

## SECCIÓN 2.2.

# ENFERMEDADES DE LOS CRUSTÁCEOS

---

## CAPÍTULO 2.2.0.

### INFORMACIÓN GENERAL

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

#### A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

##### 1. Evaluación del estado de salud de la unidad epidemiológica

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

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

##### 1.1. Tipos de muestras que deben utilizarse para las pruebas

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

##### 1.2. Especificaciones relativas al tamaño de los crustáceos

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

##### 1.3. Especificaciones relativas a las poblaciones de crustáceos

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

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

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

#### **1.4. Especificaciones relativas al estado clínico**

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

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

## **2. Procesado general de las muestras**

### **2.1. Examen macroscópico**

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

### **2.2. Examen virológico**

#### **2.2.1. Transporte y tratamiento de las muestras con antibiótico**

No es aplicable.

#### **2.2.2. Extracción del virus**

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

#### **2.2.3. Tratamiento para neutralizar virus enzoóticos**

No es aplicable.

### **2.3. Examen bacteriológico**

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

## **2.4. Examen parasitario**

No aplicable a las enfermedades de la lista actual.

## **2.5. Examen fúngico y de otros protistas**

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

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

## **1. Virus de los crustáceos**

### **1.1. Líneas celulares de crustáceos**

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

### **1.2. Medios de cultivo**

No es aplicable.

### **1.3. Controles positivos del virus y preparación del antígeno**

#### **1.3.1. Nomenclatura del virus**

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

#### **1.3.2. Producción de virus**

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

#### **1.3.3. Conservación y almacenaje del virus**

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

## **2. Bacterias de los crustáceos**

### **2.1. Medios de cultivo**

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

### **2.2. Almacenaje de los cultivos**

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

## **3. Parásitos de los crustáceos**

### **3.1. Medios de cultivo**

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

### 3.2. Almacenaje de los cultivos

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

## 4. Hongos de los crustáceos

### 4.1. Medios de cultivo

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

### 4.2. Almacenaje de los cultivos

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

## 5. Técnicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **5.1. Pruebas basadas en anticuerpos**

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

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

### **5.1.2. Antisueros anti-bacterias de crustáceos**

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

### **5.1.3. Procesado y almacenaje de los sueros inmunes**

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

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

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

## **5.2. Microscopía directa**

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

## **5.3. Técnicas histológicas**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### iv) Transporte y envío de las muestras conservadas

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

### 5.4. Microscopía electrónica de transmisión o de barrido

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

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

#### 5.5.1. Preparación y tipos de muestras

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

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

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

#### 5.5.2. Conservación del ARN y el ADN en los tejidos

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

#### 5.5.3. Extracción de ADN

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

#### 5.5.4. Extracción de ARN

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

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

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

### 6. Información adicional propuesta

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

---

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



## BIBLIOGRAFÍA CLAVE PARA LECTURA COMPLEMENTARIA

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

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

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

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

FAUQUET C.M., MAYO M.A., 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\*  
\* \*