización[2]						
Consumo humano	71,8	98,5	129,2	148,2	152,9	156,4
Usos no alimentarios	29,9	27,1	20,3	17,9	19,7	22,2
Población (*en miles de millones*)[3]	5,4	6,2	7,0	7,5	7,5	7,6
Consumo aparente per cápita (*kg*)	13,4	15,9	18,4	19,9	20,3	20,5

3. Fuente de las cifras sobre población: Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (DAES), 2019

El pescado cultivado es uno de los productos alimentarios más comercializados en todo el mundo, por un valor de 139 700 millones de dólares (54,3 millones de toneladas) (Cuadro 2). Por lo que, la acuicultura se ha vuelto en una actividad que provee ingresos económicos a muchas personas a nivel mundial. Las estadísticas oficiales indican que durante el 2016, hubo la participación de 59,51 millones de personas a tiempo completo, parcial u ocasionalmente) en el sector primario de la pesca de captura y la acuicultura, de las cuales el 20,5 millones fue en la acuicultura y 39,0 millones en la pesca de captura (FAO, 2020). La proporción de personas que se dedicaban a la pesca de captura disminuyó del 83% al 68% durante los años del 1990 al 2016 respectivamente, mientras que las personas que se dedicaban a la acuicultura aumentó en consecuencia del 17% al 32% (FAO, 2018). En 2018, la población mundial empleada en el sector de la acuicultura se concentró en Asia (85%), África (9%), América Latina y el Caribe (4%), Europa (1%) y Oceanía (1%) (FAO, 2020).

Cuadro 2: Producción obtenida a partir del cultivo de las principales categorías comestibles según el continente, 2016 (miles de toneladas, en peso vivo) Fuente: FAO, 2020

	África	Américas	Asia (– Chipre)	Europa (+ Chipre)	Oceanía	Mundo
	(en miles de toneladas, peso vivo)					
Acuicultura continental						
1. Peces de aleta	1 893	1 139	43 406	508	5	46 951
2. Crustáceos	0	73	3 579	0	0	3 653
3. Moluscos	...	...	207	...	...	207
4. Otros animales acuáticos	...	1	528	0	...	528
Total parcial	***1 893***	***1 213***	***47 719***	***508***	***6***	***51 339***
Acuicultura marina y costera						
1. Peces de aleta	291	1 059	3 995	1 892	92	7 328
2. Crustáceos	6	888	4 834	0	6	5 734
3. Moluscos	6	640	15 876	680	102	17 304
4. Otros animales acuáticos	0	...	387	3	0	390
Total parcial	***302***	***2 587***	***25 093***	***2 575***	***200***	***30 756***
Toda la acuicultura						
1. Peces de aleta	2 184	2 197	47 400	2 399	97	54 279
2. Crustáceos	6	961	8 414	0	6	9 387
3. Moluscos	6	640	16 083	680	102	17 511
4. Otros animales acuáticos	0	1	915	3	0	919
Total	**2 196**	**3 799**	**72 812**	**3 083**	**205**	**82 095**

NOTA: 0 = cantidad de producción inferior a 500 toneladas; ... = sin producción o datos de producción no disponibles.

En los últimos años, la tilapia ha ganado una mayor aceptación en el consumidor; convirtiéndose, en una importante fuente de proteínas (Addo, 2013; Ng y Romano, 2013; GLOBEFISH, 2017). Siendo su cultivo, una de las actividades acuícolas, de mayor crecimiento a nivel mundial (Conroy *et al*., 2008; GLOBEFISH, 2021); ubicándose, como la segunda especie más cultivada en el mundo (Cuadro 3) (FAO, 2020).Siendo Asia, la principal fuente de suministro, siendo los cinco principales proveedores: China, Vietnam, Indonesia, Tailandia y Malasia (GLOBEFISH, 2021). Destacando, como principales países exportadores: China, Tailandia e Indonesia. En América Latina, los principales países importadores de tilapia son: los Estados Unidos de América, México; en África, Costa de Marfil; Asia, Irán; en la UE, España, Reino Unido, Francia y Alemania (GLOBEFISH, 2017).

Para el año 2020, el continente asiático, contribuyó con el 66% de la producción mundial de tilapia (4.55 millones de toneladas). Siendo China, primer país productor de tilapia, a pesar de una ligera caída en el 2020 respecto a 2019 del 3%; por la disminución de la demanda interna, dada por la crisis del COVID-19, a principios del 2020. También, se observó una ligera disminución en los otros grandes productores asiáticos, incluidos Indonesia y Filipinas. La caída total de la producción asiática fue de alrededor del 1,3 % pero el crecimiento en otros lugares ha sido más rápido (Medio Oriente, África y América Latina); por tanto, la producción mundial de está especie no ha sido tan afectada como otras especies (GLOBEFISH, 2021).

2.2.2. *En el Perú*

La producción acuícola ha presentado un crecimiento notable durante los últimos años. La producción obtenida en el 2019 fue de 161 279 toneladas, lo cual representa un incremento de 181% respecto a la producción en el año 2010 (89 021 toneladas) (Cuadro 4). Las especies con mayor volumen de producción son: la trucha con 50 793 toneladas (31,50%), langostino con 50 820 toneladas (31,50%), concha de abanico con 53 496 toneladas (33,20%), y tilapia con 3 196 toneladas (2,00%), que representan un 98,20 % del volumen total de producción obtenida durante el 2019 (PRODUCE, 2019) (Figura 2).

Cuadro 3. Especies de peces cultivados con mayor producción a nivel mundial (miles de toneladas, en peso vivo). Fuente: FAO, 2020

	2010	2012	2014	2016	2018	Proporción de 2018
	(en miles de toneladas)					*(porcentaje)*
Peces de aleta						
Carpa herbívora, *Ctenopharyngodon idellus*	4 213,1	4 590,9	5 039,8	5 444,5	5 704,0	10,5
Carpa plateada, *Hypophthalmichthys molitrix*	3 972,0	3 863,8	4 575,4	4 717,0	4 788,5	8,8
Tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus*	2 657,7	3 342,2	3 758,4	4 165,0	4 525,4	8,3
Carpa común, *Cyprinus carpio*	3 331,0	3 493,9	3 866,3	4 054,7	4 189,5	7,7
Carpa cabezona, *Hypophthalmichthys* nobilis	2 496,9	2 646,4	2 957,6	3 161,5	3 143,7	5,8
Catla, *Catla catla*	2 526,4	2 260,6	2 269,4	2 509,4	3 041,3	5,6
Carassius spp.	2 137,8	2 232,6	2 511,9	2 726,7	2 772,3	5,1
Peces de agua dulce nep[1], *Osteichthyes*	1 355,9	1 857,4	1 983,5	2 582,0	2 545,1	4,7
Salmón del Atlántico, *Salmo salar*	1 437,1	2 074,4	2 348,1	2 247,3	2 435,9	4,5
Panga, *Pangasianodon hypophthalmus*	1 749,4	1 985,4	2 036,8	2 191,7	2 359,5	4,3
Labeo Roho, *Labeo rohita*	1 133,2	1 566,0	1 670,2	1 842,7	2 016,8	3,7
Chano, *Chanos chanos*	808,6	943,3	1 041,4	1 194,8	1 327,2	2,4
Clarias spp.	343,3	540,8	867,0	961,7	1 245,3	2,3
Tilapias nep, *Oreochromis* (= Tilapia) spp.	472,5	693,4	960,8	972,6	1 030,0	1,9
Trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*	752,4	882,1	794,9	832,1	848,1	1,6
Carpa de Wuchang, *Megalobrama amblycephala*	629,2	642,8	710,3	858,4	783,5	1,4
Peces marinos nep, *Osteichthyes*	467,7	567,2	661,0	688,3	767,5	1,4
Carpa negra, *Mylopharyngodon piceus*	409,5	450,9	505,7	680,0	691,5	1,3
Ciprínidos nep, *Cyprinidae*	639,8	601,1	628,0	596,1	654,1	1,2
Bagre amarillo, *Pelteobagrus fulvidraco*	177,8	233,7	302,7	434,4	509,6	0,9
Otros peces de aleta	6 033,9	6 869,3	7 730,0	8 217,1	8 900,2	16,4
Total de peces de aleta	**37 745,1**	**42 338,2**	**47 219,1**	**51 078,0**	**54 279,0**	**100**

Cuadro 4. Producción acuícola nacional obtenida en el período del 2010-2019 (toneladas)
Fuente: PRODUCE, 2019

Ámbito / Especie	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Total	**89 021**	**92 201**	**72 293**	**125 693**	**115 269**	**90 976**	**100 191**	**100 455**	**141 216**	**161 279**
Continental	17 320	23 609	29 564	40 068	38 683	45 758	58 771	61 028	70 164	56 949
Boquichico	36	15	35	56	6	9	31	58	29	6
Camarón Gigante de Malasia	15	13	11	20	78	21	34	26	29	60
Carachama	22	6	7	10	5	4	9	6	3	1
Carpa	19	8	19	6	2	4	4	5	4	0
Gamitana	680	522	453	531	504	299	1 863	1 047	952	787
Paco	101	130	299	443	453	825	1 390	1 624	2 184	1 871
Pacotana	3	12	17	15	9	219	11	35	14	-
Paiche	48	422	637	94	55	135	142	218	295	86
Tilapia	2 013	2 423	3 174	3 840	4 610	3 250	2 950	3 042	2 164	3 196
Trucha	14 250	19 962	24 762	34 992	32 923	40 946	52 245	54 878	64 372	50 793
Sábalo	114	95	46	58	37	33	87	84	113	148
Otros	19	0	102	3	1	12	4	6	4	1
Marítimo	71 701	68 592	42 730	85 625	76 586	45 218	41 420	39 427	71 052	104 330
Algas	-	-	146	44	3	2	1	2	1	-
Concha de Abanico	58 101	52 213	24 782	67 694	55 096	23 029	20 975	11 927	31 890	53 496
Langostino	13 598	16 379	17 801	17 883	21 484	22 183	20 441	27 492	39 153	50 820
Lenguado	-	-	1	3	3	4	3	7	9	15
Ostras del Pacífico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-

Nota: La cosecha de concha de abanico a partir del 2010 incluye lo procedente del repoblamiento en Parachique
"0" Corresponde a cifras menores que 0.5 TM
Fuente: Direcciones Regionales de Producción (DIREPRO) y Empresas Acuícolas
Elaboración: Produce - OEE

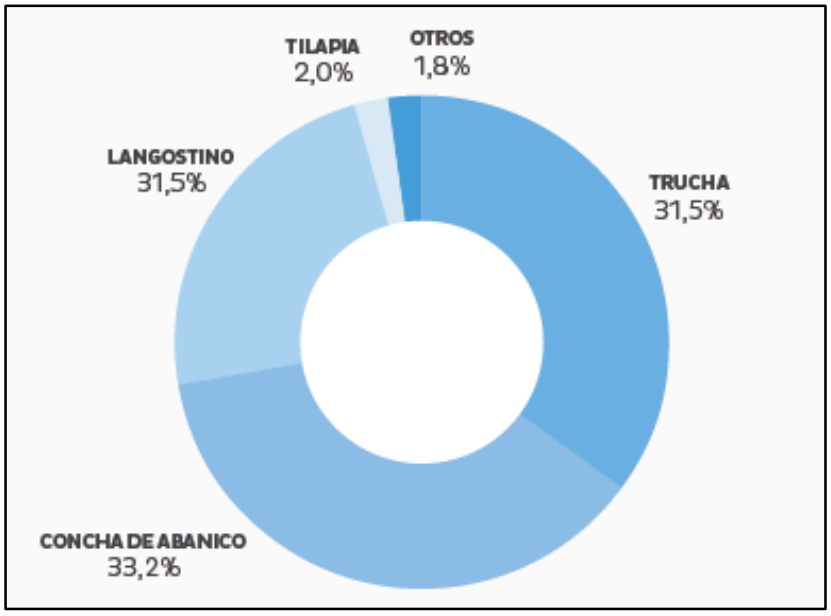


Figura 2. Especies acuícolas con mayor producción nacional ,2019. Fuente: PRODUCE, 2019

En 2019, las especies cultivadas que presentaron una mayor ventas al exterior fueron: langostino con 41 230,57 toneladas, valorizados aproximadamente en 230 879 202 dólares; concha de abanico con 11 341,89 toneladas, valorizados aproximadamente en 88 376 456; trucha 6311,40 toneladas, valorizados aproximadamente en 38 942 679 dólares; tilapia 313,38 toneladas, valorizados aproximadamente de 2 639 295 dólares y el paiche con 0,14 toneladas, valorizados aproximadamente en 2 351 dólares. Siendo los principales países destinos EE.UU, España, Francia, China, Rusia, Reino Unido (Figura 3). Donde la exportación de la tilapia fue destinada principalmente a Estados Unidos (PRODUCE, 2019).

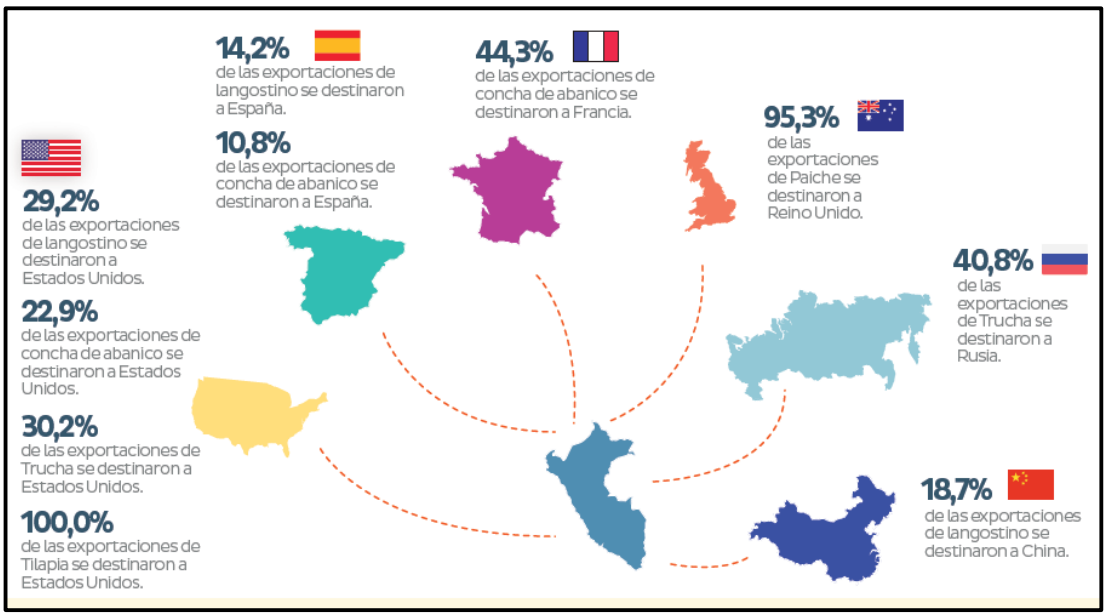


Figura 3. Especies acuícolas exportadas, 2019 Fuente: PRODUCE, 2019

Asimismo, las ventas al interior del país se han incrementado de las 15 355 a 51 064 toneladas del 2010 al 2019 respectivamente (Cuadro 5). Destacando la venta interna de la trucha (79 %), seguida del langostino (10,8%), paco (3,7%), la tilapia (3,4%), langostino (1,7%), concha de abanico (1,0%) (Figura 4). Demostrando que, hay una mayor aceptación por la población, de los productos obtenidos de la acuicultura; convirtiéndose parte de su alimentación y fuente de empleo. Según, datos publicados en 2015, se produjo 102 000 empleos aproximadamente, pudiendo ser considerado que por cada puesto de empleo generado se necesitaran 03 trabajadores dependientes. Se podría considerar que la actividad acuícola estaría generando ingresos alrededor de 300 000 peruanos (PRODUCE, 2017).Durante el período del 2015 al 2019, hubo un

incremento del 67 %, en la producción proveniente de la acuicultura; con lo que, se espera haya generado un aumento significativo en la generación de empleos (PRODUCE ,2019).

Cuadro 5. Venta interna de recursos hidrobiológicos procedentes de la actividad de acuicultura según especie 2010-2019 (TM). Fuente: PRODUCE, 2019

Especie	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Total	**15 355**	**20 265**	**26 640**	**38 567**	**36 551**	**47 133**	**56 750**	**58 570**	**68 349**	**51 064**
Continental	14 738	19 581	25 874	37 363	35 279	40 628	54 359	57 053	61 796	45 009
Boquichico	36	15	35	56	14	9	31	58	29	6
Camarón Gigante de Malasia	15	13	11	20	78	23	34	26	29	27
Carachama	22	6	7	10	5	4	9	6	3	1
Carpa	19	8	19	6	2	4	4	5	4	0
Gamitana	680	522	453	531	442	298	1 863	1 047	952	787
Paco	101	130	299	443	449	825	1 390	1 624	2 184	1 871
Pacotana	3	12	17	15	33	219	11	35	14	-
Paiche	48	45	339	87	60	45	58	80	129	86
Tilapia	1 417	1 366	1 727	2 069	2 867	1 506	2 055	2 239	1 812	1 760
Trucha	12 264	17 368	22 818	34 066	31 315	37 658	48 812	51 844	56 522	40 322
Sábalo	114	95	46	58	12	33	87	84	113	148
Otros	19	0	102	3	2	3	4	6	4	1
Marítimo	617	684	766	1 203	1 272	6 505	2 391	1 517	6 553	6 055
Concha de Abanico	208	149	369	532	387	2 000	1 142	514	1 249	506
Langostino	407	535	397	668	827	4 495	1 244	995	5 292	5 537
Ostras del Pacífico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros	2	-	-	3	58	10	4	8	12	12

Nota: "0" corresponde a cifras menores a 0.5 toneladas

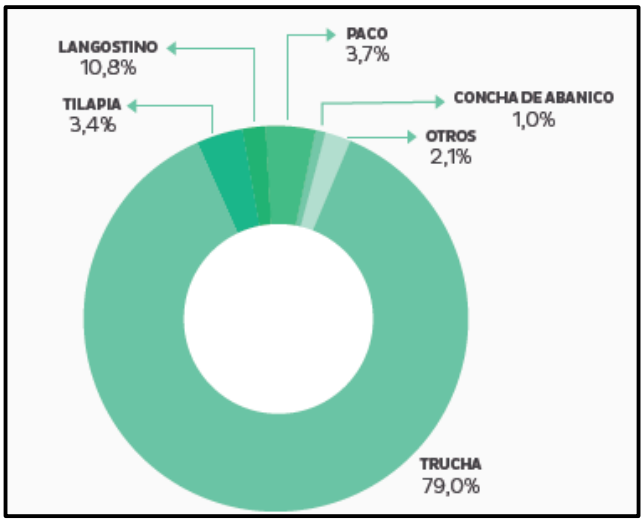


Figura 4. Especies acuícolas con mayor comercio en el interior del Perú ,2019. Fuente: PRODUCE, 2019

En nuestro país, el cultivo de tilapias presenta perspectivas positivas de crecimiento, aprovechando los recursos disponibles de la zona costera y de la selva; ya que tiene una disponibilidad de terreno de 154 000 ha aprox., así como cuerpos de agua que cuenta con los parámetros físicos - químicos óptimos para su cultivo (Baltazar ,2007).Los departamentos de San Martín y Piura han sido caracterizados como ideales para el desarrollo de un óptimo cultivo de tilapias (Hurtado, 2012; PRODUCE 2017) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cosecha de tilapia en el Perú según departamento, 2017 – 2019 (TM)

DEPARTAMENTOS	**2017**	**2018**	**2019**
AMAZONAS	0,61	10,97	16,53
CAJAMARCA	20 ,72	22,97	15,96
ICA	1,17	5,02	1,95
LA LIBERTAD	2,24	----	2,02
LAMBAYEQUE	----	7,39	5,38
LIMA	76,36	106,96	90,48
MADRE DE DIOS	-----	0,30	0,10
PIURA	1 181,99	583,22	1 921,81
SAN MARTÍN	1 754,62	1 418,92	1 136,86
TUMBES	4,17	6,44	1,52
TOTAL	**3 041.88**	**2 162.19**	**3 192.61**

Elaboración propia - Datos obtenidos (PRODUCE, 2019)

En la actualidad, la tilapicultura en el Perú se lleva a cabo como: acuicultura de recursos limitados (AREL), con una producción de hasta 3.5 toneladas /año; acuicultura de micro y pequeña empresa (AMYPE), considerando una producción mayor a 3.5 hasta 150 toneladas/año; acuicultura de mediana y gran empresa (AMYGE), con una producción mayor a 150 toneladas/año. (PRODUCE, 2019).

2.3. Tilapia

Este nombre proviene de una palabra bosquimana africana que significa "pez" (Trewavas, 1982) ; debido a, su adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (parámetros físicos - químicos del agua, disponibilidad de alimento), se encuentra ampliamente distribuidas en el mundo. Las tilapias son altamente reproductivas; se les considera que, poseen una resistencia al estrés y la enfermedad (El-Sayed, 2006). Requieren de estructuras simples para su cultivo y un alimento de bajo costo. Durante su cultivo, se ha observado que presentan: crecimiento rápido, resistencia a elevadas densidades, alta tasa de sobrevivencia y son dóciles al manejo (Baltazar y Palomino, 2004; RABOBANK; 2015).

Para poder mantenerse en buenas condiciones de vida, el agua de cultivo, debe estar a un pH de 6.5 a 9 y una concentración de oxígeno >4 mg/L, pudiendo tener una temperatura variable de acuerdo a la especie (20-35°C) (Baltazar y Palomino, 2004). Estudios realizados, en alevines de tilapias de Nilo, observaron un mayor crecimiento en los que se encontraban a una temperatura de 28°C, en comparación a temperaturas de 24 y 32 °C. Por lo que, se considera como rango óptimo una temperatura de 25-30°C (El Sayed, 2006). Las tilapias son cultivadas en agua dulce, pero provienen de un ancestro marino, por lo que pueden tolerar un amplio rango de valores de salinidad del agua, siendo incluso capaces de crecer y reproducirse en estos ambientes. Las especies de tilapias más tolerantes a la salinidad son O. *mossambicus, O. aureus y T zilii*.

El sabor de su carne es neutral, una característica que atrae a más consumidores (RABOBANK, 2015). Por todo esto, se convierte en una especie altamente rentable y su cultivo representa una actividad productiva promisoria, especialmente en los países en desarrollo (El-Sayed, 2006; MINCETUR, 2011; RABOBANK, 2015). En medida que, la tilapia ha sido incorporada, como parte de la alimentación en diversos países, organismos internacionales de desarrollo, la han denominado como: "El pescado del siglo XXI" (Rammarine, 2005), y la "Gallina acuática" (Badatunde *et al.,* 2014).

2.3.1. Clasificación taxonómica

Hasta la actualidad, la clasificación taxonómica de la tilapia, sigue siendo confusa y constantemente modificada. Se han descrito más de 70 especies pero todavía existe un debate si son realmente especies separadas o son híbridos, ya que se puede presentar similitud o superposición de sus características morfológicas (El- Sayed, 2006).

En el año 1973, Trewavas, dividió al género tilapia en dos subgéneros: Tilapia y Sarotherodon. Está división fue de acuerdo a sus comportamientos reproductivos y alimenticios (El- Sayed, 2006). Más adelante, Trewavas (1982), propuso que el subgénero Sarotherodon se convierta en género; y, a la vez, lo dividió en: *Sarotherodon, Oreochromis* .Por lo que, finalmente se propuso cuatro géneros: *Tilapia, Sarotherodon, Oreochromis, Danakilia,* de acuerdo a los nuevos estudios realizados sobre su conducta y desarrollo del proceso de incubación que puede ser exclusivamente materna, paterna o mixta (Fig.5).



a **b** **c**

Figura 5. Clasificación de tilapias realizado por Trewavas (1982) (a) *T. zilli* (b) *S. galilaenus* (c) *O. niloticus*

Sin embargo, Trewavas (1983), realizó una nueva división teniendo en cuenta, el tipo de dentición, del cual surgió tres nuevos géneros que son: *Tristamella , Danakilia y Pelmatochromis*, pero está clasificación no tuvo la acogida deseada; por lo que, hasta la actualidad predomina la primera clasificación basada en sus hábitos reproductivos. Dentro de la familia Cichlidae, se encuentran tres importantes géneros: *Oreochromis, Sarotherodon* y *Tilapia* (Ridha, 2006; Badatunde *et al.*, 2014; Wang y Lu, 2016). De éstos, el género de mayor importancia en acuicultura es el *Oreochromis* (Lim y Webster, 2006). Siendo *Oreochromis niloticus* (tilapia nilótica) (Linnaeus, 1758), la especie cultivada más común (Badatunde *et al.,* 2014), por su rápido crecimiento, madurez sexual, alta tolerancia a condiciones ambientales y sus hábitos alimenticios (Addo, 2013).

Clasificación Taxonómica

Reino:	Animalia
Phylum:	Chordata
Sub phylum:	Craneata
Superclase:	Gnostomata

Clase :	Teleostomi
Subclase:	Actinopterigii
Orden :	Perciformes
Familia:	Cichlidae
Géneros :	*Tilapia*
	Oreochromis
	Sarothrodon
	Tristanella
	Danakilia
	Pelmatochromis
Especies:	*Oreochromis niloticus*
	Oreochromis mossambicus
	Oreochromis aureus
	Oreochromis urolepis hornorum
	Oreochromis sp.

2.3.2. Morfología

Las tilapias son fácilmente identificadas por una línea lateral interrumpida, características de los peces de la familia Chiclidae (Badatunde *et al*., 2014). La forma del cuerpo es profunda y comprimida lateralmente, cubierto con escamas cicloideas (Ross, 2000), las aletas dorsal y anal tienen bastantes espinas y rayos blandos (El-Sayed, 2006). Crecen una longitud máxima de 62 cm., pesando 3.65 kg (FAO, 2012).

2.3.3. Alimentación

El tipo de alimentación de las tilapias puede variar de acuerdo a la especie, etapa productiva, distribución geográfica. Es una especie omnívora. En etapas larvarias se alimentan inicialmente de zooplancton mientras en la etapa de juveniles y adultas consiste en una considerable variedad de fitoplancton, zooplancton y pequeños crustáceos (Baltazar y Palomino, 2004; El- Sayed, 2006).

2.3.4. Reproducción

Las tilapias pueden crecer hasta los 500-600 gr en 6 a 8 meses y pueden alcanzar la madurez sexual a los 2-3 meses (Badatunde *et al*., 2014).Sin embargo, diversos estudios realizados en la reproducción de tilapias, determinaron que a la edad de 1 año las tilapias son

mejores reproductoras (Smith *et al.*, 1991) y que el rango óptimo de temperatura para su reproducción es de 25-30°C (Popma y Lovshin, 1996). Las tilapias son reproductoras asincrónicas y no se utilizan hormonas para inducir el desove (FAO, 2005), ya que éste puede ocurrir durante todo el año (Lim y Webster, 2006; SEAFISH, 2011).

La diferenciación externa de los sexos se efectúa observando la papila urogenital. El macho presenta dos orificios bajo el vientre (el ano y el orificio urogenital); mientras que, la hembra posees tres (el ano, el poro genital y el orificio urinario) (Figura 7). Para diferenciarlos, científicamente se requiere de comprobaciones morfométricas (PRODUCE, 2004). El dimorfismo sexual de las hembras y machos es muy acentuado, estando relacionado con el crecimiento y peso que alcanzan estos ejemplares en un mismo período de cultivo, donde los peces machos de tilapia crecen al doble de velocidad que las hembras (Bard *et al.* ,1975; Guerrero y Guerrero, 2000; FAO, 2005)**.** Por lo que, el cultivo de toda la población macho es importante en tilapias por su alto índice de crecimiento, calidad de la carne y la obtención de tallas más uniformes (Soto-Zarazúa *et al.* 2001; Mateen, 2007).

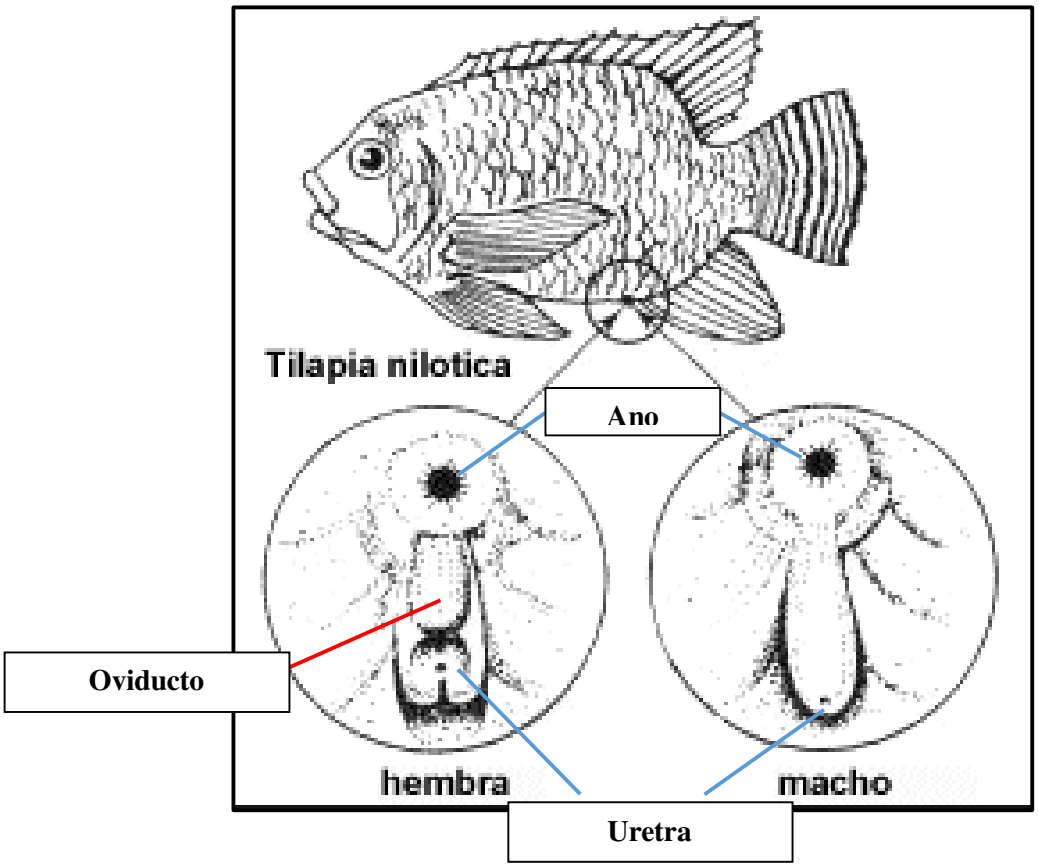


Figura 6. Diferenciación sexual externa en *Oreochromis sp.*

2.3.5. Introducción en el Perú

Las tilapias son nativas de África, pero se introdujeron en muchas regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo durante la segunda mitad del siglo 20 (Pillay, 1990); debido a su gran adaptabilidad en su cultivo (Castillo, 2011). La introducción de tilapia en esas áreas fue para: la cría como alimento para peces, pesca recreativa, control de malezas acuáticas, y propósitos de investigación (MINCETUR, 2003; El-Sayed, 2006).En la actualidad, son peces endémicos a nivel mundial (Baltazar, 2007).

La primera especie de tilapia que ingreso al país, fue Tilapia *rendalli*, por medio de la Dirección General de Caza y Pesca – Ministerio de Fomento y Agricultura, siendo ofrecida como alimento para los paiches (*Arapaima gigas*) ubicados en el Lago del Sauce (San Martín) en el año del 1962 (Baltazar, 2007). Mientras que las especies *Oreochromis niloticus, Oreochromis hornorum* y *Oreochromis mossambicus* fueron traídas con el propósito de realizar estudios y cultivarlas en la selva alta , por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) en el año de 1979 (Ramos y Gálvez , 2000; Baltazar, 2007) . (Figura 6).

(a) **(b)**





(c) **(d)**





Figura 7. Primeras especies de tilapias introducidas en el Perú (a) *Tilapia rendalli,* (b) *Oreochromis niloticus, (*c) *Oreochromis hornorum*, (d) *Oreochromis mossambicus*

2.4. ENFERMEDADES EN TILAPIAS

2.4.1. Estrés y enfermedades en tilapia

Las tilapias pueden ser afectadas por diversas enfermedades infecciosas y no infecciosas durante su vida silvestre o cultivo (Ariel y Owens, 1997; Crane y Hyatt, 2011; Aly, 2013). Las enfermedades de la tilapia han atraído la atención en los últimos años debido a las siguientes razones: la gran intensificación del cultivo de la tilapia, que puede aumentar el riesgo de enfermedades, la amplia introducción de la tilapia en muchos países, lo que aumenta las posibilidades de ocurrencia de enfermedades, aumentar la conciencia pública sobre el papel del cultivo de peces en la difusión de las enfermedades humanas, la creciente preocupación pública sobre la protección del medio ambiente y aumentar la exportación e importación mundial de tilapia, con altos estándares de calidad (El-Sayed, 2006; FAO, 2020).

Durante el cultivo de tilapias pueden ocurrir situaciones adversas como: cambios bruscos de pH, salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, alteración en el manejo nutricional y de densidades, que puedan generar estrés en ellos (González y Heredia, 1998; Everitt y Leung, 1999; Awad, 2010; Munang´andu *et al*., 2016).Siendo el estrés, el primer paso que favorece a la aparición de enfermedades (Schmittou *et al*., 2004).Los peces estresados, disminuyen su capacidad de defensa (inmunosupresión) ligada a la producción de cortisol endógeno, favoreciendo que los microorganismos puedan infectar al hospedero, produciéndose transtornos patológicos; restringiendo su producción y generando pérdidas económicas (Foo y Lam ,1993; Auro y Ocampo, 1999; Everitt y Leung, 1999; Centeno *et al*., 2004; Schmittou *et al*., 2004; Pasnik *et al*., 2010; Parker, 2012).

Estudios realizados por, Foo y Lam (1993), determinaron que el estrés que produce la manipulación es evidenciada por el aumento significativo de los niveles de cortisol en suero de la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*); aumento del cual depende, la severidad del factor estresante, duración de la exposición y el estado de salud de los peces, así mismo, demostraron que la eliminación del factor de estrés resultó en un rápido retorno al nivel normal de cortisol. En tanto, Barcellos *et al.* (1999 a y 1999b) estudiaron los efectos del estrés agudo en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) previamente expuestos a estrés crónico (estrés por manejo). Ellos encontraron que los peces expuestos a estrés crónico durante 59 días tuvieron menores tasas de crecimiento que los peces no estresados. El cortisol plasmático en peces previamente expuestos a estrés crónico (169 ng/ml) fue significativamente menor que la obtenida a partir de peces expuestos sólo a estrés agudo (9267 ng/ml). Los autores concluyeron que la tilapia del Nilo puede adaptarse al estrés crónico, y esta adaptación reduce, pero no elimina, su respuesta al estrés agudo adicional. Una causa importante de estrés crónico en la tilapia son las interacciones sociales y las jerarquías, cuyo incremento es asociado a altos niveles de densidad

de cultivo. Por otro lado, la tilapia también puede estar expuesta a estrés secundario después de tratamientos farmacológicos médicos (Lara, 2002).

En consecuencia, la reducción del estrés, sería un medio de control de la enfermedad y la mejora de la inmunidad en los peces cultivos. Una alternativa a esto son las observaciones de Endo *et al*. (2002), quienes estudiaron el estrés y la respuesta inmune de la tilapia del Nilo bajo regímenes de auto-alimentación y alimentación programada. Ellos encontraron que los peces con el régimen de auto-alimentación, tuvieron menores niveles de cortisol en plasma, aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos, aumento de la producción de anticuerpos y un mayor número de linfocitos ; en comparación , a los peces con el régimen de alimentación programada. Los autores concluyen que, un régimen de auto-alimentación, es menos estresante que la alimentación programada. Siendo evidente que, la mejor manera de prevenir o al menos reducir, las enfermedades de la tilapia es la adopción de mejores prácticas de gestión .Estas prácticas incluyen: la mejora y el control del ambiente de cultivo , el manejo y la adopción de técnicas de transporte , densidades de siembra razonables , cantidades adecuadas de alimento de alta calidad con la adopción de los regímenes de alimentación adecuados, el uso racional de medicamentos legales y uso de vacunas más eficaces(Plumb,1999).

2.4.2 Enfermedades virales

Existen pocas investigaciones relacionados a las enfermedades virales en tilapias. Entre ellas están los reportes de epizootias de linfocistis y otras posibles infecciones virales en poblaciones silvestres y cultivadas de tilapias (Conroy *et al*. ,2008). La linfocistis es la infección crónica producida por un virus ADN de doble cadena lineal, que pertenece a la familia Iridovirus (Shlapoberky *et al*., 2010). Este virus es dermotrópico e infecta a los fibroblastos (Lewis y León, 2004; Conroy *et al*., 2008). Los peces infectados muestran la presencia de papilomas o nódulos de 5 mm de diámetro aproximadamente en el tejido conectivo de las aletas, branquias y piel (Lio Po, 2001; Conroy *et al*., 2008). La presencia de estos papilomas conlleva al rechazo del producto por los consumidores, con las correspondientes pérdidas económicas para los productores (Conroy *et al*., 2008).

Otros virus reportados en tilapias incluyen: el birnavirus acuático, causante de la necrosis hematopoyética infecciosa (Shlapoberky *et al*., 2010), el Nodavirus, el virus ARN monocatenario, agente causal de la nodavirosis, encefalopatía viral y retinopatía; también llamada Necrosis Viral Infecciosa (Shlapoberky *et al*., 2010). Esta enfermedad causa alta mortalidad en los estadíos larvales y produce pérdidas económicas significativas (Skliris y Richards, 1999; Lio-Po y Penaranda, 2004). Además, Shlapoberky *et al*. (2010) reportaron un brote de enfermedad

caracterizado por un síndrome de rotaciones, con altas tasas de mortalidades en larvas de tilapias, denominándose Encefalitis viral de larvas de tilapia y por las características encontradas sugieren que el agente es un virus semejante al herpes.

En el año 2017, se advirtió a través del Sistema Mundial de Información y Alerta de la FAO (SMIA) a los países productores de tilapias, sobre la emergencia de un nuevo agente viral, que estaba produciendo elevadas muertes, tanto en tilapias de vida libre como en las tilapias cultivadas. Este nuevo agente viral fue denominado como el Virus de la tilapia del lago (TiLV) (FAO, 2017).

2.4.2.1 Virus de la tilapia del Lago (TiLV)

En el año 2014, se realizaron estudios en busca del agente causal de las mortalidades masivas en tilapias de Israel, siendo Eyngor *et al.* (2014), quien descubrió y describió a este nuevo virus como la causa de éstas. Afecta tanto a tilapias silvestres como cultivadas, causando mortalidad y morbilidad cercana al 90% en alevines y, 9% en juveniles y adultos (Figura 8) (Eyngor *et al*., 2014; Bacharach *et al*., 2016); en consecuencia, ha generado grandes pérdidas económicas en la producción de tilapias a nivel mundial de unos 7.5 mil millones de dólares aproximadamente. Siendo la fuente de origen del virus desconocida (OIE, 2017a).



Figura 8 . Mortalidad masiva en tilapias híbridas comerciales (*O. niloticus x O. aureus*) en un centro de cultivo en Israel (Agosto 2013) Fuente: Enyord *et al.* , 2014

Agente etiológico

El TiLV es un virus ARN de sentido negativo, comprende 10 segmentos genómicos (Bacharach *et al.,* 2016). El segmento 1 (más grande), posee una mínima homología con la secuencia del segmento de polimerasa PB1 del virus de la gripe C. Se especula por lo tanto, que el segmento 1 codifica la polimerasa del TiLV. Mientras los otros nueve segmentos no mostraron homología con otros virus, pero tienen secuencias conservadas y complementarias en sus extremos 5´ y 3 ´, de acuerdo con la organización del genoma que se encuentra en otros ortomixovirus (Bacharach *et al.,* 2016). Los ortomixovirus tienen sus proteínas inmunogénicas y neutralizantes en las proteínas hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA) que en el virus de la influenza (prototipo de la familia) está codificado en el gen 4 y 6 respectivamente; mientras en los Isavirus, la hemaglutinina (HA) está codificada en el segmento 6 y el segmento 4 codifica la polimerasa ácida putativa (PA) (Plarre *et al*. 2012).Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que existen 14 genes responsables de la producción de 14 proteínas virales a partir de los 10 segmentos del TiLV (Acharya *et al.*, 2019).

Mugamba *et al*, 2018, realizo un estudio para investigar la posible presencia del TiLV en tilapias en el lago Victoria, ubicada en el centro oriental de África, rodeado por los países de Uganda (45%), Tanzania (49%) y Kenia (6%) donde se cultivan tilapias (*O. niloticus*). Encontrando 28 aislados del TiLV, cuyas secuencias eran semejantes a las secuencias de los virus aislados de Israel y Tailandia. Los aislados encontrados se agruparon en dos grupos que eran ligeramente diferentes entre sí y correspondían a diferentes aislados que ya se encontraban en el Gen Bank. El Grupo I (25 secuencias) de las cuales 9 eran de Uganda y 16 de Tanzania que eran idénticas a la secuencia israelí KU552132 depositada por (Tal *et al*., 2016) y la secuencia Tailandia KX631922.1 depositada por Surachetpong *et al.,* 2017. El grupo II (3 secuencias) de las cuales 1 de Uganda y 2 de Tanzania estrechamente relacionadas con las secuencias israelíes KU751815.1 y NC029921 depositadas por (Eyngor *et al*. 2014) y (Bacharach *et al.* 2016), respectivamente. Lo que sugiere que las secuencias de TiLV en Tailandia, Israel y el Lago Victoria podrían tener un origen común. Siendo este estudio el primer reporte donde se detecta el TiLV en tilapias asintomáticas y donde no habido un reporte de un brote previo (Lago Victoria). Recientemente, se realizó un estudio filogenético del virus del TiLV aislado de tilapias cultivadas en Israel, mostrando dos clados diferentes: un clado israelí y un clado ecuatoriano que está circulando en Israel (Skornik *et al*., 2020). Sin embargo, la secuenciación del genoma completo y los análisis filogenéticos son esenciales para realizar un seguimiento adecuado del movimiento del TiLV; ya que, un estudio reciente mostró un posible evento de reordenamiento que involucra un aislado de Ecuador EC-2012 e un aislado de Israel Til-4-2011, en los segmentos 5 y 6 de los aislamientos de TiLV de Bangladesh (BD-2017) mientras que las regiones de codificación de 10 segmentos

concatenados colocaron BD-2017 en un clado de Tailandia (Chaput *et al*., 2020).Hace seis años que se utilizó la secuenciación de última generación de escopeta para identificar TiLV, y ningún otro aislado ha sido secuenciado de genoma completo al mismo nivel. Esta falta de información genómica relacionada con TiLV es un obstáculo para comprender mejor este patógeno (*Surachetpong et al., 2020)*.

Clasificación taxonómica

La enfermedad viral de la Tilapia del Lago, es causado por un nuevo virus denominado virus de la Tilapia del Lago (TiLV). Eyngor (2014), lo describió como un nuevo miembro de la familia *Orthomyxoviridae.* En la actualidad, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, la clasificó como una nueva especie, Tilapia tilapinevirus , género Tilapinevirus y la familia Amnoonviridae (Adams *et al*. 2017).

Vías de transmisión

La principal vía de transmisión es la horizontal directa, producida a través de estudios de cohabitación de tilapias infectadas experimentalmente y tilapias sanas (Eyngor *et al*., 2014). Estudio realizado por Yamkasem *et al*., (2019) demuestran la posibilidad de transmisión vertical de TiLV de reproductores a progenies, sin embargo aún sigue siendo poco clara.

Especie susceptible

Hasta el momento durante los brotes de enfermedad, se han observado que sólo afecta a tilapia cultivadas como silvestres, siendo las únicas susceptibles. Entre ellas están:

i. Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en Ecuador, Egipto , Tailandia, India, Indonesia, Uganda, Perú (Fergunson *et al*.,2014; Fathi *et al.*, 2017;Dong *et al*.,2017a; Surachetpong *et al.,* 2017; Behera *et al.*, 2018; Koesharyani *et al.*, 2018;Mugambi *et al.*, 2018; OIE,2018b ; Huamanchaca,2019).
ii. Tilapia roja (*Oreochromis spp.*) en Tailandia (Dong *et al*., 2017a; Surachetpong *et al.*, 2017).
iii. Tilapia híbrida roja (*Oreochromis niloticus x Oreochromis mossambicus*) en Malasia (Amal *et al.*, 2018).
iv. Tilapia híbrida *(Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) en Israel (Eyngor *et al*., 2014).

Además, estudios previos determinaron que cuando existía un co-cultivo de tilapias TiLV positivas con otras especies de peces, éstas últimas eran TiLV negativa (Eyngor *et al.*, 2014, Fathi *et al.*, 2017, Behera *et al.*, 2018).Sin embargo, en un lago artificial en Malasia, se registró un evento de alta mortalidad en tilapias silvestres y éstas cohabitaban con otra especie, barba de río

(*Barbonymus schwanenfeldii*) aparentemente sanos. Se realizó los análisis respectivos, y se determinó que las tilapias y los peces barba de río eran TiLV positivas (Amal *et al.*, 2018). Por lo que, este estudio pone en evidencia que hay otras especies que pueden ser susceptibles a TiLV aunque aún se desconoce la importancia o implicancia de éstos hallazgos.

Factores de riesgo

Existen reportes, donde la enfermedad se ha producido, días después de realizar los traslados de las tilapias de estanques de incubación a engorde. Por lo que, el estrés sería el principal factor de riesgo identificado (Ferguson *et al.,* 2014, Dong *et al.,* 2017a).

Signos clínicos e histopatología

Se han observado que los signos clínicos y las lesiones macroscópicas por el TiLV pueden ser algo variables, según el origen geográfico (Jansen *et al.,* 2018). Las tilapias afectadas presentan como signo clínico más común el letargo (Eyngor *et al.,* 2014; Dong *et al.* 2017a; Surachetpong *et al.* ,2017), pérdida de apetito (Dong *et al.*, 2017a; Surachetpong *et al.*, 2017), nado superficial (Dong *et al*. 2017a; Surachetpong *et al.*, 2017).

Dentro las lesiones macroscópicas se encontraron : cataratas, uveítis, endoftalmitis, buftalmía, ptisis bulbi (Eyngor *et al.*, 2014), exoftalmia(Figura 9)(Ferguson *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017a; Surachetpong *et al*. ,2017; Behera *et al*. ,2018, OIE,2018b), erosiones cutáneas (Figura 10)(Eyngor *et al.,* 2014; Dong *et al.* 2017a; Surachetpong *et al.* ,2017; Behera *et al.* ,2018; OIE, 2018b), melanosis (Eyngor *et al.*, 2014; Ferguson *et al.*, 2014), moderada congestión del bazo y del riñón (Eyngor *et al.*, 2014), congestión cerebral (Eyngor *et al.*, 2014;Dong *et al.*, 2017a; Surachetpong *et al*. ,2017), distensión abdominal (Figura 11)(Ferguson *et al.*, 2014; Dong *et al.* , 2017a; Surachetpong *et al*. ,2017), pálidez branquial (Ferguson *et al.*, 2014; Surachetpong *et al*. ,2017 , protuberancia en escamas (Ferguson *et al.*, 2014).



Figura 9. Se observa la exoftalmia en tilapias enfermas con TiLV. Fuente: Ferguson *et al*. , 2014



Figura 10. Se observan erosiones y úlceras dérmicas multifocales (puntas de flecha) en tilapias híbridas comerciales (*O. niloticus x O. aureus*). Fuente: Eyngor *et al.* ,2014



Figura 11. Se observa distensión abdominal en tilapias enfermas con TiLV. Fuente: Ferguson *et al.* ,2014

A nivel histopatológico, se observan lesiones: en el cerebro como: hemorragias focales en las leptomeninges (Eyngor *et al.,* 2014), focos de gliosis y manguitos perivasculares en la corteza cerebral (Eyngor *et al.,* 2014; Fathi *et al*. 2017;), encefalitis (Fathi *et al*. 2017).A nivel ocular, se observa, ruptura de la cápsula lenticular (Eyngor *et al.,* 2014). En el hígado, se observan, formación de células sincitiales (hepatitis sincitial) (Figura 12) (Ferguson *et al.,* 2014; Dong *et al*. 2017a; Tsofack *et al.*, 2017; Amal *et al.*, 2018; Behera *et al*. ,2018), necrosis de los hepatocitos

también se encontró necrosis de las glándulas gástricas (Ferguson *et al.,* 2014). En el riñón: hemorragia intersticial multifocal en el riñón (Fathi *et al*. 2017).

Se observaron que las lesiones se centraron en el sistema nervioso central en brotes de Israel y lesiones se centraron en el hígado en Ecuador y Colombia, la secuenciación del genoma completo de TiLV reveló que el virus en estos países estaba infectada con virus casi idénticos (Eyngor *et al*., 2014; Ferguson *et al*., 2014; Bacharach *et al.,* 2016; Kabausu *et al.,* 2016; Dong *et al.,* 2017; Surachetpong *et al.,* 2017; Tattiyapong *et al.,* 2017).

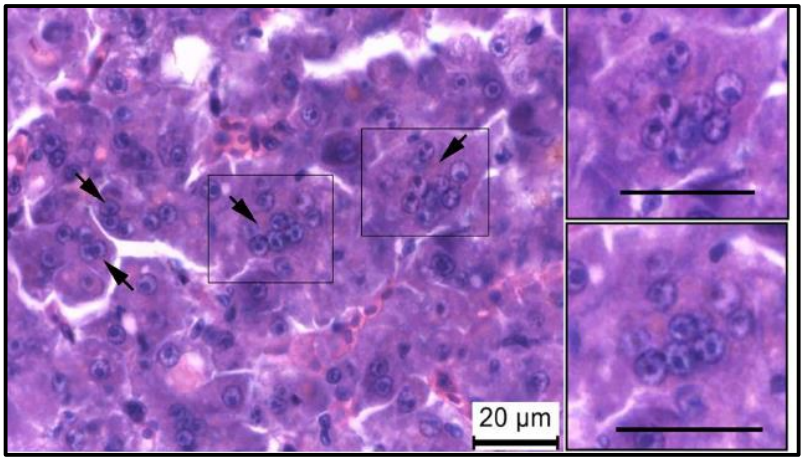


Figura 12. Hígado. Se muestras hepatocitos con múltiples núcleos (flechas). Mayor aumento de células gigantes sincitiales (cajas cuadradas). Tinción H&E, 1000 X; barras de escala, 20 µm. Fuente Dong *et al*., 2017

Distribución Geográfica

De acuerdo a la información de publicaciones científicas, notificaciones de la OIE e información de secuencia disponible en Gen Bank, el virus del TiLV ha sido notificado en tres continentes con mayor producción de tilapia: África, Asia y América del Sur (Jansen *et al*., 2018). Siendo Israel, el primer país que reporto (Eyngor *et al*., 2014; OIE, 2017c), Ecuador (Ferguson *et al*., 2014; Bacharach *et al*.,2016) , Colombia (Tsofack *et al*., 2017), Tailandia (Dong *et al*., 2017b; Surachetpong *et al*., 2017; OIE ,2017d), Egipto (Fathi *et al*., 2017; Nicholson *et al*., 2017), China Tai pei (OIE, 2017b), Malasia (OIE ,2017e); Filipinas(OIE ,2017f), India (Behera *et al*., 2018), Indonesia (Koesharyani *et al*., 2018; Amal *et al*., 2018),Uganda y Tanzania (Mugimba *et al*., 2018) y Perú (OIE, 2018b ; Huamancha *et al.*, 2019).Recientemente, reportado en México y EE.UU.(Ahasan *et al.,* 2020) y Bangladesh (Chaput *et al.,* 2020).Sin embargo, se sabe que en los

últimos años, han surgido eventos de mortalidades masivas en tilapias, donde no se ha logrado determinar la causa ni se ha considerado al virus TiLV dentro del diagnóstico diferencial. Esto indicaría que, la distribución de este virus emergente responsable de altas mortalidades, podría ser más amplia y representar así una grave amenaza para la acuicultura de tilapia a nivel mundial (OIE, 2017a).

Métodos de diagnóstico

Ante la sospecha de un caso de TiLV**,** se puede llevar a cabo el método de prueba presuntiva, que consiste en cultivar células del virus en líneas celulares primarias (cerebro de tilapia o línea celular E-II) esperando se produzca un efecto citopático dentro del rango de 3-10 días (Eyngor *et al*., 2014; Tsofack *et al*. 2016; Liamnimitr *et al*., 2017).

Como métodos de confirmación se tiene pruebas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos dirigido al segmento 3 del virus. Tsofack *et al*. (2016), publico un protocolo de RT-PCR anidada, la cual presenta alta sensibilidad (7 copias virales por reacción).Después Dong *et al.* (2017), publico un protocolo de RT-PCR semianidado cuya detección es sensible a (7.5 copias virales por reacción) y Tattiyapong *et al*. (2017), ha desarrollado un PCR cuantitativa qRT-PCR (70 copias virales /reacción). Pero las pruebas moleculares necesitan ser validadas (OIE, 2017a), por lo que se debe complementar con la secuenciación del producto representativo para confirmación del agente (Jansen *et al*., 2018).

Control

El TiLV es una enfermedad viral, por lo que no existe un tratamiento para éstas enfermedades. Por lo que es primordial, las medidas de prevención, que deben incluir las buenas prácticas de acuícolas, medidas de bioseguridad que incluyan programas de vigilancia en los centros de cultivo. Para el caso, de traslados de tilapias vivas, se deben realizar las pruebas de diagnóstico para la detección de TiLV. Así mismo, para permitir el ingreso de tilapias a un centro de cultivo, se debe realizar la cuarentena y solicitar certificado sanitario que certifique la ausencia de dicha enfermedad. (FAO ,2017).

En un estudio realizado por Eyngor *et al*. (2014) se observó que las tilapias que sobrevivían a los brotes de TiLV eran resistentes al siguiente brote, lo que esto demuestra que el pez crea una respuesta inmune contra la primera infección. Por lo que, se sugeriría la posibilidad de crear una vacuna como control de TiLV en un futuro (Eyngor *et al*. ,2014; Ferguson *et al*., 2014).

TiLV en el Perú

En el Perú, el primer brote se detectó en Piura a finales del 2017, luego se detectó en San Martín y Lambayeque a inicios del 2018. Estos brotes fueron identificados por el equipo de Investigación de la Sección Ictiopatología - Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria-FMV-UNMSM; dando información inmediata, al Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES).Siendo, ésta autoridad sanitaria , la encargada de notificar a la OIE que ,el virus del TiLV, se encuentra causando mortalidades en tilapias cultivadas y silvestres en el país (OIE, 2018b, SANIPES. 2018a). Para su diagnóstico, se realizó un estudio histopatológico (H&E) y un estudio molecular (RT- PCR anidado con cebadores específicos dirigidos al segmento 3), siendo secuenciados, los productos del PCR. Para llevarse a cabo, este estudio molecular, el equipo de investigación, realizó la estandarización de la prueba.Posteriormente, Castañeda *et al*. (2020), desarrollo un RT - PCR semi-anidado dirigido al segmento 3, para realizar el diagnóstico del TiLV.

Huamancha *et al*. (2019), realizó un estudio, en tilapias aparentemente sanas, sin signos clínicos ni lesiones, en el Departamento de San Martín. El objetivo de este estudio, fue evaluar la presencia de otro agente viral, como diagnóstico diferencial, a la enfermedad que ocasiona el virus del TiLV.

La autoridad sanitaria del país SANIPES, ante los brotes de TiLV , emitió un plan de emergencia y vigilancia, 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 (SANIPES. 2018b).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El análisis molecular se llevó a cabo en la Sección de Histopatología - Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria, en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en la ciudad de Lima.

3.2. Material Experimental

Muestras: Se **seleccionaron** al azar, 05 muestras positivas a TiLV, de un total de 26. Éstas muestras fueron obtenidas durante el brote de enfermedad registrado, por primera vez en el Perú, durante el período de Diciembre de 2017 a Junio de 2018. Las muestras positivas a TiLV, provenían de tilapias de cultivo ubicadas en los departamentos de San Martín y Piura (Cuadro 7).

Cuadro 7. Identificación y origen de las cinco (05) muestras positivas utilizadas para la secuenciación del segmento 4 del TiLV en Perú

Id muestra	Mes /Año	Departamento/Provincia/Distrito	Etapa Producción
TILV PERU T04	12/2017	Piura-Sullana- Lancones	Alevines
TILV PERU T07	12/2017	Piura-Sullana-Lancones	Engorde
TILV PERU T18	02/ 2018	San Martín - San Martín -Morales	Engorde
TILV PERU T24	03/ 2018	San Martín-San Martín -La Banda de Shilcayo	Reproductores
TILV PERU T28	03/2018	San Martín-San Martín -La Banda de Shilcayo	Reproductores

El diagnóstico a TiLV fue determinado, a través de un RT-PCR anidado con cebadores específicos dirigidos al segmento 3; según lo descrito, por Tsofack *et al. (*2017) y siendo sus productos de PCR secuenciados. Las muestras obtenidas fueron transportados al laboratorio en ARN later, para el estudio molecular. Se tomaron muestras de los órganos del riñón anterior, hígado, cerebro y líquido intraocular. Los cuales fueron homogenizados en solución salina (NaCl 0.9%) hasta lograr una suspensión del 20%. Luego se transfirió 1 ml del homogenizado a un microtubo de 2ml y fueron conservados a -80°C para su posterior uso en los análisis moleculares.

3.3. Metodología

3.3.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN total, se utilizó el método de TRIzol LS (Thermo Scientific, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizó 300 µl de cada muestra homogeneizada a la cual se agregó 1 ml de reactivo TRIzol LS (Thermo Scientific, EE.UU.) se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añadieron 240 µl de cloroformo, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se centrifugaron a 12,000g x 15 minutos a 4°C para obtener la separación de las fases de densidad. Se transfirió 500ul de la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga de 1.5ml, agregando 500 µl de etanol al 75%, y se centrifugaron a 12,000g x 15 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar a medio ambiente por 5 minutos. Finalmente, se resuspende el precipitados con 30 µl de agua libre de nucleasas y se incubó a 55 °C por 10 minutos.

El ARN total purificado se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso.

3.3.2. Síntesis de ADNc

A las muestras purificadas de ARN total se les realizó una retrotranscripción para obtener el ADN complementario (ADNc) (GoScript ™; Promega, EE. UU.), utilizando cebadores específicos externos previamente descritos: Ext-1 y Ext-2 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Cebadores específicos utilizados para el diagnóstico de TiLV por RT-PCR anidada. Los cebadores amplifican secuencias específicas del segmento 3 del genoma de TiLV.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Referencia
Ext1	TATGCAGTACTTTCCCTGCY	491	Tsofack *et al.* 2017
Ext2	TTGCTCTGAGCAAGAGTACC		
ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA	250	Dong *et al.* 2017
ME2	TATCACGTGCGTAYTCGTTCAGT		

Se realizó una etapa previa de desnaturalización donde se incubó 5 µl de muestras de ARN a 97 ° C durante 5 minutos y se mantuvo a 4°C.

La mezcla de reacción de retrotranscripción se preparó para un volumen final de 10 µl por muestra, acorde a las siguientes proporciones: 2.00µl de GoScript ™ 5X Reaction Buffer, 1.20µl $MgCl_2$ (25mM), 0.50 µl dNTP (10mM), 0.25 µl de los cebadores externos Ext-1 (20 µM) y Ext-2 (20 µM) ,0.40 µl de GoScript ™ Reverse Transcriptase, 0.40 µl de agua libre de nucleasas y finalmente se adicionó los 5 µl del ARN desnaturalizado.

Se usaron las siguientes condiciones de temperatura: 25 ° C durante 5 min, 42 ° C durante 45 min y se mantuvo a 4 ° C. El ADNc final se almacenó a -20 ° C hasta su uso en PCR.

3.3.3. RT-PCR anidada para el diagnóstico del TiLV

Se utilizó, el protocolo previamente estandarizado, por el Laboratorio de Ictiopatología-FMV-UNMSM. Por lo cual, el diagnóstico del TiLV, se llevó a cabo mediante la prueba de RT-PCR anidada, utilizando el kit GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega, EE. UU.). Se utilizaron los cebadores descritos por Tsofack *et al.*, 2017 para la detección del segmento 3 del genoma de TiLV.

Se preparó la mezcla de reacción de PCR (primera ronda y anidada) en un volumen final de 25 µl. La primera PCR amplificó un fragmento de 491 pb del segmento 3 del genoma de TiLV (PCR externa) usando 12.5 µl de 2x Master mix, 0.25 µl de los cebadores externos (Ext1 y Ext2) (Cuadro 8), 5µl de ADNc y 7 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de PCR fueron: 94 ° C durante 3 minutos seguidos de 30 ciclos de 94 ° C durante 30 segundos (desnaturalización), 54 ° C durante 60 segundos (hibridación) y 72 ° C durante 60 segundos (extensión); y un paso de extensión final de 72 °C durante 5 minutos. Los productos amplificados obtenidos fueron utilizados para un segundo PCR (PCR anidado), en el cual se emplearon los cebadores ME1 y ME2 (Cuadro 2) amplificando un fragmento de 250 pb. La mezcla de PCR se preparó usando

12,5 µl de 2x Master mix, 0.25 µl de cebador ME1 (20 µM) y ME2 (20 µM), 9 µl de agua libre de nucleasas y 3 µl del producto de PCR de la primera ronda. Las condiciones fueron: 94 ° C durante 3 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 60 segundos y 72 °C durante 60 segundos; y un paso de extensión final de 72 °C durante 5 minutos.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en solución tampón TBE (Tris/Borate/EDTA) 0.5X, utilizando bromuro de etidio, visualizados a través de un transiluminador UV y utilizando marcadores de peso molecular de Promega, EE.UU. (100bp DNA Ladder). Cinco de las muestras positivas fueron utilizados para la caracterización del segmento 4 del TiLV.

3.3.4. RT**-PCR para la amplificación del segmento 4 del TiLV**

Para la amplificación y análisis del segmento 4 del genoma de TiLV, se determinó un tamaño de 1,190pb en el segmento 4 basado en el análisis de la secuencia referencial de la cepa israelí (Nº de acceso KU751817.1) disponible en el Gen Bank.

Para ello, se diseñaron los cebadores específicos que enmarcan la secuencia amplificándola en dos porciones que se empalman. Los cebadores específicos fueron diseñados utilizando el programa PRIMER 3 y se describen en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Cebadores específicos diseñados para la amplificación del segmento 4 del TiLV en el Perú

Segmento	**Tamaño del producto (pb)**	**Sentido**	**Secuencia (5'-3')**
TiLVseg4-1P	724	Fw	GCAAATCTTTCTCCAATTACCGT
		Rv	GTGTTCGCATTGAGGTCTGG
TiLVseg4-2P	686	Fw	GGAGGCGGGATTATAGCAGT
		Rv	ACAAAGACTAGTATGGCAGCTG

Se utilizó el kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, trabajando en volumen de reacción 25 µl. La proporción de reactivos fue la siguiente: 12.5 µl Green GoTaq® Reaction Buffer 2x, 0.25 µl Cebador seg4-1P forward (20uM), 0.25 µl Cebador seg4-1P reverse (20uM), 5.00 µl ADNc y 7.00 µl de agua libre de nucleasas.

La mezcla de PCR consistió en 20 µM de los cebadores, 7 µl de agua, 12.5 µL de tampón 2x, 5 µl de ADNc. La amplificación se realizó en un termociclador Turbo Cycler 2 (Bio Tech) a

través de una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos a 94 ° C de 30 segundos, 54 ° C a 1 minuto y a 72 ° C a 1 minuto , finalmente una etapa de extensión final de 72 ° C a 5 minutos .

3.3.5. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % solución tampón TBE (Tris / Borate / EDTA) 0.5X, utilizando bromuro de etidio, visualizados a través de un transiluminador UV y utilizando marcadores de peso molecular de Promega, EE.UU. (100bp DNA Ladder).

Se utilizó un voltaje de 140V durante 30 minutos a fin de observarse las bandas en el tamaño esperado del segmento 4 del TiLV.

3.3.6. Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Inc. con sede en Seúl, República de Corea, donde fueron sometidos a secuenciación bidireccional mediante el método de Sanger automatizado. Para ello, los productos de PCR fueron preparados de acuerdo con las indicaciones de volumen y concentración requeridas por Macrogen Inc. para la secuenciación del segmento 4 del TiLV correspondiente a cada muestra. Se colocaron 25 µl de los productos obtenidos en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y fueron enviados a temperatura ambiente. Los resultados se recibieron en archivo de software Chromas Lite 2.1.1, donde cada lectura de secuenciación se pudo visualizar en gráficos (cromatogramas).

3.3.7. Análisis de secuencia de nucleótidos y análisis filogenético de TiLV

La edición y empalme de las secuencias obtenidas se realizaron mediante los softwares Chromas Lite v2.1.1 y Edit Seq v7.0.0 de Lasergene, DNASTAR, respectivamente. La alineación de secuencias múltiples se realizó usando el método Clustal W (Thompson *et al*., 1994) usando el algoritmo de Meg Align 7.0 del software Lasergene DNASTAR (Clewley y Arnold, 1997). La edición se llevó a cabo utilizando tres secuencias como base de comparación, las cepas de referencia de Israel y (Acceso KU751817.1 y KU552133.1) y Tailandia (Accesso KX631924.1) disponibles en Gen Bank. El análisis genético y porcentaje de identidad genética se realizaron mediante el programa MEGA 7 (Kumar *et al*., 2016). Esto se puede representar gráficamente, a través de la construcción del árbol filogenético, a partir de las secuencias alineadas, por medio del método de Neighbor - Joining (NJ) (Saito Nei, 1987); utilizando, los parámetros del modelo 2 de distancia de Kimura (Kimura, 1980) y boostrap de 1000 réplicas.

. **3.3.8. Análisis de estructura de la proteína hipotética**

Se utilizó el del programa Phyre2, para el modelamiento estructural por enhebramiento de las secuencias de aminoácidos obtenidos en el estudio del segmento 4 del TiLV (Kelley *et al*. 2015).

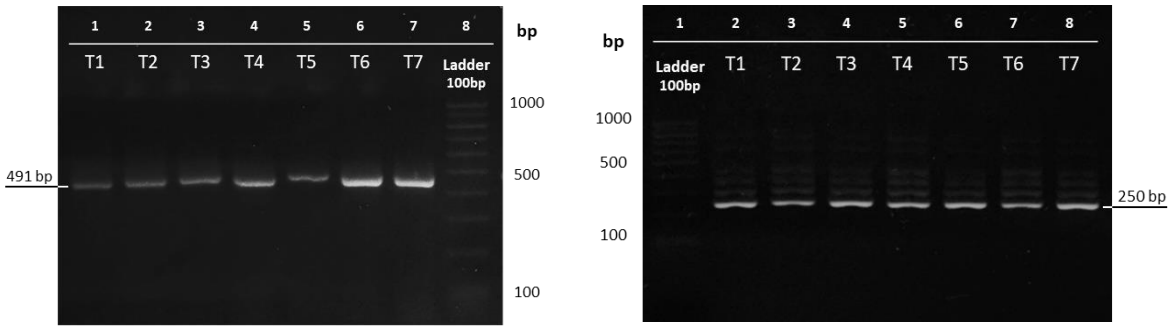
Para determinar la presencia de regiones transmembrana de la proteína putativa se utilizó el software TMpred (Hofman y Stoffel, 1993).

IV. RESULTADOS

4.1. Detección del TiLV en el Perú

Los resultados observados del RT-PCR anidado mostraron la amplificación de bandas de las muestras positivas analizadas. En la primera PCR (externa), se observó la presencia de una banda específica de 491 pb (Figura 13a) correspondiente al segmento 3 del genoma de TiLV. Todos los productos de PCR de la primera ronda, se analizaron luego por PCR anidada, observándose que las muestras positivas amplificaron un producto de 251 pb (Figura 14b).

Para confirmar nuestros resultados, los productos de 491bp obtenidos de 07 cepas de campo denominados como T1 ➔ T7**,** fueron secuenciados en Macrogen Inc., con sede en Seúl–Norcoreana**.**



13a **13b**

Figura 13. RT-PCR anidada para el segmento 3 del genoma de TiLV. Resultados de electroforesis de siete muestras positivas denominadas T1- T7. **(13a)** Producto de PCR de 491 pb de longitud en la primera ronda de PCR **y (13b)** bandas de 250 pb de longitud en PCR anidada.

4.2. Análisis de secuencia del segmento 4 del TiLV

Las 05 muestras positivas seleccionadas fueron sometidas a la técnica RT-PCR para la amplificación del segmento 4 del TiLV. Al evaluar los productos después del proceso de electroforesis, se obtuvieron bandas intensas de los tamaños esperados correspondientes a las porciones del segmento 4, de 724 y 686 pares de bases (pb), respectivamente, en las cinco muestras positivas (Figura 14). Por lo tanto, se enviaron las diez secuencias amplificadas para la secuenciación bidireccional posterior. La información de las muestras secuenciadas se detalla en el Cuadro 7.

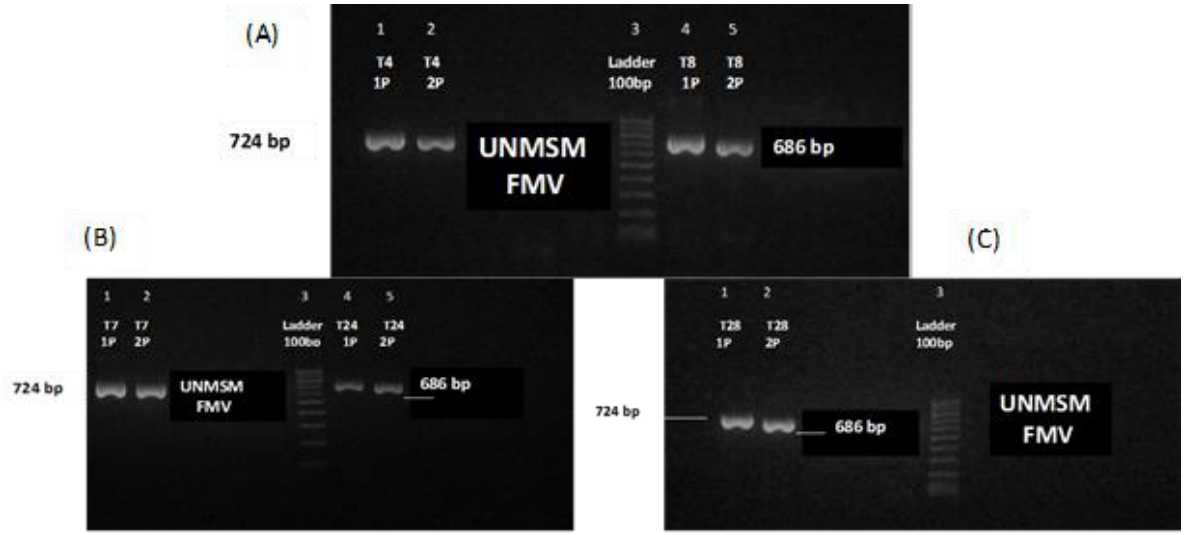


Figura 14. Electroforesis de los productos de la prueba RT-PCR para el secuenciamiento del segmento 4 del virus de la tilapia del lago(TiLV).(A) Se observan bandas de 724pb (carril 1 y carril 4) y bandas de 686 pb (carril 2 y carril 5)de las muestras T4 Y T8 respectivamente.(B) Se observan bandas de 724pb (carril 1 y carril 4) y bandas de 686 pb (carril 2 y carril 5)de las muestras T7 Y T24 respectivamente.(C). Se observa las bandas de 724pb (carril 1) y 686 pb (carril 2) de la muestra T28.

4.3. Alineamiento múltiple y análisis filogenético de TiLV

Las secuencias completas fueron empalmadas y alineadas entre ellas, definiendo una longitud de 1190 pb y fueron comparadas con cepas referenciales correspondiente al segmento 4 de TILV publicadas Gen bank. Se construyó un árbol filogenético (Figura 15) basado en la alineación de siete secuencias del segmento 4 de TiLV, las cuatro secuencias generadas en el presente estudio

y tres secuencias de cepas disponibles en Gen Bank , que se seleccionaron como cepas de referencia (Cuadro 10).Se retiró del estudio a la muestra TILV Perú T07 por obtenerse secuencias incompletas.

Cuadro 10. Secuencias del segmento 4 del TiLV depositado en Gene Bank

País de origen	N° acceso al Gen Bank	Denominación
Israel	KU751817.1	Til-4-2011 segment 4
Israel	KU552133.1	TiLV AD-2016 contig 5
Tailandia	KX631924.1	TiLV TV1 segment 4

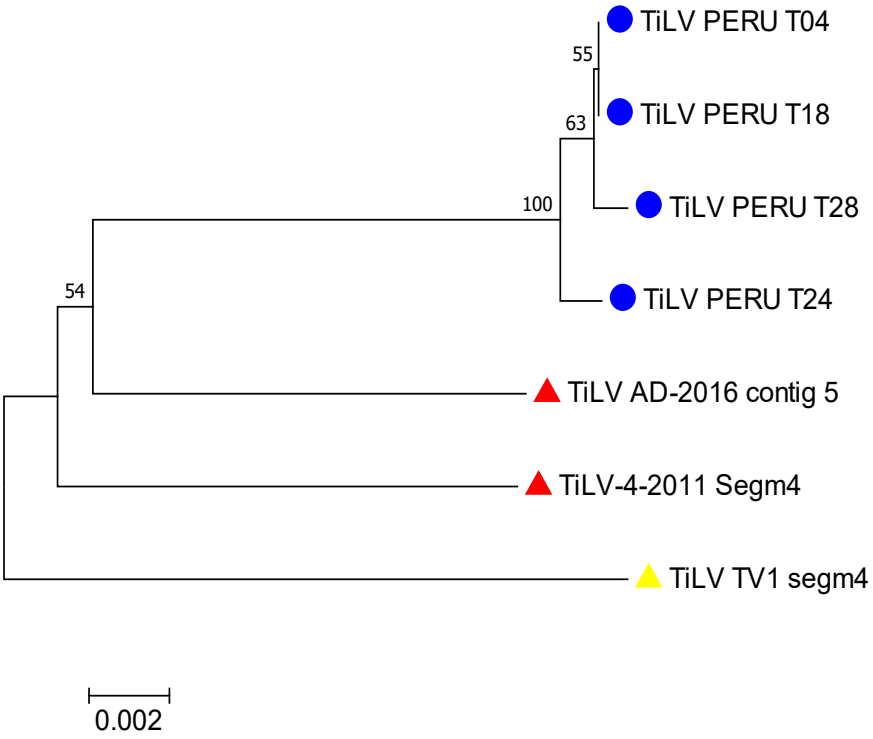


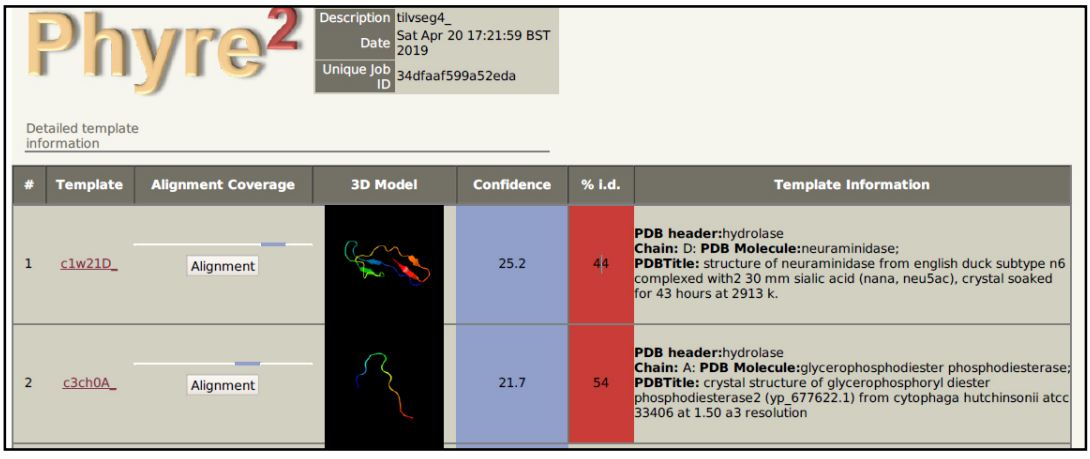
Figura 15. Análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos del segmento 4 de TiLV de Perú (círculos azules) y secuencias de referencia de Israel (rojo) y Tailandia (amarillo). Método de Neighbor-Joining, Bootstrap de 1000 réplicas, método de Kimura de 2 parámetros. Software MEGA v7.0.26.

Basado en el análisis filogenético en el segmento 4, se determinó la presencia de un genogrupo TiLV en nuestro entorno. El análisis filogenético ha determinado que las muestras positivas peruanas presentan mayor relación genética con el clado de cepas de Israel. El análisis de distancia genética muestra que las 4 muestras positivas peruanas mostraron valores de identidad de 99.7-100% entre ellas y 97.5-97.7% con cepas de Israel y 97.0-97.1% con cepas de Tailandia.

4.4. Análisis de estructura de la proteína hipotética

En el modelamiento de las proteínas hipotéticas del TiLV usando Phyre2, se observó que, la proteína hipotética del segmento 4, tiene un dominio en la región carboxilo (c1w21D), con una homología estructural con la cadena D de la neuraminidasa (N6) del virus de Influenzavirus A; con una identidad de 44%, una cobertura de 12% y una confianza de 25.2% (Figura16).

Se observó que, está región contiene un dominio conservado entre las secuencias de aminoácidos del segmento 4, con estructura de la familia sialidasas o neuraminidasas (10,2% identidad), la neuraminidasa N1 (9,1% identidad) y N2 (9,0% identidad) del Influenzavirus A.


Phyre2

Description tilvseg4_
Date Sat Apr 20 17:21:59 BST 2019
Unique Job ID 34dfaaf599a52eda

Detailed template information

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% i.d.	Template Information
1	c1w21D_	Alignment		25.2	44	**PDB header:**hydrolase **Chain:** D: **PDB Molecule:**neuraminidase; **PDBTitle:** structure of neuraminidase from english duck subtype n6 complexed with2 30 mm sialic acid (nana, neu5ac), crystal soaked for 43 hours at 2913 k.
2	c3ch0A_	Alignment		21.7	54	**PDB header:**hydrolase **Chain:** A: **PDB Molecule:**glycerophosphodiester phosphodiesterase; **PDBTitle:** crystal structure of glycerophosphoryl diester phosphodiesterase2 (yp_677622.1) from cytophaga hutchinsonii atcc 33406 at 1.50 a3 resolution

Figura 16. Reporte del programa Phyre2 del segmento 4 de TILV

En el análisis realizado para determinar la presencia de regiones transmembrana utilizando el software "TMpred prediction output", se encontró que existen dos hélices transmembrana (1803 de score) en la región de los aminoácidos 245-263 sentido interno-externo; y, 273-298 sentido externo-interno con un score de 790 y 1013 respectivamente(Figura 17) ; que indica, ser una proteína con una ubicación transmembrana.

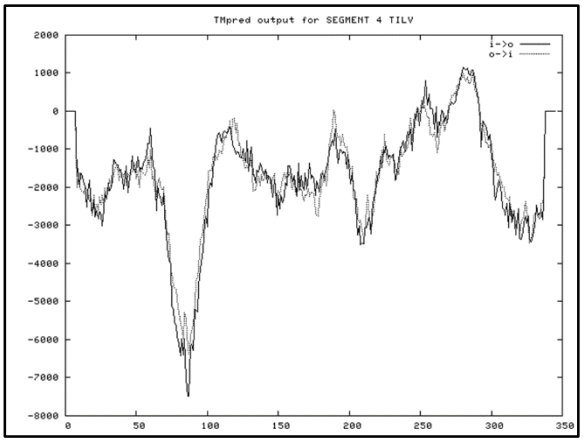


Figura 17. TMpred output para segment 4 de TILV. TMPRED.10087.8194.seq.

V. DISCUSIÓN

Este virus ha sido descrito recientemente a nivel mundial. Siendo causante de altas mortalidades en tilapias de cultivo y silvestres. En el Perú, durante los meses de Octubre - Diciembre del 2017, se observaron brotes de alta mortalidad inusuales, en tilapias silvestres y cultivadas en el departamento de Piura. El grupo de investigación de Sanidad Acuícola (GRISANAC) de la facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, fue el primer grupo de investigación, que confirmó su presencia en el país. El diagnóstico, se llevó a cabo, a través de estudios histopatológicos y estudios moleculares (RT-PCR anidada con cebadores dirigidos al segmento 3), siendo los productos de PCR secuenciados. Siendo comunicada, de tan importante hallazgo, a la autoridad sanitaria (SANIPES) para que tome las medidas convenientes y sea reportado a la OIE (OIE 2018b; SANIPES. 2018a). Posteriormente, Castañeda *et al*. (2020), desarrollo un RT - PCR semi-anidado dirigido al segmento 3, coincidiendo con nuestros datos obtenidos, donde las muestras positivas de TiLV presentes en el Perú, son más cercanas a las cepas de Israel.

Actualmente, estudios relacionados con la caracterización molecular de los segmentos del virus TiLV, y la determinación de su posible función de la secuencia de la proteína hipotética, obtenida a partir de ellos, no han sido aún descritos en el país . Por lo que, en el presente estudio, se logró la caracterización molecular del segmento 4 del virus de la tilapia del lago (TiLV) y se determinó que es una proteína transmembrana. Posteriormente, a la culminación de nuestro estudio, Huamancha (2019) detectó, el virus del TiLV en tilapias asintomáticas en el país. Por lo que, se decidió realizar un estudio de comparación con las secuencias obtenidas del segmento 4, para tener un mejor panorama de lo ocurría en el país. Así mismo, durante el proceso de evaluación de nuestra publicación, se detectó el virus del TiLV en otros países como: México,

EE.UU, Bangladesh. Los cuales no pudieron ser incluidos ya que durante el proceso del estudio e interpretación, aún no se contaban con está información. Esto puede seguir ocurriendo ya que hay mucho por investigar del virus TiLV y su distribución geográfica.

En el presente estudio ,basado en el análisis filogenético del segmento 4, se determinó la presencia de un genogrupo TiLV en nuestro país (identidad de nucleótidos de 99.7-100% entre ellas). A su vez, en un análisis de secuencias obtenidas del presente estudio (primer brote de TiLV en el Perú) con las secuencias obtenidas, por Huamancha (2019), en tilapias asintomáticas; se obtuvó, un valor de 99,81% de identidad de nucleótidos. Confirmándose así, que una misma cepa de TiLV está circulando en el Perú. Siendo, las primeras notificaciones de mortalidades inusuales en el departamento de Piura ; meses después , en el departamento de San Martín, Lambayeque, Cajamarca y Lima (OIE, 2018b).Este desplazamiento del virus en el territorio nacional, refleja el alto nivel de comercio interno, entre estos departamentos con mayor producción. A nivel nacional, se da la venta de reproductores y alevines; así como, movimientos informales de alevines y tilapias de ambientes naturales (embalses, lagos) con fines comerciales. Además, la falta de aplicación de las buenas prácticas de acuicultura, limpieza, desinfección y bioseguridad en los centros de cultivo de tilapia del país; facilita la introducción, infección y propagación del virus, en diferentes departamentos del Perú, donde se realiza el cultivo de tilapia. Esto se evidencia, por ejemplo: cuando los acuicultores hacen uso de los recursos hídricos (ríos, lagos) para la crianza de peces, y no realizan un tratamiento previo al agua usada antes de ser desechada, pudiendo afectar a los peces de otro centro de cultivo cercanos, al no realizar un adecuado método de eliminación de peces muertos siendo desechados en los ríos o lagos, pudiendo afectar a especies silvestres o peces de centros de cultivo cercanos causando el brote de la enfermedad.

Por lo tanto, es muy importante tener un mayor control en la transferencia de animales a diferentes centros de producción de tilapias ubicados en diferentes partes del país, asimismo éstos centros deben tener disposiciones bioseguridad, limpieza, desinfección y la aplicación de buenas prácticas de acuicultura, la cual carecían en el momento del brote de la enfermedad. Dado que los resultados obtenidos muestran un alto potencial de diseminación del virus, que puede causar grandes pérdidas al sector de la acuicultura, además de poner en riesgo la transmisión a los peces silvestres (Abdullah *et al*.2018).

El análisis filogenético, determino que las secuencias obtenidas en el presente estudio , presentan mayor relación genética con el clado de cepas de Israel. El análisis de distancia genética evidencia que, tienen valores de identidad de 97.5-97.7% con cepas de Israel; y, 97.0-97.1% con cepas de Tailandia. Las secuencias obtenidas por (Huamancha *et al*.2019); también presentan una mayor cercanía, con las cepas de Israel 97.37-97-56%. La cercanía filogenética de las cepas de Perú con las de Israel; podrían indicar, que provienen de un mismo origen; ya que, Israel fue

donde se produjeron los primeros informes de mortalidad inusual tanto en tilapias cultivadas y silvestres; tomando muchos años, en identificar al agente causal de éstas mortalidades. Durante este período, se pudo propagar de manera latente a diferentes países, debido al comercio de ésta especie (Dong *et al*., 2017b; Behera *et al.,* 2018, Mugimba *et al*., 2018). Así mismo, existen estudios donde se ha detectado el TiLV, en tilapias aparentemente sanas (Senapin *et al*., 2018; Mugimba *et al*., 2018; Huamanchaca, 2019); por lo que, su manifestación como patógeno en peces, podría estar relacionado al desencadenamiento de factores estresantes como: mal manejo durante el cultivo, en sistemas acuícolas intensificados; así como, los cambios medioambientales, que estresan a los peces en los cuerpos de agua naturales (Mugimba *et al*., 2018). Por lo cual, es de suma importancia incluir un programa de prevención, en los centros de cultivo de tilapia formales e informales en el país; solicitar certificados sanitarios del país de procedencia de tilapias (alevines y reproductores), para evitar el ingreso de agentes infecciosos (Machimbirike *et al*. 2019) a nuestro país, condición que debe ser considerada como obligatoria en el movimiento de tilapias en exportaciones e importaciones. Por lo tanto, el programa de vigilancia debe considerarse no solo para la enfermedad producida por TiLV sino también para otros posibles agentes infecciosos que puedan afectar a las tilapias , notificando casos de mortalidades inexplicables en poblaciones de peces importados con el fin de evitar la propagación de éstos.

Se realizó un análisis estructural por enhebramiento de las secuencias de aminoácidos obtenidos en el presente estudio; donde se determinó que, existe un dominio situado en la región carboxilo, que tiene una homología estructural con la proteína neuraminidasa N6 (Influenza A); y, con la estructura básica de la familia sialidasas, donde sobresalen las neuraminasas de los orthomixovirus, como el virus de la Influenza (Wagner *et al.*2002). El análisis bioinformática, de las secuencias del segmento, determinaron que la proteína hipotética generada del segmento 4, tiene una ubicación en la región transmembrana; indicando que, la proteína está ubicada en la cubierta del virus. Estos datos obtenidos, podrían evidenciar que, la proteína hipotética del segmento 4 del TiLV, tendría funciones similares a una neurominidasa viral. Asimismo, en el análisis de aminoácidos obtenidas del segmento 4 de la cepa de Huamancha *et al*., (2019); con respecto, a las obtenidas en el presente estudio, se obtiene una identidad de 99,71% .Por lo que, no habría un cambio en la función de la proteína hipotética.

Se han descrito el uso de las proteínas de la cápside viral: hemaglutinina esterasa (HA) y neuraminidasa (NA), como antígenos, contra el Isavirus y el Influenzavirus (Mikalsen *et al.* 2005, Caruffo *et al*. 2016). Por lo cual, la posible función que desempeñaría este segmento 4 del TiLV, como NA de acuerdo a los resultados, sería de vital importancia para la replicación del virus al participar en la liberación de los viriones de las células infectadas al exterior, mediante la ruptura de azúcares que ligan a las partículas virales maduras (Cheville y Lehmkuh 2009, Koren y Nylund 1997).Además la NA, tiene un beneficio adicional como antígeno de la vacuna; ya que, muchos

anticuerpos específicos de NA se unen a dominios que están bien conservados dentro de un subtipo, protegiendo contra virus heterólogos. Lo que sugiere que, la NA puede ser una buena opción para su inclusión en las vacunas universales contra Ortomixovirus (Eichelberger *et al*. 2018).

Se necesita seguir investigando para enfocarse en estrategias de control y prevención, como el desarrollo de una vacuna efectiva, la mejora e implementación de medidas de bioseguridad y la identificación de portadores del virus TiLV.

VI. CONCLUSIONES

1.- Se determinó la presencia de un genogrupo TiLV en nuestro país, presentando una mayor relación genética con el clado de las cepas de Israel.

2.- La proteína hipotética generada del segmento 4, tiene una ubicación en la región transmembrana.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar más estudios sobre el genoma TiLV ya que aún no se conoce las funciones específicas de las proteínas hipotéticas de sus 10 segmentos, debido a que aún no se logra tener claro su clasificación.

2. Se debería implementar un mayor control al ingreso de ovas o larvas al país, así como mayor control en el traslado interno de reproductores, alevines tanto de centros formales e informales que no cuentan con control ni medidas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ***Abdullah A, Ramly R, Syafiq M, Ridzwan M, Sudirwan F, Abas A, Ahmad K, Murni M, Chu Kua B. 2018.*** First detection of tilapia lake virus (TiLV) in wild river carp (*Barbonymus schwanenfeldii*) at Timah Tasoh Lake, Malaysia. . J Fish Dis 00: 1–4.
2. ***Acharya V, Chakraborty HJ, Rout A K, Balabantaray S, Behera BK,Das BK. 2019.*** Structural characterization of open Reading frame-encoded Functional genes from tilapia lake virus (TiLV). Molecular Biotechnology, 61(12), 945–957. https://doi.org/10.1007/s1203
3. ***Adams M, Lefkowitz E, King A, Harrach B,Harrison R,Knowles N, Kropinski A, Krupovic M, Kuhn J, Mushegian A, Nibert M, Sabanadzovic S,Sanfac¸on H, Siddell S,Simmonds P, Varsani A, Zerbini F, Gorbalenya, Davison A. 2017.*** Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). Arch Virol .DOI 10.1007/s00705-017-3358-5

4. ***Addo S.2013.*** Effects of pre and probiotcs on pond production, growth and disease susceptibility of cannel catfish *Ictalurus punctatus* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Tesis para obtener el grado de Doctor enFilosofía .Univ.de Auburn, Alabama.162 p.

5. ***Aly S.2013***. A review of fish diseases in the egyptian aquaculture sector.working report (pp.1-41) Penang, Malaysia: Worldfish

6. ***Ahasan S., Keleher W, Giray C., Perry B, Surachetpong W, Nicholson P, Waltzek T. 2020.*** Genomic characterization of tilapia lake virus isolates recovered from moribund Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) on a farm in the United States. Microbiology Resource Announcements, 9(4), e01368-19. https://doi.org/10.1128/mra.01368-19

7. ***Amal M, Koh C, Nurliyana M, Suhaiba M, Nor-Amalina Z, Santha , Diyana-Nadhirah K, Yusof M , Ina-Salwany M, Zamri-Saad M .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.

8. ***Ariel E y Owens L. 1997.*** Epizootic mortalities in tilapia Oreochromis mossambicus. Disease of Aquatic Organisms.29:1-6.

9. ***Auro A, Ocampo L. 1999.*** Diagnóstico del estrés en peces.Vet.Méx.30 (4): 337-344

10. ***Awad ES.2010.*** Studies on plant based dietary supplements for control of *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Edinburgh, UK Heriot Watt University.204p.

11. ***Bacharach E, Mishra N, Briese T, Zody MC, Kembou Tsofack JE, Zamostiano R, Lipkin WI. 2016.*** Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of Tilapia. MBio 7(2): 00431–00416.
12. ***Badatunde A. Omale S, Olubukola A.2014***.Curbing the menace of prolific brreding in "Aquatic Chiken": A way out to improve fish production in Nigeria.New York Sci J. 7(4):112-118

13. ***Baltazar PM y Palomino AR. 2004.*** Manual de cultivo de tilapia. Acuerdo de Colaboración Institucional AECI/PADESPA-FONDEPES. Subproyecto: "Programa de transferencia de tecnología en acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas" 115pp.

14. ***Baltazar PM.2007.*** La tilapia en el Perú: acuicultura, mercado y perspectivas. Rev Perú Biol 13(3): 267-273

15. ***Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza S MG, Lulhier F.1999 a.*** Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, previously to cronic strees.Aquaculture Research 30, p 437-444.

16. ***Barcellos LJG, Nicolaiewsky S, De Souza SMG, Lulhier F.1999 b.*** The effects of stocking density and social interaction on acute stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Aquaculture Research 30, p 887-892.

17. ***Bard J, De Kimpe P, Lemasson J, Lessent P.1975***.Manual de piscicultura destinado a la América Tropical. Ministerio de Asuntos Extranjeros, Francia: 125p.

18. ***Behera B, Pradhan P, Swaminathan T, Sood N, Paria P, Das A, Verma D, Rajkumar, Yadav M, Dev A, Parida P, Das B, Lal K, Jena J.2018.*** Emergence of Tilapia Lake Virus associated with mortalities of farmed Nile Tilapia Oreochromis niloticus (Linnaeus 1758) in India. Aquaculture: 168–174.

19. ***Béné C, Barange M, Subasinghe R, Pinstrup-Andersen P, Merino G, Hemre G, Williams M.2015.*** Feeding 9 billion by 2050- Puting fish back on the menú.Food Sec.16p

20. ***Caruffo M., Maturana C, Kambalapally S., Larenas J, Tobar J. 2016.*** Protective oral vaccination against infectious salmon anaemia virus in Salmo salar. Fish & shellfish immunology, 54, 54-59. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.009

21. ***Castañeda A., Feria M, Toledo O, Castillo D, Cueva M, Motte E.2020***.Detección del virus de la tilapia del lago (TiLV) mediante semi-nested RT-PCR en tilapias cultivadas provenientes de dos regiones del Perú. Rev Inv Vet Perú 2020; 31(2): e16158. http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.16158

22. ***Castillo F. 2011***.Tilapia roja: Una evolución de 29 años, de la incertidumbre al éxito. Editorial Académica Española. Saabruken Alemania.356 p.

23. ***Centeno L, Silva –Acuña A, Silva –Acuña R, Pérez J. 2004.***Fauna ectoparasitaria asociada a *Colossoma macropomum* y al híbrido de *C.macropomum x Piaractaus brachypomus,* cultivados en el estado delta Amacuro, Venezuela. Biagro. 16(2):121-126.

24. ***Clewley JP, Arnold C. 1997.*** MEGALIGN. The multiple alignment module of LASERGENE. Methods Mol Biol. 70:119-29.

25. ***Conroy G, Conroy David, Klesius P, Shoemaker C, Evans J.2008***.Importantes enfermedades infecciosas y parasitarias en tilapias cultivadas. Intervet-Schering-Plough Animal Health .171pp

26. ***Crane M, Hyatt A.2011.*** Viruses of fish: an overview of significant pathogens.Viruses 3: 2025-2046 doi: 10.3390/v3112025

27. ***Chaput D, Bass D, Alam M, Al Hasan N, Stentiford G, Tyler C.2020.*** The segment matters: Probable reassortment of tilapia lake virus (TILV) complicates phylogenetic analysis and inference of geographical origin of new isolate from Bangladesh. Viruses, 12(3), 258. https://doi.org/10.3390/v12030258

28. ***Cheville N y Lehmkuh H.2009***. Orthomyxoviruses. In: Cheville, NF, ed. Ultrastructural Pathology. Second ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell: 356-357.

29. ***Del-Pozo J, Mishra N, Kabuusu R, Cheetham S, Eldar A, Bacharach E, Ferguson HW. 2017.*** Syncytial hepatitis of Tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) is associated with orthomyxovirus-like virions in hepatocytes. Veterinary Pathology 54(1): 164–170.

30. ***Dong HT, Siriroob S, Meemetta W, Santimanawong W, Gangnonngiw W, Pirarat N, Senapin S. 2017a.*** Emergence of tilapia lake virus in Thailand and an alternative semi-nested RT-PCR for detection. Aquaculture 476: 111–118.

31. ***Dong HT, Ataguba P, Khunrae T, Rattanarojpong T, Senapin S. 2017b.*** Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries in Thailand from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease. Aquaculture 479: 579–583.

32. ***El Sayed AF .2006.*** Tilapia Culture. Oxfordshire: CABI Publishing. 277p.

33. ***Endo M, Kumahara C, Yoshida T,Tabata M.2002.***Reduced stress and increased immune responses in Nile tilapia kept under self-feeding conditions.Fisheries Science 68,253-257.

34. ***Eyngor M, Zamostiano R, Kembou Tsofack JE, Berkowitz A, Bercovier H, Tinman S, Eldar A. 2014.*** Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. Journal of Clinical Microbiology 52(12): 4137–4146.

35. ***Espejo GC .2001.*** Cría y comercialización de tilapia roja .FONADE (Fondo financiero de proyectos de desarrollo)- Ecuador. [Internet],[19 julio 2020]. Disponible en: http://www.geocities.com/piscicultura/tilapia.html,

36. ***Eichelberger C, Morens D, Taubenberger J. 2018.*** Neuraminidase as an influenza vaccine antigen: a low hanging fruit, ready for picking to improve vaccine effectiveness. Current opinion in immunology, 53, 38-44. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.025

37. ***Everitt S, Leung C FA. 1999.*** Fish disease in Hong Kong .Paper presented at the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture: Aquatic Animal Health for Sustainability, 22-26 November, Cebu City, Philippines.

38. ***[FAO] Food and Agricultural Organization of the United Nations.2005.*** Visión general del sector acuícola nacional-Perú. En: departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [Internet], [16 julio 2020]. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_peru/es.

39. ***[FAO] Food and Agricultural Organization of the United Nations.2012.*** The state of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO.231p.

40. ***[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. Rome: FAO. Global Information and Early Warning System (GIEWS) Special Alert No. 338 - Global, 26 May 2017. [Internet], [12 febrero 2020] Available from http://www.fao.org/documents/card/en/c/3ce1da5b-1529-4e7c-8b88-7adfef8d138c/

41. ***[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018.*** The state of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO. Meeting the sustainable development goals.227p.

42. ***[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020.*** The state of world fisheries and aquaculture. Rome: FAO. Meeting the sustainable development goals.243p.

43. ***Fathi M, Dickson C, Dickson M, Leschen W, Baily J, Muir F, Weidmann M. 2017.*** Identification of Tilapia lake virus in egypt in nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome. Aquaculture 473: 430–432.

44. ***Ferguson H., Kabuusu R, Beltran S, Reyes E, Lince J, del Pozo, J. 2014.*** Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): A case report J Fish Dis 37: 583–589.

45. ***Foo JTW, Lam TJ .1993.*** Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Aquaculture 115,145-158.

46. ***GLOBEFISH .2017.***Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [Internet], [24 agosto 2021]. Disponible en: http://www.fao.org/in-action/globefish/publications/details-publication/es/c/1052040/

47. ***GLOBEFISH. 2021.*** Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [Internet], [24 agosto 2021]. Disponible en: http://www.fao.org/in-action/globefish/publications/details-publication/es/c/1297260/

48. ***González J, Heredia B. 1998.*** Cultivo de la cachama (*Colossoma macropomum*).Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Estado Guárico. Maracay, Venezuela.p134**.**

49. ***Guerrero RA y Guerrero LA. 2000***. Domestic marketing of tilapia in Souheast Asia. In: Subasinghe S and Singh T. eds. Tilapia 2001. In Tech.and Trade Conference on Tilapia. Info fish, Kuala Lumpur, Malasya.81-83 pp

50. ***Hall S, Delaporte A, Phillips M, Beveridge M, O´Keefe M.2011***. Blue frontiers: managing the environmental costs of aquaculture. Penang: The Word Fish Center

51. ***Hasan M & Halwart M (eds).2009.*** Fish as feed inputs for aquaculture; practices sustainability and implications. FAO. Fisheries and Aquaculture Technical Paper. N° 518.Rome: FAO

52. ***Hofmann K, Stoffel W. 1993***.A database of membrane spanning protein segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374:166

53. ***Huamancha L. 2019.*** 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 de Maestro en Sanidad Acuícola. Lima: Univ. Per. Cayetano Heredia.52p.

54. ***Hurtado N. 2012***. Curso cultivo de la tilapia .Semana de la pesquería .CIP. [Internet], [17 febrero 2020].Disponible en: http://www.es.slideshare.net/nhurtado2000/curso-cultivo-de-tilapia?next_slideshow=1.

55. ***Jansen M, Dong H, Mohan Ch.2018***. Tilapia lake virus: a threat to the global tilapia industry?. Reviews in Aquaculture. 15pp. .**https://doi.org/10.1111/raq.12254**

56. ***Kabuusu R, Cheetham S, Eldar A, Bacharach E, Lipkin WI, Ferguson HW. 2016***. Syncytial Hepatitis of Tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) is Associated with Orthomyxovirus-Like Virions in Hepatocytes. J Fish Dis 00: 1–6

57. ***Kelley L, Mezulis S, Yates C , Wass M , Sternberg M .2015***. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature protocols, 10(6), 845. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053

58. ***Kimura M. 1980.*** A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 16:111-120. doi:10.1007/bf01731581

59. ***Koren C y Nylund A. 1997.*** Morphology and morphogenesis of infectious salmon anaemia virus replicating in the endothelium of Atlantic salmon Salmo salar. Diseases of aquatic organisms, 29(2), 99-109. https://doi.org/10.3354/dao029099

60. ***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.

61. ***Kumar S,Stecher G,Tamura K.2016.*** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0.for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 33(7): 1870–1874

62. ***Lewis TD y Leong JA. 2004.*** Viruses of fish. In *Current trends in the study of bacterial and viral fish and shrimp diseases* (ed. Yin LK).39-81p .World Scientific Publishing Co., Singapore.

63. ***Lim C y Webster CD.2006***. Tilapia: Biology, culture and nutrition. An imprint of the Haworth Press.New York.678 p.

64. ***Liamnimitr, P., Thammatorn, W., U-thoomporm, S.,Tattiyapong, P & Surachetpong, W.2018.*** Non-lethal sampling for Tilapia Lake Virus detection by RT-qPCR and cell culture. Aquaculture Vol 486, 75-80

65. ***Lio Po GD. 2001.*** Viral diseases. In G.D.Lio-Po, CR Lavilla y ER Cruz –Lacierda (eds),Health Management in aquaculture 9-24 pp. Tigbauan, Iloilo, Philippines: SEAFDEC Aquaculture

66. ***Lio-Po GD y Penaranda MD.2004***. Viral infections among cultured fish in Philippines: 2000-2003.Government of Japan –trust Fund, Regional Fish Disease Project. Abstract. *Dicentrarchus labrax* (L.).J Fish Dis. 20: 145-151.

67. ***Mateen A.2007.*** Effect of androgen on the sex reversal,growth and meat quality of Tilapia, *Oreochromis niloticus*. Thesis submitted to Universitary of Agric.Faisalabad,Pakistán.

68. ***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

69. ***Mikalsen A.B., Sindre H, Torgersen J. Rimstad E. 2005***. Protective effects of a DNA vaccine expressing the infectious salmon anemia virus hemagglutinin-esterase in Atlantic salmon. Vaccine, 23(41), 4895-4905. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.025

70. ***[MINCETUR]Ministerio de Comercio Exterior y Turismo.2003.*** Perfil del Mercado y competitividad exportadora de la tilapia.[Internet],[13 febrero 2020].Disponible en : http:// www.mincetur.gob.pe/comercio/otros /penx/pdfs/Tilapia.pdf

71. ***[MINCETUR]Ministerio de Comercio Exterior y Turismo .2011.*** Lima: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo .Plan Estratégico Nacional Exportador 2003-2017.

[Internet],[13 febrero 2020].Disponible en: http:// www.mincetur.gob.pe/comercio/otros /penx/pdfs/Tilapia.pdf

72. ***Munang´andu H, Mutoloki S, Evensen O.2016.***Prevention and control of viral diseases in aquaculture. In FSB Kibenge & MG Godoy (Eds), Aquaculture virology(p.17). London, UK:Academic Press,Elsevier

73. ***Mugimba K, Chengula A, Wamala S , Mwega E, Kasanga J, Byarugaba K, Mdegela R, Tal S, Bornstein B, Dishon, Mutoloki S , David L, Evensen Ø, Munang'andu H.2018.*** Detection of tilapia lake virus (TiLV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria. J Fish Dis. 00:1–9.

74. ***Ng WK,Romano N.2013***. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle.Rev.Aquacult.5, 220-254.

75. ***Nicholson P, Fathi MA, Fischer A, Mohan C, Schieck E, Mishra N, Heinimann A, Frey J, Wieland B, Jores J.2017.*** Detection of Tilapia Lake Virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015. J Fish Dis. 00: 1–4.

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

77. ***[OIE]*** *World Organisation for Animal Health. 2017b.* Tilapia Lake Virus Disease, Chinese Taipei. Immediate Notification. [Internet], [02 march 2020]. Available from :

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=24033

78. ***[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017c***. Hepatitis sincitial de la tilapia, Israel. Immediate Notification. [Internet], [20 April 2018.] Available from: www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=23836

79. ***[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017d.*** Tilapia Lake Virus Disease, Thailand. Immediate Notification. [Internet], [02 march 2020]. Available from:

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=23832

80. ***[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017e***. Tilapia Lake Virus Disease, Malaysia. Immediate Notification. [Internet], [02 march 2020]. Available from:

https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=24809

81. ***[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017f.*** Tilapia Lake Virus (TiLV), Philippines. Immediate Notification. [Internet], [02 march 2020]. Available from:

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=25278

82. ***[OIE] World Organisation for Animal Health. 2018b.*** Tilapia Lake Virus, Peru. Immediate Notification.[Internet], [02 march 2020]. Available from: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=26027

83. ***[OIE] World Organisation for Animal Health. 2017c.*** Hepatitis sincitial de la tilapia, Israel. Immediate Notification. [Internet], [02 march 2020]. Available from: www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=23836

84. ***Parker R. 2012.*** Aquaculture Sciencie 3°ed.Nueva York: Delmar CENGAGE Learning.652 p

85. ***Pasnik D, Evans J, Klesius P. 2010.*** Stress in fish. En: Roberts H, ed. Fundamentals of ornamental fish.1° ed.Iowa:Wiley- Blackwell Publishing p33-34.

86. ***Pillay, T.V.R., 1990***. Aquaculture: principles and techniques. Fishing New Books. Blackwell Scientific Publications Ltd. 575 p.

87. ***Plarre H, Nylund A, Karlsen M, Brevik , Sæther P, Vike S. 2012.*** Evolution of infectious salmon anaemia virus (ISA virus). Archives of Virology, 157(12), 2309–2326.

88. ***Popma T. y Lovshin L. 1996.*** Wordwide Prospects for Commercial Production of Tilapia. Research and Development Series, N°41, Department of Fisheries and Allied Aquaculture, Auburn University,Auburn, Alabama.23p

89. ***Plumb JA.1999.*** Overview of warmwater fish diseases.Journal of Applied Aquaculture 9,1-10

90. ***PRODUCE.2017.*** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. [Internet],[14 febrero 2020].Disponible en: http://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/shortcode/oee-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/825-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2017

91. ***PRODUCE.2019.*** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2019. [Internet],[08 julio 2021].Disponible en: https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oee-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/949-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2019

92. ***RABOBANK 2015.***The rise of Aquatic Chicken. International Aquafeed Magazine. Vol 18. Issue I. Enero-Febrero.Pág.25-27. [Internet], [24 febrero 2020]. Disponible en: http://issuu.com/international_aquafeed/docs/iaf1501_w1/24

93. ***Rammarine IW. 2005.*** The Farming of Tilapia.Disponible en: Uwi.tt/uwitoday/2005/march/Tilapia.asp

94. ***Ramos R, Gálvez M.2000.*** Impacto ambiental de la introducción de tilapias en la cuenca del río Piura. Rev. Universitalia. UNP. 5(1):80-97.

95. ***Ridha M.2006.*** Tilapia culture in Kuwait: constraints and solutions .Naga , WordlFish Center Quarterly,29(3-$),71-73

96. ***Ross LG.2000***. Environmental physiology and energetics: In Beveridge MCM and MC Andrew BJ (eds).Tilapias: Biology and Exploitation .Kluwer Academisc Publishers,Dordrecht/Boston.89-128 p.

97. ***Saito N, Nei M .1987***. The neighbor-joining method:A new method for reconstructing phylogenetic tree.Molecular Biology and Evolution.4(4):406-425

98. ***SANIPES. 2018a.*** Presencia de Virus de la Tilapia Lacustre (TiLV) en el Perú. Comunicado N° 018 -2018–SANIPES.

99. ***SANIPES. 2018b.*** SANIPES informa los resultados del diagnóstico de TiLV en los centros de producción de alevines de tilapia en la región San Martín. Comunicado N° 061 - 2018 – SANIPES. [Internet], [17 julio 2018] Disponible en: https://www.sanipes.gob.pe/documentos/_COMUNICADO-N-018-2018-SANIPES.pdf

100. ***Smith S, Watanabe W, Chan J, Ernst D, Wicklund R, Olla B. 1991.*** Hatchery production of Tilapia roja de Florida seed in brackishwater Tanques: the influence of broodstock age. Aquaculture and Fisheries Management 22:141-147.

101. ***Schmittou HR, Cremer MC, Zhang J.2004.*** Principles and practices of high density fish culture in low volumen cages. VI. Fish Stress, Health and Disease.1-11.

102. ***SEAFISH. 2011.*** Responsible sourcing Guide: Tilapia.6p.

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

104. ***Shelton y Popma.2006.*** Biology: Tilapia biology, culture and nutrition. New York, NY, USA: Food Production Press.

105. ***Shlapoberky M, Synyakov M, Katzenellenboggen M, Ronit S, Jeremy D, Avtalion R.2010.***Viral encephalitis of tilapia larvae : Primary characterization of a novel herpes – like virus

106. ***Skornik R, Eyngor M , Behar A, Markovich MP, Wajsbrot N, Klement E , Davidovich N. (2020).*** Tilapia lake virus disease: Phylogenetic analysis reveals that two distinct clades are circulating in Israel simultaneously. Transboundary and Emerging Diseases, 67(2), 494–501. https://doi.org/10.1111/tbed.13407

107. ***Skliris GP y Richards RH.1999***. Nodavirus isolated from experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters).JFish Dis. 22(4): 315-318.

108. ***Soto-Zarazúa M, Rico-García E, Toledano –Ayala M.2001.***Temperature effect on fish culture tank facilities inside greenhouse .nInt J Phys Sci. 6(5): 1039-1044

109. ***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 (6): 1031–1033.

110. ***Surachetpong W, Roy SRK, Nicholson P.2020.*** Tilapia lake virus: The story so far. *J Fish Dis*.2020;00 :1–18. https://doi.org/10.1111/jfd.13237

1. ***Tal S, Bornestein B, Ben-Moshe E, Nevo Y, Bronstein M, Bar N, Dishon A.2016***.*Isolation* and primary characterization of a virus causing mortality in tilapia. Unpublished NCBI KU552132.1 (Research and Development, KoVax Ltd., 19 Hartom ST., Jerusalem 45212, Israel).

2. ***Tattiyapong P, Dachavichitlead W, Surachetpong W. 2017.*** Experimental infection of Tilapia lake virus (TiLV) in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.).* Veterinary Microbiology 207: 170–177.

3. ***Tattiyapong P, Sirikanchana K, Surachetpong W. 2017.*** Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. J Fish Dis 00: 1–7.

4. ***Thompson J, Higgins D, Gibson T. 1994.*** CLUSTAL W: improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680. doi:10.1007/978-1-4020- 6754-9_3188

5. ***Tsofack JE, Zamostiano R, Watted S, Berkowitz A, Rosenbluth E, Mishra N, Bacharach E. 2017.*** Detection of Tilapia lake virus in clinical samples by culturing and nested reverse transcription PCR. Journal of Clinical Microbiology 55(3): 759–767.

6. ***Trewavas E.1982.*** Tilapias: taxonomy and speciation.In :Pullin RVS and Lowe –McConnell RH.(eds). The biology and culture of tilapias. ICLARM Conference Proceedings N7, ICLARM, Manila, Philippines, pp.3-13.

7. ***Trewavas E. 1983.*** Tilapiine especies of the genera *Saratherodon ,Oreochromis* and *Danakilia.* London: British Museum (Natural History) Publications N.878

8. ***Wagner R., Feldmann A, Wol T, Pleschka S, Garten W, Klenk H.2002***. The Role of Hemagglutinin and Neuraminidase in Influenza Virus Pathogenicity. In Structure-Function Relationships of Human Pathogenic Viruses; Holzenburg, A., Bogner, E. ed. Boston, MA, USA: Springer. p 331–345

9. ***Wang M, Lu M.2016.*** Tilapia polyculture: a global review.Aquacultures.47, 2363-2374

10. ***Yamkasem J, Tattiyapong P, Kamlangdee A, Surachetpong W.2019***. Evidence of potential vertical transmission of tilapia lake virus. *J Fish Dis* 00:1–8. https ://doi.org/10.1111/jfd.1305