

## NECROSIS HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

---

### 1. Ámbito de aplicación

La necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa está causada por una infección con el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (VNHHI) (Bonami y Lightner, 1991; Bonami *et al.*, 1990; Lightner, 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b; Lotz *et al.*, 1995; Tang y Lightner 2002). Se ha observado que una gran parte del genoma del VNHHI está insertado en el genoma de ciertas líneas genéticas de *Penaeus monodon*. No hay indicios de que esta variante del VNHHI sea infecciosa (Tang y Lightner, 2002; 2006).

Sinónimos: El Comité Internacional de Taxonomía ha designado al VNHHI (un parvovirus) provisionalmente como una especie del género *Brevidensovirus*, familia Parvoviridae, con el nombre de especie de PstDNV (para el densovirus de *Penaeus stylirostris*) (Fauquet *et al.*, 2005). A efectos de este *Manual Acuático*, normalmente el agente vírico de la NHHI se denominará VNHHI.

### 2. Información sobre la enfermedad

#### 2.1. Factores del agente

##### 2.1.1. Agente patógeno, cepas del agente

El VNHHI es el más pequeño de los virus conocidos del camarón peneido. El virión de la NHHI es un icosaedro sin envoltura de 20-22 nm, con una densidad de 1,40 g/ml en CsCl, que contiene ADN lineal monocatenario de un tamaño estimado de 3,9 kb, y que tiene una cápsida con cuatro polipéptidos de 74, 47, 39 y 37,5 kD de peso molecular (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000).

Se han identificado al menos cuatro genotipos diferentes del VNHHI (Tang y Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003): Tipo 1) de las Américas y Asia oriental (principalmente Filipinas); Tipo 2) del sureste de Asia; Tipo 3A) de Asia oriental, India y Australia; y tipo 3B) de la región del Indo-Pacífico oeste, incluidos Madagascar, Mauricio y Tanzania (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Los dos primeros genotipos son infecciosos para los peneidos representativos, *P. vannamei* y *P. monodon*, mientras que las otras dos variantes no son infecciosas en estas especies (Tang y Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003; 2007). Se han hallado secuencias relacionadas con el VNHHI tipo 3A y tipo 3B insertadas en el genoma de *P. monodon* de África oriental, Australia y la región del Indo-Pacífico oeste (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Las secuencias presuntamente de VNHHI halladas en el genoma de *P. monodon* no son infecciosas para las especies hospedadoras representativas, *P. vannamei* y *P. monodon* (Lightner *et al.*, 2009; Tang y Lightner 2006; Tang *et al.*, 2007).

##### 2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se dispone de datos.

##### 2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Se considera que el VNHHI es el virus más estable de todos los virus conocidos que afectan a los camarones peneidos. Los tejidos infectados se mantienen infecciosos después de repetidos ciclos de congelación-descongelación y tras un almacenaje en glicerina al 50% (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1987; 2009).

##### 2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

La mayoría de las especies de peneidos pueden resultar infectadas con el VNHHI, incluidas las principales especies de piscifactoría, *P. monodon* (langostino jumbo), *L. vannamei* (camarón patiblanco) y *L. stylirostris* (camarón azul).

Las infecciones por VNHHI son más graves en el camarón azul, *P. stylirostris*, en el que el virus puede causar una epizootia aguda y una mortalidad masiva (> 90%). En *L. stylirostris* los estadios de juvenil y subadulto son los más gravemente afectados (Bell y Lightner, 1984; 1987; Brock y Lightner 1990; Brock *et al.*, 1983; Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998; Lightner *et al.*, 1983a).

El VNHHI produce como enfermedad crónica el síndrome de la deformidad y del enanismo (SDE) en *L. vannamei*, en el cual los principales efectos son un crecimiento reducido e irregular y deformidades cuticulares, más que mortalidad (Bray *et al.*, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Castille *et al.*, 1993; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner, 1996; Motte *et al.*, 2003). La infección por el VNHHI en *P. monodon* es generalmente subclínica, aunque se ha descrito SDE, índices de crecimiento reducido y bajos rendimientos de cultivo en poblaciones infectadas por el VNHHI (Chayaburakul *et al.*, 2004; Primavera y Quinitio, 2000).

### 2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Se ha encontrado el VNHHI en todos los estadios de vida de *P. vannamei* (huevos, larvas, postlarvas (PL), formas juveniles y adultos). Se ha hallado que los huevos de hembras infectadas con el VNHHI con alto contenido de virus generalmente no llegan a desarrollarse ni a eclosionar. Aquellas larvas nauplias producidas por reproductores infectados que eclosionan tienen una alta prevalencia de infección por VNHHI (Motte *et al.*, 2003).

### 2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Véanse los apartados 2.2.1 y 2.2.2.

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El VNHHI infecta y se ha demostrado que se replica (utilizando hibridación *in-situ* [ISH] con sondas específicas de ADN) en tejidos del embrión de origen ectodérmico y mesodérmico. De esta forma, los principales órganos diana son los siguientes: las branquias, el epitelio cuticular (o hipodermis), todos los tejidos conjuntivos, los tejidos hematopoyéticos, el órgano linfático, la glándula antenal y el cordón nervioso ventral, con sus ramas y sus ganglios. Los órganos entéricos (hepatopáncreas, derivado del endodermo, y el epitelio de la mucosa del intestino medio y de los ciegos del intestino medio) y el músculo liso, cardíaco y estriado no presentan lesiones histológicas de infección por el VNHHI, y normalmente son negativos al VNHHI según la prueba de la ISH (Lightner, 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1992).

### 2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos miembros de las poblaciones de *P. stylirostris* y *P. vannamei* que sobreviven a las infecciones y/o epizootias por VNHHI, pueden portar el virus de por vida y pasarlo a la progenie y a otras poblaciones por transmisión vertical u horizontal (Bell y Lightner 1984; Lightner, 1996a; 1996b; Morales-Covarrubias y Chavez-Sanchez, 1999; Motte *et al.*, 2003).

### 2.2.6. Vectores

No se conoce ninguno en las infecciones naturales.

### 2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

El VNHHI es frecuente en los camarones peneidos salvajes del sureste asiático (*P. monodon*) y de las Américas (*P. vannamei*, *P. stylirostris* y otras especies de peneidos salvajes de la zona del Pacífico) (Fegan y Clifford, 2001; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 1999; Nunan *et al.*, 2001).

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del VNHHI puede tener lugar mediante vías horizontales o verticales. Se ha demostrado la transmisión horizontal por canibalismo o por aguas contaminadas (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1983a;

1983b; 1985; Tang *et al.*, 2002), y la transmisión vertical a través de huevos infectados (Motte *et al.*, 2003).

### 2.3.2. Prevalencia

En reservas salvajes de las regiones donde el virus es enzoótico, en varios estudios se han observado prevalencias del VNHHI de entre el 0 y el 100%. Algunos de los valores medios descritos para la prevalencia del VNHHI en reservas salvajes son: 26% y 46% en *P. stylirostris* en las partes inferior y superior del Golfo de California, respectivamente (Pantoja *et al.*, 1999); 100% y 57%, respectivamente, en hembras adultas y en machos adultos de *P. stylirostris* de la región media del Golfo de California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% en ejemplares de *L. vannamei* salvajes obtenidos de las costas del Pacífico de Panamá (Nunan *et al.*, 2001); y 51 a 63% en *P. vannamei* obtenido de las costas del Pacífico de Ecuador, Colombia y Panamá (Motte *et al.*, 2003). Otros peneidos obtenidos durante algunos de estos estudios y que han dado positivo al VNHHI incluyen el camarón patiamarillo (*P. californiensis*) y el camarón blanco del Pacífico (*P. occidentalis*). En los criaderos donde se encuentra presente el VNHHI, su prevalencia puede ir de muy baja al 100%, pero es habitual una prevalencia que se acerque al 100% (Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1988; 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1992; 1983a; Martínez-Cordova 1992).

### 2.3.3. Distribución geográfica

El VNHHI parece tener una distribución mundial en el camarón peneido, tanto salvaje como de piscifactoría (Brock y Lightner, 1990; Lightner, 1996; Owens *et al.*, 1992). En el hemisferio occidental, el VNHHI se encuentra normalmente en el camarón peneido salvaje del Pacífico oriental, desde Perú a México. Aunque el VNHHI se ha descrito en *P. vannamei* y *P. stylirostris* de piscifactoría en la mayoría de las regiones de cultivo de camarón del hemisferio occidental y en peneidos salvajes a lo largo de toda la costa americana del Pacífico (desde Perú al norte de México), en la costa americana Atlántica no se ha descrito el virus en el camarón peneido salvaje (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock y Main, 1994; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 1992; Lightner y Redman, 1998a). El VNHHI también se ha descrito en el camarón peneido de piscifactoría de las Islas del Pacífico, incluidas las islas de Hawai, la Polinesia francesa, Guam y Nueva Caledonia. En la región del Indo-Pacífico, se ha descrito el virus en el camarón peneido cultivado y salvaje en el este de Asia, sureste de Asia y Oriente Medio (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996a). Se ha descrito un virus tipo VNHHI en Australia (Krabsetsve *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1992), y en 2008 se notificó a la OIE la presencia de NHHI en camarones de piscifactoría en Australia. Como se ha explicado en el apartado 2.1.1, se han encontrado secuencias relacionadas con el VNHHI insertadas en el genoma de *P. monodon* de África oriental, Australia y la región del Indo-Pacífico occidental (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En función de la especie hospedadora y del genotipo del virus, la NHHI puede presentarse de tres formas distintas; así, en *P. stylirostris* de poblaciones no seleccionadas, la infección por el VNHHI da lugar a una enfermedad aguda y normalmente catastrófica con mortalidades que se acercan al 100%. Por el contrario, en *P. vannamei*, algunas de las líneas de *P. stylirostris*, y en *P. monodon* en ciertas condiciones, la infección por el VNHHI da lugar a una enfermedad más sutil y crónica, SDE, en la que es poco habitual observar altas mortalidades, pero a menudo con una considerable inhibición del crecimiento y deformidades de la cutícula. En la tercera situación, la mayor parte del genoma del VNHHI se ha hallado insertado en el genoma de algunas líneas genéticas de *P. monodon*. No hay indicios de que esta variante del VNHHI sea infecciosa (Tang y Lightner, 2002; 2006).

### 2.3.5. Factores medioambientales

La tasa de replicación del VNHHI a altas temperaturas del agua se redujo considerablemente en un estudio en el que se comparó la replicación vírica en *P. vannamei* infectado experimentalmente y mantenido a 24°C con la observada si se mantenía a 32°C. Tras un adecuado periodo de incubación, los camarones mantenidos a 32°C presentaban una carga vírica alrededor de 10<sup>2</sup> veces inferior a la de los camarones mantenidos a 24°C. Sin embargo, incluso a temperaturas del agua más altas, seguía produciéndose una considerable replicación (de hasta 10<sup>5</sup> copias de virus/ 50 ng de ADN de camarón) del VNHHI en camarones mantenidos a 32°C (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

## 2.4. Control y prevención

### 2.4.1. Vacunación

No se han desarrollado métodos de vacunación eficaces contra el VNHHI.

#### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

No existen informes de tratamientos con sustancias químicas eficaces confirmados científicamente.

#### 2.4.3. Inmunoestimulación

No existen informes de tratamientos de inmunoestimulación eficaces confirmados científicamente.

#### 2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se han desarrollado reservas seleccionadas de *P. stylirostris* que son resistentes a la NHHI, y se han aplicado con cierto éxito en piscifactorías de camarones (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; 1996b; Weppe 1992; Zarian-Herzberg y Ascencio-Valle, 2001). Algunas de las líneas seleccionadas de *P. stylirostris* que se cultivaron con el fin de que fueran resistentes a la enfermedad, se observó que eran refractarias a la infección (Tang *et al.*, 2000). Sin embargo, estas reservas no presentan una gran resistencia a enfermedades como las causadas por el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB) y, por tanto, su utilidad ha sido escasa, aunque en algunas reservas se ha observado una base genética de la susceptibilidad de *P. vannamei* a la NHHI (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

#### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Con *P. stylirostris* resistente al VNHHI ha habido cierta aplicación y éxito, aunque escasos, (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarin-Herzberg y Ascencio 2001). La resistencia relativa de *P. vannamei* a la NHHI, a pesar de la infección por el VNHHI, se considera uno de los principales motivos por los que *P. vannamei* es la principal especie de camarón cultivada en el hemisferio occidental y, desde 2004, a nivel mundial (Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

#### 2.4.6. Agentes bloqueantes

Existen informes de camarones con altas cargas víricas de VNHHI que son resistentes a la infección por el VSMB (Bonnichon *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2003). Sin embargo, hasta ahora no se ha publicado ningún informe sobre agentes bloqueantes del VNHHI.

#### 2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Se ha comprobado que el VNHHI se transmite verticalmente por vía transovárica (Motte *et al.*, 2003). Por tanto, aunque la desinfección de huevos y larvas es una buena práctica de manejo (Chen *et al.*, 1992) y se recomienda por su potencial de reducción de la contaminación por el VNHHI en los huevos desovados y las larvas que surgen a partir de estos (y la contaminación por otros agentes patógenos), no es un método eficaz de prevención de la transmisión del VNHHI (Motte *et al.*, 2003).

#### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

Algunas prácticas de manejo se han aplicado con éxito a la prevención de las infecciones y la enfermedad del VNHHI. Entre ellas, la aplicación de pre-cribado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los reproductores salvajes o de piscifactoría y/o de sus huevos desovados/nauplias, eliminando aquellos que den positivos al virus (Fegan y Clifford, 2001; Motte *et al.*, 2003) y el desarrollo de producciones de camarón *P. vannamei* y *P. stylirostris* libres de patógenos específicos (SPF) (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992). Se ha demostrado que esta última es la práctica de manejo con más éxito para la prevención y control de la NHHI (Jaenike *et al.*, 1992; Lightner, 2005; Pruder *et al.*, 1995). Desafortunadamente, en la industria existe la idea equivocada de que el ser SPF es un rasgo genético, en lugar de un estado de salud (Lightner *et al.*, 2009). El desarrollo de *L. vannamei* SPF, libres no solo de VNHHI sino también de todos los agentes patógenos más importantes conocidos de camarón peneido, ha dado como resultado la introducción de la especie en Asia, y a superar a *P. monodon* en el año 2005 como especie de camarón de piscifactoría dominante en Asia, así como en las Américas, donde se desarrollaron progenies SPF (FAO, 2006; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

### 3. Obtención de muestras

#### 3.1. Elección de ejemplares

Los ejemplares adecuados para las pruebas de detección del VNHHI son todos los estadios de vida (huevos, larvas, post-larvas, juveniles y adultos) (Motte *et al.*, 2003). Aunque el VNHHI puede infectar a cualquier estadio, la gravedad de la infección, y por tanto la carga de virus, puede hallarse por debajo de los límites de detección en los huevos desovados y en los estadios larvarios, de modo que estos estadios de vida pueden no ser adecuados para la detección del VNHHI o la certificación de ausencia de NHHI.

### 3.2. Conservación de las muestras para su envío

En el Capítulo 2.2.0 se indican cuáles son los métodos histológicos y las pruebas moleculares sistemáticos, y se proporciona orientación sobre cómo conservar las muestras para cada tipo de prueba.

### 3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras que se toman para pruebas moleculares pueden combinarse convirtiéndolas en muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares de juveniles, subadultos o adultos cada una. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las PL, para obtener una cantidad de muestra suficiente (ácido nucleico extraído) como para llevar a cabo una prueba diagnóstica, tal vez sea necesario poner en común cantidades mayores de ejemplares (como ~150 o más huevos o larvas, o 50–150 PL, en función de los tamaños/edades). Véase también el Capítulo 2.2.0.

### 3.4. Órganos y tejidos de elección

El VNHHI infecta tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. Los principales tejidos diana del VNHHI son las células del tejido conjuntivo, las branquias, ganglios hematopoyéticos y hemocitos, el cordón nervioso central y sus ganglios, las células epiteliales del túbulo de la glándula antenal y las células parenquimatosas del órgano linfóide (Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998). Por tanto, las muestras formadas por camarones enteros o tejidos de camarón (como larvas o PL) que contengan algunos de los tejidos diana mencionados son adecuadas para la mayoría de pruebas basadas en métodos moleculares.

Cuando es necesario analizar reproductores mediante pruebas no letales puede obtenerse hemolinfa o pleópodos extirpados y utilizarse para las pruebas (normalmente para PCR, o hibridación por transferencia puntual con sondas específicas) (Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998).

### 3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VNHHI es un virus sistémico y no se replica en tejidos entéricos (como el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos). Así, los tejidos entéricos no son muestras adecuadas para la detección de infección por el VNHHI (Lightner, 1996a; 2011; Lightner y Redman, 1998).

## 4. Métodos de diagnóstico

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

#### 4.1.1. Signos clínicos

Ciertas deformidades, en concreto un rostro inclinado hacia la izquierda o la derecha, que pueden presentar *P. vannamei* y *P. stylirostris* con SDE, son patognomónicas de infección por el VNHHI (véase el apartado 4.2.1.2). Sin embargo, este signo clínico no siempre aparece en poblaciones de camarón crónicamente infectadas por el VNHHI. Dado que *P. vannamei*, *P. stylirostris*, y *P. monodon* pueden estar infectados por el VNHHI y no presentar signos evidentes de infección (por ejemplo, es posible que presenten una considerable reducción de la velocidad de crecimiento o presencia de “enanos”), se recomienda llevar a cabo pruebas moleculares cuando se requiera demostrar la ausencia de NHHI.

#### 4.1.2. Alteraciones de comportamiento

En la NHHI aguda, *P. stylirostris* puede presentar cambios de comportamiento (véase el apartado 4.2.1.1), pero con SDE no se han notificado cambios de comportamiento importantes en los camarones afectados.

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

##### 4.2.1.1. NHHI en *Penaeus stylirostris*

El VNHHI produce a menudo enfermedad aguda con mortalidades muy altas en los ejemplares juveniles de la especie. Las larvas infectadas verticalmente y las primeras PL no llegan a estar enfermas, pero en los ejemplares que tienen unos 35 días de edad o en los juveniles más viejos, se pueden observar signos macroscópicos de la enfermedad, seguidos de mortalidades masivas. En los

juveniles infectados horizontalmente, el periodo de incubación y la gravedad de la enfermedad dependen en cierto modo del tamaño y de la edad, y los juveniles pequeños son siempre los más gravemente afectados. Los adultos infectados rara vez muestran síntomas de la enfermedad o mortalidad (Bell y Lightner, 1984; 1987; Bondad-Reantao *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 1983; Brock y Main, 1994; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 1996c; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). Los signos macroscópicos no son específicos de la NHHI, pero los *L. stylirostris* juveniles con NHHI aguda muestran una marcada reducción en el consumo de alimento, seguida de cambios en el comportamiento y el aspecto. Se ha observado que el camarón de esta especie con NHHI aguda sube lentamente en los tanques de cultivo a la superficie del agua, se queda allí inmóvil y después gira y se hunde lentamente (con el lado ventral hacia arriba) al fondo del tanque. Los camarones que muestran este comportamiento pueden repetir el proceso durante varias horas hasta que están demasiado débiles para continuar, o hasta que son atacados y devorados por sus hermanos más sanos. *Litopenaeus stylirostris* en este estadio de infección tiene a menudo manchas blancas o coloreadas de marrón (que difieren en aspecto y localización de las manchas blancas que a veces se observan en el camarón infectado por el VSMB) en la epidermis cuticular, especialmente en la unión de las placas tergaes del abdomen, que le confieren al camarón un aspecto moteado. Este moteado pierde intensidad en los *L. stylirostris* moribundos, ya que tales individuos se vuelven más azulados. En *L. stylirostris* y en *P. monodon* en fase terminal por infecciones con el VNHHI, los camarones moribundos son a menudo de color claramente azulado, y tienen la musculatura abdominal opaca (Bondad-Reantao *et al.*, 2001; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 1996c; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b).

#### 4.2.1.2. NHHI en *Penaeus vannamei*

La SDE, una forma crónica de la NHHI, tiene lugar en *P. vannamei* como resultado de la infección por el VNHHI. La gravedad y prevalencia de la SDE en poblaciones infectadas de juveniles o estadios más tardíos de *L. vannamei* puede estar relacionada con la infección durante el estadio de larva o de principio de PL. La SDE también se ha descrito en poblaciones de piscifactoría de *L. stylirostris* y *P. monodon*. El camarón juvenil con SDE puede presentar una inclinación (45° a 90° a la izquierda o a la derecha), o bien una deformación del rostro, una deformación en el sexto segmento abdominal, los flagelos de las antenas arrugados, aspereza de la cutícula, “cabezas en burbuja” y otras deformidades de la cutícula. Las poblaciones de camarón juvenil con SDE muestran crecimiento dispar con una amplia variedad de tamaños, y muchos camarones son más pequeños de lo esperado (“enanos”). El coeficiente de variación (CV = la desviación estándar dividida por la media de grupos de distintos tamaños dentro de una población) para poblaciones con SDE suele ser superior al 30% y puede acercarse al 90%, mientras que las poblaciones de juveniles de *L. vannamei* y *L. stylirostris* libres del VNHHI (y por tanto libres de SDE) suelen tener una CV del 10-30% (Bray *et al.*, 1994; Brock y Lightner, 1990; Brock *et al.*, 1983; Brock y Main, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; Lightner, 1996a; Primavera y Quintino, 2000; Pruder *et al.*, 1995).

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

Las infecciones agudas por el VNHHI en *P. stylirostris* pueden diagnosticarse fácilmente mediante métodos histológicos sistemáticos de tinción con hematoxilina y eosina (H/E) (véase el apartado 4.2.6). Las infecciones crónicas por el VNHHI y SDE son mucho más difíciles de diagnosticar mediante métodos histológicos de rutina con H/E. Para el diagnóstico de infecciones crónicas, se recomienda utilizar métodos moleculares para la detección del VNHHI (como la PCR o la aplicación de sondas de ADN específicas del VNHHI, o bien pruebas de hibridación por transferencia de puntos o ISH de cortes histológicos).

La prueba histopatológica de cuerpos de inclusión intranucleares prominentes, como los cuerpos de Cowdry tipo A, proporciona un diagnóstico provisional de la infección por el VNHHI. Estos cuerpos de inclusión característicos de la NHHI son cuerpos de inclusión eosinófilos y a menudo presentan halo (con colorantes de hematoxilina y eosina de tejidos conservados con fijadores que contengan ácido acético, tales como la solución AFA de Davidson y la solución de Bouin) (Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996a), son intranucleares y se encuentran en el interior de núcleos hipertrofiados y con la cromatina en los márgenes de células de tejidos de origen ectodérmico (epidermis, epitelio hipodérmico del intestino delgado y grueso, cordón nervioso y ganglios nerviosos) y mesodérmico (órganos hematopoyéticos, glándula antenal, gónadas, órgano linfoide y tejido conjuntivo). Los cuerpos de inclusión intranucleares debidos al VNHHI pueden confundirse fácilmente con cuerpos de inclusión intranucleares en desarrollo debidos a una infección por el VSMB. La ISH (véase el apartado 4.3.1.2.3 de este capítulo) de tales cortes con una sonda específica de ADN para el VNHHI proporciona un diagnóstico definitivo de la infección por VNHHI (Lightner, 1996a; 2011; Lightner y Redman, 1988).

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

No se ha desarrollado ningún método fiable para observar lesiones mediante microscopía óptica.

#### 4.2.5. Frotis

No aplicable.

#### 4.2.6. Cortes fijados

*Histopatología:* puede utilizarse histología para proporcionar un diagnóstico definitivo de la infección por el VNHHI. Dado que la formalina tamponada al 10% y otros fijadores en el mejor de los casos proporcionan una fijación pasable del camarón, es muy recomendable utilizar fijador de Davidson (que contiene un 33% de alcohol etílico [al 95%], un 22% de formalina [que a su vez contiene alrededor de un 37% de formaldehído], un 11,5% de ácido acético glacial y un 33,5% de agua destilada o de grifo) en todos los estudios histológicos sistemáticos con camarón (Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996a). Para optimizar los resultados, no debe utilizarse camarón muerto. Para la fijación y el examen histológico deben escogerse solamente camarones vivos, moribundos o en estado comprometido. Los camarones escogidos se sacrifican mediante una inyección de fijador directamente en el hepatopáncreas; se abre la cutícula situada sobre el cefalotórax y el abdomen justo lateral a la línea media dorsal, mediante unas tijeras quirúrgicas de punta fina para potenciar la penetración del fijador (el abdomen se puede retirar y eliminar), se sumerge el camarón entero (o el cefalotórax menos el abdomen) en fijador durante 24 a no más de 48 horas, y a continuación se transfiere a alcohol etílico al 70%, donde queda guardado. Una vez en el alcohol etílico al 70%, los ejemplares fijados pueden ser transportados (por correo o mensajería al laboratorio de diagnóstico) envueltos en paños o papel de cocina saturados con alcohol etílico al 70% e introducidos en bolsas de plástico herméticas (véase el apartado 4.2.3).

Hibridación *in-situ* (véase el apartado 4.3.1.2.3, más adelante).

#### 4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica no se recomienda para el diagnóstico sistemático del VNHHI.

### 4.3. Métodos de detección e identificación del agente patógeno

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

##### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

###### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4.

###### 4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

###### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.6.

##### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

###### 4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

El VNHHI no se ha cultivado *in vitro*. No existe ninguna línea celular de crustáceos (Lightner, 1996a; Lightner y Redman, 1998).

###### 4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

No se ha desarrollado ninguno con éxito.

###### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Existen métodos directos de detección basados en sondas de ADN específicas del VNHHI en formato de transferencia puntual y de ISH. Se han desarrollado pruebas de PCR para el VNHHI y se dispone sin dificultad de varios métodos y productos basados en estos métodos.

*Sondas de ADN para transferencia puntual y aplicaciones de ISH:* los métodos basados en sonda génica y PCR proporcionan mayor sensibilidad que las técnicas más tradicionales de diagnóstico de

la NHHI, que se basan en enfoques histopatológicos clásicos. Además, estos métodos tienen la ventaja añadida de permitir la realización de pruebas no letales en camarones reproductores de gran valor. Se puede tomar una muestra de hemolinfa con una jeringa de tuberculina, o una biopsia de un apéndice (por ejemplo, de un pleópodo) (Bell *et al.*, 1990), y usarla como muestra para una prueba de transferencia puntual directa.

*Procedimiento de hibridación por transferencia puntual para el VNHHI:* la sonda se marca de forma no radiactiva con digoxigenina-11-dUTP (DIG-11- dUTP). El sistema para marcar sondas de ácidos nucleicos utilizando DIG fue desarrollado por Boehringer Mannheim Biochemicals (esta compañía es propiedad actualmente de la Roche Diagnostic Corporation) y está descrito en la Guía Roche de Marcaje no Radioactivo con DIG y Selección de Productos de Detección, así como en la Guía del Usuario del Manual de Aplicación de DIG para Sistemas de Hibridación en Filtro™ y en el Manual<sup>1</sup> de Aplicación de la Hibridación In Situ No Radiactiva de Boehringer Mannheim (2006a; 2006b). Los protocolos ofrecidos a continuación utilizan sonda marcada con DIG para VNHHI, que puede producirse de varias formas. Las sondas pueden ser producidas utilizando un fragmento del ADN del VNHHI clonado como molde por el método de marcaje con cebado aleatorio (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1993). Otro posible método de producción de sondas marcadas con DIG utiliza cebadores específicos del ADN clonado del VNHHI, y otro es el kit PCR DIG Probe Synthesis Kit™, de Roche.

*Procedimiento de hibridación por transferencia puntual:* El método de hibridación por transferencia puntual explicado a continuación se basa en una sonda de ADN marcada con DIG para el VNHHI y en general sigue los métodos descritos por Mari *et al.* (1993) y Lightner (1996a). Las fórmulas para los reactivos necesarios se indican después de los protocolos.

- i) Se prepara una membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics Cat. Nº 1-209-299 o equivalente): se cortan trozos para encajar muestras y controles y se marca con un lápiz de mina suave haciendo 1 cm cuadrado para cada muestra. Se incluye un control positivo y uno negativo sobre cada filtro. Se sitúa sobre un trozo de papel de filtro (Whatman 3MM).
- ii) Si es necesario, en el interior de tubos de microcentrífuga de 1,5 ml se diluyen las muestras problema en TE (Tris/EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) más 50 µg/ml de ADN de esperma de salmón, utilizando 1 µl de muestra en 9 µl de tampón. Las muestras para transferencia puntual pueden ser de hemolinfa, tejidos homogeneizados en TN (Tris/NaCl: NaCl 0,4 M y Tris-HCl 20 mM, pH 7,4), o extracto de ADN en Tris/HCl 10 mM.
- iii) Se hierven las muestras durante 10 minutos y se congelan rápidamente en hielo durante 5 minutos. Se centrifugan brevemente en microfuga en frío para bajar todo el líquido y sedimentar toda posible proteína coagulada. Se mantienen en hielo hasta que las muestras son dispuestas en puntos sobre la membrana.
- iv) Se transfieren 1-3 µl de cada muestra a un lugar apropiado sobre los filtros. Se dejan secar al aire y después se fijan las muestras sobre la membrana calentando a 80°C durante 30 minutos o por entrecruzamiento con luz UV utilizando un transiluminador de ADN durante 3 minutos.
- v) Se ajusta un baño de agua a 68°C y se prepara una solución de prehibridación. Se preparan 8 ml por membrana para una membrana de 10 × 15 cm. Se coloca una placa de agitación caliente en la posición "lento" y se mueve mientras se calienta la solución durante 30 minutos hasta que el agente bloqueante se haya disuelto y la solución esté turbia. Se preparan también algunas bolsas cerradas herméticamente con calor, de un tamaño ligeramente más grande que la membrana: se necesitarán de cinco a seis bolsas por membrana.
- vi) Se retiran las membranas del horno o transiluminador y se introducen en una bolsa cerrada herméticamente con calor con 4 ml de solución de prehibridación por cada membrana. Se sellan herméticamente las bolsas y se sumergen en un baño de agua a 68°C durante 0,5-1 hora.
- vii) Se hierve la sonda marcada con DIG durante 10 minutos, se congela rápidamente en hielo y se centrifuga en una microfuga en frío para bajar todo el líquido del tubo de microcentrífuga. Se mantiene en hielo. Se retira la solución de prehibridación de las bolsas. Se añaden 2 ml de solución reciente de prehibridación a cada bolsa y después se añade a cada una la cantidad correcta y predeterminada de sonda marcada con DIG, mezclando bien a medida

---

1 Las referencias a 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*.



que se va añadiendo. Se cierran las bolsas herméticamente, se sumergen de nuevo en el baño de agua a 68° C y se incuban durante 8-12 horas.

- viii) Se lavan bien las membranas con:
- |  |   |                                   |
|--|---|-----------------------------------|
| Citrato salino estándar (SSC) 2×/<br>dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1% | x | 5 minutos a temperatura ambiente  |
| SSC 0,1× / SDS al 0,1%   | x | 15 minutos a 68°C                 |
| (se utilizan 4 ml/filtro y se cierran herméticamente en bolsas)          |   |                                   |
| Tampón I   | x | 5 minutos a temperatura ambiente  |
| Tampón II  | x | 30 minutos a temperatura ambiente |
| Tampón I   | x | 5 minutos a temperatura ambiente  |
|  | x |                                   |
- (Los tampones se preparan con anticipación).
- ix) Se deja que la membrana reaccione en bolsas con conjugado de AP anti-DIG (Roche Diagnostics 1-093-274) diluido a 1/5.000 en Tampón I. Se utilizan 3 ml por membrana y se incuban durante 30-45 minutos a temperatura ambiente en una plataforma oscilante.
- x) Se lava bien la membrana con:
- |            |   |                                   |
|------------|---|-----------------------------------|
| Tampón I   | x | 15 minutos a temperatura ambiente |
| Tampón III | x | 5 minutos a temperatura ambiente  |
- xi) Se revelan las membranas en bolsas utilizando 3 ml por membrana de solución de revelado (sal de nitroazul de tetrazolio [NBT]/X-fosfato en Tampón III) preparada justo antes de su uso. Se deja reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1-2 horas. Se detienen las reacciones en Tampón IV y se secan las membranas en papel de filtro 3MM.
- xii) Se fotografían los resultados (porque el color pierde intensidad con el paso del tiempo).
- xiii) Se almacenan las membranas secas en bolsas cerradas herméticamente con calor.

*Procedimiento de la hibridación in-situ (ISH):* El método de hibridación in-situ descrito a continuación utiliza una sonda de ADN marcada con DIG para el VNHHI y en general sigue los métodos descritos en Mari *et al.* (1993) y Lightner (1996a). Las fórmulas para los reactivos necesarios se describen después de los protocolos.

- i) Se incluye el tejido en parafina y se realizan cortes de 4-6 µm de espesor. Los cortes se sitúan sobre portas de microscopio cargados positivamente (no poner gelatina en agua para hacer flotar los cortes; utilizar solo agua).
- ii) Se colocan los portas en un soporte, como por ejemplo un soporte Tissue-Tek. Se calientan los portas en un horno durante 45 minutos a 60°C. En la batería de la tinción, el tejido se rehidrata del siguiente modo:
- |                                  |     |  |
|----------------------------------|-----|--|
| Xileno (o un sustituto adecuado) | 3 x | 5 minutos cada una                               |
| Alcohol absoluto                 | 2 x | 1 minuto cada una                                |
| Alcohol al 95%                   | 2 x | 10 inmersiones cada una                          |
| Alcohol al 80%                   | 2 x | 10 inmersiones cada una                          |
| Alcohol al 50%                   | 1 x | 10 inmersiones                                   |
| Agua destilada                   |     | Seis lavados (no dejar que los portas se sequen) |
- iii) Se lavan los portas durante 5 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS o tampón Tris/NaCl/EDTA [TNE]). Se prepara proteinasa K fresca a una concentración de 100 µg ml<sup>-1</sup> en PBS (o TNE). Se colocan los portas horizontalmente en una cámara húmeda, se pipetea encima 500 µl de la solución de proteinasa K y se incuban durante 10-15 minutos a 37°C. Se escurre el líquido con papel de filtro.
- iv) Se devuelven los portas al soporte. Se fijan los cortes en formaldehído frío al 0,4% durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- v) Se incuban los portas en SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente.

- vi) Con los portas horizontales, se añaden 0,5-1 ml de tampón prehibridación y se incuban en una cámara húmeda durante 15-30 minutos a 37°C.
- vii) Se hierve la sonda marcada con DIG durante 10 minutos y se congela rápidamente sobre hielo; se centrifuga brevemente en frío y se mantiene en hielo. Se diluye la sonda a 25 ng ml<sup>-1</sup> en solución prehibridación y se cubre el tejido con 250 µl de la solución. Se incuban los portas durante 2-4 horas a 42°C o durante toda la noche a 37°C en una cámara húmeda. Se escurre el líquido en papel de cocina. Durante esta incubación, se pre-calientan los tampones de lavado a 37°C.
- viii) Se colocan los portas en el soporte y se lavan como se indica a continuación:
- |          |     |                     |
|----------|-----|---------------------|
| SSC 2×   | 2 × | 5-30 minutos a 37°C |
| SSC 1×   | 2 × | 5 minutos a 37°C    |
| SSC 0,5× | 2 × | 5 minutos a 37°C    |
- ix) Se lavan los portas durante 5 minutos en Tampón I a temperatura ambiente. Se colocan los portas horizontalmente en una cámara húmeda y se bloquean con 0,5 ml de Tampón II por porta. Se incuban durante 15 minutos a 37°C. Se escurre el líquido en papel de cocina.
- x) Se diluye el conjugado de AP anti-DIG (Roche Applied Science cat. 10686322) a 1/1000 en Tampón II (1 µl de AP anti-DIG por ml de tampón). Se cubre el tejido con 500 µl de conjugado diluido y se incuba en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C.
- xi) Se colocan los portas en un soporte. Se lavan en Tampón I dos veces durante 5-10 minutos cada vez a temperatura ambiente. Se lavan una vez con Tampón III durante 5-10 minutos.
- xii) Se prepara la solución de revelado añadiendo en primer lugar 4,5 µl de NBT por 1 ml de tampón III. Se mezcla bien. A continuación, se añaden 3,5 µl de X-fosfato por ml de solución y se mezcla bien. Se pipetea 500 µl por porta y se incuban en una cámara húmeda en la oscuridad durante 2-3 horas a temperatura ambiente.
- xiii) Se detiene la reacción devolviendo los portas al soporte y lavando en Tampón IV durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- xiv) Se someten las muestras a una coloración de contraste sumergiéndolas durante 5 minutos en una solución acuosa de marrón Bismarck Y al 0,5%.
- xv) Se deshidratan los portas en la batería de tinción como se indica a continuación:
- |                                  |     |                         |
|----------------------------------|-----|-------------------------|
| Alcohol al 95%                   | 3 × | 10 inmersiones cada uno |
| Alcohol absoluto                 | 3 × | 10 inmersiones cada uno |
| Xileno (o un sustituto adecuado) | 4 × | 10 inmersiones cada uno |
- No dejar secar los portas – dejarlos en la última cubeta del xileno (o sustituto del xileno) hasta que estén listos para los cubres.
- xvi) Se añade medio de montaje (Permount) y se montan con cubre.
- xvii) Se examinan los portas bajo campo claro para ver si existe precipitado azul oscuro o negro que indique los puntos en los que se encuentra ADN de VNHHI. Las inclusiones intranucleares patodiagnósticas de Cowdry tipo A están bien marcadas con la sonda. Con frecuencia también están bien marcados los núcleos de la célula hospedadora sin inclusiones evidentes, inclusiones citoplasmáticas y acumulación de virus libre en los espacios del tejido y la hemolinfa.

NOTA: Siempre debe llevarse a cabo un control positivo y uno negativo.

Fórmulas de reactivos para el método de la ISH:

- i) Solución salina tamponada con fosfato 10×

NaCl	160 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	23 g
KCl	4 g
H <sub>2</sub> O DD	1950 ml (qs to 2 litros)

pH a 8,2 con NaOH; se esteriliza en autoclave; se almacena a temperatura ambiente. Para hacer PBS 1x, se diluyen 100 ml de PBS 10x en 900 ml de H<sub>2</sub>O DD; Se filtra solución 1× a través de un filtro de 0,45 µm de poro; se almacena a 4°C.

- ii) Tampón Tris/NaCl/EDTA (TNE) 10×
- |                     |                         |
|---------------------|-------------------------|
| Tris base           | 60,57 g                 |
| NaCl                | 5,84 g                  |
| EDTA                | 3,72 g                  |
| DD H <sub>2</sub> O | 900 ml (c.s.p. 1 litro) |
- pH a 7,4 con HCl concentrado o 5 M. Para preparar TNE 1×, se diluyen 100 ml de TNE 10× en 900 ml de H<sub>2</sub>O DD; se filtra 1 × solución a través de un filtro de 0,45 µm; se almacena a 4°C
- iii) Proteinasa K, 100 µg ml<sup>-1</sup> (se prepara inmediatamente antes de su uso)
- |              |              |
|--------------|--------------|
| PBS          | 10 ml PBS 1x |
| Proteinasa K | 1 mg         |
- iv) Formaldehído al 0,4%
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Formaldehído al 37% | 5,4 ml |
| DD H <sub>2</sub> O | 500 ml |
- Se almacena a 4°C; se puede utilizar hasta 4 veces antes de desecharlo.
- v) Tampón prehibridación (50 ml de volumen final)
- |                           |                                     |
|---------------------------|-------------------------------------|
| SSC 4×                    | 10 ml de SSC 20×                    |
| Formamida al 50%          | 25 ml de formamida al 100%          |
| Solución Denhardt 1×      | 2,5 ml de solución de Denhardt 20×  |
| Sulfato de dextrano al 5% | 10 ml de sulfato de dextrano al 25% |
- Calentar a 60°C
- Se hierven 2,5 ml de ADN de esperma de salmón a una concentración de 10 mg/ml y se añade al tampón para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml de ADN de esperma de salmón; se almacena a 4°C.
- vi) Tampón SSC 20×
- |   |  |
|---|--|
| NaCl 3 M  | 175,32 g de NaCl                           |
| Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,3 M | 88,23 g de citrato de Na 2H <sub>2</sub> O |
| H <sub>2</sub> O DD   | 1000 ml (qs)                               |
- pH a 7,0; se esteriliza en autoclave; se almacena a 4°C.
- Para obtener SSC 2x, se diluyen 100 ml de SSC 20× en 900 ml de H<sub>2</sub>O DD; para obtener SSC 1x, se diluyen 50 ml de SSC 20× en 950 ml de H<sub>2</sub>O DD; para obtener SSC 0,5x, se diluyen 50 ml de SSC 20× en 1950 ml de H<sub>2</sub>O DD. Se filtran las soluciones a través de un filtro de 0,45 µm de poro; se almacenan a 4°C.
- vii) Solución de Denhardt 20×
- |                     |                                   |
|---------------------|-----------------------------------|
| BSA (Fracción V)    | 0,4 g de albúmina de suero bovino |
| Ficoll 400          | 0,4 g de Ficoll                   |
| PVP 360             | 0,4 g de polivinilpirrolidona     |
| H <sub>2</sub> O DD | 100 ml                            |
- Se filtran las soluciones a través de un filtro de 0,45 µm de poro, se almacenan a 4°C. Se disponen alícuotas de 2,5 ml en pequeños tubos y se guardan congeladas.
- viii) Sulfato de dextrano al 25%
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Sulfato de dextrano | 25 g   |
| H <sub>2</sub> O DD | 100 ml |
- Se mezcla para disolver; se almacena congelado en alícuotas de 10 ml.
- ix) ADN de esperma de salmón (10 mg ml<sup>-1</sup>)
- |                          |        |
|--------------------------|--------|
| ADN de esperma de salmón | 0,25 g |
| H <sub>2</sub> O DD      | 25 ml  |
- Para prepararlo, se calienta agua y se añade el ADN lentamente agitándolo hasta que esté completamente disuelto; se hierve durante 10 minutos; se fuerza el ADN empujándolo a través de una aguja de 1,2 mm de diámetro externo varias veces; se distribuyen alícuotas de 2,5 ml en tubos pequeños y se almacenan congelados; se hierven durante 10 minutos inmediatamente antes de su uso para facilitar la mezcla en el tampón.

- x) Tampón I 10×
- |                     |                      |
|---------------------|----------------------|
| Tris/HCl 1M         | 121,1 g de Tris base |
| NaCl 1,5 M          | 87,7 g de NaCl       |
| H <sub>2</sub> O DD | 1000 ml (qs)         |
- pH a 7,5 con HCl. Se esteriliza en autoclave; se almacena a 4°C.
- Para obtener Tampón I 1x, se diluyen 100 ml de 10 × solución madre en 900 ml de H<sub>2</sub>O DD. Se filtra a través de un filtro de 0,45 µm de poro; se almacena a 4°C.
- xi) Tampón II (tampón bloqueante)
- |                   |   |
|-------------------|---|
| Tampón bloqueante | 0,25 g de Reactivo bloqueante (Roche Diagnostics 1-096-176) |
| Tampón I          | 50 ml de tampón I 1×  |
- Se almacena a 4°C hasta 2 semanas.
- xii) Tampón III
- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| Tris/HCl 100 mM     | 1,21 g de Tris base |
| NaCl 100 mM         | 0,58 g de NaCl      |
| H <sub>2</sub> O DD | 100 ml (qs)         |
- pH a 9,5 con HCl
- Después se añade:
- |                         |  |
|-------------------------|--|
| MgCl <sub>2</sub> 50 mM | 1,02 g de MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O |
|-------------------------|--|
- Se filtra por un filtro de 0,45 µm de poro; se almacena a 4°C.
- xiii) Alcohol polivinílico (PVA) al 10%
- |                      |        |
|----------------------|--------|
| Alcohol polivinílico | 10 g   |
| H <sub>2</sub> O DD  | 100 ml |
- Para prepararlo, se añade lentamente el PVA al agua mientras se agita con un poco de calor (el PVA tarda 2-3 horas en convertirse en solución). Se ponen 10 ml por tubo y se almacena congelado a -20°C.
- xiv) Solución de revelado
- Se mezclan 90 ml de Tampón III con 10 ml de PVA al 10%. Se almacenan a 4°C. Inmediatamente antes de uso, a cada ml de Tampón III con PVA se añaden
- |                     |   |
|---------------------|---|
| 4,5 µl de NBT       | 75 mg de NBT ml <sup>-1</sup> en dimetilformamida al 70% (Roche Diagnostics 1-383-213)  |
| 3,5 µl de X-fosfato | 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato, sal de toluidina (50 mg ml <sup>-1</sup> en dimetilformamida) (Roche Diagnostics 1-383-221) |
- xv) Tampón IV
- |                     |   |
|---------------------|---|
| Tris/HCl 10 mM      | 1,21 g de Tris base                             |
| EDTA 1mM            | 0,37 g de EDTA·2H <sub>2</sub> O (sal disódica) |
| H <sub>2</sub> O DD | 1000 ml   |
- pH a 8,0 con HCl. Se filtra por un filtro de 0,45 µm; se almacena a 4°C.
- xvi) Marrón Bismark Y al 0,5%
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Marrón Bismark Y    | 2,5 g  |
| H <sub>2</sub> O DD | 500 ml |
- Se disuelve el colorante en agua. Se filtra a través de un filtro Whatman n° 1; se almacena a temperatura ambiente.

*Reacción en cadena de la polimerasa para el VNHHI:* Existen varios métodos de PCR simple (Krabsetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2003; Tang y Lightner 2001) y varios kits comerciales de PCR para la detección del VNHHI. También existen métodos anidados de distintas marcas comerciales.

Hay múltiples variedades geográficas del VNHHI, algunas de las cuales no son detectadas por todos los métodos disponibles para el VNHHI. Dos series de cebadores, 392F/R y 389F/R, son las más adecuadas para detectar todas las variantes genéticas conocidas del VNHHI (Krabsetsve *et al.*, 2004; Tang y Lightner 2002), incluidos los tipos 3A y 3B, que están insertos en el genoma de ciertas poblaciones geográficas de *P. monodon* de la zona Indo-Pacífica occidental, África oriental, Australia y la India (Duda y Palumbi, 1999; Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). La serie de cebadores

309F/R amplifica solo un segmento de los VNHHI tipos 1 y 2 (las formas infecciosas del VNHHI), pero no de los tipos 3A y 3B, que son no infecciosos y forman parte del genoma de *P. monodon* (Tang y Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Por tanto, es muy recomendable confirmar resultados positivos y/o negativos no esperados de PCR para el VNHHI con una segunda serie de cebadores, o bien mediante otro método de diagnóstico (es decir, PCR utilizando cebadores de otra región del genoma, PCR en tiempo real, bioanálisis, ISH).

**Tabla 4.1.** Series de cebadores recomendadas para la detección del VNHHI mediante PCR simple

Cebador	Producto	Secuencia	% de G+C/ Temperatura	Banco de genes y Bibliografía
389F	389 pb	5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	50%/72°C	AF218266
389R		5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000)
77012F	356 pb	5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	50%/68°C	AF218266
77353R		5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	55%/63°C	(Nunan <i>et al.</i> , 2000)
392F	392 pb	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	50%/68°C	AF218266
392R		5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	50%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000; 2007)
309F	309 pb	5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	36%/68°C	AF218266
309R		5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	40%/69°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)
MG831F	831 pb	5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	45%/58°C	DQ228358
MG831R		5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	55%/62°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)

NOTA: Los cebadores 389F/R y 392F/R descritos anteriormente corresponden a la región codificadora de la proteína no estructural (ORF 1) del genoma del VNHHI. Los cebadores 77353/77012 corresponden a una región del genoma situada entre la región que codifica una proteína no estructural y la que codifica una proteína estructural (proteína de la cápsida). En el caso de obtener resultados ambiguos utilizando la serie de cebador "universal" 389F/R, se recomienda utilizar cebadores de una región diferente del genoma como prueba confirmatoria. En este caso, las series de cebadores pertinentes serían 77012/77353 o 392F/R

*Método general de PCR para detectar el VNHHI:* el método de PCR descrito a continuación para el VNHHI sigue generalmente las indicaciones señaladas por Nunan *et al.* (2000). La experiencia acumulada con la técnica ha llevado a modificaciones con respecto al molde (extracción del ADN de ejemplares clínicos), a la elección de cebadores (Tabla 4.1) y al volumen de la reacción.

- i) Se utiliza como molde el ADN extraído de homogenado de tejido triturado (tampón TN, NaCl 0,4 M, Tris 20 mM, pH 7,4) o hemolinfa (obtenida con una pequeña cantidad de citrato de sodio al 10%) o bien de tejido o hemolinfa fijados en etanol al 95% y después secados. Durante el paso de extracción del ADN se debe incluir un control de tejido o hemolinfa de animales que se sepa que son negativos. El ADN se puede extraer mediante varios métodos pero se han obtenido excelentes resultados utilizando kits de Roche Diagnostics (Cat. No. 1-796-828) o de Qiagen (Cat. No. 51304), o reactivos de Gibco Life Sciences (Dnazol Cat. No. 10503-027). Las lecturas espectrofotométricas del ADN final indicarán la pureza del ADN y la cantidad de ADN total extraído de la muestra. Se utilizan 1-5 µl de ADN extraído por 50 µl de volumen de reacción.
- ii) Los siguientes controles deben incluirse en todas las PCR para la detección del VNHHI: a) ADN de una muestra de tejido que se sepa que es negativo; b) ADN de una muestra que se sepa que es positiva (de tejido o hemolinfa o de un clon de un plásmido que contenga el fragmento que amplifica la serie de cebadores específica; y c) un control "sin molde".

- iii) Se utilizan como cebadores los cebadores 389F y 389R, que originan una banda de 389 pb (pares de bases) a partir del material infectado con el VNHHI, o los cebadores 77012F y 77353R, que originan una banda de 356 pb a partir del material infectado con el VNHHI. Se preparan los cebadores a razón de 100 ng/µl en agua destilada. Se mantienen congelados a -70°C.
- iv) Se utiliza un método de “inicio caliente” para la polimerasa: si se utiliza Applied Biosystem's AmpliTaq Gold, eso implica un paso de 5 minutos a 95°C para desnaturalizar el ADN antes de la unión de los cebadores y la activación del enzima. Este programa se enlaza después con el programa de ciclos (35 ciclos) y un programa de extensión. El programa se ajusta de la siguiente forma:

Inicio caliente	Programa 1	5 minutos a 95°C	
Enlazado al	Programa 2	30 segundos a 95°C	
		30 segundos a 55°C	35 ciclos
		1 minuto a 72°C	
Enlazado al	Programa 3	7 minutos a 72°C	
Enlazado al	Programa 4	4°C hasta el final	

- v) Se prepara una “mezcla madre” formada por agua, tampón 10× para PCR, los cuatro dNTP, los dos cebadores, MgCl<sub>2</sub> y AmpliTaq Gold (se supone la utilización de 1 µl de molde; si se usa más, se ajusta el agua adecuadamente). Se añade la mezcla a cada tubo. Se utilizan tubos de pared delgada diseñados para PCR. Se lleva a cabo siempre un control positivo y otro negativo

“Mezcla madre”:

H <sub>2</sub> O DD	32,5 µl × número de muestras
Tampón para PCR 10×	5 µl × número de muestras
dTTP 10 mM	1 µl × número de muestras
dATP 10 mM	1 µl × número de muestras
dCTP 10 mM	1 µl × número de muestras
dGTP 10 mM	1 µl × número de muestras
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µl × número de muestras
Cebador directo (100 ng µl <sup>-1</sup> )	1,5 µl × número de muestras
Cebador inverso (100 ng µl <sup>-1</sup> )	1,5 µl × número de muestras
AmpliTaq Gold	0,5 µl × número de muestras

Se agita esta solución en un vórtex para mezclar bien todos los reactivos; se mantiene en hielo.

NOTA: El volumen de la reacción de la PCR puede modificarse. Previamente, las reacciones de PCR para el VNHHI se llevaron a cabo en volúmenes de 100 µl, pero no es necesario utilizar esa cantidad de reactivos, y por tanto en este procedimiento se describen volúmenes de 50 µl. De igual forma, las reacciones de la PCR también pueden llevarse a cabo con volúmenes tan bajos como de 25 µl. Para ello, deberán aumentarse o disminuirse los volúmenes de los reactivos proporcionalmente.

- vi) Para una mezcla de reacción de 50 µl, añadir 49 µl de la mezcla madre a cada tubo y añadir posteriormente 1 µl de la muestra problema.
- vii) Se agita cada tubo en un vórtex, se centrifuga rápidamente para extraer todo el líquido. Si el termociclador no tiene tapa para evitar la condensación, se recubre cuidadosamente la parte superior de cada muestra con 25-50 µl de aceite mineral y se vuelven a tapar los tubos. Se insertan los tubos en el termociclador y se comienza el programa 1 (“inicio caliente”), que está enlazado con los ciclos de ciclado, extensión y finalización
- viii) Si se utiliza el aceite mineral, se recuperan las muestras de debajo utilizando pipetas de 50 µl y se transfieren a un tubo limpio. El uso de puntas en pipetas de tipo largo (diseñadas para cargar geles) permite arrastrar menos aceite con la muestra
- ix) Se ponen 10 µl de la muestra en un gel de agarosa al 1,5% (conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio para teñir el ADN). Se busca la banda de 389 pb (si se utilizan los cebadores 389F y 389R) o de 356 pb (si se utilizan los cebadores 77012F y 77353R). Las bandas no siempre se ven, ya que es necesario tener al menos 10 ng ADN/µl para ver el ADN en un gel. Para que la detección sea más sensible se puede llevar a cabo una inmunoelectrotransferencia del gel o una transferencia puntual. El ADN también se puede sedimentar (acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol al 100%, a -70°C, durante 1-3 horas, y se centrifuga durante 20 minutos) y resuspenderse en una décima parte del volumen (es decir, 4 µl) de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) o agua, y volverse a analizar en el gel o bien mediante transferencia puntual.

*Método de la PCR en tiempo real (qPCR) para el VNHHI:* Se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real para la detección del VNHHI. Estos métodos ofrecen una extraordinaria sensibilidad, que permite detectar incluso una única copia de la secuencia diana del genoma del VNHHI (Dhar *et al.*, 2001; Tang y Lightner, 2001).

El método de la qPCR en el que se utiliza la bioquímica de TaqMan descrito a continuación para el VNHHI se basa en general en el método utilizado en Tang y Lightner (2001).

- i) Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan se seleccionan de una región de la secuencia genómica del VNHHI (GenBank AF218266) que codifica la proteína no estructural. Los cebadores y la sonda TaqMan están diseñados por el sistema Primer Express (Applied Biosystems). Las secuencias del cebador en dirección 5' (VNHHI1608F) y en dirección 3' (VNHHI1688R) son: 5'-TAC-TCC-GCA-CACCCA- ACC-A-3' y 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3', respectivamente. La sonda TaqMan (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TATTTG-3'), que corresponde a la región derivada del nucleótido 1632 al 1644, se sintetiza y se marca con los colorantes fluorescentes 5-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5', y N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxiroadamina (TAMRA) en el extremo 3' (Applied Biosystems, parte nº 450025)
- ii) Preparación de ADN molde: la extracción y la purificación del ADN molde son las descritas en el apartado sobre la PCR tradicional.
- iii) La mezcla de reacción de la PCR contiene: mezcla madre TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems, parte nº 4324018), 0,3 µmol de cada cebador, 0,15 µmol de la sonda TaqMan, 5-50 ng de ADN, y agua en un volumen de reacción de 25 µl. Para optimizar los resultados, la mezcla de reacción debe agitarse en un vórtex y mezclarse bien.
- iv) La amplificación se lleva a cabo con el sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 (Applied Biosystems; también pueden utilizarse ABI PRISM 7000, 7300, o 7500 o equivalente). El programa de ciclos es el siguiente: activación del AmpliTaq Gold durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.
- v) Al final de la reacción, se toman medidas de fluorescencia en tiempo real con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD). Se establece un umbral por encima de la línea base que comienza a detectar el incremento en la señal asociada con un incremento exponencial del producto de la PCR. Las muestras se definirán como negativas si los valores del Ct (ciclo umbral) superan los 40 ciclos. Las muestras con un valor de Ct por debajo de los 40 ciclos se consideran positivas. Para confirmar los resultados de la PCR en tiempo real, una alícuota del producto de la PCR puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa-bromuro de etidio al 4% y fotografiarse. En las muestras que dan positivo para VNHHI puede visualizarse un fragmento de ADN de 81-pares de bases
- vi) Es necesario incluir un control "sin molde" en cada reacción. Esto se hace para excluir la presencia de contaminantes de fluorescencia en la mezcla de reacción o en el bloque de calor del termociclador. También debe incluirse un control positivo, que puede ser un plásmido que contenga la secuencia diana, o bien viriones purificados o ADN del tejido infectado con el VNHHI.

*Secuenciación:* Los productos de la PCR pueden clonarse y secuenciarse cuando sea necesario para confirmar la infección con el VNHHI, para identificar falsos positivos o amplificación inespecífica, o para diferenciar el producto amplificado de la forma infecciosa del virus y demostrar la presencia de la inserción de genoma no infeccioso del VNHHI en el ADN del hospedador (Tang y Lightner, 2002; 2006).

#### 4.3.2. Métodos serológicos

Los camarones son animales invertebrados y no producen anticuerpos. Por tanto, no se dispone de métodos serológicos para la detección de la NHHI.

## 5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, detección y diagnóstico del VNHHI 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 y/o no está disponible actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva, ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

**Tabla 5.1.** Vigilancia, detección y métodos de diagnóstico del VNHHI

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

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

## 6. Prueba(s) recomendada para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la PCR es el método recomendado para la vigilancia dirigida, por motivos de disponibilidad, utilidad y sensibilidad y especificidad diagnósticas.

Al estudiar episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia dirigida, poner de manifiesto lesiones patognomónicas inducidas por el VNHHI en el epitelio cuticular mediante histología (con o sin confirmación mediante ISH con sondas de ADN específicas del VNHHI) es un método adecuado (Tabla 5.1).

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso es aquel en el que se observa poco porcentaje de eclosión de huevos, y escasa supervivencia y rendimiento del cultivo de los estadios larvarios y PL (Motte *et al.*, 2003) cuando se utilizan reproductores de poblaciones salvajes o de piscifactoría donde el VNHHI es enzoótico.

En ejemplares de piscifactoría de *L. stylirostris*, los juveniles, subadultos y adultos pueden presentar altas mortalidades persistentemente. Los ejemplares infectados por el VNHHI de *L. vannamei*, *L. stylirostris*, y posiblemente *P. monodon* pueden presentar un crecimiento escaso y muy dispar, poco rendimiento del cultivo en general, y deformidades cuticulares, incluyendo especialmente rostros torcidos y los sextos segmentos abdominales deformados

Se observan cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos a basófilos pálidos en los tejidos diana típicos de la infección por el VNHHI. Como los cuerpos de inclusión intranucleares del VNHHI tienen un aspecto casi idéntico al de los que aparecen en los primeros estadios de las infecciones por el VSMB, su presencia en cortes de tejido debe considerarse como un diagnóstico provisional de VNHHI hasta que se confirme con una segunda prueba, como la transferencia por puntos o la ISH con sondas específicas de ADN para el VNHHI, o con resultados positivos en las pruebas de PCR para el VNHHI.

### 7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtienen resultados positivos en cualquier combinación de al menos dos de los siguientes cuatro métodos:



- Resultados positivos en hibridación por transferencia puntual para el VNHHI.
- Señal histológica positiva en la ISH para lesiones propias del VNHHI.
- Resultados positivos en la PCR para el VNHHI.
- Puede ser necesaria la secuenciación de productos específicos de la PCR cuando el objetivo sea determinar el genotipo del VNHHI.

## 8. Bibliografía

ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H. SWEENEY J. & LOTZ J. (1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV Disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of Shrimp Size on Disease Expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.

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.

BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of IHNV infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.

BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1991). Chapter 24. Unclassified Viruses of Crustacea. In: Atlas of Invertebrate Viruses, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 597–622.

BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.

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.

BONNICHON V., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 179–184.

BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.

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.

BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.

BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean Biol.*, **13**, 87–94.

CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.

CASTILLE F.L., SAMOCHA T.M., LAWRENCE A.L., HE H., FRELIER P. & JAENIKE F. (1993). Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*, **113**, 65–81.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S., & WITYACHUMNARNKUL. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress, Jory D.E., ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.
- DUDAT.F.JR.&PALUMBI S.R. (1999). Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar. Biol.*, **134**, 705–710.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANIHOFF 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. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.
- JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. 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, 295–302.
- KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquaculture Soc.*, **22**, 235–243.
- KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.
- LIGHTNER D.V. (1983). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. In: CRC Handbook of Mariculture. Vol. 1. Crustacean Aquaculture, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 289–320.
- 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. (1993). Diseases of penaeid shrimp. In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). 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. (1996b). The penaeid shrimp viruses IHHNV 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. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES Marine Science Symposia*, **194**, 97–105.
- LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture Soc.*, **18**, 196–197.
- LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. 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, 233–253.

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

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

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free (SPF) Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans, *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983). Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mariculture Soc.*, **14**, 212–225.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., WILLIAMS R.R., MOHNEY L.L., CLERX J.P.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1985). Recent advances in penaeid virus disease investigations. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture Soc.*, **16**, 267–274.

LOTZ, J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.

MARTINEZ-CORDOVA L.R. (1992). Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *The Progressive Fish Culturist*, **54**, 265–266.

MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B., & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J. World Aquaculture Soc.*, **30**, 192–200.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 330–334.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHNV parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.

PRIMAVERA, J.H. & QUINITIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.*, **20**, 796–802.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

ROCHE APPLIED SCIENCE (2006a). DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics. [www.roche-applied-science.com/frames/frame\\_publications.htm](http://www.roche-applied-science.com/frames/frame_publications.htm). Indianapolis, USA.

ROCHE APPLIED SCIENCE (2006b). DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide. Catalog Number 03 908 089 001. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA.

ROSEBERRY B. (2004). World Shrimp Farming 2004. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.

SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevdensoviruses. *Virology*, **277**, 167–177.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (2003). Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. *Aquaculture*, **216**, 19–29.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 93–97.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.

TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH, H.H. & LIGHTNER D.V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.

WEPPE M. (1992). Demonstration de altas cuaidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress, CENAIM, Guayaquil, Ecuador, 229–232.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). (2003). Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, Fourth Edition. OIE, Paris, France, 358 pp.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE, [www.oie.int](http://www.oie.int)).