

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 ovoides 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.

Consúltese 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 μ m 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 enzimoimmunoanálisis (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, consúltese 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-indoil 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., INOUYEK., KIMURAT. &NAKANOH. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeusjaponicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.

MOMOYAMAK., HIRAOKAM., 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., PANTOJAC 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., NONAKAL., 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., NONAKAL., 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.

VIJAYANK 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., 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)