

CAPÍTULO 2.2.9.

BACULOVIRIOSIS ESFÉRICA

(Baculovirus de *Penaeus monodon*)

1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la baculovirus esférica se considera una infección por el baculovirus de *Penaeus monodon* (BVM). Sinónimos: el BVM de *P. monodon* se ha designado también como PmSNPV (que significa virus de la poliedrosis nuclear de envoltura única que afecta a *P. monodon*), de acuerdo con las directrices sobre nomenclatura de los virus publicadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (Murphy *et al.* 1995), y aparece como la especie provisional de NPV de *P. monodon*, o PemoNPV (en español, NPVPemo), en los Informes 7ª y 8ª del ICTV (Fauquet *et al.*, 2005; Van Regenmortel *et al.*, 2000). Aunque puede que NPVPemo sea el nombre más correcto para el virus, para designar este virus en el presente *Manual Acuático* en la mayoría de los casos se utilizará el término baculovirus de *P. monodon* (BVM).

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores relacionados con el agente**

2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

Agente patógeno: baculovirus de *P. monodon* (BVM), según describen Lightner & Redman (1981), Lightner *et al.* (1983), Mari *et al.* (1993).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus incluye el BVM (baculovirus esférico) como especie provisionalmente denominada NPVPemo en el género Nucleopolyherdovirus (Fauquet *et al.*, 2005).

Cepas del agente patógeno: teniendo en cuenta la amplia distribución geográfica y la amplia gama de especies hospedadoras del BVM, es probable que existan diferentes cepas. Recientemente, se ha hallado que las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) diseñadas para las cepas procedentes del este y sureste de Asia producen falsos negativos en *P. monodon* de África infectados por el BVM (Lightner, datos no publicados), lo cual sugiere una vez más que existe más de una cepa del BVM (o de la especie NPVPemo).

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

No se dispone de datos.

2.1.3. **Estabilidad del agente patógeno (métodos eficaces de inactivación)**

No se dispone de datos.

2.1.4. **Ciclo de vida**

No aplicable.

2.2. **Factores relacionados con el hospedador**

2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

Se han notificado infecciones por el BVM en una o más especies de los siguientes géneros o subgéneros de peneidos (estos últimos se indican entre paréntesis): *Penaeus* (*Penaeus*), *Penaeus* (*Metapenaeus*), *Penaeus* (*Fenneropenaeus*) y *Penaeus* (*Melicertus*) (Dobrovsky *et al.*, 1988; Hao *et al.*, 1999; Lester *et al.*, 1987; Lightner, 1996; Lightner & Redman 1981; Spann & Lester 1996). La exposición experimental por agua y por vía oral de postlarvas (PL) de 1 día de vida de langostino japonés, *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus*, al BVM no produjo infecciones detectables (Fukuda *et al.*, 1988). De igual forma, a pesar del cultivo simultáneo de *P. monodon* infectado por el BVM en varias piscifactorías del hemisferio occidental, y la consecuente exposición directa de ciertos peneidos del hemisferio occidental (es decir, concretamente *Penaeus vannamei*, *P. stylirostris* y *P. californiensis*) al BVM, el virus no causó infecciones en estas especies, ni se ha establecido en

las piscifactorías de camarones ni en poblaciones naturales de las zonas expuestas (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

2.2.2. Estadios susceptibles de la vida del hospedador

Los estadios susceptibles de la vida del hospedador a la infección por el BVM son todos, excepto los huevos y las larvas nauplias.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El BVM es estrictamente entérico e infecta a las células epiteliales de las mucosas de los túbulos del hepatopáncreas y del intestino medio anterior (Anderson *et al.*, 1987; Brock & Lightner 1990; Couch, 1991; Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

En hospedadores peneidos del BVM es frecuente la infección persistente. Se ha observado que las hembras adultas salvajes de *P. monodon* que están intensamente infectadas por el BVM excretan heces contaminadas por el BVM cuando desovan, contaminando así los huevos y transmitiendo el virus a la siguiente generación (Johnson & Lightner 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Vectores

No se conocen vectores en las infecciones naturales.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone de datos.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del BVM es horizontal y tiene lugar mediante la ingesta de tejido infectado (canibalismo), heces, cuerpos de inclusión o detritos o agua contaminados con el virus (Johnson & Lightner, 1988; Lightner, 1996). El BVM se ha transmitido experimentalmente en el laboratorio mediante la exposición de larvas o PL tempranas de *P. monodon* al virus por el agua o *per os*. Unos 2 días después de la exposición pueden observarse cuerpos de inclusión del BVM en células hepatopancreáticas cuando se exponen PL-1 a 28 °C en agua de mar de 33 ppmil (Natividad & Lightner, 1992a; 1992b; Paynter *et al.*, 1992).

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia del BVM es muy variable, y oscila entre <1% en poblaciones salvajes y de piscifactoría, y hasta el 100% en poblaciones de piscifactoría de tanques de cría de larvas y estanques de precriaderos (Anderson *et al.*, 1987; Chayaburakul *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1989b; 1989c; 1990; Lightner, 1996; Natividad & Lightner 1992a; Vijayan *et al.*, 1995).

2.3.3. Distribución geográfica

El BVM es enzoótico en peneidos salvajes en las siguientes regiones limítrofes del Indo-Pacífico: este y sudeste asiático, el subcontinente indio, Oriente Medio, Australia, Indonesia, Nueva Caledonia, África oriental y Madagascar. Fuera del ámbito geográfico normal de *P. monodon*, no se ha informado de la existencia de BVM en camarones peneidos salvajes. Sin embargo, se ha informado de la existencia de BVM en lugares en los que se ha cultivado *P. monodon* en el Mediterráneo, África Oriental, Tahití y Hawaii, así como en varios lugares de Norteamérica y Sudamérica y en el Caribe, pero solo en las poblaciones de *P. monodon* introducidas (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Los estadios larvarios (en concreto, protozoos y misis) y los estadios de PL temprana son las fases de la vida del hospedador en que pueden producirse importantes mortalidades, y son los que resultan infectados más fácilmente en estudios de desafío en el laboratorio (Chen *et al.* 1989b; Natividad & Lightner 1992a; Paynter *et al.*, 1992). En regiones enzoóticas en las que se cultiva *P. monodon*, la

prevalencia del BVM y la gravedad de la infección pueden ser altas (de entre el 50% y casi el 100%) en juveniles y adultos, pero sin mortalidad ni morbilidad asociadas. Las infecciones por el BVM aparentemente son bien toleradas por *P. monodon* a no ser que sufran un intenso estrés (Chayaburakul *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 1989a; 1989b; 1989c, Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1992; Natividad & Lightner 1992b). No obstante, las infecciones intensas por el BVM en *P. monodon* de piscifactoría pueden detener el crecimiento, lo cual da lugar a una disminución de la supervivencia y a una reducción del rendimiento global del cultivo (Anderson *et al.*, 1987; Baticados *et al.*, 1991; Chayaburakul *et al.*, 2004; Fegan *et al.*, 1991; Lightner, 1996; Nash *et al.*, 1988; Natividad & Lightner 1992b).

2.3.5. Factores ambientales

No se dispone de datos

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método eficaz de vacunación contra la BVM.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No se dispone de informes científicamente confirmados sobre tratamientos eficaces con sustancias químicas.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes científicamente confirmados sobre tratamientos eficaces mediante inmunoestimulación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

No se ha demostrado la existencia de ninguna población de especies susceptibles que sea resistente al BVM.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable al BVM.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se conoce el uso de agentes bloqueantes.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Dado que el BVM se transmite de los ejemplares adultos a su descendencia por contaminación fecal de los huevos desovados, la prevención de la infección de viveros puede lograrse aplicando pasos adicionales para eliminar la contaminación fecal de dichos huevos y las larvas limpiando bien las larvas nauplias o los huevos con formalina, iodóforos y agua de mar limpia (Chen *et al.*, 1990).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Viveros: para la prevención de las infecciones por el BVM y de la enfermedad que causa, se han aplicado varias prácticas de manejo. La aplicación de métodos de detección sistemática del BVM a reproductores fue algo eficaz para detectar portadores del virus intensamente infectados y, por tanto, para reducir la transmisión de la enfermedad de los progenitores a la descendencia. Con métodos de análisis no letales, esto se logra con un simple examen de hebras fecales al microscopio óptico (o mediante análisis de hebras fecales por PCR, si se dispone sin problema de las instalaciones necesarias para llevar a cabo esta técnica). Como alternativa, pueden sacrificarse reproductores que se encuentren al final de su vida útil tras el desove, para llevar a cabo un simple examen al microscopio óptico de aplastamientos de hepatopáncreas (también puede extirparse el hepatopáncreas y analizarse mediante PCR) para determinar el estado del desovador respecto al BVM. Dado que el BVM se transmite de los ejemplares adultos a su descendencia por contaminación fecal de los huevos desovados, la prevención de la infección de viveros puede lograrse aplicando pasos adicionales para eliminar la contaminación fecal de los huevos desovados y las larvas limpiando bien las nauplias o los huevos con formalina, iodóforos y agua de mar limpia (Chen *et al.*, 1990).

Precriaderos y estanques de engorde: las infecciones por BVM siguen siendo frecuentes en estanques con fondo de tierra en zonas del Indo-Pacífico en las que el virus es enzoótico (Bondad-

Reantaso *et al.*, 2001; Chayaburakulet *et al.*, 2004; Lightner, 1996), pero la incidencia y la prevalencia de las infecciones por el BVM puede reducirse en precriaderos y estanques de engorde revestidos internamente.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Las muestras adecuadas para determinar si existe infección por el BVM con métodos moleculares (por ejemplo, la PCR, la hibridación *in situ*, etc.) son las postlarvas (PL), los juveniles y los adultos. Aunque el BVM puede infectar todas las fases de vida, la gravedad de la infección, y por lo tanto, la carga vírica, pueden estar por debajo de los límites de detección en huevos desovados y en las fases larvarias, de modo que estas fases de vida podrían no constituir muestras adecuadas para la detección del BVM ni para la certificación de ausencia de baculovirus esférico.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para conocer los detalles sobre la conservación de las muestras para la histología o pruebas moleculares sistemáticas, así como para otros métodos analíticos, consúltese el capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras obtenidas para las pruebas moleculares pueden juntarse formando muestras combinadas de no más de cinco ejemplares de juveniles, subadultos o adultos cada una. No obstante, en el caso de los huevos, las larvas y las postlarvas (PL), para disponer de suficiente muestra (ácido nucleico extraído) para ejecutar una prueba diagnóstica tal vez sea necesario combinar cantidades mayores de ejemplares (por ejemplo, ~150 o más huevos o larvas, o 50–150 PL en función del tamaño y de la edad). Consúltese también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El BVM es un virus entérico y puede detectarse en el hepatopáncreas.

Pueden obtenerse muestras fecales cuando se precise un método analítico no letal (por ejemplo, para analizar de forma no letal reproductores de gran valor).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El BVM es un virus entérico (se replica, por ejemplo, en el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos) y no se replica a nivel sistémico.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

En el apartado 4.2 se describen los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones infectados por el BVM.

La infección del hepatopáncreas por el baculovirus de *P. monodon* (BVM) es una de las enfermedades más fáciles de diagnosticar en los camarones peneidos y en las gambas. Los cuerpos de oclusión que forma el virus son muy llamativos y fáciles de observar mediante microscopía óptica con muestras frescas, o por histología en el caso de muestras fijadas. Los métodos de microscopía directa son más adecuados para las PL, que a menudo son transportadas en el comercio regional e internacional. También se dispone de métodos moleculares muy sensibles para el diagnóstico del BVM, que son los más adecuados para la vigilancia, y sobre todo para el análisis no letal de reproductores.

- **Examen mediante microscopía directa**
 - *Preparaciones húmedas de tejido fresco:* el diagnóstico del BVM se lleva a cabo mostrando uno o varios cuerpos de oclusión generalmente esféricos en preparaciones húmedas de aplastamientos de hepatopáncreas o intestino medio examinadas mediante microscopía de contraste de fases o de campo brillante. En preparaciones no teñidas

cuidadosamente realizadas, los cuerpos de oclusión del BVM son inclusiones visibles únicas o múltiples, ligeramente refringentes, intranucleares y verdosas cuyo diámetro oscila entre menos de 0,1 µm y casi 20 µm. La tinción del aplastamiento de tejido con verde de malaquita acuoso al 0,05% ayuda a poner de manifiesto los cuerpos de oclusión tiñéndolos más intensamente que otros elementos esféricos de tamaño similar, como los núcleos celulares normales del hospedador, los nucléolos, gránulos secretorios, fagolisosomas y gotitas lipídicas (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1988; 1996; Lightner *et al.*, 1983).

- **Preparaciones húmedas de hebras fecales:** este método se puede utilizar como método no letal para detectar portadores del BVM. El método se puede aplicar a camarones juveniles o de fases posteriores, y tal vez sea más útil como método no letal para la detección de la infección en reproductores de alto valor. Las muestras fecales de camarón a analizar pueden obtenerse introduciendo el camarón en un acuario, un tanque de desove u otro tanque adecuado durante unas pocas horas hasta que aparezcan hebras fecales en el fondo del mismo. La mejor forma de obtener las hebras fecales es empleando una manguera de sifón de plástico transparente (lo ideal es un tubo acoplado a una sección de una pipeta de plástico a modo de extremo) colocada en un vaso de precipitados, un vaso normal o cualquier otro recipiente adecuado. Pueden realizarse preparaciones húmedas de las hebras fecales y examinarse directamente en busca de cuerpos de oclusión. Los cuerpos de oclusión del BVM son cuerpos más o menos esféricos, refringentes, y pueden aparecer aislados o formando agrupaciones. En hebras fecales muy frescas, pueden observarse formando agrupaciones que se mantienen unidas por la membrana nuclear. Al añadir una gota de verde de malaquita acuoso al 0,05% a la preparación húmeda se facilita la observación de los cuerpos de oclusión del BVM porque los tiñe de un verde más intenso que los demás elementos redondos observables en la muestra de heces (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996).
- Las heces obtenidas también puede utilizarse como muestras para el análisis no letal de detección del BVM por PCR. La PCR aporta una mayor sensibilidad diagnóstica para las infecciones de bajo grado que el examen por microscopía directa (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner & Redman 1998).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Además de la letargia en las PL intensamente afectadas, no se ha documentado ninguna otra alteración del comportamiento en hospedadores infectados.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los protozoos, los misis y las PL tempranas con infecciones intensas por BP pueden tener el intestino medio blanquecino (debido a la presencia de cuerpos de oclusión y detritos celulares en el material fecal) (Lightner, 1996). Los juveniles y los adultos no presentan signos macroscópicos de valor diagnóstico, así como tampoco las larvas con infecciones más leves.

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Véase el apartado 4.2.6.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.1.1.

4.2.5. Frotis

No es aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Histopatología: la histología como diagnóstico definitivo de la infección por el BVM. Dado que la formalina tamponada al 10% y otros fijadores en el mejor de los casos aportan una fijación regular del hepatopáncreas del camarón (el principal órgano diana del BVM), es muy recomendable utilizar fijador de Davidson (que contiene un 33% de alcohol etílico [al 95%], un 20% de formalina [formaldehído aproximadamente al 37%], un 11,5% de ácido acético glacial y un 33,5% de agua destilada o de grifo)

para todas las histologías sistemáticas de camarones (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996). Para optimizar resultados, no deben utilizarse camarones muertos. Para la fijación y el examen histológico solo deben escogerse camarones vivos, moribundos o que se hallen comprometidos. Los camarones elegidos se sacrifican mediante inyección de fijador directamente hacia el interior del hepatopáncreas; la cutícula que recubre el cefalotórax y el abdomen justo lateral a la línea media dorsal se abre con una tijeras de punta fina de cirugía para potenciar la penetración del fijador (puede retirarse el abdomen y desecharse), se sumerge el camarón entero (o el cefalotórax menos el abdomen) en fijador durante un periodo de entre 24 y no más de 48 horas, y a continuación se transfiere a alcohol etílico al 70%, donde se guardará. Tras ser transferidos a alcohol etílico al 70%, los ejemplares fijados se pueden transportar (por correo o mensajería al laboratorio de diagnóstico) envueltos en una toalla o papel absorbente saturado con alcohol etílico al 70% e introducidos en bolsas de plástico herméticas.

Para empezar el procesado histológico, los camarones fijados se “cortan” (para observar una guía fotográfica de este procedimiento, consúltese Bell & Lightner, 1998) para facilitar la posterior realización de cortes histológicos del hepatopáncreas y del intestino medio. Tras la deshidratación, las muestras se incluyen en parafina y se realizan cortes de 4-6 µm de espesor. Pueden utilizarse tinciones histológicas como la de Mayer Bennett o la de hematoxilina y eosina (H/E) de Harris para observar los cuerpos de oclusión esféricos en los hepatopancreatocitos, células del epitelio intestinal, o el lumen intestinal, diagnósticos del BVM. Lo característico es que las células hepatopancreáticas (o, en ocasiones, del intestino medio) infectadas por el BVM presenten núcleos destacadamente hipertrofiados con cuerpos de oclusión eosinófilos únicos o, más a menudo, formando agrupaciones, junto con una disminución y marginación de la cromatina. Los cuerpos de oclusión se pueden teñir de rojo brillante con las tinciones de H/E, e intensamente, aunque de forma variable, con las tinciones de tejido de Gram. Así, por ejemplo, la tinción histológica de Gram de Brown y Brenn, aunque no es específica de los cuerpos de oclusión del baculovirus tiende a teñir las oclusiones más intensamente (de rojo o púrpura, en función del espesor del corte, del tiempo de decoloración, etc.) que el tejido circundante, lo cual ayuda a poner de manifiesto su presencia en infecciones poco intensas (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock & Lightner 1990; Lester *et al.*, 1987; Lightner 1988; 1996; Vogt, 1992).

Método de la autofluorescencia con floxina: se trata de otro método para detectar cuerpos de oclusión del BVM que se basa en la fluorescencia de los cuerpos de oclusión teñidos de floxina. Puede añadirse floxina acuosa al 0,001% a aplastamientos de tejido para crear preparaciones húmedas de hepatopáncreas o heces para el examen directo. Los cortes histológicos teñidos con una H/E sistemática que contenga floxina al 0,005%, también son adecuados para este procedimiento. Los cuerpos de oclusión de las preparaciones húmedas de aplastamientos de tejido, en las heces o en cortes histológicos emiten una fluorescencia de color amarillo-verde brillante sobre un fondo de color verde claro bajo epi-fluorescencia (filtro de barrera de 0-515 nm y filtro excitador de 490 nm). Otros elementos de los tejidos, así como los cuerpos de oclusión de baculovirus de los insectos no emiten fluorescencia con este método. Así pues, este método permite un diagnóstico rápido y específico (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996; Thurman *et al.*, 1990).

Hibridación in-situ: véase el apartado 4.3.1.2.3 abajo.

Métodos basados en anticuerpos: los anticuerpos policlonales producidos en conejos para la detección la poliedrina de la baculovirus tetraédrica (BP) (Lewis, 1986) reaccionan de forma cruzada con el BVM en la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) (Lightner, 1996), pero no se dispone de ninguno para el diagnóstico sistemático de infecciones por el BVM.

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Microscopía electrónica: la infección por BVM puede confirmarse poniendo de manifiesto el virus (o cuerpos de oclusión patognomónicos con viriones ocluidos) en cortes, o bien mostrando el virus en preparaciones de virus semi-purificado preparadas a partir del hepatopáncreas (Couch 1991; Fegan *et al.*, 1991; Johnson & Lightner 1988; Lightner *et al.*, 1983; Lu *et al.*, 1996; Mari *et al.*, 1993).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.1.1.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Ninguno documentado hasta ahora.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Métodos moleculares con sondas de ADN para el BVM: se han desarrollado sondas génicas no radiactivas marcadas con DIG para el BVM (Lightner *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 1993; Spann *et al.*, 1993). Se comercializan sondas de ADN marcadas con DIG para detectar el BVM, como los kits ShrimProbe™ de DiagXotics (Lawrenceville, New Jersey, EE.UU.). Estas sondas están marcadas con un marcador no radiactivo, digoxigenina-11-dUTP (DIG), y solo funcionan bien con la hibridación *in situ* aplicada a cortes histológicos, porque hay sustancias en el hepatopáncreas y en las heces de los camarones que comportan la aparición de falsos positivos y de falsos negativos cuando se emplean muestras que se transfieren directamente y no se extraen antes de aplicar la sonda.

Procedimiento de hibridación por transferencia puntual para el BVM: si bien existen sondas de ADN específicas del BVM, su aplicación a los procedimientos de hibridación por transferencia puntual no se recomienda para la mayoría de las aplicaciones sistemáticas con fines de diagnóstico. Los pigmentos presentes en el hepatopáncreas dejan una mancha coloreada en la membrana de hibridación que puede enmascarar una prueba positiva o inducir una falsa interpretación de una prueba negativa. De la misma manera, partículas de quitina (que unen las sondas de ADN de forma inespecífica), pigmentos, y otros materiales presentes en muestras fecales también pueden producir falsos positivos y falsos negativos en pruebas de hibridación por transferencia puntual. Para evitar estos problemas se recomienda la extracción de ADN del hepatopáncreas o las heces antes de la transferencia, o bien emplear sondas quimioluminiscentes o marcadas radiactivamente. Sin embargo, la idoneidad de otros métodos (es decir, la observación directa de preparaciones húmedas, la histología o la PCR) no ha hecho necesario el posterior refinamiento ni la aplicación adicional del método de la transferencia puntual (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

- *Procedimiento de la hibridación In-situ:* en el protocolo de la hibridación *in situ* detallado para la baculovirus tetraédrica (BP) en el apartado 4.3.1.2.3. del capítulo 2.2.10 se utiliza el mismo método, excepto por el hecho de que se emplea una sonda marcada con DIG para BVM.

Reacción en cadena de la polimerasa: Se han desarrollado varios métodos de PCR para el BVM y pueden ser adecuados para ciertas aplicaciones (Chang *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993; Umshaet *et al.*, 2003; Vickers *et al.*, 1992; 1994). No obstante, recientemente se han desarrollado más sensibles y se ha observado que detectan el BVM de varias zonas geográficas (Belcher & Young 1998; Surachetpong *et al.*, 2005).

Se ha observado que existen ciertas sustancias en el hepatopáncreas y en las heces de los camarones que inhiben la ADN polimerasa que se utiliza en la PCR. Por tanto, se precisa una extracción del ADN antes de poder aplicar con éxito la PCR a la detección de este virus (Belcher & Young 1998; Chang *et al.*, 1993; Hsu *et al.*, 2000). Los kits de extracción de ADN son cómodos y se venden.

En cada prueba de PCR para el BVM deben incluirse los siguientes controles: una muestra de tejido o heces que se sepa que es negativa; una muestra de tejido o de heces que se sepa que es positiva (como el clon de ADN a partir del cual se diseñó un conjunto específico de cebadores); y un control "sin molde".

PCR anidada para el BVM (Belcher & Young 1998): este protocolo de PCR anidada permite detectar concentraciones bajas de BVM (de incluso solo ocho equivalentes de genoma vírico). Se diseñaron dos cebadores externos y dos internos utilizando una secuencia de ADN derivada del plásmido p4Ec196, que se construyó a partir de un fragmento *EcoRI* de 7,4 kb de una cepa australiana de BVM. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

Cebador	Secuencia	Temperatura
MBV1.4F	5'-CGA- TTC-CAT-ATC-GGC-CGA-ATA-3'	62°C (68,9°C)
MBV 1.4r	5'-TTG-GCA-TGC-ACT-CCC-TGA-GAT-3'	64°C (70,8°C)
MBV 1.4NF	5'-TCC-AAT-CGC-GTC-TGC-GAT-ACT-3'	64°C (70,8°C)
MBV 1.4NR	5'-CGC-TAA-TGG-GGC-ACA-AGT-CTC-3'	66°C (72,8°C)

Las temperaturas de fusión de los cebadores se han calculado con la fórmula $2(A+T) + 4(G+C)$, o según el método del porcentaje de GC (son los valores entre paréntesis).

Extracción de ADN

- i) Belcher & Young (1998) indicaron la presencia de inhibidores de la PCR en muestras de ADN preparadas a partir de PL de *Penaeus monodon* enteras infectadas por el BVM empleando el método de extracción recomendado por Wang *et al.* (1996) para BP, que incorpora proteinasa K. No obstante, empleando fenol caliente para extraer el ADN, este efecto inhibitorio desaparecía.
- ii) Con el método del fenol caliente, la muestra a analizar (PL, hepatopáncreas de camarón, heces) se liofiliza y se muele con un mortero hasta obtener un polvo en nitrógeno líquido.
- iii) Se añaden de inmediato unos 300 mg del material resultante a 400 µl de tampón de lisis (Tris/HCl 100 mM, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 100 mM, dodecilsulfato de sodio al 1%, pH 8,0) precalentado (a 65°C) y se incuba a 65°C durante 5-10 minutos.
- iv) La suspensión obtenida se homogeneiza no muy finamente mediante centrifugación manual en mortero y con un tubo de microcentrifuga. Se añade fenol tamponado con Tris/HCl, pH 8,0 (600 µl) y la mezcla se incuba durante 2 horas a 65°C invirtiéndola de vez en cuando.
- v) Tras la centrifugación a 12.000 **g** durante 10 minutos a temperatura ambiente, la capa acuosa se transfiere a un tubo de microcentrifuga nuevo y se extrae dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo (1/1). A continuación, se transfieren un total de 50 µl de la capa acuosa a un tubo de microcentrifuga nuevo que contenga 150 µl de tampón de dilución y se extrae una vez más con un volumen igual de fenol/cloroformo (1/1), y después se lleva a cabo una extracción directa con cloroformo.
- vi) Se añade acetato de amonio a la capa acuosa a una concentración final de 2,5 M, se mezcla brevemente, y se añaden dos volúmenes de etanol a -20°C con 1 µl de glucógeno a una concentración de 20 mg/litro para precipitar el ADN.
- vii) El ADN precipita mediante incubación a -20°C durante toda la noche o mediante incubación a -70°C durante 1 hora.
- viii) El ADN sedimenta a 12.000 **g** durante 15 minutos a 4°C. El sedimento de ADN resultante se enjuaga dos veces, primero con 500 µl de etanol frío al 80% y se centrifuga a 12.000 **g** durante 10 minutos a 4°C, y después con un enjuagado idéntico, y se centrifuga a temperatura ambiente.
- ix) El sedimento final de ADN se seca *in vacuo*, y se vuelve a suspender en 100 µl de tampón de dilución (Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, pH 8,0) a temperatura ambiente durante toda la noche o a 37°C durante 2 horas. Tras el análisis espectrofotométrico, y antes de ejecutar la PCR, el ADN se diluye a 50 ng/µl en tampón de dilución.

Pasos de la PCR anidada de Belcher & Young (1998):

- i) Antes de la PCR, el ADN total extraído se desnaturaliza en agua hirviendo durante 3 minutos, y después se enfría rápidamente en agua con hielo.
- ii) Como molde se utiliza un total de 100 ng del ADN extraído.
- iii) Cada tubo de reacción contiene KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9, Triton X-100 al 0,1%, cada una de las dNTP a una concentración 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, tanto el cebador MBV1.4F como el cebador MBV1.4R a una concentración 0,25 µM, y 2,5 U de *Taq*, y se completa hasta un volumen final de 50 µl.
- iv) Las mezclas de reacción se recubren con aceite mineral (según necesidad).

- v) Las condiciones para la primera ronda de amplificación son las siguientes: un ciclo de 96°C durante 5 minutos; 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos; y un ciclo de 72°C durante 7 minutos.
- vi) El segundo paso de la PCR anidada se lleva a cabo con 0,5 µl de la mezcla de reacción de la PCR primaria utilizada como molde con los cebadores internos.
- vii) La segunda ronda de la reacción de amplificación contiene KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ 1,5 mM, cada una de las dNTP a una concentración 0,2 mM, tanto el cebador MBV1.4NF como el MBV1.4NR a una concentración 0,25 µM, y 2,5 U de *Taq*, y se prepara hasta un volumen final de 50 µl.
- viii) Las mezclas de reacción se recubren con aceite mineral (según necesidad).
- ix) Las condiciones para la segunda ronda de amplificación son las siguientes: un ciclo de 96°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos; y un ciclo de 72°C durante 7 minutos.
- x) Se ponen de manifiesto los productos de la PCR (de 533 pb los del primer paso, y de 361 los del segundo paso) añadiendo 1 µl de tampón de carga de gel (azul de bromofenol al 0,25% [p/v], Ficoll de tipo 400 al 15% [p/v], EDTA 100 mM, pH 8,0) a 10 µl de cada mezcla de reacción y se ejecuta la electroforesis por un gel de agarosa al 0,8% en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) que contenga 0,5 g/litro de bromuro de etidio.

En el Laboratorio de Referencia de la OIE, en la Universidad de Arizona, se utiliza otra PCR simple porque es menos propensa a la contaminación (Surachetpong *et al.*, 2005). En este método se emplean la muestra tipo y los métodos de extracción descritos anteriormente en este apartado.

Cebadores: un par de cebadores, uno directo y uno inverso (261F/261R), seleccionados del clon GC7 (entrados en GenBank y cuyo número de acceso es AY819785) produce un amplicón de 261 pb (Surachetpong *et al.*, 2005).

Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

261F 5'-AAT-CCT-AGG-CGA-TCT-TAC-CA-3'

261R 5'-CGT-TCG-TTG-ATG-AAC-ATC-TC-3'

Moldes de ADN:

- i) Extraído de hepatopáncreas (congelado o fijado en etanol);
- ii) Extraído de PL enteras (congelado o fijado en etanol);
- iii) Extraído de heces (congelado o fijado en etanol).

Mezcla de reacción para la PCR:

Reactivo (concentración)	25 µl de perlas de PCR*
H ₂ O destilada	23,5 µl
Cebador 261F (0,3 µM)	0,5 µl
Cebador 261R (0,3 µM)	0,5 µl
Molde de ADN (50–450 ng de ADN)	0,5 µl

*Perlas para PCR *PuReTaq™ Ready-To-Go PCR beads™*, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido

Parámetros de ciclación de la PCR:

Cebadores	Mezcla/Perlas	Tiempo	Temp. °C	Nº de ciclos
261F/261R	Perlas*	5 minutos	95	1
		30 segundos 30 segundos 30 segundos	94, 60, 72	35
		7 minutos	72	1

4.3.1.2.4. *Purificación del agente*

Ninguna.

4.3.2. **Métodos serológicos**

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico del BVM se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = en la actualidad el método no se recomienda y/o no está disponible para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia, detección y diagnóstico de la baculovirus esférica (*Baculovirus de Penaeus monodon*)

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

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

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de baculovirus esférica (baculovirus de *Penaeus monodon*)

Antecedentes de dos años de resultados analíticos negativos al BVM utilizando:

- PCR realizada en muestras del tipo y el tamaño adecuados;
- Ausencia de observación de cuerpos de oclusión en preparaciones húmedas y/o histología de muestras del tipo y tamaño adecuados.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

En el caso de las larvas (en concreto, protozoarias, misis y PL tempranas) de especies susceptibles: mortalidad con larvas que presenten intestinos medios blancos. En el caso de los juveniles: mal crecimiento o mal rendimiento del cultivo en poblaciones con antecedentes de infección por el BVM o en zonas donde el BVM sea prevalente.

7.2. Definición de caso confirmado

Cualquier combinación de al menos dos de los siguientes tres métodos (con resultados positivos):

- Observación microscópica de cuerpos de oclusión esféricos en preparaciones húmedas de larvas enteras o hepatopáncreas extirpados. En el caso de PL de más edad, así como de juveniles y adultos: observación de cuerpos de oclusión esféricos en preparaciones húmedas de aplastamientos y/o en cortes histológicos del hepatopáncreas o de heces.
- Señal histológica positiva en la hibridación *in situ* correspondiente a lesiones propias del BVM (es decir, núcleos hipertrofiados con o sin los cuerpos de oclusión esféricos patognomónicos.
- Resultados positivos para el BVM en la PCR.

8. Bibliografía

- ANDERSON I.G., SHARIFF M., NASH G. & NASH. M. (1987). Mortalities of juvenile shrimp *Penaeus monodon*, associated with *Penaeus monodon* baculovirus, cytoplasmic reo-like virus and rickettsial and bacterial infections, from Malaysian brackish water ponds. *Asian Fish. Sci.*, **1**, 47–64.
- BATICADOS M.C.L., PITOGO, C.L., PANER M.G., DE LA PEZA L.D., TENDENCIA E.A. (1991). Occurrence and pathology of *Penaeus monodon* baculovirus infection in hatcheries and ponds in the Philippines. *Israeli J. Aquaculture Bamidgeh*, **43**, 35–41.
- BELCHER C.R. & YOUNG P.R. (1998). Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. *J. Virol. Methods*, **74**, 21–29.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.
- BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *In: Diseases of Marine Animals*, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.
- CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHANG P.S., LO C.F., KOU G.H. & CHEN S.N. (1993). Purification and amplification of DNA from *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). *J. Invertebr. Pathol.*, **62**, 116–120.

- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1989). Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeusmonodonbaculovirus* (MBV) in cultured shrimps in Taiwan. *Fish Pathol.*,**24**, 189–195.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1990). Infection route and eradication of *Penaeusmonodonbaculovirus* (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeusmonodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CHEN S.N., CHANG P.S., KOU G.G. & LIGHTNER D.V. (1989). Studies on virogenesis and cytopathology of *Penaeusmonodonbaculovirus* (MBV) in giant tiger prawn (*Penaeusmonodon*) and the red tail prawn (*Penaeuspenicillatus*). *Fish Pathol.*, **24**, 89–100.
- CHEN S.N., LO C.F., LIU S.M. & KOU G.H. (1989). The first identification of *Penaeusmonodonbaculovirus* (MBV) in cultured sand shrimp, *Metapenaeusensis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*,**9**, 62–64.
- COUCH J.A. (1991). Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 2. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects. In: Atlas of Invertebrate Viruses, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205–226.
- DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K., ATHERTON J.G. & LESTER R.J.G. (1988). Observations on the ultrastructure of baculovirus in Australian *Penaeusmonodon* and *Penaeusmerguiensis*. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*,**39**, 743–749.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.
- FEGAN D.F., FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S. & WAIYAKRUTTHA M. (1991). The occurrence, development and histopathology of monodonbaculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture*, **96**, 205–217.
- FUKUDA H., MOMOYAMA K. & SANO T. (1988). First detection of monodonbaculovirus in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 45–48.
- HAO N.V., THUY D.T., LOAN L.T.T., PHI T.T., PHUOC L.H., DUONG H.H.T., CORSIN F. & CHANRATCHAKOOL P. (1999). Presence of the two viral pathogens WSSV and MBV in three wild shrimp species (*Penaeusindicus*, *Metapenaeusensis* and *Metapenaeuslysianassa*) cultured in the mangrove forest of Ca Mau Province. *Asian Fish. Sci.*, **12**, 309–325.
- HSUY.L., WANG K.H., YANG Y.H., TUNG M.C., HU C.H., LO C.F., WANG C.H. & HSU T. (2000). Diagnosis of *Penaeusmonodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis. Aquat. Org.*,**40**, 93–99.
- JOHNSON P.T. & LIGHTNER D.V. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.*,**5**, 123–141.
- LESTER R.J.G., DOUBROVSKY A., PAYNTER J.L., SAMBHI S.K. & ATHERTON J.G. (1987). Light and electron microscope evidence of baculovirus infection in the prawn *Penaeusplebejus*. *Dis. Aquat. Org.*,**3**, 217–219.
- LEWIS D.H. (1986). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting penaeidbaculovirus. *J. Fish Dis.*,**9**, 519–522.
- LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture, Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 8–127.
- LIGHTNER, D.V. (ED.) (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., NATIVIDAD J.M., RUKYANI A. & POERNOMO A. (1992). A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. In: Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R.P., & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 57–80.
- LIGHTNER D.V., HEDRICK R.P., FRYER J.L., CHEN S.N., LIAO I.C. & KOU G.H. (1987). A survey of cultured penaeid shrimp in Taiwan for viral and other important diseases. *FishPathol.*,**22**, 127–140.

- LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., NUNAN L., PANTOJA C., MARI J. & BONAMI J.R. (1994). Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the penaeid shrimp parvoviruses IHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1, 59–85.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1981). A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**, 299–302.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, **32**, 209–233.
- LU C.C., TANG F.J.K. & CHEN S.N. (1996). Morphogenesis of the membranous labyrinth in penaeid shrimp cells infected with *Penaeus monodon* baculovirus (MBV). *J. Fish Dis.*, **19**, 357–364.
- LU C.C., TANG F.J.K., KOU G.H. & CHEN S.N. (1993). Development of a *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) DNA probe by polymerase chain reaction and sequence analysis. *J. Fish Dis.*, **16**, 551–559.
- LU C.C., TANG F.J.K., KOU G.H. & CHEN S.N. (1995). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* Fabricius by in situ hybridization. *J. Fish Dis.*, **18**, 337–345.
- MARI J., BONAMI J.R., POULOS B. & LIGHTNER D.V. (1993). Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Dis. Aquat. Org.*, **16**, 207–215.
- MURPHY F.A., FAUQUET C.M., MAYO M.A., JARVIS A.W., GHABRIAL S.A., SUMMERS M.D., MARTELLI G.P. & BISHOP D.H.L. (1995). Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* (Suppl. 10). Springer-Verlag, Vienna, Austria and New York, USA, 586 pp.
- NASH G., POERNOMO A. & NASH M.B. (1988). Baculovirus infection in brackishwater pond cultured *Penaeus monodon* Fabricius in Indonesia. *Aquaculture*, **73**, 1–6.
- NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992). Prevalence and geographic distribution of MBV and other diseases in cultured giant tiger prawns (*Penaeus monodon*) in the Philippines. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 139–160.
- NATIVIDAD J.M. & LIGHTNER D.V. (1992). Susceptibility of the different larval and postlarval stages of black tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, to monodon baculovirus (MBV). In: Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 111–125.
- PAYNTER J.L., VICKERS J.E. & LESTER R.J.G. (1992). Experimental transmission of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV). In: Diseases in Asian Aquaculture I, Shariff M., Subasinghe R. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 97–110.
- POULOS B.T., MARI J., BONAMI J.R., REDMAN R. & LIGHTNER D.V. (1994). Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeus monodon* by in situ hybridization on fixed tissue. *J. Virol. Methods*, **49**, 187–194.
- SPANN K.M. & LESTER R.J.G. (1996). Baculovirus of *Metapenaeus bennettiae* from the Moreton Bay region of Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 53–58.
- SPANN K.M., LESTER R.J.G. & PAYNTER J.L. (1993). Efficiency of chlorine as a disinfectant against monodon baculovirus (MBV). *Asian Fish. Sci.*, **6**, 295–301.
- SURACHETPONG W., POULOS B.T., TANG K.F.J., LIGHTNER D.V. (2005). Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **249**, 69–75.
- THURMAN R.B., LIGHTNER D.V., BELL T.A. & HAZANOW S. (1990). Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculoviruses and their use in diagnosis of infections. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 128–131.

UMESHA R.K., UMA A., OTTA S.K., KARUNASAGAR I., & KARUNASAGAR I. (2003). Detection by PCR of hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery-reared *Penaeus monodon* postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 141–146.

VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARSTENS 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*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA, 1162 pp.

VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1992). Detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) in digestive glands of postlarval prawns using polymerase chain reaction. *In: Diseases in Asian Aquaculture I*, Shariff M., Subasinghe R.P., & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 127–133.

VICKERS J.E., LESTER R.J.G., SPRADBROW P.B. & PEMBERTON J.M. (1994). Evidence for homology between polyhedrin genes of baculoviruses of a prawn and an insect. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 207–208.

VIJAYAN K.K., ALAVANDI S.V., RAJENDRAN K.V. & ALAGARSWAMI K. (1995). Prevalence and histopathology of monodon baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* and *P. indicus* in shrimp farms in the south-east coast of India. *Asian Fish. Sci.*, **8**, 267–272.

VOGT G. (1992). Transformation of anterior midgut and hepatopancreas by monodon baculovirus (MBV) in *Penaeus monodon* postlarvae. *Aquaculture*, **107**, 239–248.

WANG S.Y., HONG C. & LOTZ J.M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculovirus penaei* in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 123–131.

*
* *

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