

CAPÍTULO 2.2.3.

MIONECRISIS 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 linfoide (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 transovárico 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 5x #N808-0178):

Reactivo	25 µl de mezcla de reacción	Concentración final
H ₂ O DD	6,5 µl	–
Tampón 5x EZ	5,0 µl	1 x
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-carboxirodamina (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 (2x), 0,625 µl de mezcla Multiscribe (40x), 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*, Fuks 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).