

## ENFERMEDAD DE LA CABEZA AMARILLA

### 1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la enfermedad de la cabeza amarilla (ECA) se considera que es una infección causada por el virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (VECA).

### 2. **Información sobre la enfermedad**

#### 2.1. **Factores del agente**

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

El virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (genotipo 1) es uno de los seis genotipos conocidos del complejo de virus de la cabeza amarilla y es el único agente conocido de la ECA. Se designa como genotipo 2 al virus asociado a las branquias (VAB). El VAB y otros cuatro genotipos conocidos del complejo (los genotipos 3-6) se presentan generalmente en *Penaeus monodon* sanos del este de África, de Asia y de Australia, y casi nunca o nunca se asocian a enfermedad (Walker *et al.*, 2001, Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). El VECA y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla son clasificados por la Comisión Internacional de Taxonomía de Virus como las únicas especies del género *Okavirus*, de la familia Roniviridae, del orden de los Nidovirales (Cowley *et al.*, 2012). Existen indicios de la existencia de recombinación genética entre los genotipos (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

Los viriones del VECA son partículas baciliformes con envoltura (40–60 nm x 150–200 nm). Las envolturas están repletas de prominentes espículas que sobresalen unos 11 nm de la superficie. Las nucleocápsidas tienen una simetría helicoidal (y un diámetro de 20-30 nm), con una periodicidad de 5-7 nm. Los viriones están formados por tres proteínas estructurales (nucleoproteína p24 y glucoproteínas de envoltura gp64 y gp116) y un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de unas 26 kb.

##### 2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

El VECA permanece viable en agua de mar aireada hasta 72 horas (Flegel *et al.*, 1995b).

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

El VECA puede inactivarse aplicando 60°C durante 15 minutos (Flegel *et al.*, 1995b). El VECA se inactiva calentándolo a 60°C durante 15 minutos (Flegel *et al.*, 1995b). Se dispone de poca información sobre otros métodos de inactivación, pero el virus parece ser susceptible al tratamiento con cloro a 30 partes por millón (0,03 mg ml<sup>-1</sup>) (Flegel *et al.*, 1997).

##### 2.1.4. **Ciclo de vida**

No se han notificado infecciones por el VECA de alta multiplicidad en cultivo celular. Una infección a una multiplicidad de infección de 0,001 en cultivo celular primario de órgano linfóide ha indicado que el máximo título vírico se obtiene a los 4 días post-infección. En *P. monodon* tienen lugar signos clínicos de ECA en un plazo de 7-10 días tras la exposición. El VECA se replica en el citoplasma de células infectadas en las que hay abundantes precursores filamentosos largos de las nucleocápsidas y los viriones germinan hacia el interior de vesículas citoplásmicas en disposiciones paracrísticas densamente concentradas para salir a nivel de la membrana citoplásmica (Chantanachookin *et al.*, 1993).

#### 2.2. **Factores del hospedador**

##### 2.2.1. **Especies hospedadoras susceptibles**

Solo se han notificado brotes de la ECA en el langostino jumbo (*P. monodon*) y en el camarón patiblanco (*P. vannamei*) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Senapin *et al.*, 2010). Sin embargo, también se han detectado infecciones naturales en el langostino japonés (*P. japonicus*), el langostino banana (*P. merguensis*), el camarón azul (*P. stylirostris*), el camarón blanco nortero (*P. setiferus*), el camarón resbaloso (*Metapenaeus ensis*), el camarón rosna (*Palaemon styliferus*) y el krill (*Acetes* sp.). Otras especies de camarones peneidos y palemónidos, gambas y krills en los que se ha notificado susceptibilidad a la infección experimental son los siguientes: el langostino tigre marrón (*P. esculentus*),

el camarón café norteño (*P. aztecus*), el camarón rosado norteño (*P. duorarum*), el camarón rabo verde (*Metapenaeus bennettiae*), el camarón krakatoa (*Macrobrachium sintangense*), el camarón carpintero (*Palaemon serrifer*), el camarón de pasta (*Asctes sp.*) y *Palaemonetes pugio* (Ma *et al.*, 2009). Cada especie tiene una susceptibilidad distinta a la enfermedad. En pruebas de laboratorio se ha observado que el VECA puede causar una alta mortalidad en *P. monodon*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *M. sintangense*, *P. styliferus* y *P. serrifer* (Lightner *et al.*, 1998; Longyant *et al.*, 2005; 2006; Ma *et al.*, 2009). En un estudio realizado con 16 especies de cangrejo obtenidas de las proximidades de piscifactorías de camarones de Tailandia, no se observaron indicios de susceptibilidad a la infección, ni natural ni experimental (Longyant *et al.*, 2006). Se ha llevado a cabo una revisión crítica de la susceptibilidad de los crustáceos a la enfermedad de la cabeza amarilla y de las implicaciones de la inclusión en la legislación europea (Stentiford *et al.*, 2009). Se ha detectado el VAB (virus asociado a la branquia) en *P. monodon* y en *P. esculentus* (Walker *et al.*, 2001). Hasta ahora solo se han detectado otros genotipos del complejo del VECA en *P. monodon* (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

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

*Penaeus monodon* es susceptible a la infección por el VECA a partir del estadio de PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Las infecciones experimentales con el VAB indican que los ejemplares de *P. japonicus* más grandes (~20 g) son menos susceptibles a la enfermedad que los más pequeños (~6–13 g) de la misma especie (Spann *et al.*, 2000).

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

Entre las especies de camarones susceptibles, la única que se sabe que resulta afectada con frecuencia (con una prevalencia de hasta el 100%) por el virus del complejo de la cabeza amarilla (genotipos 2–6) es *P. monodon* sano, que parece ser el hospedador natural (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a; 2009). Sin embargo, las infecciones por el VECA (genotipo 1) se suelen detectar solo en caso de enfermedad y no aparecen con frecuencia en *P. monodon* sanos, aunque sí se han detectado en poblaciones salvajes sanas de *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). Durante los brotes de enfermedad en los estanques, la prevalencia de la infección por el VECA puede considerarse alta. Se han detectado infecciones naturales por el VECA en *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, *P. styliferus* y *E. superba* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b), pero se dispone de poca información sobre la prevalencia natural.

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Los tejidos diana del VECA, que son de origen ectodérmico y mesodérmico, son el órgano linfóide, los hemocitos, el tejido hematopoyético, las laminillas de las branquias y el tejido conjuntivo esponjoso del subcutis, el intestino, la glándula antenal, las gónadas, los tractos nerviosos y los ganglios (Chantanachookin *et al.*, 1993; Lightner, 1996).

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

El VAB persiste como infección crónica en *P. esculentus* supervivientes durante al menos 50 días tras la exposición experimental (Spann *et al.*, 2003). La alta prevalencia de la infección por el VAB y otros virus del complejo de la cabeza amarilla (genotipos 2-6) en todos los estadios de vida de *P. monodon* sanos sugiere que son frecuentes las infecciones crónicas de por vida (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). También existen indicios de la persistencia del VECA (genotipo 1) en supervivientes a la infección experimental (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

### 2.2.6. Vectores

No existen vectores conocidos del VECA.

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

La susceptibilidad a la infección y la persistencia a largo plazo indican la posibilidad de que una amplia variedad de camarones peneidos y palemónidos salvajes actúen como portadores.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

La infección por el VECA se puede transmitir horizontalmente mediante inyección, ingesta de tejido infectado, inmersión en extractos de tejidos que contengan agua marina filtrados para estar libres de bacterias, o por cohabitación de camarones nunca antes infectados con camarones infectados (Flegel *et al.*, 1995b; Lightner, 1996). También se ha demostrado infección de camarones por inyección de extractos del camarón de pasta (*Asctes sp.*) obtenido de estanques infectados (Flegel *et al.*, 1995a). En el caso del VAB, se ha observado que se produce transmisión vertical de la infección a la descendencia,

desde progenitores tanto machos como hembras, probablemente por contaminación superficial o infección del tejido que envuelve el huevo fecundado (Cowley *et al.*, 2002). No se ha estudiado la dinámica de la infección por el VECA en estanques, pero la rápida acumulación de mortalidades durante los brotes de enfermedad sugiere una transmisión horizontal muy eficaz.

### 2.3.2. Prevalencia

La prevalencia de la infección por los virus del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos (según la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa [PCR] es muy alta (50-100%) en la mayoría de poblaciones salvajes y de piscifactoría analizadas en Australia, Asia y el este de África así como en piscifactorías de *L. vannamei* en México (Cowley *et al.*, 2004; Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sánchez-Barajas *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). La prevalencia de cada genotipo depende del origen geográfico del camarón. Por el contrario, excepto en situaciones de brotes de enfermedad en estanques de acuicultura, la prevalencia del VECA (genotipo 1) es con mayor frecuencia baja (>1%) en *P. monodon* sano salvaje o de piscifactoría. El uso de métodos de detección menos sensibles que la PCR anidada (como la histología, la inmunoelectrotransferencia, la transferencia puntual o la hibridación *in-situ*), es probable que en la mayoría de los casos informe de la prevalencia real de la infección en poblaciones de camarones que se están subestimando.

### 2.3.3. Distribución geográfica

La ECA se ha notificado en Taipei chino, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam (Walker *et al.*, 2001). Se han detectado VAB y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos de Australia, Taipei chino, India, Indonesia, Malasia, Mozambique, Filipinas, Tailandia y Vietnam (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). También se ha detectado el VECA en *P. vannamei* de piscifactorías de México (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sánchez-Barajas *et al.*, 2009).

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Dado que *P. monodon* se cría en estanques, la enfermedad causada por el VECA (genotipo 1) puede causar hasta un 100% de mortalidad en estanques de *P. monodon* infectados en un plazo de 3-5 días tras la aparición de los signos clínicos (Chantanachookin *et al.*, 1993). El VAB (genotipo 2) se ha asociado a mortalidades de hasta un 80% en estanques de *P. monodon* en Australia. Aunque pueden inducirse mortalidades experimentalmente por exposición al VECA o al VAB, mediante bioanálisis se ha observado que el VECA es mucho más virulento (~10<sup>6</sup> veces más, según el cálculo de la dosis letal 50 [DL<sub>50</sub>]) (Oanh *et al.*, 2011). Los genotipos 3, 4, 5 y 6 todavía no se han asociado a esta enfermedad (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

### 2.3.5. Factores ambientales

La amplificación del virus y la enfermedad asociada pueden desencadenarse por un estrés fisiológico inducido por cambios repentinos en el pH o el oxígeno disuelto, o por otros factores ambientales (Flegel *et al.*, 1997). El hecho de que la virulencia del VECA sea mucho más alta que la del VAB y de otros genotipos parece garantizar que el umbral de infección necesario para que aparezca la enfermedad sea mucho más fácil de alcanzar.

## 2.4. Control y prevención

### 2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método eficaz de vacunación.

### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Todavía no se dispone de ningún producto antivírico comercial eficaz.

### 2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes científicamente confirmados.

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

Ninguna comunicada.

### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Todas las especies de camarón marino criadas comercialmente parecen ser susceptibles al VECA.

#### **2.4.6. Agentes bloqueantes**

La inyección a camarones de ARN bicatenario (ds) homólogo a regiones del gen ORF1a/1b del VECA o del VAB (que acceden así al ARN vírico de todo el genoma) puede inhibir la replicación vírica y prevenir mortalidades tras la exposición experimental. El mecanismo de acción antivírica parece incluir la interferencia por ARN (ARNi).

#### **2.4.7. Desinfección de huevos y larvas**

Ninguna notificada.

#### **2.4.8. Prácticas generales de manejo**

Para reducir el riesgo de esta enfermedad pueden utilizarse poblaciones libres de patógenos específicos (SPF) o negativas al virus según la PCR, así como agua y sistemas de cultivo bioseguros.

### **3. Obtención de muestras**

#### **3.1. Elección de ejemplares**

Para realizar el diagnóstico durante un brote de la enfermedad, los camarones moribundos que pueden obtenerse de los márgenes de los estanques son la fuente de elección de material para el análisis. También deben obtenerse camarones aparentemente normales de los mismos estanques. A efectos de vigilancia de signos de infección en poblaciones de camarones aparentemente sanos los estadios de vida de misis en adelante (misis, postlarvas [PL], juveniles o adultos) pueden constituir fuentes de tejido adecuadas para el análisis.

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

Los camarones (o tejido de camarones moribundos) moribundos obtenidos para el aislamiento del virus deben congelarse de inmediato en el lugar en un líquido formado por hielo seco/alcohol y guardarse congelados en hielo seco, nitrógeno líquido o a -80°C. No es adecuado congelarlos a -20°C o temperaturas superiores.

Las muestras para el cribado molecular mediante PCR deben guardarse en un exceso mínimo de tres veces de etanol (absoluto) de grado reactivo analítico al 90%. No se recomienda utilizar etanol de grado inferior (de laboratorio o de grado industrial). También pueden utilizarse conservantes comerciales del ARN (como el RNAlater).

Las muestras para histología deben conservarse en fijador de Davidson. La formalina (10%) en agua marina puede ser una alternativa útil.

Las muestras para microscopía electrónica deben procesarse a partir de camarones vivos.

En el Capítulo 2.2.0 se ofrece orientación sobre la conservación de las muestras para cada método de diagnóstico.

#### **3.3. Combinación de varias muestras**

Para la detección de infecciones por el VECA en poblaciones grandes de camarones, la combinación de varias muestras es aceptable para el cribado o la vigilancia de lotes de fases de vida entre misis y PL de un tanque de vivero o bien de lotes de camarones juveniles en un estanque. Para el análisis mediante PCR, el tamaño de la muestra compuesta debe determinarse por la masa de tejido que puede procesarse sin comprometer un análisis. Las cantidades totales de camarones muestreados, tanto a modo de una sola muestra combinada como en forma de combinaciones múltiples más pequeñas, se escoge en función de la prevalencia esperable y del intervalo de confianza exigido en la detección. Lo habitual en poblaciones de más de 100.000 camarones, si la prevalencia de la infección supera el 5%, es para detectar el VECA con un límite de confianza del 95% se necesite un total de 60 animales analizados en muestras combinadas de los tamaños adecuados. Sin embargo, la detección definitiva puede resultar comprometida si las cargas de VECA en los camarones infectados son muy bajas o si se utilizan pruebas menos sensibles que la PCR de dos pasos o la PCR en tiempo real. Véase también el Capítulo 2.2.0.

#### **3.4. Órganos o tejidos de elección**

Los tejidos más adecuados de camarones moribundos sospechosos de estar infectados por el VECA son los del órgano linfoide y las branquias. Para el cribado o vigilancia de camarones juveniles o adultos que parezcan

macroscópicamente normales, el órgano más adecuado es el linfoide pero pueden utilizarse branquias o hemolinfa para el muestreo sin sacrificio en el caso de las fases comprendidas entre las misis y las PL.

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

Sin determinar.

## 4. Métodos de diagnóstico

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

#### 4.1.1. Signos clínicos

El VECA puede infectar camarones de piscifactoría a partir del estadio de PL tardía en adelante, pero la mayor parte de la mortalidad tiene lugar en los estadios de juvenil temprano a tardío. Los camarones moribundos pueden presentar un aspecto general descolorido y un color amarillento en el cefalotórax debido a que el hepatopáncreas se encuentra debajo, y que puede estar excepcionalmente blando en comparación con el de los camarones normales, que es marrón. En muchos casos se produce una pérdida total de la producción en cuestión de días tras la aparición de los primeros signos macroscópicos de ECA en los camarones (Chantanachookin *et al.*, 1993). Aunque en los brotes de ECA siempre se observa un cese de la alimentación, una congregación en los márgenes de los estanques y un aspecto en general descolorido, estos rasgos de la enfermedad no son especialmente particulares de la ECA. Los otros signos macroscópicos, más patognomónicos, no siempre se observan y, por tanto, no son fiables, ni siquiera para un diagnóstico provisional de la ECA. Los signos macroscópicos de enfermedad por el VAB son una natación cerca de la superficie y en los márgenes de los estanques, el cese de la alimentación y un enrojecimiento del cuerpo y los apéndices, así como un cambio de color de las branquias, que pasan a ser rosas a amarillas (Spann *et al.*, 1997). Sin embargo, aunque estos signos tienen lugar con frecuencia en los camarones enfermos, no se consideran patognomónicos de la enfermedad del VAB. Los camarones crónicamente infectados por el VECA o el VAB presentan un aspecto y comportamiento normales.

#### 4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Puede producirse una actividad alimentaria excepcionalmente alta seguida de un cese repentino de la alimentación en un plazo de 2 a 4 días tras la aparición de los signos clínicos macroscópicos de enfermedad y mortalidad. Pueden acumularse camarones moribundos en los márgenes del estanque cerca de la superficie (Chantanachookin *et al.*, 1993).

### 4.2. Métodos clínicos

#### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Véase el apartado 4.1.

#### 4.2.2. Bioquímica clínica

No está descrita.

#### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

Se fijan tejidos del cefalotórax de camarones moribundos sospechosos de estar afectados por el VECA en fijador de Davidson, se preparan cortes de tejido y se tiñen con hematoxilina y eosina (H/E) de Meyer utilizando procedimientos histológicos estándar (Lightner, 1996). Se examinan los cortes mediante microscopía óptica y se averigua si presentan cantidades moderadas a altas de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, esféricas, de unos 2 µm de diámetro o más pequeñas en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico (Chantanachookin *et al.*, 1993). Los tejidos del órgano linfoide, la subcutícula del estómago y las branquias son especialmente útiles.

#### 4.2.4. Preparaciones húmedas

Se fijan camarones enteros o filamentos de branquias en fijador de Davidson (Lightner, 1996) durante toda la noche. Tras la fijación, se lavan bien algunos filamentos de branquias con agua de grifo para eliminar el fijador, y se tiñen con la tinción de hematoxilina y eosina (H/E) de Meyer (Lightner, 1996). Tras la tinción y la deshidratación, cuando el tejido está en xileno, se coloca un filamento de branquia sobre un porta de microscopio en una gota de xileno y, utilizando un par de agujas finas (un microscopio estereó es útil), se rompen varios filamentos secundarios. Se sustituye el filamento principal en xileno donde

pueda guardarse indefinidamente como referencia permanente en un vial cerrado. Con cuidado de no dejar que el xileno se seque, se separan los filamentos secundarios sobre un porta y se retiran todos los fragmentos grandes o partículas que pudieran espesar la preparación innecesariamente. Por último, se añade una gota de líquido de montaje y un cubreobjetos. Se aplica una ligera presión para allanar la preparación lo máximo posible. Este procedimiento también puede utilizarse con capas finas de tejido subcuticular. Se examina al microscopio óptico mediante el objetivo de x40. En el caso de las muestras de brotes de ECA, se observarán cantidades moderadas a grandes de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, esféricas (de unos 2 µm de diámetro o menos) (Flegel *et al.*, 1997). Este hallazgo debe utilizarse junto con los resultados de los frotis de hemolinfa (véase abajo) para establecer un diagnóstico provisional de un brote de ECA. En cuanto a los tejidos y filamentos fijados en xileno, estos portas de preparaciones completas pueden guardarse como registro permanente.

Si se precisan resultados rápidos, el paso de la fijación puede acortarse a solo 2 horas cambiando el ácido acético del fijador de Davidson por HCl al 50%. Para optimizar los resultados, este fijador no debe guardarse más que durante unos pocos días antes de su uso. Tras la fijación, se lava bien para eliminar el fijador y se comprueba que el pH haya vuelto casi a la neutralidad antes de teñir. No se fija durante periodos más largos ni a temperaturas superiores a los 25°C, puesto que ello podría dar lugar a lesiones tisulares excesivas que dificultarían o imposibilitarían la interpretación.

#### 4.2.5. Frotis

En el caso de camarones moribundos procedentes de brotes de ECA, los frotis de hemolinfa no son útiles porque los hemocitos suelen estar muy reducidos en las fases avanzadas de la enfermedad. Deben obtenerse muestras de hemolinfa de camarones macroscópicamente normales procedentes de un estanque sospechoso donde también se hayan obtenido camarones moribundos. Se extrae la hemolinfa con una jeringa que contenga dos volúmenes de formalina al 25% o bien de fijador de Davidson, en cuya fórmula el ácido acético se habrá sustituido por agua o por formalina. Se mezcla bien, sin hacer caso de los coágulos del interior de la jeringa, se deposita una gota en un porta, se realiza el frotis y a continuación se seca al aire antes de teñir con H/E u otras tinciones estándar de frotis de sangre. Se deshidrata, se añade líquido de preparación y se coloca un cubreobjetos. Se examina al microscopio óptico mediante un objetivo de x40. En el caso de muestras de brotes de la ECA, algunos de los frotis presentarán cantidades moderadas a altas de hemocitos con núcleos cariorréticos o picnóticos. Es importante que los portas con estos núcleos no presenten signos de infección bacteriana concomitante, puesto que las infecciones bacterianas pueden causar alteraciones similares en los hemocitos. Un diagnóstico provisional de un brote de ECA deberá basarse en los resultados de los frotis de hemolinfa y los resultados de preparaciones completas realizadas con tinciones rápidas (véase arriba) o de cortes históricos teñidos.

#### 4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología

Para la microscopía electrónica de transmisión (MET), los tejidos más adecuados de camarones moribundos sospechosos de estar infectados por el VECA son los del órgano linfoide y de las branquias. Para el cribado o la vigilancia de camarones macroscópicamente normales, el tejido más adecuado es el órgano linfoide.

Se aturden camarones vivos mediante inmersión en agua helada solo hasta que queden inmovilizados, o bien se sacrifican mediante una inyección de fijador. Se diseccionan rápidamente y se toman pequeños trozos de tejido diana (de no más de unos pocos mm de diámetro) y se fijan en al menos 10 volúmenes de glutaraldehído al 6% mantenido a 4°C y tamponado con solución de cacodilato de sodio ( $\text{Na}[\text{CH}_3]_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (8,6 g de cacodilato de Na, 10 g de NaCl, agua destilada para llegar a los 100 ml, ajustado a pH 7 con HCl 0,2 N) o solución de fosfato (0,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de NaCl, 0,5 g de sacarosa, agua destilada para llegar a los 100 ml, se ajusta a pH 7 con HCl 0,2 N). Se fijan durante al menos 24 horas antes de procesarlos. En el caso de un almacenaje largo en fijador a 4°C, se reduce el glutaraldehído al 0,5-1,0%. El procesado consiste en la post-fijación con tetróxido de osmio al 1%, deshidratación, inclusión, corte y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo según los métodos estándar de MET. Los reactivos utilizados para este procedimiento se han descrito en otra parte (Lightner, 1996).

En el citoplasma de células infectadas por el VECA, se observan tanto precursores de la nucleocápsida como viriones con envoltura completos. Los precursores de la nucleocápsida son filamentos largos de unos 15 nm de diámetro y de longitud variable (80-450 nm) que aparecen en el citoplasma, a veces densamente concentrados en series paracristalinas. Los viriones son partículas baciliformes con envoltura (40-60 nm x 150-200 nm) con los extremos redondeados y protuberancias prominentes (8-11 nm) que sobresalen de la superficie. Los viriones suelen observarse en el citoplasma de las células infectadas y junto a vesículas intracelulares. También pueden observarse germinando en la membrana

citoplasmática y en espacios intersticiales. Mediante MET no es posible diferenciar los viriones y las nucleocápsidas del VAB de los del VECA.

Los esferoides del órgano linfoide se observan a menudo en *P. monodon* sanos crónicamente infectados con el VECA o el VAB, y la enfermedad con frecuencia cursa con necrosis del órgano linfoide (Spann *et al.*, 1998). Sin embargo, la formación de esferoides y la degeneración del tejido del órgano linfoide también pueden tener lugar durante la infección con otros virus de camarones (Lightner, 1996).

### 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

Aunque se dispone de métodos de cultivo primario de células de camarón, no se recomiendan para el aislamiento/identificación del VECA por el alto riesgo de contaminación con agentes extraños. Por el momento no existen líneas celulares continuas adecuadas para el cultivo del VECA.

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

Se preparan los reactivos y se llevan a cabo las pruebas según los protocolos de Lu *et al.* (1994) y Loh *et al.* (1998). Esto consiste en la purificación de viriones del VECA de camarones infectados en el laboratorio, la generación de inmunoglobulinas (Ig) en conejos blancos neozelandeses, la purificación de la IgG utilizando columnas de proteína G bacteriana recombinante y la extracción de antígenos de camarón normal de reacción cruzada, mediante adsorción en tejido de músculo y hemolinfa de camarón triturado y secado con acetona. Para la prueba se extraen 0,1 ml de hemolinfa de muestras de camarón vivo y se diluyen en un volumen igual de tampón citrato para utilizarlas de inmediato, o bien se almacenan a -80°C hasta que se utilicen. Para la inmunoelectrotransferencia, se utilizan 200 µl de la muestra, se clarifican a 8.000 **g** durante 5 minutos y a continuación se sedimenta el sobrenadante a 140.000 **g** durante 5 minutos. Se resuspenden los precipitados en 100 µl de tampón de carga 2x (2,5 ml de Tris/NCI 0,5 mM, a pH 6,8, 4 ml de dodecil sulfato de sodio [SDS] al 10%, 2 ml de glicerol, 1 µl de beta-mercaptoetanol y 0,5 ml de agua destilada desionizada) y se calientan a 95°C durante 5 minutos. Se carga una sub-muestra de 10 µl sobre gel de SDS/poliacrilamida al 5%, y se lleva a cabo la electroforesis a 200 V. Se transfiere el gel situándolo sobre una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,1 mm) en tampón de transferencia (3,03 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 200 ml de metanol por litro) a 100 V durante 1 hora. Se lava la membrana con solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, se empapa en leche desnatada al 5% (en PBS) durante 1 hora y se lava con PBS durante 5 minutos. A continuación, se trata la membrana con una dilución del anticuerpo primario (IgG) a 1/1000 durante 1 hora, se lava tres veces con PBS durante 5 minutos y a continuación se trata durante 1 hora con una dilución a 1/2.500 de anti-IgG de conejo generada en cabra conjugada a peroxidasa de rábano. Se lava de nuevo tres veces con PBS durante 5 minutos y a continuación se trata con substrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, hasta que aparece un color azulado/morado. Se detiene la reacción empapando la membrana en agua destilada. Todas las incubaciones deben llevarse a cabo a 25°C ± 2°C. Se utiliza una preparación vírica purificada como control positivo y se identifican 2-4 bandas de proteínas importantes características del VECA a 116, 64 y 20 kDa. La sensibilidad es de 0,4 ng de proteína de VECA (≈ 10<sup>6</sup> viriones del VECA).

###### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

###### 4.3.1.2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Existen tres métodos de RT-PCR descritos. El primer protocolo es una RT-PCR de un solo paso adaptado de Wongteerasupaya *et al.* (1997) que puede utilizarse para la confirmación del VECA en camarones obtenidos de brotes sospechosos de ECA. Este protocolo detectará solo el VECA y no el

VAB ni otros genotipos. El segundo protocolo es un procedimiento de RT-PCR anidada múltiple más sensible adaptado de Cowley *et al.* (2004). Puede utilizarse para la detección diferencial de VECA y VAB en camarones que se hallen en un brote de enfermedad, o bien para el cribado de portadores sanos. Esta prueba no detectará todos los genotipos conocidos del complejo de la cabeza amarilla, y el genotipo 3 puede reaccionar como VAB. Una marca (Farming IntelliGene Technology Corporation, Taipei chino) comercializa una forma modificada adecuada de esta prueba. La OIE tiene un proceso formal de validación y certificación de pruebas comerciales. En el sitio web de la OIE se puede consultar un listado de los kits comerciales de pruebas y fabricantes certificados. El tercer protocolo es un procedimiento de RT-PCR anidada múltiple sensible proporcionado por Wijegoonawardane *et al.* (2008b). Esta prueba se puede utilizar para la detección de virus del complejo de la cabeza amarilla a efectos del cribado de camarones sanos. Detecta los seis genotipos actualmente conocidos (incluidos el VECA y el VAB), pero no discrimina entre genotipos. La determinación del genotipo se logra mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos del producto de la RT-PCR.

*Preparación de la muestra:* En el caso de camarones juveniles o adultos, para preparar ARN total pueden utilizarse órgano linfoide, tejido de branquias o hemolinfa. Es preferible el tejido fresco. El tejido de órgano linfoide y de branquias conservado en etanol de grado analítico al 95% o en RNAlater (disponible en distintas marcas), o bien almacenado congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  también son adecuados para la preparación de ARN total. Se procesan 10-20 mg de tejido de órgano linfoide o de branquias o 50  $\mu\text{l}$  de hemolinfa en 500  $\mu\text{l}$  del reactivo Trizol<sup>TM</sup>1 y se extrae ARN total según el manual de instrucciones del producto. Se resuspende el ARN en 25  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC (diethyl-piropicarbonate), se calienta a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, se enfría con hielo y se utiliza de inmediato o se guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta que sea necesario. Lo ideal es preparar una dilución a 1/200 (es decir, 2,5  $\mu\text{l}$  de ARN en 500  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC), y determinar las absorbancias  $A_{260}$  nm y  $A_{280}$  nm (se precisa un espectrofotómetro de UV) para cuantificar el ARN y comprobar su calidad (proporción aproximada de 2:1). La cantidad de ARN depende del tipo y frescor de los tejidos, así como de la calidad del conservante utilizado y del tiempo durante el cual se haya conservado. Sin embargo, las cantidades de ARN aproximadas extraídas de tejidos frescos oscilan entre los 0,2 y los 2,0  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ , y las extraídas de tejidos conservados en alcohol, entre 0,1 y 1,0  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ .

De un tanque de precriadero o vivero que contenga 100.000 PL o más, se toma una muestra de unas 1.000 PL de cinco puntos distintos. Se combinan las muestras en un estanque, se remueve suavemente el agua y a continuación se escoge y se analiza una muestra de cinco PL vivas que se extraen del centro del estanque. El tamaño de la muestra se determina según la prevalencia supuesta o la que se tenga por objetivo. Se homogeneiza la muestra en un volumen adecuado del reactivo Trizol<sup>TM</sup> y se extrae ARN según el manual de instrucciones del producto. En base al procedimiento estándar de extracción con Trizol<sup>TM</sup>, se utilizan masas de tejido equivalentes a 25–30  $\times$  PL5, 15  $\times$  PL10 y 5  $\times$  PL5 y se produce ARN total de alta calidad libre de contaminación por proteínas.

Para cada grupo de muestras de ARN a analizar, deben incluirse agua tratada con DEPC y extractos que se sepa que contienen ARN del VECA y/o ARN del VAB (según la prueba) como controles negativo y positivo, respectivamente.

*Protocolo 1:* RT-PCR para la detección específica del VECA en camarones enfermos

Se mezclan 2  $\mu\text{l}$  de ARN en 20  $\mu\text{l}$  de tampón para PCR (Tris/HCl 10 mM, a pH 8,3, KCl 50 mM) que contenga 2,5 U de transcriptasa inversa del M-MLV (virus de la leucemia murina de Moloney), 1,0 U de inhibidor de la ribonucleasa, cebador antisentido (144R, abajo) 0,75  $\mu\text{M}$ , cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 5 mM, y  $\text{MgCl}_2$  5 mM, y se incuba a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos para sintetizar ADNc. A continuación, se incuba la mezcla a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para inactivar la transcriptasa inversa y se deja enfriar la mezcla hasta los  $5^{\circ}\text{C}$ . Se añade la mezcla de la PCR (Tris/HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM) que contiene 2,5 U de ADN polimerasa *Taq*,  $\text{MgCl}_2$  2 mM y cebador codificante 10F 0,75  $\mu\text{M}$  para conseguir un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . A no ser que el instrumento vaya equipado con una tapa calentada, se recubren los tubos con 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral y se lleva a cabo la amplificación mediante PCR durante 40 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos,  $58^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos y finalmente a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Se añaden 20  $\mu\text{l}$  del producto amplificado de la PCR a geles de agarosa/TAE (Tris-acetato-EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) al 2% que contengan 0,5  $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$  de bromuro de etidio y un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se realiza la detección mediante un transiluminador ultravioleta

La reacción positiva vendrá indicada por la presencia de un producto de 135 pb. La sensibilidad de esta prueba es de unos 0,01 pg de ARN purificado de VECA ( $\approx 10^3$  genomas).

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

Secuencias del cebador de la PCR:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'  
144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

*Protocolo 2:* RT-PCR anidada para la detección diferencial del VECA y del VAB en camarones sanos o enfermos

Para la síntesis de ADNc, se añaden 2 µl de ARN (lo ideal son 1,0 µg de ARN total, si se cuantifica) y 0,7 µl de cebador GY5 (50 pmol µl<sup>-1</sup>) hasta un total de 6 µl en agua tratada con DEPC, se incuban a 70°C durante 10 minutos y se enfrían sobre hielo. Se añaden 2 µl de tampón Superscript II x 5 (Tris/HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 1 µl de DTT 100 mM y 0,5 µl de mezcla madre de dNTP 10 mM (es decir, dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10) y se mezcla suavemente. Se precalienta a 42°C durante 2 minutos, se añaden 0,5 µl de transcriptasa inversa (200 U µl<sup>-1</sup>) y se incuban a 42°C durante 1 hora. A continuación, se calienta la reacción a 70°C durante 10 minutos, se enfría sobre hielo y se centrifuga brevemente en una microcentrífuga para recoger el contenido del tubo. Para el primer paso de la PCR, se prepara una mezcla de reacción de 50 µl que contenga tampón *Taq* 1x (Tris/HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM de los cebadores GY1 y GY4, cada uno a una concentración 35 pM, cada una de las dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 200 µM y 2,5 U de polimerasa *Taq* en un tubo de pared fina de 0,5 ml. Se recubre la mezcla de reacción con 50 µl de parafina líquida, se calienta a 85°C durante 2-3 minutos y a continuación se añade 1 µl de ADNc. Se lleva a cabo la amplificación mediante PCR utilizando 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR, se prepara una mezcla de reacción de 50 µl que contenga 2 µl del producto del primer paso de la PCR, tampón *Taq* 1x (arriba), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 35 pmol de los cebadores GY2, Y3 y G6, cada una de las dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) 200 µM y 2,5 U de polimerasa *Taq* en un tubo de pared fina de 0,5 ml revestido con parafina líquida. Se lleva a cabo la PCR aplicando unas condiciones de amplificación iguales a las descritas anteriormente. Se añaden 10 µl del producto amplificado mediante la PCR a geles de agarosa/TAE al 2% que contengan 0,5 µg ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio y un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se realiza la detección mediante un transiluminador ultravioleta.

Si la carga vírica es lo suficientemente alta, se amplificará un fragmento de ADN de 794 pb del VAB o del VECA en el primer paso de la PCR. En el segundo paso de la PCR, la presencia de un producto de 277 pb indicará la detección de VECA, y un producto de 406 pb indicará la detección del VAB. La presencia de productos tanto de 406 como de 277 pb indicará una infección dual con VAB y VECA. La sensibilidad de detección de la PCR de segundo paso es unas 1.000 veces superior a la de la PCR de un solo paso, y permite detectar ARN del VAB o del VECA hasta un límite de 10 fg de ARN total de órgano linfóide.

Las secuencias de los cebadores de la RT-PCR genéricos para el VAB y el VECA (GY) o específicos del VAB (G) o el VECA (Y) son las siguientes:

GY1: 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'  
GY2: 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'  
GY4: 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'  
GY5: 5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'  
Y3: 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'  
G6: 5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

**NB:** Se han encontrado problemas de especificidad de los cebadores para algunas cepas emergentes, por lo que todos los productos de la PCR generados al usar el protocolo 2 deben ser secuenciados para confirmar el genotipo del virus.

*Protocolo 3:* RT-PCR anidada para la detección de todos los genotipos del complejo de la cabeza amarilla actualmente conocidos (incluidos el VECA y el VAB).

Para la síntesis de ADNc, se mezclan 2 µl de ARN (lo ideal son 1,0 µg de ARN total, si se cuantifica), 50 ng de cebadores hexámeros aleatorios y 1,0 µl de dNTP 10 mM y se llega a un volumen total de 14 µl en agua estéril tratada con DEPC, se incuban a 65°C durante 5 minutos y se enfrían sobre hielo. Se añaden 4,0 µl de tampón Superscript III x 5, 1,0 µl de DTT 100 mM, 1,0 µl de una solución de 40 U µl<sup>-1</sup> de RNaseOUT™ (Invitrogen) y 1,0 µl de una solución de 200 U µl<sup>-1</sup> de transcriptasa inversa y se mezcla suavemente. Se incuban a 25°C durante 5 minutos y a continuación a 42°C durante 55 minutos, se detiene la reacción calentando a 70°C durante 15 minutos, se enfría sobre hielo y se centrifuga brevemente en una microcentrífuga para recoger el contenido del tubo. Para el primer paso de la PCR, se añade 1 µl de ADNc a una mezcla de reacción de 25 µl en total, que contenga tampón *Taq* 1x (Tris/HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM, Triton X-100 al 0,1%), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,35 µl de

mezcla de cebador que contenga 25 pmol  $\mu\text{l}^{-1}$  de cada conjunto de cebadores (véase abajo) YC-F1ab y YC-R1ab, 0,5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de dNTP 10 mM y 0,25  $\mu\text{l}$  de una solución de 5 U  $\mu\text{l}^{-1}$  de ADN polimerasa *Taq*. Se lleva a cabo la amplificación mediante la PCR utilizando una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguida de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 40 segundos, seguida de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR, se utiliza 1  $\mu\text{l}$  del producto del primer paso de la PCR en la mezcla de reacción según se ha preparado anteriormente, pero sustituyendo las combinaciones de cebadores YC-F2ab y YC-R2ab. Se lleva a cabo la amplificación mediante la PCR utilizando una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto seguida de 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, seguida de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Se añaden 8  $\mu\text{l}$  del producto amplificado de la PCR a geles de agarosa/TAE al 2% que contengan 0,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de bromuro de etidio y un marcador apropiado de ADN a modo de escala, y se realiza la detección mediante un transiluminador ultravioleta

Si la carga vírica es suficientemente alta, se amplifica un fragmento de ADN de 358 pb en el primer paso de la PCR. El segundo paso de la PCR (anidada) amplifica un producto de 146 pb. La detección de estos productos indica la presencia de uno de los seis genotipos del complejo de la cabeza amarilla. Si es necesario, se puede determinar exactamente de qué genotipo se trata mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos de cualquier producto de la PCR, seguida de una comparación con las secuencias de los genotipos conocidos, mediante una alineación múltiple de la secuencia y un análisis filogenético. Las sensibilidades de detección de la PCR de primer paso y de la PCR anidada son de 2.500 y de 2,5 moldes de ARN, respectivamente.

Las secuencias de los cebadores de la PCR (cada cebador está formado por un conjunto de cantidades iguales de dos secuencias relacionadas de oligonucleótidos) son las siguientes:

Conjunto YC-F1ab:	5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'
	5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'
Conjunto YC-R1ab:	5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3'
	5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'
Conjunto YC-F2ab:	5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'
	5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'
Conjunto YC-R2ab:	5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'
	5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'
Códigos de bases mixtas:	R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).

#### 4.3.1.2.3. Hibridación in-situ

A continuación se describe el protocolo de Tang *et al.* (2002). Es un método adecuado para la detección tanto del VECA como del VAB (Tang y Lightner (1999). Para conservar el ARN vírico, se fijan camarones vivos con fijador de Davidson modificado, tamponado con solución neutra, sin ácido acético (fijador RF) (Hasson *et al.*, 1997). Para lograr una buena conservación del tejido y al mismo tiempo conservar la accesibilidad del ARN, puede utilizarse fijador normal de Davidson siempre que el tiempo de fijación no supere las 24 horas (máximo de 48 horas). Se procesan los camarones fijados utilizando métodos histológicos estándar y se realizan cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor sobre portas Superfrost Plus (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.). Antes de la hibridación, se incuban los cortes a 65°C durante 45 minutos, se retira la parafina con Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.) y se rehidratan pasándolos por una serie de diluciones de etanol en agua. Se digieren los cortes con proteinasa K (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , en Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM) durante 15 minutos a 37°C, y a continuación se post-fijan en formaldehído (0,4%) durante 5 minutos. Se lavan en SSC (citrato salino estándar) 2x, después se pre-hibridan con 500  $\mu\text{l}$  de solución de pre-hibridación (SSC 4x, formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 0,25  $\text{mg ml}^{-1}$  de ARN de levadura, 0,5  $\text{mg ml}^{-1}$  de ADN de esperma de salmón sonicado, sulfato de dextrano al 5%) a 42°C durante 30 minutos. Para la hibridación se recubren los cortes con 250  $\mu\text{l}$  de solución de hibridación que contenga una sonda marcada con digoxigenina (20-40  $\text{ng ml}^{-1}$ ) a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavan los cortes del siguiente modo: con SSC 2x una vez durante 30 minutos a temperatura ambiente; SSC 1x dos veces durante 5 minutos a 37°C; SSC 0,5x dos veces durante 5 minutos a 37°C. Se incuban los cortes con un suero de anticuerpos de oveja anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) a 37°C durante 30 minutos. Se lavan con una solución de Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5, y NaCl 0,15 M dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente y con una solución de Tris/HCl 0,1 M, pH 9,5, y NaCl 0,1 M. Se incuban con nitroazul tetrazolio y con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en la oscuridad durante 1-2 horas para que aparezca color. Se aplica una tinción de contraste con Marrón Bismarck Y (0,5%), se rehidratan pasándolos por una serie de diluciones de etanol y Hemo-De, se añade Permout (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.) y se cubren con un cubreobjetos. Las células infectadas por el VECA se tiñen de un color azul a negro-morado que destaca sobre la tinción

de contraste marrón. Se incluyen controles positivos de tejido infectado por el VECA y controles negativos de tejido de camarón no infectado. La sonda de diagnóstico se prepara mediante marcaje por PCR utilizando los siguientes cebadores:

VECA1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'  
 VECA1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

#### 4.3.1.2.3 Purificación del agente patógeno

El método de la purificación del agente patógeno se basa en el descrito por Wongteersupaya *et al.* (1995). Lo ideal es utilizar unos 250 ejemplares juveniles sanos de camarón *P. monodon* (unos 10 g) como fuente de virus para la purificación. Tras un periodo de varios días de aclimatación en tanques de 1.500 litros (unos 80 camarones/tanque) a una salinidad de 3,5 partes por mil (mg/ml), se inocula a cada camarón por vía intramuscular 100 µl de una suspensión a 1/100 de extracto de branquia infectada. El día 2 post-infección, se obtienen los camarones moribundos que presenten signos característicos de la ECA. Se extrae hemolinfa mediante una jeringa de los senos de la base de las patas locomotrices y se mezcla con cuidado sobre hielo con el mismo volumen de medio de hemolinfa de langosta (LHM) (NaCl 486 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 8,1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 36 mM, dextrosa al 0,05% en Medio Mínimo de Eagle's, a pH ajustado a 7,6 con NaOH 1 N). Se centrifuga la mezcla a 480 g durante 30 minutos a 4°C para extraer los detritos celulares. Tras la centrifugación, se desecha el sedimento y se vuelve a centrifugar el líquido sobrenadante a 100.000 g durante 1 hora a 4°C. Se desecha la fracción sobrenadante y se resuspende con cuidado el sedimento a 4°C durante toda la noche en 1 ml de LHM. Se deposita una capa de esta suspensión sobre un gradiente continuo de Urografin al 20-40% y se ultracentrifuga a 100.000 g durante 1 hora a 4°C. Tras la centrifugación, se recoge la banda vírica mediante una pipeta Pasteur y se vuelve a diluir con tampón NTE (EDTA 0,02 M, NaCl 0,2 M, Tris/HCl 0,2 M [pH 7,4]) hasta un volumen final de 12 ml. Se ultracentrifuga la suspensión a 100.000 g durante 1 hora a 4°C y se resuspende el sedimento (virus purificado) en 100 µl de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 7,4]) y se guarda en alícuotas de 20 µl a -80°C hasta que sea necesario.

#### 4.3.1.2.4 Bioanálisis

El procedimiento del bioanálisis se basa en el descrito por Spann *et al.* (1998), pero otros varios autores han descrito procedimientos similares (Lu *et al.*, 1994). El bioanálisis debe llevarse a cabo en camarones susceptibles (véase el apartado 2.2 anterior) que hayan sido certificados como SPF y que procedan de instalaciones de cría bioseguras. Como alternativa, deberá realizarse un cribado de los camarones susceptibles salvajes o de piscifactoría que vayan a utilizarse para el bioanálisis, mediante una PCR anidada con transcripción inversa (RT) utilizando muestras de linfa, con el fin de confirmar la ausencia de infecciones crónicas pre-existentes por el VECA, el VAB o virus relacionados. Los camarones deben mantenerse a lo largo de todo el procedimiento en las condiciones óptimas de supervivencia de la especie en cultivo de laboratorio.

Se obtienen camarones moribundos de un brote de enfermedad o bien camarones que se sospeche que son portadores de la infección, y se mantienen a 4°C sobre hielo. Se retiran y desechan la cola y los apéndices. Si es necesario, el camarón entero o el cefalotórax pueden congelarse de inmediato y almacenarse a -80°C o en nitrógeno líquido hasta que sea necesario. Se descongelan las muestras almacenadas rápidamente en un baño de agua a 37°C dentro de dos bolsas de plástico de autocierre y a continuación se mantienen a 4°C o sobre hielo durante todo el procedimiento. Se retira el caparazón y los aparatos bucales calcíferos. Se suspenden los tejidos restantes en seis volúmenes de tampón TN (Tris/HCl 0,02 M, pH 7,4, NaCl 0,4 M) y se homogeneizan en una trituradora de tejido para formar una suspensión sin grumos. Se clarifica el homogenizado a 1300 g durante 20 minutos a 4°C. Se retira el líquido sobrenadante que se encuentra bajo la capa lipídica y se pasa por un filtro de 0,45 µm. Se mantiene el filtrado a 4°C para su utilización inmediata o se congela enseguida y se almacena en alícuotas a -80°C o en nitrógeno líquido. Se descongela el filtrado rápidamente a 37°C y se mantiene sobre hielo hasta que se utiliza.

Se inyectan 5 µl de filtrado por gramo de peso corporal a un mínimo de doce juveniles de camarón (1-5 g) de una especie susceptible (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*), en el segundo segmento abdominal utilizando una aguja de 0,45 mm de diámetro externo. Se inyecta tampón TN y un extracto de tejido filtrado preparado a partir de camarones no infectados a dos grupos equivalentes de al menos 12 camarones cada uno. A otro grupo de al menos 12 camarones se inyectará por último un inóculo calibrado y de composición conocida preparado a partir de camarones infectados por el VECA o el VAB (según sea necesario), que funcionará como control positivo. Se mantiene cada grupo de camarones en un tanque cubierto independientemente, con una entrada independiente de agua a lo largo de todo el bioanálisis. Debe garantizarse que no se produzca ninguna transferencia inadvertida de agua entre los tanques, mediante la aplicación de las buenas prácticas de laboratorio. Se observan los camarones y se

registran las mortalidades durante al menos 21 días o hasta que los grupos analizados y el control positivo alcancen un 100% de mortalidad. Se obtiene al menos un camarón moribundo de cada uno de los cuatro grupos para examinarlo mediante histología, MET, hibridación *in-situ* de ácido nucleico y PCR o inmunoelectrotransferencia, con el fin de confirmar la presencia del VECA o del VAB (según sea necesario) en la muestra (los procedimientos de cada prueba se hallan descritos en los apartados anteriores).

NOTA: los camarones a analizar que sean sospechosos de ser portadores de infecciones crónicas de nivel bajo podrían producir un inóculo que contuviera una dosis muy baja de virus. En el bioanálisis, este tipo de inóculo puede no causar necesariamente mortalidad, signos macroscópicos de enfermedad ni signos histológicos característicos de una infección letal. En este caso, deben aplicarse pruebas moleculares o MET a los camarones sometidos al bioanálisis.

#### 4.3.2. Métodos serológicos

No aplicables.

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

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia específica y el diagnóstico de la ECA 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 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.** Métodos de vigilancia específica y diagnóstico

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

El método de elección para declarar la ausencia de enfermedad es la RT-PCR anidada (apartado 4.3.1.2.3.1; Protocolo 3) seguida de una secuenciación confirmativa del producto amplificado mediante PCR. Se precisa obtener unos resultados negativos en la PCR de dos pasos. Los casos, extremadamente infrecuentes, en los que un resultado positivo en la PCR de dos pasos no pueda confirmarse mediante secuenciación, también se considerarán

negativos. Dado que puede tener lugar una recombinación genética entre genotipos, la presencia de cualquiera de los genotipos se considera una prueba de la presencia de la ECA.

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de ECA se define como un brote de enfermedad en camarones marinos en el que se observan mortalidades acumuladas (de hasta el 100%) en los estadios de juveniles tempranos a tardíos, que pueden ir precedidas de un cese de la alimentación y de una acumulación de camarones en los márgenes de los estanques. Los camarones moribundos pueden presentar un aspecto general descolorido y un color amarillento en el cefalotórax, debido a que debajo se encuentra el hepatopáncreas, de color amarillo. El examen histológico del órgano linfoide fijado debe poner de manifiesto cantidades moderadas a altas de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, y esféricas (de unos 2 µm de diámetro o menores).

### 7.2. Definición de caso confirmado

La ECA puede confirmarse por la detección de niveles altos de infección diseminada en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico mediante hibridación *in situ*, junto con la detección de productos amplificados del tamaño indicado, utilizando RT-PCR confirmativas y secuenciación, como se describe en el apartado 4.3 de este capítulo. Dado que las infecciones crónicas de nivel bajo con virus del complejo de la cabeza amarilla son frecuentes en ciertas zonas, la detección de la presencia de virus no constituye, en si misma, una prueba de la etiología.

## 8. Bibliografía

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31** (12), 953–956.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.

COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012). Family Roniviridae. *In: Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A., Adams M., Carstens E. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAITANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAITANA S., WONGTERRASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. *In: Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.

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 assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). In: Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.

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

LIGHTNER D.V., HASSON, K.W., WHITE, B.L. & REDMAN R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 271–281.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. JR, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: Advances in Shrimp Biotechnology, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.

LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.

LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.

MA H., OVERSTREET R.M. & JOVONOVICH J.A. (2009). Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *J. Invert. Pathol.* **101**, 112–118.

ONH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.

SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Internat.* **17**, 101–112.

SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIRATANA S. & FLEGEL TW. (2010). Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J. Fish Dis.*, **33** (5), 421–430.

SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.

SPANN K.M., DONALDSON R.A., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 221–225.

SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 1–10.

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 implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.

TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.

WALKER P.J., COWLEY J.A., SPANN K.M., HODGSON R.A.J., HALL M.R. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. 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, LA, USA, 292–302.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA, N., PHETCHAMPAI, N., COWLEY, J.A., GUDKOV, N. & WALKER P.J. (2009). Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. *Virology* doi: 10.1016/j.virol.2009.04.015.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a). Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology* **380**, 213–225.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b). Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 45–50.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Enfermedad de la cabeza amarilla (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int))