

SÍNDROME DE TAURA

1. **Ámbito de aplicación**

El síndrome de Taura (ST) es una enfermedad vírica de los camarones peneidos causada por la infección con el virus del síndrome de Taura (VST) (Bonami *et al.*, 1997; Fauquet *et al.*, 2005; Lightner 1996a; Mari *et al.*, 1998).

2. **Información sobre la enfermedad**

2.1. **Factores del agente**

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

El agente etiológico es el VST, como describen Bonami *et al.* (1997) y Mari *et al.* (1998; 2002). Se han documentado al menos cuatro genotipos (cepas) en base a la secuencia génica que codifica la VP1 (= CP2), la proteína estructural más grande y presuntamente dominante de entre las tres principales proteínas del virus. Según las variaciones en la secuencia de la VP1 (=CP2), estos grupos genotípicos son los siguientes: 1) el grupo de las Américas; 2) el grupo del sureste asiático; 3) el grupo de Belice; y 4) el grupo de Venezuela (Chang *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang y Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

Se han identificado al menos dos variantes bien diferenciadas del VST por su diferente reactividad frente al anticuerpo monoclonal MAb 1A1, producido contra una cepa de referencia del grupo de las Américas (VST USA-HI94 – GenBank AF277675) (Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999); el Tipo A representa las que reaccionan frente al MAb 1A1 (en el enzimoimmunoanálisis [ELISA]), la inmunoelectrotransferencia y la hibridación *in-situ* [ISH] con tejidos infectados) y las que no lo hacen. Las que no reaccionan frente al MAb 1A1 se subdividen en los tipos B (VST 98 Sinaloa, México) y C (VST 02 Belice), en función de la especie hospedadora y la patogenicidad. Todas las cepas del VST del grupo de las Américas y la mayoría, si no todos, los genotipos del grupo del sureste asiático reaccionan frente al MAb 1A1. Muy al contrario, ninguna de las cepas de los genotipos del grupo de Belice reaccionan frente al MAb 1A1 (Erickson *et al.*, 2002; 2005), como tampoco lo hace ninguna de las cepas del VST de la epizootia que tuvo lugar en piscifactorías de camarones de Venezuela en el año 2005.

Las partículas del VST son icosaedros de 32 nm de diámetro y sin envoltura, con una densidad de flotación de 1.338 g ml⁻¹. El genoma del VST consiste en un ARN lineal monocatenario de sentido positivo de 10.205 nucleótidos, excluyendo la cola poli-A del extremo 3', y contiene dos grandes marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF 1 contiene las secuencias motivos de proteínas no estructurales, como la helicasa, la proteasa y la ARN polimerasa dirigida por ARN. El ORF 2 contiene las secuencias de proteínas estructurales del VST, incluidas las tres principales proteínas de la cápsida, la VP1, la VP2 y la VP3 (de 55, 40 y 24 kDa, respectivamente). El virus se replica en el citoplasma de las células hospedadoras (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

En el 9º informe del comité Internacional de Taxonomía de Virus, el VST se ha asignado al género Aparavirus, perteneciente a la Familia Dicistroviridae (ICTV; King *et al.*, en imprenta).

Otras causas descritas de ST: En Ecuador, el síndrome de Taura se vinculó inicialmente a la contaminación por fungicidas en piscifactorías de camarones, una controversia que fue acompañada de un litigio que duró unos 16 años después de que se demostrara científicamente que la enfermedad era de origen vírico (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 2005). Así, en varios artículos de la bibliografía se propone que el ST es de etiología tóxica (Intriago *et al.*, 1997; Jiménez, 1992; Jiménez *et al.*, 2000).

2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

No se dispone de información.

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

No se dispone de información.

2.1.4. Ciclo de vida

No aplicable.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las principales especies hospedadoras del VST son el camarón juvenil, *Penaeus vannamei*, y el camarón azul, *P. stylirostris*. Aunque todas las principales especies hospedadoras del VST pertenecen al subgénero de peneidos *Litopenaeus*, existen otras especies de peneidos que pueden resultar infectadas por el VST mediante exposición directa, pese a que no desarrollan síntomas. Los hospedadores naturales y experimentales que han sido documentados para el VST son: *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. indicus* y *Metapenaeus ensis* (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004; Lightner, 1996a, 1996b; Overstreet *et al.*, 1997; Srisuvan *et al.*, 2006; Stentiford *et al.*, 2009; Wertheim *et al.*, 2009).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Se han documentado casos de infección por el VST en todos los estadios de vida (juveniles y adultos) de *P. vannamei* (la especie hospedadora económicamente más importante de las dos) excepto en huevos, cigotos y larvas (Lightner, 1996a).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

El VST infecta y se ha observado que se replica (mediante ISH con sondas de ADN específicas) principalmente en el epitelio de la cutícula (o hipodermis) del exoesqueleto general, el intestino anterior, el intestino posterior, las branquias y los apéndices, y a menudo en los tejidos conjuntivos, los hematopoyéticos, el órgano linfóide (OL) y la glándula antenal. Los órganos entéricos (el hepatopáncreas derivado del endodermo, el epitelio de la mucosa del intestino medio y de la de sus ciegos) y los músculos liso, cardíaco y estriado, y el cordón nervioso ventral, sus ramas y sus ganglios no suelen presentar signos histológicos de la infección por el VST y normalmente, según la ISH, son negativos para el VST (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Hasson *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; Jimenez *et al.*, 2000; Lightner, 1996a; Lightner y Redman 1998a; 1998b; Lightner *et al.*, 1995; Srisuvan *et al.*, 2006).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Algunos miembros de las poblaciones de *P. vannamei* o *P. stylirostris* que sobreviven a infecciones y/o epizootias por el VST pueden ser portadores del virus de por vida (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b) y, aunque no está documentado, transmitir el virus a su descendencia por transmisión vertical.

2.2.6. Vectores

Aves acuáticas: se ha observado que el VST sigue siendo infeccioso durante 48 horas (tras la ingesta de camarones muertos infectados por el VST) en las heces expulsadas por gaviotas marinas (*Larus atricilla*) salvajes o criadas en cautividad y pollos (*Gallus domesticus*, que se utilizan como sustitutos de laboratorio de todas las aves que comen camarones), lo cual sugiere que el virus puede retener infectividad cuando pasa por el sistema gastrointestinal de cualquier especie aviar. Estos hallazgos implican que las aves constituyen un importante vector mecánico para la transmisión del virus dentro de piscifactorías o regiones afectadas (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Insectos acuáticos: se ha observado que el llamado barquero de agua (*Trichocorixa reticulata* [*Corixidae*], un insecto acuático que se alimenta en camarones muertos en los estanques de las piscifactorías) también sirve de vector mecánico del VST (Brock 1997; Lightner, 1995, 1996a, 1996b).

Productos comerciales congelados infectados por VST: en muestras de mercados de EE.UU., procedentes de Latinoamérica y del sudeste asiático, se ha encontrado el VST en productos congelados de camarón juvenil (*L. vannamei*). Una eliminación inadecuada de los desechos (líquidos y sólidos, es decir, caparazones pelados, cabezas, tractos intestinales, etc.) que se originan durante el reprocesado destinado a obtener productos con valor añadido y que proceden de langostinos infectados con el VST en localidades costeras, puede suponer una fuente de VST que podría contaminar poblaciones de camarones salvajes o de piscifactoría cercanas a las aguas a las que se vierten los desechos (Lightner, 1996b; Nunan *et al.*, 2004).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone datos

2.3. Patrón de la enfermedad

El ST se conoce como una enfermedad de *P. vannamei* en fase de cría o de engorde que tiene lugar en un plazo de unos 14 a 40 días tras la repoblación de estanques o tanques de engorde con PL, de modo que los camarones con ST suelen ser juveniles de corta edad que pesan entre 0,05 y <5 g. También pueden resultar afectados camarones más grandes, sobre todo si no están expuestos al virus hasta que son juveniles más grandes o adultos (Brock 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz 1997b).

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión del VST puede tener lugar por vía horizontal o por vía vertical. Se ha observado la transmisión horizontal por canibalismo o agua contaminada (Brock 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; White *et al.*, 2002). Por otra parte, se sospecha claramente de la transmisión vertical por parte de reproductores adultos infectados a su descendencia, pero no se ha confirmado experimentalmente.

2.3.2. Prevalencia

En las zonas en las que el virus es enzoótico en poblaciones de piscifactorías, según varios estudios la prevalencia del VST puede ir del 0% al 100% (Brock 1997; Jiménez *et al.*, 2000; Laramore 1997).

2.3.3. Distribución geográfica

Actualmente, el ST tiene amplia distribución geográfica en las zonas de cultivo del camarón de las América, el sureste asiático y Oriente Medio (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang y Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Yu y Song 2000; Wertheim *et al.*, 2009).

América: después de su reconocimiento en 1992 como una enfermedad bien diferenciada de *P. vannamei* de piscifactoría en Ecuador (Brock *et al.*, 1995; Jiménez 1992; Lightner *et al.*, 1994), el ST se extendió rápidamente por muchas de las regiones de cultivo de langostinos de América mediante el envío de PL y reproductores infectados (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b). En América, se han notificado el ST y/o el VST en casi todos los países de América donde se cultivan langostinos, y en casi todas las regiones de Hawai (Aguirre Guzmán y Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001). El VST es enzoótico en las poblaciones de camarón peneido de piscifactoría de la costa americana del Pacífico, de Perú a México, y se ha encontrado ocasionalmente en algunas poblaciones salvajes de *P. vannamei* de la misma región (Lightner y Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1995). El VST también se ha descrito en poblaciones de peneidos de las costas americanas atlántica, del Caribe y del Golfo de México, pero en estas regiones no se ha descrito en ejemplares salvajes (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 2005; 2011).

Asia y Oriente Medio: el VST se introdujo en Taipei, China, en 1999 con la importación de camarón juvenil (*P. vannamei*) infectado procedente de Centroamérica y Sudamérica (Tu *et al.*, 1999; Yu y Song, 2000). Desde la introducción inicial, el virus se ha propagado mediante los desplazamientos de reproductores y de PL a China (República Popular de), Tailandia, Malasia e Indonesia, donde ha sido la causa de grandes epizootias con altas mortalidades en poblaciones introducidas no seleccionadas de *P. vannamei* (Chang *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Tang y Lightner, 2005; Lightner 2011). Recientemente se ha observado que el VST se asocia a importantes mortalidades en poblaciones de *Penaeus indicus* de piscifactoría de Arabia Saudita (Wertheim *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

En epizootias de ST de piscifactoría en las que resultan afectadas poblaciones no seleccionadas (es decir, no seleccionadas para ser resistentes al VST) de *P. vannamei*, que son las principales especies hospedadoras del VST, las mortalidades acumuladas suelen oscilar entre el 40 y más del 90% en poblaciones cultivadas de PL, juveniles y subadultos. Existen líneas de *P. vannamei* resistentes al VST que muestran tasas de supervivencia de hasta un 100% ante la exposición a los cuatro genotipos del VST en condiciones de laboratorio (Lightner *et al.*, 2009; Moss *et al.*, 2001).

2.3.5. Factores ambientales

Los brotes del ST son más frecuentes cuando las salinidades se sitúan por debajo de las 30 ppmil (Jiménez *et al.*, 2000).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se dispone de vacunas eficaces contra el VST.

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 inmunoestimulantes eficaces confirmados científicamente.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Después de que aparecieran brotes del ST en Ecuador en 1992-1994, se observó que *Penaeus stylirostris* es resistente al VST (genotipo 1, MAb 1A1 tipo A). Debido a esta característica, hacia 1995, después que el VST alcanzara México en 1994 y causara grandes pérdidas productivas en piscifactorías de *P. vannamei*, las especies predominantemente cultivadas en la zona occidental del país fueron líneas seleccionadas de *P. stylirostris*. Sin embargo, en 1998-1999 apareció una nueva "cepa" del VST (Tipo B; Erickson *et al.*, 2002; Fegan y Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarin-Herzberg y Ascencio, 2001) que causó epizootias masivas en *P. stylirostris*. Poco después de la aparición de esta nueva "cepa" del VST, a finales de 1999, se introdujo el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB) en piscifactorías de camarones de México occidental, al cual *P. stylirostris* no era resistente, lo cual terminó definitivamente con todo posible interés en el cultivo de *P. stylirostris* en dicho país.

Se han desarrollado poblaciones domésticas de *P. vannamei* y de *P. stylirostris* resistentes al VST. Algunas líneas domésticas de *P. vannamei* resistentes al VST (que también están libres del VST) se utilizan mucho en la industria de la cría del camarón en América y el sudeste asiático (Clifford, 1998; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002). Tras la aparición del ST en Centroamérica, se observó una mejora de la resistencia al ST en PL salvajes de *P. vannamei* capturadas y utilizadas para repoblar piscifactorías de camarón de la región (Laramore, 1997).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Se han desarrollado líneas seleccionadas de *P. vannamei* resistentes al ST, que pueden adquirirse comercialmente (Clifford, 1998; Laramore, 1997; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002).

2.4.6. Agentes bloqueantes

Se observó que la resistencia de los cigotos de *P. vannamei* a la infección por el VST tenía lugar gracias a la expresión del ARN antisentido que codifica la proteína de la cápsida del VST. Juveniles transgénicos criados a partir de cigotos protegidos de este modo mostraron una mejora de la resistencia al VST ante la exposición mediante inyección *per os* o por vía intramuscular (IM) (Lu y Sun, 2005). Se han obtenido resultados similares mediante inyección de secuencias cortas bicatenarias aleatorias de ARNi en juveniles de *P. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Aunque se considera que el VST se transmite verticalmente (transmisión transovárica), no se dispone de informes publicados que documenten esta vía de transmisión. La desinfección de huevos y larvas (Chen *et al.*, 1992) es una buena práctica de manejo y se recomienda porque puede reducir la contaminación por VST de huevos eclosionados y de las larvas que crecen a partir de estos.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Se han aplicado con éxito ciertas prácticas de manejo para la reducir el riesgo de infecciones por el VST y de que aparezca la enfermedad en estanques de crecimiento. Estas consisten en la aplicación de un pre-cribado de los reproductores salvajes o de piscifactoría y/o de sus huevos/larvas nauplias eclosionados, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de desechar los ejemplares que den resultados positivos para el virus (Fegan y Clifford, 2001), así como el descanso y repoblación de regiones enteras de cultivo con poblaciones libres del VST (Dixon y Dorado, 1997), y el desarrollo de poblaciones de camarones *P. vannamei* y *P. stylirostris* libres de patógenos específicos (SPF) (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Moss *et al.*, 2001; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992; Wyban *et al.*, 2004). Se ha observado que la aplicación de la tecnología más reciente (poblaciones SPF) se encuentra entre las prácticas de manejo de mayor éxito para la prevención y el control del ST. Desafortunadamente, en la industria existe una idea equivocada de que SPF es un rasgo genético y no

un estado de salud. El desarrollo de *P. vannamei* SPF que no solo estén libres del VST, sino también de todos los principales agentes patógenos conocidos del camarón peneido, ha dado lugar a la introducción de la especie en Asia, y a que en el año 2005 superara a *P. monodon* como especie de camarón más cultivada en Asia, así como en América, donde se crearon las reservas SPF (FAO, 2006; Lightner, 2005; Rosenberry, 2004).

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Los ejemplares adecuados para las pruebas de diagnóstico de la infección por el VST son las PL, los juveniles y los adultos. Aunque el VST puede infectar a cualquier estadio de vida, la gravedad de la infección, y por tanto la carga vírica, pueden quedar por debajo de los límites de detección en los huevos eclosionados y en las fases larvarias, de modo que estos estadios de vida no constituyen muestras adecuadas para la detección del VST ni para la certificación de la ausencia de ST.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

En el Capítulo 2.2.0 se proporciona información relativa a la histología y las pruebas moleculares sistemáticas, y orientación sobre cómo conservar las muestras destinadas a cada tipo de prueba.

3.3. Combinación de varias muestras

Las muestras tomadas para las pruebas moleculares pueden combinarse en forma de 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 PL, para obtener una cantidad suficiente de material de muestra (ácido nucleico extraído) para llevar a cabo una prueba diagnóstica puede ser necesario combinar cantidades mayores (como por ejemplo ~150 o más huevos o larvas o 50–150 PL, según el tamaño y la edad). Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El VST infecta tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico. El principal tejido afectado en la fase aguda del ST es el epitelio de la cutícula. En las infecciones crónicas, el principal tejido afectado es el OL.

Pueden tomarse muestras de hemolinfa o pleópodos extirpados y utilizarse cuando sea necesario llevar a cabo pruebas no letales en reproductores de alto valor.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

El VST 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 constituyen muestras adecuadas para la detección de la infección por el VST.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Solo la fase aguda del ST puede diagnosticarse, aunque solo provisionalmente, a partir de los signos clínicos. En el apartado 4.2 se proporciona una descripción de los signos clínicos macroscópicos que presentan los camarones con ST en fase aguda.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Solo se observan cambios de comportamiento en los camarones con ST en fase aguda. Lo habitual es que los camarones gravemente afectados empiecen a presentar hipoxia y se desplacen hacia los márgenes o la superficie del estanque, donde la concentración de oxígeno disuelto es mayor. Este tipo de camarones pueden atraer aves marinas en grandes cantidades. En muchos brotes del ST, son las grandes cantidades de aves marinas, atraídas por los camarones moribundos, las que constituyen el primer indicio observable de la presencia de un brote importante de la enfermedad (que, en caso de presencia de aves marinas, a menudo es ST o EMB –enfermedad de las manchas blancas-) en la piscifactoría.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

El ST tiene tres fases bien diferenciadas, la aguda, la de transición y la crónica, que pueden diferenciarse a simple vista (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Los signos macroscópicos que presentan los juveniles, los subadultos y los adultos de los camarones que se hallan en la fase de transición del ST son característicos y proporcionan un diagnóstico provisional de la enfermedad.

Fase aguda: los signos macroscópicos que presentan los camarones *P. vannamei* moribundos que se hallan en la fase aguda del ST son la expansión de cromatóforos rojos, que confieren al camarón afectado un tono rojizo pálido general y que hacen que el abanico de la cola y los pleópodos sean claramente rojos; por este motivo, cuando la enfermedad apareció por primera vez en Ecuador, en las piscifactorías se le puso el nombre, entre otros, de enfermedad de la “cola roja” (Lightner *et al.*, 1995). En estos camarones, al examinar detenidamente el epitelio de la cutícula de apéndices finos (como por ejemplo, el de los bordes de los urópodos o los pleópodos) con una lupa de 10 aumentos, se observan signos de necrosis epitelial focal. Los camarones que presentan estos signos macroscópicos de ST en fase aguda suelen tener los caparazones blandos, el intestino vacío y a menudo se encuentran al final del estadio D del ciclo de muda. Los camarones gravemente afectados suelen morir durante la ecdisis. Si son mayores de ~1 g, los camarones moribundos pueden resultar visibles para las aves marinas en los márgenes y la superficie de los estanques. Así, durante el pico de las epizootias intensas, es posible observar cientos de aves marinas (gaviotas, golondrinas de mar, garzas, cormoranes, etc.) alimentándose de camarones afectados moribundos que se acumulan en la superficie y los márgenes de los estanques afectados (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Garza *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995; Vanpatten *et al.*, 2004).

Fase de transición (recuperación): aunque solo dura unos días durante las epizootias del ST, los signos macroscópicos que presentan los camarones en la fase de transición pueden aportar un diagnóstico provisional de infección por el VST. Durante la fase de transición (que puede estar ocurriendo mientras muchos de los camarones de las poblaciones afectadas siguen en la fase aguda y las mortalidades diarias son altas), cantidades entre bastante altas y moderadas de camarones de los estanques afectados presentan lesiones cuticulares melanizadas multifocales, de formas irregulares y de distribución aleatoria. Estos puntos melanizados son acumulaciones de hemocitos que indican los lugares en los que hay lesiones del ST resolviéndose en el epitelio cuticular. Estos camarones pueden tener o no las cutículas blandas y una expansión de cromatóforos rojos, y pueden estar comportándose y alimentándose con normalidad (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011).

Fase crónica: tras una muda completa, los camarones en fase de transición pasan a la fase crónica del ST, en la cual los ejemplares infectados de forma persistente no presentan signos evidentes de enfermedad (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Sin embargo, los camarones *P. vannamei* que están infectados de forma crónica con el VST pueden ser menos resistentes a los factores estresantes normales del ambiente (como reducciones súbitas de la salinidad) que los camarones no infectados (Lotz *et al.*, 1995).

4.2.2. Bioquímica clínica

No aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica (para hospedadores peneidos)

Las pruebas más fiables para el diagnóstico del ST en las fases aguda y crónica son los métodos histológicos (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Las lesiones patognomónicas inducidas por el VST son propias de las infecciones en fase aguda (Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a; 2011). En las infecciones crónicas por el VST, la única lesión que es característica de los camarones infectados es la presencia de un OL aumentado de tamaño con múltiples esferoides (EOL) (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner 2011), que no pueden diferenciarse de los EOL inducidos por infecciones crónicas con otros virus ARN (Lightner, 1996a). Cuando se observan EOL mediante una histología sistemática y se sospecha de infección crónica por el VST, para confirmarla se recomienda llevar a cabo una prueba molecular (ISH con sondas específicas del VST, o bien PCR con transcripción inversa [RT] [véase el apartado 4.3.1.2.7]).

4.2.3.1. Fase aguda del síndrome de Taura

El diagnóstico del ST en la fase aguda de la enfermedad se basa en la observación histológica (en preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina [H/E]) de áreas multifocales de necrosis en el epitelio cuticular de la superficie general del cuerpo, los apéndices, las branquias y los intestinos posterior y anterior (el esófago, y las cámaras anterior y posterior del estómago). Las células del tejido conjuntivo

subcuticular y las fibras basales del músculo estriado adyacentes al epitelio cuticular afectado están ocasionalmente afectadas. En algunos casos graves de la fase aguda del ST, el epitelio del túbulo de la glándula antenal también está destruido. En las lesiones cuticulares multifocales, destacan numerosos focos de células afectadas que presentan una gran eosinofilia en el citoplasma y núcleos picnóticos y cariorrécticos. A menudo, en estas lesiones de la fase aguda del ST son muy abundantes los restos citoplasmáticos de células necróticas y por lo general tienen aspecto de cuerpos esféricos (1–20 µm de diámetro), cuya tinción varía de eosinófila a débilmente basófila. Estas estructuras, junto con los núcleos picnóticos y cariorrécticos, confieren a las lesiones de la fase aguda del ST un aspecto característico de “pimienta” o de “perdigones”, que se considera patognomónico del ST cuando no hay necrosis concurrente de las células parenquimatosas de los túbulos del órgano linfoide. La ausencia de necrosis del órgano linfoide en la fase aguda de las infecciones por el VST permite diferenciar el ST de la fase aguda de la enfermedad de la cabeza amarilla, debido a la cual, en el epitelio cuticular y en las branquias pueden tener lugar patrones de necrosis similares a las inducidas por el VST (Lightner, 1996a).

En los tejidos infectados por el VST, los núcleos picnóticos o cariorrécticos dan una reacción de Feulgen positiva (para el ADN), que los distingue de las inclusiones citoplásmicas, menos basófilas y más eosinófilas, que no contienen ADN. La ausencia de infiltración hemocítica y de otros signos de una respuesta inflamatoria importante del hospedador distingue la fase aguda del ST de la fase de transición de la enfermedad (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

4.2.3.2. Fase de transición (recuperación) del síndrome de Taura

En la fase de transición del ST, las típicas lesiones cuticulares de la fase aguda disminuyen en cantidad y gravedad y son reemplazadas por una abundante infiltración y acumulación de hemocitos en los lugares de necrosis. Las masas de hemocitos pueden melanizarse dando lugar a las manchas negras irregulares que caracterizan la fase de transición de la enfermedad. En cortes teñidos con H/E, tales lesiones pueden poner de manifiesto erosión de la cutícula, colonización de la superficie e invasión de la cutícula afectada, así como de los hemocitos superficiales expuestos, por *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Los cortes de los órganos linfoides (OL), durante la fase de transición del ST pueden tener un aspecto normal con tinción de H/E. Sin embargo, cuando se analizan para determinar si contienen el VST mediante ISH con una sonda específica de ADNc (o mediante ISH con MAb 1A1 para el VST de tipo A, genotipo 1), se observa que se acumulan grandes cantidades de VST en las células parenquimatosas más periféricas de los túbulos de los OL (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3.3. Fase crónica del síndrome de Taura

Los camarones en la fase crónica del ST no presentan síntomas generales, e histológicamente el único signo de infección es la presencia de numerosos EOL prominentes, que pueden permanecer asociados al cuerpo principal de los OL pares, o bien desprenderse y convertirse en cuerpos EOL ectópicos, alojados en zonas estrechadas del hemocele (es decir, el corazón, las branquias, los tejidos conjuntivos subcuticulares, etc.). Dichos EOL son acumulaciones esféricas de células del OL y de hemocitos y se pueden distinguir de los tejidos normales del OL por su naturaleza esférica y la ausencia del vaso central, que es típico de los túbulos de los OL normales. Cuando se analizan los EOL mediante una sonda de ADNc (o con MAb 1A1 usando ISH) para determinar si contienen el VST, algunas células de los EOL dan reacciones positivas al virus, pero no reacciona ningún otro tejido afectado (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011).

4.2.4. Preparaciones húmedas

Para poner de manifiesto (y establecer un diagnóstico provisional del ST en fase aguda) lesiones focales de ST en fase aguda en células epiteliales de la cutícula, puede utilizarse el examen microscópico directo de simples preparaciones húmedas no teñidas de fragmentos extirpados de las branquias, puntas de los apéndices, etc., mediante microscopía óptica de contraste de fases o reducida. Las preparaciones que presenten lesiones del ST en fase aguda contendrán muchas estructuras esféricas (consúltense los métodos histopatológicos en el apartado 4.2.3 anterior), que son núcleos picnóticos y cariorrécticos y restos citoplasmáticos de células necróticas.

4.2.5. Frotis

No aplicable.

4.2.6. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.2.7. Microscopía electrónica/Citopatología

Actualmente no es aplicable a efectos de diagnóstico.

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 4.2.4.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

El VST no se ha cultivado *in vitro*, puesto que no existen líneas celulares de crustáceos (Lightner, 1996a; Pantoja *et al.*, 2004). A pesar de una reciente publicación en la que se informaba incorrectamente de que el VST había infectado líneas celulares humanas y de mono (Audelo del Valle *et al.*, 2003), otros dos laboratorios repitieron el estudio y ambos observaron que el VST no infecta ni se replica en líneas celulares de primates ni humanas de probada susceptibilidad a picornavirus humanos (Lu *et al.*, 2004; Pantoja *et al.*, 2004).

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Para analizar muestras de hemolinfa, homogenados de tejido o cortes de tejido de camarón fijados con el fijador AFA de Davidson, puede utilizarse un MAb para la detección del VST (Erickson *et al.*, 2002; 2005; Poulos *et al.*, 1999). Puede utilizarse el MAb 1A1 contra el VST para distinguir ciertas variantes o "cepas" del VST de otras cepas (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

4.3.1.2.3. Método del bioanálisis

La confirmación de la infección por el VST se puede llevar a cabo mediante bioanálisis de los animales sospechosos con las formas juveniles de *P. vannamei* SPF que sirven como indicador del virus (Brock *et al.*, 1997; Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz 1997b; Overstreet *et al.*, 1997). Se pueden emplear protocolos orales o de inyección. El método oral es relativamente sencillo de realizar y se lleva a cabo en pequeños estanques alimentando a formas juveniles de *P. vannamei* SPF con langostinos sospechosos troceados (White *et al.*, 2002). Es necesario el uso de un tanque de camarones que ejerzan de controles negativos indicadores, que solo reciban tejidos SPF (libre del VST) y alimento normal para camarones. Cuando se usa el protocolo oral de alimentación con camarones muertos para el bioanálisis destinado a detectar el VST, normalmente empiezan a detectarse camarones indicadores positivos al ST (por signos evidentes e histopatológicos) 3 a 4 días después de la exposición inicial, y se dan importantes niveles de mortalidad a los 3–8 días de la exposición inicial. Los camarones que constituyen el control negativo deben permanecer negativos (durante al menos 10–15 días) en cuanto a signos macroscópicos e histológicos del ST, y en lo que respecta a mortalidades anormales (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

Con el protocolo de bioanálisis por inyección, se pueden realizar análisis de detección del VST en varios tipos de muestras. Si se obtienen durante una epizootia de VST, se pueden usar los camarones completos. Las cabezas se usan solo si el camarón presenta grandes lesiones de fase de transición (manchas multifocales melanizadas sobre la cutícula) o si no presenta signos clínicos de infección (fase crónica), puesto que en estos casos el virus, si está presente, se concentrará en el órgano linfoide (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Para realizar una prueba no letal con reproductores, se pueden tomar muestras de la hemolinfa y usarlas, mediante inyección IM, para exponer al camarón indicador (Lightner, 1996a).

Realización del bioanálisis de detección del VST mediante inyección IM:

Obsérvese que los tejidos y el homogenado resultante deben estar refrigerados durante todo el protocolo manteniéndolos sobre hielo.

- i) Se preparan, en una proporción de 1:2 o 1:3, cabezas o ejemplares enteros de camarones sospechosos de estar infectados por el VST con tampón TN (véase el Capítulo 2.2.2, necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa [NHHI] para consultar la composición de este tampón) o solución salina estéril al 2% preparada con agua destilada.
- ii) Se homogeneiza la mezcla en una trituradora o batidora. Hay que evitar una homogenización o trituración excesivas para que la mezcla no se caliente.
- iii) Se clarifica el homogenado por centrifugación a 3.000 **g** durante 10 minutos. Se decanta y se conserva el líquido sobrenadante. Se desecha el sedimento.
- iv) Se centrifuga el líquido sobrenadante a 27.000 **g** durante 20–30 minutos a 4°C. Se decanta y se conserva el líquido sobrenadante. Se desecha el sedimento.
- v) Se diluye el líquido sobrenadante del paso iv de 1/10 a 1/100 con solución salina estéril al 2%. Esta solución puede utilizarse como inóculo para inyectar a los camarones indicadores (o bien esterilizarse por filtración, como se describe en el paso vi).
- vi) Se filtra el líquido sobrenadante diluido del paso v utilizando una jeringa estéril (el tamaño depende del volumen final del sobrenadante diluido) y un filtro estéril de 0,45 µm para jeringa. Es posible que deban utilizarse varios filtros, pues se obturan fácilmente. Se debe obtener el filtrado en un tubo de ensayo o vaso de precipitados estéril. Esta solución puede guardarse congelada (lo recomendable es a -20°C si se trata de periodos de almacenaje cortos [semanas] o a -80°C si se trata de periodos largos [meses a años]), o bien utilizarse de inmediato para inyectarla a los camarones indicadores.
- vii) Los camarones indicadores deben proceder de reservas de *P. vannamei* SPF susceptibles al VST (como la “reserva Kona” [Moss *et al.*, 2001], comercializada por varios proveedores en América), y no de líneas seleccionadas de reservas de probada resistencia al VST.
- viii) Se inyectan 0,01 ml por gramo de peso corporal utilizando una jeringa de tuberculina de 1 ml. Los camarones indicadores deben recibir la inyección por vía intramuscular en el tercer segmento caudal. Si el camarón indicador empieza a morir en cuestión de minutos tras la inyección, significa que el inóculo contiene demasiado material proteínico y que debe diluirse antes de seguir inyectando a otros camarones. Cuando se producen muertes súbitas post-inyección, significa que tiene lugar un “shock proteico”, que es consecuencia de una coagulación sistémica de la hemolinfa del camarón como respuesta al inóculo (Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).
- ix) Las muestras de hemolinfa pueden diluirse (a 1/10 o 1/20 en tampón TN), o bien esterilizarse por filtración (si es necesario), e inyectarse a los camarones indicadores sin más preparación.
- x) Si el inóculo contiene el VST, los camarones indicadores deben empezar a morir en un plazo de 24 a 48 horas tras la inyección. Dosis menores del virus pueden tardar más en causar una infección letal, de modo que los camarones deben observarse durante al menos 10 a 15 días tras la inyección.
- xi) La presencia (o ausencia) del VST en los camarones indicadores debe confirmarse mediante análisis histológico (y/o ISH mediante sonda génica, si se dispone de ella) de camarones moribundos fijados con solución de Davidson. Si se precisa confirmación adicional además de la observación de lesiones patognomónicas del VST, puede llevarse a cabo una RT-PCR con secuenciación del amplicón obtenido.

4.3.1.2.4. Método del bioanálisis con camarones centinela

Como variación de la técnica de bioanálisis, se puede utilizar un sistema de “camarón centinela”. Por ejemplo, se pueden mantener pequeñas formas juveniles de *L. vannamei* SPF susceptibles al VST en jaulas de red dentro de tanques independientes, o bien en el mismo sistema de agua, junto a otros camarones de estado desconocido respecto al VST, para que ejerzan de bioanálisis de detección de agentes infecciosos, como el VST.

4.3.1.2.5. Método del inmunoanálisis de transferencia puntual

- i) Para el método del inmunoanálisis de transferencia puntual, se puntea sobre la superficie de placas de ensayo MA-HA-N45 (Millipore, South San Francisco, California [CA], EE.UU) 1 µl del antígeno problema (virus purificado, hemolinfa de camarón infectado o hemolinfa de camarón SPF).

- ii) Después de secar al aire, los pocillos se bloquean 1 hora a temperatura ambiente con 200 µl de un tampón que contenga solución salina tamponada con fosfato y Tween 20 al 0,05% (PBST) mezclada con un 10% de suero normal de cabra (Life Technologies, Gibco BRL) y un 2% de caseína Hammersten (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.).
- iii) Se lavan los pocillos tres veces con PBST y luego se hacen reaccionar con 100 µl del anticuerpo primario (MAb o anticuerpos policlonales de ratón) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- iv) Para la detección se usa un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón desarrollado en cabra marcado con fosfatasa alcalina, específico para la cadena γ (Zymed, South San Francisco, CA), diluido a 1/1000 en PBST más un 10% de suero normal de cabra (30 minutos a temperatura ambiente).
- v) Después de lavar tres veces con PBST, una vez con PBS y una vez con agua destilada, las reacciones se visualizan dejando desarrollar durante 15 minutos a temperatura ambiente con nitroazul de tetrazolio y bromocloroindolil fosfato (Roche Diagnostics, Corp.) en tampón Tris-NaCl (cada uno a una concentración 100 mM) que contenga MgCl₂ 50 mM, a pH 9,5.
- vi) Las reacciones se detienen con agua destilada.
- vii) Las reacciones se gradúan siguiendo una escala de 0 a +4, donde la reacción de mayor intensidad es equivalente a la reacción generada usando el MAb contra el control de referencia, que consiste en VST semipurificado. Una reacción negativa es aquella en la que no es visible ninguna mancha coloreada en el pocillo

4.3.1.2.6. Otros métodos basados en anticuerpos

El MAb 1A1 contra el VST se puede aplicar a otros formatos de pruebas basadas en anticuerpos (por ejemplo, a pruebas de inmunofluorescencia indirecta [IFAT] o de inmunohistoquímica [IHC] con frotis de tejidos, cortes congelados, o tejidos fijados y desparafinados). El MAb 1A1 puede aplicarse a un formato de IHC utilizando cortes de tejidos fijados con solución de Davidson (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

Se recomienda que los resultados inesperados de pruebas de detección del VST basadas en MAb sean interpretados en el contexto de los síntomas clínicos, los antecedentes del caso, y junto con resultados de otras pruebas (como la RT-PCR, hallazgos histológicos o de ISH con una sonda de ADN específica del VST – véanse los correspondientes apartados de este capítulo).

4.3.1.2.7. Técnicas moleculares

Se han desarrollado pruebas de ISH y de RT-PCR para el VST, y existen kits comerciales de RT-PCR para el VST. No se dispone del método de la transferencia puntual para la detección del VST.

4.3.1.2.7.1. Sondas de ADN para aplicaciones de la ISH, con sondas de ADNc no radiactivas

Las sondas no radiactivas de ADNc marcadas con DIG para el VST se pueden obtener en el laboratorio. El método de la ISH proporciona mayor sensibilidad diagnóstica que los métodos más tradicionales para la detección y diagnóstico del VST basados en métodos histológicos clásicos (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner y Redman 1998; Mari *et al.*, 1998). La ISH de cortes histológicos rutinarios de lesiones de fase aguda y de transición en el epitelio cuticular, en otros tejidos, y de los EOL en la fase de transición y en la fase crónica mediante una sonda ADNc marcada con DIG específica del VST, proporciona un diagnóstico definitivo de infección por VST (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Las lesiones patognomónicas positivas para el VST consisten en áreas destacadas de color azul a negro azulado en el citoplasma de las células afectadas cuando reaccionan con las sondas de ADNc. Los prominentes fragmentos nucleares y núcleos picnóticos que contribuyen al aspecto patognomónico de “perdigones” en las lesiones de ST no reaccionan con la sonda (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (Véase el capítulo 2.2.2, NHHI, para detalles del método de la ISH. Véase el capítulo 2.2.0, apartado B.5.3.ii para una información detallada sobre el uso del fijador AFA de Davidson).

En los tejidos con la solución de Davidson pueden tener lugar falsos negativos en la prueba de la ISH si los tejidos se dejan en el fijador durante más de 24–48 horas. El bajo pH del fijador de Davidson causa una hidrólisis ácida del ARN monocatenario del genoma del VST, originando resultados que son falsos negativos. Esta hidrólisis puede evitarse usando fijadores neutros, como un fijador compatible con ARN desarrollado para camarones, o bien utilizando

debidamente el fijador de Davidson (evitando tiempos de fijación superiores a 24 horas) (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner y Redman 1998).

4.3.1.2.7.2. Método de la RT-PCR con transcripción inversa

En las muestras de tejido (hemolinfa, pleópodos, camarones pequeños enteros, etc.) se puede analizar si están infectados por el VST mediante la RT-PCR. Los cebadores llamados 9992F y 9195R, amplifican una secuencia de 231 pares de bases (pb) del genoma del VST (Nunan *et al.*, 1998). El fragmento amplificado corresponde a una secuencia conservada que se localiza en la región intergénica y en el ORF 2 del VST. El cebador 9992F se localiza cerca del extremo 3' de la región intergénica, y el 9195R se localiza en el ORF 2 dentro de la VP2 (= CP1) (Mari *et al.*, 2002; Nunan *et al.*, 1998).

Cebador	Producto	Secuencia	% de G+C	Temperatura
9992F	231 pb	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	55%	69°C
9195R		5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	50%	63°C

El método de la RT-PCR indicado a continuación para la detección del VST sigue en general el descrito por Nunan *et al.* (1998).

- i) *Preparación del ARN molde:* el ARN se puede extraer de tejidos frescos, congelados o conservados en etanol. La extracción del ARN debe realizarse usando preparaciones comerciales de extracción de ARN de los tejidos, como el High ARN Tissue Kit (Roche, Penzberg, Alemania), y siguiendo los procedimientos del fabricante para producir moldes de ARN de calidad.
- ii) La RT-PCR se hace en solución, usando como molde 10 µl de ARN total extraído de la hemolinfa, tejidos congelados de camarón, o tejidos fijados con etanol (concentración de ARN = 1–100 ng/ml).
- iii) En cada RT-PCR para la detección del VST, se deben incluir los siguientes controles: a) una muestra de tejido que se sepa que es negativa para el VST; b) una muestra que se sepa que es positiva para el VST (tejido o virus purificado); y c) un control "sin molde".
- iv) En todas las reacciones de amplificación aquí descritas se emplea el kit *GeneAmp® EZ rTth ARN PCR kit* (Applied Bioscience, Forster City, CA).
- v) Las condiciones óptimas de la RT-PCR (concentraciones finales en un volumen total de 50 µl) para detectar el VST en muestras de tejido de camarón son: cebadores (cada uno a una concentración 0,46 µM), dNTPs (cada uno a una concentración 300 µM), ADN polimerasa rTth (2,5 U/50 µl), acetato de manganeso (2,5 mM), en tampón EZ (vicién 25 mM, acetato potásico 57,5 mM, glicerol al 40% [p/v], a pH 8,2) 5×.
- vi) Si el termociclador no tiene una tapadera térmica, se deposita aceite mineral ligero (50 µl) sobre los 50 µl de mezcla de reacción para evitar la condensación o evaporación durante los ciclos térmicos.
- vii) Se combina el ARN molde con todos los reactivos y se deja que tenga lugar la transcripción inversa a 60°C durante 30 minutos, seguida de 95°C durante 2 minutos.
Nota: las condiciones de reacción aquí descritas se optimizaron mediante un *Thermal Cycler GeneAmp 980* (Applied Biosystems) automático. Las condiciones deben optimizarse para cada termociclador utilizando controles que se sepa que son positivos.
- viii) Cuando termine la transcripción inversa, se amplifican las muestras durante 40 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 45 segundos, y a continuación hibridación/extensión a 60°C durante 45 segundos. Tras el último ciclo se aplica un paso de extensión final durante 7 minutos a 60°C y el proceso termina en una fase de estabilización a 4°C.
- ix) Tras el final de la RT-PCR, se extraen las soluciones de ADNc amplificado de debajo del aceite mineral y se colocan en tubos de microcentrífuga limpios de 0,5 ml.
- x) Se puede añadir una muestra de 10 µl del producto amplificado al pocillo de gel de agarosa al 2,0% teñido con bromuro de etidio (0,5 g ml⁻¹), y someterse a electroforesis en TBE 0,5x (Tris, ácido bórico, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]).
- xi) Como marcador se utiliza una muestra de ADN con graduaciones de 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA)

- xii) En el Capítulo 2.2.2, sobre la NHHI, se proporcionan los datos relativos a la composición de los reactivos y los tampones

4.3.1.2.7.3. Método de la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección del VST

Se han desarrollado métodos de RT-PCR cuantitativa para la detección del VST. Estos métodos tienen las ventajas de la rapidez, la especificidad y la sensibilidad. La sensibilidad de la qRT-PCR es de ~100 copias de la secuencia diana del genoma del VST (Dahr *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

La RT-PCR en tiempo real mediante TaqMan descrita a continuación para la detección del VST en general sigue el método utilizando por Tang *et al.* (2004).

- i) Los cebadores de la PCR y la sonda TaqMan se escogieron de la región del ORF1 del genoma del VST (código de acceso del GenBank AF4277675) que codifica proteínas estructurales. Los cebadores y la sonda TaqMan se diseñaron mediante el programa *Primer Express* (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores en dirección 5' (TSV1004F) y en dirección 3' (TSV1075R) son: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' y 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3', respectivamente. La sonda TaqMan, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), que corresponde a la región de nucleótidos que va del 1024 hasta el 1051, se sintetizó y marcó 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, catálogo n° 450025).
- ii) *Preparación del ARN molde:* la extracción y purificación del ARN molde de la hemolinfa o tejido de camarón se llevan a cabo como se describe en el apartado dedicado a la RT-PCR tradicional.
- iii) La mezcla de reacción de la RT-PCR contiene: mezcla madre para RT-PCR TaqMan simple (Applied Biosystems, parte n° 4309169), los cebadores, cada uno a una concentración 0,3 µM, la sonda TaqMan 0,1 µM, 5–50 ng de ARN, y agua en un volumen de reacción de 25 µl. Para que los resultados sean los óptimos, la mezcla de reacción debe someterse a vórtex y mezclarse bien.
- iv) La amplificación se lleva a cabo con el sistema de detección de secuencias *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems; ABI PRISM 7000, 7300, 7500, aunque también pueden utilizarse modelos o marcas más recientes). Los ciclos consisten en una transcripción inversa a 48°C durante 30 minutos y una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y una hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.
- v) Al final de la reacción, se realizarán mediciones de la fluorescencia en tiempo real con un sistema de cámara acoplada (CCD). Se establecerá un umbral por encima del valor basal a partir del cual se empiece a detectar el aumento de señal asociada a un aumento exponencial del producto de la PCR. Las muestras se considerarán negativas si el valor Ct (ciclo umbral) es de 40 ciclos. Las muestras con un valor de Ct inferior a 40 ciclos se considerarán positivas. Para confirmar los resultados de la RT-PCR en tiempo real, puede someterse una alícuota del producto de la RT-PCR a electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 4% y exponerse a luz UV. Puede visualizarse un fragmento de ADN de 72 pb en las muestras que son positivas al VST.
- vi) Es necesario incluir un “control sin molde” cada vez que se lleve a cabo la reacción, con el fin de descartar la presencia de contaminantes fluorescentes en la mezcla de reacción o en el bloque de calentamiento del termociclador. También debe incluirse un control positivo, que puede ser un ARN transcrito *in-vitro* que contenga la secuencia diana, viriones purificados o ARN extraído de tejido infectado por el VST.

4.3.1.2.7.4. Secuenciación

Los productos de la RT-PCR pueden clonarse y secuenciarse cuando sea necesario confirmar la infección por el VST o identificar falsos positivos o una amplificación inespecífica (Mari *et al.*, 2002; Neilsen *et al.*, 2005; Srisuvan *et al.*, 2006; Tang y Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

4.3.1.2.4. Purificación del agente

Existen métodos de aislamiento y purificación del VST (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999), pero no se recomiendan para el diagnóstico sistemático del ST.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables porque los camarones son organismos invertebrados que no producen anticuerpos específicos que pudieran utilizarse para poner de manifiesto la infección por el VST o una exposición previa a este virus.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico del VST 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 VST en peneidos

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

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de síndrome de Taura

Como se ha indicado en la Tabla 5.1, la RT-PCR (apartado 4.3.1.2.7.2) es el método recomendado para la vigilancia dirigida, por motivos de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas.

Cuando se estudian episodios de mortalidad aguda como parte de un programa de vigilancia dirigida, la demostración de lesiones patognomónicas inducidas por el VST en el epitelio cuticular mediante histología (con o sin confirmación mediante ISH con sondas de ADN específicas del VST) constituye 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:

- Mortalidades repentinamente altas en PL tardías, juveniles o subadultos de *P. vannamei* o *P. stylirostris* en zonas donde el VST es enzootico;
- La repentina presencia de numerosas aves marinas (gaviotas, cormoranes, garzas, golondrinas de mar, etc.) “pescando” en uno o más de los estanques de camarones afectados;
- Muestras de *P. vannamei* o *P. stylirostris* de piscifactoría de estanques en los que haya aves marinas alimentándose, que presenten signos de ST de fase aguda o de transición, como una coloración general rojiza, letargo, caparazones blandos, intestinos vacíos y la presencia de varios puntos negros irregulares en la cutícula; o
- La presencia de focos de necrosis en el epitelio cuticular observables a bajos aumentos (es decir, mediante una lupa de x10 o un examen microscópico directo de preparaciones húmedas) para examinar los bordes de los apéndices, como los urópodos, los pleópodos o las branquias.

7.2. Definición de caso confirmado

Un caso está confirmado cuando se obtienen resultados positivos en cualquier combinación de una prueba molecular (PCR o ISH) y una prueba morfológica (histología) utilizando al menos dos de los siguientes tres métodos:

- Demostración histológica de lesiones del VST en fase aguda en (especialmente) el epitelio cuticular del intestino anterior (esófago, cámaras anterior o posterior del estómago) y/o en las branquias, los apéndices o la cutícula general. Este tipo de lesiones del VST son patognomónicas del VST solo cuando aparecen sin una necrosis aguda grave (con picnosis y cariorrexis) de las células parenquimatosas de los túbulos del órgano linfóide (lo cual puede ocurrir en las infecciones por el virus de la cabeza amarilla en fase aguda).
- ISH (con una sonda de ADNc específica del VST) que dé una señal positiva para las lesiones propias del VST en cortes histológicos (es decir, lesiones cuticulares de la fase aguda del ST) o para esferoides del órgano linfóide (EOL) en los órganos linfoides de camarones con lesiones de la fase crónica del ST.
- Resultados de la RT-PCR positivos para el VST.
- En caso necesario, para determinar el genotipo del VST puede llevarse a cabo una secuenciación del producto de la PCR que englobe la CP2 (Tang y Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

8. Bibliografía

AGUIRRE GUZMAN G. & ASCENCIO VALLE F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, **4**, 333–348.

AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISEÑO-GARCÍA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.

BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.

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. Rome, FAO, 240 pp.

BROCK, J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol. & Technol.*, **13**, 415–418.

BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. 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, 84–94.

BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: *Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 275–283.

CHANG Y.S., PENG S.E., YU H.T., LIU F.C., WANG C.H., LO, C.F. & KOU G.H. (2004). Genetic and phenotypic variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus sensis* in Taiwan. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2963–2968.

- 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, D.E. Jory, ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2002). Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green Chemistry. *J. Virol. Methods*, **104**, 69–82.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, May/June, 30–42.
- ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). Taura Syndrome Virus from Belize represents a unique variant. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 91–98.
- ERICKSON H.S., ZARAIN-HERZBERG M. & LIGHTNER D.V. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 1–10.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.
- FEGAN D.F. & 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.
- GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T., MARI J. & BONAMI J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.L. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 365–379.
- JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). In: Acuicultura del Ecuador. Camara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.
- JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.
- KING A., ADAMS M., CARSTENS E. & LEFKOWITZ E.J., EDS. (in press) Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

LARAMORE C.R. (1997). Shrimp culture in Honduras following the Taura syndrome virus. *In: Proceeding of the 4th Symposium on Aquaculture in Central America: Focusing on Shrimp and Tilapia, Tegucigalpa, Honduras, World Aquaculture Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–7.*

LIGHTNER D.V. (1995). Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. *Proceedings of the 99th Annual Meeting US Animal Health Association, Reno, Nevada, USA, 36–52.*

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). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 27–52.

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

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

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free 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., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.

LOTZ J.M. (1997a). Disease control and pathogen status assurance in an SPF-based shrimp aquaculture industry, with particular reference to the United States. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 243–254.

LOTZ J.M. (1997b). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.

LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.

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.

LOTZ J.M., FLOWERS A.M. & BRELAND V. (2003). A model of Taura syndrome virus (TSV) epidemics in *Litopenaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **83**, 168–176.

LU Y. & SUN P. (2005). Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene. *Antiviral Res.*, **67**, 141–146.

LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of Penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.

MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 917–928.

- MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). *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, 1–19.
- NIELSEN L., SANG-OU M., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- NUNAN L.M., TANG-NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura Syndrome Virus (TSV). *Aquaculture*, **229**, 1–10.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCILWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.
- POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of the Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.
- 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.
- ROBALINO J., BROWDY C.L., PRIOR S., METZ A., PARNELL P., GROSS P. & WARR G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* **78**, 10442–10448.
- ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.
- ROSENBERRY B. (2004). World Shrimp Farming 2004. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.
- SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, In press
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.-R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implication of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Research*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura Syndrome Virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390** (2), 324–329.
- WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **33**, 341–348.

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.

WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV Challenges Advance Selective Breeding in Pacific White Shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 40–41.

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32**, 21–24.

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

*
* *

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