

Detección del virus de la tilapia del lago (TiLV) mediante semi-nested RT-PCR en tilapias cultivadas provenientes de dos regiones del Perú

Detection of tilapia lake virus (TiLV) by seminested RT-PCR in farmed tilapias from two regions of Peru

Arnaldo E. Castañeda^{1,3,4}, Manuel A. Feria^{1,3}, Odalis E. Toledo^{1,3},
Deysy Castillo², Mario D. Cueva², E. Motte¹

RESUMEN

El cultivo de la tilapia (*Oreochromis* sp) se encuentra afectada por brotes con alta mortalidad del virus de la tilapia del lago (TiLV) en las principales regiones de crianza en el Perú. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la presencia del TiLV en dos centros piscícolas de tilapia en Piura y San Martín, que presentaron mortalidades superiores al 60%. Se tomaron muestras (hígado y cerebro) de 70 peces de diferentes fases de cultivo que mostraron letargia, pérdida del apetito, lesiones oculares y erosiones de la piel. La detección y confirmación del TiLV se determinó mediante semi-nested RT-PCR y posterior secuenciación del producto amplificado del segmento 3 del virus. Se encontraron productos del peso esperado (250 pb) correspondientes a muestras de los dos centros de producción. El análisis filogenético demostró una alta homología entre los aislados y una identidad mayor al 90% con la cepa de referencia israelí (KU751816.1).

Palabras clave: virus de la tilapia del lago, TiLV, PCR, tilapia

ABSTRACT

The production of tilapia (*Oreochromis* sp) is being affected by outbreaks of lake tilapia virus (TiLV) with high mortality in the main breeding regions in Peru. The aim of this study was to determine the presence of TiLV in two tilapia fish farms in Piura and San Martín, which presented mortalities greater than 60%. Samples (liver and brain) were

¹ Incabiotec, Tumbes, Perú

² Cooperativa de Trabajadores Biotecoop, Tumbes, Perú

³ Universidad Nacional de Tumbes, Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar, Tumbes, Perú

⁴ E-mail: arnaldoc_ve@hotmail.com

Recibido: 13 de mayo de 2019

Aceptado para publicación: 25 de marzo de 2020

Publicado: 22 de junio de 2020

taken from 70 fish from different stages of culture that showed lethargy, loss of appetite, eye lesions and skin erosions. The detection and confirmation of TiLV was determined by semi-nested RT-PCR and subsequent sequencing of the amplified product of segment 3 of the virus. Products of the expected weight (250 bp) corresponding to samples from the two production centres were found. The phylogenetic analysis showed a high homology among the isolates and an identity greater than 90% with the Israeli reference strain (KU751816.1).

Key words: tilapia lake virus, TiLV, PCR, tilapia

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de tilapia (*Oreochromis* sp) alcanzó 6.4 millones de toneladas métricas (t), siendo China, Egipto, Filipinas, Tailandia e Indonesia los principales productores (FAO, 2017). En el Perú, el cultivo de tilapia ha llegado a ser la segunda especie piscícola de mayor producción por detrás de la trucha *Oncorhynchus mykiss*, alcanzando las 2950 t en 2016, pudiendo llegar según estimaciones a 3579 t en 2022 (PRODUCE, 2017). La producción de tilapia se concentra principalmente en las regiones de Piura y San Martín, representando aproximadamente el 95% del total de producción (PRODUCE, 2016).

A pesar del continuo crecimiento productivo de la tilapia, el estrés producto de la crianza intensiva ha conducido a un incremento de brotes de infecciones en las granjas piscícolas, tanto de origen bacteriano (*Aeromonas* sp, *Streptococcus* sp) (Huicab-Pech *et al.*, 2016; Asencios *et al.*, 2016) como de virosis (virus de la tilapia del lago [TiLV]) (Eyingor *et al.*, 2014). El TiLV es un patógeno emergente que pertenece al género Tilapinevirus (Adams *et al.*, 2017), y es considerado el causante de la hepatitis sincitial de la tilapia (SHT) (Ferguson *et al.*, 2014; Del Pozo *et al.*, 2017) y del síndrome de mortalidad de verano (SMS) o síndrome de mortalidad de un mes de la tilapia (TOMMS) (Fathi *et al.*, 2017; Tattiyapong *et al.*, 2017). Este virus ha sido identificado en tilapias de

Sudamérica (Bacharach *et al.*, 2016; Kembou Tsofack *et al.*, 2017; OIE, 2018), Asia (Amal *et al.*, 2018; Behera *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2017a; OIE, 2018) y África (Fathi *et al.*, 2017; Mugimba *et al.*, 2018), mayormente en los meses con temperaturas mayores de 22 °C.

El TiLV es un virus de ARN de simple cadena, de sentido negativo, y tiene un genoma de 10 323 kb organizado en 10 segmentos que codifican 10 proteínas (Bacharach *et al.*, 2016). Este patógeno tiene la cualidad de infectar varias especies de cíclidos, principalmente la tilapia, y de replicar y transcribir su genoma en múltiples órganos como el hígado, riñón, bazo, cerebro, branquias y tejido muscular (Eyingor *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017a).

Los signos clínicos incluyen letargia, distensión abdominal, lesiones oculares, y erosiones de la piel, aunque también se le puede encontrar en peces sin signos clínicos aparentes (Senapin *et al.*, 2018). Además de la transmisión horizontal, su presencia en huevos embrionados y alevinos sugieren una transmisión vertical (Dong *et al.*, 2017b). Varios métodos moleculares han sido propuestos para su detección, principalmente la PCR y sus variantes con el objetivo de amplificar el segmento 3 del genoma viral (Eyingor *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017a; Tattiyapong *et al.*, 2017; Waiyamitra *et al.*, 2018), seguido de la secuenciación de los productos de PCR para su confirmación.

En el Perú, el primer brote de TiLV fue detectado en Piura a fines de 2017 produciendo mortalidades masivas, tanto en medios naturales como en centros comerciales, habiéndose propagado a otras regiones del Perú. En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo detectar la presencia del TiLV asociado a eventos de mortalidades masivas en centros piscícolas de tilapia localizados en dos regiones del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Estudio

El estudio fue realizado entre diciembre de 2017 y abril de 2018. La colección de especímenes de tilapia (*Oreochromis niloticus*) se realizó en dos centros de cultivo ubicados en Sullana (Piura) y Tarapoto (San Martín). Las muestras se procesaron en el laboratorio de biotecnología molecular Incabiotec, Tumbes, Perú.

Muestras

Se colectaron 70 especímenes con sintomatología clínica sugerente de enfermedad (presencia de lesiones) de diferentes fases de cultivo, entre ambos centros de producción. Se procedió a la eutanasia previa anestesia con eugenol. La necropsia se realizó siguiendo la metodología propuesta por Fisher y Myer (2000), realizándose la toma de muestras de tejido hepático y cerebral (<0.5 cm de diámetro) por cada individuo. Los órganos se agruparon en pools de tres a cinco individuos y se colocaron en tubos con solución preservante de ARN.

Extracción de ARN Total y Síntesis de ADNc

El ARN total fue extraído a partir de los tejidos diana después de una purificación utilizando el método de extracción con ácido de

tiocianato de fenol–cloroformo de guanidina con el reactivo TRizol® (Thermo Fisher Scientific), seguido de un tratamiento con DNaseI (Thermo Fisher Scientific). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando el ReverdAid™ Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). En ambos casos, se siguieron los instructivos del fabricante. La transcripción reversa se realizó utilizando el iniciador específico Nested ext-2 (Eyngor *et al.*, 2014).

Semi-nested PCR y Secuenciación

La técnica de PCR fue adaptada de Dong *et al.* (2017a), que amplifica un fragmento inicial de 415 pb (ext.1 anidado – TATGACAGTACTTCCCTGCC y ME – GTTGGGCACAAGGCATCCTA) y un fragmento final de 250 pb (ME2 – TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT y ME1 – GTTGGGCACAAGGCATCCTA) (Cuadro 1), correspondientes al segmento 3 del genoma viral. Se utilizó un plásmido pGEM-415 pb como control positivo. Se hicieron 30 ciclos bajo las condiciones siguientes: 95 °C durante 5 min, 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s y finalmente 72 °C durante 5 min. Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador ultravioleta. Los productos amplificados se secuenciaron mediante el método de Sanger en Macrogen (USA).

Análisis Filogenético

El análisis fue inferido tomando como referencia el segmento 3 de la cepa viral israelí (KU751816.1)- Así mismo, como control externo se utilizó una secuencia de *Orthopneumovirus*. Para el análisis se utilizó el método de máxima verosimilitud y un valor de Bootstrap de 2000 para estimar la confianza en el software MEGA 7.

Cuadro 1. Cebadores utilizados en el estudio para la detección del virus de la tilapia del lago (TiLV)

Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Amplicón (pb)	Referencia
Nested ext-1	TATGCAGTACTTTCCCTGCC	415	Eyngor <i>et al.</i> (2014)
ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA	250	
7450/150R/ ME2	TATCACGTGCGTACTCGTTCAGT		
ME1	GTTGGGCACAAGGCATCCTA		

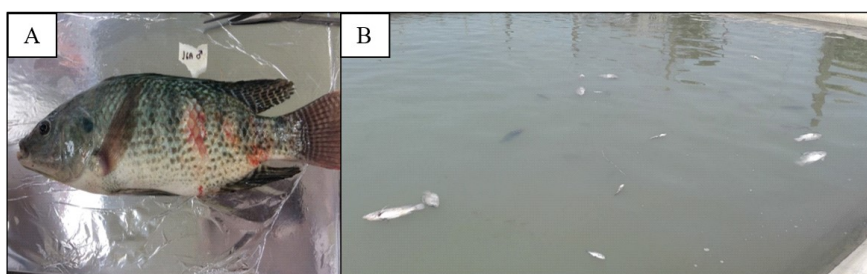


Figura 1. Brote del virus de la tilapia del lago (TiLV) en Piura y San Martín, Perú. (A) Erosiones en la piel a nivel lateral de individuo de *O. niloticus*. (B) Mortalidades masivas en un centro de cultivo comercial

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los brotes producidos por el virus de la tilapia del lago (TiLV) produjeron tasas de mortalidades superiores al 60% durante el verano en los centros de cultivo de Piura y San Martín, abarcando todas las fases de producción. Solamente se afectaron tilapias del Nilo (*O. niloticus*) más no a otras especies acompañantes como pacos (*Piaractus brachypomus*) y gamitanas (*Colossoma macropomun*).

Los peces afectados exhibieron pérdida del apetito, letargia, erosiones de la piel y muerte (Figura 1). La necropsia mostró

hepatomegalia, esplenomegalia y congestión en hígado y cerebro, signos clínicos similares a los descritos en la literatura científica (Ferguson *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2017a, Nicholson *et al.*, 2017) donde ocurrieron mortalidades entre 20 y 90%. El amplio rango en las tasas de mortalidades se debe a factores tales como el sistema de producción, variedades genéticas del TiLV, co-infecciones, y condiciones ambientales como la temperatura. Así, la elevada mortandad observada en el presente estudio pudo deberse principalmente al tipo de sistema de producción (intensivo y semi-intensivo) reflejado en el hacinamiento de los animales y subsecuente estrés, además de las condiciones óptimas de temperatura presentes (estación de verano).

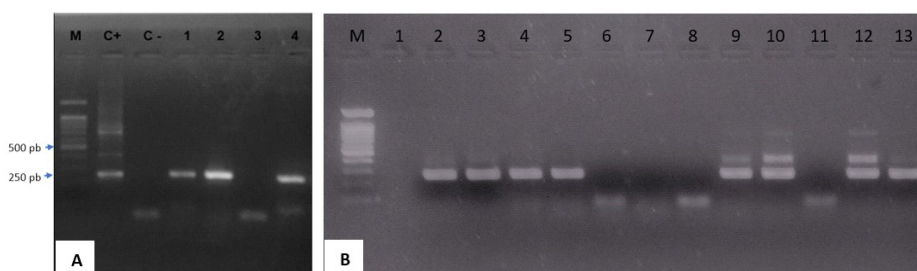


Figura 2. Productos amplificados para la identificación del virus de la tilapia del lago (TiLV) por semi-nested RT-PCR. (A) M: marcador molecular (100 pb); C+: control positivo (pGEM-415 pb); C-: control negativo; 1, 2, 3, 4: muestras de tejido hepático y cerebral de tilapias de Piura. (B) M: marcador molecular (100 pb); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12: muestras de tejido hepático y cerebral de tilapias de San Martín

Los resultados de PCR mostraron bandas definidas con un peso de 250 pb (Figura 2). La metodología utilizada para su identificación fue adaptada de Dong *et al.* (2017a), quienes describen un ensayo alternativo basado en semi-nested RT-PCR que produce un producto de 415 pb en la primera corrida y otro de 250 pb para la segunda, maximizando la sensibilidad de detección comparado a una PCR convencional, reduciendo así los falsos negativos. Recientemente, Tattiyapong *et al.* (2018) y Waiyamitra *et al.* (2018) desarrollaron nuevos métodos de PCR cuantitativo con transcripción reversa (RT-qPCR) basado en SYBR Green y TaqMan, respectivamente, dirigidos al segmento 3 y con una sensibilidad de 2 copias/μl. Sin embargo, nuevos métodos de detección molecular deberían ser desarrollados, por ejemplo aquellos sistemas basados en amplificación isotérmica como LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucles) permitiendo el diagnóstico *in situ*, reduciendo costos y tiempo.

Los resultados de secuenciación y análisis por NCBI-BLAST revelaron que las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron homólogas con aquellas pertenecientes al segmento 3 de la cepa de referencia israelí (KU751816.1). Además, al comparar las se-

cuencias de nucleótidos entre los aislados de Piura y San Martín se observó una alta identidad evidenciado en su agrupamiento en un mismo clado (Figura 3), sugiriendo que las mortandades en ambas regiones fueron producidas por la misma cepa; sin embargo, se requiere secuenciar el genoma viral completo de los aislados con el fin de demostrar una homología genética completa.

La presencia del TiLV en el Perú y su rápida diseminación entre las dos regiones en estudio pudo deberse a su proximidad, así como a la cercanía al Ecuador y Colombia, donde han sido reportados brotes de TiLV, además del ingreso de alevinos y reproductores a los centros de producción. A pesar de que la ruta de transmisión es principalmente horizontal, Dong *et al.* (2017b) detectaron el virus en huevos embrionados y alevinos en incubadoras de Tailandia sugiriendo su transmisión vertical. La tilapia no es la única especie que puede verse afectada por el TiLV, pues se le ha aislado de *Barbonimus schwanefeldii* (Abdullah *et al.*, 2018) y *Osheronemus goramy* (Jaemwimol *et al.*, 2018), lo cual indica la posibilidad de haber otras especies que actúen como reservorios en sistemas de cultivos mixtos, como es el caso de la amazonia peruana.

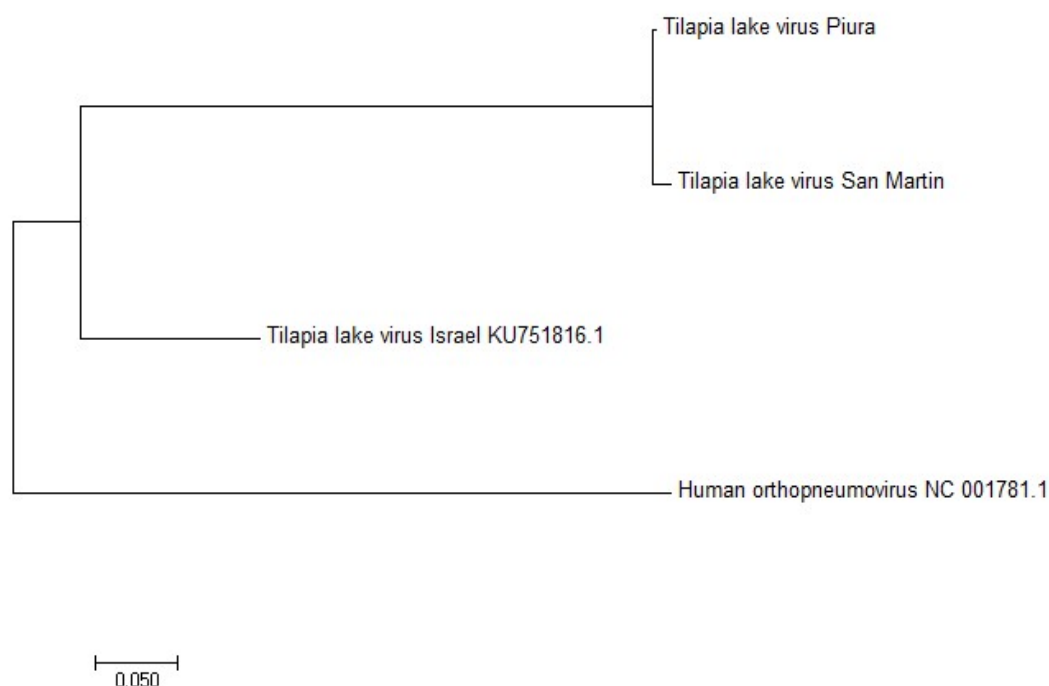


Figura 3. Árbol filogenético que grafica la relación entre las secuencias de nucleótidos de aislados del del virus de la tilapia del lago (TiLV)

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dr. Saengchan Senapin (BIOTEC, Tailandia) por brindar generosamente el control positivo (pGEM – 415 bp).

LITERATURA CITADA

1. **Abdullah A, Ramly R, Ridzwan MSM, Sudirwan F, Abas A, Ahmad K, Murni M, et al. 2018.** First detection of tilapia lake virus (TiLV) in wild river carp (*Barbonymus schwanenfeldii*) at Timah Tasoh Lake, Malaysia. *J Fish Dis* 41: 1459-1462. doi: 10.1111/jfd.12843
2. **Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Nibert M. 2017.** Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 162: 2505-2538. doi: 10.1007/s00705-018-3847-1
3. **Amal MNA, Koh CB, Nurliyana M, Suhaiba M, Nor-Amalina Z, Santha S, 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* x *O. mossambicus*) farm experiencing high mortality. *Aquaculture* 485: 12-16. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.11.019
4. **Asencios YO, Sánchez FB, Mendi-zábal HB, Pusari KH, Alfonso HO, Sayán AM, Figueiredo MAP, et al. 2016.** First report of *Streptococcus agalactiae* isolated from *Oreochromis niloticus* in Piura, Peru: molecular identification and histopathological lesions. *Aquac Rep* 4: 74-79. doi: 10.1016/j.aqrep.2016.06.002

5. **Bacharach E, Mishra N, Briese T, Zody MC, Kembou Tsofack JE, Zamostiano R, Berkowitz A, et al. 2016.** Characterization of a novel orthomyxo-like virus causing mass die-offs of tilapia. *MBio* 7: e00431-16. doi: 10.1128/mBio.00431-16
6. **Behera BK, Pradhan PK, Swaminathan TR, Sood N, Paria P, Das A, Jena JK. 2018.** Emergence of tilapia lake virus associated with mortalities of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India. *Aquaculture* 484: 168-174. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.11.025
7. **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. *Vet Pathol* 54: 164-170. doi: 10.1177/0300985816658100
8. **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* 76: 111-118. doi: 10.1016/j.aquaculture.-2017.04.019
9. **Dong HT, Ataguba GA, Khunrae P, Rattanarojpong T, Senapin S. 2017b.** Evidence of TiLV infection in tilapia hatcheries from 2012 to 2017 reveals probable global spread of the disease. *Aquaculture* 479: 579-583. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.06.035
10. **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. *J Clin Microbiol* 52: 4137-4146. doi: 10.1128/JCM.00827-14
11. **[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017.** The state of food and agriculture. Rome, Italy. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7658e.pdf>
12. **Fathi M, Dickson C, Dickson C, 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. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.03.014
13. **Ferguson HW, Kabuusu R, Beltran S, Reyes E, Lince JA, del-Pozo J. 2014.** Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L): a case report. *J Fish Dis* 37: 583-589. doi: 10.1111/jfd.12142
14. **Fisher JP, Myers MS. 2000.** Fish necropsy. In: *Handbook of experimental animals – The fish*. Academic Press. p 543-556.
15. **Huicab-Pech ZG, Landeros-Sánchez C, Castañeda-Chávez MR, Lango-Reynoso F, López-Collado CJ, Rosado P. 2016.** Current state of bacteria pathogenicity and their relationship with host and environment in tilapia *Oreochromis niloticus*. *J. Aquac Res Dev* 7: 1-10
16. **Jaemwimol P, Rawiwan P, Tattiya-pong P, Saengnual P, Kamlangdee A, Surachetpong W. 2018.** Susceptibility of important warm water fish species to tilapia lake virus (TiLV) infection. *Aquaculture* 497: 462-468. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.08.028
17. **Kembou-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. *J Clin Microbiol* 55: 759-767. doi: 10.1128/JCM.01808-16
18. **Mugimba KK, Chengula AA, Wamala S, Mwega ED, Kasanga CJ, Byarugaba DK, Mutoloki SS, et al. 2018.** Detection of tilapia lake virus (TiLV) infection by PCR in farmed and wild Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from Lake Victoria. *J Fish Dis* 2018: 1-9. doi: 10.1111/jfd.12790

19. **Nicholson P, Fathi MA, Fischer A, Mohan C, Schieck E, Mishra N, Heinemann A, et al. 2017.** Detection of tilapia lake virus in Egyptian fish farms experiencing high mortalities in 2015. *J Fish Dis* 40: 1925-1928. doi: 10.1111/jfd.12650
20. [OIE] World Organisation for Animal Health. 2018. World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface. [Internet] Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home
21. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2017.** Situación actual de la acuicultura en el Perú. [Internet]. Disponible en: <http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/boletines/SITUACION-C3%93-N%20ACTUAL%20DE-%20LA-%20ACUICULTURA%20-EN%20EL%20PERU-C3%9A.pdf>
22. **[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016.** Anuario estadístico pesquero y acuícola 2016. Lima, Perú. [Internet]. Disponible en: <http://ogeiee.produ-ce.gob.pe/index.php/short-code/oe-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/775-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2016>
23. **Senapin S, Shyam KU, Meemetta W, Rattanarojpong T, Dong HT. 2018.** Inapparent infection cases of tilapia lake virus (TiLV) in farmed tilapia. *Aquaculture* 487: 51-55. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.01.007
24. **Tattiyapong P, Dachavichitlead W, Surachetpong W. 2017.** Experimental infection of tilapia lake virus (TiLV) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis* spp.). *Vet Microbiol* 207: 170-177. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.06.014
25. **Tattiyapong P, Sirikanchana K, Surachetpong W. 2018.** 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* 41: 255-261. doi: 10.1111/jfd.12708
26. **Waiyamitra P, Tattiyapong P, Sirikanchana K, Mongkolsuk S, Nicholson P, Surachetpong W. 2018.** A TaqMan RT-qPCR assay for tilapia lake virus (TiLV) detection in tilapia. *Aquaculture* 497: 184-188. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.07.060