

## 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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 dese 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<sup>-1</sup> y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- vi) Se añaden 50 µl del cromógeno ortofenildiamina a razón de 0,4 mg ml<sup>-1</sup> en tampón sustrato (ácido cítrico 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, a pH 5,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final del 0,33%).
- vii) Se detiene la reacción después de 15 minutos añadiendo 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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<sup>-1</sup> y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
- vii) Se añaden 50 µl del cromógeno ortofenildiamina a razón de 0,4 mg ml<sup>-1</sup> en tampón sustrato (ácido cítrico 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, a pH 5,4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración final del 0,33%).
- viii) Se detiene la reacción después de 15 minutos añadiendo 25 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>.

*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, MgCl<sub>2</sub> 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 ml 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 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.

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  $\mu\text{l}^{-1}$  de transcriptasa inversa de VLM-M [virus de la leucemia murina de Moloney] en tampón, 20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  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  $\mu\text{l}$  de ADNc [10 ng], 6  $\mu\text{l}$  de agua estéril, 0,5  $\mu\text{l}$  de cada cebador específico del *NVMr* y del VMP [a una concentración 25  $\mu\text{M}$ ] y 2  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción que contenga polimerasa Fast Start *Taq*, mezcla dNTP, colorante verde SYBR,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y 1  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{m}$  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 rehidratán 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 dietilpicrocarbonato (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 (citrate salino estándar) 4x, ditioneol (DTT) 10 mM, 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  de ARNt de levadura, 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y sheared y 40 ng  $\text{ml}^{-1}$  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, MgCl<sub>2</sub> 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, MgSO<sub>4</sub> 6 mM, 8 U de Bst ADN polimerasa junto con 1x 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 separaran 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, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, pp 177–184.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR C., NAIR M. & SHERIEFP.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., CHENS.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. & LIMSUWAN 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](http://www.oie.int)).