

CAPÍTULO 2.2.10.

BACULOVIRIOSIS TETRAÉDRICA

(*Baculovirus penaei*)

1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la baculovirus tetraédrica se considera una infección por *Baculovirus penaei*. Un sinónimo es NPVCPv (nucleopoliedrovirus de envoltura única del camarón *Penaeus vannamei*).

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

Agente etiológico: *Baculovirus penaei* (BP), descrito por Couch (1974a; 1974b; 1989; 1991), Summers (1977), Overstreet (1994) y Bonami *et al.* (1995).

En el Octavo Informe del Comité Internacional de Taxonomía de Virus, Fauquet *et al.* (2005) detallan un listado de los virus MBV (virus de la baculovirus esférica) emparentados, como especies provisionalmente clasificadas en el género *Nucleopolyherdovirus*. Por tanto, el BP también debe considerarse una especie provisional de este género.

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

Cepas del agente patógeno: se han observado al menos tres cepas geográficas, que son las siguientes: 1) la de la costa sureste del Atlántico y del Golfo de México de EE.UU. y del Caribe; 2) la de la costa del Pacífico de Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica; y 3) la de Hawai (Brock *et al.*, 1986; Bruce *et al.*, 1993; Durand *et al.*, 1998).

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

No se dispone de datos

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

No se dispone de datos.

2.1.4. **Ciclo de vida**

No aplicable.

2.2. **Factores del hospedador**

2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

Se han notificado infecciones por BP en una o más especies de los siguientes géneros o subgéneros de camarones peneidos (los segundos están entre paréntesis): *Penaeus* (*Litopenaeus*), (*Farfantepenaeus*), (*Fenneropenaeus*), (*Melicertus*), (*Penaeus*), *Trachypenaeus* y *Protrachypene* (Bueno *et al.*, 1990; Durand *et al.*, 1998; Le Blanc *et al.*, 1991; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1989; Machado *et al.*, 1995; Overstreet, 1994). Todas las especies de peneidos son posibles hospedadoras (Lightner, 1996; 1999; Overstreet, 1994).

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

Todos los estadios de la vida del hospedador son susceptibles a la infección por BP, excepto los huevos y las larvas nauplias.

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

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

BP es estrictamente entérico e infecta a las células epiteliales de las mucosas de los túbulos del hepatopáncreas y del intestino medio anterior (Brock y Lightner, 1990; Couch, 1974a; Couch, 1991; Johnson y Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Es frecuente observar infecciones persistentes en camarones peneidos hospedadores de BP. Las hembras adultas salvajes de *P. vannamei* que están intensamente infectadas por BP excretan heces contaminadas con BP al desovar, y de este modo contaminan los huevos y transmiten el virus a la siguiente generación (Johnson y Lightner, 1988; Lightner, 1996).

2.2.6. Vectores

No se conoce ninguno en las infecciones naturales, pero las larvas nauplias de los rotíferos *Brachionus plicatilis* y *Artemia salina* se utilizaron como portadores pasivos de BP para liberar el virus a estadios larvarios de *P. vannamei* en infecciones experimentales (Overstreet *et al.*, 1988; Stuck y Wang 1996).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se ha observado ninguno.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de BP es horizontal, por ingesta de tejido infectado (canibalismo), heces, cuerpos de oclusión o detritos o agua contaminados (Johnson y Lightner, 1988; Lightner, 1996; Overstreet *et al.*, 1988).

2.3.2. Prevalencia

Es muy variable, y va de <1% en poblaciones salvajes y de piscifactoría a incluso el 100% en poblaciones de piscifactoría en tanques de cría de larvas y en estanques de precriaderos (Brock y Lightner 1990; Lightner, 1996).

2.3.3. Distribución geográfica

BP es enzoótico en peneidos salvajes de las Américas y de Hawai. No se ha notificado en camarones peneidos salvajes ni de piscifactoría del hemisferio oriental, a pesar de las cuantiosas introducciones de peneidos de las Américas en Asia y en la región del Indo-Pacífico (Bobdad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 1986; Lightner, 1996).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Los estadios larvarios (en concreto los protozoos y los misis) y las postlarvas (PL) tempranas resultan infectados con mayor facilidad en estudios de desafío de laboratorio (Bruce *et al.*, 1994a; Hammer *et al.*, 1998; Le Blanc y Overstreet 1990; Overstreet *et al.*, 1988; Stuck y Overstreet 1994; Stuck *et al.*, 1996; Stuck y Wang 1996) y son los estadios en los que es probable que tengan lugar las máximas mortalidades en viveros de camarones peneidos. Es poco habitual observar mortalidades altas como consecuencia de una infección por BP en los juveniles y los adultos, pero en las piscifactorías de camarones la infección podría causar un mal crecimiento y una reducción de la supervivencia en los estanques de precriadero o de engorde (Brock y Main 1994; Lightner, 1996; Overstreet, 1994).

2.3.5. Factores ambientales

No se dispone de datos.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se han desarrollado métodos eficaces de vacunación contra BP.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

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

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes confirmados científicamente de tratamientos inmunoestimulantes eficaces.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Se ha demostrado el potencial de la selección genética para crear resistencia contra BP.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

No es aplicable a BP.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No se han documentado agentes bloqueantes.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Se ha observado la inactivación de BP mediante desinfectantes, pH bajos, calor y radiación UV (Le Blanc y Overstreet, 1991).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Viveros: se han aplicado varias prácticas de manejo para la prevención de las infecciones por BP y de la enfermedad que causa. El pre-cribado de reproductores en cuanto a BP ha tenido cierta eficacia en la detección de portadores intensamente infectados por el virus, y por tanto en la reducción de la transmisión de la enfermedad de los progenitores a la descendencia. Con métodos de análisis no letales, esto se consigue mediante un examen microscópico simple de hebras fecales (o aplicando la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] a hebras fecales si se dispone de instalaciones para llevar a cabo una PCR). Como alternativa, pueden sacrificarse reproductores viejos tras el desove y examinarse aplastamientos de hepatopáncreas mediante microscopía óptica simple (o bien analizarse hepatopáncreas extirpados mediante PCR) para determinar el estado de infección por BP en los reproductores. Dado que el BP se transmite de adultos a la descendencia por contaminación fecal de los huevos desovados, puede llevarse a cabo una prevención de la infección en los viveros aplicando otros pasos para eliminar la contaminación fecal de los huevos desovados y las larvas lavando a fondo las larvas nauplias y los huevos con formalina, yodóforos y agua de mar limpia (Chen *et al.*, 1990). La desinfección sistemática de los huevos desovados por reproductores infectados o potencialmente infectados ha reducido la incidencia de las epizootias de BP en los viveros (Lightner y Redman, 1998).

Precriaderos y estanques de engorde: En estanques de tierra de la zona de las Américas donde el virus es enzoótico (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996) siguen produciéndose infecciones por BP de manera frecuente, pero la incidencia y la prevalencia de BP podrían reducirse en estanques de viveros y de engorde revestidos.

3. Obtención de muestras**3.1. Elección de ejemplares**

Las muestras adecuadas para la detección de la infección por BP utilizando métodos moleculares (como la PCR, la hibridación *in situ*, etc.) son las postlarvas (PL), los juveniles y los adultos, cuando se dispone de tejidos u órganos entéricos. Aunque BP podría infectar a cualquier estadio de vida, la gravedad de la infección, y por tanto la carga vírica, podría estar bajo los límites de detección en los huevos desovados y en los estadios larvarios, de modo que estos estadios de vida podrían no ser muestras adecuadas para la detección de BP ni para la certificación de la ausencia de la enfermedad causada por BP.

3.2. Conservación de muestras para su envío

En cuanto a la conservación de las muestras para la histología o las pruebas moleculares sistemáticas, y para obtener orientación sobre cómo conservar las muestras para las pruebas previstas, consúltese el Capítulo 2.2.0.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras que se toman para pruebas moleculares pueden combinarse formando muestras compuestas que representen no más de cinco ejemplares por muestra de juveniles, subadultos o adultos. Sin embargo, en el caso de los huevos, las larvas y las postlarvas (PL), para obtener suficiente material (ácido nucleico extraído) como para ejecutar una prueba diagnóstica, tal vez sea necesario combinar cantidades mayores (por ejemplo, ~150 huevos o larvas o más, o unas 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Consúltese también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos o tejidos de elección

BP es un virus entérico y puede detectarse en el hepatopáncreas.

Pueden obtenerse muestras fecales cuando se requiere aplicar pruebas no letales (por ejemplo, si es preciso un análisis no letal de reproductores de alto valor).

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

BP es un virus entérico (infecta el hepatopáncreas, el intestino medio o sus ciegos) y no se replica a nivel sistémico.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Consúltese el Apartado 4.2, donde se ofrece una descripción de los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones infectados con BP.

- **Examen mediante microscopía directa**

- *Preparaciones húmedas de tejido fresco:* el diagnóstico de infecciones por BP se lleva a cabo mediante la observación de cuerpos de oclusión tetraédricos únicos o múltiples en núcleos de células epiteliales en preparaciones de aplastamientos de hepatopáncreas o intestino medio que se examinan por microscopía de contraste de fases o de campo claro. La forma tridimensional de los cuerpos de oclusión es tetraédrica o piramidal, y su tamaño oscila entre menos de 0,1 µm y casi 20 µm desde la base de la pirámide al pico, con una longitud vertical modal de 8 µm. En algunas publicaciones, los cuerpos de oclusión de BP se denominan PIB (cuerpos de inclusión poliédricos) (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock y Main 2006; Lightner, 1996).
- *Preparaciones húmedas de hebras frescas:* Este método no letal podría utilizarse para realizar un cribado de los reproductores en cuanto a BP. El método puede aplicarse a juveniles o a camarones de más edad, y tal vez sea el método no letal más útil para el cribado de reproductores de alto valor. Las muestras fecales de camarones a analizar pueden obtenerse colocando el camarón en un acuario, un tanque de desovado u otros tanques adecuados durante unas pocas horas hasta que aparezcan hebras fecales en el fondo del estanque. Las hebras fecales se obtienen mejor utilizando una manguera de plástico transparente con sifón (lo ideal es un conducto de aire acoplado a un corte de una pipeta de plástico a modo de punta), introduciéndolas en un vaso de precipitados, un vaso u otro recipiente adecuado. Las hebras fecales podrían depositarse en preparaciones húmedas, y puede averiguarse si contienen cuerpos de oclusión mediante microscopía directa. Los cuerpos de oclusión de BP son tetraedros prominentes y refringentes, cuyo tamaño oscila entre apenas visibles y casi los 20 µm de altura (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock y Main 2006; Lightner, 1996).
- Las heces obtenidas también podrían utilizarse como muestra para el análisis no letal de detección de BP mediante PCR. La PCR proporcionará una mayor sensibilidad diagnóstica en infecciones de bajo grado que el examen mediante microscopía directa (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner y Redman 1998).

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Aparte del letargo en las PL intensamente afectadas, no se ha observado ningún otro cambio de comportamiento en los hospedadores infectados.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

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

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Consúltese el apartado 4.2.6.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Consúltese el apartado 4.1.1.

4.2.5. Frotis

No es aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Histopatología: puede utilizarse histología para lograr un diagnóstico definitivo de infección por BP. Dado que la formalina tamponada al 10% y otros fijadores en el mejor de los casos aportan una fijación mediocre del hepatopáncreas del camarón (el principal órgano diana de BP y de otras infecciones por baculovirus en los camarones peneidos), se recomienda claramente utilizar fijador de Davidson (que contenga un 33% de alcohol etílico [al 95%], un 20% de formalina [con alrededor de un 37% de formaldehído], un 11,5% de ácido acético glacial y un 33,5% de agua destilada o de grifo) para todos los estudios histológicos sistemáticos de camarones (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner y Redman 1998). Para observar los cuerpos de oclusión tetraédricos patognomónicos (de BP) en los hepatopancreatocitos, las células epiteliales del intestino o el lumen intestinal pueden utilizarse tinciones histológicas habituales, como la de hematoxilina/eosina de Mayer-Bennett o de Harris (Bonami *et al.*, 1995; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996). Lo habitual es que las células hepatopancreáticas (o, en ocasiones, las del intestino medio) infectadas por BP presenten núcleos considerablemente hipertrofiados con uno o, lo más habitual, múltiples cuerpos de oclusión eosinófilos, con una cromatina escasa y dispuesta en los márgenes (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996). Los cuerpos de oclusión pueden teñirse de un rojo brillante con las tinciones de H/E, y de forma intensa, aunque variable, en el caso de las tinciones de Gram. Así, por ejemplo, la tinción de Gram histológica de Brown y Brenn, aunque no es específica para los cuerpos de oclusión de los baculovirus, tiende a teñir las oclusiones más intensamente (de rojo o morado, en función del espesor de la preparación, de la duración del cambio de color, etc.) que el tejido circundante, lo cual puede contribuir a demostrar su presencia en infecciones de poca intensidad (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock y Lightner 1990; Lightner, 1996).

Método de la autofluorescencia con tinción de floxina: otro método para detectar cuerpos de oclusión de BP se basa en la fluorescencia de los cuerpos de oclusión teñidos con floxina. Puede añadirse floxina al 0,001% a preparaciones de aplastamientos de tejido para crear preparaciones húmedas de hepatopáncreas o heces con el fin de examinarlas mediante microscopía directa. Los cortes histológicos teñidos con H/E sistemática que contenga floxina al 0,005% también son adecuados para este procedimiento. Las oclusiones de BP de las preparaciones húmedas de aplastamientos de tejido, de heces o de cortes histológicos emiten fluorescencia de un color verde amarillento brillante sobre un fondo verde pálido bajo epi-fluorescencia (filtro barrera de 0-515 nm y filtro de excitación de 490 nm). Los demás elementos de los tejidos y los cuerpos de oclusión de los baculovirus de los insectos no emiten fluorescencia con este método. Así, el método permite un diagnóstico rápido y específico (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996).

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

4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

La infección por BP puede confirmarse mediante observación del virus (o cuerpos de oclusión patognomónicos) en los cortes, o por la observación del virus en preparaciones de virus

semipurificadas preparadas a partir de hepatopáncreas (Couch 1974; 1991; Johnson y Lightner, 1988).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.1.1.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.1.2.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.6.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Ninguno documentado hasta ahora.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

Métodos basados en anticuerpos: se han desarrollado anticuerpos policlonales para la detección de BP (Lightner, 1996), pero no se dispone de ninguno para el diagnóstico sistemático de infecciones por BP.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Hibridación *in-situ*: el método de la hibridación *in-situ* en el que se utiliza una sonda de ADN marcada con DIG sigue en general los métodos descritos por Poulos *et al.* (1994) y Lightner (1996), y se describen a continuación.

- i) Se incluye en parafina el tejido fijado con solución de Davidson, y se realizan cortes de 4 µm o menos de espesor. Se sitúan los cortes sobre portas de microscopio cargados positivamente. No se debe utilizar gelatina en agua para hacer flotar los cortes; se debe utilizar solo agua destilada o desionizada.
- ii) Se calientan los portas durante 30–45 minutos a 60°C. Se rehidrata el tejido del siguiente modo:

Xileno (o sustituto adecuado)	3×	5 minutos cada uno
Alcohol absoluto	2×	1 minuto cada uno
Alcohol al 95%	2×	10 inmersiones cada uno
Alcohol al 80%	2×	10 inmersiones cada uno
Alcohol al 50%	1×	10 inmersiones cada uno
Agua destilada	6×	10 inmersiones cada uno (no dejar secar los portas)
- iii) Se pipetea 500 µl de proteinasa K a una concentración de 100 g/ml recién preparada en tampón TNE. Se incuban durante 15 minutos a 37°C.
- iv) Se lavan los portas en formaldehído frío al 0,4% durante 5 minutos.
- v) Se lavan los portas en SSC 2x durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- vi) Se prehibridan los portas utilizando 500 µl de tampón de hibridación y se incuban durante 30 minutos a 42°C en una cámara de hibridación.
- vii) Se diluye una sonda específica marcada con DIG en tampón de hibridación hasta la concentración adecuada y se hierve durante 10 minutos. Se enfría de inmediato sobre hielo durante 5 minutos.
- viii) Se pipetea 500 µl de sonda sobre el porta. Se sitúa sobre un bloque caliente a 85°C durante 6-7 minutos. Se enfrían inmediatamente los portas sobre hielo durante 5 minutos. Se incuban durante toda la noche a 42°C en una cámara de hibridación.

- ix) Se lavan los portas del siguiente modo:
- | | | |
|----------|-----|-----------------------------------|
| SSC 2x | 2 × | 15 minutos a temperatura ambiente |
| SSC 1x | 2 × | 5 minutos a 42°C |
| SSC 0,5x | 2 × | 15 minutos a 42°C |
| Tampón I | 1 × | 15 minutos a temperatura ambiente |
- x) Se pipetea 500 µl de tampón II (Tampón bloqueante). Se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- xi) Se pipetea 250 µl de anticuerpo anti-DIG-AP (se diluye 1 µl en 1 ml de Tampón II). Se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- xii) Se lavan los portas del siguiente modo:
- | | | |
|------------|----|-----------------------------------|
| Tampón I | 2× | 10 minutos a temperatura ambiente |
| Tampón III | 1× | 5 minutos a temperatura ambiente |
- xiii) Se mezclan 4,5 µl de NBT (nitroazul de tetrazolio) y 3,5 µl de X-fosfato (fosfato de bromocloro-indoil) por cada ml de Tampón III que contenga alcohol polivinílico al 1%. Se pipetea 500 µl sobre cada porta y se incuban durante 1-3 horas en oscuridad a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- xiv) Se detiene la reacción de color aplicando Tampón IV durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- xv) Se lleva a cabo una tinción de contraste de los portas y se rehidratan del siguiente modo:
- | | | |
|-------------------------------|----|-------------------------|
| Agua destilada | 1× | 10 inmersiones |
| Bismarck Brown al 0,5% | 1× | 2-5 minutos |
| Alcohol al 95% | 3× | 10 inmersiones cada uno |
| Alcohol absoluto | 3× | 10 inmersiones cada uno |
| Xileno (o sustituto adecuado) | 4× | 10 inmersiones cada uno |
- xvi) Las preparaciones se montan con Permount y un cubreobjetos. Se averigua si presentan precipitado morado/negro asociado a células.

Notas:

- Este protocolo puede llevarse a cabo en una incubadora diseñada para la hibridación *in-situ*, o bien puede utilizarse un deshidratador de alimento como fuente de calor para la cámara de la incubación *in-situ*. Los portas pueden colocarse en cajas de pipeta, con agua en el fondo, cerradas y situadas en el deshidratador. Es importante controlar la temperatura y la humedad atmosférica.
- El paso de la hibridación (viii) puede llevarse a cabo utilizando un cubreobjetos para reducir la evaporación. Si se utiliza un cubreobjetos, el volumen de sonda puede reducirse a 250 µl.
- El paso del calentamiento a 85°C es necesario para desnaturalizar el genoma de ADN bicatenario. Cuando no se desarrollan reacciones, la causa más habitual es un calentamiento insuficiente del genoma.
- Se precisa proteinasa K para eliminar la unión de la proteína al ácido nucleico y para aumentar la unión de la sonda al ácido nucleico.
- Las fórmulas de los tampones utilizados en este proceso se detallan en el apartado sobre reactivos (abajo).

Reactivo y tampones para el método de la hibridación *in-situ*.

- i) Tampón Tris/NaCl/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (TNE) 10×

Tris base 0,5	60,57 g
NaCl 100 mM	5,84 g
EDTA-2 H ₂ O 1 mM	3,72 g
H ₂ O DD	900 ml

pH a 7,4 con HCl concentrado o 5 M. C.s.p. 1 litro. Se esteriliza en autoclave. Se guarda a 4°C. Para obtener TNE 1x, se diluyen 100 ml de solución madre 10× en 900 ml de H₂O DD; se filtran solución 1× por un filtro de 0,45 µm.

- ii) Lisozima, 100 µg/ml (se prepara justo antes de utilizar)

TNE 1x	10 ml
Lisozima	1 mg

- iii) Proteínasa K, 100 µg/ml (se prepara justo antes de utilizar)

TNE 1x	10 ml
Proteínasa K	100 µl de solución madre de proteínasa K (10 mg/ml)

Solución madre de PK: se añaden 100 mg de proteínasa K a 10 ml de H₂O DD. Se dispensan 100 µl en el interior de tubos y se guarda a -20°C. Se prepara la concentración de trabajo (100 µg/ml) justo antes de utilizar.

- iv) Formaldehído al 0,4%

Formaldehído al 37%	5,4 ml
H ₂ O DD	500 ml

Se guarda a 4°C; puede volver a utilizarse 5 veces o se guardase durante 3 meses antes de desecharse.

- v) Tampón de hibridación (50 ml de volumen final)

SSC 4x	10 ml de SSC 20x
Formamida al 50%	25 ml de formamida al 100%
Solución de Denhardt 1x	2,5 ml de solución de Denhardt 20x
ADN de esperma de salmón a 0,5 mg/ml	2,5 ml de solución de 10 mg/ml
Sulfato de dextrano al 5%	10 ml de sulfato de dextrano al 25%
Se guarda a 4°C	

- vi) Tampón SSC 20x

NaCl 3 M	175,32 g
Citrato de Na dihidratado 0,3 M	88,23 g
H ₂ O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 7,0; se esteriliza en autoclave; se guarda a 4°C.

Para obtener SSC 2x, se diluyen 100 ml de SSC 20x en 900 ml de H₂O DD; para obtener SSC 1x, se diluyen 50 ml de SSC 20x en 950 ml de H₂O DD; para obtener SSC 0,5x, se diluyen 50 ml de SSC 20x en 1.950 ml de H₂O DD. Se filtran las soluciones por un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

- vii) Solución de Denhardt 20x

BSA (Fracción V)	0,4 g de albúmina de suero bovino
Ficoll 400	0,4 g de solución Ficoll
PVP 360	0,4 g de polivinilpirrolidona
H ₂ O DD	100 ml

Se filtra con un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

- viii) Sulfato de dextrano al 25%

Sulfato de dextrano	25 g
H ₂ O DD	C.s.p. 100 ml

Se calienta con calor suave removiendo hasta que se disuelva; se guarda congelado.

- ix) ADN de esperma de salmón (10 mg/ml)

ADN de esperma de salmón	0,25 g
H ₂ O DD	25 ml

Se añade lentamente ADN al agua en un vaso de precipitados con una barra de agitación. Se calienta y remueve hasta que se disuelva el ADN, añadiendo más hasta que todo el ADN esté disuelto. Se esteriliza en autoclave. Se dispensa en tubos estériles. Se guarda a -20°C.

- x) Tampón I 10x

Tris base 1 M	121,1 g
NaCl 1,5 M	87,7 g
H ₂ O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 7,5 con HCl. Se esteriliza en autoclave; se guarda a 4°C.

Para obtener Tampón I 10x, se diluyen 100 ml de solución madre 10x en 900 ml de H₂O DD. Se filtran por un filtro de 0,45 µm; se guardan a 4°C.

xi) Tampón II (tampón bloqueante y Tampón de Dilución Ab)

Reactivo Genius 11	0,5 g
Tampón I	100 ml

Se calienta con calor suave removiendo durante 30 minutos para disolverlo. La solución será turbia, pero sin partículas. Se guarda a 4°C hasta un máximo de 2 semanas.

xii) Tampón III

Tris base 100 mM	12,1 g
NaCl 100 mM	0,58 g
H ₂ O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 9,5 con HCl
A continuación añadir:

MgCl ₂ ·6H ₂ O 50 mM	16,10 g
--	---------

Se filtra por un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

xiii) Alcohol polivinílico (PVA) al 10%

Alcohol polivinílico (30.000–70.000 MW)	10 g
H ₂ O DD	100 ml

Se remueve el PVA y calentarlo, si es necesario, para que disuelva. Se dispensan 10 ml/tubo. Se guardan a -20°C.

xiv) Solución de revelado

Se mezclan 90 ml de Tampón III con 10 ml de PVA al 10% y se guardan a 4°C. Justo antes de utilizar, por cada ml de Tampón III con PVA se añade:

Sal de nitroazul de tetrazolio	4,5 µl de NBT (75 mg/ml en dimetilformamida al 70%)
Sal fosfato de toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indoil	3,5 µl de X-fosfato (50 mg/ml en dimetilformamida)

xv) Tampón IV 10x

Tris base 10 mM	1,21 g
EDTA·2H ₂ O 1 mM	3,7 g
H ₂ O DD	C.s.p. 1.000 ml

pH a 8,0 con HCl 5 N. Se esteriliza en autoclave; se guarda a 4°C.

Para obtener Tampón IV 1x, se diluyen 100 ml de solución madre 10x en 900 ml de H₂O DD. Se filtra por un filtro de 0,45 µm; se guarda a 4°C.

xvi) Marrón Bismarck Y al 0,5%

Marrón Bismarck Y	2,5 g
H ₂ O DD	500 ml

Se disuelve la tinción en agua. Se filtra por un filtro Whatman N° 1; se guarda a temperatura ambiente.

• *Métodos de la reacción en cadena de la polimerasa:*

El protocolo aquí descrito es una modificación del de Wang *et al.* (1996).

Muestras adecuadas: hepatopáncreas extirpado, larvas o PL enteras (combinadas), o heces. Las muestras pueden ser frescas, congeladas conservadas en etanol al 90% o en otros conservantes diseñados para la conservación de muestras destinadas a la amplificación del ADN.

Se han hallado sustancias en el hepatopáncreas y en las heces de los camarones que inhiben la polimerasa del ADN utilizada en la prueba de la PCR. Por tanto, para poder utilizar con éxito la PCR para detectar BP es necesaria una extracción previa del ADN.

Extracción del ADN

Los kits de extracción de ADN son cómodos y pueden adquirirse comercialmente. Como alternativa, puede aplicarse un procedimiento de extracción de ADN como el siguiente:

- i) Se añade una muestra de heces o de hepatopáncreas al tampón de digestión (con una proporción de muestra/tampón de alrededor de 1/10 en un máximo de 400 µl de tampón) que contenga KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM, a pH 8,3, 0,1 mg/ml de gelatina, un 0,45% de Nonidet P-40, un 0,45% de Tween 20 y 80 µg/ml de proteinasa K, aplastada y dispersada con un palillo de madera o una punta de pipeta.
- ii) Tras dispersar la muestra en el tampón de digestión, se calienta a 60°C durante 1 hora y a continuación a 95°C durante 10 minutos.
- iii) Se centrifuga a 12.000 **g** durante 2 minutos, se transfiere el líquido sobrenadante a un tubo nuevo y se guarda sobre hielo.
- iv) Se extraen 50 µl de la muestra digerida y se diluyen con 150 µl de tampón de dilución (Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM) y se extrae con 200 µl de fenol/alcohol isoamílico/cloroformo (PIC) (25/1/24).
- v) Tras someter la muestra al vórtex durante 5 segundos, se deja el tubo 5 minutos y después se centrifuga a 12.000 **g** durante 2 minutos.
- vi) Se extraen 160 µl de la fase acuosa (superior) y se transfieren a un nuevo tubo de microcentrifuga.
- vii) El paso de extracción puede repetirse si es necesario.
- viii) Se precipita el ADN añadiendo 20 µg de glucógeno (1 µl de una solución madre de 20 mg/ml), 65 µl de una solución de acetato de amonio 7,5 M y 390 µl de etanol, se guarda a -20°C durante más de 1 hora, y después se sedimenta el ADN mediante centrifugación a 12.000 **g** durante 5 minutos.
- ix) Se lava el sedimento de ADN con 200 µl de etanol al 70% para eliminar el acetato de amonio residual, se seca y a continuación se disuelve el sedimento de ADN en 30 µl de tampón de dilución o agua destilada antes de añadir la muestra (molde) a la mezcla de reacción de la PCR y empezar la PCR.

Método de la PCR (Wang et al., 1996)

Cebadores: tres cebadores directos y tres inversos escogidos de un segmento de ~1.430 pares de bases (pb) del gen de la polihedrina de BP indicados por Wang *et al.* (42). Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

BPA	5'-GAT-CTG-CAA-GAG-GAC-AAA-CC-3'	Temperatura 61°C
BPB	5'-ATC-GCT-AAG-CTC-TGG-CAT-CC-3'	Temperatura 64°C
BPD	5'-TGT-TCT-CAG-CCA-ATA-CAT-CG-3'	Temperatura 62°C
BPE	5'-TAC-ATC-TTG-GAT-GCC-TCT-GC-3'	Temperatura 63°C
BPF	5'-TAC-CCT-GCA-TTC-CTT-GTC-GC-3'	Temperatura 68°C
BPG	5'-ATC-CTG-TTT-CCA-AGC-TCT-GC-3'	Temperatura 64°C

Las combinaciones de estos cebadores amplifican segmentos de ADN molde de BP de: BPA/BPF – 196 pb; BPA/BPB – 560 pb; BPA/BPG – 933 pb; BPD/BPB – 207 pb; BPD/BPG – 580 pb; y BPE/BPG – 221 pb.

El siguiente procedimiento de PCR se adaptó de Wang *et al.* (1996):

- i) Para la PCR de detección de BP, se desnaturaliza el ADN de cada muestra extraída calentándolo en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos, y a continuación se enfría al momento en agua con hielo.
- ii) Se añaden 25 µl de mezcla de reacción que contenga cada cebador a una concentración 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM y 0,5–1 unidad de ADN polimerasa.
- iii) Tras calentar la mezcla de reacción durante 3 minutos a 95°C, se llevan a cabo 30 ciclos de PCR (un paso de fusión del ADN a 94°C, un paso de hibridación del cebador a 60°C y un paso de elongación a 72°C) seguidos de un paso de elongación de 5 minutos a 72°C.
- iv) Los productos de la PCR resultantes pueden compararse con estándares moleculares mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% o bien pueden analizarse para determinar si los contienen mediante una sonda de ADN específica del fragmento, siguiendo una inmunoelectrotransferencia.
- v) Los siguientes controles deben incluirse en toda prueba de PCR de detección de BP: una muestra de tejido o fecal que se sepa que es negativa; una muestra de tejido o fecal que se

sepa que es positiva (esta puede ser el clon de ADN a partir del cual se ha diseñado un conjunto específico de cebadores), y un control “no molde”.

Método alternativo utilizado por el Laboratorio de Referencia de la OIE en la Universidad de Arizona (no publicado). Deben utilizarse los tipos de muestra y los métodos de extracción descritos arriba.

Cebadores: el par de cebadores, uno directo y uno inverso (6581F/6582R) escogidos del clon IR36 (denominado B1.23 por Bonami *et al.*, (1995) y depositado en el GenBank con número de acceso DQ496179) produce un amplicón de 644 pb. Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

6581 5'-TGT-AGC-AGC-AGA-GAA-GAG-3'

6582 5'-CAC-TAA-GCC-TAT-CTC-CAG-3'

Método:

Mezcla de reacción de la PCR:

Reactivo	25 µl de mezcla de reacción	25 µl de perlas de PCR*	Conc. final
dH ₂ O	16,5 µl	23,0 µl	
Tampón 10x	2,5 µl		1x
dNTP	0,5 µl de cada		200 µM cada una
Cebador A	0,5 µl	0,5 µl	0,31 µM
Cebador B	0,5 µl	0,5 µl	0,31 µM
MgCl ₂	1,5 µl		1,5 µM
Enzima	0,5 µl		2,5 U
Molde	1,0 µl	1,0 µl	

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

Parámetros de ciclado de la PCR:

Cebadores	Mezcla/Perlas	Tiempo	Temp. °C	Nº de ciclos
6581/6582	Mix/Perlas*	5 minutos	95	1
		30 segundos, 30 segundos, 1 minuto	95, 60, 72	35
		7 minutos	72	1
			0,5 µl	0,31 µM

4.3.1.2.4. Purificación del agente patógeno

Ninguna

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de BP 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 de la *Baculovirus tetraédrica* (*Baculovirus penaeid*)

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

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

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de baculovirus tetraédrica (*Baculovirus penaeid*)

Resultados negativos en las pruebas de detección de BP durante dos años, utilizando:

- PCR realizada en muestras del tipo y tamaño muestral adecuados; y/o
- Preparación húmeda y/o resultados histológicos en los que no se observen cuerpos de inclusión tetraédricos en muestras del tipo y tamaño adecuados.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

En el caso de larvas (sobre todo protozoos, misis y PL tempranas): mortalidad con larvas que presenten intestinos medios blancos. En el caso de juveniles: mal crecimiento en poblaciones con antecedentes de infección por BP.

7.2. Definición de caso confirmado

Resultados positivos en cualquier combinación de al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Observación mediante microscopía de cuerpos de occlusión tetraédricos en preparaciones húmedas de larvas enteras o hepatopáncreas extirpados. En el caso de PL más tardías, juveniles o adultos: cuerpos de occlusión tetraédricos evidentes en preparaciones húmedas de aplastamientos y/o en cortes histológicos de hepatopáncreas o en heces.
- Señal histológica positiva en la hibridación *in-situ* para lesiones propias de BP (es decir, núcleos hipertrofiados con o sin cuerpos de occlusión tetraédricos patognomónicos).
- Resultados de PCR positivos para BP

8. Bibliografía

BONAMI J.R., BRUCE L.D., POULOS B.T., MARI J. & LIGHTNER D.V. (1995). Partial characterisation and cloning of the genome of PvSNPV (= BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 59–66.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I., SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of crustacea. Diseases caused by microorganisms. *In: Diseases of Marine Animals*, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.

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, Honolulu, Hawaii, USA. 242 pp.

BROCK J.A., NAKAGAWA L.K., VAN CAMPEN H., HAYASHI T. & TERUYA S. (1986). A record of *Baculovirus penaei* from *Penaeus marginatus* Randall in Hawaii. *J. Fish Dis.*, **9**, 353–355.

BRUCE L.D., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & STUCK K.C. (1994). Application of traditional and molecular detection methods to experimental studies on the development of *Baculovirus penaei* (BP) infections in larval *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **6**, 355–359.

BRUCE L.D., REDMAN R.M., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (1993). Application of gene probes to detect a penaeid shrimp baculovirus in fixed tissue using *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 215–221.

BUENO S.L.S., NASCIMENTO R.M. & NASCIMENTO I. (1990). *Baculovirus penaei* infection in *Penaeus subtilis*: A new host and a new geographic range of the disease. *J. World Aquaculture Soc.*, **21**, 235–237.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1990). 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.

COUCH J.A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invertebr. Pathol.*, **24**, 311–331.

COUCH J.A. (1991). Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 2. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Invertebrates Other Than Insects. *In: Atlas of Invertebrate Viruses*, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 205–226.

DURAND S., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (1998). Differentiation of BP-type baculovirus strains using *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **32**, 237–239.

HAMMER H.S., STUCK K.C. & OVERSTREET R.M. (1998). Infectivity and pathogenicity of *Baculovirus penaei* (BP) in cultured larval and postlarval Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, related to the stage of viral development. *J. Invertebr. Pathol.*, **72**, 38–43.

JOHNSON P.T. & LIGHTNER D.V. (1988). Rod-shaped nuclear viruses of crustaceans: gut-infecting species. *Dis. Aquat. Org.*, **5**, 123–141.

- LE BLANC B.D. & OVERSTREET R.M. (1990). Prevalence of *Baculoviruspenaei* in experimentally infected white shrimp (*Penaeusvannamei*) relative to age. *Aquaculture*, **87**, 237–242.
- LE BLANC B.D. & OVERSTREET R.M. (1991). Effect of desiccation, pH, heat and ultraviolet irradiation on viability of *Baculoviruspenaei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **57**, 277–286.
- LE BLANC B.D., OVERSTREET R.M. & LOTZ J.M. (1991). Relative susceptibility of *Penaeusztecus* to *Baculoviruspenaei*. *J. World Aquaculture Soc.*, **22**, 173–177.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Applied Aquaculture*, **9**, 27–52.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & ALMADA RUIZ E.A. (1989). *Baculoviruspenaei* in *Penaeusstylirostris* (Crustacea: Decapoda) cultured in Mexico: unique cytopathology and new geographic record. *J. Invertebr. Pathol.*, **53**, 137–139.
- MACHADO C.R., BUENO S.L. DE S. & MENCK C.F.M. (1995). Cloning shrimp *Baculoviruspenaei* DNA and hybridization comparison with *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus. *Rev. Brasil. Genet. (Brazil. J. Genetics)*, **18**, 1–6.
- OVERSTREET R.M. (1994). BP (*Baculoviruspenaei*) in penaeid shrimps. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL Special Publication No. 1, 97–106.
- OVERSTREET R.M., STUCK K.C., KROL R.A. & HAWKINS W.E. (1988). Experimental infections with *Baculoviruspenaei* in the white shrimp *Penaeusvannamei* as a bioassay. *J. World Aquaculture Soc.*, **19**, 175–187.
- POULOS B.T., MARI J., BONAMI J.R., REDMAN R., & LIGHTNER D.V. (1994). Use of non-radioactively labeled DNA probes for the detection of a baculovirus from *Penaeusmonodon* by in situ hybridization on fixed tissue. *J. Virol. Methods*, **49**, 187–194.
- STUCK K.C. & OVERSTREET R.M. (1994). Effect of *Baculoviruspenaei* growth and survival of experimentally infected postlarvae of the Pacific white shrimp, *Penaeusvannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **64**, 18–25.
- STUCK K.C., STUCK L.M., OVERSTREET R.M. & WANG S.Y. (1996). Relationship between BP (*Baculoviruspenaei*) and energy reserves in larval and postlarval Pacific white shrimp *Penaeusvannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 191–198.
- STUCK K.C. & WANG S.Y. (1996). Establishment and persistence of *Baculoviruspenaei* infections in cultured Pacific white shrimp *Penaeusvannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **68**, 59–64.
- SUMMERS M.D. (1977). Characterization of Shrimp Baculovirus. U.S. Environmental Protection Agency Report, EPA-600/3-77-130, US E.P.A., Gulf Breeze, Florida, USA, 35 pp.
- WANG S.Y., HONG C. & LOTZ J.M. (1996). Development of a PCR procedure for the detection of *Baculoviruspenaei* in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 123–131.

*
* *

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