

CAPÍTULO 2.1.1.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la quitridiomycosis es una enfermedad que deriva de la infección por el hongo formador de zoosporas *Batrachochytrium dendrobatidis* (Hongos, Chytridiomycota, Rhizophydiales). Las recomendaciones de este capítulo son aplicables a todas las especies de Anura (ranas y sapos), Caudata (salamandras, tritones y sirénidos) y de Gymnophiona (cecilias).

Todos los protocolos y reactivos descritos en este capítulo están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

Todo el muestreo, la histología, la histoquímica y las técnicas TaqMan están validados (Hyatt *et al.*, 2007).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Batrachochytrium dendrobatidis (Bd) fue descrito por primera vez en 1998 y 1999 (Berger *et al.*, 1998; Longcore *et al.*, 1999) y ahora es la causa aceptada de la enfermedad potencialmente mortal denominada quitridiomycosis (consúltese el plan de reducción de la amenaza en Australia contra la quitridiomycosis, que puede hallarse en <http://www.environment.gov.au/biodiversity/threatened/publications/tap/pubs/chytrid-background.pdf>). La enfermedad ha conllevado mortalidades masivas, disminuciones de población y extinciones (de hasta ocho especies en Australia) de poblaciones y especies de anfibios de todo el mundo (Fisher *et al.*, 2009). Bd ahora está reconocido por su capacidad de propagarse rápidamente por poblaciones de anfibios (Lips *et al.*, 2006; Skerratt *et al.*, 2007), causar altas mortalidades (Lips *et al.*, 2006; Scholegel *et al.*, 2006) y persistir a densidades de hospedador bajas (Scholegel *et al.*, 2006; Woodhams y Alford, 2005). Bd ya ha sido identificado en todos los continentes (36 países) en que existen poblaciones de anfibios salvajes. Bd infecta a más de 350 especies de anfibios y ha intervenido en el declive de más de 200 de estas especies (Skerratt *et al.*, 2007).

La patogenia de esta enfermedad cutánea ha sido difícil de determinar, puesto que no se ha detectado ninguna alteración anatomopatológica constante en ningún órgano interno. Para explicar la causa de la muerte se han publicado dos hipótesis, mutuamente no excluyentes. La primera es que Bd libera enzimas proteolíticas u otros compuestos activos que son absorbidos por la piel permeable de la rana. La segunda sugiere que unos daños en la función cutánea dan lugar a perturbaciones del equilibrio hídrico y electrolítico (osmorregulación) o bien solo del equilibrio electrolítico, que comportan la muerte del animal (Berger *et al.*, 1998). Un informe reciente (Voyles *et al.*, 2009) presenta datos que respaldan la segunda hipótesis.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Se ha establecido la hipótesis, aunque no se ha confirmado, de que Bd existe fuera de su hospedador. Se ha recuperado ADN de Bd de rocas (Lips *et al.*, 2006), y puede cultivarse Bd en condiciones de laboratorio en plumas de aves y en suelo húmedo (Johnson y Speare, 2003; 2005; Lips *et al.*, 2006). Se detectó Bd en mesocosmos de laboratorio de los cuales se habían eliminado *Rana sphenoccephala* infectados por Bd.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Bd es susceptible a una gran variedad de tratamientos químicos y físicos (Phillott *et al.*, 2010). Las soluciones eficaces son las de compuestos del amonio cuaternario, cloruro de didecildimetilamonio (por ejemplo, Path X, en solución de 1/500 durante 30 segundos) o cloruro de benzalconio (por ejemplo, F10 solución de 1/500 durante 1 minuto). El hipoclorito de sodio es eficaz a concentraciones del 1% y superiores. También es eficaz la exposición a etanol al 70% y a 1 mg/ml de Virkon durante 20 segundos. Estas sustancias químicas pueden utilizarse para la desinfección en el laboratorio, para la cría de anfibios

y en el trabajo de campo. Así, por ejemplo, pueden utilizarse gasas empapadas en alcohol para desinfectar tijeras, calibradores y demás instrumental entre un animal y el siguiente. Los cultivos de Bd no sobreviven a la desecación completa, pero en la práctica la persistencia de agua en forma de gotitas permite la supervivencia de agentes patógenos durante incluso 3 horas tras el “secado” (Johnson *et al.*, 2003). El calentamiento por encima de los 37°C durante 4 horas da lugar a la muerte de esporangios. La luz ultravioleta utilizada sistemáticamente para matar bacterias, hongos y virus resulta ineficaz.

Bd puede crecer, pero no prosperar, en muchas fuentes distintas de nitrógeno (Piotrowski *et al.*, 2004) y en agua estéril de lago (Johnson y Speare, 2003; 2005; Piotrowski *et al.*, 2004). Otros hallazgos puntuales sugieren que puede sobrevivir y crecer como saprobio en ausencia de ranas. Las zoosporas permanecen móviles durante más de 24 horas, y alrededor de un 50% y de un 5% siguen móviles pasadas 18 horas y 24 horas, respectivamente (Piotrowski *et al.*, 2004).

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de Bd tiene dos fases principales: la zoospora móvil, de vida corta y vehiculada por el agua para la dispersión, y el tallo estacionario monocéntrico que se desarrolla convirtiéndose en un zoosporangio para la amplificación asexual. Bd está adaptado a vivir en la epidermis estratificada de la piel. Los tallos viven dentro de células epidérmicas, parasitando inicialmente células que se encuentran a pocas capas de profundidad, y tienen una rapidez de desarrollo que coincide con la madurez de la célula a medida que se desplaza hacia el exterior y se queratiniza. Bd crece inicialmente en células vivas, pero los tallos completan su paso a zoosporangios en células queratinizadas superficiales muertas que carecen de orgánulos. Los tubos de descarga tienen la capacidad de confluir con la membrana celular epidérmica y disolverse y abrirse a la superficie de la célula, normalmente la superficie distal del cuerpo. La distribución de esporangios en adultos y renacuajos muestra que los Bd necesitan una dermis estratificada y queratinizada cuando aparecen en forma de parásitos (Berger *et al.*, 1998; Marantelli *et al.*, 2004). Los esporangios inmaduros también pueden crecer dentro de células más profundas que contengan pre-queratina. No se han hallado esporas en reposo resistentes.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Como se ha indicado anteriormente, Bd se ha identificado en seis continentes, en dos órdenes de anfibios, 14 familias y más de 350 especies. En conjunto, puede decirse que la mayoría de los anuros y urodeles, si no todos, son susceptibles a la infección por Bd; la morbilidad y la mortalidad varían entre especies. Prácticamente no se ha observado mortalidad en renacuajos (existe un informe que indica lo contrario [Blaustein *et al.*, 2005]) y, hasta ahora, no se ha detectado Bd viable en huevos.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Las fases susceptibles de la vida del hospedador son todas las edades, larvas, metamorfos y adultos (no los huevos).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La susceptibilidad innata varía mucho entre especies. El microhabitat y el medio en el que habita una especie también son factores clave para la infección y la enfermedad, puesto que la virulencia disminuye a temperaturas más cálidas (>26°C).

A excepción de los huevos, Bd puede detectarse a cualquier edad, en larvas, metamorfos y adultos, y por varias técnicas – inspección visual de renacuajos, microscopía óptica, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, microscopía inmunoelectrónica y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El órgano diana del que tomar muestras es la piel (Hyatt *et al.*, 2007). Un signo clínico observado en la quitridiomycosis es la muda excesiva de piel de la superficie epidérmica. La piel mudada a menudo procede de las superficies ventrales del abdomen, las extremidades y los pies, y suele identificarse (Berger *et al.*, 2005a; 2005b; Pessier *et al.*, 1999) por hiperqueratosis y la presencia de zoosporangios. La obtención de piel de estos lugares es una forma clara de maximizar la probabilidad de detectar Bd.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Alguna especie de anfibios son portadoras de infecciones subclínicas en la naturaleza y presentan pocos o ningún indicio de morbilidad ni mortalidad. No se sabe si estas especies son portadoras de por vida.

2.2.6. Vectores

Existen especies de anfibios que pueden actuar como reservorios de Bd sin presentar signos de infección. La capacidad de Bd de sobrevivir en el medio o en especies simpátricas le confiere la capacidad de llevar a ciertas especies a la extinción. Bd constituye un importante factor de riesgo para alrededor del 97% de los anfibios en peligro crítico de extinción (Smith *et al.*, 2006) y, como se ha indicado anteriormente, ha sido reconocido como la causa de extinción de ciertas especies de anfibios (Fisher *et al.*, 2009).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Solo se han identificado anfibios como fuentes y portadores de Bd.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La infección por Bd puede transmitirse entre animales por contacto entre ellos o con zoosporas móviles vehiculadas con el agua. Se considera que la transmisión a largas distancias tiene lugar por medios distintos del agua, como el traslado de animales durante el comercio internacional (Rowley *et al.*, 2007) y posiblemente por el movimiento de agua contaminada o suelo húmedo.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia varía en gran medida con la estación, el lugar y la especie. En poblaciones infectadas, la prevalencia suele ser de al menos el 5%, pero no es raro observar prevalencias del 90%. En zonas tropicales, se producen prevalencias altas en invierno y a altas altitudes. Pueden hallarse detalles sobre esta prevalencia, obtenidos mediante una intensa vigilancia global (mediante qPCR) en <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/>.

2.3.3. Distribución geográfica

Se han notificado infecciones por Bd en todos los continentes (como se ha indicado anteriormente). La información de la que se dispone hasta la fecha (los países, las zonas y las especies – número analizado, positivos/negativos, método de identificación, año de notificación, el estado según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [IUCN] y los lugares se detallan en <http://www.spatialepidemiology.net/bd-maps/>). En el momento de publicar este capítulo, Bd se había notificado en 72 países; consúltense las páginas web indicadas para más detalles.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Algunas especies de anfibios coexisten con Bd, mientras que otras sucumben a la enfermedad (Davidson *et al.*, 2003; Hanselmann *et al.*, 2004; Retallick *et al.*, 2004). Incluso dentro de cada especie, algunas poblaciones pueden coexistir con Bd, mientras que otras entran en declive hasta la extinción (Briggs *et al.*, 2005). Bd debe considerarse un agente patógeno muy infeccioso y potencialmente mortal que puede llevar a una especie a la extinción.

2.3.5. Factores ambientales

Los brotes de quitridiomycosis se asocian principalmente a estaciones (meses más fríos), altitudes (la mayoría de casos graves en general se restringen a poblaciones de grandes altitudes), y a hábitats de reproducción. Respecto a los últimos, los declives de poblaciones son pronunciados en especies que viven en arroyos. La gravedad del impacto de la enfermedad en la población también está correlacionada con pequeñas distribuciones de poblaciones que son menos fecundas (Williams y Hero, 1998). Nota: existen interacciones más complejas y diferencias de susceptibilidad aparentemente inherentes que actúan junto con estos “factores” identificados.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No aplicable.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Bd es susceptible a gran variedad de agentes antifúngicos y a niveles bajos de calor (>30°C) cuando se analiza *in vitro*, pero existen pocos métodos que hayan demostrado eliminar Bd de los anfibios (Berger *et al.*, 2010). Se ha comprobado que el calentamiento (a 32°C durante 5 días y a 37°C durante dos periodos

de 8 horas, con un intervalo de 24 horas entre ellos) es igual de eficaz contra la quitridiomycosis en dos especies de anfibios (Phillott *et al.*, 2010; Woodhams *et al.*, 2003). Debe comprobarse el efecto del calor y optimizarse en varias especies, y se observará que muchos anfibios de climas templados no toleran los 37°C. Aunque tanto los baños de itraconazol y (al 0,01% durante 5 minutos al día y un total de 11 días) como los de formalina/verde de malaquita parecen ser tratamientos eficaces para las ranas post-metamórficas (Forzan *et al.*, 2008; Hohreiter y Rigg 2001; Nichols y Lamirande, 2009; Parker *et al.*, 2002), estas pruebas no fueron rigurosas y se observó el problema de la toxicidad, en concreto en el caso de la formalina/verde de malaquita. No obstante, los baños de itraconazol se han utilizado mucho en programas de rescate y conservación de anfibios, y observaciones puntuales sugieren que es eficaz para adultos y subadultos. Se ha observado un tratamiento eficaz de renacuajos infectados de una especie en una prueba controlada en la que se ha utilizado itraconazol a dosis bajas (1,5 mg litro⁻¹), pero podría ir asociado a despigmentación (Garner *et al.*, 2009). Nota: la formulación hidrosoluble de itraconazol no es fácil de conseguir. Se ha documentado un tratamiento seguro y eficaz contra infecciones por Bd (en adultos y renacuajos) con voriconazol. Este tratamiento consiste en aplicar spray una vez al día durante 7 días a razón de 1,25 mg litro⁻¹ (Martel *et al.*, 2010).

2.4.3. Inmunoestimulación

No se ha comprobado.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se ha iniciado ningún programa de selección genética a favor de la resistencia; sin embargo, ciertos países están desarrollando planes nacionales para controlar la quitridiomycosis. Estos planes incluyen la implementación de protocolos de higiene para personas que traten con anfibios salvajes y en los que se reconozca que existen ciertas zonas aisladas e inmaculadas en las que habitan especies muy vulnerables que necesitan ser protegidas de Bd. Otra actividad (Genwin, 2008) consiste en establecer poblaciones cautivas de especies muy susceptibles amenazadas por olas epidémicas en progresión o ya infectadas y que estén sufriendo declives lentos pero constantes (el proyecto Arca de los Anfibios: <http://www.amphibianark.org/>).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

La presencia de especies resistentes se considera que aumenta la transmisión a especies amenazadas. Se han llevado a cabo programas de reproducción en cautividad para repoblar poblaciones salvajes de ranas en peligro de extinción.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se han comprobado.

2.4.7. Desinfección

En un artículo reciente de Phillott *et al.*, 2010 se resumen los protocolos de desinfección, con detalle de los protocolos respecto a la captura, la manipulación y el mantenimiento de anfibios salvajes; la desinfección de la piel antes y después de llevar a cabo intervenciones invasivas; el marcaje de las ranas; la desinfección de la piel, el cierre de heridas y el tratamiento de quipo accesorio (Tabla 1.1). Estos protocolos están diseñados para proporcionar medidas de higiene en el lugar, con el fin de minimizar el riesgo de transmisión de Bd entre animales. Este artículo también detalla protocolos de medidas de higiene en el momento de la entrada, la salida y entre lugares, para prevenir el aumento del riesgo de propagación de Bd a niveles superiores.

Tabla 1.1: Estrategias de desinfección adecuadas para matar Bd (Retallick *et al.*, 2004)

Aplicación	Desinfectante	Concentración	Tiempo
Desinfección de equipo quirúrgico y otro instrumental (como básculas o calibradores)	Cloruro de benzalconio	2 mg ml ⁻¹	1 minuto
	Etanol	70%	1 minuto
Desinfección de equipo y recipientes de obtención de muestras	Hipoclorito de sodio	1%	1 minuto
	Path X o compuestos del amonio cuaternario 128	Solución 1 en 500	0,5 minutos
	Trigene	Solución 1 en 5000	1 minuto

	F10	Solución 1 en 5000	1 minuto
	Virkon	2 mg ml ⁻¹	1 minuto
	Permanganato de potasio	1%	10 minutos
	Secado completo		>3 horas
	Calor	60°C	30 minutos
	Calor	37°C	8 horas
Desinfección del calzado	Hipoclorito de sodio	1%	1 minuto
	Path X o compuestos del amonio cuaternario 128	Solución 1 en 500	0,5 minutos
	Trigene	Solución 1 en 5000	1 minuto
	F10	Solución 1 en 5000	1 minuto
	Secado completo		>3 horas
Desinfección de la ropa	Lavado en caliente	60°C o más	30 minutos

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Cuando las instalaciones de animales en cautividad suponen una amenaza para las poblaciones salvajes, deben aplicarse las siguientes medidas:

- El agua, los residuos y otros materiales deben tratarse para matar Bd o bien deben guardarse, desecharse o trasladarse a un lugar donde no supongan una amenaza. Así, por ejemplo, las aguas infectadas pueden liberarse a alcantarillas que desemboquen directamente al medio marino.
- Todos los animales vivos, incluidos los de producción, deben encerrarse de tal forma que no puedan salir al exterior.
- Las personas, equipo y materiales que salgan de la instalación deben pasar por una limpieza suficiente como para prevenir la transmisión de Bd.
- Los anfibios que sean liberados a la naturaleza deben mantenerse en estricto aislamiento y debe comprobarse si están infectados por Bd antes de liberarlos. Si alguna especie da un resultado positivo, debe tratarse, y tendrán que volver a analizarse todos los animales hasta que estén libres de la infección.
- Cuando se planifique la construcción de una instalación, al decidir la ubicación y el diseño deberá tenerse en cuenta el estado de la zona respecto a Bd, así como la disponibilidad de un suministro seguro de agua y de consumibles, y si los residuos podrán desecharse de forma segura. Así, por ejemplo, las operaciones de cría de animales es mejor realizarlas en zonas de tierras bajas tropicales, donde Bd no supone apenas ninguna amenaza para las especies locales y donde es más fácil acceder a medios seguros de eliminación de residuos.
- Cuando en la zona haya Bd, debe tenerse cuidado de no aumentar la carga ni introducir nuevas cepas al ambiente local. Las operaciones de las explotaciones deben garantizar que la carga en el agua residual y otros materiales se reducirá a los niveles ambientales antes de ser desechada al medio, y que los animales que acaben de llegar y que puedan ser portadores de nuevas cepas serán tratados y lavados antes de instalarlos con otros anfibios.

Cuando existan fuentes externas que representen una amenaza para las poblaciones cautivas, deberán aplicarse las siguientes medidas:

- El agua y las personas u otros elementos que entren en la instalación deberán ser tratados para eliminar Bd, a no ser que se sepa que proceden de zonas seguras.
- Los anfibios que entren en la instalación deberán aislarse y analizarse. Si alguno da positivo, deberá tratarse y se tendrá que volver a analizar todo el grupo hasta que se observe que está libre de infección.

3. Obtención de muestras

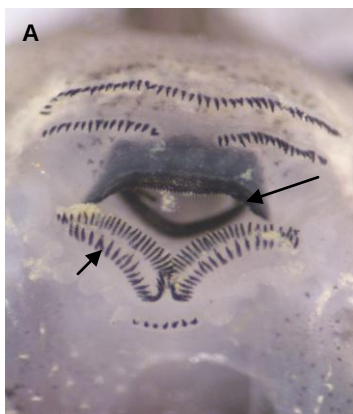
3.1. Elección de ejemplares

Bd se replica en las partes queratinizadas de los aparatos bucales de los renacuajos y en casi todas las superficies ventrales, así como en los dedos de los pies de los anfibios adultos. Los órganos infectados son los dedos de los pies (que deberían cortarse, pero no se recomienda por motivos éticos), la piel (deben tomarse hisopos) y los aparatos bucales (renacuajos), y también debe realizarse baños de animales enteros (adultos y renacuajos) (Hyatt *et al.*, 2007).

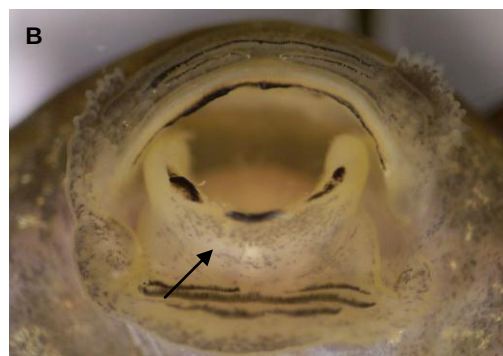
3.1.1. Corte de dedos de los pies (adultos), discos orales (renacuajos/larvas), e hisopos (adultos y renacuajos)

Los dedos de los pies que vayan a ser utilizados en PCR TaqMan en tiempo real deberán cortarse en el campo y guardarse secos o en alcohol al 70%. Como alternativa, se pueden recoger en tubos de 1,5 ml y guardarse a -80°C hasta que se realice la extracción de ADN. Los dedos de los pies que vayan a ser procesados para histología deben fijarse en formalina tamponada neutra al 10%.

En el campo, pueden obtenerse hisopos de los aparatos bucales de renacuajos (discos orales – véanse las fotografías siguientes) utilizando hisopos de punta fina¹. Estos discos orales también se pueden extirpar y secar al aire sobre papel de filtro. Pueden reconocerse los animales infectados por la despigmentación (flecha, fotografía B) de la capa dérmica de la mandíbula, la presencia de dientes acortados o la pérdida de dientes (Imágenes cedidas por el Dr. Obendorf; Departamento de Anatomopatología, Universidad de Tasmania).



Disco oral normal (tejidos pigmentados) de *Crinia signifera*



Ejemplar de *Limnodynastes dumerilii* afectado por Bd

Al tomar hisopos de ranas, debe asegurarse la muestra de la cara inferior de las extremidades, los pies y el parche pélvico (pasando el hisopo 3-5 veces); a continuación debe romperse el palo del hisopo y la parte húmeda debe depositarse en un tubo de 1,5 ml. Debe tomarse un hisopo de los aparatos bucales de renacuajos insertando el hisopo en la boca y haciéndolo girar varias veces.

3.1.2. Baños de agua y filtros

Dado que la piel de las ranas infectadas se desprende quedando en el medio que la rodea, pueden colocarse anfibios en recipientes que contengan soluciones sin Bd (como la solución DS; se describe más adelante). El agua del “baño” puede analizarse directamente (consúltase abajo) tras una inmersión de 15 minutos. Como alternativa, puede filtrarse el agua del baño y guardar los filtros (por ejemplo, filtros de 0,45 µm²) secos (a temperatura ambiente o a 4°C) hasta que sean analizados.

Reactivos

Preparación de solución salina débil (DS)

KH₂PO₄ – 0,001 M

1 Medical Wire & Equipment Co. MW100-100.
2 Sartorius Minisart No. 16555.

MgCl₂ – 0,0001 M
CaCl₂ – 0,00002 M

Solución madre #1 (solución de fosfato):

KH₂PO₄ – 136,0 g

K₂HPO₄ – 174,18 g

(NH₄)₂HPO₄ – 132,07 g

Agua destilada hasta 1000 ml

Solución madre #2 (solución de calcio-magnesio):

CaCl₂.2H₂O – 36,76 g

MgCl₂.6H₂O – 50,83 mg

Agua destilada hasta 500 ml

Se lleva el pH a 7 con KOH (solución débil)

Para crear la DS, se añaden 0,1 ml de la solución madre de calcio-magnesio y 0,5 ml de la solución de fosfato a 1000 ml de agua destilada.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Los hisopos y los discos orales extirpados pueden guardarse secos a temperatura ambiente (de hasta 23°C). Nota: la exposición a temperaturas altas durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, en un coche) puede reducir la obtención de ácido nucleico.

En caso de realizar el examen mediante microscopía óptica o electrónica, se fijan los tejidos en formalina tamponada neutra al 10% y glutaraldehído tamponado al 2,5%. Las muestras deben procesarse como se describe para la Necrosis hematopoyética epizootica o la Infección por ranavirus.

3.3. Combinación de varias muestras

Pueden juntarse un máximo de cinco muestras (aunque las débilmente positivas pueden obviarse). Nota: se recomienda juntar las muestras solo en los estudios de población cuyo objetivo sea obtener datos de presencia/ausencia (Hyatt *et al.*, 2007).

3.4. Órganos y tejidos de elección

Piel ventral (adultos), dedos de los pies (adultos) y aparatos bucales (renacuajos).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Órganos internos y huevos.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

En la mayoría de los animales infectados no se observan signos clínicos. El periodo de manifestación de signos clínicos suele ser corto y se limita a los anfibios que después morirán.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Predominan los signos del sistema nervioso central. Las alteraciones del comportamiento consisten en un movimiento lento y descoordinado, posturas de sedestación anómalas, espasmos tetánicos, pérdida del reflejo de erguido y parálisis.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Pueden observarse alteraciones macroscópicas de la piel en las infecciones graves, que consisten en una muda anómala de la piel (más frecuente de lo normal y en trozos más pequeños) y eritema. Estos signos clínicos no son específicos de la quitridiomycosis.

4.2.2. Bioquímica clínica

En la rana arborícola verde de Australia enferma (*Litoria caerulea*) se observan reducciones en las concentraciones plasmáticas de sodio y de potasio de un 20% y un 50%, respectivamente (Voyles *et al.*, 2009).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

La microscopía consiste en el examen de preparaciones húmedas de piel (raspados, frotis o piel entera), cortes histológicos de piel teñido con hematoxilina y eosina, e inmunohistoquímica de cortes de piel. Estas pruebas sistemáticas tienen un alto valor predictivo positivo. A continuación se explican detalles de estas técnicas y sobre cómo interpretar los resultados.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Pueden examinarse muestras de piel entera, de las membranas interdigitales o de cualquier otro lugar; esta técnica mantiene la anatomía de la piel y permite examinar una gran superficie. La ventaja es que la muestra se puede orientar y que la localización del agente sospechoso puede ayudar a identificarlo. Así, por ejemplo, puede determinarse si en las células superficiales hay perfiles fúngicos sospechosos, lo cual sería indicativo de Bd, o bien si se encuentran en capas más profundas, lo cual es normal en la morfología normal del anfibio. Esta técnica es rápida, barata y, cuando es utilizada por observadores con experiencia, ofrece una sensibilidad equivalente a la de la tinción con hematoxilina y eosina (Longcore *et al.*, 2007). Es útil para estudiar ranas sanas de las que no puedan obtenerse hojas de piel mudada.

Los renacuajos infectados a menudo pueden identificarse en el campo por la falta de color en las capas dérmicas de las mandíbulas, lo cual puede observarse mediante lupas (x10). Los aparatos bucales del renacuajo también se pueden examinar cortando trozos de las filas de dientes o de las capas dérmicas y aplastándolos bajo un cubreobjetos, donde se podrán observar agrupaciones de esporangios.

En las preparaciones húmedas y los frotis (véase abajo), normalmente se observan esporangios intracelulares de forma entre redonda y ovalada formando agrupaciones. En piel mudada el estadio más frecuente es el de esporangios vacíos viejos, aunque también es frecuente hallar esporangios que contengan zoosporas. Los tubos de descarga (asociados a los zoosporangios), de los cuales salen zoosporas, suelen apuntar perpendicularmente a la superficie de la piel y, por tanto, son pequeños círculos, tal vez difíciles de diferenciar. La observación de septos internos dentro de los esporangios aumenta la confianza en el diagnóstico. Los núcleos de las células de la epidermis son de tamaño similar al de los esporangios, pero pueden diferenciarse por sus membranas irregulares y poco definidas, y por su aspecto plano, granular y gris.

4.2.5. Frotis

El examen de raspados o frotis de piel mediante microscopía óptica es un método rápido y sencillo de identificar Bd y puede realizarse con muestras frescas, congeladas o fijadas (Berger *et al.*, 2009a). La piel mudada se levanta o se raspa en la rana (mediante una hoja de bisturí o una espátula de plástico estéril) y se extiende sobre un porta con una gota de agua, se cubre con un cubreobjetos y se examina la preparación con un microscopio óptico compuesto. Teóricamente se obtiene una monocapa uniforme de células epidérmicas queratinizadas. Se utilizan el objetivo de 100 aumentos inicialmente para examinar una zona y a continuación el de 400 para confirmar la presencia de esporangios. Los esporangios (5-13 µm) intracelulares, de forma entre redonda y ovalada, forman agrupaciones en el interior de las células hospedadora. Los esporangios vacíos viejos son el estadio más prevalente en la piel mudada, aunque es frecuente observar esporangios que contengan zoosporas.

Las muestras preparadas como se ha descrito anteriormente pueden teñirse mediante los siguientes protocolos:

Azul algodón de lactofenol:

- i) Se instila una gota de alcohol al 70% sobre un porta.
- ii) Se sumerge la muestra/material en la gota de alcohol.
- iii) Se añaden una o dos gotas de azul algodón de lactofenol antes de que el alcohol se seque.
- iv) Sosteniendo el cubre entre el dedo índice y el pulgar, se toca un borde de la gota de medio de montaje con el borde del cubre, y se baja con cuidado, evitando formar burbujas de aire. Ahora la preparación está lista para ser examinada.

Reactivos (se prepara 1 litro):

Fenol:	200,0 g
Azul algodón:	0,5 g
Glicerol:	400 ml
Ácido láctico:	200 ml
Agua desionizada:	200 ml

Rojo Congo: Con una solución de trabajo de Rojo Congo acabada de preparar (y filtrada), se tiñen raspados o frotis de piel durante 45-60 minutos. Las paredes quitinosas de esporangios vacíos (paredes) y los tubos de secreción expuestos se teñirán de color rojo ladrillo. Las paredes de los esporangios más inmaduros, los maduros y los vacíos también se teñirán. Nota: con este procedimiento, las zoosporas no se tiñen. Los núcleos de las células epidérmicas se tiñen de color naranja claro con el Rojo Congo si las células están dañadas.

Reactivos

Solución madre:	saturada
Tinción Rojo Congo:	1,0 g
Solución madre de NaCl:	500 ml
(Solución madre de NaCl 30,0 g + 200 ml de agua destilada)	200 ml

Solución de trabajo (Rojo Congo)	
Solución madre de Rojo Congo:	50,0 ml
NaOH al 1%:	0,5 ml

Nota: Se filtra por lana de fibra de vidrio, y la solución debe ser transparente, no turbia; debe utilizarse de inmediato)

Puede utilizarse DipQuick³ para teñir para citología diagnóstica general. Para la detección de Bd, se utiliza la tinción para identificar zoosporas y paredes de esporangios; el citoplasma y los núcleos de la célula hospedadora también se teñirán. Se trata de una tinción comercial y debe seguirse el protocolo del fabricante.

Nota: estas tinciones pueden mejorar la exactitud y la facilidad del diagnóstico, pero no se han realizado comparaciones.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente**4.3.1. Métodos directos de detección****4.3.1.1. Métodos microscópicos distintos de las preparaciones húmedas y de los frotis***4.3.1.1.1. Microscopía óptica: cortes fijados*

Se preparan los tejidos igual que para los protocolos convencionales. Se tiñen cortes de 5 µm de espesor con hematoxilina y eosina (Drury y Wallington, 1980). Se corta de tal forma que se consiga un corte vertical de la piel.

Los dedos se examinan cortando la cara ventral entera de una piel o cortando un dedo. En el caso de los dedos de los pies, la longitud máxima de estrato córneo se consigue a partir de un corte longitudinal y no de un corte transversal. Los dedos se descalcifican en EDTA durante 48 horas a 37°C o en ácido fórmico al 10% durante 3-5 días antes del procesado. Como alternativa, en el caso de los dedos más grandes, por ejemplo de anfibios con una longitud de hocico de más de 60 mm, se puede retirar la piel de la falange subyacente y cortar la piel sin hueso.

En el estrato córneo, el quitridio es esférico u ovalado con papilas de secreción que se proyectan desde la superficie. Pueden papilas de secreción en cortes histológicos, pero no son frecuentes. Las zoosporas que se desarrollan en el zoosporangio salen por el tubo de secreción abierto. La pared del zoosporangio es lisa, de espesor uniforme y normalmente eosinófila. El contenido de los zoosporangios varía en función de la fase de desarrollo del quitridio; se han identificado cuatro fases: (1) La primera fase contiene una masa central basófila, bastante homogénea. (2) Los zoosporangios se vuelven multinucleados y a continuación el citoplasma se divide formando zoosporas. Las zoosporas son basófilas y en el corte transversal tienen aspecto de cuerpos redondos u ovalados, y

3 http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/diff_quick_ellis.htm

se observan unos 4 a 10, en función del plano del corte. (3) Una vez las zoosporas se han liberado por las papilas de secreción, los zoosporangios quedan vacíos. En algunas fases coloniales, pueden observarse septos delgados dividiendo el esporangio en compartimientos internos. (4) El esporangio vacío puede hundirse adoptando una forma irregular. Durante esta fase terminal la estructura vacía a veces resulta colonizada por bacterias, que pueden observarse en el corte en forma de bacilos o cocos basófilos. Los esporangios vacíos son el estadio más frecuente de la capa superficial mudada. En cortes histológicos el diámetro de los zoosporangios oscila entre los 5 y los 13 μm . Tienen un tamaño similar al de los núcleos de las células epidérmicas. Los tubos de descarga tienen un diámetro de 2 μm y son de longitud variable, normalmente de entre 2 y 4 μm , pero a veces pueden medir incluso 10 μm de largo. Las zoosporas miden unos 2 μm de diámetro. La infección se suele asociar a anatomopatología cutánea y estas alteraciones pueden utilizarse para detectar, a bajos aumentos, zonas probablemente infectadas. Es frecuente una hiperqueratosis y erosiones focales en la zona adyacente a los microorganismos. Puede haber un engrosamiento irregular de la epidermis (hiperplasia). En algunos casos mortales, una extensa muda de la capa hiperqueratótica deja la epidermis con pocos microorganismos. Sin embargo, en estos casos puede detectarse Bd en bajas cantidades en la capa superficial ligeramente queratinizada o pueden observarse en grandes cantidades en la piel mudada. En zonas de gran ulceración no hay esporangios (Berger *et al.*, 2009b).

4.3.1.1.2. Microscopía electrónica

La preparación de muestras (piel y dedos de los pies) se describe en otro lugar (Berger *et al.*, 2005a). Determinados estudios sobre la piel de ranas infectadas realizados mediante microscopía electrónica muestran una zona de citoplasma hospedador condensado, de hasta 2,5 μm de grosor, alrededor de algunos esporangios. Esta zona parece estar formada principalmente por fibrillas (sin orgánulos). Las células epidérmicas más superficiales contienen esporangios más grandes, y los núcleos y orgánulos del hospedador, como las mitocondrias, están situados en un lado de la célula. Cerca de la superficie de la piel, el citoplasma epidérmico se condensa en una capa fina alrededor de los tallos fúngicos y se pierden orgánulos del hospedador, como ocurre durante la maduración normal de la célula epidérmica. Los núcleos de las células se vuelven oscuros y se condensan, pero no son tan aplanados como en el estrato córneo normal. Parece producirse queratinización de forma prematura en las células situadas debajo de la superficie de la piel, en comparación con las células infectadas de la misma capa epidérmica. Las uniones celulares de las células infectadas suelen tener un aspecto normal. Algunas células infectadas y no infectadas próximas a los focos de infección se hinchan de forma aguda, aunque las mitocondrias y otros orgánulos de estas células quedan intactos. Los núcleos de algunas células infectadas del estrato granuloso están encogidas y cromatolíticas. La anatomopatología de las células epidérmicas más profundas, en la capa basal, consiste en encogimiento, aumento de los espacios intercelulares, vacuolación y disolución del micoplasma. La hiperqueratosis parece poder atribuirse en parte a un aumento de la renovación de células epidérmicas. La hinchazón de las células epidérmicas próximas a los focos de infección sugiere una respuesta hiperplásica. Los esporangios parecen empezar a iniciar una muerte prematura y una queratinización de las células hospedadoras. Puede producirse adelgazamiento de la epidermis cuando la germinación de las células epidérmicas no puede compensar la rapidez de muda causada por el aumento de muerte celular. Otras ranas infectadas pueden tener la epidermis destacadamente engrosada debido a que la hiperplasia supera la tasa de muda.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Aislamiento, cultivo y archivo de Bd

4.3.1.2.1.1. Aislamiento

Se obtienen animales (vivos, moribundos o que acaben de morir) y se guardan refrigerados y húmedos hasta que se examinen. Se identifica Bd como se ha descrito anteriormente.

- i) Se examina la piel con un microscopio de disección ($\times 10$ o $\times 20$).
- ii) Se utiliza una aguja afilada y estéril para retirar la piel suelta de entre los dedos de los pies y de otras partes de la superficie ventral del animal. Si la piel no está suelta, se utilizan pinzas de disección y se rasgan trozos tirando del borde más grande de piel situado entre los dedos de los pies o utilizando una hoja de afeitar de un solo margen para extirpar las membranas interdigitales de los pies. En el caso de los animales larvarios, si presentan pérdida focal de dientes o despigmentación de la capa dérmica de la mandíbula, se retiran estas zonas con pinzas de disección.
- iii) Se coloca la piel o la capa dérmica de la mandíbula sobre un porta en una gota de agua destilada estéril y se cubre con un cubreobjetos. Se observa con un microscopio compuesto a $\times 100$ y $\times 400$.

- iv) Se comprueba si hay esporangios (cuerpos con pared, entre esféricos y ovalados, de 10-30 µm de diámetro) dentro de las células epidérmicas. Nota: algunos esporangios serán septados (es decir, contendrán divisiones de las paredes de la célula), en los que se dividirá el cuerpo fúngico, o tallo, en dos o más esporangios. Algunos esporangios pueden contener zoosporas y algunos estarán vacíos.
- v) Se coloca la piel en la que se haya observado Bd sobre una placa de cultivo (de 9 cm) que contenga agar nutriente mTGh con antibióticos, que se añaden tras la esterilización en autoclave.
- vi) Se utiliza una aguja afilada y esterilizada para tomar e introducir pequeños (<1×1 mm) trozos de piel infectada (x40) en el agar nutriente (placa de cultivo de 9 cm). Si los trozos de piel son demasiado gruesos y no se rasgan, se cortan en trozos pequeños con unas microtijeras o tijeras cortapieles.
- vii) Cada pocos mm se retira la aguja del rozo de piel y se pasa por el agar (para eliminar bacterias, hongos y esporas fúngicas).
- viii) Se invierte la dirección de la piel y se pasa una y otra vez por el agar. Nota: La contaminación bacteriana y fúngica no supone a penas ningún problema cuando se trabaja con tejido de renacuajo.
- ix) Tras pasar la muestra por el agar, se coloca la piel limpia sobre una placa nueva de agar mTGh. Hay que asegurarse de que la nueva placa se abra muy poco, y debe pasarse la muestra por el agar introduciéndola con la aguja. Se repite este proceso para otros trozos de piel; en cada intento, se recomienda colocar al menos seis trozos de piel limpia en cada una de un total de dos placas. Se sella la placa de agar nutriente con Parafilm® u otro material sellante de laboratorio bien ajustado alrededor de la circunferencia de la placa.
- x) Se incuban las placas a 17-23°C. Durante las siguientes una a tres semanas, se comprueba el desarrollo invirtiendo la placa de cultivo en la platina de un microscopio compuesto (x100). Se comprueba si las placas presentan contaminantes y se retiran las colonias fúngicas y bacterianas con una hoja de bisturí esterilizada. Se comprueba si hay zoosporas móviles de Bd (3–4 µm) cerca de la piel (1–3 días post-inoculación) o si hay contornos esféricos de tallos en crecimiento (normalmente en un plazo de varios días a 2 semanas). Si se observan hifas creciendo de la piel limpia, se retira de forma aséptica la colonia de hifas de la placa de aislamiento con un cuchillo/hoja de bisturí estériles.
- xi) Cuando se observan colonias de Bd en la piel, puede retirarse de forma aséptica parte de una colonia y colocarse en una gota de agua en un porta. Se observa con un microscopio compuesto y se identifican esporangios y zoosporas por comparación con fotografías publicadas (por ejemplo, las de Berger *et al.*, 2002; Longcore *et al.*, 1999; y <http://www.umaine.edu/chytrids/Batrachochytrium/Photographs.html>).
- xii) Tras una identificación positiva y crecimiento suficiente (2 semanas – 1 mes) se transfiere la colonia (o parte de la misma) de forma aséptica a una placa de agar triptona al 1%. El hongo crece mejor en grupos, de modo que hay que tener cuidado de no separar los esporangios durante la transferencia. Se incuba durante 1-2 semanas; si el cultivo está libre de microorganismos contaminantes (por ejemplo, bacterias y hongos), se esparce la colonia sobre la placa y se transfiere una parte de la colonia a un caldo nutriente en un frasco de 250 ml con tapón de rosca. Para disponer de réplicas, también deben transferirse trozos de la colonia a placas nuevas, que se sellarán con Parafilm®. Nota: si es posible, hay que trabajar en una cabina de flujo laminar.
- xiii) Para disponer de stocks, deben guardarse dos conjuntos de cultivos en triptona líquida al 1% a 5°C. Los cultivos de medio líquido refrigerados permanecen viables durante unos cuatro meses.

Reactivos

mTGh

8 g de triptona
2 g de hidrolizado de gelatina
10 g de agar
1,000 ml de agua destilada

Se añaden 200 mg litro⁻¹ de penicilina-G y 200–500 mg litro⁻¹ de sulfato de estreptomicina tras la esterilización en autoclave; si las bacterias siguen siendo un problema, se añade 1 mg litro⁻¹ de ciprofloxacilina.

Triptona agar al 1%

10 g de triptona

10 g de agar
1000 ml de agua destilada

Caldo tristona al 1%
10 g de triptona
1000 ml de agua destilada

4.3.1.2.1.2. Crio-archivo a partir de cultivo en caldo

4.3.1.2.1.2.1. Preparación de cultivos

- i) Se toman 2 ml del caldo de cultivo con crecimiento activo (de 1 semana).
- ii) Se añaden a 13 ml de caldo nuevo en un frasco de 25 cm².
- iii) Se incuba durante 3-4 días asegurándose de que los frascos estén planos.
- iv) Los cultivos deben tener muchas zoosporas muy activas, esporangios individuales pequeños o medianos adheridos al plástico y algunos más grandes cerca de las zoosporas que se están liberando. También debe haber muchas agrupaciones pequeñas de esporangios flotando en el caldo.
- v) Se rascan las paredes del frasco y se centrifuga el contenido en una centrífuga de sobremesa a 1700 **g** durante 10 minutos.
- vi) Se vierte el sobrenadante (hay que tener en cuenta que el sobrenadante contiene grandes cantidades de zoosporas activas).
- vii) Se vuelve a suspender el sedimento en 1 ml de DMSO al 10% y suero fetal bovino (FBS) al 10% en caldo y se congela en un recipiente para congelación. Un DMSO al 10% en caldo o crioprotector (como abajo) también funciona, pero la combinación de DMSO y FBS es la que proporciona la mejor recuperación.
- viii) Tras la descongelación y la siembra en placas de TGhL, se añade 1 ml de DS.

4.3.1.2.1.2.2. Congelación de cultivos

- i) En una cabina de flujo laminar, se añade crioprotector (más o menos 1 ml) en un tubo de 3 ml.
- ii) Se rasca una parte del cultivo de Bd y se coloca en el crioprotector. Si hay algunas zonas del cultivo con agrupaciones sólidas, se escogen unas pocas, con el agar adherido, y se añaden a la parte rascada. Nota: no se deben añadir más de unos 0,5 cm³ de cultivo.
- iii) Se congela utilizando un recipiente de congelación de plástico que contenga isopropanol⁴.
- iv) Se colocan los recipientes de congelación en un congelador a -80°C toda la noche, a continuación se colocan los tubos de congelación en nitrógeno líquido a modo de almacenaje permanente.

4.3.1.2.1.2.3. Descongelación de cultivos

- i) Se llena un recipiente con agua (43°C).
- ii) Se colocan los tubos de congelación directamente procedentes del nitrógeno líquido en esta agua y se comprueba que se mantengan bajo el agua. Se agitan durante unos 30 segundos.
- iii) Se comprueban los tubos de congelación elevándolos fuera del agua, para determinar si el crioprotector se ha descongelado. Si se ha descongelado, se vierte el contenido en una placa de Petri estéril; si no, se devuelven al agua tibia. Es fundamental que la muestra no se caliente demasiado (Nota: una exposición prolongada de Bd a 43°C matará el microorganismo). Consejo: cuando el contenido empiece a descongelarse, sostenga el tubo de congelación en la mano para que el calor de su mano facilite la descongelación.
- iv) Se coloca la muestra en el agar (TGhL) de la placa de Petri.
- v) Se pipetea algo del crioprotector líquido sobre la muestra (en la placa de Petri).
- vi) Se depositan unas pocas gotas (alrededor de 1 ml) de DS sobre la muestra transferida y se incuba (consultar arriba). Se examinan los cultivos durante 7-10 días para comprobar si

4 Se recomiendan los recipientes de Mr Frosty® (Nalgene)

hay movimiento de zoosporas. Si, pasados 4-7 días, no se observa movimiento y el agar tiene un aspecto seco, se instilan unas pocas gotas de DS sobre el cultivo. Si no se produce movimiento pasadas 3 semanas, es probable que los cultivos estén muertos.

Nota: Si hay contaminación, se transfiere el cultivo a una zona descontaminada. Si la contaminación es considerable, se utiliza TGH con antibióticos.

Reactivos

DS

Véase el apartado 3.1.2.

Medio de congelación

Solución madre de leche desnatada

Se añaden 90 ml (30,5 g) de leche desnatada en polvo a 200 ml de agua destilada a temperatura ambiente en un frasco de 500 ml. Se mezcla bien, se esteriliza en autoclave durante no más de 15 minutos con una frecuencia de ventilación de 5-8 minutos. Es importante recordar que la leche se carameliza con gran facilidad, y que a menudo hay que tirarla y volver a repetir este paso. Si la solución está demasiado marrón al sacarla del autoclave, hay que tirarla y repetir el proceso. Debe ser de color marrón claro/crema.

Solución #1: Se preparan 100 ml de glicerol al 20% en agua doblemente destilada y se esterilizan en autoclave con un ciclo normal.

Solución #2: En una campana, se prepara una solución estéril de leche desnatada al 17% (véase arriba) añadiendo 17 ml de la solución de leche desnatada a 83 ml de agua estéril.

En una campana, se preparan 200 ml de crioprotector añadiendo volúmenes iguales de solución #1 a solución #2. Esto debe mantenerse estéril, flameando el cuello de la botella al utilizarla.

4.3.1.3. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Hay que tener en cuenta que los anticuerpos que se utilizan en todos los métodos relacionados reaccionan de forma cruzada con varios hongos (Berger *et al.*, 2002). Por tanto, deben utilizarse con cuidado y junto con microscopía óptica clásica y/o electrónica (véase el apartado 4.3.1.).

4.3.1.3.1. Co-localización de Bd y queratina mediante histoquímica y tinción especializada

Se procesaron cortes de animales infectados mediante una versión modificada del protocolo (Berger *et al.*, 2002). Se incubaron cortes con anticuerpo secundario conjugado a inmunoperoxidasa (IPX), lo cual dio lugar a una tinción roja-marrón de agrupaciones de Bd entre las células epiteliales (teñidas mediante tinción de contraste con hematoxilina de Lillie-Mayer⁵).

Procedimiento # 1: Inmunoperoxidasa

- i) Se desparafinan los cortes: 10 minutos en un horno a 60°C, xileno 1 minuto (x3), etanol al 100% (grado tec) 1 minuto x2, etanol al 70% 1 minuto, chorro de agua de grifo 1 minuto, agua destilada.
- ii) Se enjuagan en tampón PBS para eliminar las burbujas de aire.
- iii) Se aplican anticuerpos primarios a la dilución deseada (se determina empíricamente); se utiliza una solución de leche desnatada en polvo /PBSA al 1% como diluyente
- iv) Se incuban los cortes 45 minutos a 37°C.
- v) Se enjuagan los cortes en PBS durante 5 minutos.
- vi) Se bloquea el peróxido endógeno: Se aplica H₂O₂ al 3% en agua destilada, 200 µl/ porta, durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- vii) Se enjuagan los cortes con PBS durante 5 minutos.

- viii) Se añade “Envision +”⁶ (anti-conejo cuando los anticuerpos primarios son policlonales, y anti-ratón cuando los anticuerpos primarios son monoclonales), 3-4 gotas durante 20 minutos, a 37°C.
- ix) Se enjuagan los portas con PBS durante 5 minutos.
- x) Se extraen los portas de los estuches de secuencias y se colocan en la rejilla de tinción en tarro o tampón. Se distribuyen los portas sobre una rejilla horizontal de tinción limpiando los cortes con papel absorbente y aplicando solución sustrato a razón de 200 µl por porta.
- xi) Se añaden 200 µl de dimetilformamida (DMF) a 200 mg de AEC (3-amino-9-etilcarbazol, Sigma) en polvo, asegurándose de que el polvo se disuelve por completo, se añaden 10 ml de tampón acetato 0,05 M a pH 5,0, se añaden 5 µl de H₂O₂ al 30%.
- xii) Se comprueba el corte control positivo cada 2 minutos hasta que se logra una tinción óptima, normalmente a los 2-5 minutos.
- xiii) Se detiene la reacción lavando los portas en agua destilada.
- xiv) Se aplica una tinción de contraste en hematoxilina de Lillie-Mayer (Mod.) durante 30-90 segundos, se enjuaga en agua de grifo, azul en solución de Scott, se enjuaga bajo el chorro de agua de grifo.
- xv) Se enjuagan los portas en agua destilada y se montan en medio de acuoso de montaje.

Procedimiento #2. Fosfatasa alcalina y tinción de queratina

La identificación histológica e histoquímica de Bd puede complicarse cuando se muda la capa queratinizada superficial (estrato córneo), lo cual comporta un error en el diagnóstico porque los esporangios se pierden con la piel mudada. La combinación de la inmunotinción de Bd con la tinción de queratina tricrómica de Hollande ayuda a determinar si un resultado negativo puede deberse a la pérdida de la capa de queratina (Olsen *et al.*, 2004).

Aunque la fosfatasa alcalina (AP) no es más eficaz como sustrato que la IPX, es preferible debido a un efecto blanqueador en el sustrato de la IPX en la siguiente tinción de queratina. La AP tiene la ventaja de mejorar el contraste entre la tinción del sustrato y la tinción de la queratina.

- i) Se desparafinan los cortes con xileno y se hidratan en diluciones seriadas de etanol con agua de grifo.
- ii) Se sumergen en agua destilada.
- iii) Se incuban los cortes con anticuerpo policlonal anti-quitridio Rabbit 667, (solución salina tamponada de leche desnatada al 1% [p/v]/Tris a 1/1000) durante 45 minutos a 37°C.
- iv) Se lavan los cortes durante 5 minutos con TBS.
- v) Se incuban con Fosfatasa Alcalina anti-conejo/ratón ENVISION⁷ durante 20 minutos a 37°C.
- vi) Se lavan de nuevo (durante 5 minutos) con TBS.
- vii) Se añade sustrato⁸ BCIP/NBT a los cortes y se incuban durante 10 minutos.
- viii) Se enjuagan los cortes con agua destilada.

En esta fase, si no se requiere ninguna otra tinción, los cortes deben montarse en un gel⁹ de base acuosa y sellarse con un cubreobjetos.

Tinción de queratina – Tinción tricrómica de Hollande modificada

- i) Se extraen los portas del agua destilada (tras el inmunomarcaje) y se incuban con ácido fosfomolibdico¹⁰ al 1% (p/v) (solución C) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- ii) Se enjuagan con agua destilada y se incuban con solución Orange G¹¹ saturada (solución D) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

6 “ENVISION +”: Dako Peroxidase anti ratón Código 4000 (15 ml) o 4001 (110 ml)

7 DakoCytomation

8 DakoCytomation

9 Por ejemplo ImmunonTM, Thermo Shandon

10 Ajax/Univar

11 Gurr, Michrome #411

- iii) La mayor parte de la solución D debe decantarse y debe añadirse colorante verde claro SF al 0,2% (p/v) (solución E) sin enjuagar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- iv) Se colocan los portas (sin enjuagar) en etanol al 100% (x2), se enjuagan en xileno (x2) y se montan en un gel de montaje a base de xileno.
- v) Se dejan secar los portas hasta que el medio de montaje se haya establecido, y a continuación se observan en un microscopio óptico.

Interpretación de la tinción

El método de la tinción combinada da lugar a un color azul/púrpura en el caso de Bd, naranja en la queratina y pre-queratina, y verde en el colágeno y otros tejidos conjuntivos sub-epidérmicos.

Resultado de la tinción		Interpretación
Queratina	Bd	
+	–	Las ranas fue negativa a Bd. La presencia de queratina da confianza en el diagnóstico
+	+	La rana estaba infectada por Bd
–	–	Ambiguo. No puede realizarse una identificación negativa porque falta queratina y puede haber Bd en la piel mudada

4.3.1.3.2. Detección de Bd mediante un ELISA de captura de antígeno

Debido a la mala sensibilidad y especificidad del ELISA de captura de antígeno, no se recomienda para la detección de Bd.

4.3.1.3.3. Microscopía convencional e inmunoelectrónica

Principio de la prueba: la piel puede examinarse mediante microscopía electrónica. La microscopía electrónica convencional (examen de cortes ultrafinos) generará datos sobre la estructura de Bd. La utilización de anticuerpos específicos anti-Bd y de anticuerpos anti-especie marcados con oro permite examinar tanto la ultraestructura como la antigenicidad (Berger *et al.*, 2005).

Microscopía electrónica de transmisión convencional

Se fijan tejidos como describieron Berger *et al.*, 1999. En pocas palabras, se utiliza glutaraldehído tamponado al 2,5% (v/v) (cacodilato o fosfato) para fijar células durante 40 minutos. Tras la fijación primaria, las células se enjuagan en el mismo tampón (3 x 20 minutos), se post-fijan en tetróxido de osmio tamponado al 1% (p/v) (1 hora), se lavan (3 x 5 minutos) en agua doblemente destilada/de ósmosis inversa (RO) (1 hora), se deshidratan en soluciones seriadas de alcohol (70-100%) y se infiltran e incluyen en una resina de epoxi (por ejemplo, Spurr's o Epon).

Marcaje de los cortes con oro

- i) Para marcar con oro cortes de resina ultrafinos (Hyatt, 1991), debe prestarse atención a las pautas de fijación e inclusión. Así, por ejemplo, las células debe fijarse en glutaraldehído al 0,25% (v/v) con paraformaldehído al 2-4%. No se utiliza fijación secundaria y las células se infiltran y fijan en una resina acrílica¹².
- ii) Tras la fijación y la inclusión, se realizan cortes ultrafinos y se transfieren a rejillas bañadas en níquel.
- iii) Se realizan cortes a partir de los bloques adecuados.
- iv) Se bloquean en leche desnatada en polvo al 2% (p/v) en PBS-A (10 minutos).
- v) Se bloquean los aldehídos libres con glicina 0,1 M en PBS-A (20 minutos).
- vi) Se lavan en PBS-A (3 x 1 minuto). Este es un paso opcional que solo se utiliza si hay un exceso de aldehídos libres (un fondo alto puede ser indicativo de ello).
- vii) Si no se están utilizando complejos de proteína A-oro, entonces se bloquea en suero normal de la especie – este suero debe ser homólogo al utilizado para formar complejos con el oro. La dilución recomendada es de aproximadamente 1/40 (10 minutos).

- viii) Se incuban en anticuerpos primarios. Si no se conocen los detalles de la incubación, se llevan a cabo reacciones iniciales con diluciones a 1/100 a 1/2700 (con diluciones a una tercera parte). Se diluyen los anticuerpos en gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (60 minutos, temperatura ambiente).
- ix) Se enjuagan en gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (6 × 3 minutos).
- x) Se incuban en anticuerpo secundario marcado con oro o complejo proteína A-oro o proteína G-oro. La dilución sugerida es 1/40 en PBS-A que contenga albúmina de suero bovino (BSA) al 1%, Tween 20 al 0,1% (v/v) y Triton X al 0,1% (v/v), 60 minutos, a temperatura ambiente.
- xi) Se enjuagan en PBS-A (6 × 3 minutos, a temperatura ambiente).
- xii) Se post-fijan en glutaraldehído al 2,5% (v/v) en PBS-A (5 minutos, a temperatura ambiente).
- xiii) Se enjuagan en agua (RO) (3 × 3 minutos, a temperatura ambiente).
- xiv) Se secan sobre papel de filtro (no importa de qué tipo).
- xv) Se tiñen en acetato de uranilo y acetato de plomo.

Interpretación de los resultados

Las membranas (externas) asociadas a zoosporas y a esporangios estarán marcadas con oro.

4.3.1.4. Técnicas moleculares, PCR TaqMan

Se puede identificar Bd utilizando la PCR TaqMan en tiempo real descrita y validada (Boyle *et al.*, 2004; Hyatt *et al.*, 2007). Esta prueba se puede ejecutar en menos de 24 horas a un coste relativamente bajo.

La RT-PCR TaqMan utiliza un conjunto de cebador/sonda diseñado para acceder a las regiones 5,8, 18 y 28S de ADN, muy conservadas y separadas por espaciadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2), así como por un espaciador intergénico que permite detectar Bd en hisopos, dedos cortados, filtros y discos orales de renacuajos (frescos o desecados). Las secuencias de 5,8, 18 y 28 S del ARNr están muy conservadas, mientras que la región ITS y el espaciador intergénico evolucionan rápidamente. La prueba tiene una sensibilidad de 0,1 equivalentes de zoosporas. También cuantifica el nivel de infección de los animales.

Dado que es una prueba muy sensible, deben tomarse todas las precauciones posibles para prevenir una contaminación (la prueba detectará cuantitativamente una sola zoospora de la muestra problema). Ello implica utilizar material desechable para cada muestra, ponerse guantes, realizar la prueba en cabinas de bioseguridad de Clase II, preparar alícuotas de los reactivos para ser utilizadas al momento, utilizar puntas filtradas, utilizar pipetas específicas y trabajar en una zona "limpia".

4.3.1.4.1 Preparación de los hisopos

Hisopos recomendados: Medical Wire y Equipment Co (Reino Unido) MW 100-100 procedentes de Biomirieux Aust.). No existen otros hisopos validados. Si se utilizan otros, debería exigirse la validación correspondiente.

- i) Se aplican los hisopos a la cara inferior de los pies, las patas y el parche pélvico enérgicamente 2-3 veces.
- ii) Se rompe el palo del hisopo y la punta se introduce en un tubo de 1,5 ml con tapón de rosca (con anillo en O) que contenga 30-40 mg de perlas de zirconio/sílice¹³ de 0,5 mm y 50 µl de PrepMan Ultra¹⁴.
- iii) Se homogeneiza utilizando un triturador de perlas (2 x 45 segundos). Se centrifuga en una microcentrífuga (30 segundos) entre cada homogeneización, para recuperar todo el material del tubo, y de nuevo tras la segunda homogeneización.
- iv) Se colocan los tubos de tapón de rosca en un soporte adecuado y se calientan las muestras (10 minutos a 100°C).
- v) Se enfrían (2 minutos) a temperatura ambiente y se microcentrifugan (3 minutos).
- vi) Se obtiene y guarda la mayor cantidad posible de sobrenadante – normalmente unos 20-40 µl.

¹³ Biospec. Products – Cat. # 11079105z

¹⁴ Applied Biosystems. Cat. # 4318930

Cuando se procesen grandes cantidades de sobrenadante, puede almacenarse en placas de 96 pocillos de fondo en V a filas alternas – puede realizarse una dilución (1/10 en agua) en las filas alternas de la placa. El sobrenadante obtenido puede almacenarse durante una semana a 4°C si la prueba se está realizando en ese momento, de lo contrario se guardará congelado a -20°C. Se sellan las placas para impedir la evaporación. Debe incluirse un control de extracción negativo cada vez para garantizar la ausencia de contaminación (es decir, un hisopo limpio en 50 µl de PrepMan Ultra).

4.3.1.4.2 Preparación de dedos cortados y aparatos bucales

La extracción es la misma que para los hisopos. Se utiliza aproximadamente 1 mg (no más). Se utilizan hojas de bisturí nuevas estériles y se trabaja en una superficie limpia y sin Bd (es decir, que no haya sido utilizada antes, como por ejemplo, una placa de Petri. En el caso de los dedos grandes, se arrancan tiras de piel del dedo utilizando hojas de bisturí limpias, placas de Petri y palillos, y se añade a razón de un 10% (p/v) del volumen de PrepMan Ultra como máximo, para evitar una sobrecarga del sistema de homogeneización; se aumenta el volumen de PrepMan Ultra si es necesario. Se coloca la muestra directamente en el tubo con perlas de zirconio y PrepMan Ultra como se ha descrito para los hisopos.

4.3.1.4.3. Extracción de ADN

Se extrae ADN de dedos cortados, hisopos, filtros o discos orales de renacuajos mediante PrepMan Ultra.

- i) Se añaden 50 µl de PrepMan Ultra (200 µl en el caso de los filtros) a cada muestra, junto con 30-40 mg de perlas de zirconio/sílice de 0,5 mm de diámetro¹⁵.
- ii) Se homogeneiza la muestra durante 45 segundos en un triturador de perlas, como por ejemplo una Mini Beadbeater 8¹⁶.
- iii) Se centrifuga (30 segundos, 13.000 **g** en una microcentrífuga, x2): con esto se recupera todo el material del tubo.
- iv) Se calienta la muestra a 100°C (10 minutos), se enfría (2 minutos) y se centrifuga (13.000 **g**, 3 minutos en una microcentrífuga).
- v) Se toma un 20% de sobrenadante y se utiliza de inmediato; la muestra se puede guardar a -20°C hasta que se utilice.

4.3.1.4.4. Preparación de los estándares

- i) Se siembran placas de cultivo TGHl con 2 ml de cultivo de *B. dendrobatidis* en crecimiento activo y se dejan crecer 4 a 5 días.
- ii) Se recogen las zoosporas inundando la placa dos veces con 2 ml de solución DS.
- iii) Se realiza un recuento de las zoosporas en un hemocitómetro (x4).
- iv) Se sedimentan 10⁷ zoosporas en una microcentrífuga (13.000 **g**, 1 minuto).
- v) Se extrae el sedimento y se vuelve a suspender en 200 µl de PrepMan Ultra.
- vi) Se hierva la suspensión durante 10 minutos, se enfría 2 minutos, se microcentrifuga 3 minutos y se extraen 150 µl de sobrenadante.
- vii) Se diluye ADN en agua destilada (2 × 10⁵ equivalentes de genoma por ml) y se guardan alícuotas a -20°C.

4.3.1.4.5. Controles internos

Tras el proceso de extracción puede haber inhibidores de la prueba TaqMan, como tierra en los hisopos, lo cual dará lugar a falsos negativos. La presencia de inhibidores en las muestras puede detectarse utilizando un control interno. Applied Biosystems® produce un amplicón sintético de un plásmido cuya secuencia no se sabe que tenga lugar en la naturaleza. Está marcado con VIC y limitado en cuanto a cebador para ser utilizado en pruebas múltiples¹⁷: debe incluirse 1 µl de mezcla Exo IPC 10 × y 0,5 µl de Exo IPC DNA 50× en la mezcla madre de 1 pocillo de los tres triplicados. Los valores Ct de la capa VIC deben ser comparables en los controles y en las muestras problema. Si el valor Ct de la muestra problema de la capa VIC es dos a cuatro veces más alto que el control negativo, la muestra debe diluirse a 1/100 o más.

¹⁵ Biospec Products

¹⁶ Biospec Products

¹⁷ ReactivosTaqMan exógenos como control positivo interno (Sonda VIC) # 4308323

4.3.1.4.6. Prueba TaqMan

- i) Se preparan alícuotas de 20 µl de una combinación de la mezcla madre/cebadores/sonda por pocillo.
- ii) Se añaden 5 µl de ADN a una dilución de 1/10 (en agua) en el caso de las muestras preparadas con PrepMan Ultra.
- iii) Para cada prueba, deben utilizarse estándares de 100, 10, 1 y 0,1 zoosporas para construir una curva estándar. Pueden prepararse soluciones madre de estándares y guardarse congeladas para diluirlas cuando sea necesario.
- iv) En cada placa también debe incluirse un control de extracción sin ADN (sin control molde).
- v) Todas las muestras que incluyan estándares debe llevarse a cabo por triplicado.
- vi) Secuencias de los cebadores y de la sonda:

Cebador 1 (Cebador Directo): <i>ITS1-3 Bd</i> : 29 bases 5'-CCT-TGA-TAT-AAT-ACA-GTG-TGC-CAT-ATG-TC-3'
Cebador 2 (Cebador Inverso): <i>5.8S Bd</i> : 22 bases 5'-AGC-CAA-GAG-ATC-CGT-TGT-CAA-A-3'
Sonda: Chytr MGB2 de 15 nucleótidos – marcada con FAM. 5'-6FAM-CGA-GTC-GAA-CAA-AAT-MGBNFQ-3'

En el Laboratorio de Referencia de la OIE, la amplificación se lleva a cabo en un termociclador ABI 7500 rápido o 7900 Sequence Detection System utilizando el siguiente programa: 50°C durante 2 minutos (digestión con uracilo N-deglicosilasa), 1 ciclo; 95°C durante 10 minutos (activación de la ADN termoestable Taq Gold presente en la mezcla madre), 1 ciclo; 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 45 ciclos. Nota: Los cebadores y la sonda se vuelven a suspender según las instrucciones del fabricante.

Condiciones de los ciclos:

50°C	2 minutos
95°C	10 minutos
45 repeticiones de:	
95°C	15 segundos
60°C	1 minuto

4.3.1.4.7 Interpretación de los datos

Tras terminar la prueba, los resultados deben analizarse del siguiente modo:

- i) Se lleva a cabo un OBT (establecimiento de valores que quedan fuera del intervalo, valor basal y valor umbral), fijando el intervalo basal en 3, 15 y el umbral a un Delta R_N de 0,1 (Bd y control interno).
- ii) Si las muestras positivas tienen un valor $C_T < 18$, se reduce el valor basal superior, pasándolo de 15 a, como mínimo, 3 menos que el valor C_T de la muestra.

Se determina si la prueba es válida según los siguientes criterios:

- i) Pocillos control positivos: las curvas de amplificación de la capa de tinción FAM deben tener una forma característica.
- ii) El control positivo exógeno no debe ser más de dos veces superior a su valor determinado en el control negativo. Si el valor C_T es más de dos veces superior, la prueba ha resultado inhibida y la muestra debe diluirse (a 1/100).
- iii) Extracción con control sin molde y con control negativo: se determina la ausencia de contaminación si se observa que no hay curvas de amplificación características en la capa de FAM. La capa de tinción VIC debe tener un valor C_T superior a 39.
- iv) Curva estándar: los estándares a concentraciones de 1/100, 10, 1, 0,1 se encuentran dentro del intervalo especificado del estándar de referencia. La r^2 es superior a 0,98.

Si la prueba se considera válida, los resultados de los pocillos con muestra problema pueden interpretarse utilizando los siguientes criterios:

Resultados positivos

Definición: Presencia de amplicones específicos, indicada por una curva de amplificación característica similar a la del control positivo con un valor de C_T inferior o igual a 39 (en los tres pocillos).

Resultados negativos

Definición: Ausencia de amplicones específicos, indicados por una ausencia de curva de amplificación característica y con un valor C_T superior a 41 (en los tres pocillos).

Resultados indeterminados

Definición: presencia de curvas de amplificación características similares al control positivo pero con un valor C_T de entre 39 y 41 o una cantidad inferior de equivalentes de zoospora solo en uno o dos pocillos). Estos resultados indican que es necesario repetir la prueba.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de la quitridiomycosis se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin; y NA = no es aplicable. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales (véase el Capítulo 1.1.2 de este *Manual Acuático*), su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Huevos/e sperma	Renacuajos	Metamorfos	Adultos		
Signos macroscópicos	na	d	d	d	d	d
Histopatología	na	c	c	c	c	c
Tinción por inmunoperoxidasa	na	c	c	c	b	b
ME de transmisión	na	d	d	d	c	c
Microscopía inmunoelectrónica	na	d	d	d	c	c
Aislamiento	na	na	na	na	na	na
ELISA de captura de antígeno	na	na	na	na	na	na
ELISA de captura de anticuerpo	na	na	na	na	na	na

PCR TaqMan	na	a	a	a	a	a
Análisis de la secuencia del producto de la PCR	na	b	b	b	b	a

La histopatología es muy específica; en animales enfermos también es muy sensible.
ELISA = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; na: no es aplicable.

6. Prueba(s) recomendadas para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de quitridiomycosis

El muestreo y las pruebas TaqMan asociadas descritos en este artículo se pueden utilizar para la vigilancia dirigida a la Bd. En un artículo reciente (Skerratt *et al.*, 2010) puede hallarse un protocolo de estudio revisado por pares que se puede utilizar para el mapeo de Bd en zonas geográficas definidas.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Anfibios aparentemente sanos o moribundos que presenten una conducta aberrante y zonas localizadas de piel mudada. En la piel deben hallarse zoosporas y esporangios que se tiñan con anticuerpos adquiridos en el Laboratorio de Referencia.

7.2. Definición de caso confirmado

Anfibios aparentemente sanos, moribundos o muertos cuya piel contenga Bd según una prueba TaqMan. Nota: Los patólogos con experiencia puede utilizar la histología (cortes teñidos con hematoxilina y eosina) con confianza porque no existe ningún otro hongo que afecte a los anfibios y que tenga una estructura similar (esporangios con tubos de secreción, zoosporas, situados dentro de las células del estrato córneo); no obstante, para que el diagnóstico se considere definitivo, debe haberse realizado mediante una PCR TaqMan.

8. Bibliografía

- BERGER L., SPEARE R., DASZAK P., GREEN D., CUNNINGHAM A., GOGGIN C., SLOCOMBE R., RAGAN M., HYATT A., McDONALD K., HINES H., LIPS K., MARANTELLI G. & PARKES H. (1998). Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9031–9036.
- BERGER L., HYATT A., OLSEN V., HENGSTBERGER S., BOYLE D., MARANTELLI G., HUMPHREYS K. & LONGCORE J. (2002). Production of polyclonal antibodies to *Batrachochytrium dendrobatidis* and their use in an immunoperoxidase test for chytridiomycosis in amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 213–220.
- BERGER L., HYATT A., SPEARE R. & LONGCORE J. (2005a). Life cycle stages of *Batrachochytrium dendrobatidis* Longcore *et al.* 1999, the amphibian chytrid. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 51–63.
- BERGER L., SPEARE R. & SKERRATT L. (2005b). Distribution of *Batrachochytrium dendrobatidis* and pathology in the skin of green tree frogs (*Litoria caerulea*) with severe chytridiomycosis. *Dis. Aquat. Org.*, **68**, 65–70.
- BERGER L., LONGCORE J., SPEARE R., HYATT A. & SKERRATT L.F. (2009a). Fungal Diseases in Amphibians. Pp 2986–3052 in: *Amphibian Biology, Volume 8 Amphibian Decline: Disease, Parasites, Maladies, and Pollution*. Edited by H Heatwole and JW Wilkinson, Surrey Beatty & Sons. NSW.
- BERGER L., SPEARE R., MARANTELLI G. & SKERRATT L. (2009b). A zoospore inhibition technique to evaluate the activity of antifungal compounds against *Batrachochytrium dendrobatidis* and unsuccessful treatment of experimentally infected green tree frogs (*Litoria caerulea*) by fluconazole and bezalkonium chloride. *Res. Vet. Sci.*, **87**, 106–110.
- BERGER L., SPEARE R., PESSIER A., VOYLES J. & SKERRATT L.F. (2010). Treatment of chytridiomycosis requires urgent clinical trials. *Dis. Aquat. Org.*, Special 4: Chytridiomycosis: an emerging disease, p17.

- BLAUSTEIN A., ROMANSIC J.M., SCHEESSELE E.A., HAN B.A., PESSIER A.P. & LONGCORE J.E. (2005). Interspecific variation in susceptibility of frog tadpoles to the pathogenic fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Conservation Biol.*, **19**, 1460–1468.
- BOYLE D.G., BOYLE D.B., OLSEN V., MORGAN J.A.T. & HYATT A.D. (2004). Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 133–139.
- BRIGGS C.J., VREDENBURG V.T., KNAPP R.A. & RACHOWICZ L.J. (2005). Investigating the population-level effects of chytridiomycosis: an emerging infectious disease of amphibians. *Ecology*, **86**, 3149–3159.
- DAVIDSON E.W., PARRIS M., COLLINS J.P., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & BRUNNER J. (2003). Pathogenicity and transmission of chytridiomycosis in tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Copeia*, **3**, 601–607.
- DRURY R.B. & WALLINGTON E. A. (1980). Carleton's Histological Technique, Oxford University Press, 520 p.
- FISHER M.C., GARNER T.W.J. & WALKER S.F. (2009). Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. *Microbiology*, **63**, 291–310.
- FORZAN M.J., GUNN H. & SCOTT P. (2008). Chytridiomycosis in an aquarium collection of frogs, diagnosis, treatment, and control. *J. Zoo. Wildl. Med.*, **39**, 406–411.
- GARNER T.W., GARCIA G., CARROLL B. & FISHER M.C. (2009). Using itraconazole to clear *Batrachochytrium dendrobatidis* infection, and subsequent depigmentation of *Alytes muletensis* tadpoles. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 257–260.
- HANSELMANN R., RODRIQUE A., LAMPO, M., FAJARDO-RAMOS, L., AGUIRRE A., MARM K.A., RODREQUIZ, P. & DASZAK, P. (2004). Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. *Biol. Conserv.* **120**, 115–119.
- HOHREITER D.W. & RIGG D.K. (2001). Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde. *Chemosphere*, **45**, 471–486.
- HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques, *In: Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*, Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.
- HYATT A.D., BOYLE D.G., OLSEN V., BOYLE D.B., BERGER L., OBENDORF D., DALTON A., KRIGER K., HERO M., HINES H., PHILLOTT R., CAMPBELL R., MARANTELLI G., GLEASON F. & COLLING A. (2007). Diagnostic assays and sampling protocols for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 175–192.
- JOHNSON M., BERGER L., PHILLIPS L. & SPEARE R. (2003). *In vitro* evaluation of chemical disinfectants and physical techniques against the amphibian chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 255–260.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2003). Survival of *Batrachochytrium dendrobatidis* in water: quarantine and control implications. *Dis. Aquat. Org.*, **9** (8), 922–925.
- JOHNSON M. & SPEARE R. (2005). Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 181–186.
- LIPS K., BREM F., BRENES F., REEVE J., ALFORD R., VOYLES J., CAREY C., LIVO L., PESSIER A. & COLLINS J. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, (9) 3165–3170.
- LONGCORE J., PESSIER A. & NICHOLS D. (1999). *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia*, **91**, 219–227.
- LONGCORE J.R., LONGCORE J.E., PESSIER A.P. & HALTEMAN W.A. (2007). Chytridiomycosis widespread in anurans of northeastern United States. *J. Wildl. Management*, **71**, 435–444.
- MARANTELLI G., BERGER L., SPEARE R. & KEEGAN L. (2004). Distribution of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin during tadpole development. *Pacific Conservation Biol.*, **10** (1), 173–179.

MARTEL P., VAN ROOIJ G. & VERCAUTEREN K., BAERT L. & VAN WAEYENBERGHE P. (2010). Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology*, Month 2010, Early Online, 1–7.

NICHOLS D.K. & LAMIRANDE E.W. (2009). Successful treatment of chytridiomycosis. *Froglog* 2001; 46.

OLSEN V., HYATT A.D., BOYLE D.G. & MENDEZ D. (2004). Co-localisation of *Batrachochytrium dendrobatidis* and keratin for enhanced diagnosis of chytridiomycosis in frogs. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 85–88.

PARKER J.M., MIKAELIAN I., HAHN N. & DIGGS H.E. (2002). Clinical diagnosis and treatment of epidermal chytridiomycosis in African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp. Med.*, **52**, 265–268.

PESSIER A.P., NICHOLS D.K., LONGCORE J.E. & FULLER M.S. (1999). Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 194–199.

PIOTROWSKI J.S., ANNIS S.L. & LONGCORE J.F. (2004). Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia*, **96** (1), 9–15.

RETALLICK R.W.R., MCCALLUM H. & SPEARE R. (2004). Endemic infection of the amphibian chytrid fungus in a frog community postdecline. *PLoS Biol.*, **2**, 1965–1971.

PHILLOTT A.D., SPEARE R., HINES H.B., MEYER E., SKERRATT L.F., McDONALD K.R., CASHINS S.D., MENDEZ D., BERGER L. (2010). Minimising exposure of amphibians to pathogens during field studies. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 175–185.

ROWLEY J.J.L., CHAN S.K.F., TANG W.S., SPEARE R., SKERRATT L.F., ALFORD R.A., CHEUNG K.S., HO C.Y. & CAMPBELL R. (2007). Survey for the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hong Kong in native amphibians and in the international amphibian trade. *Dis. Aquat. Org.*, **78**, 87–95.

SKERRATT, L.F., BERGER, L., SPEARE, R., CASHINS, S., McDONALD, K., PHILLOTT, A., HINES, H. & KENYON N. (2007). Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *EcoHealth*, **4**, 125–34.

SKERRATT L.F., McDONALD KR, HINES H.B., BERGER L, MENDEZ D., PHILLOTT A.D., CASHINS S.D., MURRAY K. & SPEARE R. (2010). Validation of the Mapping Protocol for *Batrachochytrium dendrobatidis* in Queensland, Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 117–129.

SMITH K., SAX D. & LAFFERTY K. (2006). Evidence for the role of infectious disease in species extinction and endangerment. *Conservation Biol.*, **5**, 1349–1357.

VOYLES J., YOUNG S., BERGER L., CAMPBELL G., VOYLES W.F., DINUDOM A., COOK D., WEBB R., ALFORD R.A., SKERRATT L.F. & RICK SPEARE R. (2009). Pathogenesis of Chytridiomycosis, a Cause of Catastrophic Amphibian Declines. *Science*, **23**, 582–585.

WILLIAMS S. & HERO J. (1998). Rainforest frogs of the Australian wet tropics: guild classification and the ecological similarity of declining species. *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **265**, 597–602.

WOODHAMS D.C. & ALFORD R.A. (2005). The ecology of chytridiomycosis in rainforest stream frog assemblages of tropical Queensland. *Conservation Biol.*, **19**, 1449–1459.

WOODHAMS D.C., ALFORD R.A. & MARANTELLI G. (2003). Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 65–67.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.1.2.

INFECCIÓN POR RANAVIRUS

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la enfermedad causada por ranavirus se considera una infección clínica o subclínica sistémica por un miembro del género *Ranavirus* en las principales familias de anuros y caudados. No incluye el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica, que es el agente etiológico de la necrosis hematopoyética epizoótica (NHE).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Los ranavirus pertenecen al género *Ranavirus*, de la familia Iridoviridae. La especie tipo es el virus de la rana tipo 3 (VR3) (Chinchar *et al.*, 2005). Otras especies son el iridovirus Bohle (IVB), el virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (VNHE), el virus del bagre europeo (VBE), el virus del siluro europeo (VSE) y el ranavirus de Santee-Cooper. En este género hay muchas otras especies provisionales. Desde el reconocimiento de la enfermedad causada por el VNHE en peces de aleta de Australia en 1986, en anfibios se han documentado síndromes necrotizantes sistémicos similares por iridovirus. Se han aislado ranavirus en ranas, salamandras y reptiles sanos o enfermos en América, Europa, Asia y Australia (Chinchar, 2002; Drury *et al.*, 1995; Fijan *et al.*, 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare y Smith, 1992; Wolf *et al.*, 1968; Xia *et al.*, 2009; Zupanovic *et al.*, 1998b). Los ranavirus tienen viriones grandes (150–170 nm) icosaédricos, un genoma de ADN bicatenario de 150-170 kb, y se replican tanto en el núcleo como en el citoplasma, estructurándose en el citoplasma (Chinchar *et al.*, 2005). Poseen antígenos comunes que se pueden detectar por varias técnicas.

<i>Especie</i>	<i>Nº de cepas</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Origen geográfico</i>
<i>Virus Ambystoma tigrinum</i>	2	<i>Virus Ambystoma tigrinum</i> , <i>ranavirus Regina</i>	Norteamérica
<i>Iridovirus Bohle</i>	1	<i>Iridovirus Bohle</i>	Australia
<i>Virus de la rana tipo 3</i>	12	<i>Virus de la rana tipo 3</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la tortuga caja tipo 3</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de Bufo bufo del Reino Unido</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Iridovirus Bufo marinus de Venezuela tipo 1</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de Lucké triturus tipo 1</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la Rana temporaria del Reino Unido</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del Redwood Park</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del espinoso</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del edema del renacuajo</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus del renacuajo tipo 2</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la rana atigrada</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Virus de la tortuga terrestre tipo 5</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
<i>Especies provisionales</i>	3	<i>Iridovirus de la rana esculenta</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica
		<i>Iridovirus Testudo</i>	Europa, Norteamérica y Sudamérica

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Es probable que todos los ranavirus sean extremadamente resistentes a la desecación; el VNHE puede sobrevivir durante meses en el agua, en tejidos de pescado congelados durante más de 2 años

(Langdon, 1989), y en peces muertos congelados durante al menos un año (Whittington *et al.*, 1996). El ranavirus Santee-Cooper permanece viable en tejidos de pescado congelados durante al menos 155 días (Plumb y Zilbert, 1999). Se sabe menos sobre otros ranavirus, pero dada su similitud con el VNHE, se supone que tienen una estabilidad comparable. El virus de la salamandra *Ambystoma tigrinum* (VAT) resulta infeccioso para las salamandras si están en sedimento húmedo, pero no en sedimento de estanques secos, pero no se conoce la duración de la infectividad.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Los ranavirus (como se ejemplifica con el VNHE) son susceptibles al etanol al 70%, a 200 mg litro⁻¹ de hipoclorito de sodio o al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (19). Si antes se deseca, el VNHE puede sobrevivir al calentamiento a 60°C durante 15 minutos (observaciones no publicadas). Se inactivaron 10⁷ unidades formadoras de colonias por ml de un ranavirus de los anfibios en 1 minuto en una solución de 150 mg litro⁻¹ de clorhexidina (Novasan ® al 0,75%), 180 mg litro⁻¹ de hipoclorito de sodio (lejía al 3%) o 200 mg litro⁻¹ de peroximonosulfato de potasio (Virkon ® al 1%) (Bryan *et al.*, 2009).

2.1.4. Ciclo de vida

La vía de infección se desconoce, pero los anfibios son susceptibles experimentalmente tras una exposición por inyección de baño o una exposición tras abrasiones inducidas en el laboratorio (Cunningham *et al.*, 2007; 2008).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Se conocen casos de infecciones naturales por ranavirus en las principales familias de Anura y de Caudata (Carey *et al.* 2003a; 2003b; Cullen y Owens, 2002; Daszak *et al.*, 2003).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Las fases susceptibles de la vida del hospedador son todas las clases de edad, larvas, metamorfos y adultos.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se conocen.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los órganos y tejidos infectados por ranavirus en los anfibios no son siempre los mismos. A continuación se indican tres ejemplos: i) IVB infecta hígado, riñón, bazo, pulmón y otros tejidos parenquimatosos (Cullen y Owens, 2002). ii) VR-3 infecta células epiteliales de los túbulos proximales del riñón, el hígado y el tracto gastrointestinal (Robert *et al.*, 2005). iii) ranavirus del Reino Unido (RVRU) infecta a las células epiteliales, los fibroblastos, los linfocitos, los melanomacrófagos y una pequeña parte de células endoteliales de muchos tejidos, así como los hepatocitos y las células de Kupffer del hígado, la epidermis y la dermis (Cunningham *et al.*, 2008). Se halla VAT en la piel, el bazo, el hígado, las células epiteliales del túbulo renal y los tejidos linfoides y hematopoyéticos de las salamandras.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No se conoce.

2.2.6. Vectores

Los anfibios pueden resultar infectados de la misma forma que los peces, y, por ello, se incluyen aquí los detalles relacionados con el VNHE. Los posibles vectores son redes, barcos y demás equipo, así como anfibios utilizados como cebos por parte de pescadores deportivos. Las aves son posibles vectores mecánicos, puesto que los ranavirus pueden ser vehiculados en el intestino, en las plumas, en las patas y en el pico. Es importante recordar que los ranavirus probablemente resulten inactivados a las temperaturas corporales habituales de las aves (40-44°C). No obstante, es posible que los ranavirus (como se ha observado en el VNHE) puedan propagarse por regurgitación de material ingerido en cuestión de pocas horas tras la ingesta (Whittington *et al.*, 1996). Además, se han observado casos de infección en anfibios por la exposición al sedimento de lugares donde se han producido muertes por ranavirus.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se conocen.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Pueden producirse infecciones por ranavirus por contacto entre animales, y por la ingesta de animales infectados, moribundos o muertos (por ejemplo, Cullen y Owens, 2002; Picco y Collins, 2008). Estos virus también se pueden transmitir entre sistemas fluviales y embalses muy apartados. Se considera que la transmisión tiene lugar por medios distintos del agua (véase arriba); algunos de los mecanismos son el traslado de peces o cebos vivos por parte de pescadores deportivos (por ejemplo, Pico *et al.*, 2007).

2.3.2. Prevalencia

Se han notificado infecciones por ranavirus en cinco continentes, incluida Asia (Gray *et al.*, 2009); su prevalencia, a pesar de aplicar una serovigilancia amplia y exhaustiva y sistemas de detección del antígeno, no se conoce.

2.3.3. Distribución geográfica

Se han recuperado ranavirus de ranas de salvajes o de piscifactoría, sanas y enfermas, en América, Europa continental, el Reino Unido y Asia (Ariel *et al.*, 2009; Chinchar, 2002; Cunningham *et al.*, 1996; Drury *et al.*, 1995; Fijan *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 1968; Zhan *et al.*, 2001; Zupanovic *et al.*, 1998b) así como en salamandras manchadas de vida libre de la especie *Ambystoma maculatum* en Norteamérica (Docherty *et al.*, 2003; Jancovich *et al.*, 2003). El iridovirus Bohle (IVB), que es claramente distinto del VR-3, se aisló originalmente en renacuajos enfermos de la especie *Limnodynastes ornatus* en el norte de Queensland, Australia (Speare y Smith, 1992). Desde entonces no se ha vuelto a aislar, aunque existen indicios serológicos de infección por ranavirus en sapos gigantes (*Bufo bufo*) en esa región (Whittington *et al.*, 1996). Otra especie de ranavirus claramente distinta, el virus de la salamandra *Ambystoma tigrinum* (VAT), es responsable de muertes en la salamandra atigrada *A. tigrinum* (Jancovich *et al.*, 2005). También se han recuperado virus estrechamente relacionados con el VR-3 de reptiles. Se aisló el iridovirus Wamena (IVW) en Australia en pitones arborícolas verdes, *Chondropython viridis*, enfermas extraídas por contrabando de Papúa Occidental (Irian Jaya) mientras que se recuperó el iridovirus de *Testudo hermanni* (IVTH) (TV-CH8) de tortugas de Hermann (*Testudo hermanni*) de Europa. Tanto el IVW como el IVTH presentaron más de un 97% de homología de las secuencias de nucleótidos con la del VR-3 en las regiones de la proteína principal de la cápsida (MCP) que se examinaron (Hyatt *et al.*, 2002; Marshang *et al.*, 1999).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La mortalidad y la morbilidad varían en función de la especie. Las infecciones de laboratorio y los datos de campo muestran que la mortalidad pueden oscilar entre baja (incluso del 0%) y del 100% de los animales infectados de un grupo experimental según la especie, el virus y la edad y estado sanitario del hospedador tras periodos de infección cortos (Harp y Petranka, 2006; Hyatt *et al.*, 1998; Pearman *et al.*, 2004). Sin embargo, otras pruebas en las que se utilizaron distintas especies hospedadoras y ranavirus dieron resultados variables (Brunner *et al.*, 2004; 2007; Cunningham *et al.*, 2007).

2.3.5. Factores ambientales

Las epizootias naturales por ranavirus en los anfibios parecen ser similares a las de piscifactoría (como las del VNHE). Las epizootias parecen ser estacionales y pueden estar relacionadas con un mal manejo (poblaciones en cautividad) y con la sobrepoblación (en la naturaleza o en cautividad). Se considera que en algunos anfibios, como las salamandras (bibliografía) la enfermedad está relacionada con la aparición anual de grandes cantidades de animales jóvenes no inmunes y su posterior exposición al virus en aguas poco profundas (Brunner *et al.*, 2004; 2007; Green *et al.*, 2002; Greer y Collins, 2008; Greer *et al.*, 2008; Jancovich *et al.*, 1997; 2001; Rojas *et al.*, 2005).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna disponible.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno disponible.

2.4.3. Inmunoestimulación

No disponible.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia.

No se ha probado.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se ha probado.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se han probado.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se han probado.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

No se han probado.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Se ha validado un método sencillo para la preparación de tejidos para el cultivo celular y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) de peces (Whittington y Steiner, 1993; Whittington *et al.*, 1999).

Se bañan anfibios grandes durante 30 segundos en etanol al 70%; se bañan anfibios pequeños durante 5 segundos en etanol al 70% y a continuación se enjuagan en agua estéril. Se secan de forma aséptica en una cabina de bioseguridad de Clase II.

Anfibios grandes: (>60 mm de longitud) se extrae 0,1 g de hígado, riñón, bazo ($\pm$ otros órganos en estuaciones específicas) y se introducen en tubos estériles de 1,5 ml. Existen tubos especiales para ser utilizados con morteros para triturar tejidos (véase abajo), pero también pueden servir los tubos estándar de 1,5 ml. En algunas situaciones, puede juntarse el hígado, el riñón y el bazo en un solo tubo (véase el apartado 3.3).

Anfibios medianos (30–60 mm de longitud): se introducen todas las vísceras en el tubo.

Anfibios pequeños (<30 mm de longitud): se elimina la cabeza y la cola y se introduce el resto del animal en el tubo.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para el cultivo celular y el ELISA, se congelan los tubos con tejidos a temperaturas de entre -20°C y -80°C hasta que sean necesarios.

Para el examen mediante microscopía óptica, se fijan los tejidos en formalina tamponada neutra al 10%.

3.3. Combinación de varias muestras

No se ha evaluado cuál es el efecto de combinar varios tejidos de distintos animales en la sensibilidad de las pruebas diagnósticas. No obstante, a menudo se combinan tejidos para el aislamiento de virus en lotes de 5 o 10 animales por prueba.

3.4. Órganos o tejidos de elección

Hígado, riñón, bazo, pulmón, piel.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos que no son adecuados son las gónadas, los líquidos gonadales, el esperma y los huevos, puesto que no se ha observado infección del tracto reproductor ni de que los reproductores intervengan en los ciclos de infección.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Existen dos síndromes de las ranas relacionados con la infección por ranavirus: un síndrome ulceroso crónico y un síndrome hemorrágico agudo (Cunningham *et al.*, 1996). Las salamandras infectadas por el virus *Ambystoma tigrinum* desarrollan dermatitis y enteritis ulcerosas. Las larvas afectadas tienen pequeñas hemorragias multifocales que afectan al tejido subcutáneo de la superficie plantar de los pies, la zona inguinal y la zona de la cloaca, con edema ventral, y la piel pueden contener focos claros (Bollinger *et al.*, 1999; Docherty *et al.*, 2003).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Las alteraciones en el campo y del comportamiento difieren entre especies, entre estadios de vida y según la gravedad de la enfermedad. Las alteraciones incluyen lordosis, natación errática, letargia y pérdida del equilibrio (Gray *et al.*, 2009).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Es posible que no haya lesiones macroscópicas ni inespecíficas. En las ranas existen dos síndromes relacionados con la infección por ranavirus: el síndrome ulceroso y el síndrome hemorrágico (Cunningham *et al.*, 1996). En las salamandras infectadas por el virus *Ambystoma tigrinum* puede haber dermatitis ulcerosa, focos claros en la piel, pequeñas hemorragias multifocales que afectan al tejido subcutáneo de la superficie plantar de los pies, la zona inguinal, la cloaca, la superficie subserosa del intestino, y el hígado puede estar pálido e hinchado; puede haber edema ventral (Bollinger *et al.*, 1999; Docherty *et al.*, 2003).

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

El IVB y el VR3 causan hemorragia y necrosis multifocales en varios órganos (Cullen y Owens, 2002; Robert *et al.*, 2005). Las salamandras infectadas por el virus *Ambystoma tigrinum* desarrollan necrosis en muchos tejidos, incluidos el bazo, el hígado, las células epiteliales de los túbulos renales y tejidos linfoides y hematopoyéticos (Bollinger *et al.*, 1999). Puede haber cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos anofílicos en células de varios órganos junto con células únicas o zonas de tamaño variable de necrosis focal (Bollinger *et al.*, 1999; Docherty *et al.*, 2003). En la piel puede haber focos de espongirosis y degeneración por abombamiento, erosión y ulceración e hiperplasia de células epiteliales epidérmicas que pueden tener cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Bollinger *et al.*, 1999).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No es aplicable.

4.2.5. Frotis

No se han probado.

4.2.6. Cortes fijados

Consúltese el apartado 4.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Los tejidos afectados (como el riñón, el hígado o el bazo) contienen células que presentan necrosis. Las células contienen inclusiones citoplasmáticas llamativas que son zonas enrarecidas del citoplasma en las que los virus se estructuran. Dentro del citoplasma, se observan agregados (matrices paracristalinas) de virus icosaédricos grandes (los ranavirus pueden variar mucho de tamaño, midiendo entre 150 nm y más de 170 nm) sin envoltura; también se observan virus aislados. Salen virus enteros (con los centros electrodensos incluidos) de las células infectadas a través de la membrana plasmática por gemación. Los núcleos de las células infectadas a menudo están situados en la periferia y están deformados.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

Microscopía óptica: pueden utilizarse métodos sistemáticos para la fijación de tejidos en formalina tamponada neutra al 10%, inclusión en parafina, preparación de cortes de 10 µm y tinción con H/E para demostrar la necrosis tisular y la presencia de cuerpos basófilos de inclusión intracitoplasmática. Estos cuerpos de inclusión indican, aunque no confirman, los ranavirus. También pueden teñirse cortes incluidos en parafina y fijados con formalina utilizando un método de inmunoperoxidasa (véase abajo) para identificar el antígeno ranavirus asociado a las lesiones necróticas.

Microscopía electrónica: con el fin de demostrar la necrosis tisular, la presencia de virus y la presencia de cuerpos de inclusión víricos pueden utilizarse métodos sistemáticos de corte ultrafino para preparar tejidos y cultivos celulares (Eaton *et al.*, 1991). Pueden utilizarse tejidos y células fijados con una pauta alternativa de fijación y de inclusión para la detección de antígeno (Hyatt, 1991).

Microscopía electrónica de contraste negativo: para detectar virus pueden utilizarse sobrenadantes de tejidos homogeneizados mediante homogeneizador Dounce (al 10% [p/v]) y cultivos celulares. Los ranavirus tienen un aspecto definido. Tienen un diámetro variable (150-180 nm) y una envoltura limitante derivada de la membrana (membrana plasmática) que envuelve una cápsida de simetría sesgada. Debajo de la cápsida hay una membrana *de novo* que envuelve por sí misma un centro que contiene ADN bicatenario (ds) y proteínas menores. Estas preparaciones también se pueden utilizar para confirmar la antigenicidad del ranavirus (Eaton *et al.*, 1991).

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis

No son aplicables.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.3.1.1 sobre métodos microscópicos.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Preparación de tejidos de anfibio para el aislamiento de virus y para ELISA

Se ha descrito un método sencillo de preparación de tejidos para el cultivo celular y para ELISA (Whittington y Steiner, 1993; Whittington *et al.*, 1999) (véase la obtención de muestras en el apartado 3.1).

- i) Se congelan los tubos con los tejidos a -80°C hasta que sean necesarios.
- ii) Se añaden 0,5 ml de medio homogeneizador (medio mínimo esencial Eagle, con sales de Earle con glutamina [MEM] con 200 Unidades Internacionales [UI] ml⁻¹ penicilina, 200 µg ml⁻¹ de estreptomycin y 4 µg ml⁻¹ de amfotericina B) a cada tubo. Se tritura el tejido con una mano de mortero estéril hasta obtener una masa fina.

- iii) Se añaden otros 0,5 ml de medio homogeneizador a cada tubo y se mezclan con una mano de mortero.
- iv) Se añaden tres perlas de vidrio estéril a cada tubo (de 3 mm de diámetro) y se tapan los tubos.
- v) Se somete la suspensión al vórtex enérgicamente durante 20-30 segundos y se guarda a 4°C durante 2 horas.
- vi) Se somete la suspensión a vórtex de nuevo como antes y se centrifuga durante 10 minutos a 2500 *g* en una microcentrífuga de mesa.
- vii) Se transfiere el sobrenadante, ahora denominado homogenado de tejido clarificado, a un tubo nuevo estéril. Los homogenados se pueden congelar a -80°C hasta que sean necesarios para el aislamiento del virus y para el ELISA.

Cultivo celular/medios artificiales

El cultivo celular es la prueba de referencia pero es cara y lenta. Los ranavirus crecen bien en muchas líneas celulares de peces, como BF-2 (alevines de *Lepomis macrochirus*; ATCC CCL 91), FHM (*Pimephales promelas*; ATCC CCL 42), EPC (epitelioma papuloso de carpa [Fijan *et al.*, 1983]), y CHSE-214 (línea celular de embrión de salmón real; ATCC CRL 1681) a temperaturas de entre 15°C y 22°C (Crane *et al.*, 2005), pero el Laboratorio de Referencia prefiere BF-2, que utiliza una temperatura de 22°C tanto antes como después de la inoculación con virus. El procedimiento para la BF-2 se indica a continuación. En el apartado sobre tinción con inmunoperoxidasa (véase el apartado 4.3.1.2.2) se indica un procedimiento para las células CHSE-214. El virus *Ambystoma tigrinum* produce un ECP igual que el del VNHE en FHM, RTG y células de lengua de rana mugidora a 25°C (Docherty *et al.*, 2003). Otros han utilizado fibroblastos de embrión de rana a 27°C o células FHM para aislar o propagar las cepas del Reino Unido de VR-3 (Cunningham *et al.*, 1996, 2007).

La identidad de los virus en el cultivo celular se determina mediante inmunotinción, ELISA, microscopía inmunoelectrónica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos.

Muestras: homogenados de tejido.

Procedimiento técnico para el cultivo celular: las células se cultivan (en frascos, tubos o placas multi-pocillo) con medio de crecimiento (MEM + suero fetal bovino [FBS] al 10% con 100 UI ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin y 2 µg ml⁻¹ de amfotericina B). Las células se incuban hasta que casi confluyen a 22°C, lo cual puede tardar hasta 4 días, en función de la rapidez de siembra. El medio se cambia por un medio de mantenimiento (MEM con FBS al 2% y 100 UI ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin y 2 µg ml⁻¹ de amfotericina B) el día de la inoculación. Se prepara una dilución a 1/10 utilizando medio homogeneizador de homogenados simples o combinados. Cada cultivo se inocula con 100 µl de muestra por ml de medio de cultivo. Esto representa una dilución a 1/100 de un homogenado de tejido de 0,1 mg/ml. Un cultivo se inocula con homogenado no diluido, y dos con homogenado diluido a 1/10. No se utiliza paso de adsorción. Como alternativa, pueden inocularse directamente dos de tres cultivos con 10 µl de homogenado no diluido por ml de medio de cultivo. Obsérvese que el uso de un gran inóculo no diluido a menudo cursa con una alta tasa de toxicidad o contaminación celular. Los cultivos se incuban a 22°C en una incubadora durante 6 días. Los cultivos se leen el día 3 y el día 6, y se pasan al menos una vez para detectar muestras con niveles bajos de virus. El día 6, los cultivos primarios (P1) se congelan durante toda la noche a -20°C, se descongelan, se mezclan con cuidado y a continuación se inocula el sobrenadante del cultivo en células frescas como antes (P2), es decir 100 µl de sobrenadante de P1 por ml de medio de cultivo. Los sobrenadantes P1 restantes se transfieren a tubos estériles de 5 ml y se guardan a 4°C para ser analizados mediante ELISA o PCR u otro medio para confirmar que la causa del efecto citopático (ECP) es el VNHE. P2 se incuba como antes, y se lleva a cabo un tercer pase si es necesario.

Interpretación de los resultados

El ECP está bien desarrollado y consiste en una lisis focal rodeada de células granulares redondas. Esta alteración se extiende rápidamente afectando a toda la monocapa, que se desprende y se desintegra.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Es importante destacar que los anticuerpos utilizados en todos los métodos relacionados (inmunoperoxidasa, ELISA de captura de antígeno y microscopía inmunoelectrónica) reaccionan de forma cruzada con todos los ranavirus conocidos (Hyatt *et al.*, 2000).

4.3.1.2.2.1. Detección de ranavirus utilizando tinción por inmunoperoxidasa de cultivos celulares infectados

Principio de la prueba: los ranavirus se replican en cultivos celulares. Al añadir un detergente suave se permeabilizan las células, lo cual permite que un anticuerpo de conejo purificado por afinidad se una a proteínas víricas intracelulares. Se detecta el ranavirus mediante un anticuerpo biotinilado anti-especie y un conjugado estreptavidina-peroxidasa. La adición de un sustrato da lugar a una tinción de color “rojo ladrillo” en zonas marcadas con anticuerpos.

Muestras: homogenados de tejido.

Características de funcionamiento: cuando se lleva a cabo como se ha descrito en este protocolo, la tinción es llamativa y específica. No obstante, la prueba no se ha validado respecto a sensibilidad y reproducibilidad.

Preparación de células: el procedimiento descrito abajo es para las células CHSE-214. También se pueden utilizar otras líneas celulares recomendadas.

- i) Se siembran placas de 24 pocillos de la línea CHSE-214 el día antes de utilizarlas con 250.000 células/pocillo (o 4 millones de células en 40 ml de medio de crecimiento por placa) en 1,5 ml de medio de crecimiento (MEM de Earle con aminoácidos no esenciales [EMEM], FBS al 10%, N-2-hidroxietilpiperazina 10 mM, N-2-etanosulfónico [HEPES], glutamina 2 mM, 100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomycin) y se incuban en un 5% de CO₂ a 22°C durante toda la noche. (Nota: los cultivos deben ser casi confluentes y tener células sanas en división antes de ser utilizados).
- ii) Se desecha el medio, se inocula cada pocillo con 150 µl de una suspensión al 10% de tejido triturado (por ejemplo, de hígado, riñón o bazo), se incuba durante 1 hora (22°C) y a continuación se añaden 1,5 ml de medio fresco de mantenimiento (igual que para el medio de crecimiento excepto por el FBS al 2%) y se devuelve a la incubadora (22°C).
- iii) Se observa si los cultivos presentan ECP. Si no aparece ECP durante los primeros 10 días, se pasan los cultivos por células CHSE frescas recogiendo las células y el medio y añadiendo 150 µl a las células de la placa nueva; obsérvese que las células no se congelan-descongelan. No hay necesidad de desechar el medio existente, solo de devolver la placa nueva a la incubadora (22°C). Se observa de nuevo a diario si aparece ECP.
- iv) Se fijan las células (se añaden 50 µl de una solución de formalina al 20% a cada pocillo (en el caso de los cultivos en placas de 96 pocillos con 200 µl de medio de cultivo/pocillo) o bien 400 µl (en el caso de los cultivos en placas de 24 pocillos con 1,6 ml de medio de cultivo/pocillo), sin desechar el medio de cultivo cuando se observe ECP por primera vez. Tras la incubación (22°C) durante 1 hora a temperatura ambiente (RT), se desecha la mezcla de medio/formalina y los pocillos se enjuagan dos veces con PBS-A (solución salina tamponada con fosfato, sin Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) para eliminar la formalina. Se añade más PBS-A si las placas van a guardarse a 4°C.

Protocolo

- i) Se diluye anticuerpo anti-VNHE y suero normal a una concentración de trabajo como se describe abajo (protocolo de fijación para inmunocitoquímica) para el agente en cuestión en solución de leche desnatada (SM) al 1% (PBS-A (SM)) hasta el volumen necesario para la prueba.
- ii) Se retira el PBS-A de los pocillos (con cultivos celulares fijados) y se lavan los pocillos dos veces con PBS/Tween 20 al 0,05% (v/v). Se añaden 50 µl de soluciones de anticuerpos primarios a cada pocillo de una placa de 96 pocillos o 200 µl a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Se incuba en un agitador de placa a 100-200 rpm a RT (22-24°C) durante 15-30 minutos o sin agitación a 37°C durante 1 hora.
- iii) Se diluye suero biotinilado anti-especie (anticuerpo secundario) en solución de SM al 0,1% como se describe en el protocolo de fijación (abajo) para el agente en cuestión hasta el volumen necesario para la prueba.
- iv) Se elimina la solución de anticuerpo primario y se lavan los pocillos tres veces con PBST. Se añade anticuerpo secundario a todos los pocillos. Se incuba en un agitador de placa a 100-200 rpm a RT durante 15-30 minutos o sin agitación a 37°C durante 1 hora.
- v) Se diluye el conjugado de estreptavidina-peroxidasa en solución de SM al 0,1% para el agente en cuestión hasta el volumen necesario para la prueba.

- vi) Se elimina la solución de anticuerpo secundario y se lavan los pocillos tres veces con PBST. Se añade conjugado a cada pocillo. Se incuba en un agitador de placa a 100-200 rpm a RT durante 15-30 minutos o sin agitación a 37°C durante 1 hora.
- vii) Se prepara sustrato madre de solución de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC): se disuelve un comprimido de AEC (20 mg) en 2,5 ml de dimetilformamida.
- viii) Se elimina el conjugado de los pocillos. Se lavan (tres veces) con PBST.
- ix) Se diluye solución madre disuelta de AEC en 47,5 ml de tampón acetato (4,1 ml de acetato de sodio anhidro en 1 litro de agua desionizada; el pH se ajusta a 5,0 con ácido acético glacial). Justo antes de utilizarla, se añaden 25 µl de peróxido de hidrógeno al 30% a la solución de AEC y a continuación se añade a cada pocillo. Se incuba a RT durante 20 minutos.
- x) Se retira la solución de sustrato y se lavan los pocillos dos veces con agua desionizada para detener la reacción.
- xi) Para visualizar todas las células se aplica una tinción de contraste con hematoxilina de Mayer (50 µl/pocillo o 200 µl/pocillo) durante 1 minuto y se enjuaga con agua desionizada.
- xii) Se añaden 50 µl de agua de grifo de Scott y se enjuaga con agua desionizada y se seca al aire.

Interpretación de los resultados

Reacción positiva: la tinción celular tipo granular, focal y de color rojo ladrillo indica la presencia de virus identificado por el anticuerpo diagnóstico.

Reacción negativa: ausencia de tinción roja – todas las células deben teñirse de color azul claro debido a la tinción de contraste.

Tinción de fondo: puede producirse una tinción no granular, no focal, más generalizada, pálida y rosácea por todo el cultivo. Esta tinción de fondo podría estar causada por varias razones, como una reacción de anticuerpos inespecífica frente a componentes no víricos, un lavado ineficaz, o la caducidad de otros reactivos.

Reactivos para las pruebas de inmunocitoquímica

Solución salina de formaldehído al 20% (PBS-A)

Formalina (formaldehído al 36–38%)	54 ml
Agua destilada	36 ml
10 × PBS-A	10 ml

10 × PBS-A

Para preparar 1 litro de PBS-A 10 × se utiliza:

NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KCl	2,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Agua destilada	1,0 litro

NOTA: algunas sales se suministran con grupos adicionales de agua. Si se utilizan estos reactivos, se ajustan las masas para asegurarse de que se añade la masa adecuada de sal; por ejemplo, para el Na₂HPO₄·2H₂O se añaden 15 g en lugar de 11,5 g ($156 \text{ mw}/120 \text{ mw} \times 11,5 \text{ g} = 14,95 \text{ g}$) para eliminar el efecto de las moléculas de agua.

4.3.1.2.2.2 Detección de ranavirus utilizando ELISA de captura de antígeno

Se ha validado un ELISA de captura de antígeno para detectar el VNHE en cultivos celulares y directamente en homogenados de tejido de pescado. La misma prueba se puede aplicar a tejidos de anfibios. La sensibilidad analítica es de 10^3 a 10^4 DICT₅₀ ml⁻¹. La especificidad se acerca al 100% y la sensibilidad de la detección directa en tejidos de pescado es del 60% respecto al método de referencia, que es el aislamiento del virus en células BF-2 (Drury *et al.*, 1995; Marsh *et al.*, 2002; and datos no publicados). El ELISA es útil tanto para el diagnóstico como para la certificación. No pueden utilizarse pruebas de neutralización para identificar el VNHE porque tras la inmunización de mamíferos o peces no se producen anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos monoclonales de ratón producidos contra el VNHE se dirigen contra epítomos de la proteína principal de la cápsida (MCP) y no son neutralizantes (datos no publicados). Se han desarrollado

anticuerpos de conejo anti-VNHE par ser utilizados en el ELISA de captura de antígeno, tinción por inmunoperoxidasa y microscopía inmunoelectrónica (Hengstberger *et al.*, 1993; Hyatt *et al.*, 1991; Reddacliff y Whittington, 1996). En el Laboratorio de Referencia pueden adquirirse los protocolos y reactivos correspondientes.

Muestras: muestras de homogenado tisular preparadas utilizando un protocolo validado (véase abajo) y cultivos celulares.

Principio de la prueba: se capturan partículas de VNHE de la muestra mediante anticuerpo de conejo purificado por afinidad que se aplica recubriendo la placa. Se detecta el VNHE mediante un segundo anticuerpo y conjugado marcado con peroxidasa utilizando el cromógeno ABTS ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfónico. La enzima se inactiva tras 20 minutos y la densidad óptica (OD) resultante se compara con los estándares.

Componentes de la prueba y preparación de los reactivos

- i) Se precisan placas de microtitulación de fondo plano.
- ii) La inmunoglobulina de conejo anti-VNHE purificada por afinidad y el antisuero de oveja anti-VNHE se suministran liofilizados. Se reconstituyen utilizando 1 ml de agua purificada y se deja el vial en reposo a RT durante 2 minutos. Se mezcla el vial con mucho cuidado. Cuando se guardan a -20°C, estos reactivos son estables durante al menos 4 años. Para el uso sistemático en el ELISA, se recomienda preparar soluciones de trabajo de ambos anticuerpos a una dilución de 1/10 en una solución salina de tris, glicerol y mertiolato (fórmula al final de este apartado). A -20°C, estas son estables al menos durante 5 años y no solidifican a esta temperatura.
- iii) El conjugado anti-inmunoglobulina de oveja marcado con peroxidasa (reactivo comercial, KPL #14-23-06; 0,5 mg) se suministra en forma de polvo liofilizado. En este reactivo se ha observado una considerable constancia en la actividad entre distintos lotes a lo largo de un periodo de 15 años. Este producto se debe reconstituir en agua de glicerol al 50% estéril, distribuirse en alícuotas de 150 µl y guardarse a -20°C en forma de solución madre no diluida. Se prepara una solución de trabajo añadiendo 900 µl de TSGM a 100 µl de solución madre no diluida. La solución de trabajo también se guarda a -20°C y es estable durante al menos 1 año. Deben titularse nuevos lotes de este conjugado contra un lote más antiguo aplicando protocolos estándar.
- iv) El antígeno control de VNHE, inactivado por calor, se suministra en forma de polvo liofilizado. Se reconstituye en 1 ml de agua estéril y se guarda en pequeñas alícuotas a -20°C. Se preparan diluciones utilizando PBSTG (PBS + Tween + gelatina) el mismo día que se lleva a cabo la prueba. Las diluciones de antígeno VNHE control (A, B, D y F) cubren el intervalo de la señal de respuesta de la prueba y permiten realizar un procedimiento de normalización.

Equipo

Se recomienda un lavador automático de placas, aunque las placas también pueden lavarse a mano. Esta prueba es sensible a las condiciones de lavado de las placas. Si la OD de los controles es inesperadamente baja, y el conjugado y los demás reactivos no están caducados, el lavador de placas debe ajustarse de modo que se minimice la presión de lavado durante el llenado de los pocillos y la aspiración de los mismos.

Se recomienda utilizar un lector automático de placas, aunque las placas también pueden leerse a simple vista.

Para preparar las diluciones de todos los reactivos y para cargar reactivos en los pocillos de las placas de microtitulación deben utilizarse pipetas de precisión calibradas (como las Gilson).

Protocolo

- i) Se recubre una placa de ELISA de 96 pocillos (100 µl pocillo⁻¹) con anticuerpos de conejo purificados por afinidad anti-VNHE diluidos a 1/12.800 en tampón borato de recubrimiento. Se incuba durante toda la noche a 4°C.
- ii) Se lava la placa cinco veces con tampón de lavado (agua Milli-Q (MQ) purificada más Tween 20 al 0,05%). Es importante recordar que en este y otros pasos también puede utilizarse agua destilada y desionizada.
- iii) Se prepara una solución de bloqueo: se calientan las soluciones en un microondas o baño de agua para disolver la gelatina, a continuación se enfrían hasta que alcancen la RT.

- iv) Se bloquean los lugares de unión restantes utilizando solución de bloqueo (100 µl pocillo⁻¹) (gelatina al 1% [p/v] en diluyente PBSTG [PBS, Tween 20 al 0,05% (v/v), gelatina al 0,1% (p/v)]). Se incuba a RT durante 30 minutos.
- v) Se lava la placa cinco veces como antes.
- vi) Se trabaja en una cabina de bioseguridad de Clase II. Se diluye el antígeno control (véase abajo) en PBSTG y se añade a la esquina inferior derecha de la placa. Se añaden muestras de homogenado de tejido o de sobrenadante de cultivo y antígenos control a razón de 100 µl/pocillo. Todas las muestras y controles se añaden a pocillos por duplicado. Se incuba durante 90 minutos a RT.

Los antígenos control son diluciones de un sobrenadante de cultivo celular de VNHE 86/8774 inactivado por calor. Es esperable que los controles den las siguientes OD, aunque habrá cierta variación entre laboratorios y, por tanto, deberá permitirse una variación de $\pm 10\%$:

Control	Dilución en PBS*	OD (405 nm)*
A	1/5	>2,0
B	1/40	1,90
D	1/200	0,68
F	1/3000	0,16

* Estas diluciones y valores de OD son los determinados por el Laboratorio de Referencia de la OIE para el VNHE y variarán en función del lote de antígeno control. Los valores anteriores corresponden al lote 86/8774-4-5-01. En este ELISA, el valor de corte que determina qué muestras de homogenado de tejido clarificado de perca y de trucha arcoiris son positivas y cuáles son negativas se estima por el valor de OD de la D control en cada placa.

- vii) Se lava la placa a mano para evitar contaminar el lavador de placas. Se trabaja en una cabina de Clase II. Se aspiran los pocillos mediante una pipeta multicanal. Se enjuaga la placa dos veces.
- viii) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas, como antes.
- ix) Se añade el segundo anticuerpo de oveja anti-VNHE diluido a 1/32.000 en PBSTG (100 µl pocillo⁻¹). Se incuba 90 minutos a RT.
- x) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas.
- xi) Se añade el conjugado diluido a 1/1500 en PBSTG (100 µl pocillo⁻¹). Se incuba 90 minutos a RT.
- xii) Se lava la placa cinco veces en el lavador de placas.
- xiii) Se añade el sustrato ABTS (22 ml de ABTS + 10 µl de H₂O₂) (100 µl pocillo⁻¹) y se coloca la placa en el agitador. Se cronometra este paso desde el momento en que se añade el sustrato a los primeros pocillos de la placa 1. Se incuba 20 minutos.
- xiv) Se añade de inmediato solución de parada de ABTS (50 µl pocillo⁻¹), se agita la placa brevemente y se lee la OD a 405 nm. Se calcula la OD media del ELISA de pocillos duplicados. Se calcula el coeficiente de variación de los duplicados: las muestras con un CV >15% debe volver a analizarse si la OD media queda cerca del valor de corte entre positivo y negativo.

Normalización de datos y control de calidad del límite de decisión

Si se desea normalizar los datos obtenidos de distintas placas y a lo largo del tiempo, o para llevar a cabo un control de calidad del límite de decisión, puede aplicarse el siguiente procedimiento. Se realizan análisis de antígenos control en ELISA al menos en cinco ocasiones a lo largo de un periodo de 3 semanas (un total de 20 placas de ELISA independientes). Se calcula la OD media para cada antígeno control. A continuación, para cada placa que se vaya utilizando, se calcula un factor de corrección de la placa (PCF) del siguiente modo:

$$PCF = (OD \text{ media del control A} (OD \text{ real} + OD \text{ media del control B} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control D} / OD \text{ real} + OD \text{ media del control F} / OD \text{ real}) / 4.$$
 Se multiplica la OD media real de cada muestra por el PCF de la placa y se notifican estos valores.

Se permite una variación del PCF de entre 0,8 y 1,2, lo cual se aproxima a un coeficiente de variación del 10%. Los valores que queden fuera de este intervalo sugieren que la placa tiene que volver a analizarse. Los gráficos del PCF que pueden ir registrándose a lo largo del tiempo constituyen un medio útil para el seguimiento de la estabilidad de los reactivos, de las variaciones

en el procedimiento y de posibles errores del operario. Este método de control de calidad se ha validado para el ELISA de captura de antígeno.

Tampones y otros reactivos

Tampón borato de recubrimiento

Ácido bórico	6,18 g
Tetraborato de disodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	9,54 g
NaCl	4,38 g
Agua MQ hasta	1 litro
Se esteriliza en autoclave	

Solución salina tamponada con fosfato 10 ×

NaCl	80,00 g
KCl	2,00 g
Na_2HPO_4	11,50 g
KH_2PO_4	2,00 g
Agua MQ hasta	900 ml
Se ajusta el pH a 7,2 con HCl o NaOH; se prepara hasta 1 litro	
Se esteriliza en autoclave	

Para obtener la concentración de trabajo, se diluye a 1/10 y se vuelve a comprobar el pH. Para guardar polvo en botes, se prepara el doble de la cantidad de polvo anterior; se guarda; para obtener la solución, se añaden 1,8 litros de agua MQ, se ajusta el pH, y se prepara un volumen total de 2 litros.

ABTS

Tampón citrato fosfato	
Ácido cítrico	21,00 g
Na_2HPO_4	14,00 g
Agua MQ hasta 800 ml; se ajusta el pH a 4.2; se prepara hasta	
ABTS	1 litro
Tampón citrato fosfato hasta	0,55 g
Se distribuye en alícuotas de 22 ml y se congela.	1 litro
Inmediatamente antes de utilizarlo, se añaden 10 µl de H_2O_2 por cada alícuota de 22 ml.	

Solución de ABTS de parada (NaN_3 al 0,01% en ácido cítrico 0,1 M)

Ácido cítrico	10,5 g
Agua MQ hasta	500 ml
Se añaden 50 mg de azida sódica o 1 ml de solución al 5%.	

Conjugado KPL #14-23-06¹

Crioprotector TSGM

Solución Tris/salina 10×, pH 7.4	50 ml
Glicerol	250 ml
Agua purificada estéril hasta	500 ml
Se esteriliza en autoclave	
Se añade mertiolato al 10%	1 ml
Se guarda en frasco oscuro a 4°C	

1 Proveedor del reactivo: Bio-Mediq DPC Australia, P.O. Box 106, Doncaster, Victoria 3108, Australia; Tel.: (+61-3) 9840 2767; Fax: (+61-3) 9840 2767. Visítese: www.kpl.com para enlaces a distribuidores de todo el mundo.

Solución Tris/salina 10× (Tris 250 mM, NaCl 1,5 M)

Tris	15,14 g
NaCl	43,83 g
Agua purificada estéril	500 ml
Se ajusta el pH a	7,4

*4.3.1.2.2.3. Microscopía inmunoelectrónica**Marcaje con oro de cortes que contengan cultivos o cultivos celulares*

Principio de la prueba: para el examen por microscopía electrónica pueden utilizarse cultivos celulares, tejidos y/o homogenados de tejidos. La microscopía electrónica convencional (examen de cortes ultrafinos) genera datos sobre la estructura y la morfogénesis del virus. La microscopía electrónica de contraste negativo produce imágenes que pueden utilizarse para examinar la estructura de las partículas del virus. El uso de anticuerpos específicos contra los ranavirus y oro conjugado con estas preparaciones permite examinar tanto la ultraestructura como la antigenicidad (Hyatt, 1991). Estos datos colectivos permiten la clasificación en el género *Ranavirus*.

Cultivos celulares y tejidos

- i) Se fijan los tejidos o cultivos celulares como describe Hyatt (1991). En pocas palabras, se utiliza glutaraldehído tamponado al 2,5% (v/v) (cacodilato o fosfato) para fijar células durante 40 minutos. Tras la fijación primaria, las células se enjuaga en el mismo tampón (3 x 20 minutos), se post-fijan en tetróxido de osmio tamponado al 1% (p/v), se deshidratan en soluciones seriadas de alcohol (70-100%) y se infiltran y fijan en una resina de epoxi (como Spurr's o Epon). Para el marcaje con oro de cortes ultrafinos en resina, debe prestarse atención a las pautas de fijación e inclusión. Así, por ejemplo, las células deben fijarse en glutaraldehído al 0,25% (v/v) con paraformaldehído al 2-4%. No se utiliza fijación secundaria y las células se infiltran y se incluyen en una resina acrílica como la LR White.
- ii) Tras la fijación e inclusión, se realizan cortes ultrafinos y se transfieren a rejillas bañadas en níquel.
- iii) Se realizan cortes de los bloques apropiados.
- iv) Se bloquean en una solución de leche desnatada en polvo al 2% (p/v) en PBS-A (10 minutos).
- v) Se bloquean los aldehídos libres con glicina 0,1 M en PBS-A (20 minutos).
- vi) Se lava con PBS-A (3 x 1 minutos). Este es un paso opcional que solo se utiliza si hay un exceso de aldehídos libres (un fondo alto puede ser indicativo de ello).
- vii) Si no se está utilizando proteína A-oro, se bloquea en suero normal de la especie – este suero debe ser homólogo al que se utiliza para formar los complejos con oro. La dilución recomendada es de aproximadamente 1/40 (10 minutos).
- viii) Se incuba en anticuerpo primario. Si no se conocen los detalles de la incubación, se llevan a cabo las reacciones iniciales con diluciones a 1/100 a 1/2700 (con diluciones a un tercio). Se diluyen los anticuerpos en solución de gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (60 minutos, RT).
- ix) Se enjuaga en solución de gelatina de pescado de agua fría al 1% (v/v) en PBS-A, (6 x 3 minutos).
- x) Se incuba en anticuerpo secundario marcado con oro o proteína A-oro o proteína G-oro. La dilución sugerida es 1/40 en PBS-A que contenga albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (p/v), Tween 20 al 0,1% (v/v) y Triton X al 0,1% (v/v), durante 60 minutos, a RT.
- xi) Se enjuaga en PBS-A (6 x 3 minutos, RT).
- xii) Se post-fija en una solución de glutaraldehído (v/v) al 2,5% en PBS-A (5 minutos, RT).
- xiii) Se enjuaga en agua (RO) (3 x 3 minutos, RT).
- xiv) Se seca sobre papel de filtro (no importa de qué tipo).
- xv) Se tiñe en acetato de uranilo y en acetato de plomo.

Interpretación de los resultados

Los virus del interior del citoplasma de las células infectadas quedarán marcados específicamente con oro. Los virus se situarán de forma peculiar, dentro de cuerpos de inclusión y de matrices paracristalinas.

Marcado con oro de partículas víricas (virus adsorbidos a rejillas)

- i) Se homogeneiza mediante Dounce una solución al 10% (p/v) de hígado, riñón o bazo, y se clarifica (5 minutos, 2.500 **g**).
- ii) Se adsorbe el sobrenadante (del homogenado o de cultivos celulares) a un sustrato de rejilla.
- iii) Se utilizan rejillas de oro de malla 200 recubiertas de carbono.
- iv) Se fija la muestra con glutaraldehído al 0,1% (v/v) y Nonidet P40 (NP40) al 1% (v/v) en PBS (2 minutos).
- v) Se lava en PBS (3 × 3 minutos).
- vi) Se bloquea con solución de gelatina de pescado de agua fría al 5% (v/v) (Sigma) en PBS (10 minutos) y a tampón de incubación (PBS/solución de gelatina de pescado de agua fría al 0,1%).
- vii) Se incuba con anticuerpo (anticuerpo anti-VNHE de conejo purificado por afinidad, Lote nº M708; suministrado por el Laboratorio de Referencia de la OIE; dilución sugerida: 1/500) durante 1 hora, a RT.
- viii) Se lavan las rejillas (6 × 3 minutos) en tampón de incubación.
- ix) Se incuban con 10 nm de proteína-oro (para la dilución, consúltase la recomendación de los proveedores) durante 1 hora, a RT.
- x) Se lava (6 × 3 minutos).
- xi) Se fija con glutaraldehído al 2,5% (5 minutos).
- xii) Se lava con agua destilada (3 × 3 minutos) y se tiñe con ácido fosfotúngstico al 2% (pH 6,8) durante 1 minuto.

Interpretación de los resultados

La inclusión de NP40 permitirá que penetren anticuerpos y proteína A-oro en la membrana externa y que reaccionen con la cápsida subyacente. El marcado debe ser específico del virus. Debe incluirse un suero de conejo purificado por afinidad sin VNHE (1/500) como control negativo.

4.3.1.2.2.4. Inmunohistoquímica (tinción por inmunoperoxidasa)

Muestras: Cortes de tejido fijados con formalina e incluidos en parafina.

Procedimiento técnico

El objetivo del siguiente protocolo es la demostración cualitativa de antígenos de ranavirus en cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina (He *et al.*, 2002). Se considera que los antígenos pueden haber adquirido la capacidad de reaccionar de forma cruzada, y por tanto se incluye un paso de digestión con proteasa que puede omitirse si se examinan muestras no fijadas. Para la tinción se utiliza un kit comercial (DAKO® LSAB K0679) con estreptavidina marcada con peroxidasa y una mezcla de inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo/anti-ratón/anti-cabra a modo de anticuerpos de unión. También se utilizan otros reactivos comerciales, que también suministra DAKO². El anticuerpo primario de conejo anti-VNHE purificado por afinidad (Lote nº M708) lo suministra liofilizado el Laboratorio de Referencia.

- i) Se realizan cortes de 5 µm y se montan en portas SuperFrost® Plus G/Edge (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. Nº HD 041300 72P3). Se hace una marca alrededor del corte con un lápiz de diamante para reducir la diseminación de los reactivos.

2 Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, EE.UU., Tel.: (+1-805) 566 6655, Fax: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Australia, Fax: (+61-2) 9316 4773; Visítase la página www.dakocytomation.com para enlaces a otros países.

ii) Se desparafina el corte:

Se pre-calientan los portas en una incubadora a 60°C 30 minutos.

Se colocan los portas en un baño de xileno y se incuban 5 minutos. Se repite una vez. Obsérvese que pueden realizarse sustituciones del xileno sin efectos perjudiciales.

Se elimina el exceso de líquido y se sumergen los portas en etanol absoluto 3 minutos. Se repite una vez.

Se elimina el exceso de líquido y se sumergen los portas en etanol al 95% 3 minutos. Se repite una vez.

Se elimina el exceso de líquido y se sumergen los portas en agua destilada o agua desionizada 30 segundos.

- iii) Se exponen antígenos utilizando un tratamiento con proteasa. Se inunda el porta con proteinasa K (5–7 µg ml⁻¹) y se incuba 20 minutos (solución lista para usar, DakoCytomation Cat. No. S3020). Se enjuaga el porta sumergiéndolo tres veces en agua. Se coloca en un baño de PBST 5 minutos (PBS, pH 7,2, Tween 20 al 0,05% [v/v]). Se elimina el exceso de solución de lavado y se aplica con cuidado papel absorbente alrededor del corte.
- iv) Se lleva a cabo la reacción de inmunotinción utilizando el Universal DAKO LSAB[®]+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Asegurándose de que el corte de tejido se ha recuperado por completo, se añaden los siguientes reactivos al porta. Se evita que se sequen por completo.
- v) Peróxido de hidrógeno al 3%: se cubre el corte y se incuba 5 minutos. Se enjuaga con cuidado con PBST y se coloca en un baño limpio de lavado.
- vi) Anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-VNHE purificado por afinidad 1:/1500 Lote N° M708) y reactivo control negativo (suero de conejo no inmune a una dilución de 1/1500) en un segundo porta. Se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se enjuagan los portas.
- vii) Unión: se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se enjuagan los portas.
- viii) Estreptavidina peroxidasa: se cubre el corte y se incuba 15 minutos. Se enjuagan los portas.
- ix) Solución de sustrato-cromógeno: se cubre el corte y se incuba 5 minutos. Se enjuagan los portas con cuidado con agua destilada.
- x) Se aplica tinción de contraste colocando los portas en un baño de hematoxilina de Mayer de DAKO[®] durante 1 (modificación de Lillie, Cat. N° S3309). Se lava con cuidado con agua destilada. Se sumerge 10 veces en un baño de agua. Se coloca en agua destilada o desionizada durante 2 minutos.
- xi) Se montan muestras y se cubren con cubreobjetos con un medio de montaje de base acuosa (medio de montaje acuoso de DAKO[®] Faramount Cat. N° S3025).

Interpretación de los resultados

El antígeno de ranavirus se tiñe de marrón en las zonas que circundan las partes parenquimatosas degeneradas y necróticas. No debe haber tinción con el suero control negativo de conejo en el mismo corte.

Acceso a pruebas y reactivos: se pueden obtener reactivos de anticuerpos y protocolos analíticos en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Se puede llevar a cabo la identificación de ranavirus a nivel de género y de especie mediante dos PCR dirigidas al gen de la MCP. En la primera, se utilizan dos PCR con cebadores de MCP con análisis de restricción para detectar y diferenciar rápidamente los ranavirus de peces (VNHE, VBE (virus del bagre europeo)) de los ranavirus de anfibios (VR3, IVB) (Harp y Petranksa, 2006). Esto se puede llevar a cabo en menos de 24 horas a un coste relativamente bajo. En el segundo método, se utiliza una PCR dirigida a la MCP para generar un producto de 580 pb, que a continuación se secuencian para identificar el tipo de ranavirus (consúltese el capítulo 2.3.1. Necrosis hematopoyética epizoótica).

Muestras: Virus tomado de cultivo celular o análisis directo de homogenado tisular.

4.3.1.2.3.1. PCR y análisis mediante endonucleasa de restricción (REA): procedimiento técnico

El producto MCP-1 amplificado mediante PCR y digerido con PflM I permite diferenciar entre iridovirus australianos (VNHE e IVB) e iridovirus no australianos (VR3, de América; y VBE, de Europa). El producto MCP-2 amplificado mediante PCR y digerido con Hinc II, Acc I y Fnu4H I (individualmente) permite diferenciar entre el VNHE y el IVB (Australia) entre ellos, así como entre el VR3 (América) y el VBE (Europa).

Preparación de los reactivos

El Laboratorio de Referencia suministra reactivos control liofilizados de ADN purificado de VNHE y de ADN purificado de IVB para la PCR. Se reconstituyen con 0,5 ml de tampón Tris-EDTA (TE) (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) y se deja el vial en reposo a RT 2 minutos. Se mezcla el vial con mucho cuidado. Para el uso sistemático, como control de la PCR, se recomienda preparar las soluciones de trabajo a modo de una dilución a 1/10 en tapón TE (pH 8,0). Deben guardarse alícuotas de 250 µl a -20°C. Cada alícuota es suficiente durante al menos 50 reacciones (se añaden 1 a 5 µl al cóctel) y tiene un periodo de validez mínimo de 6 meses desde la fecha en que se diluye.

Los cebadores M151 y M152 (MCP-1, 321 pb), M153 y M154 (MCP-2, 625 pb) se suministran a la concentración de trabajo y deben guardarse a -20°C. También pueden encargarse cebadores a proveedores comerciales. Para saber cuáles son las secuencias de los cebadores, consúltese la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Secuencias de los cebadores MCP-1 y MCP-2

PCR	Cebador	Secuencia	Tamaño del producto	Ubicación del gen
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 bp	266–586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 bp	842–1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

Cóctel para la PCR

Las reacciones de amplificación en un volumen final de 50 µl (incluidos 5 µl de la muestra de ADN) contienen 2,5 µl de cada cebador de trabajo, los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP y dCTP, cada uno a una concentración 200 mM, tampón para PCR 10× (Tris/HCl 66,6 mM, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 2,5 mM, BSA a 1,65 mg ml⁻¹, beta-mercaptoetanol 10 mM) y 2 U de polimerasa Taq. En la Tabla 4.2 se indican las instrucciones para la preparación del tampón para PCR 10x.

Tabla 4.2. Preparación del tampón para PCR 10x

Ingredientes	Cantidad	Concentración final en 50 µl de mezcla para PCR
Tris	4,050 g	66,6 mM
Sulfato de amonio	1,100 g	16,6 mM
BSA (fracción V de albúmina bovina libre de ácidos grasos)	0,825 g	1,65 mg ml ⁻¹
Cloruro de magnesio	1,25 ml	2,5 mM
Tampón TE (estéril)	50 ml	

NOTA: también pueden utilizarse tampones comerciales alternativos.

Se incluyen dos controles negativos, uno que lleva el cóctel para la PCR y el segundo que lleva 5 µl de tampón TE.

Las reacciones para la obtención de MCP-1 y de MCP-2 tienen el siguiente perfil: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 50°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto; una extensión final de 72°C durante 5 minutos, y enfriado a 4°C.

NOTA: la temperatura de hibridación se puede aumentar a 60°C o 62°C para reducir la amplificación inespecífica cuando la prueba se utiliza para analizar tejidos de pescado.

Los resultados de la PCR se evalúan mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El ADN control de VNHE para PCR (solución de trabajo a 1/10) debe dar un resultado de intensidad similar a la banda 10-3 en ambos casos.

Análisis mediante nucleasa de restricción (REA)

Se someten amplicones de PCR a REA con las enzimas descritas en la Tabla 4.3. Todas las endonucleasas deben utilizarse según las instrucciones del fabricante. Se preparan reacciones de REA añadiendo 1-4 µl del producto de la PCR, 2 U de la endonucleasa de restricción apropiada, 1,6 µl de tampón (suministrado con cada endonucleasa de restricción), 1,6 µl de solución de BSA de 100 µg ml⁻¹ (en el caso de PflM I e Hinc II) y se completa hasta un volumen final de 16 µl con agua purificada estéril. Se incuban los digestos de restricción 2-4 horas a las temperaturas recomendadas y se evalúan mediante electroforesis en gel de agarosa en geles al 3%. En la Tabla 4.4 se indican los tamaños de banda previstos tras la restricción.

Tabla 4.3. Análisis mediante endonucleasa de restricción de amplicones de MCP de ranavirus

PCR	Enzima de restricción	Tamaños de banda previstos tras la restricción (pb)	Patrón aplicable a
MCP-1 (321bp)	<i>PflM I</i>	321	VNHE, IVB
		131, 190	VR3, IVW
MCP-2 (625bp)	<i>Hinc II</i>	100, 138, 387	VNHE
		100, 525	IVB, VR3
		100, 240, 285	IVW
	<i>Acc I</i>	238, 387	VNHE
		625	IVB, VSE, VBE, IVW
		164, 461	VR3, VG
	<i>Fnu4H I</i>	33, 38, 44, 239, 271	VNHE
		3, 33, 38, 44, 108, 399	IVB
		3, 38, 44, 108, 432	VR3, VG
		3, 9, 38, 44, 108, 151, 272	VSE, VBE
		3, 44, 71, 108, 399	IVW

VG: Virus Gutapo (Hyatt *et al.*, 2000).

Se distribuye en alícuotas de 500 µl y se guarda a -20°C. Para obtener una solución de trabajo, se añaden 3,5 µl de beta-mercaptoetanol por cada 500 µl de tampón 10x. Tras preparar el cóctel para la PCR, el tampón sobrante debe desecharse.

Se está evaluando cuál es la sensibilidad de la PCR en las aplicaciones diagnósticas a tejidos de pescado.

Los protocolos detallados de la prueba completa, hojas de trabajo y ADN control de VNHE pueden conseguirse en el Laboratorio de Referencia de la OIE.

4.3.1.2.3.2. PCR alternativa y secuenciación para la identificación del virus

En esta prueba se utilizan dos cebadores, un cebador directo (5'-AAA-GAC-CCG-TTT-TGC-AGC-AAA-C-3') y un cebador inverso (5'-CGC-AGT-CAA-GGC-CTT-GAT-GT-3'), para la amplificación de la secuencia diana de la MCP (580 pares de bases [pb]) del ADN del VNHE mediante PCR. Esta PCR se puede utilizar para la detección específica de ranavirus de percas, truchas arcoiris, siluros, bagres, *Poecilia reticulata*, navajón cirujano (*Labroides dimidiatus*) y de varios ranavirus de los anfibios (Eaton *et al.*, 1991). Se añade ácido nucleico (1 µl) a tampón polimerasa Taq que contenga cada cebador a una concentración 0,1 µM, 2,5 U de polimerasa Taq (Promega) y MgCl₂ 2,5 mM. La mezcla se incuba en un ciclador térmico automático programado para 35 ciclos a 95°C

durante 60 segundos, 55°C durante 60 segundos y 72°C durante 60 segundos, y finalmente se mantiene a 72°C durante 15 minutos. Se analiza ADN amplificado (580 pb) mediante electroforesis en gel de agarosa, se extrae y se secuencía utilizando varios métodos estándar. Cada especie vírica se identifica por su secuencia de ADN específica, que puede consultarse en el GenBank. Pueden enviarse muestras al Laboratorio de Referencia de la OIE para llevar a cabo una identificación específica.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Se ha descrito la purificación del VNHE (Drury *et al.*, 1995; Hyatt *et al.*, 2000) y el Laboratorio de Referencia dispone del protocolo.

4.3.2. Métodos serológicos

No se han detectado anticuerpos neutralizantes en peces ni mamíferos expuestos a ranavirus. Se ha descrito un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos inducidos tras la exposición de *Bufo marinus* a ranavirus. En el Laboratorio de Referencia se dispone de los protocolos y los reactivos de anti-inmunoglobulina específicos necesarios para llevar a cabo estas pruebas.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de ranavirus se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin; y NA = no es aplicable. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales (véase el Capítulo 1.1.2 de este *Manual Acuático*), su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico preliminar	Diagnóstico confirmativo
	Huevos/esperma	Renacuajos	Metamorfos	Adultos		
Anatomopatología macroscópica	na	d	d	d	d	d
Histopatología	na	d	d	d	b	d
Tinción por inmunoperoxidasa	na	c	c	c	b	b
ME de transmisión	na	d	d	d	c	c
Microscopía inmunoelectrónica	na	d	d	d	c	c
Cultivo celular	na	a	a	a	a	a
ELISA de captura de antígeno	na	a	a	a	b	b
ELISA de captura de anticuerpo	na	d	d	c	c	d
PCR-REA	na	d	a	d	c	a
Análisis de la secuencia del producto de la PCR	na	d	d	d	c	a

ME = microscopía electrónica; ELISA = enzoinmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; REA: análisis por endonucleasa de restricción; na: no es aplicable

6. Prueba(s) recomendadas para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de ranavirus

Deben utilizarse prácticas de obtención de muestras estadísticamente válidas, pero actualmente no pueden definirse para los anfibios.

Deben obtenerse los órganos/muestras correctos.

Debe aplicarse las pruebas estandarizadas de sensibilidad y especificidad especificadas. Esto restringe las pruebas de certificación al cultivo celular, que es la prueba de referencia.

En estudios en los que se pretende identificar poblaciones de anfibios infectadas también podría intervenir de forma útil la serología. Se precisan más estudios para confirmar la validez de esta propuesta.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Anfibios aparentemente sanos, moribundos o muertos cuya piel y/o tejidos parenquimatosos contengan indicios histológicos de necrosis por licuefacción o coagulación multifocal o localmente extensa con o sin cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos.

7.2. Definición de caso confirmado

Anfibios aparentemente sanos, moribundos o muertos cuya piel y/o tejidos parenquimatosos contengan indicios histológicos de necrosis por licuefacción o coagulación multifocal o localmente extensa con o sin cuerpos de inclusión basófilos intracitoplasmáticos y/o en los cuales se haya observado la presencia de ranavirus por los siguientes medios:

1. ECF característico en el cultivo celular y cultivo celular positivo para ranavirus en la prueba de la inmunoperoxidasa o el ELISA de captura de antígeno o la PCR,
- o
2. Tejidos positivos en el ELISA de captura de antígeno o en la tinción por inmunoperoxidasa o en la microscopía inmunoelectrónica o en la PCR

Y tanto en 1 como en 2, cuando se utilice PCR

3. Observación de una secuencia compatible con ranavirus mediante REA o secuenciación del producto de la PCR.

8. Bibliografía

ARIEL E., KIELGAST J., SVART H.E., LARSEN K., TAPIOVAARA H., JENSEN B.B. & HOLOPAINEN R. (2009). Ranavirus in wild edible frogs (*Pelophylax kl. esculentus*) in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 7–14.

BOLLINGER T.K.M., SCHOCK J., BRIGHAM D. & GREGORY R.M. (1999). Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.*, **35**, 413–429.

BRUNNER J., SCHOCK D., DAVIDSON E. & COLLINS J. (2004). Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology*, **85**, 560–566.

BRUNNER J.L., SCHOCK D.M. & COLLIN J.P. (2007). Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 87–95.

BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.

CAREY C., BRADFORD D.F., BRUNNER J.L., COLLINS J.P., DAVIDSON E.W., LONGCORE J.E., OUELLET M., PESSIER A.P. & SCHOCK D.M. (2003a). Biotic factors in amphibian population declines. Multiple stressors and declining amphibian populations Linder G., Sparling D.W. & Krest S.K., eds. Society for Environmental Chemistry and Toxicology Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Press, Pensacola, Florida, USA.

- CAREY C., PESSIER A.P., & PEACE A.D. (2003b). Pathogens, infectious disease, and immune defenses. *In: Semlitsch R.D., ed. Amphibian conservation. Smithsonian Institute, Washington, DC, USA, 127–136.*
- CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.
- CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–161.*
- CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.
- CULLEN B.R. & OWENS L. (2002). Experimental challenge and clinical cases of Iridovirus Bohle (IVB) in native Australian anurans. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 83–92.
- CUNNINGHAM A.A., HYATT A.D., RUSSELL P. & BENNETT P.M. (2007). Emerging epidemic diseases of frogs in Britain are dependent on the source of ranavirus agent and the route of exposure. *Epidemiol. Infect.*, **135**, 1200–1212.
- CUNNINGHAM A.A., LANGTON T.E.S., BENNETT P.M., LEWIN J.F., DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & MACGREGOR S.K. (1996). Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Phil. Trans. R. Soc. B*, **351**, 1539–1557.
- CUNNINGHAM A.A., TEMS C.A. & RUSSELL P.H. (2008). Immunohistochemical demonstration of Ranavirus antigen in the tissues of infected frogs (*Rana temporaria*) with systemic haemorrhagic or cutaneous ulcerative disease. *J. Comp. Pathol.*, **138** (1), 3–11.
- DASZAK P., CUNNINGHAM A.A. & HYATT A.D. (2003). Infectious disease and amphibian population declines. *Divers Distrib.*, **9**, 141–150.
- DOCHERTY D.E., METEYER C.U., WANG J., MAO J., CASE S.T. & CHINCHAR V.G. (2003). Diagnostic and molecular evaluation of three iridovirus-associated salamander mortality events. *J. Wildl. Dis.*, **39**, 556–566.
- DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CUNNINGHAM A.A. (1995). Isolation of an iridovirus-like agent from common frogs (*Rana temporaria*). *Vet. Rec.*, **137**, 72–73.
- EATON B.T., HYATT A.D. & HENGSTBERGER S. (1991). Epizootic haematopoietic necrosis virus: purification and classification. *J. Fish Dis.*, **14**, 157–169.
- FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.
- FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur*, 134E.
- FOX S.F., GREER A.L., TORRES-CERVANTES R. & COLLINS J.P. (2006). First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 87–92.
- GREEN D.E., CONVERSE K.A. & SCHRADER A.K. (2002). Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **969**, 323–339.
- GREER A.L., BRIGGS C.J. & COLLINS J.P. (2008). Testing a key assumption of host-pathogen theory: density and disease transmission. *Oikos*, **117**, 1667–1673.
- GREER A.L. & COLLINS J.P. (2008). Habitat fragmentation as a result of biotic and abiotic factors controls pathogen transmission throughout a host population *J. Anim. Ecol.*, **77**, 364–369.
- GRAY M.J., MILLER D.L. & HOVERMAN J.T. (2009). Ecology and pathology of amphibian ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **87** (3), 243–266.

- HARP E.M. & PETRANKA J.W. (2006). Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds. *J. Wildl. Dis.*, **42**, 307–318.
- HENGSTBERGER S.G., HYATT A.D., SPEARE R. & COUPAR B.E.H. (1993). Comparison of epizootic haematopoietic necrosis and Iridovirus Bohlees, recently isolated Australian iridoviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 93–107.
- HE J.G., LU L., DENG M., HE H.H., WENG S.P., WANG X.H., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z. & CHAN S.M. (2002). Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*, **292**, 185–197.
- HYATT A.D. (1991). Immunogold labelling techniques. In: *Electron Microscopy in Biology: a Practical Approach*, Harris R., ed. IRL Press, Oxford, UK, 59–81.
- HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–617.
- HYATT A., PARKES H. & ZUPANOVIC Z. (1998). Identification, characterisation and assessment of Venezuelan viruses for potential use as biological control agents against the cane toad (*Bufo marinus*) in Australia. Available at <http://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive/publications/cane-toad-maintenance/index.html>
- HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, **145**, 301–331.
- HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.
- JANCOVICH J.K., DAVIDS E.W., SEILER A., JACOBS B.L. & COLLINS J.P. (2001) Transmission of the *Ambystoma tigrinum* virus to alternative hosts. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 159–163.
- JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W., MORADO J.F., JACOBS B.L. & COLLINS J.P. (1997). Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 161–167.
- JANCOVICH J.K., MAO J.H., CHINCHAR V.G., WYATT C., CASE S.T., KUMAR S., VALENTE G., SUBRAMANIAN S., DAVIDSON E.W., COLLINS J.P. & JACOBS B.L. (2003.) Genomic sequence of a ranavirus (family Iridoviridae) associated with salamander mortalities in North America. *Virology*, **316**, 90–103.
- JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W., PARAMESWARAN N., MAO J., CHINCHAR V.G., COLLINS J.P., JACOBS B.L. & STORFER A. (2005). Evidence for emergence of an amphibian iridoviral disease because of human-enhanced spread. *Molecular Ecology*, **14**, 213–224.
- LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.
- MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, **16**, 137–151.
- MARSCHANG R.E., BECHER P., POSTHAUS H., WILD P., THIEL H.-J., MULLER-DOBILES U., KALETA E.F. & BACCARINI L.N. (1999). Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Arch. Virol.*, **144**, 1909–1922.
- PICCO A.M., BRUNNER J.L. & COLLINS J.P. (2007). Susceptibility of the endangered california tiger salamander, *Ambystoma californiense*, to Ranavirus infection. *J. Wildl. Dis.*, **43** (2), 286–290.
- PICCO A.M. & COLLINS J.P. (2008). Amphibian commerce as a likely source of pathogen pollution. *Conservation Biology*, **22**, 1582–1589.
- PEARMAN P.B., GARNER T.W.J., STRAUB M. & GREBER U.F. (2004). Response of the Italian agile frog (*Rana latastei*) to a Ranavirus, virus de la rana tipo 3: a model for viral emergence in naïve populations. *J. Wildl. Dis.*, **40**, 660–669.
- PLUMB J.A. & ZILBERG D. (1999). The lethal dose of largemouth bass virus in juvenile largemouth bass and the comparative susceptibility of striped bass. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 246–252.

- REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.
- ROBERT J., MORALES H., BUCK W., COHEN N., MARR S. & GANTRESS J. (2005). Adaptive immunity and histopathology in virus de la rana tipo 3-infected *Xenopus*. *Virology*, **332**, 667–675.
- ROJAS S, RICHARDS K, JANCOVICH J.K., DAVIDSON E.W. (2005). Influence of temperature on Ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. *Dis. Aquat. Org.*, **63** (2–3), 95–100.
- SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.
- WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.
- WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSH I., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.
- WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (VNHE): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, **43**, 205–220.
- WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.
- XIA L., CAO J., HUANG X. & QIN Q. (2009). Characterization of Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication. *Arch. Virol.*, **154** (9), 1409–1416.
- ZHAN Q.Y., XIAO F., LI Z.Q., GUI J.F., MAO J. & CHINCHAR V.G. (2001) Characterization of an iridovirus from the cultured pig frog *Rana grylio* with lethal syndrome. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 27–36.
- ZUPANOVIC Z., LOPEZ G., HYATT A.D., GREEN B., BARTRAN G., PARKES H., WHITTINGTON R.J., & SPEARE R. (1998a). Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against ‘ranaviruses’. *Dis. Aquat. Org.*, **32** (1), 1–8.
- ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J. (1998b). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Infección por ranavirus (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

SECCIÓN 2.2.

ENFERMEDADES DE LOS CRUSTÁCEOS

CAPÍTULO 2.2.0.

INFORMACIÓN GENERAL

Los principios y métodos que se explican en este capítulo necesariamente se centrarán en los camarones peneidos, porque la mayoría de las enfermedades de la lista actual (y las que están en estudio para una posible entrada en la lista) de la OIE son enfermedades del camarón peneido (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2012). La taxonomía del camarón peneido fue revisada en 1997 (Pérez Farfante & Kensley, 1997). Los subgéneros de los peneidos fueron elevados a la categoría de géneros en sí. Sin embargo, dado que este cambio en la taxonomía de los peneidos no se ha aceptado en todo el mundo, en este *Manual Acuático* se utilizará la taxonomía de los peneidos establecida por Holthuis (Holthuis, 1980).

A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

1. Evaluación del estado de salud de la unidad epidemiológica

La toma de muestras de poblaciones de crustáceos salvajes constituye un tremendo reto cuando se diseñan estudios de enfermedades. Cuando existen pesquerías de crustáceos salvajes, se da la posibilidad de obtener muestras. Sin embargo, esto representa una población de animales relativamente sanos que han sobrevivido a una edad y a un tamaño de pesca, y por tanto, podrían no representar lo suficiente las enfermedades de interés.

En el Capítulo 1.4 del *Código Acuático* se proporciona un enfoque general de la vigilancia y de los sistemas de toma de muestras.

1.1. Tipos de muestras que deben utilizarse para las pruebas

Las muestras a escoger dependen de la enfermedad o agente patógeno que tengan que detectarse, y del tamaño de los animales y el objetivo de los análisis, es decir, si se trata de un diagnóstico de una enfermedad manifiesta, una detección de portadores subclínicos del agente patógeno o una toma de muestras para la vigilancia dirigida con el fin de demostrar la ausencia de una determinada enfermedad. Para conocer más detalles sobre los requisitos de las muestras, véanse la *Directrices de la OIE para la Vigilancia de la Sanidad de los Animales Acuáticos* (Corsin *et al.*, 2009) y los capítulos sobre cada enfermedad en particular en este *Manual Acuático*.

1.2. Especificaciones relativas al tamaño de los crustáceos

Para conocer más detalles sobre los requisitos de las muestras véanse las *Directrices de la OIE para la Vigilancia de la Sanidad de los Animales Acuáticos* (Corsin *et al.*, 2009) y los capítulos sobre cada enfermedad en particular en este *Manual Acuático*.

1.3. Especificaciones relativas a las poblaciones de crustáceos

Además de las consideraciones indicadas en el *Manual de la OIE sobre vigilancia de la Sanidad de los Animales Acuáticos* (Corsin *et al.*, 2009), durante el desarrollo de un sistema de vigilancia deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos relacionados con las poblaciones de crustáceos:

- Las poblaciones de crustáceos habitualmente cultivadas se distribuyen en múltiples unidades de explotación, que en general no comparten agua y pueden o no compartir la exposición a distintas condiciones.
- Los crustáceos tienden a estratificarse en la unidad de explotación y en la columna de agua en función de su estado de salud y de otras interacciones comportamentales (por ejemplo, los animales enfermos a menudo se acercan a los márgenes o la superficie de los estanques).

- Para varias enfermedades de los crustáceos existen grandes cantidades de especies susceptibles, de las cuales a menudo se conoce poco su susceptibilidad comparativa.
- La división o mezcla de poblaciones de crustáceos cambia las características de las poblaciones.
- Algunas poblaciones de crustáceos salvajes a veces se caracterizan por amontonarse, lo cual conlleva cierto grado de homogeneidad dentro de cada banco.

1.4. Especificaciones relativas al estado clínico

En los episodios de enfermedad clínica, deben obtenerse ejemplares de calidad cuidadosamente escogidos y con lesiones representativas de entre los crustáceos vivos o moribundos. Para establecer un diagnóstico debe hacerse todo lo posible por extraer ejemplares que sean representativos de la enfermedad/es que está/n afectando a la población de crustáceos de interés, y que estén moribundos o clínicamente enfermos. Siempre que sea posible debe evitarse la obtención de ejemplares muertos durante brotes de enfermedad, pero las muestras de animales recién muertos pueden resultar adecuadas para ciertas pruebas diagnósticas. Cuando las poblaciones de crustáceos de piscifactoría o salvajes presenten signos clínicos de una enfermedad activa que concuerden con cualquiera de las enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE, o que las sugieran, debe tenerse cuidado de garantizar que las muestras obtenidas sean conservadas adecuadamente, para que puedan ser utilizadas en las pruebas de diagnóstico previstas (véanse los métodos recomendados en el apartado sobre la conservación de las muestras). Para las enfermedades de la lista de la OIE se recomienda especialmente planificar el programa de toma de muestras (es decir, según las previsiones de la explotación, la estación del año, etc.) de modo que se tomen muestras de cada estadio de vida concreto en el momento de máxima probabilidad de detección del agente patógeno en cuestión. Esto es especialmente importante cuando los métodos de diagnóstico de los que se dispone se basan en la microscopía óptica o la histología y no incluyen métodos moleculares. Para el síndrome de Taura, la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la enfermedad de las manchas blancas, la mionecrosis infecciosa, la hepatopancreatitis necrotizante y la enfermedad de la cabeza amarilla, los juveniles y los subadultos constituyen las mejores muestras; y para la plaga del cangrejo de río, las muestras adecuadas son los juveniles y los adultos.

Las muestras tomadas para pruebas moleculares o basadas en anticuerpos realizadas para diagnosticar enfermedades de los crustáceos incluidas en la lista de la OIE podrían combinarse formando muestras compuestas de no más de cinco ejemplares por muestra compuesta. Para ciertas pruebas de diagnóstico, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR con transcripción inversa (RT-PCR), el aislamiento y/o el cultivo del agente patógeno, bioanálisis, etc. pueden servir cangrejos de río u otros crustáceos recién muertos (en función de su estado).

2. Procesado general de las muestras

2.1. Examen macroscópico

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

2.2. Examen virológico

2.2.1. Transporte y tratamiento de las muestras con antibiótico

No es aplicable.

2.2.2. Extracción del virus

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

2.2.3. Tratamiento para neutralizar virus enzoóticos

No es aplicable.

2.3. Examen bacteriológico

No es aplicable a las enfermedades de la lista actual, excepto en el caso de la HPN. Dado que la bacteria causal de la HPN no se ha cultivado y dado que tiene un tamaño muy pequeño, es posible que el examen bacteriológico se limite a la tinción de Gram.

2.4. Examen parasitario

No aplicable a las enfermedades de la lista actual.

2.5. Examen fúngico y de otros protistas

Consúltase el Capítulo 2.2.1 Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*), y el capítulo 2.3.2. Síndrome ulcerante epizoótico.

B. MATERIALES Y PRODUCTOS BIOLÓGICOS NECESARIOS PARA EL AISLAMIENTO Y LA IDENTIFICACIÓN DE LOS AGENTES PATÓGENOS DE LOS CRUSTÁCEOS

1. Virus de los crustáceos

1.1. Líneas celulares de crustáceos

No es aplicable. Actualmente no existen líneas celulares de crustáceos confirmadas ni documentadas.

1.2. Medios de cultivo

No es aplicable.

1.3. Controles positivos del virus y preparación del antígeno

1.3.1. Nomenclatura del virus

En general, la nomenclatura del virus que se utiliza en los capítulos dedicados a cada enfermedad sigue las normas de la taxonomía más reciente aplicable a los virus, según se indica en el Informe del Comité sobre Taxonomía de los Virus (Fauquet *et al.*, 2005). En dichos capítulos también se indican los nombres de la enfermedad y del virus que son de uso frecuente en la industria de la explotación del camarón y la gamba, así como los sinónimos más habituales que se han utilizado o que se utilizan actualmente.

1.3.2. Producción de virus

Dado que no se conocen líneas celulares (de crustáceos, artrópodos ni vertebrados) que puedan utilizarse para producir virus de crustáceos, el método de elección para producir virus con fines experimentales es la infección de especies hospedadoras que se sepa que son susceptibles (y que estén libres de infección por parte del agente patógeno en cuestión).

1.3.3. Conservación y almacenaje del virus

La infectividad de todos los virus conocidos de los crustáceos puede mantenerse congelando el crustáceo infectado entero o bien tejidos diana infectados a -20 °C si se trata de un corto periodo de tiempo, o bien a -80 °C o menos si se trata de un largo periodo de tiempo.

2. Bacterias de los crustáceos

2.1. Medios de cultivo

No es aplicable a las enfermedades de la lista actual de la OIE.

2.2. Almacenaje de los cultivos

No es aplicable a las enfermedades de la lista actual de la OIE.

3. Parásitos de los crustáceos

3.1. Medios de cultivo

No es aplicable a las enfermedades de la lista actual de la OIE.

3.2. Almacenaje de los cultivos

No es aplicable a las enfermedades de la lista actual de la OIE.

4. Hongos de los crustáceos

4.1. Medios de cultivo

Consúltese el Capítulo 2.2.1 Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*), y el capítulo 2.3.2. Síndrome ulcerante epizoótico.

4.2. Almacenaje de los cultivos

Consúltese el Capítulo 2.2.1 Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*).

5. Técnicas

Los métodos de los que se dispone para el diagnóstico de las enfermedades de los crustáceos son los métodos tradicionales basados en la morfología de la enfermedad (como la microscopía óptica, la histopatología y la microscopía electrónica), los métodos de bioanálisis con hospedadores susceptibles como indicadores, y los métodos moleculares (sondas de genes y PCR). Aunque el cultivo tisular se considera una herramienta estándar en los laboratorios de diagnóstico de medicina, veterinaria y explotaciones acuícolas, todavía no se ha desarrollado ningún método de diagnóstico sistemático y útil para los agentes patógenos de los crustáceos. Los veterinarios especialistas en anatomía patológica de los crustáceos no utilizan la bioquímica clínica como herramienta sistemática de diagnóstico.

En el momento de redactar este apartado del *Manual Acuático*, los métodos de diagnóstico disponibles que pueden aplicarse al diagnóstico de las enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE o a la detección de sus agentes etiológicos se basan en:

- Los signos macroscópicos y clínicos.
- La microscopía directa de campo claro, de contraste de fases o de campo oscuro con preparaciones húmedas de tejido teñidas o no, aplastamientos de tejido y frotis por impronta; y preparaciones húmedas de hebras fecales.
- Histología de muestras fijadas
- Bioanálisis de portadores sospechosos o subclínicos utilizando un hospedador muy susceptible (debido al estadio de la vida o la especie) como indicador de la presencia del agente patógeno
- Microscopía electrónica de transmisión o de barrido
- Pruebas basadas en anticuerpos para la detección de agentes patógenos utilizando anticuerpos policlonales (PAbs) o monoclonales (MAbs) de sueros inmunes.
- Métodos moleculares (incluyendo la secuenciación cuando sea adecuada para la determinación de la cepa):

Sondas de ADN en pruebas de hibridación por transferencia puntual directamente con muestras de tejido fresco o con ADN extraído

Sondas de ADN o de ARN para pruebas de hibridación *in-situ* (ISH) con cortes histológicos de tejidos fijados

PCR estándar y en tiempo real y RT-PCR para el análisis directo de muestras de tejido fresco o con ADN o ARN extraído

Existen muy pocas pruebas de diagnóstico basadas en anticuerpos para los agentes patógenos que causan enfermedades en los crustáceos. Como los crustáceos no producen anticuerpos, las pruebas diagnósticas basadas en anticuerpos se aplican poco a la detección de agentes patógenos. Aunque se ha desarrollado una gran cantidad de métodos de diagnóstico basados en anticuerpos, descritos en la bibliografía, se han desarrollado con anticuerpos de ratón o conejo generados contra agentes patógenos específicos purificados a partir de hospedadores infectados. Dado que los virus de los crustáceos no pueden cultivarse *in vitro* de forma sistemática

(es decir, no pueden producirse en cultivo tisular), para producir anticuerpos tradicionalmente se han utilizado virus purificados, obtenidos de hospedadores infectados. Recientemente, se han producido proteínas víricas estructurales recombinantes a partir de la información de la secuencia vírica y estas proteínas se han utilizado para producir anticuerpos. La ausencia de métodos de cultivo celular ha limitado mucho el desarrollo y la disponibilidad de esta herramienta de diagnóstico hasta hace poco. La reciente aplicación de las tecnologías basadas en los MABs a este problema ha empezado a proporcionar unas pocas pruebas basadas en anticuerpos. Así, se dispone de MABs contra los agentes patógenos de varias de las enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE (VSMB, VST, VECA y VNHHI). Actualmente existen a la venta preparaciones/reactivos de diagnóstico basados en anticuerpos para la detección de las infecciones causadas por el VST, el VSMB y el VECA.

Se han desarrollado métodos moleculares, y algunos se utilizan mucho para la detección de muchos de los virus, bacterias, hongos y protozoos que afectan al camarón peneido (o a otros crustáceos decápodos). Los métodos de detección basados en el ácido nucleico son fáciles de encontrar en la bibliografía y para algunos existen preparaciones comerciales destinadas al diagnóstico de agentes patógenos causantes de enfermedades de la lista de la OIE, como el VST, el VSMB o el VECA/VAB, así como el VNHHI, el MBV, el BP o el IMNV. La PCR y la RT-PCR pueden aplicarse a todos estos virus, y se utilizan sistemáticamente en determinados sectores de la industria acuícola de explotación de crustáceos. En cuanto a los agentes causales de otras enfermedades de la lista de la OIE, se han mencionado en la bibliografía o se dispone comercialmente de sondas de ADN específico marcadas de forma no radiactiva, para ser aplicadas en formatos de transferencia puntual con hemolinfa o extractos de tejidos o para ser utilizadas con cortes histológicos de rutina aplicando la ISH.

Las muestras tomadas para las pruebas moleculares o basadas en anticuerpos destinadas al diagnóstico de enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE pueden combinarse formando muestras compuestas de no más de cinco ejemplares por muestra compuesta de juveniles, subadultos y adultos. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las postlarvas, para disponer de suficiente material de muestra (antígeno para las pruebas basadas en anticuerpos o ácido nucleico extraído para las pruebas moleculares, para llevar a cabo una prueba diagnóstica) puede ser necesario un mayor número de ejemplares (como unos 150 o más huevos o larvas o 50 a 150 postlarvas, en función del tamaño y la edad)

5.1. Pruebas basadas en anticuerpos

5.1.1. Producción de antisueros y de anticuerpos policlonales de conejo anti- virus de crustáceos

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

5.1.2. Antisueros anti-bacterias de crustáceos

No aplicable a las enfermedades de la lista actual de la OIE.

5.1.3. Procesado y almacenaje de los sueros inmunes

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

5.1.4. Anticuerpos monoclonales desarrollados de ratón anti-virus y bacterias de los crustáceos

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

5.2. Microscopía directa

Las muestras destinadas al examen mediante microscopía directa deben examinarse cuanto antes tras obtenerlas. Deben utilizarse ejemplares vivos siempre que sea posible, o bien ejemplares frescos, refrigerados o fijados en formalina tamponada al 10% cuando no se disponga de ejemplares vivos. Si se dispone de un laboratorio de campo adecuado, debe utilizarse para procesar y examinar las muestras cerca del lugar donde se hayan obtenido.

5.3. Técnicas histológicas

Se extraen camarones (u otros crustáceos decápodos) por el medio que del que se disponga y causándoles el mínimo estrés posible por manipulación. Se fijan los camarones (u otros crustáceos decápodos) al lateral del depósito o estanque o bien se transportan al laboratorio en un recipiente lleno de agua bien oxigenada. Se proporciona la suficiente aireación al recipiente si los camarones (u otros crustáceos decápodos) van a dejarse durante un corto periodo de tiempo antes de la verdadera fijación. Para el estudio de camarones (u otros crustáceos decápodos) presuntamente enfermos, deben escogerse los que estén moribundos, presenten cambios de color, comportamientos anómalos o anomalías de cualquier tipo, excepto cuando se tomen muestras destinadas a evaluar el número de casos de la enfermedad (como la estimación de la prevalencia de la enfermedad), en cuyo caso el método de selección preferible es el muestreo aleatorio.

- i) Se tiene preparada una cantidad suficiente de fijador. Por norma general, deben utilizarse como mínimo diez volúmenes de fijador por cada volumen de muestra de tejido (es decir, una muestra de 10 g de camarón [u otro crustáceo decápodo] requeriría 100 ml de fijador).
- ii) Fijador AFA (alcohol, formalina, ácido acético) de Davidson

El fijador AFA de Davidson se recomienda para la mayoría de aplicaciones histológicas. Este fijador es rápido, reduce las alteraciones autolíticas de los crustáceos decápodos (es decir, sobre todo en el camarón peneido, *Macrobrachium rosenbergii*, en las langostas del género *Panilurus*, y en otros crustáceos decápodos de piscifactoría de las zonas tropicales y subtropicales), y su contenido ácido descalcifica la cutícula. La fórmula para 1 litro de fijador AFA de Davidson es la siguiente:

330 ml de alcohol etílico al 95%
220 ml de formalina* al 100% (una solución acuosa saturada de formaldehído al 37–39%)
115 ml de ácido acético glacial**
335 ml de agua de grifo (en el caso de los crustáceos marinos puede sustituirse por agua de mar)

Se guarda el fijador en botellas de vidrio o de plástico con tapones de seguridad a temperatura ambiente.

* No utilizar formalina al 10% prefabricada para preparar el fijador AFA de Davidson, puesto que el contenido en formalina del fijador AFA de Davidson será insuficiente para proporcionar una fijación satisfactoria.

** No sustituir el ácido acético por otros ácidos, como el HCl. Los cortes histológicos preparados a partir de una solución de HCl-Davidson no son adecuados para la tinción histológica de rutina con hematoxilina y eosina.

- iii) Procedimientos de fijación con el fijador AFA de Davidson

- *En el caso de las larvas y las postlarvas que son demasiado pequeñas como para inyectarles fácilmente fijador mediante una jeringa de tuberculina:* Se utiliza una malla de orificios muy pequeños o una pipeta Pasteur, y se seleccionan y cogen los ejemplares. Se sumergen los camarones (u otros crustáceos decápodos) escogidos directamente en el fijador. Se fijan durante 12-24 horas y a continuación se transfieren a una solución de alcohol etílico al 70%, donde se dejan almacenados.
- *En el caso de postlarvas más grandes y de juveniles muy pequeños que son demasiado pequeños como para inyectarles el fijador:* Se seleccionan y cogen los ejemplares. Se utiliza una aguja o unas pinzas de punta fina para realizar una incisión en la cutícula e inmediatamente se sumergen los camarones (u otro crustáceo decápodo) escogidos directamente en el fijador. Se fija durante 12-24 horas y a continuación se transfiere a una solución de alcohol etílico al 50-70%, donde se dejan almacenados.
- *En el caso de postlarvas juveniles y adultos más grandes:* Se inyecta fijador (se utiliza una proporción volumen/peso del 5-10%) mediante aguja y jeringa (el calibre de la aguja depende del tamaño del camarón [u otro crustáceo decápodo], de modo que se utiliza una aguja de 41 mm de diámetro externo en el caso de postlarvas y juveniles pequeños) en el camarón (u otro crustáceo decápodo) vivo.

El hepatopáncreas (HP) debe inyectarse en primer lugar en dos o más puntos, con un volumen de fijador suficiente como para que pase a tener un color blanco a naranja (cuando se utiliza fijador AFA de Davidson); a continuación, se inyecta fijador en las zonas adyacentes al cefalotórax, y en el interior de la zona abdominal anterior y la zona abdominal posterior.

El fijador debe repartirse entre las distintas zonas, y la cefalotorácica, sobre todo el HP, debe recibir más cantidad que la zona abdominal.

Un buen método para garantizar una fijación suficiente es inyectar un equivalente del 5-10% del peso del camarón (u otro crustáceo); todos los signos vitales deben cesar rápidamente, y debe aparecer un visible cambio de color en las zonas inyectadas.

Inmediatamente después de la inyección, se corta la cutícula con una tijeras de disección, desde el sexto segmento abdominal hasta la base del pico, prestando especial atención a no cortar demasiado profundamente para no llegar al tejido subyacente. La incisión en la zona cefalotorácica debe ser justo lateral a la línea media dorsal, mientras que la de la zona abdominal debe ser aproximadamente central-lateral.

- *En el caso de los camarones (y la mayoría de los demás crustáceos) de más de ~12 g:* Tras la inyección del fijador, el cuerpo debe biseccionarse transversalmente, al menos una vez, justo posterior a la unión abdomen/cefalotórax, y (opcionalmente) central-abdominalmente.
- *En el caso de los crustáceos muy grandes (como langostas, cangrejos, peneidos adultos, Macrobrachium rosenbergii adultos, ciertas especies y estadios de cangrejos, etc.):* Los órganos de interés deben extirparse tras la inyección del fijador. A continuación, la fijación de estas muestras de tejidos se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente.

Tras la inyección, las incisiones y la bisección/trisección, o la extirpación de los órganos de interés, se sumerge el ejemplar en el fijador (se utiliza una proporción de fijador/tejido de 10/1).

Se deja que la fijación se produzca a temperatura ambiente durante 24-72 horas en función del tamaño del crustáceo que se desee conservar. En el caso del fijador AFA de Davidson pueden aplicarse periodos de fijación más largos para descalcificar por completo el caparazón de cangrejos, langostas, cangrejos de río, etc.

Tras la fijación, los ejemplares deben transferirse a una solución de alcohol etílico al 70%, donde pueden guardarse indefinidamente.

En el momento de extraerlos, se anotan todos los datos de los ejemplares: observaciones macroscópicas del estado del crustáceo, la especie, la edad, el peso, la procedencia (savage o, en el caso de proceder de acuicultura, número de estanque o depósito, número de población, etc.) y cualquier otra información relevante que pueda ser necesaria en el futuro.

La etiqueta debe permanecer con los ejemplares en el mismo recipiente, durante la fijación, el almacenaje y el transporte al laboratorio. Se utiliza siempre un lápiz de mina blanda del n° 2 y papel resistente al agua (lo recomendable es el papel plastificado; nunca deben utilizarse plumas ni bolígrafos, puesto que el alcohol disuelve la tinta).

iv) Transporte y envío de las muestras conservadas

Dado que no pueden enviarse por correo ni mensajería grandes volúmenes de alcohol, se recomiendan los siguientes métodos: Sacar los ejemplares de la solución de alcohol etílico al 70%. En el caso de las larvas, las postlarvas o los juveniles pequeños, utilizar viales de plástico a prueba de fugas y con tapón de rosca, si se dispone de ellos; si deben utilizarse viales de vidrio, deben envolverse para que no se rompan. En el caso de ejemplares más grandes, las muestras se envuelven con papel de cocina cubriéndolas por completo (no debe utilizarse algodón natural ni procesado). Se colocan los ejemplares envueltos con papel de cocina en una bolsa de plástico con cierre y se cubren de alcohol etílico al 70%. Se introduce la etiqueta y se cierra la bolsa. Dicha bolsa se introduce en una segunda bolsa con cierre. Para el envío, pueden colocarse varias de estas bolsas en un recipiente resistente y a prueba de aplastamiento debidamente etiquetado (para conocer los detalles, consúltase el Capítulo 5.4. del *Código Acuático*).

5.4. Microscopía electrónica de transmisión o de barrido

La microscopía electrónica (ME de transmisión o de barrido) es una valiosa herramienta para el estudio de las enfermedades de los crustáceos. Sin embargo, los métodos basados en la ME solo existen como métodos confirmativos para ciertas enfermedades y no se usan de forma sistemática para el diagnóstico de las enfermedades de la lista de la OIE. Por eso, la aplicación de los mismos se limita a fines específicos (consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*).

5.5. Utilización de técnicas moleculares y basadas en anticuerpos para el análisis y el diagnóstico de confirmación

5.5.1. Preparación y tipos de muestras

Las muestras escogidas para las pruebas de diagnóstico basadas en el ácido nucleico o en anticuerpos deben manipularse y empaquetarse (en bolsas o botellas nuevas de plástico especiales para muestras) con mucho cuidado, con el fin de minimizar la probabilidad de contaminación cruzada entre las muestras tomadas de distintas poblaciones (salvajes o de acuicultura), depósitos, tanques, explotaciones, etc. Deben utilizarse bolsas o botellas nuevas de plástico especiales para muestras). Dentro de cada paquete o recipiente que contenga cada conjunto de muestras debe introducirse una etiqueta impermeable que indique los datos correspondientes escritos con un lápiz del n° 2.

Algunos de los métodos útiles para conservar y transportar las muestras tomadas para pruebas moleculares o basadas en anticuerpos son los siguientes:

- *Ejemplares vivos*: pueden procesarse en el campo o enviarse al laboratorio de diagnóstico para que sean analizados.
- *Hemolinfa*: Este tejido es la muestra preferida para ciertas pruebas diagnósticas moleculares y basadas en anticuerpos (consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad). Pueden tomarse muestras mediante aguja y jeringa por punción cardíaca, del hemocele (es decir, el seno ventral en el caso de los peneidos) o de un apéndice cortado, y transferirse de inmediato a un tubo que esté medio lleno de etanol al ~90–95% o de un conservante adecuado (por ejemplo, RNALater®) para conservar la muestra).
- *Ejemplares conservados en hielo o refrigerados*: Es el caso de los ejemplares que pueden transportarse al laboratorio para ser analizados en un plazo de 24 horas. Se empaquetan las muestras en bolsas especiales para este fin envueltas por una cantidad suficiente de hielo húmedo que rodee las muestras embolsadas, en una caja aislada con Styrofoam™¹, y se envían al laboratorio.
- *Ejemplares enteros congelados*: Se escogen ejemplares vivos según los criterios descritos en cada capítulo dedicado a cada enfermedad en este *Manual Acuático*, se congelan rápidamente en el campo mediante hielo seco triturado, o se congelan en laboratorios de campo utilizando un congelador mecánico a -20 °C o menos. Se prepara e introduce la etiqueta en el recipiente que contiene las muestras, se empaquetan las muestras con una cantidad suficiente de hielo seco en una caja aislada con Styrofoam™, y se envían al laboratorio.
- *Muestras conservadas en alcohol*: En las zonas donde el almacenaje y envío de muestras congeladas resulta problemático, puede utilizarse etanol al 90-95% para conservar, almacenar y transportar ciertos tipos de muestras para pruebas moleculares. Las muestras conservadas en alcohol en general no sirven para las pruebas basadas en anticuerpos. Los ejemplares enteros (cualquier estadio de vida siempre que el ejemplar no pese más de 2-3 g), los tejidos extirpados (es decir, los pleópodos) de crustáceos grandes y la hemolinfa pueden conservarse en etanol al 90-95%, y a continuación empaquetarse para el envío según los métodos descritos en el apartado 5.3, párrafo iv (para conocer otros detalles sobre el transporte internacional de este tipo de muestras, consúltense el Capítulo 5.4 del *Código Acuático*).

5.5.2. Conservación del ARN y el ADN en los tejidos

Para las pruebas de diagnóstico de rutina mediante PCR o RT-PCR, así como para las pruebas de transferencia de puntos con sondas de ADN, las muestras deben prepararse de modo que conserven el ácido nucleico del agente patógeno. Para la mayor parte de las finalidades, la conservación de las muestras en alcohol (70-100%) es el método de elección para posteriores pruebas moleculares. Existen otros productos (como el RNAlater, distintos tampones de lisis, etc.) a la venta para el mismo fin, y se proporciona información sobre los mismos en los capítulos dedicados a cada enfermedad de este *Manual Acuático*, en los casos en que es aplicable.

5.5.3. Extracción de ADN

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

5.5.4. Extracción de ARN

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

5.5.5. Preparación de portas para la hibridación *in-situ*

Consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

6. Información adicional propuesta

Para conocer las recomendaciones sobre cualquier otro dato que pueda requerirse o que pueda ayudar al laboratorio de diagnóstico a determinar cuál es la prueba/s más adecuada para las muestras recibidas, consúltense los capítulos dedicados a cada enfermedad en este *Manual Acuático*.

1 La mención de productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

BIBLIOGRAFÍA CLAVE PARA LECTURA COMPLEMENTARIA

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA.

CORSIN F., GEORGIADIS M., HAMMELL K.L. & HILL B. (2009). Guide for Aquatic Animal Health Surveillance. The World Organisation for Animal Health (OIE). 114 p.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANIHOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.

JOHNSON P.T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A Model for the Decapoda. Prager, New York, USA, 440 pp.

HOLTHUIS L.B. (1980). FAO Species Catalogue. Vol. 1 – Shrimp and Prawns of the World. FAO Fisheries Synopsis No. 125, FAO, Rome, Italy, 271 p.

LIGHTNER D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 p.

LIGHTNER D.V. (1996). The penaeid shrimp viruses IHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.

LOTZ J.M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 405–413.

PEREZ FARFANTE I. & KENSLEY B.F. (1997). The Penaeoid and Sergestoid Shrimps and Prawns of the World: Keys and Diagnosis for the Families and Genera. Editions du Museum national d'Histoire Naturelle, Paris, France, **175**, 1–233.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2012). Chapter 1.3. Diseases listed by the OIE. In: Aquatic Animal Health Code, Fifteenth Edition. OIE, Paris, France.

*
* *

PLAGA DEL CANGREJO DE RÍO (*APHANOMYCES ASTACI*)

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la plaga del cangrejo de río se considerará una infección del cangrejo de río por *Aphanomyces astaci* Schikora.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agentes patógenos, cepas del agente

El agente patógeno de la plaga del cangrejo de río es *Aphanomyces astaci*. *Aphanomyces astaci* forma parte del grupo de microorganismos que a menudo se denominan hongos acuáticos. Aunque se han considerado hongos durante mucho tiempo, este grupo, los Oomicetos, ahora se consideran protistas y se clasifican, junto con las diatomeas y las algas marrones, dentro del grupo llamado Estramenópilos o Cromistas

Se han descrito cuatro grupos (A-D) de *A. astaci* en base a una polimorfismo mediante una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN (RAPD-PCR) (Huang *et al.*, 1994; Dieguez-Urbeondo *et al.* 2005): el grupo A (las denominadas cepas *Astacus*) está formado por varias cepas que se aislaron de *Astacus astacus* y de *Astacus leptodactylus*; estas cepas se considera que han estado en Europa durante mucho tiempo. El Grupo B (cepas *Pacifastacus* I) está formado por cepas tanto de *A. astacus* de Suecia como por cepas de *Pacifastacus leniusculus* del lago Tahoe, EE.UU. Es probable que *P. leniusculus* importados hayan introducido *A. astaci* e infectado a *A. astacus* nativos de Europa. El Grupo C (cepas *Pacifastacus* II) está formado por una cepa de *P. leniusculus* aislada del lago Pitt, Canadá. Otra cepa (Pc), aislada de *Procambarus clarkii*, en España, se halla en el grupo D (cepa *Procambarus*). Esta cepa presenta curvas de temperatura/crecimiento con temperaturas óptimas más altas que las de las cepas del norte de Europa (Dieguez Uribeondo *et al.*, 1995). Los *Aphanomyces astaci* que han existido en Europa durante muchos años (cepas del grupo A) parecen ser menos patógenos que cepas introducidas más recientemente con cangrejos de Norteamérica desde los años 60.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Aunque *A. astaci* no es un parásito en sentido estricto y crece bien en medios artificiales en el laboratorio (Alderman y Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1988), no es fácil que sobreviva mucho tiempo en un entorno natural, en ausencia de un hospedador adecuado.

Las zoosporas de *Aphanomyces astaci* siguen siendo móviles durante incluso 3 días y los quistes sobreviven durante 2 semanas en agua destilada (Svensson y Unestam, 1975; Unestam, 1966). Dado que *A. astaci* puede crecer a lo largo de tres ciclos de eclosión de las zoosporas, la esperanza máxima de vida fuera de un hospedador podría ser de varias semanas. Las esporas siguen siendo viables en una suspensión de esporas mantenida a 2°C durante meses (Unestam, 1966).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Aphanomyces astaci, tanto si se halla en un cultivo como en cangrejos infectados, muere tras una corta exposición a temperaturas de 60°C o de -20°C (o inferiores) durante 48 horas (o más) (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002). El hipoclorito de sodio y los iodóforos son eficaces para desinfectar el equipo contaminado, aunque este debe lavarse antes de la desinfección, puesto que se ha observado que la presencia de materia orgánica disminuye la eficacia de los iodóforos (Alderman y Polglase, 1985). También es eficaz un secado minucioso del equipo (>24 horas), puesto que *A. astaci* no es resistente a la desecación.

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *A. astaci* es sencillo: las hifas vegetativas invaden y se ramifican a través de los tejidos del hospedador, y terminan produciendo esporangios extramatriciales que liberan esporas primarias ameboideas. Estas esporas inicialmente se enquistan, pero después liberan una zoospora biflagelada (zoospora secundaria). Las zoosporas biflageladas nadan en la columna de agua y, al encontrarse con un hospedador susceptible, se unen a él y germinan produciendo hifas vegetativas invasivas. Las zoosporas que nadan libremente parecen resultar atraídas quimiotácticamente por la cutícula del cangrejo de río (Cerenius y Söderhäll, 1984a) y a menudo se depositan sobre la cutícula cerca de una herida (Nyhlen y Unestam, 1980). Las zoosporas son capaces de enquistarse y resurgir en repetidas ocasiones alargando el periodo durante el cual pueden ser infectivas (Cerenius y Söderhäll, 1984b). La capacidad de crecimiento y de esporulación depende de la cepa y de la temperatura (Dieguez Uribeondo *et al.*, 1995).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Hasta ahora, todas las especies de cangrejo de agua dulce se han considerado susceptibles a la infección por *A. astaci*. La evolución de cada infección depende de la especie. Todos los estadios de las especies europeas de cangrejo, incluidos el cangrejo de río de patas rojas (*Astacus astacus*) del noreste de Europa, el cangrejo de patas blancas (*Austropotamobius pallipes*) del sureste y este de Europa, el cangrejo de los torrentes (*Austropotamobius torrentium*) del suroeste de Europa, y el cangrejo de patas delgadas (*Astacus leptodactylus*) de Europa del este y de Asia Menor, son muy susceptibles (Alderman, 1996; Alderman *et al.*, 1984; Rahe y Soylu, 1989; Unestam, 1969b; 1976; Unestam y Weiss, 1970). Las inoculaciones de desafío llevadas a cabo en el laboratorio han puesto de manifiesto que las especies australianas de cangrejos también son muy susceptibles (Unestam, 1976). Los cangrejos de Norteamérica, tales como el cangrejo del Pacífico (*Pacifastacus leniusculus*), el cangrejo de las marismas (*Procambarus clarkii*) y *Orconectes* spp. resultan infectados por *A. astaci*, pero en condiciones normales esta infección no causa enfermedad clínica ni la muerte. Todas las especies de cangrejos de Norteamérica estudiadas hasta ahora se ha observado que son susceptibles a la infección, según ha demostrado la presencia del agente patógeno en la cutícula del hospedador (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969b; Unestam y Weiss, 1970) y por tanto actualmente se asume que ocurre lo mismo en cualquier otra especie de cangrejo de Norteamérica.

El único otro crustáceo que se sabe que es susceptible a la infección por *A. astaci* es el cangrejo chino (*Eriocheir sinensis*), pero dicha susceptibilidad solo se ha observado en condiciones de laboratorio (Benisch, 1940).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los estadios de vida deben considerarse susceptibles a la infección

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Especies muy susceptibles: en los brotes naturales de la plaga del cangrejo de río, pueden encontrarse cangrejos moribundos y muertos de gran variedad de tamaños (y por tanto, de edades).

Especies de cangrejo de Norteamérica: la prevalencia de la infección tiende a disminuir en los animales que han mudado recientemente (B. Oidtmann, datos no publicados). Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios sistematizados a gran escala que se comprometieran a corroborar estas observaciones. Los juveniles de cangrejo de río pasan por varias mudas al año, y los adultos suelen mudar al menos una vez al año en los climas templados. Por tanto, los animales que llevan un tiempo sin mudar pueden presentar una mayor prevalencia que los que han mudado recientemente.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El primer tejido en infectarse es la cutícula del exoesqueleto. La cutícula blanda, dado que se encuentra en la parte ventral del abdomen y en las articulaciones que lo rodean, es la primera en resultar afectada. En las especies europeas de cangrejo, que son muy susceptibles, el agente patógeno a menudo consigue penetrar hasta la lámina basal situada bajo la capa celular de la epidermis. Desde ahí, *A. astaci* se disemina por todo el organismo invadiendo principalmente el tejido conjuntivo y senos hemáticos; sin embargo, pueden resultar afectados todos los tejidos.

En las especies de cangrejo de Norteamérica, la infección no suele pasar de la cutícula.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se ha estudiado la susceptibilidad a la infección por *A. astaci* y el desarrollo de la enfermedad en varias especies de cangrejo de Norteamérica (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969a; Unestam y Söderhäll, 1977). Hasta ahora, la infección se ha demostrado sin excepción en todas las especies de cangrejo de Norteamérica analizadas hasta la fecha. Los animales estudiados solían estar clínicamente sanos.

Esta hipótesis está respaldada por un reciente estudio en el que se ha observado que la probabilidad de detectar un cangrejo positivo para *A. astaci* aumenta significativamente al aumentar la longitud del cangrejo. Además, las hembras de cangrejos grandes expresaban niveles significativamente más altos de *A. astaci* que los machos grandes (Vrålstad *et al.*, 2011). Es probable que los resultados reflejen la que la frecuencia de muda de los animales adultos más grandes es menor a la de los inmaduros, más pequeños (Reynolds, 2002), y que las hembras adultas tiendan a mudar incluso con menor frecuencia que los machos adultos (Skurdal y Qvenild, 1986).

De acuerdo con las observaciones realizadas en especies de cangrejo de Norteamérica, parece razonable suponer que todas las especies de cangrejo originarias de Norteamérica pueden resultar infectadas por *A. astaci* sin desarrollar enfermedad clínica y que, por tanto, pueden actuar como portadores del agente patógeno de por vida.

2.2.6. Vectores

Existen indicios de campo y experimentales fiables de que los desplazamientos de peces desde zonas donde la plaga del cangrejo de río está activa pueden transmitir la infección de una cuenca a otra (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2006).

Fomites: *A. astaci* también puede transmitirse a través de equipo contaminado (redes, botas, ropa, etc.).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Muchos estudios han puesto de manifiesto que las especies de cangrejo originarias de Norteamérica pueden actuar como portadoras de *A. astaci* (como el cangrejo señal, el cangrejo de los canales o el cangrejo de las marismas (Alderman *et al.*, 1990; Oidtmann *et al.*, 2006). Dado que todas las especies de Norteamérica analizadas hasta ahora han resultado ser posibles portadoras de la enfermedad, también se considera que las especies de Norteamérica no analizadas hasta ahora probablemente actuarán como posibles portadoras de *A. astaci*. Se han extendido especies de Norteamérica por varias regiones de Europa. Un informe reciente de Finlandia también sugiere que las poblaciones de cangrejo de patas rojas de baja densidad en medios de agua fría podrían estar afectadas a bajos niveles por una infección crónica (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Las principales vías de transmisión del agente patógeno son 1) el desplazamiento de cangrejos infectados, 2) el desplazamiento de esporas con agua o equipo contaminados, como puede ocurrir durante los desplazamientos de los peces, o 3) la colonización de hábitats por parte de especies de cangrejo de Norteamérica.

La transmisión entre cangrejos tiene lugar, en pocas palabras, mediante la liberación de zoosporas de un animal infectado y la inserción de dichas zoosporas a un cangrejo no inmune. Las zoosporas de *A. astaci* nadan activamente en la columna de agua y se ha observado que presentan una quimiotaxis positiva hacia el cangrejo (Cerenius y Söderhäll, 1984a).

La principal vía de transmisión de la plaga del cangrejo de río en Europa entre los años 60 y el año 2000 ha sido la población activa de cangrejos de Norteamérica en explotaciones de cangrejo salvaje, o bien fugas desde dichas explotaciones (Alderman, 1996; Dehus *et al.*, 1999). Hoy en día, la transmisión tiene lugar principalmente debido a la expansión de las poblaciones de cangrejo de Norteamérica, al co-transporte accidental de ejemplares y a la liberación de cangrejo de Norteamérica a la naturaleza por parte de particulares (Edsman, 2004; Oidtmann *et al.*, 2005).

La colonización por parte de especies de cangrejo de Norteamérica portadoras de *A. astaci* de hábitats inicialmente ocupados por especies muy susceptibles probablemente dará lugar a una epidemia en los animales que sean muy susceptibles. La velocidad de transmisión depende, entre otros factores, de la prevalencia de la infección en la población de cangrejos de Norteamérica.

El transporte de pescado podría facilitar la transmisión de *A. astaci* de varias formas, como por ejemplo mediante la presencia de esporas en el agua de transporte, la presencia de *A. astaci* que haya sobrevivido en la piel del pescado, el co-transporte de ejemplares de cangrejos infectados, o una combinación de los tres factores (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). También existen indicios circunstanciales de la transmisión por equipo contaminado (redes, botas, ropa, etc.).

2.3.2. Prevalencia

En las especies europeas de cangrejo muy susceptibles, la exposición a esporas de *A. astaci* se considera que conlleva la infección y finalmente la muerte. La dosis mínima infecciosa todavía no se ha establecido, pero podría ser tan baja como de una sola espora por animal (B. Oidtmann, datos no publicados). La prevalencia de la infección dentro de una población en el estadio inicial de un brote podría ser baja (podrían estar afectados solo uno o unos pocos animales de la población de un río). Sin embargo, el agente patógeno se amplifica en los animales afectados, y a continuación se libera al agua, lo cual suele conllevar un 100% de mortalidad en una población contigua. La velocidad de transmisión desde los animales afectados inicialmente depende de varios factores, uno de los cuales es la temperatura del agua (Oidtmann *et al.*, 2005). Por tanto, el tiempo que transcurre entre la introducción inicial del agente patógeno en una población y la observación de mortalidades detectables en los cangrejos puede variar mucho y puede oscilar entre unas pocas semanas y unos meses. La prevalencia de la infección aumentará progresivamente a lo largo de este periodo y normalmente alcanzará el 100%. Los datos de una población de cangrejo de patas rojas de Finlandia que sufrió un brote de plaga del cangrejo de río en 2001, de la que se llevó a cabo un seguimiento durante los años posteriores, sugiere que en poblaciones de cangrejo de patas rojas de baja densidad, la propagación por la población hospedadora podría prolongarse a lo largo de un periodo de tiempo de varios años.

Los niveles de prevalencia en el cangrejo de Norteamérica parecen variar mucho. Unos pocos estudios sugieren que es posible observar niveles de prevalencia en cualquier punto situado entre el 0 y el 100% (Oidtmann *et al.*, 2006).

2.3.3. Distribución geográfica

Las primeras observaciones de grandes mortalidades en cangrejos se remontan a 1860 en Italia (Ninni, 1865; Seligo, 1895). A partir de entonces hubo otras, en las que no estaba afectada ninguna otra especie acuática, localizadas en la zona de la frontera franco-alemana en el tercer cuarto del siglo XIX. Desde ahí se produjo una propagación constante de la infección, principalmente en dos direcciones: hacia el sur por el Danubio hasta adentrarse en los Balcanes, y hacia el Mar Negro, y por la llanura del norte de Alemania en dirección a Rusia, y desde ahí hacia el sur hasta llegar al Mar Negro y hacia el noroeste hasta Finlandia, alcanzando Suecia en 1907. En los años 60 se describieron los primeros brotes en España, y en los años 80 se produjeron otras propagaciones de la infección a las islas británicas, Turquía, Grecia y Noruega (Alderman, 1996). El reservorio de las infecciones iniciales del siglo XIX nunca se determinó; no se supo que se había introducido *Orconectes* spp. hasta los años 1890, pero las propagaciones posteriores de los años 1960 están muy vinculadas a los desplazamientos de cangrejos de Norteamérica introducidos más recientemente con fines de explotación comercial (Alderman, 1996). Fue casi imposible evitar fugas de estas nuevas especies, y hoy en día *Pacifastacus leniusculus* y *Procambarus clarkii* están ampliamente aclimatadas en muchas partes de Europa.

Dado que el cangrejo de Norteamérica sirve de reservorio de *A. astaci*, todas las zonas en las que se encuentra cangrejo de Norteamérica se consideran zonas donde también hay *A. astaci* (a no ser que se demuestre lo contrario).

Australia y Nueva Zelanda nunca han experimentado ningún brote de plaga del cangrejo de río hasta la fecha, y actualmente se consideran libres de la enfermedad (interfaz WAHID de la web de la OIE, consultada en junio de 2011).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Cuando la infección alcanza en primer lugar una población no inmune de cangrejos susceptibles, se suele producir una mortalidad rápida de manera que en las zonas con altas densidades de cangrejo el fondo de los lagos, de los ríos y de los arroyos queda cubierto de cangrejos muertos y moribundos. Se extenderá rápidamente una franja de mortalidad río abajo desde el lugar del brote inicial, mientras que río arriba la propagación será más lenta. En los lugares en los que las poblaciones de cangrejos susceptibles son escasas, se producirán menos zoosporas, la propagación de la enfermedad será más lenta y la evidencia de mortalidad menos drástica. La temperatura del agua tiene algún efecto en la velocidad de propagación y esto es más evidente en las poblaciones de cangrejos de baja densidad, donde la transmisión de un animal a otro tarda más tiempo y la intensidad de la exposición será más baja. Las bajas temperaturas del agua y el número reducido de zoosporas se asocian a mortalidades más bajas y con una mayor variedad de signos clínicos en los animales infectados (Alderman *et al.*,

1987). Las observaciones de Finlandia sugieren que a bajas temperaturas del agua, el cangrejo de patas rojas puede resultar infectado durante varios meses sin desarrollar mortalidades perceptibles (S. Viljamaa-Dirks, datos no publicados).

En ocasiones muy infrecuentes, se han encontrado ejemplares aislados de especies muy susceptibles después de que haya tenido lugar un brote de plaga del cangrejo de río en un río o lago. Lo más probable es que esto se deba a que estos animales no han resultado expuestos durante el brote (pueden haberse quedado en un afluente de un río o lago, o bien en una parte del río o lago afectados a la que no han llegado esporas; estos ejemplares también pueden haber estado enterrados durante la ola de la plaga del cangrejo). Sin embargo, se ha descrito que existen cepas poco virulentas de la plaga del cangrejo que persisten en un curso de agua, y que se mantienen vivas mediante una infección débil en la población residual (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Aunque en muchas cuencas europeas quedan poblaciones residuales de especies de cangrejo susceptibles, las densas poblaciones que existieron hace 150 años son ahora mucho menores (Alderman, 1996; Souty-Grosset *et al.*, 2006). Las poblaciones de cangrejo susceptibles podrían reestablecerse, pero una vez la densidad de la población y la distribución geográfica sea suficiente como para que animales susceptibles entren en contacto con la infección, tendrán lugar nuevos brotes de plaga del cangrejo en forma de mortalidades a gran escala.

2.3.5. Factores medioambientales

En condiciones de laboratorio, el intervalo de temperaturas preferido para el crecimiento de los micelios de *A. astaci* varía ligeramente en función de la cepa. En un estudio, en el que se compararon varias cepas de *A. astaci* que habían sido aisladas de distintas especies de cangrejo, se observó crecimiento miceliar a temperaturas de entre 4 y 29,5°C, y la cepa aislada de *Procambarus clarkii* creció mejor a temperaturas más altas que las óptimas para otras cepas. La eficiencia de la esporulación también fue alta en todas las cepas estudiadas a temperaturas de entre 4 y 20°C, pero fue claramente inferior en las cepas no de *P. clarkii* a 25°C y ausente a 27°C. Por el contrario, a 27°C seguía habiendo esporulación de la cepa *P. clarkii*. La proporción de zoosporas móviles (de entre todas las zoosporas observadas en una suspensión de zoosporas) fue de casi el 100% a temperaturas de entre 4 y 18°C, disminuyó a aproximadamente el 60% a 20°C y a alrededor del 20% a 25°C, pero a 27°C no se encontró ninguna espora móvil (Dieguez Uribeondo *et al.*, 1995).

Los datos de campo indican que se producen brotes de plaga del cangrejo a muy variadas temperaturas, y al menos en el intervalo de temperaturas que va de los 4 a los 20°C. La velocidad de transmisión dentro de una población depende de varios factores, como la temperatura del agua. En un intervalo de temperatura de entre 4 y 16°C, la velocidad de propagación de una epidemia se potencia a mayores temperaturas del agua. A temperaturas del agua más bajas, la curva de la epidemia puede aumentar muy lentamente y el periodo durante el cual se observan mortalidades puede ser de varios meses (B. Oidtmann, datos no publicados).

En agua tamponada bidestilada, se produce esporulación a pH de entre 5 y 8, siendo el intervalo óptimo el comprendido entre un pH de 5 y de 7. El intervalo de pH óptimo para la natación de las zoosporas parece ser el situado entre 6 y 7,5, y el intervalo máximo es el que va de 4,5 a 9,0 (Unestam, 1966).

La salida de las esporas está influida por la presencia de ciertas sales en el agua. El CaCl₂ estimula la salida de las zoosporas de los quistes primarios, mientras que el MgCl₂ tiene un efecto inhibitor. En general, la salida de las zoosporas se desencadena por la transferencia del micelio vegetativo a un medio en que no hay nutrientes o bien se encuentran en una baja concentración (Cerenius y Söderhäll, 1984b).

2.4. Control y prevención

Una vez *A. astaci* se ha introducido en la naturaleza en una población de especies de cangrejo muy susceptibles, la transmisión dentro de la población afectada no se puede controlar. Por tanto, es crucial la prevención de la introducción. Para evitar las principales vías de introducción, es necesario aplicar las siguientes medidas:

1. Deben evitarse los desplazamientos de cangrejos infectados vivos o muertos, de agua, equipo o cualquier otro objeto potencialmente contaminado que pudiera vehicular el agente patógeno de un lugar infectado a otro no infectado donde vivan especies susceptibles.
2. Al planificar transferencias de peces, debe tenerse en cuenta si el agua original puede contener cangrejos infectados (incluidos cangrejos de Norteamérica portadores).
3. Todo desplazamiento de peces procedentes de un lugar donde esté teniendo lugar una plaga del cangrejo conlleva un alto riesgo de propagación y en general debe evitarse.
4. Al planificar desplazamientos de peces procedentes de unas aguas que contengan cangrejo de Norteamérica, los métodos de extracción de peces empleados en el lugar de origen deben garantizar

que: a) no se co-transporten accidentalmente cangrejos; b) el agua de transporte no contenga esporas de *A. astaci*; c) se desinfecte el equipo entre un uso y el siguiente; d) el envío no se contamine durante el transporte.

5. Debe evitarse la liberación de cangrejo de Norteamérica a la naturaleza en zonas donde habite cualquiera de las especies que son muy susceptibles. Una vez liberados, los cangrejos de Norteamérica tiende a propagarse, a veces a grandes distancias. Por tanto, antes de planificar cualquier liberación, hay que tener muy en cuenta las posibles consecuencias de dicha liberación a largo plazo, puesto que pueden terminar afectadas poblaciones de cangrejos muy susceptibles que se encuentren incluso a grandes distancias del punto en el que se ha llevado a cabo la liberación.
6. Las instalaciones de acuicultura para la explotación de cangrejo casi nunca son adecuadas para prevenir la fuga de cangrejos. Por tanto, debe estudiarse con mucho detalle si estas instalaciones son realmente necesarias.

Ciertas vías de introducción, como la liberación de cangrejo de Norteamérica por parte de particulares, son difíciles de controlar.

2.4.1. Vacunación

Actualmente no existe ningún indicio de que las vacunas ofrezcan una protección a largo plazo a los crustáceos, pero incluso en el caso de que sí la ofrecieran, la vacunación de poblaciones naturales de cangrejo es imposible.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Actualmente no se conoce ningún tratamiento que permite tratar con éxito las especies de cangrejo muy susceptibles, una vez infectadas.

2.4.3. Inmunoestimulación

Actualmente no se conoce ningún inmunoestimulante que permita proteger con éxito las especies de cangrejo muy susceptibles contra la infección y la consecuente enfermedad causadas por *A. astaci*.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

A lo largo de los 125 años que han pasado desde que tuvo lugar el primer brote de plaga del cangrejo de Europa, se han hallado pocos indicios de poblaciones resistentes de cangrejo europeo. Sin embargo, el hecho de que el cangrejo de Norteamérica no sea muy susceptible al desarrollo de la enfermedad clínica sugiere que la selección a favor de la resistencia podría ser posible y que podrían tener éxito los estudios de laboratorio en los que se utilizan cepas de *A. astaci* de patogenicidad atenuada. No obstante, actualmente no existe ningún dato publicado relativo a este tipo de estudios.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Se han utilizado cangrejos de Norteamérica en distintos países europeos para repoblar las reservas perdidas de cangrejo nativo. Sin embargo, dado que el cangrejo de Norteamérica es un posible hospedador de *A. astaci*, la repoblación con cangrejo de Norteamérica potenciaría la propagación de *A. astaci*. Dadas las altas tasas de reproducción y la tendencia de varias especies de cangrejos de Norteamérica a colonizar nuevos hábitats, la repoblación con especies de cangrejos de Norteamérica prevendría en gran medida el reestablecimiento de las especies de cangrejo nativas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No existen datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Existe poca información sobre la susceptibilidad de los huevos de cangrejo a la infección por *A. astaci*. Unestam y Söderhäll mencionan que ellos expusieron experimentalmente huevos de *Astacus astacus* y de *P. leniusculus* a suspensiones de zoosporas y no consiguieron inducir infección (Unestam y Söderhäll, 1977). No obstante, no se han publicado los detalles de estos estudios.

Aunque no se dispone de datos publicados, es improbable que la desinfección de larvas, una vez infectadas, funcione, puesto que *A. astaci* quedaría protegido de la desinfección por la cutícula del cangrejo, donde seguiría estando presente.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Al planificar la apertura de una piscifactoría de cangrejos de una especie muy susceptible, debe estudiarse muy detenidamente si en las proximidades de la zona escogida hay especies de cangrejo de Norteamérica o si podría haber poblaciones de cangrejos de Norteamérica río arriba (en el caso de aguas que procedan de los mismos cauces y en los casos en que se extraiga agua de dichos cauces), por mucho que se encuentren a una gran distancia. Si hay cangrejos de Norteamérica, será muy probable que la especie susceptible de la piscifactoría termine infectada.

En los lugares donde se cultive la especie muy susceptible deben seguirse las siguientes recomendaciones para evitar una introducción de *A. astaci* en el lugar:

1. Deben evitarse los desplazamientos de cangrejos infectados vivos o muertos, de agua, equipo o cualquier otro objeto potencialmente contaminado que pudiera vehicular el agente patógeno de un lugar infectado a otro no infectado donde vivan especies susceptibles.
2. Al planificar transferencias de peces, estas no pueden proceder de cauces u otras aguas que contengan cangrejos potencialmente infectados (ni poblaciones de cangrejo susceptible que actualmente estén pasando por un brote de plaga del cangrejo, ni cangrejos de Norteamérica portadores).
3. No deben traerse cangrejos de Norteamérica al lugar.
4. Los peces procedentes de fuentes de agua dulce desconocidas o de aguas en las que pueda haber cangrejos de Norteamérica o en las que pueda estar produciéndose un brote de plaga del cangrejo no deben utilizarse como cebo ni alimento para los cangrejos, a no ser que se hayan sometido a un tratamiento térmico que mate *A. astaci* (véase el apartado 2.1.3).
5. Todo equipo que llegue al lugar debe ser desinfectado.
6. Deben aplicarse medidas generales de bioseguridad (como controlar el acceso a las instalaciones, desinfectar las botas cuando se entra en el lugar, investigar las mortalidades si las hay o introducir animales vivos (cangrejos, peces) solo procedentes de lugares en los que se sepa que no hay plaga del cangrejo).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

En el caso de que se sospeche de un brote de plaga del cangrejo en una población de una especie de cangrejo muy susceptible, lo ideal es que el lote de cangrejos escogidos para estudiar la presencia de *A. astaci* esté formado por: a) cangrejos vivos que presenten signos de enfermedad, b) cangrejos vivos que parezcan estar todavía sanos y, c) cangrejos muertos que también pudieran ser adecuados, aunque esto dependerá de su estado.

Los cangrejos vivos deben transportarse en recipientes de poliestireno provistos de pequeños agujeros que permitan la aireación, o un recipiente equivalente. La temperatura del interior del recipiente no puede superar los 16°C.

El recipiente debe proporcionar un aislamiento contra las grandes diferencias de temperatura respecto al exterior. En épocas de calor, deben utilizarse bloques de congelador para evitar que se alcancen temperaturas nocivas para los animales. Estos bloques se pueden pegar al fondo del recipiente de transporte por la cara interna. Sin embargo, el cangrejo debe estar protegido del contacto directo con estos bloques, lo cual puede conseguirse utilizando, por ejemplo, cartón o varias capas de papel de periódico.

Los cangrejos deben transportarse en una atmósfera húmeda, por ejemplo usando virutas de madera/serrín, papel de periódico o hierba/heno, todo ello humedecido. A no ser que el agua de transporte esté suficientemente oxigenada, los cangrejos vivos no deben transportarse en agua, puesto que podrían ahogarse debido a la falta de oxígeno.

El periodo de tiempo transcurrido entre la toma de ejemplares vivos y la entrega al laboratorio no debe ser superior a las 24 horas.

En el caso de que en el lugar donde se sospeche de un brote solo se encuentren animales muertos, tal vez también sean adecuados para el diagnóstico. En función del estado en el que se encuentren, pueden: a) transportarse refrigerados (si parecen haber muerto muy recientemente), o b) sumergirse en etanol no metilado (concentración mínima del 70%; véase el apartado 3.2).

Los animales que presenten un estado avanzado de descomposición probablemente no darán resultados fiables, pero si no hay otros, incluso así podrían ser analizados.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

La utilización de cangrejos frescos es lo ideal, como se ha descrito anteriormente. Pero si por motivos prácticos no puede prepararse rápidamente el transporte de cangrejos recién muertos o moribundos, los ejemplares pueden fijarse en etanol (a un mínimo del 70%). No obstante, la fijación puede reducir la sensibilidad de la prueba. Lo ideal es que la proporción cangrejos:etanol sea de 1:10 (1 parte de cangrejos, 10 partes de etanol).

3.3. Combinación de varias muestras

No se recomienda.

3.4. Órganos y tejidos de elección

En especies muy susceptibles, se recomienda tomar una muestra de la cutícula abdominal blanda, que puede hallarse en la cara ventral del abdomen.

En las especies de cangrejo de Norteamérica, se recomienda tomar muestra de la cutícula abdominal blanda, de los urópodos y del telson.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El material autolítico no es adecuado para el análisis.

4. Métodos de diagnóstico

La aparición de grandes cantidades de cangrejos muertos pertenecientes a especies muy susceptibles, quedando el resto de la fauna acuática inalterada, suscita la sospecha de que la población podría estar afectada por la plaga del cangrejo. Los signos clínicos de la plaga del cangrejo consisten en cambios en el comportamiento y una gran variedad de lesiones externas visibles. Los principales métodos de diagnóstico de los que se dispone son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el aislamiento del agente patógeno en medios de cultivo seguido de la identificación. El aislamiento puede ser difícil y requiere que las muestras se encuentren en buenas condiciones cuando lleguen al laboratorio (Oidtmann *et al.*, 1999). Hoy en día se dispone de métodos moleculares que dependen menos de la rapidez de la entrega y pueden aplicarse a una mayor variedad de muestras que los métodos basados en el aislamiento del agente causal (Oidtmann *et al.*, 2006; Vrålstad *et al.*, 2009).

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Especies muy susceptibles

Los síntomas clínicos evidentes son extremadamente variables y dependen de la intensidad de la exposición y de las temperaturas del agua. El primer signo de mortalidad de la plaga del cangrejo suele ser la presencia de cangrejos en libertad durante el día (los cangrejos son normalmente nocturnos), algunos de los cuales pueden mostrar una pérdida evidente de coordinación en sus movimientos, caída fácil sobre el dorso e imposibilidad de volver por sí mismos a su posición normal. Sin embargo, con frecuencia, a no ser que se observen cuidadosamente las aguas, el primer signo de que existe un problema es la presencia de grandes cantidades de cangrejos muertos dentro del río o del lago (Alderman *et al.*, 1987).

En el caso de las especies susceptibles, cuando está presente un número de cangrejos suficiente como para que la infección se extienda con rapidez, sobre todo en aguas con temperaturas veraniegas, la infección se propagará con rapidez y en tramos de más de 50 kilómetros se pueden perder todos sus cangrejos en menos de 21 días a partir de la observación de la primera muerte (D. Alderman, comunicación personal). La plaga del cangrejo tiene efectos de suma gravedad, ya que los cangrejos susceptibles infectados no suelen sobrevivir. Sin embargo, debe hacerse hincapié en que la presencia de un gran número de cangrejos muertos, incluso en cuencas hidrográficas afectadas por esta plaga, no es suficiente por sí misma para el diagnóstico de la enfermedad. Debe evaluarse el estado general de otras especies acuáticas. La mortalidad o desaparición de otros invertebrados acuáticos además de los cangrejos, aunque sobrevivan los peces, puede indicar la existencia de contaminación (ej., los insecticidas, como la cipermetrina, se han asociado a un diagnóstico inicial erróneo).

Especies de cangrejo de Norteamérica

La presencia de melanización en la cutícula en ocasiones se ha sugerido que puede ser un signo de infección por *A. astaci*. Sin embargo, la melanización puede derivar de muchas posibles causas y no es un signo específico de infección por *A. astaci*. Por el contrario, es frecuente observar animales infectados que no presentan melanización.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Especies muy susceptibles

Los cangrejos de especies muy susceptibles infectados puede abandonar sus escondites durante el día (lo cual no es habitual en el cangrejo) y presentar una reducción en el reflejo de escape y una parálisis progresiva. A veces se encuentran cangrejos moribundos echados sobre el dorso. Estos animales a menudo ya no pueden recuperar por sí solos la posición normal. A veces, pueden verse animales infectados que intentan rascarse o pellizcarse a sí mismos.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Los cangrejos de Norteamérica no presentan ningún cambio de comportamiento (B. Oidtmann, datos no publicados).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Especies muy susceptibles

Dependiendo de una gran variedad de factores, los focos de infección en los cangrejos se pueden detectar fácilmente a simple vista o bien puede que no se distingan por mucho que se lleve a cabo un minucioso examen. Tales focos se pueden ver mejor mediante un microscopio estereoscópico de baja potencia y son más fácilmente reconocibles por el blanqueamiento local del músculo de debajo de la cutícula. En algunos casos puede aparecer una coloración marrón de la cutícula y del músculo y, en otros, las hifas son visibles en las cutículas infectadas en forma de finos trazos marrones (melanizados) en la cutícula misma. Los tejidos más adecuados para un examen concreto son la cutícula ventral blanda intersternal del abdomen y la cola, la cutícula de la región perianal, la cutícula situada entre el espaldar y el abdomen, las uniones de los pereiópodos (patas locomotoras), en concreto la unión proximal y, finalmente, las branquias.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Los cangrejos de Norteamérica infectados a veces pueden presentar puntos melanizados en sus cutículas blandas, por ejemplo en la cutícula abdominal blanda. Sin embargo, es importante destacar que estas melanizaciones pueden estar causadas por lesiones mecánicas o infecciones por otros hongos acuáticos, y que son muy inespecíficas. Por el contrario, una melanización visible no siempre se asocia a un estado de portador. Los animales infectados pueden estar totalmente desprovistos de melanizaciones visibles.

4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de métodos adecuados.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

A no ser que se haya escogido bien el tejido que va a fijarse, las hifas de *A. astaci* pueden ser difíciles de encontrar en las preparaciones teñidas. Además, este tipo de material no demuestra que ninguna de las hifas observadas pertenezca al patógeno primario. Puede utilizarse una técnica de tinción histológica como la de la tinción de plata de Grocott, que es una tinción de contraste con hematoxilina y eosina convencionales.

Véase también el apartado 4.2.4.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Se examinan pequeñas porciones de cutículas blandas extirpadas de las regiones antes mencionadas (apartado 4.2.1) mediante un microscopio compuesto utilizando una potencia de media a baja, que confirmará la presencia de hifas fúngicas no septadas de 7–9 µm de ancho. Las hifas suelen hallarse invadiendo todo el espesor de la cutícula, formando una red tridimensional de hifas en las zonas intensamente afectadas de la cutícula. La presencia de hemocitos hospedadores y posiblemente cierta

melanización encapsulando las hifas y estrechamente asociada a ellas, constituye un buen indicio preliminar de que las hifas constituyen un patógeno y no un invasor oportunista secundario. En algunos casos, el examen de la superficie de tales cutículas montadas demostrará la presencia de esporangios de *A. astaci* característicos con agrupaciones de esporas primarias enquistadas (véase el apartado 4.3).

4.2.5. Frotis

No es adecuado.

4.2.6. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No es adecuada.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Como se ha indicado anteriormente, se puede identificar de forma provisional *A. astaci* a partir de la presencia de hifas que invadan la cutícula y de esporangios de los tipos morfológicos correctos (ver más abajo) en la superficie de los exoesqueletos de los cangrejos.

4.3.1.1.2. Frotis

No es adecuado.

4.3.1.1.3. Cortes histológicos

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Especies muy susceptibles

Debe tenerse cuidado de que los animales utilizados para el aislamiento de *A. astaci* mediante cultivo no queden en ningún momento expuestos a la desecación.

Benisch (1940), Nyhlen y Unestam (1980), Alderman y Polglase (1986), Cerenius *et al.* (1988), Oidtman *et al.* (1999) y Viljamaa-Dirks (2006) han descrito métodos de aislamiento.

Medio de aislamiento (IM) descrito por Alderman y Polglase (1986) es el siguiente: 12,0 g de agar; 1,0 g de extracto de levadura; 5,0 g de glucosa; 10 mg de ácido oxalínico; 1,000 ml de agua de río; y 1,0 g de penicilina G (estéril) que se añade después de la esterilización en autoclave y el enfriado a 40°C. El agua de río es agua de cualquier río natural o agua de lago, en vez de agua desmineralizada.

Toda contaminación superficial debe retirarse en primer lugar de la cutícula abdominal interesternal blanda o de cualquier otra zona de la cual vaya a extirparse cutícula, limpiándola a fondo con papel de cocina limpio húmedo (utilizando H₂O esterilizada en autoclave). Una simple escisión aséptica de tejidos infectados que se colocarán luego en pequeñas porciones (de 3-5 mm²) sobre la superficie de las placas de medio de aislamiento, normalmente darán como resultado un aislamiento exitoso de *A. astaci* a partir de animales moribundos o recién muertos (menos de 24 horas antes). Dependiendo de varios factores, el foco de infección en los cangrejos puede verse a simple vista o puede no ser detectado ni siquiera mediante un minucioso examen. Dichos focos se pueden ver mejor mediante un microscopio estereoscópico de baja potencia y normalmente se reconocen por un blanqueamiento localizado del músculo de debajo de la cutícula.

En algunos casos puede aparecer una coloración marrón de la cutícula y del músculo y en otros, las hifas son visibles en las cutículas infectadas en forma de finos senderos marrones (melanizados) en la cutícula misma. Los tejidos más adecuados para un examen concreto son la cutícula ventral blanda

interesternal del abdomen y la cola, la cutícula de la región perianal, la situada entre el espaldar y la cola, las uniones de los pereiópodos (patas locomotoras), en concreto en la unión proximal y, finalmente, las branquias.

Siempre que la escisión de los tejidos infectados para el aislamiento se haga con las debidas precauciones, los contaminantes no deben suponer un gran problema. Se pueden transferir pequeñas porciones de cutícula y músculo a placas de Petri con agua destilada y a continuación se cortan en pequeños trozos con instrumentos estériles para transportarlos al medio de aislamiento (IM). Los instrumentos adecuados para este trabajo son hojas de bisturí, pinzas de punta fina y tijeras.

Para reducir los posibles problemas de contaminación, se puede mejorar el éxito del aislamiento mediante una desinfección de la cutícula con etanol y fundiendo un anillo de vidrio estéril de 1-2 mm de espesor en el medio de aislamiento (Nyhlen y Unestam, 1980; Oidtmann *et al.*, 1999). Se ha descrito la adición de telurito de potasio a la zona del interior del anillo de vidrio (Nyhlen y Unestam, 1980).

El agar inoculado puede incubarse a temperaturas de entre 16°C y 24°C. Las placas de Petri deben cerrarse con una película sellante (como Parafilm¹) con el fin de evitar que se des sequen.

Cuando se utiliza el agar para el aislamiento, el crecimiento de nuevas cepas de *A. astaci* tiene lugar casi por completo en el interior del agar, excepto a temperaturas inferiores a 7°C, en cuyo caso aparece algún crecimiento superficial. Las colonias son incoloras. Las dimensiones y el aspecto de las hifas son casi los mismos en los tejidos de los cangrejos que en el cultivo de agar. Las hifas vegetativas son no septadas y miden (5)7–9(10) µm de ancho (es decir, el tamaño normal es de 7–9 µm, pero se han observado tamaños de entre 5 y 10 µm). Las hifas jóvenes y de crecimiento activo están densamente concentradas con un citoplasma toscamente granular, con numerosos glóbulos muy refractivos (Alderman y Polglase, 1986). Las hifas más viejas son en su mayor parte vacuoladas con el citoplasma restringido en la mayoría de los casos a la periferia, dejando sólo finos haces de protoplasma que crean un puente sobre la gran vacuola central. Las hifas mayores están aparentemente desprovistas de contenido. Las hifas se ramifican de forma profusa, y sus ramificaciones vegetativas a menudo tienden a ser en cierta medida más estrechas que la hifa principal a lo largo de las primeras 20–30 µm de crecimiento.

Cuando los talos o porciones de talos que han crecido activamente en caldo o en medio sólido se transfieren a agua de río (el agua natural con cationes disponibles estimula mejor la esporulación que el agua destilada), se forman rápidamente esporangios en 20-30 horas a 16°C, y en 12-15 horas a 20°C. Los talos transferidos del caldo de cultivo pueden lavarse con agua de río estéril en un tamiz estéril de acero inoxidable, antes de transferirse a agua de río estéril y fresca para inducir la esporulación. Los talos que están en agar deben transferirse cortando un trocito superficial de agar que contenga el hongo de forma que se transfiera una cantidad mínima de agar con nutrientes. Se utilizará siempre un gran volumen de agua de río estéril con respecto a la cantidad de hongo a transferir (100:1). Los esporangios son miceloides, terminales o intercalados, que se desarrollan a partir de hifas vegetativas no diferenciadas. La forma esporangial varía: los esporangios terminales son simples, se desarrollan a partir de una hifa extramatricial nueva, mientras que los esporangios intercalados pueden tener una forma compleja. Los esporangios intercalados se desarrollan por el crecimiento de una ramificación extramatricial lateral nueva que forma el conducto de descarga del esporangio. El citoplasma de tales conductos de descarga es notablemente denso, y estas ramificaciones son ligeramente más anchas (10–12 µm) que la hifas vegetativas ordinarias. Los esporangios están delimitados por un solo septo basal en el caso de los esporangios terminales y por septos en ambos extremos del segmento esporangial en los esporangios intercalados. Tales septos son notablemente más gruesos que la pared hifal y tienen un índice refractivo alto. Las secciones consecutivas de hifas vegetativas pueden convertirse en esporangios y la mayor parte del talo vegetativo también es capaz de convertirse en esporangios.

Dentro de los esporangios que están en desarrollo, el citoplasma se separa formando una serie de unidades alargadas (10–25 × 8 µm) que inicialmente están unidas por hebras de protoplasma. Aunque los extremos de estas unidades citoplásmicas se vuelven redondeados, dichos extremos permanecen alargados hasta y durante la descarga. La descarga de esporas es aclioide, es decir, la primera fase de la spora es una aplanospora que se enquistas en el orificio esporangial y probablemente representa la zoospora primaria de la saprolegniacea suprimida. No se han hallado indicios de que exista una spora primaria flagelada, por tanto, en esta descripción se han utilizado los términos “esporangio”, no “zoosporangio”, y “spora primaria”, no “zoospora primaria”. La

1 Las referencias a productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

descarga es bastante rápida (termina en menos de 5 minutos) y las esporas primarias individuales (igual a unidades citoplasmáticas) pasan a través de la punta del esporangio y se acumulan alrededor del orificio esporangial. La velocidad de separación y descarga del citoplasma depende de la temperatura. En el momento de su liberación, cada espora primaria conserva brevemente su forma ameboidea irregular alargada antes de que se produzca el enquistado.

El enquistado está marcado por un redondeado gradual seguido por el desarrollo de una pared quística que se manifiesta por un cambio en el índice refractario de la célula. Entre la liberación y el enquistado pasan de 2 a 5 minutos. Algunas esporas pueden alejarse de la masa de esporas en la punta esporangial y enquistarse por separado. La pared quística primaria se forma rápidamente y, tras producirse el enquistamiento, las esporas permanecen juntas como un grupo coherente y se adhieren bien a la punta esporangial, de tal forma que tendría que darse una alteración física considerable para que se rompiera la masa de esporas.

Las esporas primarias enquistadas son esféricas, miden 9–11 µm de diámetro, aunque se han observado esporas de entre 8 y 15 µm y son relativamente poco numerosas, de 15 a 30 µm por esporangio (de todas formas, existen casos de entre 8 y 40 por esporangio) en comparación con otras subespecies de *Aphanomyces*. Las esporas permanecen enquistadas durante 8–12 horas. Las temperaturas óptimas para la formación de esporos y la descarga para la mayoría de las cepas europeas de *A. astaci* están comprendidas entre los 16 y los 24°C (Alderman y Polglase, 1986). Para algunas cepas, en concreto las que proceden de aguas españolas, pueden requerirse unas temperaturas óptimas ligeramente superiores (Dehus *et al.*, 1999). La descarga de zoosporas secundarias de los quistes primarios alcanza el máximo a los 20°C, y a los 24°C no se produce. En las nuevas cepas de *A. astaci*, es habitual que la mayoría de los quistes de espora primarios descargue como zoosporas secundarias, aunque esto depende de la degeneración que tiene lugar en los cultivos de laboratorio a largo plazo. La formación esporangial y la descarga se producen a los 4°C. *A. astaci* no sobrevive en un cultivo a –5°C o menos durante más de 24 horas, aunque pueden necesitarse –20°C durante >48 horas en los tejidos de cangrejos infectados, ni tampoco es viable en los que hayan estado sometidos a procedimientos normales de cocción. (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002).

En muchos casos, algunas de las esporas primarias no son descargadas del esporangio y muchos esporangios ni siquiera se descargan. En su lugar, las esporas primarias parecen enquistarse *in situ* dentro del esporangio, a menudo desarrollan una forma esférica en lugar de una forma alargada y ciertamente están sometidos a los mismos cambios en el índice refractivo que indican el enquistamiento de las esporas fuera del esporangio. Se ha observado este enquistamiento dentro de los esporangios en los cangrejos. Las esporas enquistadas en esta situación parecen ser capaces de germinar y producir así un crecimiento hifal adicional.

La liberación de las zoosporas secundarias es papilada, y la papila se desarrolla poco después de la descarga. El citoplasma de la espora emerge lentamente de manera ameboidea a través de un estrecho poro situado en la punta de una papila, se redondea y comienza un movimiento de balanceo lento a medida que comienza una extrusión flagelar y la forma de la espora cambia gradualmente, pasando de esférica a arriñonada. La unión flagelar es lateral (Scott, 1961); las zoosporas son zoosporas secundarias típicas de la familia saprolegniaceae, que miden 8 × 12 µm. La movilidad activa tarda en aparecer de 5 a 20 minutos (depende de la temperatura) y, al principio, las zoosporas son lentas y descoordinadas. A temperaturas de entre 16 y 20°C, las zoosporas pueden continuar nadando al menos durante 48 horas (Alderman y Polglase, 1986).

La sensibilidad y especificidad del método del cultivo puede variar mucho en función de la experiencia de la persona que lo lleve a cabo, pero en general serán inferiores a las de la PCR.

Especies de cangrejo de Norteamérica

El aislamiento de *A. astaci* mediante cultivo siguiendo los métodos descritos para las especies muy susceptibles suele fracasar. Actualmente, el método recomendado para detectar la infección en estas especies es la PCR.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

No se dispone de ninguno.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Animales

En el caso de un brote sospechoso de la enfermedad en especies de cangrejos muy susceptibles, para la extracción de ADN preferiblemente deben escogerse cangrejos moribundos o que hayan

muerto recientemente (en las últimas 24 horas). Los cangrejos vivos pueden sacrificarse mediante cloroformo. Si los únicos animales de los que se dispone son ejemplares que han muerto unos pocos días antes de la extracción, también pueden incluirse en el análisis, pero los resultados negativos en la PCR deberán interpretarse con cautela, puesto que puede haberse producido una degradación del ADN. Puede aplicarse controles endógenos para evaluar si se ha producido degradación. En estos preferiblemente deben utilizarse tejidos del hospedador más ricos en células hospedadoras que la cutícula; la cutícula en sí contiene muy pocos núcleos de células hospedadoras. Si las circunstancias impiden enviar cangrejos al laboratorio en un plazo de 24 horas, pueden fijarse en etanol al 70% ($\geq 3:1$ etanol:tejido de cangrejo), pero ello puede dar lugar a una reducción del ADN obtenido.

Extracción de ADN

Cuando se analizan animales de especies muy susceptibles, el tejido de elección para la extracción de ADN es la cutícula abdominal blanda. Toda posible contaminación superficial debe eliminarse antes limpiando bien la cutícula abdominal blanda con papel de cocina limpio humedecido (mediante H_2O esterilizada en autoclave). A continuación, se extirpa la cutícula abdominal blanda y se trituran 30 a 50 mg en nitrógeno líquido hasta liofilizar la muestra, utilizando una mano de mortero (pueden utilizarse otras técnicas de trituración, pero deben compararse con el método del nitrógeno líquido antes de utilizarlas de forma sistemática). Para la identificación de portadores, se toman 30-50 mg de tejido de cada cutícula abdominal blanda, y el telson y los urópodos y se procesan de forma independiente. A continuación, se extrae ADN de la cutícula triturada mediante un método de extracción de ADN basado en la proteinasa K (como el *DNeasy tissue kit*; Qiagen, Hilden, Alemania; protocolo para tejido de insecto) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Oidtmann *et al.*, 2006) o utilizando una prueba basada en CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Vrålstad *et al.*, 2009). Deben analizarse controles negativos paralelamente a las muestras. Como controles negativos pueden utilizarse tejidos de camarón.

4.3.1.2.3.1. PCR

Se han desarrollado varias PCR con distintos niveles de sensibilidad y especificidad. Aquí se describen dos pruebas que han demostrado ser altamente sensibles y específicas. Ambas tienen como diana la región ITS (espaciador interno) de la agrupación de genes ribosomales nucleares que se encuentra en el genoma de *A. astaci*. Como debe hacerse siempre para cualquier prueba diagnóstica basada en la PCR, deberán analizarse controles negativos paralelamente a las muestras, con el fin de controlar una posible contaminación. Deben incluirse controles ambientales (utilizando, por ejemplo, tejido de camarón, como se indica arriba) y controles blancos durante la extracción de ADN, junto con controles de PCR "sin molde" (el ADN molde se sustituye por agua de grado molecular). Los controles de la PCR que no son moldes deben incluir un control de PCR ambiental que se dejará abierto durante el pipeteado del ADN de la muestra.

Método 1:

Esta PCR convencional se basa en cebadores específicos de especie situados en las regiones ITS1 e ITS2. El cebador directo (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CF-3' y el cebador inverso (BO 640) 5'-CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3'. La PCR se realiza en un volumen de reacción de 50 μ l que contenga tampón 1 $\times$ para PCR (Tris/HCl 75 mM, pH 8,8, $[NH_4]_2SO_4$ 20mM, Tween 20 al 0,01% (v/v)), $MgCl_2$ 1,5 mM, dATP, dCTP, dTTP y dGTP, cada uno a una concentración 0,2 mM, 0,5 μ mol de cada cebador, y 1,25 unidades de ADN polimerasa (por ejemplo, Thermoprime Plus (AB Gene, Epsom, Reino Unido) o polimerasa *Taq* equivalente y 2 μ l de ADN molde. Se desnaturaliza la mezcla a 96°C durante 5 minutos y a continuación se realizan 40 ciclos de amplificación de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 59°C y un minuto a 72°C, y, finalmente, una extensión de 7 minutos a 72°C. Se analiza el ADN amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa. El producto objetivo es un fragmento de 569 pb. Se recomienda la confirmación de la identidad del producto de PCR mediante secuenciación. La prueba detecta sistemáticamente hasta 500 fg de ADN diana genómico o la cantidad equivalente de diez zoosporas sometidas a la PCR (Tuffs y Oidtmann, 2011).

Método 2:

Esta prueba es una PCR en tiempo real con unión al surco menor TaqMan que tiene por diana una secuencia motivo particular de 59 pb de *A. astaci* situada en la región ITS1. El cebador directo es AphAstITS-39F (50-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-30), el cebador inverso, AphAstITS-97R (50-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-30), y la sonda, TaqMan MGB AphAstITS-60T (50-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-30) marcados con la tinción indicadora fluorescente FAM en el extremo 50 y un grupo extintor de la fluorescencia no fluorescente MGBNFQ en el extremo 30. Las amplificaciones mediante PCR en tiempo real se llevan a cabo en un volumen total de 25 μ l que contiene 12,5 μ l de la mezcla de reacción para la PCR (por ejemplo, Universal PCR Master Mix o

Environmental PCR Master Mix, Applied Biosystems), los cebadores directo (AphAstITS-39F) e inverso (AphAstITS-97R), ambos a una concentración 0,5 µM, la sonda MGB (AphAstITS-60T) 0,2 µM, 1,5 µl de agua de grado molecular y 5 µl de ADN molde (no diluido y diluido a una décima parte). La amplificación y la detección se llevan a cabo en placas de reacción óptica (*Optical Reaction Plates*) selladas con película adhesiva óptica u otra similar sobre un ciclador térmico en tiempo real. El programa de PCR consiste en una descontaminación inicial de 2 minutos a 50°C para que tenga lugar una actividad óptima de la enzima UNG, seguida de 10 minutos a 95°C para activar la ADN polimerasa, desactivar la UNG y desnaturalizar el ADN molde, y a continuación 50 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 58°C. Junto con las muestras debe procesarse una dilución seriada con ADN de referencia cuyo contenido en ADN se conozca.

El límite absoluto de detección de esta prueba se observó que era de unas 5 unidades formadoras de PCR (=copias del ADN molde diana), lo cual equivale a menos de un genoma de *A. astaci* (Vrålstad *et al.*, 2009). En otro estudio se observó que esta prueba permitía una detección sistemática de hasta 50 fg (Tuffs y Oidtmann, 2011).

La sensibilidad diagnóstica de cualquier prueba depende en gran medida de la calidad de las muestras obtenidas. Cuando se estudia un brote de plaga del cangrejo, lo esperable es que la sensibilidad diagnóstica sea alta cuando se trabaja con ejemplares que han muerto por esta enfermedad 12 horas o menos antes de la toma de muestras, o bien en cangrejos vivos que presenten claros signos de la enfermedad. No se han llevado a cabo estudios para investigar el efecto que el deterioro de la calidad de la muestra tiene en la pérdida de sensibilidad (por ejemplo, cuando el muestreo o el procesado se retrasan, o cuando las muestras se guardan de forma inadecuada). Es recomendable analizar varios cangrejos (5-10) con el fin de compensar las posibles variaciones en la calidad de la muestra y en la zona afectada del cangrejo.

Se ha estudiado la especificidad analítica (Oidtmann *et al.*, 2006; Tuffs y Oidtmann, 2011; Vrålstad *et al.*, 2009) y no se ha observado reacción cruzada. Sin embargo, debido a los frecuentes descubrimientos de nuevas cepas de *Aphanomyces*, es muy recomendable secuenciar para confirmar el diagnóstico. En el caso de la PCR en tiempo real, esto requiere una amplificación independiente del producto de la PCR, o bien utilizando los cebadores según se ha descrito en el método 1, o bien utilizando cebadores ITS1 e ITS4 (véase el apartado “secuenciación”, a continuación).

4.3.1.2.3.2. Secuenciación

Se puede amplificar un producto de la PCR de 569 pb utilizando los cebadores BO42 y BO640. El tamaño del amplicón obtenido mediante PCR se verifica con una electroforesis en gel de agarosa, y se purifica extrayéndolo de este gel (por ejemplo, mediante un sistema de purificación de ADN Freeze n' Squeeze, Anachem, Luton, Reino Unido). Ambas hebras de ADN deben secuenciarse utilizando los cebadores que se han empleado en la amplificación inicial. La secuencia consenso se genera aplicando un programa informático de análisis de la secuencia y comparándola con secuencias publicadas, utilizando una herramienta de búsqueda de alineación, como la BLAST. Si se halla un 100% de coincidencia entre la secuencia problema y las secuencias publicadas, el producto amplificado será *A. astaci*. Si la secuencia no es idéntica al 100%, deberá llevarse a cabo otra secuenciación utilizando los cebadores ITS-1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') y ITS-4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *et al.*, 1990), que generarán un amplicón de 757 pb que proporcionará datos de secuencia de la misma región, pero alargados por ambos extremos respecto a la secuencia generada por los cebadores BO42 y BO640. Esta secuencia alargada debe confirmar la identidad del agente patógeno a nivel de especie.

Especies muy susceptibles

La PCR (convencional o en tiempo real) es un método adecuado para investigar brotes sospechosos de plaga del cangrejo (véase el apartado 7.1). Cuando se cumplan las condiciones de un caso sospechoso, la amplificación de un producto del tamaño esperado obtenido por PCR y utilizando PCR convencional o en tiempo real puede considerarse un diagnóstico confirmativo suficiente, si se detecta un alto nivel de ADN molde. Cuando se detecten niveles bajos de ADN molde (amplificación débil) o se analicen muestras procedentes de lugares donde no se cumplan las condiciones de caso sospechoso, para confirmar el diagnóstico se recomienda secuenciar productos de PCR generados como se ha descrito en el apartado sobre secuenciación.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No disponible.

4.3.2. Métodos serológicos

No disponibles.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos de los que se dispone actualmente para el diagnóstico de casos clínicos de la plaga del cangrejo (*Aphanomyces astaci*) en especies muy susceptibles se muestran en la Tabla 5.1. Los métodos de vigilancia dirigida destinados a demostrar la ausencia de enfermedad en especies muy susceptibles se muestran en la Tabla 5.2.

La enfermedad clínica es extremadamente infrecuente en el cangrejo de Norteamérica. Por tanto, no se proporciona un orden de preferencia de los métodos de diagnóstico de los casos clínicos utilizados en estas especies. Sin embargo, en la Tabla 5.3. Se muestran los métodos de vigilancia dirigida destinados a demostrar la ausencia de enfermedad en cangrejos de Norteamérica.

Las denominaciones utilizadas en las tablas indican: a = este es el método recomendado por motivos de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b= este es el método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c= este método es aplicable en ciertas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan mucho su aplicación; y d= actualmente este método no se recomienda para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza rutinaria y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de diagnóstico de la plaga del cangrejo en especies de cangrejo muy susceptibles

Método	Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
Signos macroscópicos y microscópicos	b	d
Aislamiento y cultivo	b	d
Histopatología	d	d
PCR	a	b o a ¹
Secuenciación de los productos de la PCR	n/a	b o a ¹
ME de transmisión	d	d
Pruebas basadas en anticuerpos	n/a	n/a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	n/a	n/a

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; q PCR = PCR cuantitativa; ME = microscopía electrónica; n/a = no aplicable o disponible; ¹ = véanse las definiciones de caso confirmado en el apartado 7.1.

Tabla 5.2. Métodos de vigilancia dirigida en especies de cangrejo muy susceptibles para declarar la ausencia de plaga del cangrejo

Método	Método de detección	Método de confirmación
Inspección en busca de signos macroscópicos y mortalidad	a	c
Signos microscópicos (preparaciones húmedas)	c	c
Aislamiento y cultivo	c	b
Histopatología	d	d
PCR	a	b, posiblemente a ¹
qPCR	a	b, posiblemente a ¹

Método	Método de detección	Método de confirmación
Secuenciación de los productos de la PCR	n/a	a
ME de transmisión	d	d
Pruebas basadas en anticuerpos	n/a	n/a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	n/a	n/a

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; qPCR = PCR cuantitativa; ME = microscopía electrónica; n/a = no aplicable o disponible; ¹ = véanse las definiciones de caso confirmado en el apartado 7.1.

Tabla 5.3. Métodos para la vigilancia dirigida en especies de cangrejo de Norteamérica para declarar la ausencia de plaga del cangrejo

Método	Método de detección	Método de confirmación
Signos macroscópicos y microscópicos	d	d
Aislamiento y cultivo	c	c
Histopatología	d	d
PCR	a	b
qPCR	a	b
Secuenciación de los productos de la PCR	n/a	a
ME de transmisión	d	d
Pruebas basadas en anticuerpos	n/a	n/a
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	n/a	n/a

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; qPCR = PCR cuantitativa; ME = microscopía electrónica; n/a = no aplicable o disponible

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de plaga del cangrejo (*Aphanomyces astaci*)

6.1. Especies muy susceptibles

Es necesaria una inspección de las piscifactorías en las que se críen cangrejos susceptibles, con la frecuencia señalada en el capítulo 2.2.0. Los métodos adecuados para este propósito son la observación del historial de mortalidades no relevantes (lo cual excluye las pérdidas derivadas de la depredación) que se producen en la población durante un período de al menos 12 meses combinada con la ausencia de signos clínicos, así como de lesiones macroscópicas o microscópicas en el momento de la inspección. La vigilancia de las poblaciones de cangrejos salvajes constituye un mayor problema, especialmente cuando se trata de una especie en peligro. Como los desplazamientos de las poblaciones de peces procedentes de aguas infectadas constituyen un riesgo de transmisión de la enfermedad, es necesario realizar un seguimiento del estado de las poblaciones de cangrejos para confirmar que permanecen sanos.

En el contexto de una piscifactoría, una infección por plaga del cangrejo debe detectarse con relativa rapidez, debido al inicio relativamente rápido de la mortalidad en la población de cangrejos de la explotación.

Para llevar a cabo una vigilancia dirigida, es recomendable realizar inspecciones periódicas, durante las cuales deberán tomarse muestras si existe sospecha de mortalidad o enfermedad. Si se hallan animales moribundos o muertos, se recomienda analizar las muestras mediante PCR, y si la PCR da un resultado positivo, se secuenciarán los productos de esta PCR generados mediante cebadores 42 y 640, o ITS-1 y 5, y las secuencias obtenidas se analizarán.

6.2. Especies de cangrejo de Norteamérica

En las especies de cangrejo de Norteamérica, deben tomarse ejemplares y analizarse mediante una de las PCR descritas anteriormente. La PCR en tiempo real es el método de elección porque ofrece una mayor sensibilidad. Esto es aplicable tanto a las poblaciones de piscifactoría como a las poblaciones salvajes aclimatadas, y en los programas de vigilancia se deben tener en cuenta los riesgos de una transmisión indirecta derivados de los desplazamientos de peces.

7. Criterios para el diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Especies de cangrejo muy susceptibles

Los casos que presentan una mortalidad alta exclusivamente en las especies muy susceptibles de cangrejos de agua dulce, en lugares en que todas las demás especies de flora y fauna, y en concreto otros crustáceos acuáticos, están normales y sanos.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Toda población de cangrejos de Norteamérica en general se considera potencialmente infectada por *A. astaci*.

7.2. Definición de caso confirmado

Especies de cangrejo muy susceptibles

Confirmación de la presencia de *A. astaci* mediante PCR o qPCR y secuenciación.

Cuando (1) una mortalidad de cangrejos cumple la definición de caso sospechoso y (2) los resultados de la PCR indican la presencia de altos niveles de ADN molde (en el caso de la PCR en tiempo real, esto corresponde a valores de $C_t \leq 30$), y (3) el caso sospechoso estudiado no es el primer caso de detección de *A. astaci* en el país o región, el resultado de la PCR por sí mismo puede considerarse suficiente como confirmación.

Especies de cangrejo de Norteamérica

Confirmación de la presencia de *A. astaci* mediante PCR o qPCR y secuenciación.

8. Bibliografía

ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15** (2), 603–632.

ALDERMAN D.J. (2000). Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*. Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia.

ALDERMAN D.J., HOLDICH D. & REEVE I. (1990). Signal crayfish as vectors in crayfish plague in Britain. *Aquaculture*, **86**, 3–6.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquaculture and Fisheries Management*, **16**, 203–205.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L., FRAYLING M. & HOGGER J. (1984). Crayfish plague in Britain. *J. Fish Dis.*, **7**, 401–405.

BENISCH J. (1940). Kuenstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.

- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984a). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984b). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Mycol.*, **8**, 370–377.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M., AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshw. Crayfish*, **7**, 131–144.
- DEHUS P., BOHL E., OIDTMANN B., KELLER M., LECHLEITER S. & PHILLIPSON S. (1999). German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to Make the Best of a Bad Situation?), Gherardi F. & Holdich D.M., eds. A.A Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp. 149–160.
- DIEGUEZ URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHALL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.
- EDSMAN L. (2004). The Swedish story about import of live crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, **372–373**, 281–288.
- HUANG, T.S., CERENIUS L. & SÖDERHALL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–10.
- NINNI A.P. (1865). Sulla mortalità dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e più particolarmente nella provincia trevigiana. *Atti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.
- NYHLEN L. & UNESTAM T. (1980). Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 187–197.
- OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.
- OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.
- OIDTMANN B., SCHMID I., ROGERS D. & HOFFMANN R. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshw. Crayfish*, **12**, 303–312.
- OIDTMANN B., THRUSH M., ROGERS D. & PEELER E. (2005). Pathways for transmission of crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, in England and Wales. Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Nairn, Inverness, Scotland, 30.03.-01.04.05, Poster.
- RAHE R. & SOYLU E. (1989). Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 10–15.
- REYNOLDS J.D. (2002). Growth and reproduction. In: Biology of Freshwater Crayfish, Holdich D.M., ed. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 152–191.
- SCOTT W.W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Virginia Agricultural Research Station Technical Bulletin*, **151**, 1–95.
- SELIGO A. (1895). Bemerkungen ueber die Krebspest, Wasserpest, Lebensverhaeltnisse des Krebses. *Zeitschrift fuer Fischerei und deren Hilfswissenschaften*, **3**, 247–261.
- SKURDAL J. & QVENILD T. (1986). Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshwater Crayfish*, **6**, 182–186.
- SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFNER P. (Eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.
- SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.

TUFFS S & OIDTMANN B (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.* (accepted).

UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum*, **19**, 1110–1119.

UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum*, **22**, 221–235.

UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute Freshw. Res.*, 202–206.

UNESTAM T. (1976). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**, 349–359.

UNESTAM T. & SÖDERHÄLL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshw. Crayfish*, **3**, 321–331.

UNESTAM T. & WEISS D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 77–90.

VILJAMAA-DIRKS S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011): Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, (in press).

VRÅLSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRÅLSTAD T., KNUSTEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*) (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.2.2.

NECROSIS HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

1. Ámbito de aplicación

La necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa está causada por una infección con el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (VNHHI) (Bonami y Lightner, 1991; Bonami *et al.*, 1990; Lightner, 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b; Lotz *et al.*, 1995; Tang y Lightner 2002). Se ha observado que una gran parte del genoma del VNHHI está insertado en el genoma de ciertas líneas genéticas de *Penaeus monodon*. No hay indicios de que esta variante del VNHHI sea infecciosa (Tang y Lightner, 2002; 2006).

Sinónimos: El Comité Internacional de Taxonomía ha designado al VNHHI (un parvovirus) provisionalmente como una especie del género *Brevidensovirus*, familia Parvoviridae, con el nombre de especie de PstDNV (para el densovirus de *Penaeus stylirostris*) (Fauquet *et al.*, 2005). A efectos de este *Manual Acuático*, normalmente el agente vírico de la NHHI se denominará VNHHI.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agente patógeno, cepas del agente

El VNHHI es el más pequeño de los virus conocidos del camarón peneido. El virión de la NHHI es un icosaedro sin envoltura de 20-22 nm, con una densidad de 1,40 g/ml en CsCl, que contiene ADN lineal monocatenario de un tamaño estimado de 3,9 kb, y que tiene una cápsida con cuatro polipéptidos de 74, 47, 39 y 37,5 kD de peso molecular (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000).

Se han identificado al menos cuatro genotipos diferentes del VNHHI (Tang y Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003): Tipo 1) de las Américas y Asia oriental (principalmente Filipinas); Tipo 2) del sureste de Asia; Tipo 3A) de Asia oriental, India y Australia; y tipo 3B) de la región del Indo-Pacífico oeste, incluidos Madagascar, Mauricio y Tanzania (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Los dos primeros genotipos son infecciosos para los peneidos representativos, *P. vannamei* y *P. monodon*, mientras que las otras dos variantes no son infecciosas en estas especies (Tang y Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003; 2007). Se han hallado secuencias relacionadas con el VNHHI tipo 3A y tipo 3B insertadas en el genoma de *P. monodon* de África oriental, Australia y la región del Indo-Pacífico oeste (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Las secuencias presuntamente de VNHHI halladas en el genoma de *P. monodon* no son infecciosas para las especies hospedadoras representativas, *P. vannamei* y *P. monodon* (Lightner *et al.*, 2009; Tang y Lightner 2006; Tang *et al.*, 2007).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se dispone de datos.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Se considera que el VNHHI es el virus más estable de todos los virus conocidos que afectan a los camarones peneidos. Los tejidos infectados se mantienen infecciosos después de repetidos ciclos de congelación-descongelación y tras un almacenaje en glicerina al 50% (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1987; 2009).

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

La mayoría de las especies de peneidos pueden resultar infectadas con el VNHHI, incluidas las principales especies de piscifactoría, *P. monodon* (langostino jumbo), *L. vannamei* (camarón patiblanco) y *L. stylirostris* (camarón azul).

Las infecciones por VNHHI son más graves en el camarón azul, *P. stylirostris*, en el que el virus puede causar una epizootia aguda y una mortalidad masiva (> 90%). En *L. stylirostris* los estadios de juvenil y subadulto son los más gravemente afectados (Bell y Lightner, 1984; 1987; Brock y Lightner 1990; Brock *et al.*, 1983; Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998; Lightner *et al.*, 1983a).

El VNHHI produce como enfermedad crónica el síndrome de la deformidad y del enanismo (SDE) en *L. vannamei*, en el cual los principales efectos son un crecimiento reducido e irregular y deformidades cuticulares, más que mortalidad (Bray *et al.*, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Castille *et al.*, 1993; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner, 1996; Motte *et al.*, 2003). La infección por el VNHHI en *P. monodon* es generalmente subclínica, aunque se ha descrito SDE, índices de crecimiento reducido y bajos rendimientos de cultivo en poblaciones infectadas por el VNHHI (Chayaburakul *et al.*, 2004; Primavera y Quintio, 2000).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Se ha encontrado el VNHHI en todos los estadios de vida de *P. vannamei* (huevos, larvas, postlarvas (PL), formas juveniles y adultos). Se ha hallado que los huevos de hembras infectadas con el VNHHI con alto contenido de virus generalmente no llegan a desarrollarse ni a eclosionar. Aquellas larvas nauplias producidas por reproductores infectados que eclosionan tienen una alta prevalencia de infección por VNHHI (Motte *et al.*, 2003).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Véanse los apartados 2.2.1 y 2.2.2.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El VNHHI infecta y se ha demostrado que se replica (utilizando hibridación *in-situ* [ISH] con sondas específicas de ADN) en tejidos del embrión de origen ectodérmico y mesodérmico. De esta forma, los principales órganos diana son los siguientes: las branquias, el epitelio cuticular (o hipodermis), todos los tejidos conjuntivos, los tejidos hematopoyéticos, el órgano linfático, la glándula antenal y el cordón nervioso ventral, con sus ramas y sus ganglios. Los órganos entéricos (hepatopáncreas, derivado del endodermo, y el epitelio de la mucosa del intestino medio y de los ciegos del intestino medio) y el músculo liso, cardíaco y estriado no presentan lesiones histológicas de infección por el VNHHI, y normalmente son negativos al VNHHI según la prueba de la ISH (Lightner, 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1992).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos miembros de las poblaciones de *P. stylirostris* y *P. vannamei* que sobreviven a las infecciones y/o epizootias por VNHHI, pueden portar el virus de por vida y pasarlo a la progenie y a otras poblaciones por transmisión vertical u horizontal (Bell y Lightner 1984; Lightner, 1996a; 1996b; Morales-Covarrubias y Chavez-Sanchez, 1999; Motte *et al.*, 2003).

2.2.6. Vectores

No se conoce ninguno en las infecciones naturales.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

El VNHHI es frecuente en los camarones peneidos salvajes del sureste asiático (*P. monodon*) y de las Américas (*P. vannamei*, *P. stylirostris* y otras especies de peneidos salvajes de la zona del Pacífico) (Fegan y Clifford, 2001; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 1999; Nunan *et al.*, 2001).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del VNHHI puede tener lugar mediante vías horizontales o verticales. Se ha demostrado la transmisión horizontal por canibalismo o por aguas contaminadas (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1983a;

1983b; 1985; Tang *et al.*, 2002), y la transmisión vertical a través de huevos infectados (Motte *et al.*, 2003).

2.3.2. Prevalencia

En reservas salvajes de las regiones donde el virus es enzoótico, en varios estudios se han observado prevalencias del VNHHI de entre el 0 y el 100%. Algunos de los valores medios descritos para la prevalencia del VNHHI en reservas salvajes son: 26% y 46% en *P. stylirostris* en las partes inferior y superior del Golfo de California, respectivamente (Pantoja *et al.*, 1999); 100% y 57%, respectivamente, en hembras adultas y en machos adultos de *P. stylirostris* de la región media del Golfo de California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% en ejemplares de *L. vannamei* salvajes obtenidos de las costas del Pacífico de Panamá (Nunan *et al.*, 2001); y 51 a 63% en *P. vannamei* obtenido de las costas del Pacífico de Ecuador, Colombia y Panamá (Motte *et al.*, 2003). Otros peneidos obtenidos durante algunos de estos estudios y que han dado positivo al VNHHI incluyen el camarón patiamarillo (*P. californiensis*) y el camarón blanco del Pacífico (*P. occidentalis*). En los criaderos donde se encuentra presente el VNHHI, su prevalencia puede ir de muy baja al 100%, pero es habitual una prevalencia que se acerque al 100% (Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1988; 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1992; 1983a; Martínez-Cordova 1992).

2.3.3. Distribución geográfica

El VNHHI parece tener una distribución mundial en el camarón peneido, tanto salvaje como de piscifactoría (Brock y Lightner, 1990; Lightner, 1996; Owens *et al.*, 1992). En el hemisferio occidental, el VNHHI se encuentra normalmente en el camarón peneido salvaje del Pacífico oriental, desde Perú a México. Aunque el VNHHI se ha descrito en *P. vannamei* y *P. stylirostris* de piscifactoría en la mayoría de las regiones de cultivo de camarón del hemisferio occidental y en peneidos salvajes a lo largo de toda la costa americana del Pacífico (desde Perú al norte de México), en la costa americana Atlántica no se ha descrito el virus en el camarón peneido salvaje (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock y Main, 1994; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1998a). El VNHHI también se ha descrito en el camarón peneido de piscifactoría de las Islas del Pacífico, incluidas las islas de Hawai, la Polinesia francesa, Guam y Nueva Caledonia. En la región del Indo-Pacífico, se ha descrito el virus en el camarón peneido cultivado y salvaje en el este de Asia, sureste de Asia y Oriente Medio (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996a). Se ha descrito un virus tipo VNHHI en Australia (Krabsetsve *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1992), y en 2008 se notificó a la OIE la presencia de NHHI en camarones de piscifactoría en Australia. Como se ha explicado en el apartado 2.1.1, se han encontrado secuencias relacionadas con el VNHHI insertadas en el genoma de *P. monodon* de África oriental, Australia y la región del Indo-Pacífico occidental (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En función de la especie hospedadora y del genotipo del virus, la NHHI puede presentarse de tres formas distintas; así, en *P. stylirostris* de poblaciones no seleccionadas, la infección por el VNHHI da lugar a una enfermedad aguda y normalmente catastrófica con mortalidades que se acercan al 100%. Por el contrario, en *P. vannamei*, algunas de las líneas de *P. stylirostris*, y en *P. monodon* en ciertas condiciones, la infección por el VNHHI da lugar a una enfermedad más sutil y crónica, SDE, en la que es poco habitual observar altas mortalidades, pero a menudo con una considerable inhibición del crecimiento y deformidades de la cutícula. En la tercera situación, la mayor parte del genoma del VNHHI se ha hallado insertado en el genoma de algunas líneas genéticas de *P. monodon*. No hay indicios de que esta variante del VNHHI sea infecciosa (Tang y Lightner, 2002; 2006).

2.3.5. Factores medioambientales

La tasa de replicación del VNHHI a altas temperaturas del agua se redujo considerablemente en un estudio en el que se comparó la replicación vírica en *P. vannamei* infectado experimentalmente y mantenido a 24°C con la observada si se mantenía a 32°C. Tras un adecuado periodo de incubación, los camarones mantenidos a 32°C presentaban una carga vírica alrededor de 10² veces inferior a la de los camarones mantenidos a 24°C. Sin embargo, incluso a temperaturas del agua más altas, seguía produciéndose una considerable replicación (de hasta 10⁵ copias de virus/ 50 ng de ADN de camarón) del VNHHI en camarones mantenidos a 32°C (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se han desarrollado métodos de vacunación eficaces contra el VNHHI.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No existen informes de tratamientos con sustancias químicas eficaces confirmados científicamente.

2.4.3. Inmunoestimulación

No existen informes de tratamientos de inmunoestimulación eficaces confirmados científicamente.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se han desarrollado reservas seleccionadas de *P. stylirostris* que son resistentes a la NHHI, y se han aplicado con cierto éxito en piscifactorías de camarones (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; 1996b; Weppe 1992; Zarian-Herzberg y Ascencio-Valle, 2001). Algunas de las líneas seleccionadas de *P. stylirostris* que se cultivaron con el fin de que fueran resistentes a la enfermedad, se observó que eran refractarias a la infección (Tang *et al.*, 2000). Sin embargo, estas reservas no presentan una gran resistencia a enfermedades como las causadas por el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB) y, por tanto, su utilidad ha sido escasa, aunque en algunas reservas se ha observado una base genética de la susceptibilidad de *P. vannamei* a la NHHI (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Con *P. stylirostris* resistente al VNHHI ha habido cierta aplicación y éxito, aunque escasos, (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarin-Herzberg y Ascencio 2001). La resistencia relativa de *P. vannamei* a la NHHI, a pesar de la infección por el VNHHI, se considera uno de los principales motivos por los que *P. vannamei* es la principal especie de camarón cultivada en el hemisferio occidental y, desde 2004, a nivel mundial (Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

2.4.6. Agentes bloqueantes

Existen informes de camarones con altas cargas víricas de VNHHI que son resistentes a la infección por el VSMB (Bonnichon *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta ahora no se ha publicado ningún informe sobre agentes bloqueantes del VNHHI.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Se ha comprobado que el VNHHI se transmite verticalmente por vía transovárica (Motte *et al.*, 2003). Por tanto, aunque la desinfección de huevos y larvas es una buena práctica de manejo (Chen *et al.*, 1992) y se recomienda por su potencial de reducción de la contaminación por el VNHHI en los huevos desovados y las larvas que surgen a partir de estos (y la contaminación por otros agentes patógenos), no es un método eficaz de prevención de la transmisión del VNHHI (Motte *et al.*, 2003).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Algunas prácticas de manejo se han aplicado con éxito a la prevención de las infecciones y la enfermedad del VNHHI. Entre ellas, la aplicación de pre-cribado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los reproductores salvajes o de piscifactoría y/o de sus huevos desovados/nauplias, eliminando aquellos que den positivos al virus (Fegan y Clifford, 2001; Motte *et al.*, 2003) y el desarrollo de producciones de camarón *P. vannamei* y *P. stylirostris* libres de patógenos específicos (SPF) (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992). Se ha demostrado que esta última es la práctica de manejo con más éxito para la prevención y control de la NHHI (Jaenike *et al.*, 1992; Lightner, 2005; Pruder *et al.*, 1995). Desafortunadamente, en la industria existe la idea equivocada de que el ser SPF es un rasgo genético, en lugar de un estado de salud (Lightner *et al.*, 2009). El desarrollo de *L. vannamei* SPF, libres no solo de VNHHI sino también de todos los agentes patógenos más importantes conocidos de camarón peneido, ha dado como resultado la introducción de la especie en Asia, y a superar a *P. monodon* en el año 2005 como especie de camarón de piscifactoría dominante en Asia, así como en las Américas, donde se desarrollaron progenies SPF (FAO, 2006; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Los ejemplares adecuados para las pruebas de detección del VNHHI son todos los estadios de vida (huevos, larvas, post-larvas, juveniles y adultos) (Motte *et al.*, 2003). Aunque el VNHHI puede infectar a cualquier estadio, la gravedad de la infección, y por tanto la carga de virus, puede hallarse por debajo de los límites de detección en los huevos desovados y en los estadios larvarios, de modo que estos estadios de vida pueden no ser adecuados para la detección del VNHHI o la certificación de ausencia de NHHI.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

En el Capítulo 2.2.0 se indican cuáles son los métodos histológicos y las pruebas moleculares sistemáticos, y se proporciona orientación sobre cómo conservar las muestras para cada tipo de prueba.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras que se toman para pruebas moleculares pueden combinarse convirtiéndolas en muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares de juveniles, subadultos o adultos cada una. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad de muestra suficiente (ácido nucleico extraído) como para llevar a cabo una prueba diagnóstica, tal vez sea necesario poner en común cantidades mayores de ejemplares (como ~150 o más huevos o larvas, o 50–150 PL, en función de los tamaños/edades). Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El VNHHI infecta tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. Los principales tejidos diana del VNHHI son las células del tejido conjuntivo, las branquias, ganglios hematopoyéticos y hemocitos, el cordón nervioso central y sus ganglios, las células epiteliales del túbulo de la glándula antenal y las células parenquimatosas del órgano linfático (Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998). Por tanto, las muestras formadas por camarones enteros o tejidos de camarón (como larvas o PL) que contengan algunos de los tejidos diana mencionados son adecuadas para la mayoría de pruebas basadas en métodos moleculares.

Cuando es necesario analizar reproductores mediante pruebas no letales puede obtenerse hemolinfa o pleópodos extirpados y utilizarse para las pruebas (normalmente para PCR, o hibridación por transferencia puntual con sondas específicas) (Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VNHHI es un virus sistémico y no se replica en tejidos entéricos (como el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos). Así, los tejidos entéricos no son muestras adecuadas para la detección de infección por el VNHHI (Lightner, 1996a; 2011; Lightner y Redman, 1998).

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Ciertas deformidades, en concreto un rostro inclinado hacia la izquierda o la derecha, que pueden presentar *P. vannamei* y *P. stylirostris* con SDE, son patognomónicas de infección por el VNHHI (véase el apartado 4.2.1.2). Sin embargo, este signo clínico no siempre aparece en poblaciones de camarón crónicamente infectadas por el VNHHI. Dado que *P. vannamei*, *P. stylirostris*, y *P. monodon* pueden estar infectados por el VNHHI y no presentar signos evidentes de infección (por ejemplo, es posible que presenten una considerable reducción de la velocidad de crecimiento o presencia de “enanos”), se recomienda llevar a cabo pruebas moleculares cuando se requiera demostrar la ausencia de NHHI.

4.1.2. Alteraciones de comportamiento

En la NHHI aguda, *P. stylirostris* puede presentar cambios de comportamiento (véase el apartado 4.2.1.1), pero con SDE no se han notificado cambios de comportamiento importantes en los camarones afectados.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

4.2.1.1. NHHI en *Penaeus stylirostris*

El VNHHI produce a menudo enfermedad aguda con mortalidades muy altas en los ejemplares juveniles de la especie. Las larvas infectadas verticalmente y las primeras PL no llegan a estar enfermas, pero en los ejemplares que tienen unos 35 días de edad o en los juveniles más viejos, se pueden observar signos macroscópicos de la enfermedad, seguidos de mortalidades masivas. En los

juveniles infectados horizontalmente, el periodo de incubación y la gravedad de la enfermedad dependen en cierto modo del tamaño y de la edad, y los juveniles pequeños son siempre los más gravemente afectados. Los adultos infectados rara vez muestran síntomas de la enfermedad o mortalidad (Bell y Lightner, 1984; 1987; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 1983; Brock y Main, 1994; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 1996c; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). Los signos macroscópicos no son específicos de la NHHI, pero los *L. stylirostris* juveniles con NHHI aguda muestran una marcada reducción en el consumo de alimento, seguida de cambios en el comportamiento y el aspecto. Se ha observado que el camarón de esta especie con NHHI aguda sube lentamente en los tanques de cultivo a la superficie del agua, se queda allí inmóvil y después gira y se hunde lentamente (con el lado ventral hacia arriba) al fondo del tanque. Los camarones que muestran este comportamiento pueden repetir el proceso durante varias horas hasta que están demasiado débiles para continuar, o hasta que son atacados y devorados por sus hermanos más sanos. *Litopenaeus stylirostris* en este estadio de infección tiene a menudo manchas blancas o coloreadas de marrón (que difieren en aspecto y localización de las manchas blancas que a veces se observan en el camarón infectado por el VSMB) en la epidermis cuticular, especialmente en la unión de las placas tergaes del abdomen, que le confieren al camarón un aspecto moteado. Este moteado pierde intensidad en los *L. stylirostris* moribundos, ya que tales individuos se vuelven más azulados. En *L. stylirostris* y en *P. monodon* en fase terminal por infecciones con el VNHHI, los camarones moribundos son a menudo de color claramente azulado, y tienen la musculatura abdominal opaca (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 1996c; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b).

4.2.1.2. NHHI en *Penaeus vannamei*

La SDE, una forma crónica de la NHHI, tiene lugar en *P. vannamei* como resultado de la infección por el VNHHI. La gravedad y prevalencia de la SDE en poblaciones infectadas de juveniles o estadios más tardíos de *L. vannamei* puede estar relacionada con la infección durante el estadio de larva o de principio de PL. La SDE también se ha descrito en poblaciones de piscifactoría de *L. stylirostris* y *P. monodon*. El camarón juvenil con SDE puede presentar una inclinación (45° a 90° a la izquierda o a la derecha), o bien una deformación del rostro, una deformación en el sexto segmento abdominal, los flagelos de las antenas arrugados, aspereza de la cutícula, “cabezas en burbuja” y otras deformidades de la cutícula. Las poblaciones de camarón juvenil con SDE muestran crecimiento dispar con una amplia variedad de tamaños, y muchos camarones son más pequeños de lo esperado (“enanos”). El coeficiente de variación (CV = la desviación estándar dividida por la media de grupos de distintos tamaños dentro de una población) para poblaciones con SDE suele ser superior al 30% y puede acercarse al 90%, mientras que las poblaciones de juveniles de *L. vannamei* y *L. stylirostris* libres del VNHHI (y por tanto libres de SDE) suelen tener una CV del 10-30% (Bray *et al.*, 1994; Brock y Lightner, 1990; Brock *et al.*, 1983; Brock y Main, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; Lightner, 1996a; Primavera y Quinitio, 2000; Pruder *et al.*, 1995).

4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las infecciones agudas por el VNHHI en *P. stylirostris* pueden diagnosticarse fácilmente mediante métodos histológicos sistemáticos de tinción con hematoxilina y eosina (H/E) (véase el apartado 4.2.6). Las infecciones crónicas por el VNHHI y SDE son mucho más difíciles de diagnosticar mediante métodos histológicos de rutina con H/E. Para el diagnóstico de infecciones crónicas, se recomienda utilizar métodos moleculares para la detección del VNHHI (como la PCR o la aplicación de sondas de ADN específicas del VNHHI, o bien pruebas de hibridación por transferencia de puntos o ISH de cortes histológicos).

La prueba histopatológica de cuerpos de inclusión intranucleares prominentes, como los cuerpos de Cowdry tipo A, proporciona un diagnóstico provisional de la infección por el VNHHI. Estos cuerpos de inclusión característicos de la NHHI son cuerpos de inclusión eosinófilos y a menudo presentan halo (con colorantes de hematoxilina y eosina de tejidos conservados con fijadores que contengan ácido acético, tales como la solución AFA de Davidson y la solución de Bouin) (Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996a), son intranucleares y se encuentran en el interior de núcleos hipertrofiados y con la cromatina en los márgenes de células de tejidos de origen ectodérmico (epidermis, epitelio hipodérmico del intestino delgado y grueso, cordón nervioso y ganglios nerviosos) y mesodérmico (órganos hematopoyéticos, glándula antenal, gónadas, órgano linfóide y tejido conjuntivo). Los cuerpos de inclusión intranucleares debidos al VNHHI pueden confundirse fácilmente con cuerpos de inclusión intranucleares en desarrollo debidos a una infección por el VSMB. La ISH (véase el apartado 4.3.1.2.3 de este capítulo) de tales cortes con una sonda específica de ADN para el VNHHI proporciona un diagnóstico definitivo de la infección por VNHHI (Lightner, 1996a; 2011; Lightner y Redman, 1988).

4.2.4. Preparaciones húmedas

No se ha desarrollado ningún método fiable para observar lesiones mediante microscopía óptica.

4.2.5. Frotis

No aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Histopatología: puede utilizarse histología para proporcionar un diagnóstico definitivo de la infección por el VNHHI. Dado que la formalina tamponada al 10% y otros fijadores en el mejor de los casos proporcionan una fijación pasable del camarón, es muy recomendable utilizar fijador de Davidson (que contiene un 33% de alcohol etílico [al 95%], un 22% de formalina [que a su vez contiene alrededor de un 37% de formaldehído], un 11,5% de ácido acético glacial y un 33,5% de agua destilada o de grifo) en todos los estudios histológicos sistemáticos con camarón (Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996a). Para optimizar los resultados, no debe utilizarse camarón muerto. Para la fijación y el examen histológico deben escogerse solamente camarones vivos, moribundos o en estado comprometido. Los camarones escogidos se sacrifican mediante una inyección de fijador directamente en el hepatopáncreas; se abre la cutícula situada sobre el cefalotórax y el abdomen justo lateral a la línea media dorsal, mediante unas tijeras quirúrgicas de punta fina para potenciar la penetración del fijador (el abdomen se puede retirar y eliminar), se sumerge el camarón entero (o el cefalotórax menos el abdomen) en fijador durante 24 a no más de 48 horas, y a continuación se transfiere a alcohol etílico al 70%, donde queda guardado. Una vez en el alcohol etílico al 70%, los ejemplares fijados pueden ser transportados (por correo o mensajería al laboratorio de diagnóstico) envueltos en paños o papel de cocina saturados con alcohol etílico al 70% e introducidos en bolsas de plástico herméticas (véase el apartado 4.2.3).

Hibridación *in-situ* (véase el apartado 4.3.1.2.3, más adelante).

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica no se recomienda para el diagnóstico sistemático del VNHHI.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente patógeno

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

El VNHHI no se ha cultivado *in vitro*. No existe ninguna línea celular de crustáceos (Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998).

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

No se ha desarrollado ninguno con éxito.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Existen métodos directos de detección basados en sondas de ADN específicas del VNHHI en formato de transferencia puntual y de ISH. Se han desarrollado pruebas de PCR para el VNHHI y se dispone sin dificultad de varios métodos y productos basados en estos métodos.

Sondas de ADN para transferencia puntual y aplicaciones de ISH: los métodos basados en sonda génica y PCR proporcionan mayor sensibilidad que las técnicas más tradicionales de diagnóstico de

la NHHI, que se basan en enfoques histopatológicos clásicos. Además, estos métodos tienen la ventaja añadida de permitir la realización de pruebas no letales en camarones reproductores de gran valor. Se puede tomar una muestra de hemolinfa con una jeringa de tuberculina, o una biopsia de un apéndice (por ejemplo, de un pleópodo) (Bell *et al.*, 1990), y usarla como muestra para una prueba de transferencia puntual directa.

Procedimiento de hibridación por transferencia puntual para el VNHHI: la sonda se marca de forma no radiactiva con digoxigenina-11-dUTP (DIG-11- dUTP). El sistema para marcar sondas de ácidos nucleicos utilizando DIG fue desarrollado por Boehringer Mannheim Biochemicals (esta compañía es propiedad actualmente de la Roche Diagnostic Corporation) y está descrito en la Guía Roche de Marcaje no Radioactivo con DIG y Selección de Productos de Detección, así como en la Guía del Usuario del Manual de Aplicación de DIG para Sistemas de Hibridación en Filtro™ y en el Manual¹ de Aplicación de la Hibridación In Situ No Radiactiva de Boehringer Mannheim (2006a; 2006b). Los protocolos ofrecidos a continuación utilizan sonda marcada con DIG para VNHHI, que puede producirse de varias formas. Las sondas pueden ser producidas utilizando un fragmento del ADN del VNHHI clonado como molde por el método de marcaje con cebado aleatorio (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1993). Otro posible método de producción de sondas marcadas con DIG utiliza cebadores específicos del ADN clonado del VNHHI, y otro es el kit PCR DIG Probe Synthesis Kit™, de Roche.

Procedimiento de hibridación por transferencia puntual: El método de hibridación por transferencia puntual explicado a continuación se basa en una sonda de ADN marcada con DIG para el VNHHI y en general sigue los métodos descritos por Mari *et al.* (1993) y Lightner (1996a). Las fórmulas para los reactivos necesarios se indican después de los protocolos.

- i) Se prepara una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics Cat. N° 1-209-299 o equivalente): se cortan trozos para encajar muestras y controles y se marca con un lápiz de mina suave haciendo 1 cm cuadrado para cada muestra. Se incluye un control positivo y uno negativo sobre cada filtro. Se sitúa sobre un trozo de papel de filtro (Whatman 3MM).
- ii) Si es necesario, en el interior de tubos de microcentrífuga de 1,5 ml se diluyen las muestras problema en TE (Tris/EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) más 50 µg/ml de ADN de esperma de salmón, utilizando 1 µl de muestra en 9 µl de tampón. Las muestras para transferencia puntual pueden ser de hemolinfa, tejidos homogeneizados en TN (Tris/NaCl: NaCl 0,4 M y Tris-HCl 20 mM, pH 7,4), o extracto de ADN en Tris/HCl 10 mM.
- iii) Se hierven las muestras durante 10 minutos y se congelan rápidamente en hielo durante 5 minutos. Se centrifugan brevemente en microfuga en frío para bajar todo el líquido y sedimentar toda posible proteína coagulada. Se mantienen en hielo hasta que las muestras son dispuestas en puntos sobre la membrana.
- iv) Se transfieren 1-3 µl de cada muestra a un lugar apropiado sobre los filtros. Se dejan secar al aire y después se fijan las muestras sobre la membrana calentando a 80°C durante 30 minutos o por entrecruzamiento con luz UV utilizando un transiluminador de ADN durante 3 minutos.
- v) Se ajusta un baño de agua a 68°C y se prepara una solución de prehibridación. Se preparan 8 ml por membrana para una membrana de 10 × 15 cm. Se coloca una placa de agitación caliente en la posición "lento" y se mueve mientras se calienta la solución durante 30 minutos hasta que el agente bloqueante se haya disuelto y la solución esté turbia. Se preparan también algunas bolsas cerradas herméticamente con calor, de un tamaño ligeramente más grande que la membrana: se necesitarán de cinco a seis bolsas por membrana.
- vi) Se retiran las membranas del horno o transiluminador y se introducen en una bolsa cerrada herméticamente con calor con 4 ml de solución de prehibridación por cada membrana. Se sellan herméticamente las bolsas y se sumergen en un baño de agua a 68°C durante 0,5-1 hora.
- vii) Se hierve la sonda marcada con DIG durante 10 minutos, se congela rápidamente en hielo y se centrifuga en una microfuga en frío para bajar todo el líquido del tubo de microcentrífuga. Se mantiene en hielo. Se retira la solución de prehibridación de las bolsas. Se añaden 2 ml de solución reciente de prehibridación a cada bolsa y después se añade a cada una la cantidad correcta y predeterminada de sonda marcada con DIG, mezclando bien a medida que se va añadiendo. Se cierran las bolsas herméticamente, se sumergen de nuevo en el baño de agua a 68°C y se incuban durante 8-12 horas.

1 Las referencias a productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

viii) Se lavan bien las membranas con:

Citrato salino estándar (SSC) 2×/ dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%	2 ×	5 minutos a temperatura ambiente
SSC 0,1× / SDS al 0,1% (se utilizan 4 ml/filtro y se cierran herméticamente en bolsas)	3 ×	15 minutos a 68°C
Tampón I	1 ×	5 minutos a temperatura ambiente
Tampón II	1 ×	30 minutos a temperatura ambiente
Tampón I	1 ×	5 minutos a temperatura ambiente

(Los tampones se preparan con anticipación).

ix) Se deja que la membrana reaccione en bolsas con conjugado de AP anti-DIG (Roche Diagnostics 1-093-274) diluido a 1/5.000 en Tampón I. Se utilizan 3 ml por membrana y se incuban durante 30-45 minutos a temperatura ambiente en una plataforma oscilante.

x) Se lava bien la membrana con:

Tampón I	2 ×	15 minutos a temperatura ambiente
Tampón III	1 ×	5 minutos a temperatura ambiente

xi) Se revelan las membranas en bolsas utilizando 3 ml por membrana de solución de revelado (sal de nitroazul de tetrazolio [NBT]/X-fosfato en Tampón III) preparada justo antes de su uso. Se deja reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Se detienen las reacciones en Tampón IV y se secan las membranas en papel de filtro 3MM.

xii) Se fotografían los resultados (porque el color pierde intensidad con el paso del tiempo).

xiii) Se almacenan las membranas secas en bolsas cerradas herméticamente con calor.

Procedimiento de la hibridación in-situ (ISH): El método de hibridación in-situ descrito a continuación utiliza una sonda de ADN marcada con DIG para el VNHHI y en general sigue los métodos descritos en Mari *et al.* (1993) y Lightner (1996a). Las fórmulas para los reactivos necesarios se describen después de los protocolos.

i) Se incluye el tejido en parafina y se realizan cortes de 4-6 µm de espesor. Los cortes se sitúan sobre portas de microscopio cargados positivamente (no poner gelatina en agua para hacer flotar los cortes; utilizar solo agua).

ii) Se colocan los portas en un soporte, como por ejemplo un soporte Tissue-Tek. Se calientan los portas en un horno durante 45 minutos a 60°C. En la batería de la tinción, el tejido se rehidrata del siguiente modo:

Xileno (o un sustituto adecuado)	3 ×	5 minutos cada una
Alcohol absoluto	2 ×	1 minuto cada una
Alcohol al 95%	2 ×	10 inmersiones cada una
Alcohol al 80%	2 ×	10 inmersiones cada una
Alcohol al 50%	1 ×	10 inmersiones
Agua destilada	Seis lavados (no dejar que los portas se sequen)	

iii) Se lavan los portas durante 5 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS o tampón Tris/NaCl/EDTA [TNE]). Se prepara proteinasa K fresca a una concentración de 100 µg ml⁻¹ en PBS (o TNE). Se colocan los portas horizontalmente en una cámara húmeda, se pipetea encima 500 µl de la solución de proteinasa K y se incuban durante 10-15 minutos a 37°C. Se escurre el líquido con papel de filtro.

iv) Se devuelven los portas al soporte. Se fijan los cortes en formaldehído frío al 0,4% durante 5 minutos a temperatura ambiente.

v) Se incuban los portas en SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente.

vi) Con los portas horizontales, se añaden 0,5-1 ml de tampón prehibridación y se incuban en una cámara húmeda durante 15-30 minutos a 37°C.

vii) Se hierve la sonda marcada con DIG durante 10 minutos y se congela rápidamente sobre hielo; se centrifuga brevemente en frío y se mantiene en hielo. Se diluye la sonda a 25 ng ml⁻¹ en solución prehibridación y se cubre el tejido con 250 µl de la solución. Se incuban los portas durante 2-4 horas a 42°C o durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Se escurre el líquido en papel de cocina. Durante esta incubación, se pre-calientan los tampones de lavado a 37°C.

viii) Se colocan los portas en el soporte y se lavan como se indica a continuación:

SSC 2×	2 ×	5–30 minutos a 37°C
SSC 1×	2 ×	5 minutos a 37°C
SSC 0,5×	2 ×	5 minutos a 37°C

ix) Se lavan los portas durante 5 minutos en Tampón I a temperatura ambiente. Se colocan los portas horizontalmente en una cámara húmeda y se bloquean con 0,5 ml de Tampón II por porta. Se incuban durante 15 minutos a 37°C. Se escurre el líquido en papel de cocina.

x) Se diluye el conjugado de AP anti-DIG (Roche Applied Science cat. 10686322) a 1/1000 en Tampón II (1 µl de AP anti-DIG por ml de tampón). Se cubre el tejido con 500 µl de conjugado diluido y se incuba en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.

xi) Se colocan los portas en un soporte. Se lavan en Tampón I dos veces durante 5-10 minutos cada vez a temperatura ambiente. Se lavan una vez con Tampón III durante 5-10 minutos.

xii) Se prepara la solución de revelado añadiendo en primer lugar 4,5 µl de NBT por 1 ml de tampón III. Se mezcla bien. A continuación, se añaden 3,5 µl de X-fosfato por ml de solución y se mezcla bien. Se pipetea 500 µl por porta y se incuban en una cámara húmeda en la oscuridad durante 2-3 horas a temperatura ambiente.

xiii) Se detiene la reacción devolviendo los portas al soporte y lavando en Tampón IV durante 15 minutos a temperatura ambiente.

xiv) Se someten las muestras a una coloración de contraste sumergiéndolas durante 5 minutos en una solución acuosa de marrón Bismarck Y al 0,5%.

xv) Se deshidratan los portas en la batería de tinción como se indica a continuación:

Alcohol al 95%	3 ×	10 inmersiones cada uno
Alcohol absoluto	3 ×	10 inmersiones cada uno
Xileno (o un sustituto adecuado)	4 ×	10 inmersiones cada uno
No dejar secar los portas – dejarlos en la última cubeta del xileno (o sustituto del xileno) hasta que estén listos para los cubres.		

xvi) Se añade medio de montaje (Permount) y se montan con cubre.

xvii) Se examinan los portas bajo campo claro para ver si existe precipitado azul oscuro o negro que indique los puntos en los que se encuentra ADN de VNHHI. Las inclusiones intranucleares patodiagnósticas de Cowdry tipo A están bien marcadas con la sonda. Con frecuencia también están bien marcados los núcleos de la célula hospedadora sin inclusiones evidentes, inclusiones citoplasmáticas y acumulación de virus libre en los espacios del tejido y la hemolinfa.

NOTA: Siempre debe llevarse a cabo un control positivo y uno negativo.

Fórmulas de reactivos para el método de la ISH:

i) Solución salina tamponada con fosfato 10×

NaCl	160 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	23 g
KCl	4 g
H ₂ O DD	1950 ml (qs to 2 litros)

pH a 8,2 con NaOH; se esteriliza en autoclave; se almacena a temperatura ambiente. Para hacer PBS 1x, se diluyen 100 ml de PBS 10x en 900 ml de H₂O DD; Se filtra solución 1x a través de un filtro de 0,45 µm de poro; se almacena a 4°C.

ii) Tampón Tris/NaCl/EDTA (TNE) 10×

Tris base	60,57 g
NaCl	5,84 g
EDTA	3,72 g
DD H ₂ O	900 ml (c.s.p. 1 litro)

pH a 7,4 con HCl concentrado o 5 M. Para preparar TNE 1x, se diluyen 100 ml de TNE 10x en 900 ml de H₂O DD; se filtra 1 × solución a través de un filtro de 0,45 µm; se almacena a 4°C

iii) Proteinasa K, 100 µg ml⁻¹ (se prepara inmediatamente antes de su uso)

PBS	10 ml PBS 1x
Proteinasa K	1 mg

iv) Formaldehído al 0,4%

Formaldehído al 37%	5,4 ml
DD H ₂ O	500 ml

Se almacena a 4°C; se puede utilizar hasta 4 veces antes de desecharlo.

v) Tampón prehibridación (50 ml de volumen final)

SSC 4×	10 ml de SSC 20×
Formamida al 50%	25 ml de formamida al 100%
Solución Denhardt 1×	2,5 ml de solución de Denhardt 20×
Sulfato de dextrano al 5%	10 ml de sulfato de dextrano al 25%

Calentar a 60°C

Se hierven 2,5 ml de ADN de esperma de salmón a una concentración de 10 mg/ml y se añade al tampón para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón; se almacena a 4°C.

vi) Tampón SSC 20×

NaCl 3 M	175,32 g de NaCl
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O 0,3 M	88,23 g de citrato de Na 2H ₂ O
H ₂ O DD	1000 ml (qs)

pH a 7,0; se esteriliza en autoclave; se almacena a 4°C.

Para obtener SSC 2x, se diluyen 100 ml de SSC 20x en 900 ml de H₂O DD; para obtener SSC 1x, se diluyen 50 ml de SSC 20x en 950 ml de H₂O DD; para obtener SSC 0,5x, se diluyen 50 ml de SSC 20x en 1950 ml de H₂O DD. Se filtran las soluciones a través de un filtro de 0,45 µm de poro; se almacenan a 4°C.

vii) Solución de Denhardt 20×

BSA (Fracción V)	0,4 g de albúmina de suero bovino
Ficoll 400	0,4 g de Ficoll
PVP 360	0,4 g de polivinilpirrolidona
H ₂ O DD	100 ml

Se filtran las soluciones a través de un filtro de 0,45 µm de poro, se almacenan a 4°C. Se disponen alícuotas de 2,5 ml en pequeños tubos y se guardan congeladas.

viii) Sulfato de dextrano al 25%

Sulfato de dextrano	25 g
H ₂ O DD	100 ml

Se mezcla para disolver; se almacena congelado en alícuotas de 10 ml.

ix) ADN de esperma de salmón (10 mg ml⁻¹)

ADN de esperma de salmón	0,25 g
H ₂ O DD	25 ml

Para prepararlo, se calienta agua y se añade el ADN lentamente agitándolo hasta que esté completamente disuelto; se hierve durante 10 minutos; se fuerza el ADN empujándolo a través de una aguja de 1,2 mm de diámetro externo varias veces; se distribuyen alícuotas de 2,5 ml en tubos pequeños y se almacenan congelados; se hierven durante 10 minutos inmediatamente antes de su uso para facilitar la mezcla en el tampón.

x) Tampón I 10×

Tris/HCl 1M	121,1 g de Tris base
NaCl 1,5 M	87,7 g de NaCl
H ₂ O DD	1000 ml (qs)

pH a 7,5 con HCl. Se esteriliza en autoclave; se almacena a 4°C.

Para obtener Tampón I 1x, se diluyen 100 ml de 10 × solución madre en 900 ml de H₂O DD. Se filtra a través de un filtro de 0,45 µm de poro; se almacena a 4°C.

xi) Tampón II (tampón bloqueante)

Tampón bloqueante	0,25 g de Reactivo bloqueante (Roche Diagnostics 1-096-176)
Tampón I	50 ml de tampón I 1×

Se almacena a 4°C hasta 2 semanas.

xii) Tampón III

Tris/HCl 100 mM	1,21 g de Tris base
NaCl 100 mM	0,58 g de NaCl
H ₂ O DD	100 ml (qs)
pH a 9,5 con HCl	
Después se añade:	
MgCl ₂ 50 mM	1,02 g de MgCl ₂ ·6H ₂ O
Se filtra por un filtro de 0,45 µm de poro; se almacena a 4°C.	

xiii) Alcohol polivinílico (PVA) al 10%

Alcohol polivinílico	10 g
H ₂ O DD	100 ml

Para prepararlo, se añade lentamente el PVA al agua mientras se agita con un poco de calor (el PVA tarda 2-3 horas en convertirse en solución). Se ponen 10 ml por tubo y se almacena congelado a -20°C.

xiv) Solución de revelado

Se mezclan 90 ml de Tampón III con 10 ml de PVA al 10%. Se almacenan a 4°C. Inmediatamente antes de uso, a cada ml de Tampón III con PVA se añaden

4,5 µl de NBT	75 mg de NBT ml ⁻¹ en dimetilformamida al 70% (Roche Diagnostics 1-383-213)
3,5 µl de X-fosfato	5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato, sal de toluidina (50 mg ml ⁻¹ en dimetilformamida) (Roche Diagnostics 1-383-221)

xv) Tampón IV

Tris/HCl 10 mM	1,21 g de Tris base
EDTA 1mM	0,37 g de EDTA·2H ₂ O (sal disódica)
H ₂ O DD	1000 ml
pH a 8,0 con HCl. Se filtra por un filtro de 0,45 µm; se almacena a 4°C.	

xvi) Marrón Bismark Y al 0,5%

Marrón Bismark Y	2,5 g
H ₂ O DD	500 ml

Se disuelve el colorante en agua. Se filtra a través de un filtro Whatman n° 1; se almacena a temperatura ambiente.

Reacción en cadena de la polimerasa para el VNHHI: Existen varios métodos de PCR simple (Krabsetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2003; Tang y Lightner 2001) y varios kits comerciales de PCR para la detección del VNHHI. También existen métodos anidados de distintas marcas comerciales.

Hay múltiples variedades geográficas del VNHHI, algunas de las cuales no son detectadas por todos los métodos disponibles para el VNHHI. Dos series de cebadores, 392F/R y 389F/R, son las más adecuadas para detectar todas las variantes genéticas conocidas del VNHHI (Krabsetsve *et al.*, 2004; Tang y Lightner 2002), incluidos los tipos 3A y 3B, que están insertos en el genoma de ciertas poblaciones geográficas de *P. monodon* de la zona Indo-Pacífica occidental, África oriental, Australia y la India (Duda y Palumbi, 1999; Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). La serie de cebadores 309F/R amplifica solo un segmento de los VNHHI tipos 1 y 2 (las formas infecciosas del VNHHI), pero no de los tipos 3A y 3B, que son no infecciosos y forman parte del genoma de *P. monodon* (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Por tanto, es muy recomendable confirmar resultados positivos y/o negativos no esperados de PCR para el VNHHI con una segunda serie de cebadores, o bien mediante otro método de diagnóstico (es decir, PCR utilizando cebadores de otra región del genoma, PCR en tiempo real, bioanálisis, ISH).

Tabla 4.1. Series de cebadores recomendadas para la detección del VNHHI mediante PCR simple

Cebador	Producto	Secuencia	% de G+C/Temperatura	Banco de genes y Bibliografía
389F	389 pb	5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	50%/72°C	AF218266
389R		5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	45%/71°C	(Tang et al., 2000)
77012F	356 pb	5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	50%/68°C	AF218266
77353R		5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	55%/63°C	(Nunan et al., 2000)
392F	392 pb	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	50%/68°C	AF218266
392R		5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	50%/71°C	(Tang et al., 2000; 2007)
309F	309 pb	5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	36%/68°C	AF218266
309R		5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	40%/69°C	(Tang et al., 2007)
MG831F	831 pb	5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	45%/58°C	DQ228358
MG831R		5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	55%/62°C	(Tang et al., 2007)

NOTA: Los cebadores 389F/R y 392F/R descritos anteriormente corresponden a la región codificadora de la proteína no estructural (ORF 1) del genoma del VNHHI. Los cebadores 77353/77012 corresponden a una región del genoma situada entre la región que codifica una proteína no estructural y la que codifica una proteína estructural (proteína de la cápsida). En el caso de obtener resultados ambiguos utilizando la serie de cebador "universal" 389F/R, se recomienda utilizar cebadores de una región diferente del genoma como prueba confirmatoria. En este caso, las series de cebadores pertinentes serían 77012/77353 o 392F/R

Método general de PCR para detectar el VNHHI: el método de PCR descrito a continuación para el VNHHI sigue generalmente las indicaciones señaladas por Nunan et al. (2000). La experiencia acumulada con la técnica ha llevado a modificaciones con respecto al molde (extracción del ADN de ejemplares clínicos), a la elección de cebadores (Tabla 4.1) y al volumen de la reacción.

- Se utiliza como molde el ADN extraído de homogenado de tejido triturado (tampón TN, NaCl 0,4 M, Tris 20 mM, pH 7,4) o hemolinfa (obtenida con una pequeña cantidad de citrato de sodio al 10%) o bien de tejido o hemolinfa fijados en etanol al 95% y después secados. Durante el paso de extracción del ADN se debe incluir un control de tejido o hemolinfa de animales que se sepa que son negativos. El ADN se puede extraer mediante varios métodos pero se han obtenido excelentes resultados utilizando kits de Roche Diagnostics (Cat. No. 1-796-828) o de Qiagen (Cat. No. 51304), o reactivos de Gibco Life Sciences (Dnazol Cat. No. 10503-027). Las lecturas espectrofotométricas del ADN final indicarán la pureza del ADN y la cantidad de ADN total extraído de la muestra. Se utilizan 1-5 µl de ADN extraído por 50 µl de volumen de reacción.
- Los siguientes controles deben incluirse en todas las PCR para la detección del VNHHI: a) ADN de una muestra de tejido que se sepa que es negativo; b) ADN de una muestra que se sepa que es positiva (de tejido o hemolinfa o de un clon de un plásmido que contenga el fragmento que amplifica la serie de cebadores específica; y c) un control "sin molde".
- Se utilizan como cebadores los cebadores 389F y 389R, que originan una banda de 389 pb (pares de bases) a partir del material infectado con el VNHHI, o los cebadores 77012F y 77353R, que originan una banda de 356 pb a partir del material infectado con el VNHHI. Se preparan los cebadores a razón de 100 ng/µl en agua destilada. Se mantienen congelados a -70°C.
- Se utiliza un método de "inicio caliente" para la polimerasa: si se utiliza Applied Biosystem's AmpliTaq Gold, eso implica un paso de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN antes de la

unión de los cebadores y la activación del enzima. Este programa se enlaza después con el programa de ciclos (35 ciclos) y un programa de extensión. El programa se ajusta de la siguiente forma:

Inicio caliente	Programa 1	5 minutos a 95°C	
Enlazado al	Programa 2	30 segundos a 95°C	
		30 segundos a 55°C	35 ciclos
		1 minuto a 72°C	
Enlazado al	Programa 3	7 minutos a 72°C	
Enlazado al	Programa 4	4°C hasta el final	

- v) Se prepara una “mezcla madre” formada por agua, tampón 10× para PCR, los cuatro dNTP, los dos cebadores, MgCl₂ y AmpliTaq Gold (se supone la utilización de 1 µl de molde; si se usa más, se ajusta el agua adecuadamente). Se añade la mezcla a cada tubo. Se utilizan tubos de pared delgada diseñados para PCR. Se lleva a cabo siempre un control positivo y otro negativo

“Mezcla madre”:

H ₂ O DD	32,5 µl × número de muestras
Tampón para PCR 10×	5 µl × número de muestras
dTTP 10 mM	1 µl × número de muestras
dATP 10 mM	1 µl × número de muestras
dCTP 10 mM	1 µl × número de muestras
dGTP 10 mM	1 µl × número de muestras
MgCl ₂ 25 mM	4 µl × número de muestras
Cebador directo (100 ng µl ⁻¹)	1,5 µl × número de muestras
Cebador inverso (100 ng µl ⁻¹)	1,5 µl × número de muestras
AmpliTaq Gold	0,5 µl × número de muestras

Se agita esta solución en un vórtex para mezclar bien todos los reactivos; se mantiene en hielo.

NOTA: El volumen de la reacción de la PCR puede modificarse. Previamente, las reacciones de PCR para el VNHHI se llevaron a cabo en volúmenes de 100 µl, pero no es necesario utilizar esa cantidad de reactivos, y por tanto en este procedimiento se describen volúmenes de 50 µl. De igual forma, las reacciones de la PCR también pueden llevarse a cabo con volúmenes tan bajos como de 25 µl. Para ello, deberán aumentarse o disminuirse los volúmenes de los reactivos proporcionalmente.

- vi) Para una mezcla de reacción de 50 µl, añadir 49 µl de la mezcla madre a cada tubo y añadir posteriormente 1 µl de la muestra problema.
- vii) Se agita cada tubo en un vórtex, se centrifuga rápidamente para extraer todo el líquido. Si el termociclador no tiene tapa para evitar la condensación, se recubre cuidadosamente la parte superior de cada muestra con 25-50 µl de aceite mineral y se vuelven a tapar los tubos. Se insertan los tubos en el termociclador y se comienza el programa 1 (“inicio caliente”), que está enlazado con los ciclos de ciclado, extensión y finalización
- viii) Si se utiliza el aceite mineral, se recuperan las muestras de debajo utilizando pipetas de 50 µl y se transfieren a un tubo limpio. El uso de puntas en pipetas de tipo largo (diseñadas para cargar geles) permite arrastrar menos aceite con la muestra
- ix) Se ponen 10 µl de la muestra en un gel de agarosa al 1,5% (conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para teñir el ADN). Se busca la banda de 389 pb (si se utilizan los cebadores 389F y 389R) o de 356 pb (si se utilizan los cebadores 77012F y 77353R). Las bandas no siempre se ven, ya que es necesario tener al menos 10 ng ADN/µl para ver el ADN en un gel. Para que la detección sea más sensible se puede llevar a cabo una inmunoelectrotransferencia del gel o una transferencia puntual. El ADN también se puede sedimentar (acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, a -70°C, durante 1-3 horas, y se centrifuga durante 20 minutos) y resuspenderse en una décima parte del volumen (es decir, 4 µl) de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) o agua, y volverse a analizar en el gel o bien mediante transferencia puntual.

Método de la PCR en tiempo real (qPCR) para el VNHHI: Se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real para la detección del VNHHI. Estos métodos ofrecen una extraordinaria sensibilidad, que permite detectar incluso una única copia de la secuencia diana del genoma del VNHHI (Dhar *et al.*, 2001; Tang y Lightner, 2001).

El método de la qPCR en el que se utiliza la bioquímica de TaqMan descrito a continuación para el VNHHI se basa en general en el método utilizado en Tang y Lightner (2001).

- i) Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan se seleccionan de una región de la secuencia genómica del VNHHI (GenBank AF218266) que codifica la proteína no estructural. Los cebadores y la sonda TaqMan están diseñados por el sistema Primer Express (Applied Biosystems). Las secuencias del cebador en dirección 5' (VNHHI1608F) y en dirección 3' (VNHHI1688R) son: 5'-TAC-TCC-GCA-CACCCA- ACC-A-3' y 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3', respectivamente. La sonda TaqMan (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TATTTG-3'), que corresponde a la región derivada del nucleótido 1632 al 1644, se sintetiza y se marca con los colorantes fluorescentes 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', y N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxiroadamina (TAMRA) en el extremo 3' (Applied Biosystems, parte n° 450025)
- ii) Preparación de ADN molde: la extracción y la purificación del ADN molde son las descritas en el apartado sobre la PCR tradicional.
- iii) La mezcla de reacción de la PCR contiene: mezcla madre TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems, parte n° 4324018), 0,3 µmol de cada cebador, 0,15 µmol de la sonda TaqMan, 5-50 ng de ADN, y agua en un volumen de reacción de 25 µl. Para optimizar los resultados, la mezcla de reacción debe agitarse en un vórtex y mezclarse bien.
- iv) La amplificación se lleva a cabo con el sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems; también pueden utilizarse ABI PRISM 7000, 7300, o 7500 o equivalente). El programa de ciclos es el siguiente: activación del AmpliTaq Gold durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.
- v) Al final de la reacción, se toman medidas de fluorescencia en tiempo real con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD). Se establece un umbral por encima de la línea base que comienza a detectar el incremento en la señal asociada con un incremento exponencial del producto de la PCR. Las muestras se definirán como negativas si los valores del Ct (ciclo umbral) superan los 40 ciclos. Las muestras con un valor de Ct por debajo de los 40 ciclos se consideran positivas. Para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real, una alícuota del producto de la PCR puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa-bromuro de etidio al 4% y fotografiarse. En las muestras que dan positivo para VNHHI puede visualizarse un fragmento de ADN de 81-pares de bases
- vi) Es necesario incluir un control “sin molde” en cada reacción. Esto se hace para excluir la presencia de contaminantes de fluorescencia en la mezcla de reacción o en el bloque de calor del termociclador. También debe incluirse un control positivo, que puede ser un plásmido que contenga la secuencia diana, o bien viriones purificados o ADN del tejido infectado con el VNHHI.

Secuenciación: Los productos de la PCR pueden clonarse y secuenciarse cuando sea necesario para confirmar la infección con el VNHHI, para identificar falsos positivos o amplificación inespecífica (Tang y Lightner, 2002; 2006).

Mediante PCR, se ha detectado VNHHI en *P. monodon* del sureste asiático. La mayoría de estas PCR para VNHHI también han detectado secuencias relacionadas con el VNHHI en poblaciones de *P. monodon* de África, Australia y Tailandia (Saksmerprome *et al.*, 2011; Tang & Lightner, 2006). Para distinguir las secuencias relacionadas con el VNHHI del virus verdadero, se han desarrollado pruebas de PCR en las que se emplean cebadores que detectan la secuencia vírica del VNHHI y no reaccionan con secuencias relacionadas con el VNHHI presentes en las poblaciones de *P. monodon* de África, Australia (Tang *et al.*, 2007) o Tailandia (por ejemplo, Saksmerprome *et al.*, 2011)

4.3.2. Métodos serológicos

Los camarones son animales invertebrados y no producen anticuerpos. Por tanto, no se dispone de métodos serológicos para la detección de la NHHI.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, detección y diagnóstico del VNHHI se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda y/o no está disponible actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva, ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Vigilancia, detección y métodos de diagnóstico del VNHHI

Método	Vigilancia				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	d	d	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	c
MO directa	d	d	d	d	d	d
Histopatología	d	d	c	c	a	b
ME de transmisión	d	d	d	d	c	c
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	c	d	d
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	b	b	a	a
PCR, qPCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica;
qPCR = reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

6. Prueba(s) recomendada para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la PCR es el método recomendado para la vigilancia dirigida, por motivos de disponibilidad, utilidad y sensibilidad y especificidad diagnósticas.

Al estudiar episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia dirigida, poner de manifiesto lesiones patognomónicas inducidas por el VNHHI en el epitelio cuticular mediante histología (con o sin confirmación mediante ISH con sondas de ADN específicas del VNHHI) es un método adecuado (Tabla 5.1).

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso es aquel en el que se observa poco porcentaje de eclosión de huevos, y escasa supervivencia y rendimiento del cultivo de los estadios larvarios y PL (Motte *et al.*, 2003) cuando se utilizan reproductores de poblaciones salvajes o de piscifactoría donde el VNHHI es enzoótico.

En ejemplares de piscifactoría de *L. stylirostris*, los juveniles, subadultos y adultos pueden presentar altas mortalidades persistentemente. Los ejemplares infectados por el VNHHI de *L. vannamei*, *L. stylirostris*, y posiblemente *P. monodon* pueden presentar un crecimiento escaso y muy dispar, poco rendimiento del cultivo en general, y deformidades cuticulares, incluyendo especialmente rostros torcidos y los sextos segmentos abdominales deformados.

Se observan cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos a basófilos pálidos en los tejidos diana típicos de la infección por el VNHHI. Como los cuerpos de inclusión intranucleares del VNHHI tienen un aspecto casi idéntico al de los que aparecen en los primeros estadios de las infecciones por el VSMB, su presencia en cortes de tejido debe considerarse como un diagnóstico provisional de VNHHI hasta que se confirme con una segunda prueba, como la transferencia por puntos o la ISH con sondas específicas de ADN para el VNHHI, o con resultados positivos en las pruebas de PCR para el VNHHI.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtienen resultados positivos en cualquier combinación de al menos dos de los siguientes cuatro métodos:

- Resultados positivos en hibridación por transferencia puntual para el VNHHI.
- Señal histológica positiva en la ISH para lesiones propias del VNHHI.
- Resultados positivos en la PCR para el VNHHI.
- Puede ser necesaria la secuenciación de productos específicos de la PCR cuando el objetivo sea determinar el genotipo del VNHHI.

8. Bibliografía

ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H. SWEENEY J. & LOTZ J. (1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHHN Disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of Shrimp Size on Disease Expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.

BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of IHHN virus infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.

BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1991). Chapter 24. Unclassified Viruses of Crustacea. In: Atlas of Invertebrate Viruses, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 597–622.

BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BONNICHON V., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 179–184.

BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.

BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. In: Diseases of Marine Animals, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.

BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International. Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.

BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean Biol.*, **13**, 87–94.

CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.

CASTILLE F.L., SAMOCHA T.M., LAWRENCE A.L., HE H., FRELIER P. & JAENIKE F. (1993). Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*, **113**, 65–81.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S., & WITHYACHUMNARNKUL. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress, Jory D.E., ed. Panama City, Panama, 1–11.

DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoeitic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.

DUDA T.F.JR. & PALUMBI S.R. (1999). Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar. Biol.*, **134**, 705–710.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANIOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.

FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.

JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 295–302.

KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquaculture Soc.*, **22**, 235–243.

KRABSETSV K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.

LIGHTNER D.V. (1983). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. In: CRC Handbook of Mariculture. Vol. 1. Crustacean Aquaculture, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 289–320.

LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp and Prawns. In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 8–127.

LIGHTNER D.V. (1993). Diseases of penaeid shrimp. In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996b). The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. In: Diseases in Asian Aquaculture VII, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992a). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES Marine Science Symposia*, **194**, 97–105.

LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture. Soc.*, **18**, 196–197.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992b). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 233–253.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, **33**, 165–180.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free (SPF) Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans, *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983b). Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mariculture Soc.*, **14**, 212–225.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG, K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., WILLIAMS R.R., MOHNEY L.L., CLERX J.P.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1985). Recent advances in penaeid virus disease investigations. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture. Soc.*, **16**, 267–274.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.

MARTINEZ-CORDOVA L.R. (1992). Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *The Progressive Fish Culturist*, **54**, 265–266.

MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B., & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J. World Aquaculture Soc.*, **30**, 192–200.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 330–334.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHHN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.

PRIMAVERA, J.H. & QUINTIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.*, **20**, 796–802.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. In: *Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

ROCHE APPLIED SCIENCE (2006a). DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics. www.roche-applied-science.com/frames/frame_publications.htm. Indianapolis, USA.

ROCHE APPLIED SCIENCE (2006b). DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide. Catalog Number 03 908 089 001. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA.

ROSENBERRY B. (2004). *World Shrimp Farming 2004*. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.

SAKSMERPROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160** (1–2), 180–190.

SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevidensovirus. *Virology*, **277**, 167–177.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (2003a). Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. *Aquaculture*, **216**, 19–29.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 93–97.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.

TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH, H.H. & LIGHTNER D.V. (2003b). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.

WEPPE M. (1992). Demonstration de altas cuaidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress, CENAIM, Guayaquil, Ecuador, 229–232.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). (2003). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Fourth Edition. OIE, Paris, France, 358 pp.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Para más información sobre la Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, contactar con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

CAPÍTULO 2.2.3.

MIONECROSIS INFECCIOSA

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la mionecrosis infecciosa (MNI) es una enfermedad vírica del camarón peneido causada por el virus de la mionecrosis infecciosa (VMNI) (Lightner *et al.*, 2004; Nibert 2007; Poulos *et al.*, 2006).

2. Información sobre la enfermedad**2.1. Factores del agente****2.1.1. Agente patógeno, cepas del agente**

El VMNI es un totivirus. El análisis filogenético de la secuencia que codifica el gen de la ARN polimerasa dirigida por ARN (RdRp) sugiere que el VMNI está más estrechamente relacionado con el virus que infecta al parásito *Giardia lamblia*, que pertenece a la familia Totiviridae (Fauquet *et al.*, 2005; Lightner 2011; Nibert 2007; Poulos *et al.*, 2006).

Las partículas de VMNI son icosaédricas y miden 40 nm de diámetro, con una densidad de flotación de 1.366 g ml⁻¹ en cloruro de cesio. El genoma consiste en una única molécula de ARN bicatenario de 7560 pb. La secuenciación del genoma vírico pone de manifiesto dos marcos de lectura abiertos (ORF) no solapados. El ORF 59 (ORF 1, nucleótidos 136-4953) codifica una posible proteína de unión al ARN y una proteína de cápsida. La región codificadora de la proteína de unión al ARN se sitúa en la primera mitad del ORF 1 y contiene un motivo de unión al ARN bicatenario en los primeros 60 aminoácidos. La segunda mitad del ORF 1 codifica una proteína de cápsida, según se ha determinado por la secuenciación de aminoácidos, con una masa molecular de 106 kDa. El ORF 39 (ORF 2, nucleótidos 5241-7451) codifica una posible ARN polimerasa dirigida por ARN (RdRp) (Poulos *et al.*, 2006).

Se han secuenciado los genomas completos de tipos de VMNI de Brasil e Indonesia, y se ha observado que son idénticas en un 99,6% a nivel de nucleótido (Poulos *et al.*, 2006; Senapin *et al.*, 2007). El 99,6% de coincidencia en la secuencia genómica (una información puntual sobre la introducción de poblaciones de *P. vannamei* procedentes de Brasil) indica que la enfermedad fue introducida de Brasil a Indonesia en 2006.

La MNI no es la misma enfermedad que la de la cola blanca del camarón peneido ni que la enfermedad de la cola blanda de *Macrobrachium rosenbergii*. Estas dos enfermedades cursan con signos macroscópicos e histológicos que imitan a la MNI, pero que están causados por dos tipos de virus distintos: un nodavirus denominado nodavirus de *Penaeus vannamei* – NVPv (Tang *et al.*, 2007) y un nodavirus denominado nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* - NVMr (véase el capítulo 2.2.7. Enfermedad de la cola blanca).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Solo se dispone de información esporádica. El VMNI es aparentemente más difícil de inactivar con los procedimientos clásicos de desinfección de los estanques (secado al sol, cloración, etc.) que otros virus del camarón peneido, como el VSMB, el VECA, el VST o el VNHHI. Se sospecha cuáles son los hospedadores reservorios, pero no se ha documentado ninguno de forma definitiva.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

No se dispone de datos.

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles (nombres comunes y científicos)

Las principales especies hospedadoras en las que se sabe que el VMNI causa brotes de la enfermedad y mortalidades es el camarón patiblanco, *Penaeus vannamei*, en el que la infección por el VMNI puede causar importantes pérdidas en poblaciones de piscifactoría (Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004). Se han notificado infecciones experimentales por el VMNI en el camarón azul, *P. stylirostris*, y en el langostino jumbo, *P. monodon*, pero no se produjo mortalidad como consecuencia de la infección experimental en esta prueba de laboratorio (Tang *et al.*, 2005).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Los juveniles y los subadultos de *P. vannamei*, cultivados en agua marina, salobre y salobre de baja salinidad parecen ser los más gravemente afectados por la MNI (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los principales tejidos diana del VMNI son el músculo estriado (esquelético y, con menor frecuencia, cardíaco), el tejido conjuntivo, los hemocitos y las células parenquimatosas del órgano linfático (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos miembros de poblaciones de *P. vannamei* que sobreviven a infecciones por el VMNI y/o a epizootias pueden portar el virus de por vida y, aunque no está científicamente documentado, se considera que transmiten el virus a su descendencia verticalmente.

2.2.6. Vectores

No se dispone de datos concretos sobre vectores. Sin embargo, dada su estructura (un virus ARN bicatenario sin envoltura), es probable que el VMNI siga siendo infeccioso en el intestino y las heces de las aves marinas que se han alimentado de camarones muertos o moribundos en piscifactorías en las que se esté teniendo lugar una epizootia de MNI, y que se disemine en el interior de piscifactorías o entre ellas mediante heces o mediante caparazones de camarones regurgitados (Vanpatten *et al.*, 2004).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

En el noreste de Brasil se ha notificado esporádicamente la presencia de camarones peneidos salvajes no inmunes como portadores.

2.3. Patrón de la enfermedad

Pueden aparecer brotes de MNI con súbitas mortalidades altas tras episodios estresantes como una captura mediante redes, la alimentación, cambios repentinos en la salinidad o la temperatura, etc., en juveniles tempranos, juveniles o adultos de *P. vannamei* en zonas donde el VMNI es enzoótico. Estos camarones tan gravemente afectados podrían haber estado alimentándose justo antes del inicio del estrés y podrían tener el intestino lleno. En la fase aguda de la MNI, los camarones presentarán zonas necróticas blancas, focales a extensas, en el músculo estriado (esquelético), especialmente en los segmentos abdominales distales y en el abanico caudal, que pueden necrosarse y enrojecerse en algunos ejemplares. Los camarones gravemente afectados devienen moribundos y las mortalidades pueden pasar a ser altas inmediatamente tras un episodio de “estrés” y seguir así durante varios días (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Se ha demostrado que el VMNI se transmite entre camarones por canibalismo (Lightner, 2011; Poulos *et al.*, 2006). Además, son probables la transmisión por el agua y la transmisión vertical del reproductor a su descendencia. En el caso de la transmisión vertical, no se sabe si el mecanismo es transovario o por contaminación de los huevos eclosionados.

2.3.2. Prevalencia

En las regiones donde el virus es enzoótico en poblaciones de *P. vannamei* de piscifactoría, la prevalencia del VMNI puede alcanzar el 100% (Andrade *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2004).

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha notificado en el noreste de Brasil (Andrade *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006) y el sureste asiático, incluido el este de la isla de Java (Senapin *et al.*, 2007). Un informe más reciente documenta MNI en el oeste de Java, Sumatra, Bangka, el oeste de Borneo, el sur de Sulawesi, Bali, Lombok y Sumbawa (Sutanto, 2011). Existen informes no oficiales y esporádicos referentes a otros países del sureste asiático.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Las mortalidades de la MNI oscilan entre el 40 y el 70% en *P. vannamei* de piscifactoría, y los índices de conversión (IC) de las poblaciones infectadas aumentan, pasando de valores normales de ~ 1,5 a 4,0 o superiores (Andrade *et al.*, 2007).

2.3.5. Factores ambientales

Los efectos de la temperatura y la salinidad se consideran factores probables de predisposición a los brotes de la enfermedad, pero no se dispone de datos experimentales (Nunes *et al.*, 2004).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se dispone de “vacunas” eficaces contra la MNI.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se conocen agentes terapéuticos eficaces contra la MNI.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de datos.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Existen informes puntuales de que algunas de las líneas de *P. vannamei* escogidas dan mejor supervivencia y rendimiento de cultivo en las piscifactorías en que la MNI es enzoótica. Durante un estudio de laboratorio controlado de 20 días de duración en el que se expuso experimentalmente a los camarones al VMNI, se observó que algunas líneas domesticadas de *P. vannamei* sobrevivían mejor que otras (White-Noble *et al.*, 2010).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Aunque no hay ningún informe publicado, algunas piscifactorías de camarones de Indonesia han pasado a criar *P. monodon* y *P. stylirostris* porque en un estudio preliminar de laboratorio se ha observado que estas especies son potencialmente más resistentes a la MNI que *P. vannamei* (Tang *et al.*, 2005).

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se dispone de datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Aunque se considera que el VMNI se transmite verticalmente (por vía transovárica), no existen informes publicados que documenten esta vía de transmisión. La desinfección de huevos y larvas (Chen *et al.*, 1992) es una buena práctica de manejo recomendada para reducir la posible transmisión de varias enfermedades de los camarones peneidos de la hembra a sus huevos o larvas, y dicha práctica puede reducir la contaminación de huevos eclosionados y las posteriores larvas con el VMNI.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se han aplicado ciertas prácticas de manejo con éxito a la prevención de las infecciones por el VMNI y de la MNI en piscifactorías de camarones. La más destacada ha sido la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) como prueba de pre-cribado de reproductores criados en estanques y/o de sus huevos eclosionados/larvas nauplias, con el fin de desechar los que sean positivos al virus (Andrade *et al.*, 2007). Se ha observado que el descanso y la repoblación con poblaciones de *P. vannamei* libres del VMNI de las piscifactorías o regiones enteras de cultivo afectadas, junto con el desarrollo de reservas de camarones *P. vannamei* libres de

patógenos específicos (SPF) más adecuadas para las condiciones locales de cultivo es la práctica de manejo que mejor funciona para la prevención y control de otras enfermedades víricas de los camarones, y debe ser aplicable al control y la prevención de la MNI (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Los ejemplares adecuados para las pruebas de detección de la infección por el VMNI basadas en métodos moleculares (como la RT-PCR, la RT-PCR anidada, la qRT-PCR, etc) son las postlarvas (PL), los juveniles y los adultos. Aunque el VMNI puede infectar a cualquier estadio de la vida del hospedador, la gravedad de la infección, y por tanto la carga vírica, puede ser inferior a los límites de detección en huevos eclosionados y en los estadios larvarios, de modo que estos estadios de vida pueden no ser muestras adecuadas para la detección del VMNI o la certificación de ausencia de MNI.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para conocer los datos sobre la histología o los métodos moleculares sistemáticos, o sobre las recomendaciones en cuanto a la conservación de las muestras para cada prueba, véase el Capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras que se toman para pruebas moleculares pueden combinarse convirtiéndolas en muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares de juveniles, subadultos o adultos cada una. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad de muestra suficiente (ácido nucleico extraído) como para llevar a cabo un ensayo diagnóstico tal vez sea necesario poner en común cantidades mayores de ejemplares (como ~150 o más huevos o larvas, o 50–150 PL en función de sus tamaños/edades). Véase también el Capítulo 2.2.0

3.4. Órganos y tejidos de elección

Los principales tejidos afectados en la fase aguda de la infección por el VMNI son el músculo estriado (músculo esquelético y, con menor frecuencia, el músculo cardíaco), los tejidos conjuntivos, los hemocitos y las células parenquimatosas del túbulo del órgano linfoide. En las infecciones crónicas, el órgano linfoide podría ser el principal tejido afectado.

Pueden tomarse muestras de hemolinfa o pleópodos extirpados y utilizarse cuando sean necesarias pruebas no letales en reproductores de alto valor.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VMNI es un virus sistémico, y no se replica en tejidos entéricos (como el hepatopáncreas, el intestino medio ni sus ciegos). Así, los tejidos entéricos no constituyen muestras adecuadas para la detección de infección por el VMNI.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los signos clínicos solo permiten diagnosticar, de forma provisional, la MNI en fase aguda. En el apartado 4.2 se ofrece una descripción de los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones con MNI en fase aguda.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Solo presentan cambios de comportamiento los camarones con MNI en fase aguda. Lo habitual es que los camarones gravemente afectados presenten letargo durante o poco después de episodios estresantes, como la captura mediante redes, la alimentación, cambios repentinos en la temperatura del agua, reducciones súbitas en la salinidad del agua, etc. Los camarones gravemente afectados pueden haber estado comiendo justo antes del inicio del estrés y a menudo tienen el intestino lleno.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los camarones que se encuentran en la fase aguda de la MNI presentan zonas necróticas blancas, focales a extensas, en músculos estriados (esqueléticos), sobre todo en los segmentos abdominales distales y en el abanico caudal, que pueden necrosarse y enrojecerse en algunos ejemplares. Estos signos pueden aparecer súbitamente tras episodios de estrés (como la captura mediante redes, la alimentación y cambios repentinos en la temperatura o la salinidad). Estos camarones tan gravemente afectados podrían haber estado alimentándose justo antes del inicio del estrés y podrían tener el intestino lleno. Los camarones gravemente afectados devienen moribundos y las mortalidades pueden pasar a ser altas instantáneamente y seguir así durante varios días.

La exposición de los órganos linfoides (OL) pares mediante una simple disección permitirá observar que están hipertrofiados y que llegan a medir 3 a 4 veces su tamaño normal (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Tanto en la fase aguda como en la crónica, se puede establecer un diagnóstico provisional de la MNI utilizando métodos histológicos (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). Sin embargo, las lesiones de los músculos estriados y los OL no son patognomónicas de la MNI. La enfermedad de la cola blanca del camarón peneido, causada por el nodavirus NVPv, imita la MNI (Tang *et al.*, 2007). Por ello, para confirmar un diagnóstico de MNI puede ser necesaria información diagnóstica obtenida de otras fuentes (como los antecedentes, los signos macroscópicos, la morbilidad, la mortalidad o los resultados de la RT-PCR).

Mediante histopatología, utilizando cortes incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina (H/E) de la forma habitual (Bell & Lightner, 1988), se puede observar en cortes tisulares de camarones infectados por MNI en fase aguda una mionecrosis que consiste en una necrosis coagulativa característica en las fibras del músculo estriado (esqueléticas), a menudo con un edema considerable entre las fibras musculares afectadas. Algunos camarones pueden presentar una combinación de lesiones agudas y más antiguas. En estos ejemplares, las fibras musculares afectadas parecen pasar de una necrosis por coagulación a una necrosis por licuefacción, que cursa con un infiltrado moderado y acumulación de hemocitos. En las lesiones más avanzadas, los hemocitos y las fibras musculares inflamadas quedan reemplazados por una matriz laxa de fibrocitos y fibras de tejido conjuntivo que están intercaladas con hemocitos y focos de fibras musculares (presuntamente) en regeneración (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

Una hipertrofia considerable del OL causada por acumulaciones de esferoides en el órgano linfoide (EOL) es una lesión muy frecuente en los camarones con lesiones derivadas de la MNI en fase aguda o crónica. A menudo se observan muchos EOL ectópicos en otros tejidos no cercanos al cuerpo principal del OL. Las localizaciones frecuentes de los EOL ectópicos son el hemocele, las branquias, el corazón, las proximidades de los túbulos de la glándula antenal y el cordón nervioso ventral (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Las muestras de músculo esquelético u OL afectados preparadas mediante el método de aplastamiento, teñidas o no, pueden revelar anomalías. El músculo esquelético preparado mediante aplastamiento y examinado con microscopía óptica de contraste de fases o de campo oscuro puede poner de manifiesto una pérdida de las estriaciones normales. Tal vez también se observe una fragmentación de fibras musculares. Los aplastamientos del OL ponen de manifiesto la presencia de considerables acumulaciones de masas esféricas de células (EOL) entre túbulos normales del OL.

4.2.5. Frotis

No aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.1.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No aplicable a efectos de diagnóstico.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente patógeno

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véanse los apartados 4.2.3 y 4.2.6.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Ninguno conocido hasta ahora.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se han desarrollado anticuerpos monoclonales (MAb) contra la proteína de la cápsida del VMNI (Kunanopparat *et al.*, 2011). Se desarrollaron tres MAb, y cuando se utilizaron combinados, proporcionaron una mejor sensibilidad que ninguno de los tres MAb por separado. Sin embargo, la sensibilidad fue unas 10 veces más baja que la de un ensayo de RT-PCR simple utilizando la misma muestra.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Existen métodos publicados de detección molecular del VMNI mediante hibridación *in-situ* (ISH), RT-PCR anidada y RT-PCR en tiempo real (q) cuantitativa (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005). Asimismo, se dispone de un kit comercial de RT-PCR anidada para la detección del virus. Todas las PCR han demostrado ser específicas del VMNI.

Dado que la sensibilidad de la RT-PCR anidada y en tiempo real es superior a la de otros métodos diagnósticos disponibles actualmente, y se acerca a un límite de detección de 10 copias de genoma vírico, estas pruebas son las de referencia para la detección del VMNI (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006).

Sonda de ADN para la detección del VMNI mediante ISH

Se ha creado una genoteca de ADNc a partir de ARN extraído de VMNI purificado. Se prepara una sonda de ADN para ISH específica del VMNI a partir del clon IMNV-317 mediante PCR marcando con digoxigenina-11-dUTP (DIG). Los cebadores utilizados para la amplificación de la sonda de 993 pb son IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') y IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3') y generan un amplicón de 993 pb. Tras la PCR, la sonda de ADN marcada con DIG de 993 pb se precipita con etanol, se resuspende en agua y se guarda a -20 °C hasta que se utiliza. El procedimiento de la ISH para esta sonda sigue los métodos descritos por Tang *et al.* (2005) para la detección del VMNI.

RT-PCR para la detección del VMNI

Se desarrolló un método de RT-PCR para la detección del VMNI utilizando dos grupos de cebadores que producen un amplicón de un paso de 328 pb y un amplicón de dos pasos de 139 pb. La PCR de un solo paso puede detectar el VMNI cuando la muestra contiene a partir de 100 copias de su genoma, mientras que la PCR de dos pasos puede detectar el VMNI incluso cuando la muestra solo contiene 10 copias de su genoma (Poulos & Lightner, 2006).

Puede aislarse ARN vírico utilizando cualquier kit comercial de aislamiento de ARN. La cantidad de tejido necesaria dependerá del kit escogido (es decir, el kit de extracción de ARN Qiagen y el kit de

purificación de ARN Promega y Roche recomiendan utilizar 25-50 mg de tejido¹). En función del kit utilizado, el volumen de elución varía; así, para los kits de Roche y Qiagen, así como para el kit de extracción de Promega para aislamiento de ARN de bajo volumen de elución, es de 100 µl. En el caso del kit de extracción de Promega para aislamiento de ARN de alto volumen de elución, es de 500 µl. El ARN extraído debe mantenerse a -20°C antes del análisis, pero en el caso de almacenajes a largo plazo el ARN debe almacenarse a -70°C.

A continuación se resume el método a seguir tras la extracción del ARN:

Moldes de ARN:

1. Tejido congelado o fijado en etanol (pleópodos, cefalotórax, músculo)
2. Hemolinfa (menos sensible que cuando se utilizan otros tejidos)

Mezcla de reacción de la RT-PCR (enzima rTth de Applied Biosystems rTth y Tampón EZ 5× #N808-0178):

Reactivo	25 µl de mezcla de reacción	Concentración final
H ₂ O DD	6,5 µl	–
Tampón 5× EZ	5,0 µl	1 ×
Mezcla de dNTP (cada una a una concentración 10 mM)	3,0 µl	300 µmol de cada
Cebador F (100 ng µl ⁻¹)	1,0 µl	0,62 µmol
Cebador R (100 ng µl ⁻¹)	1,0 µl	0,62 µmol
Mn(Oac) ₂ (25 mM)	2,5 µl	2,5 mmol
Enzima rTth (2,5 U µl ⁻¹)	1,0 µl	0,1 U µl ⁻¹
Molde ¹	1–5 µl	1–50 ng de ARN total

¹El molde debe hervirse durante 3 minutos y ponerse sobre hielo justo antes de añadirlo a la mezcla de reacción.

Parámetros de ciclado de la RT-PCR:

Cebadores	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos	Amplicón
4587F/4914R	60, 95	30 minutos, 2 minutos	1	328 pb
	95, 60	45 segundos, 45 segundos	39	
	60	7 minutos	1	

Reacción de la PCR anidada (Perlas Taq listas para usar, de Amersham Biosciences #27-9558-01):

Reactivo	25 µl de mezcla de reacción	Concentración final
H ₂ O DD	22,5 µl	–
Cebador NF (100 ng µl ⁻¹)	1,0 µl	0,465 µmol
Cebador NR (100 ng µl ⁻¹)	1,0 µl	0,465 µmol
Molde ²	0,5 µl	–

²El molde para la reacción anidada es el producto de la reacción del primer paso

Parámetros de ciclado de la PCR anidada:

1 La mención de productos comerciales específicos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

Cebadores	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº ciclos	Amplificación
4725 NF/4863 NR	95	2 minutos	1	139 pb
	95, 65, 72	30 segundos, 30 segundos, 30 segundos	39	
	72	2 minutos	1	

Secuencias de los cebadores:

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del amplicón	Ref.
4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA	328 pb	Poulos & Lightner, 2006
4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT		
4725 NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA	139 pb	
4863 NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G		

RT-PCR cuantitativa (en tiempo real) para la detección del VMNI

Se ha desarrollado un método de qRT-PCR en tiempo real para la detección y la cuantificación del VMNI en tejido de camarón. Este método permite detectar el virus con apenas 10 copias de ARN del VMNI por µl de ARN total (Andrade *et al.*, 2007). A continuación se resume, según está publicado.

Se utiliza el programa Primer Express (Applied Biosystems) para contribuir al diseño de los cebadores para PCR y de una sonda TaqMan a partir de la región del ORF 1 del genoma del VMNI (número de acceso de GenBank AY570982) (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006). Los cebadores IMNV412F (5'-GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-TGC-A-3') y IMNV545R (5'-AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT-3') producen un fragmento de 134 pb. Se sintetiza la sonda TaqMan, MNVp1 (5'-6FAM-CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG-TAMRA-3'), que corresponde a los nucleótidos 467–500, y se marca con los colorantes fluorescentes 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', y con N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA) en el extremo 3'. Se amplifican fragmentos del genoma del VMNI mediante un sistema de detección de secuencia ABI GeneAmp 5700 con mezcla madre para RT-PCR de un solo paso TaqMan (Applied Biosystems). Antes de llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real, el ARN extraído se hierve a 100 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ARN bicatenario y a continuación se sitúa sobre hielo. La mezcla de reacción contiene 1 µl de la muestra de ARN, 12,5 µl de mezcla madre TaqMan (2×), 0,625 µl de mezcla Multiscribe (40×), 300 nmol de cada uno de los dos cebadores, el directo y el inverso y 200 nmol de sonda TaqMan en un volumen final de 25 µl. Los parámetros del ciclo de la RT-PCR son los siguientes: 30 minutos a 48 °C y 10 minutos a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. El número de copias de ARN del VMNI de las muestras se determina utilizando diluciones seriadas de un estándar sintético de ARN (véase abajo) y el programa informático de detección de secuencia Gene Amp 5700.

Para generar un estándar de ARN para el ensayo de RT-PCR en tiempo real, se utilizan los cebadores IMNV218F y IMNV 682R (5'-GCT-GGA-CTG-TAT-TGG-TTG-AG-3' y 5'-AAC-CAA-GTT-CTT-CTT-CTC-CAG-TT-3', respectivamente), con el fin de generar un amplicón de 464 pb a partir del genoma del VMNI. El producto de la RT-PCR se lava utilizando un kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). A continuación, se ligan los fragmentos al pGEM-T Easy Vector y se transforman en células de *Escherichia coli* JM109 (Promega). Se confirma un plásmido recombinante, p IMNV -1, mediante secuenciación. A continuación, p IMNV -1 se linealiza mediante digestión con *Pst*I y se utiliza como molde para una transcripción *in-vitro* con la ARN polimerasa T7. Se utiliza un total de 1 µg de plásmido en una reacción de 50 µl a 37 °C durante 2 horas, seguida de una digestión con ADNasa I a 37 °C durante 30 minutos. La síntesis de estándar de ARN se confirma mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que contenga bromuro de etidio. El estándar de ARN se limpia utilizando un kit de purificación QIAquick PCR, se cuantifica mediante un espectrofotómetro y se guarda a -70 °C.

4.3.1.2.4. Purificación del agente patógeno

Se ha purificado el VMNI de tejido de camarón infectado mediante centrifugación por gradiente de densidad (Poulos *et al.*, 2006). Sin embargo, la purificación del agente del tejido infectado no es un método recomendado a efectos de diagnóstico.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables porque los camarones son organismos invertebrados que no producen anticuerpos específicos que pudieran utilizarse para revelar la infección por el VMNI o la exposición al virus.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de la Mionecrosis infecciosa se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva, ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia específica y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	c	c	c	c
MO directa	d	d	c	c	c	c
Histopatología	d	d	b	b	a	c
ME de transmisión	d	d	d	d	d	d
Ensayos basados en anticuerpos	d	d	d	d	c	d
Sondas de ADN (ISH)	d	d	a	a	a	a
RT-PCR anidada	a	a	a	a	a	a
qRT-PCR	d	c	a	a	a	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de mionecrosis infecciosa

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la RT-PCR anidada (Apartado 4.3.1.2.3) es el método recomendado para la vigilancia específica por motivos de disponibilidad, utilidad y sensibilidad y especificidad diagnósticas.

Al estudiar episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia específica, poner de manifiesto mediante histología lesiones características del músculo estriado inducidas por el VMNI y la extrema hipertrofia del OL causada por la formación de EOL (con o sin confirmación mediante ISH con sondas de ADN específicas del VMNI) constituye un método adecuado (Tabla 5.1). La aparición de una mortalidad considerable permite diferenciar la MNI de la enfermedad de la cola blanca de los peneidos causada por el NVPV, en la que los signos macroscópicos y la histopatología son muy similares a los de la MNI (Tang *et al.*, 2007).

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso es sospechoso cuando cursa con mortalidades altas repentinas, normalmente tras episodios de estrés, como las capturas mediante redes, la alimentación, cambios súbitos en la salinidad o temperatura del agua, etc., en juveniles tempranos, juveniles o adultos de *P. vannamei* en regiones donde el VMNI es enzoótico, o bien donde ha tenido lugar la introducción de *P. vannamei* procedente de regiones o países infectados. Los camarones tan gravemente afectados podrían haber estado ingiriendo alimento justo antes

del inicio del estrés y podrían tener el intestino lleno, y los camarones que se encuentran en la fase aguda de la MNI presentarán zonas necróticas blancas focales o extensas en músculos estriados (esqueléticos), sobre todo en los segmentos abdominales distales y en el abanico caudal, que puede necrosarse y enrojecerse en algunos ejemplares. Los camarones gravemente afectados devendrán moribundos y las mortalidades pueden dispararse instantáneamente y seguir muy altas durante varios días. La exposición del OL par mediante una sencilla disección permitirá observar que está hipertrofiado y que llega a medir 3 a 4 veces su tamaño normal.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtiene un resultado positivo en cualquier combinación de una prueba molecular (PCR o ISH) y una morfológica (histología) utilizando al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Observación histológica de lesiones diagnósticas causadas por el VMNI en fase aguda, de transición o crónica en los músculos estriados y/o en el OL.
- Señal de la ISH positiva (con sonda de ADNc específica del VMNI) para las lesiones propias del VMNI en fibras necróticas de músculo estriado, o bien para EOL en los órganos linfoides de camarones con infecciones por el VMNI en fase de transición o crónica en cortes histológicos.
- Resultado positivo para el VMNI en la RT-PCR simple o anidada, o bien en la RT-PCR en tiempo real.

8. Bibliografía

ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**, 9–15.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (eds) (2005). *Totiviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Elsevier, San Francisco, USA, pp. 571–580.

KUNANOPPARAT A., CHAIVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANY S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL, P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, **171**, 141–148.

LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (eds). (2003). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, **106**, 110–130.

LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.F.J., REDMAN R.M., PASOS DE ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 85.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans. In: *Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.

Moss S.M. & Moss D.R. (2009). Chapter 17. Selective breeding of penaeid shrimp. In: *Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 425–452.

- NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1315–1318.
- NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, **83**, 37–51 (in Portuguese).
- POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 69–72.
- POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **87**, 987–996.
- SAENGOCHAN SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, **266**, 32–38.
- SENAPIN S., PHIWSALYA, K., GANGNONNGIW W. & FLEGEL T.W. (2011). False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. *J. Negat. Results Biomed.*, **10**, 10.
- SUTANTO Y. (2011). IMNV cases in Indonesia. Presented to Shrimp Club Indonesia Workshop, 2 March 2011.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 261–265.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 183–190.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

*

**

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Mionecrosis infecciosa (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

CAPÍTULO 2.2.4.

HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE

1. Ámbito de aplicación

La hepatopancreatitis necrotizante (HPN) está causada por una infección con una alfa-proteobacteria intracelular pleomórfica gramnegativa (Frelie *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1994; Lightner *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). Las principales especies hospedadoras en las que la hepatobacteria necrotizante (BHPN) puede causar brotes importantes de la enfermedad y mortalidades son *Penaeus vannamei* y *P. stylirostris* (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006; Frelie *et al.*, 1993; Ibarra-Gómez *et al.*, 2007; Lightner y Redman, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011a).

La HPN tiene cuatro fases bien diferenciadas: la inicial, la aguda, la de transición y la crónica. En la enfermedad en fase aguda y de transición, es característico observar lesiones patognomónicas en cortes histológicos del hepatopáncreas, mientras que en las fases inicial y crónica de la enfermedad no hay lesiones patognomónicas y para diagnosticarla son necesarios métodos moleculares y basados en anticuerpos, con el fin de detectar la BHPN (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011b; Vincent y Lotz, 2005).

Sinónimos: hepatobacteria necrotizante (HBN) o bacteria de la HPN (BHPN); microorganismo tipo rickettsia (RLO).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. Agente patógeno, cepas del agente

La BHPN es una bacteria intracitoplasmática gramnegativa pleomórfica que pertenece a la α -subclase de las proteobacterias y que todavía no está clasificada (Frelie *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). La forma predominante es un microorganismo tipo rickettsia baciliforme ($0,25 \times 0,9 \mu\text{m}$), mientras que la forma helicoidal ($0,25 \times 2-3,5 \mu\text{m}$) posee ocho flagelos en el vértice basal (Frelie *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). El análisis genético de las BHPN asociadas a brotes de HPN en Norteamérica y Sudamérica sugiere que las cepas aisladas son idénticas o bien se trata de subespecies que están muy estrechamente relacionadas (Loy *et al.*, 1996a; 1996b).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se dispone de datos.

2.1.3. Estabilidad del agente

Los tejidos infectados por BHPN permanecen infecciosos tras repetidos ciclos de congelación-descongelación después de un almacenaje en glicerina al 50%. Se ha observado que la BHPN congelada a -20°C , -70°C y -80°C conserva infectividad en pruebas de transmisión experimental con *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelie *et al.*, 1992).

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

La mayoría de especies de peneidos pueden resultar infectadas con la BHPN, incluidas las principales especies de piscifactoría en Latinoamérica, *P. vannamei* (camarón juvenil) y *P. stylirostris* (camarón azul).

Las infecciones por BHPN son más graves en *P. vannamei*, en cuya especie la bacteria intracelular puede causar epizootias agudas y mortalidad masiva ($>90\%$). En *P. vannamei*, los estadios de vida

juvenil, subadulto y reproductor son los más gravemente afectados (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010).

BHPN causa enfermedad crónica en *P. vannamei*, y los principales efectos son un crecimiento lento, una cutícula blanda y un cuerpo flácido (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b).

Se han notificado brotes de HPN en *P. aztecus* (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). También se ha observado HPN en *P. californiensis* y en *P. setiferus* (Frelie *et al.*, 1995; Lightner, 1996). Por otra parte, se sabe que *Penaeus setiferus* es menos susceptible a la enfermedad que *P. vannamei* (Frelie *et al.*, 1995).

En un estudio sobre la HPN realizado en el Golfo de México, no se observaron indicios histológicos de HPN en *P. setiferus* ni *P. duorarum* de las proximidades de piscifactorías costeras de camarones situadas a lo largo de la costa del Yucatán y Campeche (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La BHPN se ha observado en juveniles, adultos y reproductores de *P. vannamei*.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas

Véanse los apartados 2.2.1 y 2.2.2.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El tejido diana es el hepatopáncreas, y se ha notificado infección por la BHPN en todos los tipos de células de este órgano.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos miembros de poblaciones de *P. vannamei* que sobreviven a infecciones y/o epizootias por la BHPN pueden portar las bacterias intracelulares de por vida y transmitir las a otras poblaciones por transmisión horizontal (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; 2010; Vincent y Lotz, 2005).

La transmisión natural de la BHPN se considera que tiene lugar *per os* por canibalismo (Frelie *et al.*, 1993; 1995; Johnson, 1990; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010), aunque también puede intervenir la coexistencia y la diseminación de la BHPN mediante la columna de agua (Frelie *et al.*, 1993; 1995). También se ha sugerido la posibilidad de transmisión de la BHPN con las heces expulsadas al agua del estanque (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Los brotes de la enfermedad a menudo van precedidos de periodos largos de temperaturas (de unos 30°C) y salinidades (de hasta 40 partes por mil [ppm]) del agua altas (Frelie *et al.*, 1995; Lightner y Redman, 1994; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011a; Vincent y Lotz, 2005).

2.2.6. Vectores

No se conocen vectores en las infecciones naturales.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

La BHPN es frecuente en el camarón peneido salvaje en Perú (*P. vannamei*) y en Laguna Madre de Tamaulipas, México (*P. aztecus*, *P. duorarum* y *P. setiferus*) (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010; Lightner y Redman, 1994).

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de la BHPN puede ser horizontal por canibalismo; también se ha demostrado la transmisión por agua contaminada (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelie *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b; Vincent *et al.*, 2004).

2.3.2. Prevalencia

Algunos de los valores medios de prevalencia de la BHPN observados en poblaciones salvajes se sitúan entre el 5,6 y el 15% en *P. duorarum*, y entre el 5 y el 17% en *P. aztecus* obtenidos de Carrizal y Carbonera, Laguna Madre de Tamaulipas, México (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010); y son del 0,77% en *P. vannamei*, y del 0,43% en *P. stylirostris* obtenidos de la Región de Tumbes, Perú (Lightner y Redman, 1994).

Algunos de los valores medios de prevalencia de la BHPN observados en piscifactorías de camarón se sitúan entre el 0,6% y el 1,3% en *P. vannamei* obtenidos de piscifactorías de camarón de Belice, Brasil, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011a).

2.3.3. Distribución geográfica

La BHPN parece encontrarse en el hemisferio occidental, tanto en el camarón peneido salvaje como en el de piscifactoría (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2010; Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006). En el hemisferio occidental, la BHPN suele hallarse en camarones peneidos de piscifactorías de Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Estados Unidos y Venezuela (Frelie *et al.*, 1992; Ibarra-Gámez *et al.*, 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011a).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En *P. vannamei*, la infección por BHPN da lugar a una enfermedad aguda y normalmente catastrófica, con mortalidades que se acercan al 100%.

2.3.5. Factores ambientales

La tasa de replicación de la BHPN aumenta en casos de periodos muy largos de temperaturas altas (>29°C) y de cambios en la salinidad (20–38‰). En México, la BHPN se ha detectado a prevalencias bajas (<7%) en piscifactorías de camarón en los meses de abril, mayo, julio y agosto. Sin embargo, durante los meses de septiembre y octubre, cuando las temperaturas son altas durante el día y bajas durante la noche, se observan prevalencias y mortalidades (>20%) altas (Morales-Covarrubias, 2010).

2.4. Control y prevención

Control

La utilización de los antibióticos oxitetraciclina y florfenicol 50% en piensos medicados cada 8 horas durante 10 días es probablemente el mejor tratamiento frente a la HPN del que se dispone hoy en día, en concreto si la enfermedad se detecta en la fase inicial (Frelie *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b).

Prevención

- La detección temprana (en la fase inicial) de la HPN clínica es importante para que el tratamiento funcione, debido a la posibilidad de que el canibalismo amplifique y transmita la enfermedad.
- El ayuno de los camarones y el canibalismo en el que se ingieren otros camarones infectados con la BHPN, así como condiciones favorables al cultivo de la BHPN, son factores importantes para la propagación de la BHPN en *P. vannamei*.
- La utilización de cal hidratada (Ca(OH)_2) para tratar los fondos de los estanques durante la preparación de los mismos antes de introducir los animales puede ayudar a reducir la incidencia de la HPN.
- Algunas de las medidas preventivas son el rastrillado, el alicatado y la eliminación de sedimentos del fondo de los estanques, la aplicación de periodos de varias semanas de secado de los estanques y los conductos de distribución de agua al sol, la desinfección de los aparejos de pesca y demás equipo de la piscifactoría mediante hipoclorito de sodio, y el secado y extensa aplicación de cal en los estanques.
- La utilización de reproductoras libres de patógenos específicos (SPF) es una medida de prevención eficaz.

2.4.1. Vacunación

No se dispone de informes confirmados científicamente.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de informes confirmados científicamente.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes confirmados científicamente.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se dispone de informes confirmados científicamente.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se dispone de informes confirmados científicamente.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se dispone de informes confirmados científicamente.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Se ha observado que la BHPN se transmite horizontalmente por canibalismo (Frelie *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Lightner y Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996b; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b; Vincent y Lotz, 2005; 2007). La desinfección de huevos y larvas es, por tanto, una buena práctica de manejo (Lee y O'Bryen, 2003) y se recomienda por su potencial de reducir la contaminación por BHPN en huevos eclosionados y larvas (así como la contaminación por otros agentes patógenos).

2.4.8. Prácticas generales de agricultura

Se han aplicado con éxito algunas prácticas de manejo destinadas a la prevención de las infecciones con la BHPN y la consecuente enfermedad. Entre ellas, la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba de cribado previo de reproductores salvajes o de piscifactoría.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Los ejemplares adecuados para las pruebas de diagnóstico de la infección por BHPN son los estadios de postlarva (PL), juvenil y adulto.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para información sobre la histología o pruebas moleculares sistemáticas, o las recomendaciones sobre la conservación de las muestras destinadas a las pruebas de diagnóstico, consúltase el Capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras tomadas para las pruebas moleculares pueden estar combinadas en forma de muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares por muestra de juveniles, subadultos o adultos. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad de muestra (ácido nucleico extraído) suficiente como para llevar a cabo una prueba diagnóstica puede ser necesario combinar cantidades mayores (como por ejemplo ~150 o más huevos o larvas o 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

La BHPN infecta el tejido entérico. El principal tejido diana de la BHPN es el hepatopáncreas. Pueden obtenerse heces y utilizarse para las pruebas (normalmente la PCR, o la hibridación por transferencia puntual con sondas específicas) cuando sea necesario realizar pruebas no letales de reproductores de alto valor (Bondad-Reantasco *et al.*, 2001; Bradley-Dunlop *et al.*, 2004; Briñez *et al.*, 2003; Frelie *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Las BHPN son bacterias entéricas y no se replican en el intestino medio (tejidos entéricos), los ciegos (tejidos entéricos), las células del tejido conjuntivo, las branquias, los ganglios hematopoyéticos, los hemocitos, el cordón nervioso ventral y sus ganglios correspondientes, las células epiteliales del túbulo de la glándula antenal ni las células parenquimatosas del órgano linfoide.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

La prevalencia y la gravedad de las infecciones por BHPN podría “potenciarse” en una población contenida si tienen lugar condiciones de relativo hacinamiento o estrés en la cría de los camarones. Los factores de “estrés por hacinamiento” pueden consistir en altas densidades de población, ablaciones y poca calidad del agua (es decir, poco oxígeno disuelto, altas temperaturas del agua o altas concentraciones de amoníaco o nitritos) en el agua del depósito. Estas condiciones podrían potenciar la expresión de infecciones por BHPN de bajo grado y la transmisión del agente patógeno de portadores a hospedadores de la población previamente no infectados, lo cual daría lugar a un aumento de la prevalencia y a la gravedad de las infecciones, que pueden detectarse más fácilmente mediante los métodos disponibles de diagnóstico y detección de la BHPN.

4.1.1. Signos clínicos

Existe una gran variedad de signos macroscópicos que indican la posible presencia de la HPN. Estos son: letargo, reducción de la ingesta de alimento, hepatopáncreas atrofiado, anorexia e intestinos vacíos, considerable reducción del crecimiento y malos cocientes de longitud/peso (“colas delgadas”); conchas blandas y cuerpos flácidos; branquias negras u oscurecidas; superficies de olor nauseabundo debido a organismos epicomensales; enfermedades bacterianas en la concha, que incluyen lesiones ulcerosas en la cutícula o erosiones melanizadas en los apéndices; y cromatóforos expandidos que dan lugar a la aparición de bordes oscurecidos en urópodos y pleópodos.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

En la HPN aguda, *P. vannamei* puede presentar cambios de comportamiento (véase el apartado 4.1.1).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La BHPN a menudo causa una enfermedad aguda con mortalidades muy altas en los juveniles de corta edad, los adultos y los reproductores. En los juveniles de corta edad, los adultos y los reproductores infectados horizontalmente, el periodo de incubación y la gravedad de la enfermedad dependen en cierto modo del tamaño y/o la edad. Los adultos infectados casi nunca presentan signos de la enfermedad ni mortalidad (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Bastos Gomes *et al.*, 2010, Brock y Main, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b). Los signos macroscópicos no son específicos de la HPN, pero la HPN aguda cursa con una marcada reducción del consumo de alimento, seguida de cambios de comportamiento y de aspecto (véase el apartado 4.1.1).

4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

En *P. vannamei*, tanto la HPN aguda como la crónica se diagnostican fácilmente mediante métodos histológicos sistemáticos de tinción con hematoxilina y eosina (H/E) (véase el apartado 4.2.6).

4.2.3.1. Fase inicial de la hepatopancreatitis necrotizante

La infección inicial por BHPN es más difícil de diagnosticar mediante métodos histológicos sistemáticos basados en la tinción H/E. Para el diagnóstico de infecciones iniciales, se recomienda utilizar métodos moleculares para detectar la BHPN (por ejemplo, PCR o la aplicación de sondas de ADN específico de BHPN a pruebas de hibridación por transferencia puntual o hibridación *in-situ* (ISH) de cortes histológicos).

4.2.3.2. Fase aguda de la hepatopancreatitis necrotizante

La HPN aguda se caracteriza por una atrofia del hepatopáncreas con atrofia moderada del epitelio del túbulo, presencia de formas bacterianas y hematocitos infiltrados que afectan a uno o más túbulos (encapsulaciones multifocales). Se observan células hipertróficas y epiteliales individuales que parecen estar separadas de las células adyacentes, y sufrir una necrosis y descamación hacia el interior de la luz tubular; el contenido lipídico de las células epiteliales es variable.

4.2.3.3. Fase de transición de la hepatopancreatitis necrotizante

La fase de transición de la HPN se caracteriza por una inflamación hemocítica de los espacios intertubulares como respuesta a la necrosis, la citolisis y el desprendimiento de células epiteliales del túbulo del hepatopáncreas. El epitelio del túbulo del hepatopáncreas está considerablemente atrofiado, lo cual da lugar a la formación de grandes zonas edematosas (llenas de líquido o “acuosas”) en el hepatopáncreas. Las células epiteliales tubulares del interior de la encapsulación multifocal están típicamente atrofiadas y se reducen, de modo que su morfología pasa de ser columnar simple a cuboide. Contienen pocas vacuolas lipídicas almacenadas, o bien ninguna, vacuolas secretoras muy escasas o ninguna, y masas de bacterias. En esta fase se observan nódulos hemocíticos en presencia de masas de bacterias en el centro del nódulo.

4.2.3.4. Fase crónica de la hepatopancreatitis necrotizante

En la fase crónica de la HPN, disminuye la abundancia de las lesiones tubulares, la encapsulación multifocal y las zonas edematosas, y son sustituidas por infiltrado y acumulación de hemocitos en los puntos de necrosis. Hay zonas con fibrosis, túbulos melanizados y necróticos y muy poca presencia de células hipertrofiadas con masas de bacterias en el citoplasma y pocos nódulos hemocíticos.

4.2.4. Preparaciones húmedas

El examen de tejido de hepatopáncreas (HP) mediante aplastamiento en preparación húmeda en general se lleva a cabo para detectar HPN de forma provisional. El hepatopáncreas puede estar atrofiado y tener alguna de las siguientes características: estar blando y acuoso; estar lleno de líquido en el centro; estar pálido con líneas negras (túbulos melanizados); o tener el centro pálido en lugar de la coloración naranja normal. Pueden producirse altas mortalidades, que alcancen más del 90% en 30 días desde el inicio de los signos clínicos si no se ha aplicado tratamiento. Para el análisis de la preparación húmeda, el camarón debe estar en el estadio entre mudas, y no haber sido tratado, puesto que ello podría alterar los túbulos. Esta técnica se basa en la deformación o atrofia tubular principalmente de la zona apical del túbulo.

La HPN tiene cuatro fases:

Fase inicial: poca presencia de deformación tubular (1–5 /campo/organismo) y desprendimiento celular.

Fase aguda: Infiltración de hemocitos, aumento del número de túbulos deformados (6–10/campo/organismo), presencia de encapsulación en distintas zonas de la muestra, que consiste en túbulos atrofiados envueltos de varias capas de hemocitos.

Fase de transición: Infiltración de hemocitos, aumento del número de túbulos deformados (11–15/campo/organismo), túbulos melanizados, túbulos necróticos y un alto nivel de encapsulación en distintas zonas de la muestra. En esta fase se han observado nódulos hemocíticos en presencia de masas de bacterias en el centro del nódulo.

Fase crónica: Zonas con fibrosis, pocos túbulos melanizados y necróticos y muy poca presencia de células hipertrofiadas con masas de bacterias en el citoplasma.

4.2.5. Frotis

No aplicable.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Actualmente no es aplicable a efectos de diagnóstico.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos de microscopía

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4

4.3.1.1.2. Frotis

No aplicable

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.1.4. Método del bioanálisis

La confirmación de la infección con la BHPN puede llevarse a cabo mediante bioanálisis de animales sospechosos de BHPN con juveniles SPF de *P. vannamei* que sirvan de indicadores de las bacterias intracelulares (Cock *et al.*, 2009; Johnson, 1990; Lee y O'Bryen, 2003; Lightner, 2005). Pueden utilizarse protocolos orales. El método oral es relativamente sencillo de realizar y se lleva a cabo alimentando a juveniles SPF de *P. vannamei* con hepatopáncreas troceado de camarones sospechosos de presentar la enfermedad, en pequeños depósitos. Es necesario utilizar un depósito control negativo de camarones indicadores, que reciban solo alimento normal. Cuando se aplique el protocolo de alimentación con hepatopáncreas (*per os*) para el bioanálisis de diagnóstico de la BHPN, los camarones indicadores positivos a HPN (detectables por signos macroscópicos y por histopatología) suelen detectarse en cuestión de 3 a 4 días tras la exposición inicial, y aparecen mortalidades considerables unos 3 a 8 días después de dicha exposición inicial. Los camarones control negativos deben permanecer sin signos macroscópicos ni histológicos de HPN ni mortalidades inusuales (durante al menos 10 a 15 días).

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

La BHPN no se ha cultivado nunca *in vitro*. No existen líneas celulares de crustáceos (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; Vincent y Lotz, 2007).

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Pruebas de inmunohistoquímica (IHC) basadas en sondas de ADNc específicas de la HPN según los métodos descritos por Bradley-Dunlop *et al.* (2001) y Loy y Freliey (1996).

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Se han desarrollado ISH y (RT)-PCR con transcripción inversa para la BHPN, y se dispone de kits comerciales de RT-PCR para la BHPN. Se han desarrollado pruebas de PCR para la HPN, y se dispone de varios métodos y productos comerciales basados en estos métodos (Loy y Freliey, 1996; Loy *et al.*, 1996b). Para el diagnóstico de la HPN, las sondas génicas y la PCR aportan mayor sensibilidad diagnóstica que las técnicas histológicas clásicas de diagnóstico de la HPN. Además, estos métodos tienen la ventaja de ser aplicables en caso de que tengan que analizarse camarones reproductores de alto valor mediante pruebas no letales.

4.3.1.2.3.1. Sondas de ADN para aplicaciones en ISH con sondas de ADNc no radiactivas

En el laboratorio pueden producirse sondas de ADNc no radiactivas marcadas con DIG para la detección de BHPN. El método de la ISH de Loy y Freliey (1996) y Lightner (1996) proporciona una mayor sensibilidad diagnóstica que los métodos más tradicionales de detección y diagnóstico de la BHPN, basados en métodos histológicos clásicos (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b). En la ISH de cortes histológicos sistemáticos de lesiones del hepatopáncreas en fase aguda, de transición y crónica con sonda de ADNc marcado con DIG específica de la BHPN, proporciona un diagnóstico definitivo de infección con la BHPN (Lightner, 1996; Loy y Freliey, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Las lesiones positivas a BHPN patognomónicas presentan zonas de un color azul intenso o negro azulado en el citoplasma de las células afectadas cuando reaccionan con las sondas de ADNc. (Para conocer los detalles sobre el

método de la ISH, véase el Capítulo 2.2.2 NHHI, y para información detallada sobre la utilización del fijador AFA de Davidson, véase el Capítulo 2.2.0, apartado B.5.3.ii).

4.3.1.2.3.2. Método de la PCR con transcripción inversa (RT-PCR)

Para llevar a cabo la RT-PCR para el diagnóstico de la BHPN puede utilizarse hepatopáncreas o heces. Los cebadores designados como NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' y NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', amplifican una secuencia de 379 pares de bases (pb) en función del número de acceso de GenBank correspondiente al ARNr ribosómico 16S de la BHPN, que amplifica un fragmento de 379 pb (Nunan *et al.*, 2008). La concentración de cebador (F2/R2) utilizada para cada caso es de 0,31 μ M. Los parámetros de ciclado son: Paso 1: 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos; Paso 2: 25 ciclos de 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos; Paso 3: 1 ciclo de 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos; después se mantiene a 4°C indefinidamente.

La RT-PCR descrita a continuación para la detección de BHPN sigue el método utilizado por Nunan *et al.* (2008).

- i) *Preparación del ARN molde*: puede extraerse ARN de hepatopáncreas fresco, congelado o conservado en etanol. La extracción de ARN debe llevarse a cabo utilizando alguno de los kits comerciales de procesamiento de tejidos para la extracción de ARN, como el High Pure RNA Tissue Kit¹ (Roche, Alemania) y siguiendo los procedimientos que indique la casa comercial para producir ARN moldes de calidad.
 - ii) La RT-PCR se lleva a cabo en solución, utilizando de ARN final (la concentración tiene que ser de 1–1000 ng ml⁻¹).
 - iii) En toda RT-PCR de detección de la BHPN deben incluirse los siguientes controles: a) una muestra de tejido que se sepa que es negativa para la BHPN; b) una muestra (de hepatopáncreas) que se sepa que es positiva para la BHPN; y c) un control “sin molde”.
 - iv) El kit de PCR GeneAmp® EZ rTth RNA PCR (Applied Bioscience, EE.UU.) se utiliza para todas las reacciones de amplificación aquí descritas.
 - v) Las condiciones óptimas de realización de la RT-PCR (concentraciones finales en un volumen total de 50 μ l) para la detección de la BHPN en muestras de hepatopáncreas de camarón son las siguientes: cebadores (cada uno a una concentración 0,46 μ M), dNTPs (cada uno a una concentración 300 μ M), rTth-ADN polimerasa (2,5 U/ 50 μ l), acetato de manganeso (2,5 mM), en tampón EZ 5 $\times$ (Vicién 25 mmol, acetato de potasio 57,5 mM, glicerol al 40% [p/v], a pH 8,2).
 - vi) Si el termociclador no dispone de tapa calentada, se deposita aceite mineral (50 μ l) sobre los 50 μ l de mezcla de reacción para evitar la condensación o evaporación durante el termociclado.
 - vii) Se combinan el ARN molde y todos los reactivos y se permite que tenga lugar la transcripción inversa a 60°C durante 30 minutos, seguida de 2 minutos.
 - viii) Los parámetros del ciclado son: Paso 1: 1 ciclo de 95°C durante 2 minutos; Paso 2: 25 ciclos de 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos; Paso 3: 1 ciclo de 60°C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos; después se mantiene indefinidamente a 4°C.
- Nota: Para cada termociclador deben optimizarse las condiciones utilizando controles positivos.
- ix) Los detalles de la composición de los reactivos y los tampones aquí utilizados pueden consultarse en el Capítulo 2.2.2 NHHI.

4.3.1.2.3.3. Método de la PCR en tiempo real

Se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real para la detección de la BHPN. Estos métodos aportan las ventajas de ser rápidos, específicos y sensibles. La sensibilidad de la PCR en tiempo real es de unas 100 copias de la secuencia de acceso del genoma de la BHPN (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent y Lotz, 2005).

El método de la PCR en tiempo real basado en química TaqMan, descrito abajo, para la detección de la BHPN en general sigue el método utilizado por Aranguren *et al.* (2010).

1 Las referencias a productos comerciales concretos como ejemplos no implica su aprobación por parte de la OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales mencionados en este *Manual Acuático*.

- i) Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan se escogieron del gen del ARNr 16S de la BHPN (GenBank U65509) (Loy *et al.*, 1996). Los cebadores y la sonda TaqMan fueron diseñados por el programa Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems). Las secuencias de cebador en dirección 5' (NHP1300F) y en dirección 3' (NHP1366R) son: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' y 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectivamente. La sonda TaqMan HPN: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', que corresponde a la región de los nucleótidos 1321–1340, se sintetiza y marca con los colorantes fluorescentes 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y N,N,N,N-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA) en el extremo 3'.
- ii) *Preparación del ARN molde*: la extracción y purificación del ARN molde del hepatopáncreas se lleva cabo igual que se ha descrito en el apartado sobre la PCR en tiempo real tradicional.
- iii) *La mezcla para reacción de la PCR en tiempo real contiene*: SuperMix de PCR simple en tiempo real TaqMan (Quanta, Biosciences), cada cebador a una concentración 0,3 µM, sonda TaqMan 0,1 µM, 5-50 ng de ARN y agua en un volumen de reacción de 25 µl. Para optimizar los resultados, la mezcla de reacción debe pasarse por el vórtex y mezclarse bien.
- iv). La amplificación se lleva a cabo con el ciclador master Realplex 2.0 (Eppendorf). El ciclado consiste en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.
- v) Al final de la reacción, se mide la fluorescencia en tiempo real con una cámara que lleve integrado un dispositivo de carga acoplado. Se fija un umbral por encima del valor basal a partir del cual se empieza a detectar un aumento en la señal asociada a un aumento exponencial del producto de la PCR. Las muestras se considerarán negativas si el valor del Ct (ciclo umbral) es de 40 ciclos.
- vi) Es necesario incluir un “control sin molde” cada vez que se ejecute la reacción, con el fin de descartar la presencia de contaminantes de la fluorescencia en la mezcla de reacción en el bloque de calor del termociclador. También debe incluirse un control positivo, que puede consistir en ARN transcrito *in-vitro* que contenga la secuencia de acceso, bacterias purificadas o ARN extraído de hepatopáncreas infectados por la BHPN.

4.3.1.2.3.4. Secuenciación

Los productos de la RT-PCR pueden clonarse y secuenciarse cuando sea necesario para confirmar la infección por la BHPN, o bien para identificar falsos positivos o una amplificación inespecífica (Aranguren *et al.*, 2010; Bustin *et al.*, 2009; Vincent y Lotz, 2005).

4.3.1.2.4. Purificación del agente patógeno

Existen métodos de aislamiento y purificación de la BHPN (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent y Lotz, 2005), pero no se recomiendan para el diagnóstico sistemático de la HPN.

4.3.2 Métodos serológicos

No son aplicables porque los camarones son organismos invertebrados que no producen anticuerpos específicos que pudieran utilizarse para poner de manifiesto una infección por BHPN o una exposición previa a esta bacteria.

5. Idoneidad de las pruebas par cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia específica y el diagnóstico de la BHPN se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con una buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva, ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	b	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	d
MO directa	d	d	c	d	c	d
Histopatología	d	b	b	c	a	a b
Sondas de ADN <i>in situ</i>	a	a	a	a	a	a
ME de transmisión	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	c	c	b	b
PCR en tiempo real	a	a	a	a	a	a
qPCR	a	a	a	a	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

6. Prueba/s recomendada/s para la vigilancia específica destinada a declarar la ausencia de hepatopancreatitis necrotizante

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la PCR en tiempo real (Apartado 4.3.1.2.3.2) es el método recomendado para la vigilancia dirigida por motivos de disponibilidad, utilidad y sensibilidad y especificidad diagnósticas. Al estudiar episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia específica, poner de manifiesto mediante histología lesiones patognomónicas en el hepatopáncreas inducidas por BHPN (con o sin confirmación por ISH con sondas de ADN específicas de BHPN) es un método adecuado (Tabla 5.1).

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso es aquel en el que se observa:

- Mortalidades altas repentinas en PL tardías, juveniles o subadultos de *P. vannamei* o *P. stylirostris* en zonas donde la BHPN es enzoótica;
- la presencia súbita de muchas aves marinas (gaviotas, cormoranes, garzas, golondrinas de mar, etc.) “pescando” en uno o más estanques de piscifactoría de camarones;
- muestras de *P. vannamei* o *P. stylirostris* de piscifactoría, tomadas de estanques en los que se hayan observado aves marinas alimentándose, que presenten signos macroscópicos indicativos de HPN en fase aguda o de transición, como un hepatopáncreas con atrofia general, color rojizo, letargo, conchas blandas, intestinos vacíos y la presencia de muchos puntos negros irregulares en la cutícula;

o bien

- una baja tasa de eclosión de los huevos, y una mala supervivencia y rendimiento en los estadios larvales y PL cuando se utilizan reproductores de poblaciones salvajes o de piscifactoría en las que la BHPN es enzoótica.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtienen resultados positivos en cualquier combinación de una prueba molecular (PCR o ISH) y una prueba morfológica (histología) utilizando al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Demostración histológica de lesiones diagnósticas de BHPN en fase aguda en (especialmente) el hepatopáncreas atrofiado, con atrofia moderada de la mucosa tubular, presencia de formas bacterianas e infiltrado de hemocitos que afecte a uno o más túbulos (encapsulaciones multifocales).
- Señal histológica positiva en la ISH para lesiones propias de la BHPN.
- Resultados positivos en la PCR para la BHPN.

8. Bibliografía

AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (nhp) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.

ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.

ARANGUREN L.F., TANG K.F. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.

BASTOS GOMES G., SANTOS DOMINGOS J.A., CAVALCANTI OLIVEIRA K.K., DE PAULA MENDES P., ARNS DA SILVA V. & SHINOZAKI MENDES E. (2010). Diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, through wet mount, histopathology and PCR techniques. *J. World Aquaculture Soc.*, **41**, 816–822.

BONDAD-REANTASCO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (eds). (2001). Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. In: *Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 p.

BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & D.V. LIGHTNER. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.

BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 55–72.

BROCK J.A. & MAIN F. (1994). A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 241 p.

BUSTIN S., GARSON J., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M., SHIPLEY G., VANDESOMPELE J. & WITTEWIT C. (2009). The MIQE guidelines: minimal information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55** (4), 611–622.

COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.

CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.

DEL RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–209.

FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.

FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A. LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. (1995). Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. *In: Swimming Through Troubled Waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95. San Diego, CA, USA, 240 p.

FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.

GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPIZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.

IBARRA-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, **33**, 1–9.

JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA.

JORY D.E. (1997). Necrotizing hepatopancreatitis and its management in shrimp ponds. *Aquaculture Magazine*, **23**, 98–101.

LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (eds). (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

LIGHTNER D.V. (ed.) (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BONAMI J.R. (1992). Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 235–239.

LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., SERBAN I.T. & TEMPLETON J.W. (1996a). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.

LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996b). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones*, Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., MOURA LEMUS-PEREIRA A., SOLÍS MONTIEL V.T., RUÍZ-LUNA A. & CONROY G. (2011a). Prevalence of diseases in cultured white shrimp (*penaeus vannamei*) in eight regions of Latin America. *Rev. Científica FCV-LUZ*, (In press).

MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M. (2011b). NHP infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Científica*, FCV-LUZ, (In press).

NUNAN M.L., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 69–73.

VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to KONA stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*
* *

NB: En el momento de esta publicación (2012) todavía no había ningún Laboratorio de Referencia de la OIE para la Hepatopancreatitis necrotizante

SÍNDROME DE TAURA

1. Ámbito de aplicación

El síndrome de Taura (ST) es una enfermedad vírica de los camarones peneidos causada por la infección con el virus del síndrome de Taura (VST) (Bonami *et al.*, 1997; Fauquet *et al.*, 2005; Lightner 1996a; Mari *et al.*, 1998).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El agente etiológico es el VST, como describen Bonami *et al.* (1997) y Mari *et al.* (1998; 2002). Se han documentado al menos cuatro genotipos (cepas) en base a la secuencia génica que codifica la VP1 (= CP2), la proteína estructural más grande y presuntamente dominante de entre las tres principales proteínas del virus. Según las variaciones en la secuencia de la VP1 (=CP2), estos grupos genotípicos son los siguientes: 1) el grupo de las Américas; 2) el grupo del sureste asiático; 3) el grupo de Belice; y 4) el grupo de Venezuela (Chang *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang y Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

Se han identificado al menos dos variantes bien diferenciadas del VST por su diferente reactividad frente al anticuerpo monoclonal MAb 1A1, producido contra una cepa de referencia del grupo de las Américas (VST USA-HI94 – GenBank AF277675) (Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999); el Tipo A representa las que reaccionan frente al MAb 1A1 (en el ensayo inmunoquímico [ELISA]), la inmunoelectrotransferencia y la hibridación *in-situ* [ISH] con tejidos infectados) y las que no lo hacen. Las que no reaccionan frente al MAb 1A1 se subdividen en los tipos B (VST 98 Sinaloa, México) y C (VST 02 Belice), en función de la especie hospedadora y la patogenicidad. Todas las cepas del VST del grupo de las Américas y la mayoría, si no todos, los genotipos del grupo del sureste asiático reaccionan frente al MAb 1A1. Muy al contrario, ninguna de las cepas de los genotipos del grupo de Belice reaccionan frente al MAb 1A1 (Erickson *et al.*, 2002; 2005), como tampoco lo hace ninguna de las cepas del VST de la epizootia que tuvo lugar en piscifactorías de camarones de Venezuela en el año 2005.

Las partículas del VST son icosaedros de 32 nm de diámetro y sin envoltura, con una densidad de flotación de 1.338 g ml⁻¹. El genoma del VST consiste en un ARN lineal monocatenario de sentido positivo de 10.205 nucleótidos, excluyendo la cola poli-A del extremo 3', y contiene dos grandes marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF 1 contiene las secuencias motivos de proteínas no estructurales, como la helicasa, la proteasa y la ARN polimerasa dirigida por ARN. El ORF 2 contiene las secuencias de proteínas estructurales del VST, incluidas las tres principales proteínas de la cápsida, la VP1, la VP2 y la VP3 (de 55, 40 y 24 kDa, respectivamente). El virus se replica en el citoplasma de las células hospedadoras (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

En el 9º informe del comité Internacional de Taxonomía de Virus, el VST se ha asignado al género Aparavirus, perteneciente a la Familia Dicistroviridae (ICTV; King *et al.*, en imprenta).

Otras causas descritas de ST: En Ecuador, el síndrome de Taura se vinculó inicialmente a la contaminación por fungicidas en piscifactorías de camarones, una controversia que fue acompañada de un litigio que duró unos 16 años después de que se demostrara científicamente que la enfermedad era de origen vírico (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 2005). Así, en varios artículos de la bibliografía se propone que el ST es de etiología tóxica (Intriago *et al.*, 1997; Jiménez, 1992; Jiménez *et al.*, 2000).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se dispone de información.

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

No se dispone de información.

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las principales especies hospedadoras del VST son el camarón juvenil, *Penaeus vannamei*, y el camarón azul, *P. stylirostris*. Aunque todas las principales especies hospedadoras del VST pertenecen al subgénero de peneidos *Litopenaeus*, existen otras especies de peneidos que pueden resultar infectadas por el VST mediante exposición directa, pese a que no desarrollan síntomas. Los hospedadores naturales y experimentales que han sido documentados para el VST son: *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. indicus* y *Metapenaeus ensis* (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004; Lightner, 1996a, 1996b; Overstreet *et al.*, 1997; Srisuvan *et al.*, 2006; Stentiford *et al.*, 2009; Wertheim *et al.*, 2009).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Se han documentado casos de infección por el VST en todos los estadios de vida (juveniles y adultos) de *P. vannamei* (la especie hospedadora económicamente más importante de las dos) excepto en huevos, cigotos y larvas (Lightner, 1996a).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El VST infecta y se ha observado que se replica (mediante ISH con sondas de ADN específicas) principalmente en el epitelio de la cutícula (o hipodermis) del exoesqueleto general, el intestino anterior, el intestino posterior, las branquias y los apéndices, y a menudo en los tejidos conjuntivos, los hematopoyéticos, el órgano linfático (OL) y la glándula antenal. Los órganos entéricos (el hepatopáncreas derivado del endodermo, el epitelio de la mucosa del intestino medio y de la de sus ciegos) y los músculos liso, cardíaco y estriado, y el cordón nervioso ventral, sus ramas y sus ganglios no suelen presentar signos histológicos de la infección por el VST y normalmente, según la ISH, son negativos para el VST (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Hasson *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; Jimenez *et al.*, 2000; Lightner, 1996a; Lightner y Redman 1998a; 1998b; Lightner *et al.*, 1995; Srisuvan *et al.*, 2006).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos miembros de las poblaciones de *P. vannamei* o *P. stylirostris* que sobreviven a infecciones y/o epizootias por el VST pueden ser portadores del virus de por vida (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b) y, aunque no está documentado, transmitir el virus a su descendencia por transmisión vertical.

2.2.6. Vectores

Aves acuáticas: se ha observado que el VST sigue siendo infeccioso durante 48 horas (tras la ingesta de camarones muertos infectados por el VST) en las heces expulsadas por gaviotas marinas (*Larus atricilla*) salvajes o criadas en cautividad y pollos (*Gallus domesticus*, que se utilizan como sustitutos de laboratorio de todas las aves que comen camarones), lo cual sugiere que el virus puede retener infectividad cuando pasa por el sistema gastrointestinal de cualquier especie aviar. Estos hallazgos implican que las aves constituyen un importante vector mecánico para la transmisión del virus dentro de piscifactorías o regiones afectadas (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Insectos acuáticos: se ha observado que el llamado barquero de agua (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], un insecto acuático que se alimenta en camarones muertos en los estanques de las piscifactorías) también sirve de vector mecánico del VST (Brock 1997; Lightner, 1995, 1996a, 1996b).

Productos comerciales congelados infectados por VST: en muestras de mercados de EE.UU., procedentes de Latinoamérica y del sudeste asiático, se ha encontrado el VST en productos congelados de camarón juvenil (*L. vannamei*). Una eliminación inadecuada de los desechos (líquidos y sólidos, es decir, caparazones pelados, cabezas, tractos intestinales, etc.) que se originan durante el reprocesado destinado a obtener productos con valor añadido y que proceden de langostinos infectados con el VST en localidades costeras, puede suponer una fuente de VST que podría contaminar poblaciones de camarones salvajes o de piscifactoría cercanas a las aguas a las que se vierten los desechos (Lightner, 1996b; Nunan *et al.*, 2004).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone datos

2.3. Patrón de la enfermedad

El ST se conoce como una enfermedad de *P. vannamei* en fase de cría o de engorde que tiene lugar en un plazo de unos 14 a 40 días tras la repoblación de estanques o tanques de engorde con PL, de modo que los camarones con ST suelen ser juveniles de corta edad que pesan entre 0,05 y <5 g. También pueden resultar afectados camarones más grandes, sobre todo si no están expuestos al virus hasta que son juveniles más grandes o adultos (Brock 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz 1997b).

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del VST puede tener lugar por vía horizontal o por vía vertical. Se ha observado la transmisión horizontal por canibalismo o agua contaminada (Brock 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; White *et al.*, 2002). Por otra parte, se sospecha claramente de la transmisión vertical por parte de reproductores adultos infectados a su descendencia, pero no se ha confirmado experimentalmente.

2.3.2. Prevalencia

En las zonas en las que el virus es enzoótico en poblaciones de piscifactorías, según varios estudios la prevalencia del VST puede ir del 0% al 100% (Brock 1997; Jiménez *et al.*, 2000; Laramore 1997).

2.3.3. Distribución geográfica

Actualmente, el ST tiene amplia distribución geográfica en las zonas de cultivo del camarón de las América, el sureste asiático y Oriente Medio (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang y Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Yu y Song 2000; Wertheim *et al.*, 2009).

América: después de su reconocimiento en 1992 como una enfermedad bien diferenciada de *P. vannamei* de piscifactoría en Ecuador (Brock *et al.*, 1995; Jiménez 1992; Lightner *et al.*, 1994), el ST se extendió rápidamente por muchas de las regiones de cultivo de langostinos de América mediante el envío de PL y reproductores infectados (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b). En América, se han notificado el ST y/o el VST en casi todos los países de América donde se cultivan langostinos, y en casi todas las regiones de Hawai (Aguirre Guzmán y Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001). El VST es enzoótico en las poblaciones de camarón peneido de piscifactoría de la costa americana del Pacífico, de Perú a México, y se ha encontrado ocasionalmente en algunas poblaciones salvajes de *P. vannamei* de la misma región (Lightner y Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1995). El VST también se ha descrito en poblaciones de peneidos de las costas americanas atlántica, del Caribe y del Golfo de México, pero en estas regiones no se ha descrito en ejemplares salvajes (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 2005; 2011).

Asia y Oriente Medio: el VST se introdujo en Taipei, China, en 1999 con la importación de camarón juvenil (*P. vannamei*) infectado procedente de Centroamérica y Sudamérica (Tu *et al.*, 1999; Yu y Song, 2000). Desde la introducción inicial, el virus se ha propagado mediante los desplazamientos de reproductores y de PL a China (República Popular de), Tailandia, Malasia e Indonesia, donde ha sido la causa de grandes epizootias con altas mortalidades en poblaciones introducidas no seleccionadas de *P. vannamei* (Chang *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Tang y Lightner, 2005; Lightner 2011). Recientemente se ha observado que el VST se asocia a importantes mortalidades en poblaciones de *Penaeus indicus* de piscifactoría de Arabia Saudita (Wertheim *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En epizootias de ST de piscifactoría en las que resultan afectadas poblaciones no seleccionadas (es decir, no seleccionadas para ser resistentes al VST) de *P. vannamei*, que son las principales especies hospedadoras del VST, las mortalidades acumuladas suelen oscilar entre el 40 y más del 90% en poblaciones cultivadas de PL, juveniles y subadultos. Existen líneas de *P. vannamei* resistentes al VST que muestran tasas de supervivencia de hasta un 100% ante la exposición a los cuatro genotipos del VST en condiciones de laboratorio (Lightner *et al.*, 2009; Moss *et al.*, 2001).

2.3.5. Factores ambientales

Los brotes del ST son más frecuentes cuando las salinidades se sitúan por debajo de las 30 ppmil (Jiménez *et al.*, 2000).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se dispone de vacunas eficaces contra el VST.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No existen informes de tratamientos con sustancias químicas eficaces confirmados científicamente.

2.4.3. Inmunoestimulación

No existen informes de tratamientos inmunoestimulantes eficaces confirmados científicamente.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Después de que aparecieran brotes del ST en Ecuador en 1992-1994, se observó que *Penaeus stylirostris* es resistente al VST (genotipo 1, MAb 1A1 tipo A). Debido a esta característica, hacia 1995, después que el VST alcanzara México en 1994 y causara grandes pérdidas productivas en piscifactorías de *P. vannamei*, las especies predominantemente cultivadas en la zona occidental del país fueron líneas seleccionadas de *P. stylirostris*. Sin embargo, en 1998-1999 apareció una nueva “cepa” del VST (Tipo B; Erickson *et al.*, 2002; Fegan y Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarin-Herzberg y Ascencio, 2001) que causó epizootias masivas en *P. stylirostris*. Poco después de la aparición de esta nueva “cepa” del VST, a finales de 1999, se introdujo el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB) en piscifactorías de camarones de México occidental, al cual *P. stylirostris* no era resistente, lo cual terminó definitivamente con todo posible interés en el cultivo de *P. stylirostris* en dicho país.

Se han desarrollado poblaciones domésticas de *P. vannamei* y de *P. stylirostris* resistentes al VST. Algunas líneas domésticas de *P. vannamei* resistentes al VST (que también están libres del VST) se utilizan mucho en la industria de la cría del camarón en América y el sudeste asiático (Clifford, 1998; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002). Tras la aparición del ST en Centroamérica, se observó una mejora de la resistencia al ST en PL salvajes de *P. vannamei* capturadas y utilizadas para repoblar piscifactorías de camarón de la región (Laramore, 1997).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Se han desarrollado líneas seleccionadas de *P. vannamei* resistentes al ST, que pueden adquirirse comercialmente (Clifford, 1998; Laramore, 1997; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002).

2.4.6. Agentes bloqueantes

Se observó que la resistencia de los cigotos de *P. vannamei* a la infección por el VST tenía lugar gracias a la expresión del ARN antisentido que codifica la proteína de la cápsida del VST. Juveniles transgénicos criados a partir de cigotos protegidos de este modo mostraron una mejora de la resistencia al VST ante la exposición mediante inyección *per os* o por vía intramuscular (IM) (Lu y Sun, 2005). Se han obtenido resultados similares mediante inyección de secuencias cortas bicatenarias aleatorias de ARNi en juveniles de *P. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Aunque se considera que el VST se transmite verticalmente (transmisión transovárica), no se dispone de informes publicados que documenten esta vía de transmisión. La desinfección de huevos y larvas (Chen *et al.*, 1992) es una buena práctica de manejo y se recomienda porque puede reducir la contaminación por VST de huevos eclosionados y de las larvas que crecen a partir de estos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se han aplicado con éxito ciertas prácticas de manejo para la reducir el riesgo de infecciones por el VST y de que aparezca la enfermedad en estanques de crecimiento. Estas consisten en la aplicación de un pre-cribado de los reproductores salvajes o de piscifactoría y/o de sus huevos/larvas nauplias eclosionados, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de desechar los ejemplares que den resultados positivos para el virus (Fegan y Clifford, 2001), así como el descanso y repoblación de regiones enteras de cultivo con poblaciones libres del VST (Dixon y Dorado, 1997), y el desarrollo de poblaciones de camarones *P. vannamei* y *P. stylirostris* libres de patógenos específicos (SPF) (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Moss *et al.*, 2001; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992; Wyban *et al.*, 2004). Se ha observado que la aplicación de la tecnología más reciente (poblaciones SPF) se encuentra entre las prácticas de manejo de mayor éxito para la prevención y el control del ST. Desafortunadamente, en la industria existe una idea equivocada de que SPF es un rasgo genético y no

un estado de salud. El desarrollo de *P. vannamei* SPF que no solo estén libres del VST, sino también de todos los principales agentes patógenos conocidos del camarón peneido, ha dado lugar a la introducción de la especie en Asia, y a que en el año 2005 superara a *P. monodon* como especie de camarón más cultivada en Asia, así como en América, donde se crearon las reservas SPF (FAO, 2006; Lightner, 2005; Rosenberry, 2004).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Los ejemplares adecuados para las pruebas de diagnóstico de la infección por el VST son las PL, los juveniles y los adultos. Aunque el VST puede infectar a cualquier estadio de vida, la gravedad de la infección, y por tanto la carga vírica, pueden quedar por debajo de los límites de detección en los huevos eclosionados y en las fases larvarias, de modo que estos estadios de vida no constituyen muestras adecuadas para la detección del VST ni para la certificación de la ausencia de ST.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

En el Capítulo 2.2.0 se proporciona información relativa a la histología y las pruebas moleculares sistemáticas, y orientación sobre cómo conservar las muestras destinadas a cada tipo de prueba.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras tomadas para las pruebas moleculares pueden combinarse en forma de muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares por muestra de juveniles, subadultos o adultos. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad suficiente de material de muestra (ácido nucleico extraído) para llevar a cabo una prueba diagnóstica puede ser necesario combinar cantidades mayores (como por ejemplo ~150 o más huevos o larvas o 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El VST infecta tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. El principal tejido afectado en la fase aguda del ST es el epitelio de la cutícula. En las infecciones crónicas, el principal tejido afectado es el OL.

Pueden tomarse muestras de hemolinfa o pleópodos extirpados y utilizarse cuando sea necesario llevar a cabo pruebas no letales en reproductores de alto valor.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VST es un virus sistémico, y no se replica en tejidos entéricos (como el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos). Así, los tejidos entéricos no constituyen muestras adecuadas para la detección de la infección por el VST.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Solo la fase aguda del ST puede diagnosticarse, aunque solo provisionalmente, a partir de los signos clínicos. En el apartado 4.2 se proporciona una descripción de los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones con ST en fase aguda.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Solo se observan cambios de comportamiento en los camarones con ST en fase aguda. Lo habitual es que los camarones gravemente afectados empiecen a presentar hipoxia y se desplacen hacia los márgenes o la superficie del estanque, donde la concentración de oxígeno disuelto es mayor. Este tipo de camarones pueden atraer aves marinas en grandes cantidades. En muchos brotes del ST, son las grandes cantidades de aves marinas, atraídas por los camarones moribundos, las que constituyen el primer indicio observable de la presencia de un brote importante de la enfermedad (que, en caso de presencia de aves marinas, a menudo es ST o EMB –enfermedad de las manchas blancas-) en la piscifactoría.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

El ST tiene tres fases bien diferenciadas, la aguda, la de transición y la crónica, que pueden diferenciarse a simple vista (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Los signos macroscópicos que presentan los juveniles, los subadultos y los adultos de los camarones que se hallan en la fase de transición del ST son característicos y proporcionan un diagnóstico provisional de la enfermedad.

Fase aguda: los signos macroscópicos que presentan los camarones *P. vannamei* moribundos que se hallan en la fase aguda del ST son la expansión de cromatóforos rojos, que confieren al camarón afectado un tono rojizo pálido general y que hacen que el abanico de la cola y los pleópodos sean claramente rojos; por este motivo, cuando la enfermedad apareció por primera vez en Ecuador, en las piscifactorías se le puso el nombre, entre otros, de enfermedad de la “cola roja” (Lightner *et al.*, 1995). En estos camarones, al examinar detenidamente el epitelio de la cutícula de apéndices finos (como por ejemplo, el de los bordes de los urópodos o los pleópodos) con una lupa de 10 aumentos, se observan signos de necrosis epitelial focal. Los camarones que presentan estos signos macroscópicos de ST en fase aguda suelen tener los caparazones blandos, el intestino vacío y a menudo se encuentran al final del estadio D del ciclo de muda. Los camarones gravemente afectados suelen morir durante la ecdisis. Si son mayores de ~1 g, los camarones moribundos pueden resultar visibles para las aves marinas en los márgenes y la superficie de los estanques. Así, durante el pico de las epizootias intensas, es posible observar cientos de aves marinas (gaviotas, golondrinas de mar, garzas, cormoranes, etc.) alimentándose de camarones afectados moribundos que se acumulan en la superficie y los márgenes de los estanques afectados (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Garza *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995; Vanpatten *et al.*, 2004).

Fase de transición (recuperación): aunque solo dura unos días durante las epizootias del ST, los signos macroscópicos que presentan los camarones en la fase de transición pueden aportar un diagnóstico provisional de infección por el VST. Durante la fase de transición (que puede estar ocurriendo mientras muchos de los camarones de las poblaciones afectadas siguen en la fase aguda y las mortalidades diarias son altas), cantidades entre bastante altas y moderadas de camarones de los estanques afectados presentan lesiones cuticulares melanizadas multifocales, de formas irregulares y de distribución aleatoria. Estos puntos melanizados son acumulaciones de hemocitos que indican los lugares en los que hay lesiones del ST resolviéndose en el epitelio cuticular. Estos camarones pueden tener o no las cutículas blandas y una expansión de cromatóforos rojos, y pueden estar comportándose y alimentándose con normalidad (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011).

Fase crónica: tras una muda completa, los camarones en fase de transición pasan a la fase crónica del ST, en la cual los ejemplares infectados de forma persistente no presentan signos evidentes de enfermedad (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Sin embargo, los camarones *P. vannamei* que están infectados de forma crónica con el VST pueden ser menos resistentes a los factores estresantes normales del ambiente (como reducciones súbitas de la salinidad) que los camarones no infectados (Lotz *et al.*, 1995).

4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica (para hospedadores peneidos)

Las pruebas más fiables para el diagnóstico del ST en las fases aguda y crónica son los métodos histológicos (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Las lesiones patognomónicas inducidas por el VST son propias de las infecciones en fase aguda (Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a; 2011). En las infecciones crónicas por el VST, la única lesión que es característica de los camarones infectados es la presencia de un OL aumentado de tamaño con múltiples esferoides (EOL) (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner 2011), que no pueden diferenciarse de los EOL inducidos por infecciones crónicas con otros virus ARN (Lightner, 1996a). Cuando se observan EOL mediante una histología sistemática y se sospecha de infección crónica por el VST, para confirmarla se recomienda llevar a cabo una prueba molecular (ISH con sondas específicas del VST, o bien PCR con transcripción inversa [RT] [véase el apartado 4.3.1.2.7]).

4.2.3.1. Fase aguda del síndrome de Taura

El diagnóstico del ST en la fase aguda de la enfermedad se basa en la observación histológica (en preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina [H/E]) de áreas multifocales de necrosis en el epitelio cuticular de la superficie general del cuerpo, los apéndices, las branquias y los intestinos posterior y anterior (el esófago, y las cámaras anterior y posterior del estómago). Las células del tejido conjuntivo

subcuticular y las fibras basales del músculo estriado adyacentes al epitelio cuticular afectado están ocasionalmente afectadas. En algunos casos graves de la fase aguda del ST, el epitelio del túbulo de la glándula antenal también está destruido. En las lesiones cuticulares multifocales, destacan numerosos focos de células afectadas que presentan una gran eosinofilia en el citoplasma y núcleos picnóticos y cariorrécticos. A menudo, en estas lesiones de la fase aguda del ST son muy abundantes los restos citoplasmáticos de células necróticas y por lo general tienen aspecto de cuerpos esféricos (1–20 µm de diámetro), cuya tinción varía de eosinófila a débilmente basófila. Estas estructuras, junto con los núcleos picnóticos y cariorrécticos, confieren a las lesiones de la fase aguda del ST un aspecto característico de “pimienta” o de “perdigones”, que se considera patognomónico del ST cuando no hay necrosis concurrente de las células parenquimatosas de los túbulos del órgano linfoide. La ausencia de necrosis del órgano linfoide en la fase aguda de las infecciones por el VST permite diferenciar el ST de la fase aguda de la enfermedad de la cabeza amarilla, debido a la cual, en el epitelio cuticular y en las branquias pueden tener lugar patrones de necrosis similares a las inducidas por el VST (Lightner, 1996a).

En los tejidos infectados por el VST, los núcleos picnóticos o cariorrécticos dan una reacción de Feulgen positiva (para el ADN), que los distingue de las inclusiones citoplásmicas, menos basófilas y más eosinófilas, que no contienen ADN. La ausencia de infiltración hemocítica y de otros signos de una respuesta inflamatoria importante del hospedador distingue la fase aguda del ST de la fase de transición de la enfermedad (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

4.2.3.2. Fase de transición (recuperación) del síndrome de Taura

En la fase de transición del ST, las típicas lesiones cuticulares de la fase aguda disminuyen en cantidad y gravedad y son reemplazadas por una abundante infiltración y acumulación de hemocitos en los lugares de necrosis. Las masas de hemocitos pueden melanizarse dando lugar a las manchas negras irregulares que caracterizan la fase de transición de la enfermedad. En cortes teñidos con H/E, tales lesiones pueden poner de manifiesto erosión de la cutícula, colonización de la superficie e invasión de la cutícula afectada, así como de los hemocitos superficiales expuestos, por *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Los cortes de los órganos linfoides (OL), durante la fase de transición del ST pueden tener un aspecto normal con tinción de H/E. Sin embargo, cuando se analizan para determinar si contienen el VST mediante ISH con una sonda específica de ADNc (o mediante ISH con MAb 1A1 para el VST de tipo A, genotipo 1), se observa que se acumulan grandes cantidades de VST en las células parenquimatosas más periféricas de los túbulos de los OL (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3.3. Fase crónica del síndrome de Taura

Los camarones en la fase crónica del ST no presentan síntomas generales, e histológicamente el único signo de infección es la presencia de numerosos EOL prominentes, que pueden permanecer asociados al cuerpo principal de los OL pares, o bien desprenderse y convertirse en cuerpos EOL ectópicos, alojados en zonas estrechadas del hemocèle (es decir, el corazón, las branquias, los tejidos conjuntivos subcuticulares, etc.). Dichos EOL son acumulaciones esféricas de células del OL y de hemocitos y se pueden distinguir de los tejidos normales del OL por su naturaleza esférica y la ausencia del vaso central, que es típico de los túbulos de los OL normales. Cuando se analizan los EOL mediante una sonda de ADNc (o con MAb 1A1 usando ISH) para determinar si contienen el VST, algunas células de los EOL dan reacciones positivas al virus, pero no reacciona ningún otro tejido afectado (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Para poner de manifiesto (y establecer un diagnóstico provisional del ST en fase aguda) lesiones focales de ST en fase aguda en células epiteliales de la cutícula, puede utilizarse el examen microscópico directo de simples preparaciones húmedas no teñidas de fragmentos extirpados de las branquias, puntas de los apéndices, etc., mediante microscopía óptica de contraste de fases o reducida. Las preparaciones que presenten lesiones del ST en fase aguda contendrán muchas estructuras esféricas (consúltense los métodos histopatológicos en el apartado 4.2.3 anterior), que son núcleos picnóticos y cariorrécticos y restos citoplasmáticos de células necróticas.

4.2.5. Frotis

No aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/Citopatología

Actualmente no es aplicable a efectos de diagnóstico.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

El VST no se ha cultivado *in vitro*, puesto que no existen líneas celulares de crustáceos (Lightner, 1996a; Pantoja *et al.*, 2004). A pesar de una reciente publicación en la que se informaba incorrectamente de que el VST había infectado líneas celulares humanas y de mono (Audelo del Valle *et al.*, 2003), otros dos laboratorios repitieron el estudio y ambos observaron que el VST no infecta ni se replica en líneas celulares de primates ni humanas de probada susceptibilidad a picornavirus humanos (Lu *et al.*, 2004; Pantoja *et al.*, 2004).

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Para analizar muestras de hemolinfa, homogenados de tejido o cortes de tejido de camarón fijados con el fijador AFA de Davidson, puede utilizarse un MAb para la detección del VST (Erickson *et al.*, 2002; 2005; Poulos *et al.*, 1999). Puede utilizarse el MAb 1A1 contra el VST para distinguir ciertas variantes o “cepas” del VST de otras cepas (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

4.3.1.2.3. Método del bioanálisis

La confirmación de la infección por el VST se puede llevar a cabo mediante bioanálisis de los animales sospechosos con las formas juveniles de *P. vannamei* SPF que sirven como indicador del virus (Brock *et al.*, 1997; Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz 1997b; Overstreet *et al.*, 1997). Se pueden emplear protocolos orales o de inyección. El método oral es relativamente sencillo de realizar y se lleva a cabo en pequeños estanques alimentando a formas juveniles de *P. vannamei* SPF con langostinos sospechosos troceados (White *et al.*, 2002). Es necesario el uso de un tanque de camarones que ejerzan de controles negativos indicadores, que solo reciban tejidos SPF (libre del VST) y alimento normal para camarones. Cuando se usa el protocolo oral de alimentación con camarones muertos para el bioanálisis destinado a detectar el VST, normalmente empiezan a detectarse camarones indicadores positivos al ST (por signos evidentes e histopatológicos) 3 a 4 días después de la exposición inicial, y se dan importantes niveles de mortalidad a los 3–8 días de la exposición inicial. Los camarones que constituyen el control negativo deben permanecer negativos (durante al menos 10–15 días) en cuanto a signos macroscópicos e histológicos del ST, y en lo que respecta a mortalidades anormales (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

Con el protocolo de bioanálisis por inyección, se pueden realizar análisis de detección del VST en varios tipos de muestras. Si se obtienen durante una epizootia de VST, se pueden usar los camarones completos. Las cabezas se usan solo si el camarón presenta grandes lesiones de fase de transición (manchas multifocales melanizadas sobre la cutícula) o si no presenta signos clínicos de infección (fase crónica), puesto que en estos casos el virus, si está presente, se concentrará en el órgano linfóide (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Para realizar una prueba no letal con reproductores, se pueden tomar muestras de la hemolinfa y usarlas, mediante inyección IM, para exponer al camarón indicador (Lightner, 1996a).

Realización del bioanálisis de detección del VST mediante inyección IM:

Obsérvese que los tejidos y el homogenado resultante deben estar refrigerados durante todo el protocolo manteniéndolos sobre hielo.

- i) Se preparan, en una proporción de 1:2 o 1:3, cabezas o ejemplares enteros de camarones sospechosos de estar infectados por el VST con tampón TN (véase el Capítulo 2.2.2, necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa [NHHI] para consultar la composición de este tampón) o solución salina estéril al 2% preparada con agua destilada.
- ii) Se homogeneiza la mezcla en una trituradora o batidora. Hay que evitar una homogenización o trituración excesivas para que la mezcla no se caliente.
- iii) Se clarifica el homogenado por centrifugación a 3.000 *g* durante 10 minutos. Se decanta y se conserva el líquido sobrenadante. Se desecha el sedimento.
- iv) Se centrifuga el líquido sobrenadante a 27.000 *g* durante 20–30 minutos a 4°C. Se decanta y se conserva el líquido sobrenadante. Se desecha el sedimento.
- v) Se diluye el líquido sobrenadante del paso iv de 1/10 a 1/100 con solución salina estéril al 2%. Esta solución puede utilizarse como inóculo para inyectar a los camarones indicadores (o bien esterilizarse por filtración, como se describe en el paso vi).
- vi) Se filtra el líquido sobrenadante diluido del paso v utilizando una jeringa estéril (el tamaño depende del volumen final del sobrenadante diluido) y un filtro estéril de 0,45 µm para jeringa. Es posible que deban utilizarse varios filtros, pues se obturan fácilmente. Se debe obtener el filtrado en un tubo de ensayo o vaso de precipitados estéril. Esta solución puede guardarse congelada (lo recomendable es a -20°C si se trata de periodos de almacenaje cortos [semanas] o a -80°C si se trata de periodos largos [meses a años]), o bien utilizarse de inmediato para inyectarla a los camarones indicadores.
- vii) Los camarones indicadores deben proceder de reservas de *P. vannamei* SPF susceptibles al VST (como la “reserva Kona” [Moss *et al.*, 2001], comercializada por varios proveedores en América), y no de líneas seleccionadas de reservas de probada resistencia al VST.
- viii) Se inyectan 0,01 ml por gramo de peso corporal utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. Los camarones indicadores deben recibir la inyección por vía intramuscular en el tercer segmento caudal. Si el camarón indicador empieza a morir en cuestión de minutos tras la inyección, significa que el inóculo contiene demasiado material proteináceo y que debe diluirse antes de seguir inyectando a otros camarones. Cuando se producen muertes súbitas post-inyección, significa que tiene lugar un “shock proteico”, que es consecuencia de una coagulación sistémica de la hemolinfa del camarón como respuesta al inóculo (Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).
- ix) Las muestras de hemolinfa pueden diluirse (a 1/10 o 1/20 en tampón TN), o bien esterilizarse por filtración (si es necesario), e inyectarse a los camarones indicadores sin más preparación.
- x) Si el inóculo contiene el VST, los camarones indicadores deben empezar a morir en un plazo de 24 a 48 horas tras la inyección. Dosis menores del virus pueden tardar más en causar una infección letal, de modo que los camarones deben observarse durante al menos 10 a 15 días tras la inyección.
- xi) La presencia (o ausencia) del VST en los camarones indicadores debe confirmarse mediante análisis histológico (y/o ISH mediante sonda génica, si se dispone de ella) de camarones moribundos fijados con solución de Davidson. Si se precisa confirmación adicional además de la observación de lesiones patognomónicas del VST, puede llevarse a cabo una RT-PCR con secuenciación del amplicón obtenido.

4.3.1.2.4. Método del bioanálisis con camarones centinela

Como variación de la técnica de bioanálisis, se puede utilizar un sistema de “camarón centinela”. Por ejemplo, se pueden mantener pequeñas formas juveniles de *L. vannamei* SPF susceptibles al VST en jaulas de red dentro de tanques independientes, o bien en el mismo sistema de agua, junto a otros camarones de estado desconocido respecto al VST, para que ejerzan de bioanálisis de detección de agentes infecciosos, como el VST.

4.3.1.2.5. Método del inmunoanálisis de transferencia puntual

- i) Para el método del inmunoanálisis de transferencia puntual, se puntea sobre la superficie de placas de ensayo MA-HA-N45 (Millipore, South San Francisco, California [CA], EE.UU) 1 µl del antígeno problema (virus purificado, hemolinfa de camarón infectado o hemolinfa de camarón SPF).

- ii) Después de secar al aire, los pocillos se bloquean 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl de un tampón que contenga solución salina tamponada con fosfato y Tween 20 al 0,05% (PBST) mezclada con un 10% de suero normal de cabra (Life Technologies, Gibco BRL) y un 2% de caseína Hammersten (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.).
- iii) Se lavan los pocillos tres veces con PBST y luego se hacen reaccionar con 100 µl del anticuerpo primario (MAb o anticuerpos policlonales de ratón) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- iv) Para la detección se usa un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón desarrollado en cabra marcado con fosfatasa alcalina, específico para la cadena γ (Zymed, South San Francisco, CA), diluido a 1/1000 en PBST más un 10% de suero normal de cabra (30 minutos a temperatura ambiente).
- v) Después de lavar tres veces con PBST, una vez con PBS y una vez con agua destilada, las reacciones se visualizan dejando desarrollar durante 15 minutos a temperatura ambiente con nitroazul de tetrazolio y bromocloroindolil fosfato (Roche Diagnostics, Corp.) en tampón Tris-NaCl (cada uno a una concentración 100 mM) que contenga MgCl₂ 50 mM, a pH 9,5.
- vi) Las reacciones se detienen con agua destilada.
- vii) Las reacciones se gradúan siguiendo una escala de 0 a +4, donde la reacción de mayor intensidad es equivalente a la reacción generada usando el MAb contra el control de referencia, que consiste en VST semipurificado. Una reacción negativa es aquella en la que no es visible ninguna mancha coloreada en el pocillo

4.3.1.2.6. Otros métodos basados en anticuerpos

El MAb 1A1 contra el VST se puede aplicar a otros formatos de pruebas basadas en anticuerpos (por ejemplo, a pruebas de inmunofluorescencia indirecta [IFAT] o de inmunohistoquímica [IHC] con frotis de tejidos, cortes congelados, o tejidos fijados y desparafinados). El MAb 1A1 puede aplicarse a un formato de IHC utilizando cortes de tejidos fijados con solución de Davidson (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

Se recomienda que los resultados inesperados de pruebas de detección del VST basadas en MAb sean interpretados en el contexto de los síntomas clínicos, los antecedentes del caso, y junto con resultados de otras pruebas (como la RT-PCR, hallazgos histológicos o de ISH con una sonda de ADN específica del VST – véanse los correspondientes apartados de este capítulo).

4.3.1.2.7. Técnicas moleculares

Se han desarrollado pruebas de ISH y de RT-PCR para el VST, y existen kits comerciales de RT-PCR para el VST. No se dispone del método de la transferencia puntual para la detección del VST.

4.3.1.2.7.1. Sondas de ADN para aplicaciones de la ISH, con sondas de ADNc no radiactivas

Las sondas no radiactivas de ADNc marcadas con DIG para el VST se pueden obtener en el laboratorio. El método de la ISH proporciona mayor sensibilidad diagnóstica que los métodos más tradicionales para la detección y diagnóstico del VST basados en métodos histológicos clásicos (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner y Redman 1998; Mari *et al.*, 1998). La ISH de cortes histológicos rutinarios de lesiones de fase aguda y de transición en el epitelio cuticular, en otros tejidos, y de los EOL en la fase de transición y en la fase crónica mediante una sonda ADNc marcada con DIG específica del VST, proporciona un diagnóstico definitivo de infección por VST (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Las lesiones patognomónicas positivas para el VST consisten en áreas destacadas de color azul a negro azulado en el citoplasma de las células afectadas cuando reaccionan con las sondas de ADNc. Los prominentes fragmentos nucleares y núcleos picnóticos que contribuyen al aspecto patognomónico de “perdigones” en las lesiones de ST no reaccionan con la sonda (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (Véase el capítulo 2.2.2, NHHI, para detalles del método de la ISH. Véase el capítulo 2.2.0, apartado B.5.3.ii para una información detallada sobre el uso del fijador AFA de Davidson).

En los tejidos con la solución de Davidson pueden tener lugar falsos negativos en la prueba de la ISH si los tejidos se dejan en el fijador durante más de 24–48 horas. El bajo pH del fijador de Davidson causa una hidrólisis ácida del ARN monocatenario del genoma del VST, originando resultados que son falsos negativos. Esta hidrólisis puede evitarse usando fijadores neutros, como un fijador compatible con ARN desarrollado para camarones, o bien utilizando

debidamente el fijador de Davidson (evitando tiempos de fijación superiores a 24 horas) (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner y Redman 1998).

4.3.1.2.7.2. Método de la RT-PCR con transcripción inversa

En las muestras de tejido (hemolinfa, pleópodos, camarones pequeños enteros, etc.) se puede analizar si están infectados por el VST mediante la RT-PCR. Los cebadores llamados 9992F y 9195RF, amplifican una secuencia de 231 pares de bases (pb) del genoma del VST (Nunan *et al.*, 1998). El fragmento amplificado corresponde a una secuencia conservada que se localiza en la región intergénica y en el ORF 2 del VST. El cebador 9992F se localiza cerca del extremo 3' de la región intergénica, y el 9195R se localiza en el ORF 2 dentro de la VP2 (= CP1) (Mari *et al.*, 2002; Nunan *et al.*, 1998).

Cebador	Producto	Secuencia	% de G+C	Temperatura
9992F	231 pb	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	55%	69°C
9195R		5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	50%	63°C

El método de la RT-PCR indicado a continuación para la detección del VST sigue en general el descrito por Nunan *et al.* (1998).

- Preparación del ARN molde:* el ARN se puede extraer de tejidos frescos, congelados o conservados en etanol. La extracción del ARN debe realizarse usando preparaciones comerciales de extracción de ARN de los tejidos, como el High ARN Tissue Kit (Roche, Penzberg, Alemania), y siguiendo los procedimientos del fabricante para producir moldes de ARN de calidad.
- La RT-PCR se hace en solución, usando como molde 10 µl de ARN total extraído de la hemolinfa, tejidos congelados de camarón, o tejidos fijados con etanol (concentración de ARN = 1–100 ng/ml).
- En cada RT-PCR para la detección del VST, se deben incluir los siguientes controles: a) una muestra de tejido que se sepa que es negativa para el VST; b) una muestra que se sepa que es positiva para el VST (tejido o virus purificado); y c) un control “sin molde”.
- En todas las reacciones de amplificación aquí descritas se emplea el kit *GeneAmp® EZ rTth ARN PCR kit* (Applied Bioscience, Forster City, CA).
- Las condiciones óptimas de la RT-PCR (concentraciones finales en un volumen total de 50 µl) para detectar el VST en muestras de tejido de camarón son: cebadores (cada uno a una concentración 0,46 µM), dNTPs (cada uno a una concentración 300 µM), ADN polimerasa rTth (2,5 U/50 µl), acetato de manganeso (2,5 mM), en tampón EZ (vicién 25 mM, acetato potásico 57,5 mM, glicerol al 40% [p/v], a pH 8,2) 5×.
- Si el termociclador no tiene una tapadera térmica, se deposita aceite mineral ligero (50 µl) sobre los 50 µl de mezcla de reacción para evitar la condensación o evaporación durante los ciclos térmicos.
- Se combina el ARN molde con todos los reactivos y se deja que tenga lugar la transcripción inversa a 60°C durante 30 minutos, seguida de 95°C durante 2 minutos.

Nota: las condiciones de reacción aquí descritas se optimizaron mediante un *Thermal Cycler GeneAmp 980* (Applied Biosystems) automático. Las condiciones deben optimizarse para cada termociclador utilizando controles que se sepa que son positivos.
- Cuando termine la transcripción inversa, se amplifican las muestras durante 40 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, y a continuación hibridación/extensión a 60°C durante 45 segundos. Tras el último ciclo se aplica un paso de extensión final durante 7 minutos a 60°C y el proceso termina en una fase de estabilización a 4°C.
- Tras el final de la RT-PCR, se extraen las soluciones de ADNc amplificado de debajo del aceite mineral y se colocan en tubos de microcentrifuga limpios de 0,5 ml.
- Se puede añadir una muestra de 10 µl del producto amplificado al pocillo de gel de agarosa al 2,0% teñido con bromuro de etidio (0,5 g ml⁻¹), y someterse a electroforesis en TBE 0,5x (Tris, ácido bórico, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]).
- Como marcador se utiliza una muestra de ADN con graduaciones de 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA)

- xii) En el Capítulo 2.2.2, sobre la NHHI, se proporcionan los datos relativos a la composición de los reactivos y los tampones

4.3.1.2.7.3. Método de la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección del VST

Se han desarrollado métodos de RT-PCR cuantitativa para la detección del VST. Estos métodos tienen las ventajas de la rapidez, la especificidad y la sensibilidad. La sensibilidad de la qRT-PCR es de ~100 copias de la secuencia diana del genoma del VST (Dahr *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

La RT-PCR en tiempo real mediante TaqMan descrita a continuación para la detección del VST en general sigue el método utilizando por Tang *et al.* (2004).

- i) Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan se escogieron de la región del ORF1 del genoma del VST (código de acceso del GenBank AF427765) que codifica proteínas estructurales. Los cebadores y la sonda TaqMan se diseñaron mediante el programa *Primer Express* (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores en dirección 5' (TSV1004F) y en dirección 3' (TSV1075R) son: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' y 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3', respectivamente. La sonda TaqMan, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), que corresponde a la región de nucleótidos que va del 1024 hasta el 1051, se sintetizó y marcó con los colorantes fluorescentes 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' y N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxiroadamina (TAMRA) en el extremo 3' (Applied Biosystems, catálogo n° 450025).
- ii) *Preparación del ARN molde*: la extracción y purificación del ARN molde de la hemolinfa o tejido de camarón se llevan a cabo como se describe en el apartado dedicado a la RT-PCR tradicional.
- iii) La mezcla de reacción de la RT-PCR contiene: mezcla madre para RT-PCR TaqMan simple (Applied Biosystems, parte n° 4309169), los cebadores, cada uno a una concentración 0,3 µM, la sonda TaqMan 0,1 µM, 5–50 ng de ARN, y agua en un volumen de reacción de 25 µl. Para que los resultados sean los óptimos, la mezcla de reacción debe someterse a vórtex y mezclarse bien.
- iv) La amplificación se lleva a cabo con el sistema de detección de secuencias *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems; ABI PRISM 7000, 7300, 7500, aunque también pueden utilizarse modelos o marcas más recientes). Los ciclos consisten en una transcripción inversa a 48°C durante 30 minutos y una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.
- v) Al final de la reacción, se realizarán mediciones de la fluorescencia en tiempo real con un sistema de cámara acoplada (CCD). Se establecerá un umbral por encima del valor basal a partir del cual se empiece a detectar el aumento de señal asociada a un aumento exponencial del producto de la PCR. Las muestras se considerarán negativas si el valor Ct (ciclo umbral) es de 40 ciclos. Las muestras con un valor de Ct inferior a 40 ciclos se considerarán positivas. Para confirmar los resultados de la RT-PCR en tiempo real, puede someterse una alícuota del producto de la RT-PCR a electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 4% y exponerse a luz UV. Puede visualizarse un fragmento de ADN de 72 pb en las muestras que son positivas al VST.
- vi) Es necesario incluir un “control sin molde” cada vez que se lleve a cabo la reacción, con el fin de descartar la presencia de contaminantes fluorescentes en la mezcla de reacción o en el bloque de calentamiento del termociclador. También debe incluirse un control positivo, que puede ser un ARN transcrito *in-vitro* que contenga la secuencia diana, viriones purificados o ARN extraído de tejido infectado por el VST.

4.3.1.2.7.4. Secuenciación

Los productos de la RT-PCR pueden clonarse y secuenciarse cuando sea necesario confirmar la infección por el VST o identificar falsos positivos o una amplificación inespecífica (Mari *et al.*, 2002; Neilsen *et al.*, 2005; Srisuvan *et al.*, 2006; Tang y Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Existen métodos de aislamiento y purificación del VST (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999), pero no se recomiendan para el diagnóstico sistemático del ST.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables porque los camarones son organismos invertebrados que no producen anticuerpos específicos que pudieran utilizarse para poner de manifiesto la infección por el VST o una exposición previa a este virus.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico del VST se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda y/o no está disponible actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Vigilancia, detección y métodos de diagnóstico del VST en peneidos

Método	Vigilancia				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	b	c
Bioanálisis	d	d	d	d	c	b
MO directa	d	d	c	d	c	d
Histopatología	d	b	b	c	a	a
ME de transmisión	d	d	d	d	c	c
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	c	c	b	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	c	b	b	a	a
RT-PCR, qRT-PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de síndrome de Taura

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la RT-PCR (apartado 4.3.1.2.7.2) es el método recomendado para la vigilancia dirigida, por motivos de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas.

Cuando se estudian episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia dirigida, la demostración de lesiones patognomónicas inducidas por el VST en el epitelio cuticular mediante histología (con o sin confirmación mediante ISH con sondas de ADN específicas del VST) constituye un método adecuado (Tabla 5.1).

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso es aquel en el que se observa:

- Mortalidades repentinamente altas en PL tardías, juveniles o subadultos de *P. vannamei* o *P. stylirostris* en zonas donde el VST es enzootico;
- La repentina presencia de numerosas aves marinas (gaviotas, cormoranes, garzas, golondrinas de mar, etc.) “pescando” en uno o más de los estanques de camarones afectados;
- Muestras de *P. vannamei* o *P. stylirostris* de piscifactoría de estanques en los que haya aves marinas alimentándose, que presenten signos de ST de fase aguda o de transición, como una coloración general rojiza, letargo, caparzones blandos, intestinos vacíos y la presencia de varios puntos negros irregulares en la cutícula; o
- La presencia de focos de necrosis en el epitelio cuticular observables a bajos aumentos (es decir, mediante una lupa de x10 o un examen microscópico directo de preparaciones húmedas) para examinar los bordes de los apéndices, como los urópodos, los pleópodos o las branquias.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtienen resultados positivos en cualquier combinación de una prueba molecular (PCR o ISH) y una prueba morfológica (histología) utilizando al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Demostración histológica de lesiones del VST en fase aguda en (especialmente) el epitelio cuticular del intestino anterior (esófago, cámaras anterior o posterior del estómago) y/o en las branquias, los apéndices o la cutícula general. Este tipo de lesiones del VST son patognomónicas del VST solo cuando aparecen sin una necrosis aguda grave (con picnosis y cariorrexis) de las células parenquimatosas de los túbulos del órgano linfático (lo cual puede ocurrir en las infecciones por el virus de la cabeza amarilla en fase aguda).
- ISH (con una sonda de ADNc específica del VST) que dé una señal positiva para las lesiones propias del VST en cortes histológicos (es decir, lesiones cuticulares de la fase aguda del ST) o para esferoides del órgano linfático (EOL) en los órganos linfáticos de camarones con lesiones de la fase crónica del ST.
- Resultados de la RT-PCR positivos para el VST.
- En caso necesario, para determinar el genotipo del VST puede llevarse a cabo una secuenciación del producto de la PCR que englobe la CP2 (Tang y Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

8. Bibliografía

- AGUIRRE GUZMAN G. & ASCENCIO VALLE F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, **4**, 333–348.
- AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISENO-GARCIA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.
- BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. Rome, FAO, 240 pp.
- BROCK, J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol. & Technol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: *Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.
- BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: *Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 275–283.
- CHANG Y.S., PENG S.E., YU H.T., LIU F.C., WANG C.H., LO, C.F. & KOU G.H. (2004). Genetic and phenotypic variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus sensilis* in Taiwan. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2963–2968.

- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress, D.E. Jory, ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2002). Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green Chemistry. *J. Virol. Methods*, **104**, 69–82.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, May/June, 30–42.
- ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). Taura Syndrome Virus from Belize represents a unique variant. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 91–98.
- ERICKSON H.S., ZARAIN-HERZBERG M. & LIGHTNER D.V. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 1–10.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANIHOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.
- FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.
- GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T., MARI J. & BONAMI J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.L. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 365–379.
- JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). In: Acuicultura del Ecuador. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.
- JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.
- KING A., ADAMS M., CARSTENS E. & LEFKOWITZ E.J., EDS. (in press) Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

LARAMORE C.R. (1997). Shrimp culture in Honduras following the Taura syndrome virus. *In: Proceeding of the 4th Symposium on Aquaculture in Central America: Focusing on Shrimp and Tilapia, Tegucigalpa, Honduras, World Aquaculture Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–7.*

LIGHTNER D.V. (1995). Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *Proceedings of the 99th Annual Meeting US Animal Health Association, Reno, Nevada, USA, 36–52.*

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996A). *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996B). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 27–52.

LIGHTNER, D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.

LOTZ J.M. (1997a). Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 243–254.

LOTZ J.M. (1997b). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.

LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

LOTZ J.M., FLOWERS A.M. & BRELAND V. (2003). A model of Taura syndrome virus (TSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **83**, 168–176.

LU Y. & SUN P. (2005). Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene. *Antiviral Res.*, **67**, 141–146.

LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of Penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.

MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 917–928.

- MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–19.
- NIELSEN L., SANG-OU M., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- NUNAN L.M., TANG-NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura Syndrome Virus (TSV). *Aquaculture*, **229**, 1–10.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCILWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.
- POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of the Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.
- PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.
- ROBALINO J., BROWDY C.L., PRIOR S., METZ A., PARNELL P., GROSS P. & WARR G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* **78**, 10442–10448.
- ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.
- ROSENBERRY B. (2004). World Shrimp Farming 2004. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.
- SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, In press
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.-R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implication of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Research*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura Syndrome Virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390** (2), 324–329.
- WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **33**, 341–348.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV Challenges Advance Selective Breeding in Pacific White Shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 40–41.

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32**, 21–24.

ZARIN-HERZBERG M. & ASCENCIO F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para el Síndrome de Taura (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).

ENFERMEDAD DE LAS MANCHAS BLANCAS

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la enfermedad de las machas blancas (EMB) se considerará una infección por el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

Se han identificado distintas cepas del VSMB con pequeños polimorfismos genéticos (variantes). Sin embargo, es importante tener en cuenta que, dado que la familia *Nimaviridae* se ha reconocido recientemente, el concepto de especie estará sujeto a cambio una vez se hayan estudiado en mayor detalle tanto las cepas previamente conocidas como las más recientes.

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) asignó el VSMB al género *Whispovirus*, que pertenece a la familia *Nimaviridae*, como miembro único. Los viriones del VSMB son entre ovóides o elipsoides y baciliformes, tienen una simetría regular y miden 80 a 120 nm de diámetro y 250 a 380 nm de longitud. Lo que más llama la atención es la prolongación (apéndice) filiforme o flagelar que se observa en un extremo del virión. Actualmente, aunque se han identificado distintas cepas geográficas con variabilidad genotípica, todas ellas están clasificadas como una única especie (el virus del síndrome de las machas blancas) dentro del género *Whispovirus* (Lo *et al.*, 2012).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Este agente es viable durante al menos 30 días a 30°C en agua marina en condiciones de laboratorio (Momoyama *et al.*, 1998), y es viable en estanques durante al menos 3–4 días (Nakano *et al.*, 1998).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Se inactiva en <120 minutos a 50°C y en <1 minuto a 60°C (Nakano *et al.*, 1998).

2.1.4. Ciclo de vida

Los estudios *in-vitro* realizados con cultivos celulares primarios y los estudios *in-vivo* con postlarvas (PL) ponen de manifiesto que el ciclo de replicación dura unas 20 horas a 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

2.2. Factores del hospedador

El VSMB tiene una gran variedad de hospedadores. El virus puede infectar a gran variedad de crustáceos acuáticos, sobre todo decápodos, como camarones marinos, de aguas salobres y de aguas dulces, así como a cangrejos y cangrejos de río y langostas (Maeda *et al.*, 2000).

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Hasta ahora, no se ha observado que ningún crustáceo decápodo (orden Decapoda) de aguas marinas y salobres o dulces sea resistente (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo y Kou, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2009).

2.2.2. Estadios susceptibles de la vida del hospedador

Todos los estadios de vida son potencialmente susceptibles, desde los huevos a los reproductores (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Los mejores estadios de la vida de los crustáceos para la detección del virus son las PL tardías, los juveniles y los adultos. La probabilidad de detección puede aumentar exponiéndolos a condiciones

estresantes (como la ablación del pedúnculo ocular, la eclosión, la muda, cambios en la salinidad, la temperatura o el pH del agua, y durante los afloramientos de plancton).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los principales tejidos diana durante la infección por el VSMB son de origen embrionario ectodérmico y mesodérmico, especialmente el epitelio cuticular y los tejidos conjuntivos subcuticulares (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Aunque el VSMB infecta el tejido conjuntivo subyacente en el hepatopáncreas y el intestino medio del camarón, las células epiteliales tubulares de estos dos órganos son de origen endodérmico, y no resultan infectadas.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Es frecuente que tenga lugar una infección persistente, y en ocasiones se ha observado una infección de por vida (Lo y Kou, 1998). Las cargas víricas durante la infección persistente pueden ser extremadamente bajas y son muy difíciles de detectar incluso mediante métodos sensibles como la PCR en tiempo real y anidada.

2.2.6. Vectores

El virus se puede transmitir entre hospedadores y no necesita ningún vector biológico.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Los decápodos salvajes son *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995a), *Acetes* sp., *Alpheus* sp., *Callinassa* sp., *Exopalaemon* sp., *Helice* sp., *Hemigrapsus* sp., *Macrophthalmus* sp., *Macrophthel* sp., *Metaplex* sp., *Orithyia* sp., *Palaemonoidea* sp., *Scylla* sp., *Sesarma* sp., *Stomatopoda* sp. (He y Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002) y pueden resultar fácilmente infectados por el VSMB y pueden expresar la enfermedad en condiciones ambientales adecuadas. No obstante, ciertos crustáceos no decápodos, como los copépodos (Huang *et al.*, 1995a), los rotíferos (Yan *et al.*, 2004), *Artemia salina* (Chang *et al.*, 2002), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), y *Tachypleidue* sp. (He y Zhou, 1996) pueden convertirse en animales acuáticos salvajes portadores con infección latente sin manifestar la enfermedad. Otros moluscos marinos, como los gusanos poliquetos (Vijayan *et al.*, 2005), así como ciertos artrópodos acuáticos no crustáceos, como las cochinillas marinas (*Isopoda*) y larvas de insectos Euphydradae pueden ser portadores mecánicos del virus sin signos de infección (Lo y Kou, 1998).

2.3. Patrón de la enfermedad

En ocasiones la infección causa enfermedad, y a veces, no (Tsai *et al.*, 1999), en función de factores que todavía no se comprenden del todo, pero que están relacionados con la tolerancia de la especie y factores ambientales desencadenantes. Si la dosis infectiva es adecuada para que los animales no mueran de inmediato, las especies susceptibles a la enfermedad presentan grandes cantidades de viriones circulantes en la hemolinfa (Lo *et al.*, 1997), pero esto también puede ocurrir en especies tolerantes que no presenten mortalidad. Así pues, una alta carga vírica *per se* no causa la enfermedad ni mortalidad en todas las especies susceptibles.

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La infección se puede transmitir verticalmente (por vía transovárica), horizontalmente por la ingesta de tejido infectado (como por ejemplo, por canibalismo, depredación, etc.), y por el agua. Puede producirse una transmisión de la infección desde animales aparentemente sanos en ausencia de enfermedad. Los animales muertos o moribundos pueden constituir una fuente de transmisión de la enfermedad (Lo y Kou, 1998).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia es muy variable, y oscila entre <1% en poblaciones salvajes infectadas y un 100% en poblaciones en cautividad (Lo y Kou, 1998).

2.3.3. Distribución geográfica

Se ha notificado la EMB en crustáceos de China (República Popular de), Japón, Corea (República de), el sudeste asiático, el sur de Asia, el continente indio, el Mediterráneo (Stentiford y Lightner, 2011), Oriente Medio y América. Se conoce la existencia de zonas y compartimientos libres de la EMB dentro de estas regiones (Lo *et al.*, 2012).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Todas las especies de camarón peneido son muy susceptibles a la infección, que a menudo desemboca en una alta mortalidad. Los cangrejos, los cangrejos de río, los camarones de agua dulce y las langostas de pequeñas o grandes pinzas son susceptibles a la infección, pero la morbilidad y la mortalidad consecuencia de la infección son muy variables (Lo y Kou, 1998). Se sabe que en algunos decápodos se producen niveles altos de infección en ausencia de enfermedad clínica.

2.3.5. Factores ambientales

Pueden inducirse brotes de la enfermedad por factores estresantes, como cambios rápidos en la salinidad del agua. La temperatura del agua tiene un gran efecto en la expresión de la enfermedad, de modo que las temperaturas medias situadas entre los 18°C y los 30°C predisponen a brotes de la EMB (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001).

2.4. Control y prevención

Aunque todavía no se sabe cuál es el mecanismo subyacente, pruebas de laboratorio han puesto de manifiesto que los camarones y cangrejos de río “vacunados” tienen mejores tasas de supervivencia tras la exposición al VSMB. Inicialmente se observó que los camarones *Penaeus japonicus* que sobrevivían a infecciones naturales y experimentales por el VSMB mostraban resistencia a posteriores exposiciones a este virus (Venegas *et al.*, 2000). En estudios posteriores se observó que la inyección de viriones o de la proteína estructural recombinante (VP28) del VSMB por vía intramuscular proporcionaba a los camarones cierta protección frente a la infección experimental por el VSMB. Además, los camarones alimentados con gránulos de alimento recubiertos de bacterias inactivadas con una sobreexpresión de la VP28 mostraban mejores tasas de supervivencia tras la exposición al VSMB (Witteveldt *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque estos resultados parecían prometedores, la protección solo fue eficaz cuando los camarones estaban infectados con dosis bajas del VSMB. Además, solía durar solo unos pocos días, o en el caso del cangrejo de río, unos 20 días. Otra posible forma de protección del camarón frente a la infección por el VSMB es la utilización de interferencia por ARN (ARNi). La utilización de ARN bicatenario (ARNds) específico del genoma del VSMB produjo una fuerte actividad anti-VSMB, protegiendo al camarón frente a la infección por el VSMB, pero en el mismo estudio se observó que un ARNds largo inducía en los camarones respuestas antivíricas tanto dependientes como independientes de la secuencia (Robalino *et al.*, 2005). Y en un estudio más reciente incluso se ha observado que la administración por vía oral de ARNds de la VP28 expresada en bacterias podía proteger a camarones frente a la infección por el VSMB (Sarathi *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta hoy no se dispone de datos de ensayos de campo que permitan aplicar ni la vacunación ni la iARN.

2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método de vacunación de probada eficacia.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No está confirmada científicamente.

2.4.3. Inmunoestimulación

En varios informes se ha indicado que el beta-glucano, la vitamina C y los extractos de algas (fucoidano) y otros inmunoestimulantes pueden mejorar la resistencia a la EMB (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se han notificado mejoras importantes.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No aplicable a la EMB.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No existen agentes bloqueantes eficaces que puedan recomendarse en este momento. La rVP28 tiene efecto, pero no puede utilizarse como agente bloqueante práctico.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Es probable que la desinfección de huevos sea eficaz frente a la transmisión transovárica (Lo y Kou, 1998), pero no está científicamente confirmado.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se han aplicado con éxito muchas prácticas de manejo para hacer frente a la EMB, como evitar la repoblación en las estaciones frías, utilizar ejemplares libres de patógenos específicos (SPF) o bien reservas negativas según la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y utilizar agua y sistemas de cultivo biológicamente seguros (Withyachumnarnkul, 1999) para el policultivo de camarones y peces (He *et al.*, datos no publicados).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Para la detección del VSMB deben escogerse ejemplares de camarones moribundos o bien camarones que presenten signos clínicos (véase el apartado 4.1.1) o muestren cambios de comportamiento (apartado 4.1.2).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

En el Capítulo 2.2.0 se orienta sobre la conservación de las muestras destinadas a cada tipo de prueba.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras tomadas para las pruebas moleculares o basadas en anticuerpos destinadas a detectar la EMB pueden combinarse en forma de muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares de juveniles o subadultos cada una. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad suficiente de material de muestra puede ser necesario combinar cantidades mayores (como por ejemplo ~150 o más huevos o larvas o 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El análisis del tropismo por los tejidos tanto en camarones infectados experimentalmente como en reproductores salvajes capturados muestra que los tejidos que se originan en el ectodermo y el mesodermo, sobre todo el epitelio cuticular y tejidos conjuntivos subcuticulares, así como otros tejidos diana (como la glándula antenal, el órgano hematopoyético, etc.), son los principales tejidos diana del VSMB. Se recomienda enviar muestras de los pleópodos, las branquias, la hemolinfa, el estómago o el músculo abdominal (Lo *et al.*, 1997).

Para el cribado no destructivo mediante PCR, se recomienda enviar (un pequeño trozo de) branquia, (una pequeña alícuota de) hemolinfa o (un pequeño trozo de) pleópodo. También existen indicios que sugieren que un pedúnculo ocular ablacionado sería una buena alternativa, siempre que el ojo compuesto se extirpe antes del envío.

Consúltase el apartado 4.3.1.2.4.1 para conocer los detalles sobre el procedimiento de la obtención de muestras.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Aunque el VSMB infecta el tejido conjuntivo subyacente del hepatopáncreas y el intestino medio del camarón, las células epiteliales columnares de estos dos órganos son de origen embrionario endodérmico (Lo *et al.*, 1997), y no son tejidos adecuados para la detección. El ojo compuesto puede contener un inhibidor de la PCR (Lo *et al.*, 1997) y, por tanto, no es adecuado para el diagnóstico mediante la PCR.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

El signo clínico más frecuente son unas manchas blancas incluidas en el exoesqueleto. En la mayoría de camarones, estas manchas van de prácticamente invisibles a los 3 mm de diámetro, y a veces confluyen formando grandes placas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que ciertos factores estresantes del ambiente, como una alta alcalinidad, o una enfermedad bacteriana también pueden causar manchas blancas en el caparazón de los camarones, y que los camarones moribundos con EMB en realidad podrían tener pocas manchas blancas, o incluso ninguna. Por tanto, la aparición de manchas blancas no

es en absoluto un buen signo diagnóstico de infección por el VSMB. Además, otros crustáceos, como la mayoría de los cangrejos de río, a menudo pueden resultar infectados por el SMB sin presentar ningún signo de manchas blancas.

En las poblaciones enfermas se observan grandes variaciones de color, en las que predominan los camarones con cambios de color a rojizos o rosados.

4.1.2. Cambios de comportamiento

La presencia de manchas blancas no siempre significa que la enfermedad sea terminal. Así, por ejemplo, en ausencia de estrés, puede haber camarones con manchas blancas que sobrevivan indefinidamente. Sin embargo, si el camarón también está aletargado, si su color pasa a ser rosado o marrón rojizo, si se mueve por los márgenes de los estanques/tanques en la superficie del agua, o si se observa una rápida reducción del consumo de alimento, es esperable una mortalidad muy alta en la población en cuestión de pocas a horas o pocos días tras la aparición de estos signos.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Véanse los apartados 4.1.1 y 4.1.2. anteriores.

4.2.2. Bioquímica clínica

La hemolinfa extraída de camarones infectados por el VSMB siempre presenta un retraso de la coagulación (y a veces una ausencia total).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

4.2.3.1. Preparaciones húmedas

Consisten en la observación de núcleos hipertrofiados en preparaciones realizadas mediante aplastamiento de epitelio de branquias y/o cuticular, que pueden estar teñidas o no.

4.2.3.1.1 Tinción T-E

Puede prepararse una tinción T-E a partir de azul Trypan al 0,6%, Eosina Y al 0,2%, NaCl al 0,5%, fenol al 0,5% y glicerol al 20% (Huang y Yu, 1995), y usarse del siguiente modo:

- i) Depositar un trozo de tejido con lesión (por ejemplo, un trozo de epitelio de branquia o de estómago sin la cutícula) sobre un porta y trocearlo fino con una hoja de bisturí.
- ii) Se añaden 1-2 gotas de la solución de tinción T-E al tejido troceado, se mezcla y se deja teñir durante 3-5 minutos.
- iii) Se deposita un cubreobjetos sobre el tejido teñido y se cubre con varios trozos de papel absorbente. Se utiliza el dedo pulgar para aplastar el tejido troceado hasta obtener una monocapa celular.

Si la muestra se tomó de un camarón intensamente infectado, debería ser fácil observar los núcleos hipertrofiados y los cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos o vacuolados a 400- 1.000 aumentos al microscopio óptico.

4.2.3.2. Frotis

Consisten en la observación de agregados de viriones del VSMB en frotis no teñidos de hemolinfa mediante microscopía de campo oscuro.

NOTA: Esta es la más sencilla de las técnicas de microscopía y se recomienda para personas con poca experiencia en el VSMB. Los agregados son puntos pequeños reflectantes de 0,5 µm de diámetro (Momoyama *et al.*, 1995).

4.2.3.3. Cortes fijados

Permiten la observación histológica de cuerpos de inclusión patognomónicos en los tejidos diana.

4.2.3.4. Hibridación *in situ*

Consiste en la utilización de sondas de ADN específicas del VSMB con cortes histológicos para observar la presencia de ácido nucleico del VSMB en células infectadas.

4.2.3.5. Inmunohistoquímica

Consiste en la utilización de anticuerpos específicos del VSMB con cortes histológicos o preparaciones húmedas para observar la presencia del antígeno VSMB en las células infectadas.

4.2.4. Microscopía electrónica/citopatología

Observación del virus en cortes hísticos o en preparaciones del virus semipurificadas y con tinción negativa (por ejemplo, de hemolinfa). En el apartado 2.1.1 se proporciona información sobre la morfología del virión.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

No se notificado ninguno.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

Véase el apartado 4.2.3 anterior.

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4 anterior.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5 anterior.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3 anterior.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Método del bioanálisis

Si se dispone de camarones SPF, puede llevarse a cabo el siguiente método de bioanálisis, basado en Nunan *et al.* (1998) y Durand *et al.* (2000), que es adecuado para el diagnóstico del VSMB.

- i) Para el bioanálisis, se retiran los pleópodos del camarón sospechoso de estar infectado por el VSMB y se homogeneizan en tampón TN (0,02 mol de Tris/HCl, 0,4 mol de NaCl, a pH 7,4).
- ii) Tras la centrifugación a 1000 *g* durante 10 minutos, se diluye el líquido sobrenadante a 1/10 con NaCl al 2% y se filtra (con un filtro de 0,2 µm de poro).
- iii) Se inyectan 0,2 ml de inóculo en la cara dorso-lateral del cuarto segmento abdominal del camarón indicador (por ejemplo, un ejemplar juvenil SPF de *Penaeus vannamei*), inyectando entre las placas tergaes hacia el interior del músculo del tercer segmento abdominal.
- iv) Se examinan camarones moribundos macroscópicamente o mediante los métodos descritos arriba. Si a los 3-5 días de la inoculación todavía no hay camarones moribundos y todos los resultados de la prueba son negativos, entonces se podrá concluir con seguridad que los resultados del bioanálisis son negativos.

4.3.1.2.2. Cultivo celular/medios artificiales

El VSMB puede aislarse mediante cultivos celulares de células linfoides u ováricas. Sin embargo, NO se recomienda utilizar cultivo celular como medio sistemático de aislamiento por: 1) el alto riesgo de contaminación y, 2) la variación de la composición del medio en función del tipo de tejido, de la especie hospedadora y del objetivo experimental; es decir, hasta ahora no existe o no se conoce ningún medio que pueda recomendarse. Dado que el cultivo celular primario es tan difícil de iniciar y de mantener para fines de aislamiento vírico, el bioanálisis debe ser el medio principal de propagación del virus.

4.3.1.2.3. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

En distintas pruebas inmunológicas, como la inmunoelectrotransferencia, la prueba de transferencia puntual, la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), la inmunohistoquímica (IHC) o el enzoinmunoanálisis (ELISA) utilizados para la detección del VSMB se han utilizado anticuerpos tanto policlonales como monoclonales generados contra el propio virus o bien contra una proteína

estructural vírica recombinante (Huang *et al.*, 1995a; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004). Los métodos basados en anticuerpos pueden ser rápidos, cómodos y aplicables a las condiciones de campo, pero dado que proporcionan solo alrededor de la mitad de la sensibilidad que la PCR simple, solo se recomiendan para la confirmación de la EMB aguda.

4.3.1.2.4. Técnicas moleculares

4.3.1.2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El protocolo de PCR aquí descrito es el de Lo *et al.* 1996a y b, y utiliza métodos de obtención de muestras de Lo *et al.* 1997. Se recomienda para todas las situaciones en las que se requiera el diagnóstico del VSMB. Un resultado positivo en el primer paso de este protocolo estándar significa una infección grave por el VSMB, mientras que obtener un resultado positivo solo en el segundo paso de amplificación, indica una infección latente o con estado de portador. También se han desarrollado PCR alternativas (por ejemplo, la de Numan y Lightner, 2011), pero antes de ser utilizadas deben compararse con el protocolo aquí descrito.

Existen kits comerciales de PCR para el diagnóstico del VSMB y son aceptables siempre que hayan sido validados como adecuados para este fin. Por favor, consúltase el registro de la OIE de kits que han sido certificados por la OIE (http://www.oie.int/vcda/eng/en_vcda_registre.htm).

Extracción de ADN

- i) Se obtienen 100-200 mg de tejido de camarón (pleópodos de camarón vivo en estadio de juvenil a subadulto, postlarvas de 11 mm o más [PL 11 up] con las cabezas eliminadas, o PL10 enteras, o bien se utilizan 10 µl de hemolinfa) y se transfieren a un microtubo de centrifuga de 1,5 ml con 600 µl de solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris/HCl 10 mM, a pH 8, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 25 mM, SLS [N-laurilsarcosinato de sodio] al 0,5% o SDS [dodecil sulfato de sodio] al 2%, y 0,5 mg ml⁻¹ de proteinasa K, que se añade justo antes de la utilización). Para la detección sistemática no destructiva, pueden extirparse pleópodos mediante pinzas al rojo vivo. Para este procedimiento, el animal debe envolverse en una toalla húmeda de modo que solo quede expuesto el órgano que va a extirparse.
- ii) Mediante un palito desechable, se homogeneiza bien el tejido dentro del tubo.
- iii) Tras la homogeneización, se incuba a 65°C durante 1 hora.
- iv) Se añade NaCl 5 M hasta alcanzar una concentración final de 0,7 M. A continuación, se añade lentamente un volumen de 1/10 de solución de bromuro de N-cetil-N,N,N-trimetilamonio (CTAB)/NaCl (CTAB al 10% en NaCl 0,7 M) y se mezcla enérgicamente.

NOTA: Además del método de extracción mediante el CTAB aquí descrito, a menudo se utilizan kits comerciales de extracción como parte normal de las actividades de vigilancia.
- v) Se incuba a 65°C durante 10 minutos y, a continuación, a temperatura ambiente, se añade un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) y se mezcla suavemente. Se centrifuga a 13.000 *g* durante 5 minutos y a continuación se transfiere la solución acuosa (capa superior) a un tubo limpio de 1,5 ml y se añade un volumen igual de fenol.
- vi) Se mezcla suavemente y se centrifuga a 13.000 *g* durante 5 minutos. Se recoge la solución de la capa superior y se repite el proceso de extracción con fenol una o dos veces.
- vii) Se transfiere la capa superior final a un nuevo tubo, se mezcla suavemente con dos volúmenes de cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) y se centrifuga a 13.000 *g* for durante 5 minutos.
- viii) Se transfiere la capa superior a un nuevo tubo y se precipita el ADN añadiendo dos volúmenes de etanol al 95% o absoluto, lo cual va seguido de un reposo en posición vertical a -20°C durante 30 minutos o a -80°C durante 15 minutos.
- ix) Se centrifuga a 13.000 *g* durante 30 minutos y se desecha el etanol. Se lava el sedimento de ADN con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 100 µl de agua bidestilada esterilizada a 65°C durante 15 minutos.
- x) Se utiliza 1 µl de esta solución de ADN para una llevar a cabo una PCR.

Nota: los siguientes procedimientos de PCR anidada están bien establecidos y proporcionan resultados diagnósticos fiables en las condiciones especificadas. Sin embargo, debe tenerse cuidado de asegurar que las muestras de ADN se preparen a partir de los órganos recomendados, y que la temperatura de la PCR se aplique con precisión (en concreto para la hibridación, la temperatura recomendada es de 62°C). Para prevenir la posibilidad de obtener falsos positivos, es importante ceñirse a los procedimientos especificados, en concreto cuando se utilizan para analizar nuevos posibles hospedadores, como *Cherax quadricarinatus* (Claydon

et al., 2004), *Procambarus clarkii* (cangrejo de las marismas) o *Procambarus zonangulus* (cangrejo blanco de río). En caso de haber diagnosticado la presencia de VSMB en un nuevo hospedador o en una zona previamente libre de la enfermedad, para confirmar los resultados positivos debe aplicarse la secuenciación del ADN.

PCR simple

- i) Se añade 1 µl de solución de ADN molde (que contenga unos 0,1–0,3 µg de ADN) a un tubo de PCR que contenga 100 µl de mezcla de reacción (Tris/HCl 10 mM, a pH 8,8, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 al 0,1%, cada una de las dNTP a una concentración 200 µM, 100 pmol de cada cebador, 2 unidades de ADN polimerasa termoestable).
- ii) Las secuencias del cebador externo son 146F1, 5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3' y 146R1, 5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'.
- iii) El perfil de la PCR es un ciclo de 94°C durante 4 minutos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, seguidos de 39 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, y 72°C durante 2 minutos y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El amplicón específico del VSMB obtenido de esta reacción es de 1447 pb. La sensibilidad es de aproximadamente 20.000 copias de un plásmido molde.

Segundo paso de la PCR (anidada)

Este segundo paso es necesario para la detección del VSMB en camarón en estadio de portador.

- i) Se añaden 10 µl del producto del primer paso de la PCR a 90 µl de un cóctel de PCR con la misma composición que antes, excepto porque contiene el segundo par de cebadores (interno): 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3') y 146R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3').
- ii) Se utiliza el mismo protocolo de amplificación mediante PCR que antes. El amplicón específico del VSMB obtenido de esta reacción es de 941 pb. La sensibilidad global de ambos pasos es de unas 20 copias de un plásmido molde del VSMB.
- iii) Para la visualización, se someten a electroforesis 10 µl de los productos de la PCR, sobre geles de agarosa al 1% que contengan bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg ml⁻¹.
- iv) En las reacciones de control destinadas a verificar la calidad del ADN extraído y la integridad de la PCR deben utilizarse cebadores específicos de decápodos (143F 5'-TGC-CTT-ATC-AGCTNT-CGA-TTG-TAG-3' y 145R 5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3' que den un amplicón de 848 pb; N representa G, A, T o C). En el camarón peneido *P. aztecus*, el producto de la PCR generado por este par de cebadores específico de decápodo corresponde a la secuencia de los nucleótidos 352 a 1200 del ARNr 18S. La secuencia de ARN 18S de decápodo se conserva mucho y produce un producto de la PCR de tamaño similar en casi todos los decápodos. En toda prueba deben incluirse un control positivo (molde de ADN del VSMB) y controles negativos (ADN no molde y ADN molde de camarón).

4.3.1.2.4.2 Secuenciación del ADN de los productos de la PCR

Para confirmar la infección en nuevos hospedadores sospechosos, debe secuenciarse el fragmento de ADN amplificado a partir de la PCR anidada, de dos pasos. Los métodos de clonación y secuenciación aquí descritos se basan en Claydon *et al.* (2004).

Nota: Para ahorrar tiempo y dinero, es aceptable secuenciar directamente el amplicón de la PCR. Si se obtiene un resultado positivo, entonces se procede al paso iv, descrito abajo. En el caso de que solo se obtengan banda/s de un tamaño inesperado, la muestra deberá analizarse de nuevo mediante los procedimientos de clonación y secuenciación descritos abajo.

- i) Se separan los fragmentos de ADN, seleccionados para el posterior análisis, de los geles de agarosa, y se purifican mediante cualquiera de los kits comerciales de limpieza para PCR.
- ii) Se ligan los amplicones al plásmido vector y se clona el constructo.
- iii) Se utilizan cebadores adecuados para amplificar el amplicón insertado, y a continuación se somete el producto amplificado a la secuenciación del ADN.
- iv) Se comparan las secuencias obtenidas con las bases de datos disponibles, utilizando la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico (*Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)) para determinar las afiliaciones filogenéticas aproximadas.

4.3.1.2.4.3 Método de la PCR Taqman en tiempo real

El protocolo aquí descrito es el de Durand y Lightner (2002). Este método de detección es muy específico del VSMB, es extremadamente sensible (cuatro copias) y tiene un intervalo dinámico y amplio (siete logaritmos).

Construcción de un vector control positivo y preparación de la curva estándar

El fragmento de ADN de 69 pb amplificado mediante los cebadores directo e inverso (indicados abajo) se clona en *pGEM-T easy* u otros vectores adecuados, y a continuación se confirma mediante secuenciación. El ADN plasmídico se purifica mediante kits comerciales de extracción de plásmidos y la concentración se determina utilizando un espectrofotómetro u otros métodos. El número de copias génicas se determina según la masa molar derivada del ADN plasmídico que contiene el inserto de 69 pb. A continuación, se preparan diluciones decimales seriadas de los ADN plasmídicos para generar curvas estándar que vayan de las 10^2 a las 10^7 copias.

Extracción de ADN

La extracción de ADN debe llevarse a cabo según el protocolo anterior descrito para la PCR (4.3.1.2.4.1) o utilizando un kit comercial. La concentración de ADN purificado se puede determinar mediante espectrofotómetro u otros métodos.

PCR en tiempo real

La prueba TaqMan se lleva a cabo utilizando la mezcla madre universal para PCR de TaqMan, que contiene ADN polimerasa Gold TaqMan, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP y componentes de tampón optimizado (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias de los cebadores son WSS1011F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3', WSS1079R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3', la sonda Taqman es: 5'-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-3'.

- i) Se añade una muestra de 10–50 ng de ADN para obtener una mezcla de reacción de 25 µl que contenga cada cebador a una concentración 0,3 µM y sonda TaqMan a una concentración 0,15 µM.
- ii) El perfil de la PCR es un ciclo de 50°C durante 2 minutos para la uracilo-N-glicosilasa (UNG) AmpErase y 95°C durante 10 minutos para la activación de la AmpliTaq, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.
- iii) Para determinar el número de copias de VSMB de las muestras de ADN extraído, las muestras se someten a PCR paralelamente al estándar de ADN plasmídico sometido a diluciones seriadas. Tras la reacción, el programa que acompaña al sistema de la PCR determina automáticamente el valor Ct para cada muestra analizada por PCR. En base a los valores Ct, el programa calcula la curva estándar para la dilución estándar y determina el número de copias de VSMB de las muestras de ADN extrapolando los valores mediante la curva estándar.

4.3.1.2.4.3 Método de la hibridación in-situ (ISH)

El protocolo aquí descrito se basa en el desarrollado por Nunan y Lightner (1997).

- i) Se fijan camarones moribundos con fijador AFA de Davidson durante 24-48 horas.
- ii) Se incluyen los tejidos en parafina y se realizan cortes de 5 µm de espesor. Se colocan los cortes sobre portas de microscopio cargados positivamente.
- iii) Se calienta el porta sobre una placa caliente, a 65°C durante 30 minutos.
- iv) Se desparafina, se rehidrata y se calienta durante 2-30 minutos (en función del tipo de tejido) con 100 µg/ml de proteinasa K en tampón Tris/NaCl/EDTA (TNE) a 37°C.
- v) Se post-fijan los portas enfriándolos en formaldehído al 0,4% previamente enfriado durante 5 minutos a 4°C, y se lavan en citrato salino estándar 2x (SSC; SSC 1x = NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM, a pH 7,0) a temperatura ambiente.
- vi) Se prehibridan los portas con solución de pre-hibridación (formamida al 50%, Ficoll 400 al 0,2%, polivinilpirrolidona al 0,2%, albúmina de suero bovino al 0,2%, SSC 5x, EDTA 1 mM, Tris/HCl 50 mM, a pH 8) durante 30 minutos a 42°C.
- vii) Se sigue con la hibridación con el amplicón de la PCR específico del VSMB de 1.447 pb (o cualquier otro amplicón específico del VSMB) véase el apartado 4.3.1.2.3.1 PCR simple, arriba) que se ha marcado con digoxigenina. Se recomienda marcar la sonda incorporando DIG-dNTP

mediante el método de la PCR. La concentración óptima deberá calcularse analizando y ajustando hasta que se obtenga una señal específica alta sobre un fondo bajo.

- viii) Para la hibridación, se hierve la sonda durante 10 minutos y se sitúa de inmediato sobre hielo. Se diluye la sonda a 30-50 ng ml⁻¹ en solución de pre-hibridación y se aplican 500 µl a cada porta.
- ix) Se sitúa el porta sobre una placa caliente a 85–95°C durante 6–10 minutos (asegurando que no alcance el punto de ebullición), se depositan los portas sobre hielo durante 5 minutos y a continuación se transfieren a una cámara húmeda y se dejan ahí durante 16-20 horas, a 42°C.
- x) Tras la hibridación, se lavan los portas dos veces durante 15 minutos cada vez con SSC 2x a temperatura ambiente, dos veces durante 5 minutos con SSC 1x a 37°C, y dos veces durante 5 minutos con SSC 0,5x a 37°C.
- xi) Para detectar la hibridación, se lavan los portas con tampón de ácido maleico (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- xii) Los portas se bloquean con solución bloqueante (suero normal de cabra al 2% y Triton X-100 al 0,3% en tampón de ácido maleico) durante 30 minutos a 37°C.
- xiii) Se añaden 250 µl de solución de anticuerpos anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina (AP) (1 µl ml⁻¹ de fragmento anti-DIG/AP-Fab en tampón de ácido maleico que contenga suero normal de cabra al 1% y Triton X-100 al 0,3%) a cada porta, y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- xiv) Se lavan los portas dos veces con tampón de ácido maleico durante 10 minutos cada uno y una vez con tampón de detección (Tris/HCl 100 mM, NaCl 100 mM, a pH 9,5) a temperatura ambiente.
- xv) Se añaden 500 µl de solución de revelado (se prepara inmediatamente antes de ser utilizada, añadiendo 45 µl de solución de sal de NBT [75 mg ml⁻¹ en dimetilformamida al 70%], 35 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, solución de sal de toluidina [del X-fosfato] [50 mg ml⁻¹ en dimetilformamida] y 1 ml de PVA al 10% a 9 ml de tampón de detección) a cada porta y se incuban en condiciones de oscuridad en una cámara húmeda durante 1-3 horas.
- xvi) Se detiene la reacción lavando los portas en tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, a pH 8,0) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los portas en agua destilada durante diez inmersiones, se aplica una tinción de contraste a los portas en Marrón Bismarck Y acuoso al 0,5% durante unos 5 minutos y a continuación se lavan con agua. Se llevan a cabo preparaciones húmedas utilizando medios de montaje acuosos para la observación inmediata, o bien se rehidratan los portas y se montan con medios de montaje para la conservación a largo plazo.
- xvii) Se montan los portas con cubres y se examinan mediante microscopía de campo claro. En caso de hibridación, aparece un precipitado de color azul oscuro a negro que contrasta con la tinción de contraste, que es de un color entre amarillo y marrón.

4.3.1.2.4.4 Método de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

El protocolo aquí descrito es el de Kono *et al.* (2004). El método de la LAMP es sensible y rápido, y amplifica los ácidos nucleicos diana en condiciones isotérmicas, de modo que no precisa medios sofisticados para el ciclado térmico.

Extracción del ADN

La extracción del ADN podría llevarse a cabo según el protocolo anteriormente descrito para la PCR (4.3.1.2.4.1) o con otros métodos adecuados o kits comerciales.

Reacción de la LAMP

- i) Se añade ADN a un tubo para lograr una mezcla de reacción de 25 µl (Tris/HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, MgSO₄ 8 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tween 20 al 0,1%, Betaine 0,8 M, cada una de las dNTP a una concentración 1,4 mM, 40 pmol de los cebadores WSSV-FIP y WSSV -BIP, 5 pmol de los cebadores WSSV -F3 y WSSV -B3).
- ii) Las secuencias de los cebadores son las siguientes: WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
- iii) Se calienta la mezcla a 95°C durante 5 minutos, a continuación se enfría sobre hielo y se añade 1 µl (8 U) de ADN polimerasa de *Bst*.

- iv) Se incuba la mezcla a 65°C durante 60 minutos, y a continuación se detiene la reacción a 80°C durante 10 minutos.
- v) Para la visualización, se someten a electroforesis 2 µl de los productos de la reacción LAMP sobre geles de agarosa al 2% que contengan bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg ml⁻¹. Esta reacción produce productos de LAMP específicos del VSMB con múltiples bandas de distintos tamaños, desde unos 200 pb hasta el pocillo de carga.

Los kits comerciales de LAMP fiables pueden ser una alternativa para el diagnóstico del VSMB.

4.3.1.2.5. Purificación del agente patógeno

- (a) El virión del VSMB puede purificarse según el método descrito anteriormente, con pequeñas modificaciones (Xie *et al.*, 2005). En pocas palabras, se obtienen cinco o seis cangrejos o camarones moribundos (de 20-25 g cada uno) entre 3 días y una semana después de la infección. Se homogeneizan todos los tejidos, excluyendo el hepatopáncreas, durante 2 minutos mediante un homogeneizador mecánico en 1.200 ml de tampón TNE (Tris/HCl 50 mM, NaCl 400 mM, EDTA 5 mM, pH 8,5) que contenga inhibidores de la proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, benzamidina 1 mM y Na₂S₂O₅ 1 mM). Se centrifugan a 3.500 *g* durante 5 minutos. Se extrae el sobrenadante y se vuelve a homogeneizar el sedimento en 1.200 ml de tampón TNE. Se filtran los sobrenadantes puestos en común por un filtro de nylon (malla 400) y se centrifugan a 30.000 *g* durante 30 minutos. Se desecha el sobrenadante y se lava cuidadosamente la capa suelta superior (rosa) del sedimento mediante una pipeta Pasteur. Se vuelve a suspender la capa compacta inferior (gris) en 10 ml de tampón TM (Tris/HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,5). Se ponen en común las suspensiones de virus y se centrifugan a 3.000 *g* durante 5 minutos. Se centrifuga el sobrenadante de nuevo a 30.000 *g* durante 20 minutos. Se retira el sobrenadante y la capa suelta rosa, y se vuelve a suspender el sedimento blanco en 1,2 ml de tampón TM que contenga un NaN₃ al 0,1%. Se transfiere a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se centrifuga la suspensión tres a cinco veces a 650 *g* durante 5 minutos cada vez para eliminar las impurezas rosas. Por último, se almacena la suspensión lechosa de virus puro a 4°C hasta que se utilice.

4.3.2. Métodos serológicos

No se ha desarrollado ninguno.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico del VSMB se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b = el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d = el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	d	d	c	b
MO directa	d	d	c	c	c	c
Histopatología	d	c	c	c	a	c

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
ME de transmisión	d	d	d	d	d	a
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	c	c	a	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	c	c	a	a
PCR	d	b	a	a	a	a
LAMP	d	d	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de enfermedad de las manchas blancas

La PCR de dos pasos y la secuenciación son los métodos recomendados para declarar la ausencia de la enfermedad, solo para juveniles y adultos, y posiblemente PL. Es necesario obtener resultados negativos en la PCR de dos pasos. Cuando un resultado positivo en la PCR de dos pasos no se puede confirmar como VSMB mediante secuenciación, se considerará que es negativo.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Para ejemplares de camarón juveniles y adultos: signos macroscópicos de la EMB (véanse los apartados 4.1.1 y 4.1.2, arriba).

Para ejemplares de camarón de cualquier estadio (larvas a adultos): mortalidad.

Para ejemplares de camarones y de cangrejos de cualquier estadio (larvas a adultos): Núcleos hipertrofiados en preparaciones por aplastamiento de epitelio de branquias y/o cuticular; agregados inusuales en la hemolinfa observados mediante microscopía de campo oscuro; cuerpos de inclusión en cortes histológicos de los tejidos afectados.

7.2. Definición de caso confirmado

Los casos sospechosos deben comprobarse en primer lugar mediante PCR o LAMP. Si en un país/zona/compartimiento previamente libre del VSMB los resultados de la PCR son positivos, deben confirmarse mediante secuenciación. Para confirmar el caso también puede utilizarse la histopatología, las sondas y la microscopía electrónica.

8. Bibliografía

CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary [beta]-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.

CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.

CHANG Y.S., LO C.F., PENG S.E., LIU K.F., WANG C.H. & KOU G.H. (2002). White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 1–10.

- CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F., WANG H.C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85** (24), 12919–12928.
- CHOTIGEATW., TONGSUPAS., SUPAMATAYAK. &PHONGDARAA. (2004).Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp.*Aquaculture*, **233**, 23–30.
- CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cheraxquadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.
- DURAND, S. V. &LIGHTNER, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp.*J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.
- DURAND S.V., TANG K.F.J. &LIGHTNERD.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.
- FLEGELT.W. (1997).Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeusmonodon*) in Thailand.*World J. Microbiol.Biotechnol.*, **13**, 433–442.
- HE J. & ZHOU H. (1996).Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus.*ActaScientiarumNaturaliumUniversitatisSunyatseni*, **38** (2), 65–69.
- HUANG J. & YU J. (1995).A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp.(Chinese J.).*Mar. Fish. Res.*, **16** (1), 31–39.
- HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z.& YANG C.-H.(1995a). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody.(Chinese J.). *Mar. Fish. Res.*, **16** (1), 40–50.
- KONO T., SAVANR., SAKAI M.,&ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimpby loop-mediated isothermal amplification.*J.Virol. Methods*, **115**, 59–65.
- LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K.(2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV).*OceanologiaetLimnologiaSinica*, **33** (3), 250–258.
- LIGHTNERD.V. (1996).A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp.Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R.,FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W. WANG H.C., XUN X., YANG F. &VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*.In:Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., &Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.USA, pp: 229–234.
- LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeusmonodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.
- LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV). detected in cultured and captured shrimp, crab and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.
- LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.
- LO C.F., LEU J.H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. &KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarusclarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.
- MOMOYAMAK., HIRAOKAM., INOUEK., KIMURAT. &NAKANOH. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeusjaponicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBEH., INOUE K. & OSEKON. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.

MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.

NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.

NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.

NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.

POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.

ROBALINO J., BARTLETT T., SHEPARD E., PRIOR S., JARAMILLO G., SCURA E., CHAPMAN R.W., GROSS P.S., BROWDY C.L. & WARR G.W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J. Virol.*, **79**, 13561–13571.

SARATHI M., SIMON M.C., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *Mar. Biotechnol. (NY)*, **10**, 242–249.

SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAVISUTHANGKURAP. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.

SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20** (4), 374–378.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellowhead disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.

STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, **319**, 302–306.

TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999). Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 107–114.

VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., NISHIZAWA T. & MUROG K. (2000). Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 83–89.

VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGAK. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.

VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 364–372.

VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEKHAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.

WITTEVELDT J., CIFUENTES C.C., VLAK J.M. & VAN HULTEN M.C. (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, **78**, 2057–2061.

WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRATANA S., NASH G.L., AKARAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69–77.

XIE X., LI H., XU L. & YANG F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res.*, **108**, 63–67.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.

YOGANANDHANK., SYED MUSTHAQS., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.

*
* *

NB: Existen un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Enfermedad de las manchas blancas (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int)

ENFERMEDAD DE LA COLA BLANCA

1. Ámbito de aplicación

La enfermedad de la cola blanca (ECB), o enfermedad del músculo blanco, es una infección vírica causada por el nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (NVMr) y se asocia al virus muy pequeño (VMP). Pueden causar un aspecto blanquecino lechoso en las larvas/postlarvas (PL)/juveniles tempranos, y son responsables de mortalidades a gran escala en el camarón de agua dulce *M. rosenbergii*.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Los agentes patógenos son dos virus, denominados nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (NVMr) (principal) y virus muy pequeño (VMP) (secundario) (Qian *et al.*, 2003, Romestand y Bonami, 2003). El NVMr es importante en los brotes de ECB de los camarones, aunque todavía no está claro cómo interviene el VMP en la patogenia. Todavía no se conocen cepas. El NVMr pertenece a la familia Nodaviridae (Bonami *et al.*, 20005; Van Regenmortel *et al.*, 2000). El VMP es el primer virus satélite secuenciado en animales y también constituye el primer registro de una asociación satélite-nodavirus (Bonami *et al.*, 20005).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se sabe cuál es la supervivencia fuera del hospedador, pero un inóculo de virus preparado a partir de homogenado de tejido guardado a -20°C causó una mortalidad del 100% en PL de *M. rosenbergii* mediante la exposición por inmersión (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

No se sabe cuál es la estabilidad del agente patógeno. Sin embargo, el tratamiento térmico destruyó la infectividad del NVMr y del VMP en experimentos de exposición (Qian *et al.*, 2003).

2.1.4. Ciclo de vida

No se conoce.

2.2. Factores del hospedador

La ECB es responsable de enormes mortalidades en larvas y PL del camarón de agua dulce, *M. rosenbergii*, en viveros, con posteriores pérdidas económicas para los sistemas de precriadero.

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

El camarón de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879). Hasta ahora no se conoce ningún otro hospedador, ni demostrado ni sospechoso.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Las larvas, las postlarvas y los juveniles tempranos son susceptibles, mientras que los adultos son resistentes y actúan como portadores (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se ha observado mortalidad en camarones subadultos ni adultos infectados experimentalmente (NVMr/VMP). Estudios experimentales han confirmado la transmisión vertical de reproductores infectados a las PL (Sudhakaran *et al.*, 2006a).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Tanto el NVMr como el VMP están confinados al tejido de las branquias, el músculo de la cabeza, el corazón, el músculo abdominal, los ovarios, los pleópodos y el músculo de la cola, pero no al hepatopáncreas ni al pedúnculo ocular (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003). La presencia de ambos virus en tejido ovárico indica la posibilidad de transmisión vertical de la ECB de los reproductores a las larvas y a las PL. En determinados estudios se ha comprobado que los pleópodos serían una fuente cómoda de ARN para las pruebas no destructivas de cribado de NVMr y VMP sin causar estrés a los camarones (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Los estudios de desafío indican una infección persistente a largo plazo en adultos y también la posibilidad de una transmisión de la ECB de los reproductores a las larvas y a las PL (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a).

2.2.6. Vectores

Ciertos camarones peneidos (*Penaeus indicus*, *P. monodon*, *P. japonicus*) (Sudhakaran *et al.*, 2006b), *Artemia* (Sudhakaran *et al.*, 2006c), y ciertos insectos acuáticos (*Belostoma* sp., *Aesohna* sp., *Cybister* sp., y *Notonecta* sp.) son vectores de la ECB (Sudhakaran *et al.*, 2008).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Ninguno conocido.

2.3. Patrón de la enfermedad

Se ha observado una alta prevalencia de la ECB en larvas y PL criadas en viveros, de la especie *M. rosenbergii*. La ECB se puede transmitir vertical y horizontalmente en sistemas de cultivo.

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión puede tener lugar de forma vertical (transovárica) y horizontal mediante el agua (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia puede ir del 10% al 100% en viveros, precriaderos y tanques de engorde, así como en la infección experimental mediante la exposición por inmersión, y se ha observado un 100% de mortalidad 5 a 7 días después de la aparición de los primeros signos macroscópicos en PL en infecciones naturales o experimentales (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; b).

2.3.3. Distribución geográfica

La enfermedad se notificó por primera vez en las Antillas Francesas (Arcier *et al.*, 1999), y después en China (Rep. Pop. de) (Qian *et al.*, 2003), la India (Sahul Hameed *et al.*, 2004b), Taipei (China) (Wang y Chang, 2006), Tailandia (Yoganandhan *et al.*, 2006) y Australia (Owens *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Las larvas, las PL y los juveniles de *M. rosenbergii* son muy susceptibles a la ECB, que a menudo causa altas mortalidades en estos estadios de vida. La mortalidad puede alcanzar un máximo en unos 5 o 6 días tras la aparición de los primeros signos macroscópicos. Muy pocas PL con la ECB sobreviven más de 15 días en un brote, y las PL que lo hacen pueden crecer hasta alcanzar el tamaño comercial como cualquier otra PL normal. Los adultos son resistentes a la ECB, pero actúan como portadores (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.3.5. Factores ambientales

No se conoce mucho sobre los factores ambientales. Sin embargo, como consecuencia de cambios rápidos en la salinidad, la temperatura o el pH pueden producirse brotes de ECB (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003).

2.4. Control y prevención

No se ha llevado a cabo ningún trabajo sobre el control y la prevención de la ECB. Sin embargo, la aplicación de unas medidas preventivas adecuadas, como un cribado de los reproductores y las PL, y de unas buenas prácticas de manejo, pueden contribuir a prevenir la ECB en los sistemas de cultivo. Cuando el ciclo de vida

de *M. rosenbergii* se completa en condiciones controladas, se pueden producir reproductores y PL libres de patógenos específicos (SPF) mediante un cribado, utilizando métodos de diagnóstico sensibles, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Romestand y Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

2.4.1. Vacunación

Todavía no está disponible.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se conocen sustancias químicas que sirvan para tratar la ECB.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de ningún informe sobre la utilización de inmunoestimulantes para el tratamiento de la ECB.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna documentada.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No se dispone de ningún informe sobre la existencia de especies resistentes.

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno conocido.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Existen procedimientos sistemáticos sugeridos para el control de las enfermedades víricas en los crustáceos, como la aplicación de formalina o iodóforos para contribuir a la eliminación de los virus (Chen *et al.*, 1992).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

La infección experimental confirmó la posibilidad de la transmisión tanto horizontal como vertical de la ECB en sistemas de cultivo (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a). Unas buenas prácticas de manejo, como una desinfección adecuada de los depósitos, el agua y los reproductores, y la utilización de reproductores negativos según la RT-PCR en los viveros y en los estanques de engorde puede ser útil para prevenir la ECB en los sistemas de cultivo (Chen *et al.*, 1992; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2008). No hay indicios de que se pueda prevenir la ECB mediante la rotación de cultivos, ni con arroz ni con policultivo con peces. Algunos responsables de piscifactorías se han planteado un cultivo mixto de camarones (*P. monodon*) con *M. rosenbergii* o una rotación de cultivos de estas dos especies como alternativa viable para su sustento y viabilidad económica. Esta situación conlleva la posibilidad de la transmisión de microorganismos patológicamente importantes de hospedadores nativos a no nativos, como observaron Sudhakaran *et al.* (2006b) y Ravi *et al.* (2009) en sus estudios. Según sus resultados, parecería que el cultivo mixto de *M. rosenbergii* con *P. monodon* debe evitarse antes de adoptar cualquier medida preventiva en la gestión de la ECB.

3. Toma de muestras

3.1. Elección de ejemplares

En los camarones de agua dulce, la ECB se diagnostica principalmente por la coloración blanquecina que adquieren el músculo abdominal y el de la cola (Arcier *et al.*, 1999; Romestand y Bonami, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004b). Sin embargo, este signo clínico no es específico de la ECB y el diagnóstico no es fácil, en concreto en las fases más tempranas de la infección. Las PL afectadas por la ECB son más lechosas y opacas. Una vez aparece este signo clínico, suelen morir; las mortalidades varían y pueden llegar a ser del 95%. Los tejidos más afectados en las PL/juveniles tempranos moribundos son la musculatura estriada del abdomen, el cefalotórax y la cola. Las PL con músculo blanquecino son ejemplares adecuados a efectos del diagnóstico (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Se obtienen larvas/PL infectadas con signos llamativos de músculo blanquecino en la parte abdominal en zonas de brotes. Se lavan las muestras con solución salina, se transfieren a tubos estériles, se transportan al laboratorio sobre hielo seco y se almacenan a -70°C hasta que se utilizan (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). Para el aislamiento del virus y la detección mediante RT-PCR o ELISA se pueden utilizar muestras congeladas (Romestand y Bonami, 2003). Se pueden transportar al laboratorio muestras para la detección del virus mediante la RT-PCR una vez fijadas en etanol al 70% (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Se pueden combinar varias larvas o PL infectadas (de 5 a 10) para las pruebas de cribado. Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Lo mejor es disponer del organismo entero de una PL (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). Todos los órganos de *M. rosenbergii* adultos excepto los pedúnculos oculares y el hepatopáncreas son adecuados para la detección del virus mediante RT-PCR. Los pleópodos (apéndices natatorios) serían una fuente cómoda de ARN para las pruebas no destructivas de detección del NVMr y del VMP que se llevan a cabo para evitar causar estrés al reproductor (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los pedúnculos oculares y el hepatopáncreas de los camarones adultos no son adecuados (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003).

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Las PL infectadas se vuelven opacas y desarrollan un aspecto blanquecino, en concreto en la zona abdominal. Este color blanquecino aparece primero en el segundo o tercer segmentos abdominales y progresivamente difunde anterior y posteriormente. En los casos graves, pueden degenerarse el telson y los urópodos. La mortalidad puede alcanzar el máximo unos 5 después de la aparición de los primeros signos macroscópicos.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Las PL son muy susceptibles a la ECB y la mortalidad alcanza el máximo unos 5 días después de que aparezca el color blanquecino. Las exuvias flotantes (cutículas mudadas) de los depósitos tienen un aspecto anómalo y parecen “copos de mica” (Arcier *et al.*, 1999). Las PL infectadas presentan una debilitación progresiva de su capacidad de alimentarse y nadar (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La ECB de *M. rosenbergii*, causada por una infección con el NVMr y el VMP, se diagnostica principalmente por el color blanquecino del músculo abdominal. Sin embargo, este signo clínico no es específico de la ECB, aunque va asociado a mortalidades altas.

4.2.2. Bioquímica clínica

Los días 3 y 5 post-inyección (p.i.) la actividad de la profenol oxidasa aumentó significativamente en camarones a los que se había inyectado NVMr y VMP, y volvió a la normalidad desde el día 10 p.i. en adelante. Se observó un aumento significativo de la concentración del anión superóxido los días 3, 5 y 10 p.i., mientras que la actividad de la superóxido dismutasa disminuyó de forma significativa hasta el día 10 p.i. y volvió a la normalidad después del día 15 p.i. El recuento total de hemocitos disminuyó significativamente en camarones a los que se había inyectado NVMr y VMP el día 1 y 3 p.i. y no hubo cambios significativos en el nivel de la hemocianina de camarones normales ni de camarones a los que se había inyectado NVMr y VMP (Ravi *et al.*, 2010).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

El tejido más afectado de las PL infectadas es el músculo estriado del cefalotórax, el abdomen y la cola. En la histología se observa la presencia de una necrosis de Zenker aguda de los músculos estriados, que se caracteriza por una degeneración hialina intensa, necrosis y lisis muscular. También se observa un edema moderado y espacios abiertos anómalos entre las células del músculo afectado, así como la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos basófilos ovales o irregulares en los músculos infectados (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006). Se han observado cuerpos de inclusión citoplasmáticos basófilos ovales o irregulares patognomónicos en los tejidos diana mediante histología (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

La presencia del NVMr en células infectadas puede observarse en cortes histológicos utilizando una sonda de hibridación *in-situ* de ADN marcado con DIG específica del NVMr (Sri Widada *et al.*, 2003).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Ninguna hasta ahora.

4.2.5. Frotis

Ninguno hasta ahora.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Mediante la microscopía electrónica de transmisión (MET), puede observarse el aspecto necrótico de las células infectadas, que presentan un citoplasma desorganizado. Los estudios con MET ponen de manifiesto la presencia de dos tipos de partículas víricas para-esféricas sin envoltura de distintos tamaños dentro del citoplasma de las células del tejido conjuntivo y las células musculares. Las partículas víricas grandes tienen cinco a seis lados, y un diámetro de 26-27 nm, y serían características del NVMr. Las partículas víricas más pequeñas tienen una estructura similar (con cinco a seis caras), pero el diámetro es de 14-16 nm, y serían características del VMP (Qian *et al.*, 2003).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

Existen métodos diagnósticos basados en el genoma y en anticuerpos para detectar el NVMr/VMP (Romestand y Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Ninguna hasta ahora.

4.3.1.1.2. Frotis

Ninguno hasta ahora.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Los virus NVMr/VMP pueden propagarse fácilmente en la línea celular C6/36 de mosquito *Aedes albopictus* (Sudhakaran *et al.*, 2007a) y esta línea celular se puede cultivar fácilmente en medio Leibovitz L-15 que contenga 100 unidades internacionales de penicilina/ml, 100 µg/ml de estreptomycin y 2,5 µg/ml de fungizona suplementada con un 10% de suero bovino fetal a 28°C (Sudhakaran *et al.*, 2007a). Otras líneas celulares, denominadas línea celular SSN-1 de pez, sustentan parcialmente la multiplicación de estos virus (Hernandez-Herrera *et al.*, 2007).

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Los métodos diagnósticos basados en anticuerpos para la detección del NVMr son el ELISA descrito por Romestand y Bonami (Ravi *et al.*, 2009) o el ELISA en sándwich de triple anticuerpo (TAS-ELISA) basado en un anticuerpo monoclonal Qian *et al.*, 2006).

4.3.1.2.2.1. Protocolo del ELISA (Romestand y Bonami, 2003)

- i) Se homogeneizan muestras de PL infectadas o sanas en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifuga a 10.000 *g* durante 15 minutos. Se recoge y guarda el sobrenadante a -20°C para fines de diagnóstico.
- ii) Se cubren placas de ELISA con 50 µl por pocillo de sobrenadante de la muestra y se incuban durante toda la noche a 4°C.
- iii) Se bloquea con 250 µl de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 1 hora a 37°C.
- iv) Se añaden 50 µl de IgG anti-NVMr con BSA al 1% y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.
- v) Se añaden 50 µl de una anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa a razón de 0,4 µg ml⁻¹ y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- vi) Se añaden 50 µl del cromógeno ortofenildiamina a razón de 0,4 mg ml⁻¹ en tampón sustrato (ácido cítrico 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, a pH 5,4, H₂O₂ a una concentración final del 0,33%).
- vii) Se detiene la reacción después de 15 minutos añadiendo 25 µl de H₂SO₄ a cada pocillo.
- viii) Se mide la OD (densidad óptica) a 492 nm con un lector de placa de ELISA.

NOTA: entre cada uno de los pasos descritos anteriormente deben realizarse dos lavados con PBS.

4.3.1.2.2.2. Protocolo del TAS-ELISA (Qian et al., 2006)

- i) Se recubren las placas de ELISA con anticuerpo policlonal de conejo generado contra el NVMr y se incuban durante 2 horas a 37°C y se guardan a 4°C hasta su utilización.
- ii) Se bloquean con 250 µl de BSA en PBS durante 1 hora a 37°C.
- iii) Se homogeneizan muestras de PL infectadas o sanas en 0,5 ml de PBS y se centrifuga a 10.000 *g* durante 15 minutos. Se recoge y se guarda el sobrenadante a -20°C con fines de diagnóstico.
- iv) Se añaden 100 µl de muestra a cada pocillo y se incuban durante toda la noche a 4°C.
- v) Se añaden 50 µl de un anticuerpo monoclonal generado contra el NVMr con BSA al 1% y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente.
- vi) Se añaden 50 µl de una anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa a razón de 0,4 µg ml⁻¹ y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- vii) Se añaden 50 µl del cromógeno ortofenildiamina a razón de 0,4 mg ml⁻¹ en tampón sustrato (ácido cítrico 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, a pH 5,4, H₂O₂ a una concentración final del 0,33%).
- viii) Se detiene la reacción después de 15 minutos añadiendo 25 µl de H₂SO₄ a cada pocillo.
- ix) Se mide la OD a 492 nm con un lector de placa de ELISA.

NOTA: entre cada uno de los pasos descritos anteriormente deben realizarse dos lavados con PBS.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

El protocolo desarrollado por Sri Widada *et al.* (2003) y Sahul Hameed *et al.* (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b) de la RT-PCR para la detección del NVMr/VMP se recomienda para todas las situaciones. El NVMr y el VMP pueden detectarse mediante RT-PCR independientemente utilizando un conjunto específico de cebadores, o bien simultáneamente utilizando una RT-PCR múltiple simple y de un solo tubo (Yoganandhan *et al.*, 2005). También existe una RT-PCR (nRT-PCR) anidada que se recomienda para el cribado de cebadores y semillas (Sudhakaran *et al.*, 2006a).

Extracción de ARN total

- i) Se obtienen 50 mg de PL o 100 mg de un trozo de órgano (tejido de branquia, músculo abdominal, músculo de la cola o pleópodos) de camarones adultos y se homogeneizan en 300 µl de tampón TN (Tris/HCl 20 mM, NaCl 0,4 M, a pH 7,4).

- ii) Se centrifuga el homogenado a 12.000 **g** durante 15 minutos a temperatura ambiente y se recoge el sobrenadante.
- iii) Se toman 150 µl del sobrenadante y se añade 1 ml de TRIzol. Se mezcla enérgicamente y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- iv) Pasados 5 minutos, se añaden 200 µl de cloroformo a la muestra, se mezcla bien y se centrifuga a 12.000 **g** durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- v) Se recoge la fase acuosa y se transfiere a un tubo limpio, y se precipita el ARN mezclando con 500 µl de isopropanol.
- vi) Se incuba la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12.000 **g** durante 10 minutos a 4 °C.
- vii) Se disuelve el sedimento de ARN en 50 µl de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 1 mM, a pH 7,5) después de un lavado con alcohol etílico al 75%.
- viii) Se cuantifica el ARN midiendo la absorbancia a 260 nm mediante un espectrofotómetro UV y se comprueba la pureza midiendo el cociente de OD_{260nm}/OD_{280nm} .

Protocolo de la RT-PCR

Se describen tres métodos de RT-PCR para detectar el *NVMr* y el *VMP*. El primer protocolo es una RT-PCR simple adaptada de Sri Widada *et al.* (2003) y Sahul Hameed *et al.* (2004b), y este método se puede utilizar para confirmar el *NVMr* y el *VMP* en PL de camarones obtenidos de brotes sospechosos de ECB. El segundo protocolo es una nRT-PCR sensible descrita por Sudhakaran *et al.* (2006a). Esta prueba puede utilizarse para la detección sistemática de los virus en PL, juveniles y reproductores sanos. El tercer protocolo es una RT-PCR múltiple adaptada de Yoganandhan *et al.* (2005), que puede utilizarse para la detección simultánea del *NVMr* y el *VMP* en brotes de enfermedad o para el cribado de semillas y reproductores. En todos los protocolos aquí descritos, se utiliza una preparación comercial de RT-PCR que permite la transcripción inversa y la amplificación en un solo tubo de reacción.

Protocolo 1: RT-PCR para la detección específica del *NVMr* o el *VMP* en PL o juveniles de camarón infectados (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2007b):

Los siguientes controles deben incluirse siempre que se lleve a cabo una RT-PCR para la detección del *NVMr* o el *VMP*: a) una muestra de tejido que se sepa que es negativa a *NVMr/VMP*; b) una muestra que se sepa que es positiva a *NVMr/VMP* (tejido o virus purificado); c) un control “sin molde”.

Para la RT-PCR, se utiliza una preparación comercial de RT-PCR. La reacción se lleva a cabo en 50 µl de tampón de RT-PCR que contenga 20 pmol de cada cebador específico del *NVMr* o del *VMP* y ARN molde (10-100 ng), utilizando los siguiente ciclos: RT a 52°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, hibridación a 55°C durante 40 segundos y elongación a 68°C durante 1 minutos, terminando con un paso adicional de elongación durante 10 minutos a 68°C. Se analizan los productos de la RT-PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y con la ayuda de un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se detectan mediante un transiluminador ultravioleta.

La reacción positiva vendrá indicada por un producto de 425 pb en el caso del *NVMr* y de 546 pb en el caso de *VMP*. La sensibilidad de la prueba es de unos 2,5 fg de ARN total.

Las secuencias de los cebadores de la PCR para el *NVMr* (temperatura de hibridación de 55°C; tamaño del producto de 425 pb) son:

Directo: 5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'
Inverso: 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'

Las secuencias de los cebadores de la PCR para el *VMP* (temperatura de hibridación de 55°C; tamaño del producto de 546 pb) son:

Directo: 5'-CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA-3'
Inverso: 5'-CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA-3'

Protocolo 2: la nRT-PCR es más sensible y útil para el cribado de semillas y reproductores (Sudhakaran *et al.*, 2006a):

Para la nRT-PCR, el primer paso de la RT-PCR, que se describe en el protocolo 1, debe llevarse a cabo con cebadores externos y la nPCR debe realizarse utilizando un producto de la RT-PCR como molde. Para la nRT-PCR se añaden 2 ml del producto de la RT-PCR a un tubo de PCR que contenga 20 µl de la mezcla de reacción (Tris/HCl 10 mM, a pH 8,8, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 al 0,1%, cada una de las dNTP a una concentración 200 µM, 20 pmol de cada cebador interno, 1,25 unidades de ADN polimerasa termoestable). El protocolo de la nRT-PCR para ambos virus consiste en un ciclo inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C con una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se analizan los productos de la nRT-PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y con la ayuda de un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se detectan mediante un transiluminador ultravioleta.

Si la carga vírica es suficientemente alta, se amplificará un fragmento de ADN de 425 pb en el caso del NVMr, y de 546 pb en el caso de VMP en el primer paso de la PCR. En el paso de la nPCR, un producto de 205 pb indica la detección de NVMr y un producto de 236 pb indica la detección de VMP. La sensibilidad de la detección de la nRT-PCR es ~1000 veces superior a la de la RT-PCR simple.

A continuación se muestran las secuencias de los cebadores para el NVMr y el VMP del protocolo 1 y las secuencias de los cebadores internos:

Las secuencias de los cebadores internos para el NVMr (temperatura de hibridación de 55°C; tamaño del producto de 205 pb) son:

Directo: 5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3'
Inverso: 5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'

Las secuencias de los cebadores internos para el NVMr (temperatura de hibridación de 55°C; tamaño del producto de 236 pb) son:

Directo: 5'-ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA-3'
Inverso: 5'-GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3'

Protocolo 3: RT-PCR múltiple para la detección simultánea del NVMr y el VMP (Yoganandhan *et al.*, 2005).

Para evitar la necesidad de llevar a cabo dos reacciones RT-PCR separadas, puede aplicarse un método modificado para la detección simultánea del NVMr y el VMP en una RT-PCR múltiple simple y en un solo tubo. Esta reacción se lleva a cabo en 50 µl de tampón de RT-PCR que contenga 20 pmol de cada cebador específico del NVMr y del VMP, y ARN molde (10-100 ng), utilizando los siguientes ciclos: RT a 52°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, hibridación a 55°C durante 40 segundos y elongación a 68°C durante 1 minutos, terminando con un paso adicional de elongación durante 10 minutos a 68°C. Se analizan los productos de la RT-PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y con la ayuda de un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se detectan mediante un transiluminador ultravioleta.

Si en la muestra hay NVMr y VMP, se amplificará un fragmento de ADN de 681 pb en el caso del NVMr, y de 500 pb en el caso del VMP. La presencia de productos tanto de 681 pb como de 500 pb indica la presencia de ambos virus, NVMr y VMP. La sensibilidad de detección de la RT-PCR múltiple es de unos 25 fg de ARN total.

Secuencias de los cebadores de la PCR para el NVMr (temperatura de hibridación de 55°C; tamaño del producto de 681 pb):

Directo: 5'-GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C-3'
Inverso: 5'-GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC-3'

Secuencias de los cebadores de la PCR para el VMP (temperatura de hibridación de 55°C; tamaño del producto de 500 pb):

Directo: 5'-GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G-3'
Inverso: 5'-CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C-3'

Protocolo 4: RT-PCR cuantitativa

La RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR) puede llevarse a cabo para cuantificar el *NVMr/VMP* presente en muestras infectadas, utilizando el colorante verde SYBR según el método descrito por Hernández-Herrera *et al.* (2007) y Zhang *et al.* (2006).

- i) Se extrae ARN total de las muestras según el procedimiento explicado anteriormente.
- ii) Se incuban las muestras de ARN a 37°C durante 1 hora en una mezcla de RT (150 ng de ARN total, 8 U μl^{-1} de transcriptasa inversa de VLM-M [virus de la leucemia murina de Moloney] en tampón, 20 ng μl^{-1} de hexacebadores y dNTP 0,2 mM) para obtener ADNc total y cuantificar la cantidad de ADNc midiendo la absorbancia a 260 nm.
- iii) Se lleva a cabo la RT-qPCR utilizando una mezcla de q-PCR (1 μl de ADNc [10 ng], 6 μl de agua estéril, 0,5 μl de cada cebador específico del *NVMr* y del VMP [a una concentración 25 μM] y 2 μl de mezcla de reacción que contenga polimerasa Fast Start *Taq*, mezcla dNTP, colorante verde SYBR, MgCl_2 10 mM y 1 μl de solución colorante.
- iv) El programa de la PCR consiste en una activación inicial de la polimerasa *Taq* durante 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 5 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. Se medirán las temperaturas de fusión volviendo a 70°C durante 30 segundos y calentando progresivamente hasta 95°C en 10 minutos. Las reacciones control negativas deben contener agua en lugar de ADNc molde en cada realización para garantizar la ausencia de virus.
- v) El número de copias de ADNc vírico de la muestra se determinará utilizando el método de fijación de punto mediante el software Light Cycler

Secuencias de los cebadores de la PCR para el *NVMr* (temperatura de hibridación de 60°C; tamaño del producto de 211 pb):

Directo: 5'-AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG-3'
Inverso: 5'-CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G-3'

Secuencias de los cebadores de la PCR para el VMP (temperatura de hibridación de 58°C; tamaño del producto de 68 pb):

Directo: 5'-AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA-3'
Inverso: 5'-CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG-3'

4.3.1.2.3.2. Método de la hibridación in-situ (Sri Widada *et al.*, 2003; Zsikla *et al.*, 2004)

- i) Se fijan PL infectadas en fijador de Davidson tamponado neutro modificado sin ácido acético (fijador compatible con ARN) (Hasson *et al.*, 1997).
- ii) Se fijan los tejidos en parafina según los procedimientos estándar (Bell y Lightner, 1988) y se realizan cortes de 7 μm de espesor. Se depositan los cortes sobre portas de microscopio cargados positivamente.
- iii) Se secan los portas en un horno a 60°C. Se retira la parafina y se rehidratan mediante una serie progresiva de diluciones de etanol en agua.
- iv) Se incuban los cortes dos veces durante 5 minutos con Tris/HCl (0.2 M, pH 7.4) tratado con dietilpírocarbonato (DEPC) y 10 minutos con Tris/HCl tratado con DEPC que contenga glicina 100 mM.
- v) Se tratan los cortes durante 5 minutos a 37°C con tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 5 mM, a pH 8,0) que contenga 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de proteinasa K libre de ARNasa.
- vi) Se post-fijan los cortes con PBS tratada con DEPC que contenga formaldehído al 4% durante 5 minutos.
- vii) Los cortes se acetilan durante 10 minutos con tampón trietanolamina (TEA) 0,1M, a pH 8, que contenga anhídrido acético al 0,25% (v/v).
- viii) Tras la rehidratación, se incuban los portas a 42°C durante 16 horas en una cámara húmeda con tampón de hibridación que contenga formamida desionizada al 40%, sulfato de dextrano al 10%, solución de Denhart 1x, SSC (citratado salino estándar) 4x, ditiotriol (DTT) 10 mM, 1 mg ml^{-1} de ARNt de levadura, 1 mg ml^{-1} de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sheared y 40 ng ml^{-1} de sonda desnaturalizada de ADN marcada con digoxigenina específica del *NVMr*.
- ix) Se lavan los portas a 37°C durante 10 minutos con 1 x SSC, durante 10 minutos con SSC 0,5x y durante 5 minutos dos veces con tampón III (Tris/HCl 100 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM).

- x) Se incuban durante 20 minutos en tampón IV (tampón III con un 1% de suero normal de cabra) a temperatura ambiente.
- xi) Se incuban los portas durante 1 hora en una cámara húmeda con tampón III que contenga un 1% de suero normal de cabra y un 1% de fosfatasa alcalina conjugada a un anticuerpo de oveja anti-DIG.
- xii) Se lavan los portas sucesivamente durante 10 minutos tres veces con tampón III y durante 5 minutos dos veces con tampón V (Tris/HCl 100 mM [a pH 9,5], NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM).
- xiii) Se revela la reacción incubando los portas en tampón V que contenga BCIP en una cámara oscura y húmeda durante un mínimo de 2 horas o durante toda la noche. Se detiene la reacción incubando los portas en tampón III 2x durante 15 minutos.
- xiv) Se aplica una tinción de contraste a los portas con Marrón Bismarck al 1%, se cubren con un cubreobjetos y se examinan mediante un microscopio de campo claro.
- xv) En caso de hibridación aparece un precipitado de color entre azul negro y negro sobre la tinción de contraste, que es de un color entre amarillo y marrón.

4.3.1.2.3.3. *Amplificación isotérmica mediada por bucle* (Haridas et al., 2010; Pillai et al., 2006; Puthawibool et al., 2010)

Haridas et al. (2010) y Pillai et al. (2006) han aplicado la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para un diagnóstico rápido del NVMr y del VMP en el camarón de agua dulce. Se ha diseñado un conjunto de cuatro cebadores de forma independiente, dos externos y dos internos, para la detección del NVMr y del VMP. Además, se ha utilizado un par de cebadores de bucle específicos del NVMr y del VMP para acelerar la reacción de la LAMP.

- i) Se extrae ARN total de las muestras mediante el procedimiento mencionado anteriormente.
- iii) Se lleva a cabo la reacción de la RT-LAMP en la mezcla de reacción (cada uno de los cebadores internos, FIP y BIP, a una concentración 2 µM, cada uno de los cebadores externos, F3 y B3, a una concentración 0,2 µM, la mezcla de dNTP 1400 µM, betaína 0,6 M, MgSO₄ 6 mM, 8 U de Bst ADN polimerasa junto con 1× el tampón suministrado, 0,125 U de transcriptasa inversa del VMA [virus de la mieloblastosis aviar] y la cantidad especificada de ARN molde en un volumen final de 25 µl) a 55, 60, 63 y 65°C durante 1 a cada temperatura, seguida de una inactivación térmica a 80°C durante 2 minutos para terminar la reacción. Las muestras no infectadas y la mezcla de reacción sin molde sirven de controles negativos.
- iii) Se analizan los productos de la LAMP mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y con la ayuda de un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se detectan mediante un transiluminador ultravioleta.
- iv) Sin utilizar la electroforesis en gel de agarosa, se puede detectar el ADN amplificado añadiendo 1,0 µl de verde SYBR diluido al 10% a la mezcla de reacción y observando el cambio de color.

4.3.1.2.3.4. *Secuenciación*

Para confirmar nuevos hospedadores de NVMr/VMP sospechosos, debe secuenciarse el fragmento de ADN amplificado mediante la PCR, según los protocolos estándar (Sambrook y Russell, 2001).

4.3.1.2.4. *Purificación del agente patógeno*

El NVMr y el VMP se pueden purificar según el protocolo descrito por Bonami et al. (2005). A continuación se describe dicho procedimiento en detalle:

- i) Se obtiene una cantidad suficiente de PL infectadas y se homogeneizan en tampón PBS (a pH 7,4) utilizando una mezcladora de tejido.
- ii) Se centrifuga a 10.000 **g** durante 25 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se centrifuga de nuevo a 160.000 **g** durante 4 horas a 4°C.
- iii) Se suspende el sedimento en PBS y se extrae dos o tres veces con freón (1,1,2-tricloro-2,2,1-trifluoroetano).
- iv) Se recoge la capa acuosa y se centrifuga a 160.000 **g** durante 4 horas a 4°C.
- v) Se suspende el sedimento en tampón TN y se separan los dos virus con un gradiente de sacarosa al 15-30% (p/v en PBS), seguido de un gradiente de CsCl.

- vi) Se examina la pureza de los virus mediante MET utilizando rejillas recubiertas de colodión-carbono, y con una tinción negativa con PTA (ácido fosfotúngstico) al 2%, a pH 7,0.

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno desarrollado.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la ECB se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza rutinaria y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	c	c	d	c	d
Bioanálisis	d	c	d	d	c	c
MO directa	d	c	c	d	c	c
Histopatología	d	c	c	c	b	b
ME de transmisión	d	d	d	d	d	a
Pruebas basadas en anticuerpos	d	c	d	d	b	b
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	c	b	b	c	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Secuenciación	d	d	d	a	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de enfermedad de la cola blanca

El método de vigilancia dirigida para declarar la ausencia de ECB es la nRT-PCR.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La aparición de un aspecto blanquecino en el músculo, asociado a mortalidad es un caso sospechoso de ECB. Normalmente afecta a los estadios de larva, PL y juveniles de *M. rosenbergii* y puede cursar con un cese de la alimentación, una reducción de la actividad natatoria y un color blanquecino en los músculos abdominal y de la cola. La mortalidad alcanza un máximo de hasta un 95% a los 5 días de la aparición del color blanquecino. Los criterios de diagnóstico confirmativo se resumen en el apartado 4.2 anterior

7.2. Definición de caso confirmado

Los casos sospechosos deben comprobarse inicialmente mediante RT-PCR y confirmarse después mediante nRT-PCR, secuenciación, MET y sondas de ADN.

8. Bibliografía

- ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 1–114.
- BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of monodon baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fults W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, pp 177–184.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR C., NAIR M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probe. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
- HSIEH C.Y., WU Z.B., TUNG M.C., TU C., LO S.P., CHANG T.C., CHANG C.D., CHEN S.C., HSIEH Y.C. & TSAI S.S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671.
- OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.
- PILLAI D., BONAMI J.-R. & SRI WIDADA J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **29**, 275–283.
- PUTHAWIBOOL T., SENAPIN S., FLEGEL T.W. & KIATPATHOMCHAI W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Molecular Cellular Probes*, **24**, 244–249.
- QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.
- QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W., LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.
- RAVI M., NAZEERBASHA A., SARATHI M., ROSA IDALIA H.H., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by MrNV and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, **292**, 117–120.
- RAVI M., NAZEERBASHA A., TAJU G., RAM KUMAR R. & SAHUL HAMEED A.S. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 428–433.
- ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus like-particles in *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.

- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* in India. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
- SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). Chapter 12 DNA Sequencing. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Editions. ColdSpringHarbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, P 12.1–12.120.
- SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNACQIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.
- SUDHAKARAN R., HARIBABU P., RAJESH KUMAR S., SARATHI M., ISHAQ AHMED V.P., VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145.
- SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2006a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **29**, 1–9.
- SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* Noda virus (MrNV) and extra small virus (XSV) in C6/36 cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006b). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., RAJESH KUMAR S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b). Cloning and sequencing of capsid protein of Indian isolate of extra small virus from *Macrobrachium rosenbergii*. *Virus Res.*, **131**, 283–287.
- SUDHAKARAN R., YOGANANDHAN K., ISHAQ AHMED V.P. & SAHUL HAMEED A.S. (2006c). *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 155–160.
- VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M., MANILOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA.
- WANG C.S. & CHANG J.S. (2006). RT-PCR amplification and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) associated with white tail disease of *M. rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan. GenBank direct submission.
- YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAN M., SRIWONGPUK S. & LIMSUNWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.
- YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 1–5.
- ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.
- ZSIKLA V., BAUMANN M. & CATHOMAS G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.*, **57**, 54–656.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Enfermedad de la cola blanca (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).