



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

Original: inglés

Febrero de 2017

INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

París, 22 de febrero–1 de marzo de 2017

La Comisión de Normas Sanitarias de la OIE para los Animales Acuáticos (en lo sucesivo, Comisión para los Animales Acuáticos) se reunió en la sede de la Organización, en París, del 22 de febrero al 1 de marzo de 2017. La lista de participantes figura en el **Anexo 1**.

La Comisión para los Animales Acuáticos agradece a los siguientes Países Miembros por el envío de sus comentarios sobre los distintos proyectos de texto para el *Código Acuático* y el *Manual Acuático* difundidos tras su reunión de septiembre de 2016: Arabia Saudí, Argentina, Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Colombia, Costa Rica, Corea (Rep. de), Cuba, Estados Unidos de América, Fiji, Guatemala, Japón, Noruega, Nueva Zelanda, Singapur, Suiza, Tailandia, Tanzania, Taipéi Chino y los Estados Miembros de la Unión Europea (UE).

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó los comentarios remitidos por los Países Miembros sobre los textos presentados y modificados del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OIE (*Código Acuático*) y del *Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos* de la OIE (*Manual Acuático*) e introdujo enmiendas donde lo consideró pertinente. Las enmiendas se señalan del modo habitual, mediante doble subrayado y ~~tachado~~, y figuran en los anexos del informe. Los cambios introducidos en esta reunión se muestran con un fondo de color para distinguirlos de los efectuados en el encuentro de septiembre de 2017.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó la totalidad de los comentarios de los Países Miembros que estaban acompañados por una justificación. Sin embargo, no pudo preparar una explicación detallada de las razones que motivaron la aceptación o el rechazo de cada comentario recibido.

La Comisión para los Animales Acuáticos insta a los Países Miembros a referirse a informes previos a la hora de preparar comentarios sobre cuestiones ya tratadas. La Comisión invita a los Países Miembros a consultar los informes de los grupos *ad hoc* que presentan información importante y que se anexan a los informes de la Comisión. Además, se recuerda a los Países Miembros que es difícil evaluar y responder a comentarios recibidos sin justificación o sin una lógica obvia. Desde 2016, todos los informes de los grupos *ad hoc* se publican en el sitio web de la OIE como documentos separados (disponibles en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/comisiones-especializadas-y-grupos/comision-cientifica-y-informes/endorsed-ad-hoc-group-reports/>).

El cuadro presentado a continuación sintetiza los textos recogidos en los anexos. Los Países Miembros deben tomar nota de que los textos de los **Anexos 3 a 25** se proponen para adopción en la 85.ª Sesión General en mayo de 2017, los **Anexos 26 a 28** para comentario y los **Anexos 29 a 31**, para información.

La Comisión para los Animales Acuáticos alienta encarecidamente a los Países Miembros a participar en el desarrollo de las normas internacionales de la OIE preparándose para participar en el proceso de adopción de los textos de los **Anexos 3 al 25** en la 85.ª Sesión General. De igual manera, los insta a enviar comentarios sobre los **Anexos 26 a 28** de este informe. Los comentarios se deberán presentar como propuestas específicas de modificación de texto, basadas en argumentos científicos. Las propuestas de supresión de texto deberán indicarse con ~~tachado~~ y las de modificación, con doble subrayado. Los Países Miembros no deberán recurrir a la función automática de “control de cambios” del procesador de textos, ya que dichos cambios se pierden al compilar las propuestas de los Países Miembros en los documentos de trabajo de la Comisión.

Los comentarios de los **Anexos 26 a 28** se deberán enviar a la Sede de la OIE antes del **4 de agosto de 2017**, para su análisis durante la reunión de la Comisión para los Animales Acuáticos, que se celebrará en septiembre de 2017. Los comentarios recibidos después de la fecha indicada no se presentarán a consideración de la Comisión para los Animales Acuáticos en dicho encuentro.

Todos los comentarios deberán remitirse al Departamento de normas: standards.dept@oie.int.

| Ítem | Textos propuestos para adopción | Número de anexo | Número de página |
|------------------------|---|--|------------------|
| Código Acuático | | | |
| 1 | Comentarios generales | Sin anexo | 1 |
| 2 | Glosario | Anexo 3 | 27 |
| 3 | Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.) | Anexos 4A (limpio) y 4B (con modificaciones) | 29 |
| 4 | Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.) | Anexo 5 | 33 |
| 6 | Desinfección de establecimientos y equipos de acuicultura (Capítulo 4.3.) | Anexo 6 | 35 |
| 7 | Recomendaciones para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos (Capítulo 4.4.) | Anexo 7 | 45 |
| 8 | Obligaciones generales en materia de certificación (Artículo 5.1.4.) | Anexo 8 | 47 |
| 9.1 | Plaga del cangrejo de río (<i>Aphanomyces astaci</i>) (Capítulo 9.1.) | Anexo 9 | 49 |
| 9.2 | Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (Capítulo 9.2.) | Anexo 10 | 57 |
| 9.3 | Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 9.3.) | Anexo 11 | 65 |
| 9.4 | Mionecrosis infecciosa (Capítulo 9.4.) | Anexo 12 | 73 |
| 9.5 | Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 9.5.) | Anexo 13 | 81 |
| 9.6 | Síndrome de Taura (Capítulo 9.6.) | Anexo 14 | 89 |
| 9.7 | Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 9.7.) | Anexo 15 | 95 |
| 9.8. | Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 9.8.) | Anexo 16 | 103 |
| 10 | Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo Capítulo 9.X.) | Anexo 17 | 109 |
| 11 | Artículo revisado X.X.8. (texto limpio y con modificaciones) | Anexos 18A (limpio) y 18B (con modificaciones) | 115 |

| Ítem | Textos propuestos para adopción | Número de anexo | Número de página |
|------------------------|---|-----------------|------------------|
| Manual Acuático | | | |
| 18 | Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo proyecto de Capítulo 2.2.X.) | Anexo 19 | 119 |
| 19 | Plaga del cangrejo de río (<i>Aphanomyces astaci</i>) (Capítulo 2.2.1.) | Anexo 20 | 133 |
| 20 | Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 2.2.3.) | Anexo 21 | 155 |
| 21 | Mionecrosis infecciosa (Capítulo 2.2.4.) | Anexo 22 | 177 |
| 22 | Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 2.2.5.) | Anexo 23 | 191 |
| 23 | Síndrome de Taura (Capítulo 2.2.6.) | Anexo 24 | 205 |
| 24 | Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 2.2.8.) | Anexo 25 | 225 |
| Ítem | Textos para comentario de los Países Miembros | Número de anexo | Número de página |
| Código Acuático | | | |
| 5 | Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico (Capítulo 1.5.) | Anexo 26 | 241 |
| 15 | Criterios para la evaluación de la inocuidad de las mercancías de animales acuáticos (Capítulo 5.4.) | Anexo 27 | 245 |
| Manual Acuático | | | |
| 25 | Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 2.2.7.) | Anexo 28 | 247 |
| Ítem | Anexos para información de los Países Miembros | Número de anexo | Número de página |
| 42 | Evaluación revisada para incluir en la lista la infección por <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> | Anexo 29 | 263 |
| 44 | Ficha técnica sobre el virus de la tilapia de lago | Anexo 30 | 269 |
| J | Plan de trabajo de la Comisión para los Animales Acuáticos en 2017/2018 | Anexo 31 | 273 |

A. REUNIÓN CON EL DIRECTOR GENERAL ADJUNTO

La Comisión para los Animales Acuáticos se reunió con el Dr. Matthew Stone, director general adjunto (Normas internacionales y ciencia), el 22 de febrero de 2017. El Dr. Stone dio la bienvenida a los miembros de la Comisión y les agradeció su participación y compromiso en la realización de los objetivos de la OIE en el campo de la sanidad de los animales acuáticos.

Entre otros temas, el Dr. Stone se refirió a la próxima sesión del Consejo y a las propuestas que estudiará relacionadas con el nuevo procedimiento para la elección de los expertos y el presupuesto previsional en particular el aumento de los gastos relativos a la elaboración de las normas de la OIE (por ejemplo, organización de grupos *ad hoc*). Además, el Dr. Stone hizo hincapié en los esfuerzos de la sede encaminados a mejorar la eficacia de las cuatro comisiones gracias a sistemas de coordinación consolidados que redundará en orientaciones más sólidas y en un mayor respaldo de sus programas de trabajo, una mejor comunicación interna y un refuerzo de la comprensión de las funciones y responsabilidades.

El Dr. Ingo Ernst, presidente de la Comisión para los Animales Acuáticos, dio las gracias al Dr. Stone por sus observaciones preliminares y señaló que la Comisión tenía por delante un estimulante programa de trabajo con la incorporación de mejoras significativas tanto en el *Código* como en el *Manual Acuático*. El Dr. Ernst destacó el apoyo de la sede y del personal de la secretaría incluyendo la labor de respaldo para el funcionamiento de varios grupos *ad hoc*, lo que resulta esencial para que la Comisión implemente su programa de trabajo y responda a las expectativas de los Países Miembros.

B. APROBACIÓN DEL ORDEN DEL DÍA

El proyecto de orden del día se difundió antes de la reunión y fue objeto de debate, actualización y aprobación. El orden del día adoptado figura en el Anexo 2.

C. REUNIÓN CON EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES TERRESTRES DE LA OIE

El presidente de la Comisión para los Animales Acuáticos y el presidente de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres (Comisión del Código) se reunieron durante la semana en la que coincidieron los encuentros de ambas comisiones. Los presidentes evocaron temas de interés mutuo en los *Códigos Acuático y Terrestre*, concretamente: la armonización de los términos del glosario, en particular, la definición de “zonificación” y la revisión en curso de las definiciones utilizadas en el *Código Terrestre*; las revisiones propuestas del Capítulo 1.2. en el *Código Acuático* (criterios de inclusión) y la redacción de un documento de orientación sobre la aplicación de los criterios para la inclusión de enfermedades en la lista de la OIE.

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó que esta reunión era importante con vistas a facilitar la armonización de los capítulos horizontales de los dos *Códigos*.

D. EXAMEN DE LOS COMENTARIOS DE LOS PAÍSES MIEMBROS SOBRE EL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE

Ítem 1. Comentarios generales

Se recibieron comentarios específicos de Argentina, Australia, Colombia, Costa Rica, Fiji, Nueva Zelanda, Noruega, Tailandia y la UE.

La Comisión para los Animales Acuáticos se mostró de acuerdo con el comentario de un País Miembro que estimaba que, si bien era conveniente una armonización entre el *Código Acuático* y el *Terrestre*, siempre habrá algunos temas en que no resulta apropiada debido a las múltiples diferencias entre los animales terrestres y acuáticos, por ejemplo, la gran cantidad de especies de animales acuáticos y la diversidad de factores ambientales y patógenos a los que se hallan expuestos.

En respuesta al comentario de un País Miembro acerca de las directrices sobre los riesgos de enfermedad y el estrés asociado con el transporte de animales acuáticos, la Comisión destacó que este aspecto se cubría en el Capítulo 5.5. sobre control de riesgos para la sanidad de los animales acuáticos asociados al transporte de estos animales y el Capítulo 7.2. sobre bienestar de los peces de cultivo durante el transporte.

Un País Miembro comentó que algunas palabras en el *Código Acuático* eran difíciles de interpretar, tales como “*is likely*” (es probable), “*the likelihood*” (la probabilidad) y “*would be likely*” (probablemente). La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el uso de estos términos en el *Código Acuático* y consideró que las formulaciones actuales eran claras dentro de la sección pertinente del *Código Acuático*. Por ejemplo, el término “probabilidad” se usa en el contexto del análisis del riesgo descrito en el Capítulo 2.1.

Un País Miembro solicitó la justificación para incluir el siguiente texto en los Artículos X.X.9. y X.X.11. “consideración de introducir medidas internas para afrontar los riesgos asociados con la utilización de la mercancía para fines que no sean el consumo humano”. La Comisión para los Animales Acuáticos indicó que los productos a los que se hacen referencia en el Artículo X.X.11. no están necesariamente libres de patógenos viables y se pueden prever controles para interrumpir las vías de transmisión y prevenir la exposición de los animales susceptibles. Por consiguiente, el texto pretende alertar a los Países Miembros acerca de este riesgo potencial y motivarlos a implementar medidas apropiadas de mitigación de riesgo internas, cuando sea relevante.

Ítem 2. Glosario

Se recibieron comentarios específicos de Arabia Saudí, China (Rep. Pop. de), Colombia, Costa Rica, Fiji, Guatemala, Nueva Zelanda, Tanzania y la UE.

Animales acuáticos

La Comisión para los Animales Acuáticos recordó a los Países Miembros que esta definición incluye ambos animales cultivados y silvestres. Las medidas del *Código Acuático* se aplican a los animales acuáticos susceptibles independientemente de su origen, ya sea silvestre o de cría.

La Comisión para los Animales Acuáticos no estuvo de acuerdo con un País Miembros de incluir en la definición que los animales acuáticos provienen de un ecosistema acuático, ya que el *Código Acuático* no trata las especies terrestres.

La Comisión no se mostró de acuerdo con el comentario de un País Miembro de borrar “viable”, puesto que estimó que era importante incluir este concepto con fines de claridad en el significado del término definido.

Zonificación

En respuesta a algunos comentarios de los Países Miembros y las enmiendas propuestas por la Comisión del Código al término “zona” en el *Código Terrestre*, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó la definición para garantizar la armonización cuando sea pertinente y mejorarla legibilidad y claridad. La Comisión estuvo de acuerdo con el comentario de un País Miembro en el que se señalaba que la expresión “con un sistema hidrológico homogéneo” no era clara y acordó que el texto era innecesario y debía borrarse.

Productos biológicos

La Comisión para los Animales Acuáticos notó que las palabras “agentes infecciosos” debían remplazarse por “agentes patógenos”, de conformidad con el trabajo encaminado a garantizar consistencia en el uso del término definido “agente patógeno” en todo el *Código Acuático* (ver texto a continuación).

Enfermedad

La Comisión para los Animales Acuáticos notó que las palabras “agentes etiológicos” se debían cambiar por “agentes patógenos” de conformidad con el trabajo encaminado a garantizar consistencia en el uso del término definido de “agente patógeno” en todo el *Código Acuático* (ver texto a continuación).

Uso del término “agente patógeno”

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que, pese a los avances progresivos en garantizar un uso homogéneo del término definido “agente patógeno” en todo el *Código Acuático*, algunas veces, en particular en los capítulos horizontales (Títulos 1–7), todavía subsisten otros términos como “patógeno” y “agente etiológico” que necesitan remplazarse por “agente patógeno”. La Comisión acordó introducir las enmiendas del caso a medida en que se revisen estos títulos. Igualmente, recordó a los Países Miembros que se harían revisiones similares en los capítulos específicos de enfermedad (Títulos 8–11) como parte del trabajo en curso de actualización de la lista de especies susceptibles.

Otra información de interés

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó las definiciones revisadas en el glosario del *Código Terrestre* que se propondrán para adopción y las que circulan para comentario de los Países Miembros, con el ánimo de garantizar una armonización entre las definiciones pertinentes utilizadas en ambos *Códigos*. Acordó examinar las definiciones correspondientes del *Código Acuático* una vez adoptadas las definiciones revisadas en el *Código Terrestre*.

El glosario revisado figura en el **Anexo 3** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 3. Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.)

Se recibieron comentarios específicos de Arabia Saudí, Australia, Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Tanzania, Tailandia y la UE.

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que la mayoría de los comentarios de los Países Miembros apoyaban los criterios revisados y que otros recibidos anteriormente ya se habían examinado en reuniones previas.

En respuesta al comentario de un País Miembro acerca de la dificultad de interpretar los criterios, la Comisión para los Animales Acuáticos desarrollará un documento guía destinado a apoyar la aplicación de estos criterios. Este documento guía será usado por la Comisión cuando ellos supervisen y evalúen para así asegurar la coherencia en la interpretación de los criterios. Se compartirá el documento con la Comisión del Código.

La Comisión para los Animales Acuáticos reiteró que los fundamentos para no armonizar el criterio 1 del Artículo 1.2.2. con el texto empleado en el *Código Terrestre*, es decir “se ha demostrado” en lugar de “es probable”, ya estaban consignados en su informe de septiembre de 2016.

“La Comisión reiteró que el objetivo de listar es “la prevención de la propagación transfronteriza de importantes enfermedades de los animales acuáticos, lo que se logra gracias a una notificación transparente, oportuna y coherente”. Aseguró que sería contrario al objetivo de inclusión en la lista, esperar que se demuestre la “propagación internacional del agente” cuando las pruebas científicas y los patrones de comercio internacional ya indican que la propagación es probable. Este aspecto es importante para las enfermedades de los animales acuáticos a la luz de los factores descritos y, en particular, por el reto que supone la erradicación exitosa de dichas enfermedades una vez que se han propagado”.

La Comisión reiteró que no estaba de acuerdo con cambiar “puede demostrar” por “ha demostrado” con respecto a la ausencia de enfermedad, y destacó que este comentario había sido considerado en su reunión de octubre de 2015. La palabra “puede” resulta más apropiada, ya que se requiere que los Países Miembros instauren *condiciones elementales de bioseguridad* durante por los menos dos años antes de hacer una autodeclaración de ausencia de enfermedad.

La Comisión para los Animales Acuáticos no estuvo de acuerdo con el comentario de un País Miembro de incluir un texto adicional acerca de las enfermedades emergentes dada la obligación de notificarlas a través del Sistema Mundial de Información Sanitaria (WAHIS) con arreglo al Artículo 1.1.6. del *Código Acuático*. La Comisión destacó la importancia de este artículo dada la emergencia regular de enfermedades en los animales acuáticos.

Asimismo, rechazó el comentario de un País Miembro de definir “precisa” y “fiables” en el criterio 3, subrayando que el uso de estos términos era conforme con el Oxford English Dictionary y con el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático*.

Una vez considerados todos los comentarios de los Países Miembros, la Comisión acordó no introducir enmiendas adicionales al texto, puesto que no habían surgido nuevos interrogantes.

El Capítulo revisado 1.2. *Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE* figura en el **Anexo 4A** (texto limpio) y en el **Anexo 4B** (con modificaciones) y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 4. Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.)

Se recibieron comentarios específicos de Canadá, China (Rep. Pop. de), Costa Rica, Guatemala, Tanzania y la UE.

En respuesta al comentario de un País Miembro de modificar el texto en el preámbulo de acuerdo con las enmiendas propuestas para el Capítulo 1.3. del *Código Terrestre*, la Comisión para los Animales Acuáticos aceptó considerar la armonización del texto de ambos *Códigos* una vez se adopte el texto revisado del *Código Terrestre*.

4.1. Modificación de los nombres de las enfermedades de crustáceos

Los comentarios recibidos apoyaron las enmiendas propuestas para los nombres de las ocho enfermedades de crustáceos en el Artículo 1.3.3.

A la luz del comentario de un País Miembro, la Comisión para los Animales Acuáticos no estuvo de acuerdo en incluir “*Candidatus*” en el nombre de la “Infección por *Hepatobacter penaei* (hepatopancreatitis necrotizante)”, pero aceptó incorporar “*Candidatus*” en el Artículo 9.5.1. cuando se refiere al nombre taxonómico de este agente bacteriano.

4.2. *Batrachochytrium salamandrivorans*

Aunque varios Países Miembros apoyaron la inclusión de esta enfermedad, algunos cuestionaron el cumplimiento del criterio 8 del Artículo 1.2.2. La Comisión para los Animales Acuáticos volvió a evaluar el método de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR) (Bloom *et al.*, 2013) destacando que ya había finalizado la etapa 1 de validación y que ya se había iniciado la etapa 2, en curso actualmente. La Comisión señaló que, con la aplicación de este nuevo método, se espera generar la información adicional requerida para una nueva validación. De este modo, la Comisión actualizó el texto relativo al criterio 8 en la evaluación (ver Anexo 29).

Atendiendo el comentario de un País Miembro, la Comisión para los Animales Acuáticos acordó que sería conveniente designar un laboratorio de referencia para *Batrachochytrium* spp. y ha avanzado en la identificación de posibles candidatos.

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó los nuevos controles reglamentarios de Estados Unidos de América (información disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2016/01/13/2016-00452/injurious-wildlife-species-listing-salamanders-due-to-risk-of-salamander-chytrid-fungus>) y el informe de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para *Bsal*¹ y actualizó la evaluación en consecuencia (ver Anexo 29).

¹(EFSA), Baláž V., Gortázar Schmidt C., Murray K., Carneseccchi E., Garcia A., Gervelmeyer A., Martino L., Munoz Guajardo I., Verdonck F., Zancanaro G. & Fabris C. (2017). Scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) in the EU. *EFSA Journal* 2017;**15** (2), 4739, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4739).

La Comisión para los Animales Acuáticos reiteró su propuesta de incluir en la lista *Batrachochytrium salamandrivorans*.

La evaluación revisada de *B. salamandrivorans* figura en el **Anexo 29** para información de los Países Miembros en respaldo a su inclusión.

4.3. Infección por Ranavirus

La Comisión para los Animales Acuáticos modificó el nombre de “Infección por *Ranavirus* spp.” por “Infección por las especies de *Ranavirus*”, dado que la nomenclatura binominal no suele utilizarse para los virus. El ámbito de aplicación de esta enfermedad (descrito en el Capítulo 8.2.) busca incluir a todas las especies del género *Ranavirus* (excluyendo la necrosis hematopoyética epizootica, que figura por separado) y, en opinión de la Comisión, el nombre revisado refleja mejor el campo de aplicación.

En respuesta al comentario de un País Miembro de que las especies de ranavirus debían incluirse por separado en la lista, la Comisión observó que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus está estudiando la clasificación de los ranavirus. Los resultados de este trabajo guiarán las modificaciones de la actual lista de ranavirus.

El Capítulo revisado 1.3. *Enfermedades de la lista de la OIE* figura en el **Anexo 5** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

4.4. Evaluación de un nuevo virus de tipo orthomyxo - Virus de la tilapia de lago - TiLV (por sus siglas en inglés - Tilapia Lake Virus)

A la luz de una publicación reciente sobre los métodos de diagnóstico para el virus de la tilapia del lago (TiLV), la Comisión para los Animales Acuáticos reevaluó TiLV con respecto al criterio 8 (existe un método de diagnóstico o de detección fiable y asequible) de los criterios de inclusión en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.). La Comisión examinó esta información y acordó que esta no apoyaba ningún cambio en su evaluación previa y que, por el momento y ante la falta de métodos de diagnóstico específicos para TiLV, la enfermedad no podía proponerse para listarse.

La Comisión para los Animales Acuáticos reconoció las posibles consecuencias del virus TiLV en muchos países en virtud de la importancia del cultivo de la tilapia a nivel mundial y del comercio de estas especies e indicó que la enfermedad cumple con la definición de “enfermedad emergente” y, como tal, debe notificarse de conformidad con el Artículo 1.1.4. del *Código Acuático*.

La Comisión también destacó que no se habían notificado a la OIE eventos previos de enfermedad asociados con este virus según las obligaciones descritas en el Capítulo 1.1. Se insta a los Países Miembros a investigar los eventos de mortalidad y morbilidad de tilapinas, ya que la comprensión de su distribución geográfica es esencial en los esfuerzos de control de su posible diseminación.

Con el fin de ofrecer información a los Países Miembros sobre los métodos de detección disponibles y los riesgos de transmisión del virus, la Comisión para los Animales Acuáticos finalizó una ficha técnica de enfermedad para el virus TiLV, que se publicará en el sitio Internet de la OIE a principios de abril y se podrá consultar en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/comisiones-especializadas-y-grupos/comision-para-los-animales-acuaticos-y-informes/disease-information-cards/>

La Ficha técnica de TiLV se presenta también en el **Anexo 30** para información de los Países Miembros.

Ítem 5. Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico (Capítulo 1.5.)

Se recibieron comentarios específicos de Arabia Saudí, Australia, Canadá, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda y la UE.

Si bien numerosos comentarios de los Países Miembros respaldaron el nuevo Artículo 1.5.9., algunos expresaron su preocupación ante la falta de claridad sobre la manera de definir una amplia gama de hospedadores y las implicaciones de incluir especies susceptibles a nivel del grupo taxonómico.

La Comisión para los Animales Acuáticos recuerda a los Países Miembros que el *Código Acuático* busca prevenir la propagación de enfermedades de los animales acuáticos y garantizar la seguridad sanitaria del comercio internacional del que son objeto. La aplicación de los actuales criterios a enfermedades con una amplia gama de hospedadores demostrada (por ejemplo, infección por *Aphanomyces astaci* e infección por el virus del síndrome de las manchas blancas) puede resultar en disminuciones sustanciales en la lista de especies susceptibles para estas enfermedades. Por consiguiente, las medidas del *Código Acuático* para estas enfermedades no se aplicarán para muchas especies hospedadoras que son probablemente susceptibles, pero para las cuales se carece de información científica. La Comisión indicó que esta circunstancia sería contraria a la finalidad del *Código Acuático* y podría conducir a la propagación de las enfermedades de la lista.

La Comisión ha propuesto un nuevo Artículo 1.5.9. para tratar este asunto al incluir un mecanismo que integre grupos taxonómicos de especies, como susceptibles. Se pretende que este mecanismo se aplique únicamente a las especies con una amplia gama de hospedadores.

A la luz de los comentarios de algunos Países Miembros, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó el nuevo Artículo 1.5.9. para aclarar las condiciones en que se aplicará. También se enmendó el texto en los Artículos 1.5.1. y 1.5.2. con fines de coherencia con el nuevo Artículo 1.5.9.

Además, se solicitó al Grupo *ad hoc* de la OIE sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE que evaluara la infección por *Aphanomyces astaci* utilizando el Capítulo revisado 1.5. Esta evaluación ofrecerá a los Países Miembros un ejemplo de la aplicación de los criterios revisados, en particular del nuevo Artículo 1.5.9. La Comisión solicitó que el grupo *ad hoc* trabajara por vía electrónica y entregara su informe para su reunión de septiembre de 2017.

El Capítulo revisado 1.5. *Criterios para la inclusión de especies susceptibles* figura en el **Anexo 26** para comentario de los Países Miembros

Ítem 6. Desinfección de establecimientos y equipos de acuicultura (Capítulo 4.3.)

Se recibieron comentarios específicos de Arabia Saudí, China (Rep. Pop. de), Costa Rica, Estados Unidos de América, Guatemala, Nueva Zelanda, Tanzania, Tailandia y la UE.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó los comentarios de los Países Miembros e introdujo las enmiendas pertinentes para mejorar la lectura y la claridad. Dado que este nuevo capítulo circuló para comentario en repetidas ocasiones antes de su adopción en 2016, sólo propuso enmiendas que mejoran de manera significativa la claridad del texto.

El Capítulo revisado 4.3. *Desinfección de establecimientos y equipos de acuicultura* figura en el **Anexo 6** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 7. Recomendaciones para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos (Capítulo 4.4.)

Se recibieron comentarios específicos de Noruega y la UE.

Tras examinar los comentarios de varios Países Miembros, la Comisión para los Animales Acuáticos decidió no modificar el texto al considerarlo claro tal y como se propone.

La Comisión no estuvo de acuerdo con el comentario de un País Miembro de incluir una recomendación sobre la disposición apropiada de las soluciones desinfectantes para proteger el medio ambiente, puesto que este aspecto no está dentro del ámbito de aplicación del capítulo.

Igualmente, convino en no reemplazar “patógeno” por “agente patógeno” en el Artículo 4.4.2., ya que el uso del término patógeno en el contexto del capítulo no es pertinente para un agente patógeno específico.

El Capítulo revisado 4.1. *Recomendaciones para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos* figura en el **Anexo 7** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 8. Obligaciones generales en materia de certificación (Capítulo 5.1.)

Se recibieron comentarios específicos de Arabia Saudí, Argentina, Australia, Tailandia y la UE.

Tras examinar los comentarios de varios Países Miembros, la Comisión para los Animales Acuáticos decidió no modificar el texto al considerarlo claro tal y como se propone.

La Comisión desea reiterar que el término “periodo de incubación” que aparece en un artículo similar del *Código Terrestre* no se incluyó en el texto al no utilizarse en el *Código Acuático*. Destacó que, a diferencia de los animales terrestres, una amplia variedad de especies hospedadoras y variables ambientales dificultan la determinación del periodo de incubación de los agentes patógenos en los animales acuáticos.

El Capítulo revisado 5.1. *Obligaciones generales en materia de certificación* figura en el **Anexo 8** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 9. Modificaciones de los capítulos específicos de las enfermedades de crustáceos

Se recibieron comentarios específicos de Canadá, Costa Rica, Guatemala, Noruega, Nueva Zelanda, Tanzania y la UE.

La Comisión para los Animales Acuáticos consideró los comentarios de los Países Miembros en cada capítulo y realizó las enmiendas relevantes en cada capítulo de crustáceos, con el fin de mantener la coherencia a través de todos los capítulos.

La Comisión aceptó i) borrar la referencia a “animales acuáticos” en los Artículos X.X.3. y X.X.11. destacando que en estos artículos sólo se indican los productos derivados de animales acuáticos; ii) añadir “productos derivados” de animales acuáticos en el Artículo X.X.10. dado que este artículo también aplica a los productos de animales acuáticos; iii) modificar el apartado 2) en los Artículos X.X.9. y X.X.10. para mejorar la legibilidad e incluir una referencia cruzada al Capítulo 5.5.; iv) agregar un apartado separado 3) en los Artículos X.X.9. y X.X.10. para el manejo de los efluentes y desechos.

La Comisión para los Animales Acuáticos se mostró en desacuerdo con el comentario de un País Miembro de abreviar el nombre de las especies cuando aparecen por segunda vez en el Artículo X.X.2., ya que las especies susceptibles figuran en orden alfabético y la inclusión del nombre del género completo garantiza la claridad del texto. La Comisión de Animales Acuáticos observó que el Artículo X.X.8. se modificó según el modelo Artículo X.X.8. (Ítem 11).

9.1. Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*) (Capítulo 9.1.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

La Comisión recordó a los Países Miembros que la lista de las especies susceptibles que aparece en el Artículo 9.1.2. de la edición 2016 del *Código Acuático* no se cambiará hasta que se finalice el tema de las especies con una amplia gama de hospedadores.

El Capítulo revisado 9.1. *Plaga del cangrejo de río* figura en el **Anexo 9** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

9.2. Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (Capítulo 9.2.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

El Capítulo revisado 9.2. *Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1* figura en el **Anexo 10** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

9.3. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 9.3.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

La Comisión para los Animales Acuáticos no estuvo de acuerdo con el comentario de un País Miembro de retirar *Macrobrachium rosenbergii* de la lista de especies susceptibles en el Artículo 9.3.2., ya que estimó que se contaba con suficiente evidencia como para respaldar la inclusión de estas especies en la lista. A la luz de la referencia aportada, la Comisión solicitó al Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE que revisara su evaluación previa. El grupo *ad hoc* reiteró que el artículo de Hsieh *et al.* (2006) era válido científicamente, dado que en él se describen la infección natural y la hipótesis de la susceptibilidad de *M. rosenbergii* a la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, que no sólo se ha detectado por PCR, sino también en núcleos infectados mediante hibridación *in situ*, y los signos clínicos compatibles con la infección por este virus.

Referencia: Hsieh C.Y., Chuang P.C., Chen L.C., Tu C., Chien M.S., Huang K.C., Kao H.F., Tung M.C. & Tsai S.S. (2006). Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 258, 73–79.

A partir de esta opinión experta, la Comisión acordó mantener *Macrobrachium rosenbergii* en la lista de especies susceptibles en el Artículo 9.3.2.

El Capítulo revisado 9.3. *Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* figura en el **Anexo 11** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

9.4. Mionecrosis infecciosa (Capítulo 9.4.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

El Capítulo revisado 9.4. *Mionecrosis infecciosa* figura en el **Anexo 12** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

9.5. Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 9.5.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

En base a un comentario de un País Miembro, la Comisión acordó incluir “*Candidatus*” en el Artículo 9.5.1. cuando se hace referencia al nombre taxonómico para este agente bacteriano. Sin embargo, para facilitar la referencia, el término “*Candidatus*” no se utilizará al describir el nombre de la enfermedad “Infección por *Hepatobacter penaei*” (ver Ítem 4.1).

El Capítulo 9.5. revisado *Hepatopancreatitis necrotizante* figura en el **Anexo 13** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

9.6. Síndrome de Taura (Capítulo 9.6.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

El Capítulo 9.6. revisado *Síndrome de Taura* figura en el **Anexo 14** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

9.7. Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 9.8.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

La Comisión recordó a los Países Miembros que la lista de las especies susceptibles que aparece en el Artículo 9.1.2. de la edición 2016 del *Código Acuático* no se cambiará hasta que se finalice el tema de las especies con una amplia gama de hospedadores.

El Capítulo 9.7. revisado *Enfermedad de la cola blanca* figura en el **Anexo 15** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

9.8. Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 9.8.)

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito anteriormente.

El Capítulo 9.8. revisado *Enfermedad de las manchas blancas* figura en el **Anexo 16** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 10. Nuevo capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (Capítulo 9.X.)

Se recibieron comentarios de Canadá, Costa Rica, Guatemala y Nueva Zelanda.

La Comisión para los Animales Acuáticos analizó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia.

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó introducir modificaciones de carácter horizontal según se ha descrito en el Ítem 9.

La Comisión rechazó el comentario de un País Miembro de cambiar el nombre de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND por sus siglas en inglés) por “infección por *Vp_{AHPND}*”, puesto que consideró que posiblemente las especies de *Vibrio* asociadas con esta enfermedad cambiarían con el tiempo. Utilizar el nombre genérico de la enfermedad permitirá añadir nuevos agentes patógenos a la definición de la enfermedad en el Artículo 9.X.1.

La Comisión no aceptó numerosos comentarios de los Países Miembros de ampliar el ámbito de aplicación en el Artículo 9.X.1. más allá de la inclusión de *Vibrio parahaemolyticus*. Indicó que hasta el momento de la reunión, no existían suficientes información científica publicada que demuestren que otras especies *Vibrio* sean agentes etiológicos de la necrosis hepatopancreática aguda. La Comisión seguirá de cerca la investigación sobre esta enfermedad y modificará el Capítulo 9.X.1., si existen los datos científicos pertinentes que lo justifiquen.

La Comisión corrigió un error identificado por un País Miembro en el informe del grupo *ad hoc* electrónico encargado de evaluar la inocuidad de los productos derivados de los animales acuáticos: los productos de crustáceos pasteurizados han sido evaluados según los criterios en el Artículo 5.4.1. El informe del grupo *ad hoc* está disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/comisiones-especializadas-y-grupos/comision-cientifica-y-informes/endorsed-ad-hoc-group-reports/>.

El Capítulo 9.X. revisado *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda* figura en el **Anexo 17** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 11. Artículo revisado X.X.8.

Se recibieron comentarios específicos de Australia, Costa Rica, Guatemala y Nueva Zelanda.

La Comisión de Animales Acuáticos analizó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia.

En respuesta a un comentario de un País Miembro de modificar el término “cuarentena” en relación con las instalaciones de cuarentena en la que los animales acuáticos permanecerán el resto de su vida, la Comisión recordó a los Países Miembros que la cuarentena es un término definido en el *Código Acuático* e incluye “un periodo de tiempo determinado”. Durante la importación de animales acuáticos de un país que no está libre de un agente patógeno específico, se justifica aplicar un periodo de cuarentena de por vida. Además, la Comisión añadió el término “importado” en numerosos casos para aclarar la referencia a los animales acuáticos importados.

La Comisión explicó que en el apartado 3a)ii) un alto estatus sanitario se refiere al mejor estatus sanitario posible con respecto a una enfermedad específica de la lista, destacando que este artículo se aplicará a los países que no están libres de la enfermedad específica.

La Comisión señaló que, una vez se adopte este modelo de artículo, el Artículo X.X.8. de todos los capítulos específicos de enfermedad se modificarán en consecuencia.

El modelo revisado del Artículo X.X.8. figura en el **Anexo 18A** (texto limpio) y el **Anexo 18B** (texto con cambios) y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 12. Inclusión para las recomendaciones para la desinfección de la superficie de los huevos cuando se practica en las especies distintas de los salmónidos y es importante para garantizar el comercio seguro

La Comisión agradeció las sugerencias recibidas de numerosos Países Miembros sobre la posible ampliación de los protocolos de desinfección para los huevos de especies de peces distintas de los salmónidos. Sin embargo, la Comisión observó que no se habían proporcionado protocolos de desinfección validados y decidió que no podía proceder al desarrollo de las recomendaciones para la desinfección de la superficie de los huevos de otras especies específicas.

Sin embargo, ante el riesgo significativo asociado con esta vía de transmisión, la Comisión insta a los Países Miembros a aportar la información pertinente sobre los protocolos validados para que pueda reconsiderar este tema. La Comisión insta a los países miembros a respaldar la validación de los métodos comerciales estándares utilizados para la desinfección de huevos y larvas de animales acuáticos en sus respectivos países.

Ítem 13. Iridovirus de la dorada japonesa (Capítulo 10.8.)

Se recibió un comentario específico de la Unión Europea.

La Comisión observó un error en el *Código* y el *Manual Acuático* sobre la referencia incorrecta al *Thunnus thynnus* designado con el nombre común de atún. La Comisión consideró que este tema no se podía resolver simplemente corrigiendo un nombre taxonómico o nombre común e indicó que el asunto será estudiado por el grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE.

E. OTROS TEMAS RELATIVOS AL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE Y A LA LABOR DE LOS GRUPOS AD HOC**Ítem 14. Criterios para la evaluación de la inocuidad de las mercancías de animales acuáticos (Capítulo 5.4.)**

La Comisión de Animales Acuáticos observó que existía un número de incoherencias entre el Capítulo 5.4. sobre los criterios para la evaluación de la inocuidad de las mercancías de los animales acuáticos y los artículos relacionados X.X.3. y X.X.11./12. en los capítulos específicos de enfermedad. Se efectuaron modificaciones pertinentes incluyendo la eliminación de las referencias a los animales acuáticos, puesto que este capítulo se aplica a los productos de animales acuáticos.

El Capítulo 5.4. revisado *Criterios para la evaluación de la inocuidad de las mercancías de animales acuáticos* figura en el **Anexo 27** para comentario de los Países Miembros.

Ítem 15. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OIE

Se informó a la Comisión para los Animales Acuáticos de que el Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de peces a la infección por enfermedades de la lista de la OIE se había reunido por primera vez en diciembre de 2016 y había evaluado la susceptibilidad de las especies de peces (de conformidad con el Artículo 1.5.3. del Capítulo 1.5. del *Código Acuático*) para i) la necrosis hematopoyética epizoótica; ii) la infección por *Gyrodactylus salaris*; y iii) el herpesvirus de la carpa koi. En su próxima reunión en abril de 2017, el grupo *ad hoc* finalizará estas tres evaluaciones e iniciará la labor sobre la viremia primaveral de la carpa, la infección por el alfavirus de los salmónidos y la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón.

La Comisión para los Animales Acuáticos valoró el excelente trabajo realizado hasta la fecha por el grupo *ad hoc* y solicitó que presentara un informe con las revisiones de las listas de las especies susceptibles para las seis enfermedades, para su consideración en la reunión de septiembre de 2017.

Ítem 16. Grupo *ad hoc* sobre la demostración del estatus libre de enfermedad

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el informe preliminar del grupo *ad hoc* sobre la demostración del estatus libre de enfermedad, que se reunió entre el 17 y el 19 de enero de 2017 y sostuvo una teleconferencia con el presidente del grupo *ad hoc*. La Comisión reconoció que se trata de un área de trabajo importante y compleja con implicaciones en todo el *Código Acuático*. La Comisión solicitó que el grupo *ad hoc* se reuniera nuevamente para completar el desarrollo de un texto modelo para un capítulo específico de enfermedad y reporte a la Comisión durante su reunión en septiembre de 2017.

Ítem 17. Grupo *ad hoc* sobre la bioseguridad de los establecimientos de acuicultura

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota que un Grupo *ad hoc* sobre la bioseguridad para los establecimientos de acuicultura será convocado para comenzar su trabajo antes de la próxima reunión de la Comisión en septiembre de 2017.

**F. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE
– EXAMEN DE LOS COMENTARIOS DE LOS PAÍSES MIEMBROS**

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Japón, Nueva Zelanda, Noruega, Singapur, Suiza, Tailandia, Taipéi Chino y la UE.

La Comisión de los Animales Acuáticos revisó todos los comentarios de los Países Miembros sobre los capítulos de las enfermedades de los crustáceos y efectuó los cambios pertinentes.

La Comisión analizó el comentario de un País Miembro de modificar la definición de caso confirmado de la infección por alfavirus de los salmónidos. Actualmente, este capítulo no está en revisión, sin embargo, la Comisión acordó que el comentario será examinado en el marco de la revisión del capítulo para adaptarlo al formato del nuevo modelo desarrollado por el grupo *ad hoc* sobre el *Manual Acuático* (ver Ítem 26).

Un País Miembro propuso en varios capítulos cambiar el nombre de género de las especies de camarones de *Penaeus* a *Litopenaeus*. La Comisión solicitó al País Miembro que se refiera al ítem 14 del informe de la reunión de la Comisión de septiembre de 2016, Revisión de la literatura de la taxonomía de los camarones para *Penaeus*. a Esto entrega el fundamento de la decisión de la Comisión para mantener el nombre *Penaeus*.

En respuesta a numerosas propuestas de modificar los títulos de ciertas secciones de los capítulos del *Manual Acuático*, la Comisión recordó a los Países Miembros que los títulos de las secciones se revisarán cuando se apruebe e implemente el nuevo modelo de capítulo desarrollado por el Grupo *ad hoc* sobre el *Manual Acuático* (ver Ítem 26).

Se propuso un cierto número de modificaciones a los protocolos de prueba sobre la reacción en cadena de la polimerasa. La Comisión para los Animales Acuáticos insta a los Países Miembros a presentar los fundamentos para las modificaciones propuestas junto con la evidencia de equivalencia del rendimiento de las pruebas en función de los nuevos parámetros propuestos. También sería preferible que los protocolos modificados sean objeto de validación y publicación.

La Comisión acordó solicitar a los expertos de los laboratorios de referencia de evaluar cuidadosamente los protocolos de prueba en cada uno de los capítulos y suprimir todas las referencias innecesarias a los productos comerciales.

Se recibieron numerosas solicitudes de añadir o borrar especies de las secciones sobre *Especies hospedadores susceptibles* y *Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad*. La Comisión remitió a consideración del Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OIE todas las solicitudes y las referencias justificativas.

Ítem 18. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo proyecto de Capítulo 2.2.X.)

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop. de), Estados Unidos de América, Japón, Nueva Zelanda, Singapur y Tailandia.

Un País Miembro propuso una ampliación del ámbito de aplicación del capítulo sobre la necrosis hepatopancreática aguda para incluir otras cepas de *Vibrio*. La Comisión debatió este tema en el contexto del capítulo del *Código Acuático* para esta enfermedad. Si bien algunas especies *Vibrio* se han aislado en asociación con la necrosis hepatopancreática aguda, al momento de esta reunión no existían pruebas suficientes para demostrar que estas especies pueden causar la enfermedad.

En el apartado “Información sobre la enfermedad, factores del agente”, un País Miembro solicitó reemplazar una de las referencias por otra que considera que es la primera notificación de la enfermedad. La Comisión no estuvo de acuerdo con la propuesta, puesto que la referencia describe la virulencia de una cepa de *Vibrio parahaemolyticus* pero no en el contexto de la necrosis hepatopancreática aguda.

En respuesta a una solicitud de referencias en las secciones sobre *Especies hospedadores susceptibles* y *Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad*, la Comisión destacó que todas las referencias necesarias se podían encontrar en el informe del Grupo *ad hoc* sobre susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OIE.

El Capítulo 2.2.X. revisado *Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda* (AHPND por sus siglas en inglés) figura en el **Anexo 19** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 19. Plaga del cangrejo del río (*Aphanomyces astaci*) (Capítulo 2.2.1.)

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop. de), Nueva Zelanda, Noruega, Singapur, Suiza y la UE.

En respuesta a un comentario solicitando una mayor actualización de este capítulo, la Comisión recordó a los Países Miembros que una vez que se apruebe e implemente el nuevo modelo de capítulo de enfermedad desarrollado por el Grupo *ad hoc* sobre el *Manual Acuático* (ver Ítem 26), todos los capítulos se revisarán según el formato del nuevo modelo y la información pertinente se actualizarán en consecuencia.

La Comisión confirmó que según el Artículo 9.1.2. del *Código Acuático* todas las especies de cangrejo de río de las familias Cambaridae, Astacidae y Parastacidae se consideran susceptibles a la infección por *Aphanomyces astaci*, y las medidas del *Código Acuático* se aplican al comercio internacional de dichas especies.

La Comisión revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia tras consultar al experto del laboratorio de referencia.

El Capítulo 2.2.1. revisado *Plaga del cangrejo del río* figura en el **Anexo 20** y se propone para adopción en la 85.ª Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 20. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 2.2.3.)

Se recibieron comentarios de Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Singapur y Tailandia.

Un País Miembro solicitó la eliminación de una especie (camarón gigante de agua dulce, *Macrobrachium rosenbergii*) de la sección sobre las *Especies hospedadoras susceptibles*. La Comisión observó que este tema se había remitido al Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OIE y que el grupo había confirmado su evaluación previa.

Un País Miembro destacó que, con frecuencia, se hace referencia a los productos comerciales en los protocolos para las pruebas moleculares. La Comisión solicitará al experto del laboratorio de referencia que borre las referencias a los productos comerciales a menos que sea estrictamente necesario y que reduzca la extensión de los protocolos suprimiendo detalles superfluos.

Numerosos cambios fueron propuestos a los protocolos de las pruebas moleculares. Se solicitará al laboratorio de referencia de la OIE que revise estas propuestas. Si las enmiendas constituyen mejoras de los protocolos publicados, será necesario añadir una frase acerca de cómo se evaluaron los efectos sobre el resultado de los ensayos.

El comentario de un País Miembro sobre la definición de un caso confirmado se examinará una vez que se apruebe e implemente el nuevo modelo de capítulo preparado por el Grupo *ad hoc* sobre el *Manual Acuático* (ver Ítem 26).

La Comisión revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto de acuerdo con la opinión de los expertos de los laboratorios de referencia.

El Capítulo 2.2.3. revisado *Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa* figura en el **Anexo 21** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 21. Mionecrosis infecciosa (Capítulo 2.2.4.)

Se recibieron comentarios de Estados Unidos de América, Japón, Nueva Zelanda y Singapur.

Se propusieron cambios a los métodos de pruebas moleculares. La Comisión solicitó que se brindara la justificación para dichos cambios junto con la evidencia de equivalencia del rendimiento de las pruebas en función de los nuevos parámetros propuestos.

La Comisión revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto de acuerdo con la opinión del experto del laboratorio de referencia.

El Capítulo 2.2.4. revisado *Mionecrosis infecciosa* figura en el **Anexo 22** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 22. Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 2.2.5.)

Se recibieron comentarios de Canadá, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda y Singapur.

Un País Miembro propuso la creación de una nueva subsección tras el punto 2.2.2. *Especies con evidencia incompleta de susceptibilidad*, solo para las especies con resultado positivo a la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La Comisión no estuvo de acuerdo con esta propuesta dado que los resultados positivos a la PCR ya se mencionan en el título 2.2.2. y crearles una sección especial sería darle más importancia de la que se justifica.

Un País Miembro propuso modificaciones al protocolo PCR, incluyendo la adición de las heces como una de las muestras a partir de las cuales se pueden realizar las pruebas. La Comisión aceptó que las heces se podían incluir como un tipo de muestra si se brindaba información sobre la validación de la prueba para este caso.

La Comisión revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto de acuerdo con la opinión del experto del laboratorio de referencia.

El Capítulo 2.2.5. revisado *Hepatopancreatitis necrotizante* figura en el **Anexo 23** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 23. Síndrome de Taura (Capítulo 2.2.6.)

Se recibieron comentarios de Canadá, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Singapur, Tailandia y la UE.

Se propusieron cambios a los métodos de pruebas moleculares. La Comisión solicitó que se brindara la justificación para dichos cambios junto con la evidencia de la equivalencia del rendimiento de las pruebas en función de los nuevos parámetros propuestos.

La Comisión revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto de acuerdo con la opinión del experto del laboratorio de referencia.

El Capítulo 2.2.6. revisado *Síndrome de Taura* figura en el **Anexo 24** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 24. Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 2.2.8.)

Se recibieron comentarios de Canadá, China (Rep. Pop. de), Nueva Zelanda, Singapur, Tailandia y la UE.

La Comisión revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto de acuerdo en consecuencia en consulta con el experto del laboratorio de referencia.

El Capítulo 2.2.8. revisado *Enfermedad de la cola blanca* figura en el **Anexo 25** y se propone para adopción en la 85.^a Sesión General de mayo de 2017.

Ítem 25. Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 2.2.7)

Se recibieron comentarios de China (Rep. Pop. de).

En su última reunión de septiembre de 2016, la Comisión aceptó posponer la revisión de este capítulo en función de la revisión de la lista de especies susceptibles, pero propuso la revisión del título y el ámbito de aplicación, en coherencia con las modificaciones introducidas en los otros capítulos de crustáceos.

La Comisión revisó el capítulo e incorporó el nuevo nombre de la enfermedad “infección por el virus del síndrome de las manchas blancas” en todo el texto. La Comisión decidió examinar la definición de caso para este capítulo. Si bien el Grupo *ad hoc* sobre el *Manual Acuático* revisará la definición de caso como parte de su plan de trabajo, la Comisión estimó que la definición actual no era satisfactoria, por lo que urge una pronta revisión.

El Capítulo 2.2.7. revisado *Enfermedad de las manchas blancas* figura en el **Anexo 28** para comentarios de los Países Miembros.

**G. OTROS TEMAS RELATIVOS AL MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO
PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE Y A LA LABOR DE LOS GRUPOS AD HOC**

Ítem 26. Revisión del informe del Grupo *ad hoc* la OIE sobre el *Manual Acuático*

En enero de 2017, el Grupo *ad hoc* de la OIE sobre el *Manual Acuático* se reunió por segunda vez con el fin de seguir trabajando en el nuevo modelo de capítulo y en los tres modelos de capítulos que el grupo había desarrollado en su primera reunión de abril de 2016, de acuerdo con las observaciones aportadas por la Comisión para los Animales Acuáticos. El nuevo modelo de capítulo incluye propuestas de mejora de la estructura de la Sección 4 *Métodos de diagnóstico*, en que incorpora un cuadro revisado con los métodos de prueba disponibles para la vigilancia y el diagnóstico, y la Sección 6 *Criterios de diagnóstico corroborativo*.

La Comisión agradeció al grupo *ad hoc* por su trabajo, que redundará en mejoras importantes en términos de coherencia, calidad, claridad y valor de la información presentada en el *Manual Acuático*. La Comisión revisó el informe del grupo *ad hoc* y sus recomendaciones junto con la aplicación del nuevo modelo para una enfermedad de los moluscos, y transmitió comentarios adicionales al grupo.

La Comisión recomendó al grupo *ad hoc* seguir mejorando el modelo a partir de los tres modelos de capítulo para perfeccionar su enfoque. Una vez finalizado el modelo, los miembros del grupo *ad hoc* ayudarán a los expertos de los laboratorios de referencia a aplicarlos en todos los capítulos de enfermedades de los crustáceos. En su próxima reunión en septiembre de 2017, la Comisión revisará el modelo finalizado y las revisiones disponibles de los capítulos de enfermedad de los crustáceos.

H. CENTROS DE REFERENCIA DE LA OIE

Ítem 27. Revisión de los informes de los laboratorios de referencia y de los centros colaboradores

El personal de la sede brindó a la Comisión un análisis de las actividades de los centros de referencia para los animales acuáticos a partir de los informes anuales presentados. Hasta el 27 de febrero de 2017, 33 de los 44 (75%) laboratorios de referencia y los dos (100%) centros colaboradores en el área de los animales acuáticos presentaron sus informes anuales para el año 2016 a la OIE. Se recordará esta obligación a aquellos laboratorios que todavía no hayan presentado su informe anual. La presentación de los informes anuales es uno de los criterios para la evaluación del desempeño de los laboratorios de referencia de la OIE.

La Comisión expresó su agradecimiento a los centros de referencia de la OIE por el respaldo y asesoramiento recibido. La Comisión resaltó el aumento de respuestas positivas relacionadas con la implementación de sistemas de gestión de calidad reconocidos internacionalmente.

Ítem 28. Solicitudes para la designación de centros de referencia de la OIE o el cambio de expertos

La Comisión para los Animales Acuáticos recomendó que se aceptara la siguiente solicitud para la designación como centro de referencia de la OIE:

Laboratorio de referencia de la OIE para la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

Aquaculture Pathology Laboratory, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA Tel.: (+1-520) 621.44.38; Fax: (+1-520) 626.56.02; E-mail: fengjyu@u.arizona.edu Sitio web: <http://acbs.cals.arizona.edu/aqua> Experto de referencia designado: Dra. Kathy Tang-Nelson.

La Comisión recomendó aceptar la siguiente solicitud de cambios de experto en dos laboratorios de referencia presentada por el Delegado de Australia.

Necrosis hematopoyética epizoótica e Infección por ranavirus

El Dr. Paul Hick reemplaza al Profesor Richard Whittington en la Universidad de Sydney, Facultad de Ciencias Veterinarias, Australia.

Ítem 29. Retiro de un laboratorio de referencia de la OIE

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota que el Laboratorio de Referencia de la OIE para la encefalopatía y retinopatía virales en el Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima, de la Universidad de Japón, había solicitado su retiro de la lista tras la jubilación de su experto designado, el Profesor Toshihiro Nakai. La Comisión expresa su gratitud al Profesor Nakai por su inestimable contribución a la OIE desde que el laboratorio de referencia obtuviera su designación en el año 2000.

Ítem 30. Comentarios sobre los avances de los sistemas de gestión de calidad de los laboratorios de referencia con miras a la obtención de la norma de acreditación ISO 17025

La Comisión evaluó los avances de los laboratorios de referencia con vistas a la acreditación de la norma ISO 17025 o un sistema de gestión de calidad equivalente. Los informes de los laboratorios de referencia presentados hasta el 27 de febrero de 2017 y las respuestas previas de los mismos se utilizaron para evaluar los adelantos con respecto a dicha acreditación. Los siguientes puntos resumen los progresos realizados:

- el 61,9 % de los laboratorios posee la certificación ISO 17025;
- el 19,0 % está en proceso de obtención de la certificación ISO 17025;
- el 4,8 % posee la acreditación de un sistema de gestión de calidad equivalente;
- el 14,3 % no posee ni solicitará la certificación ISO 17025 o un sistema de gestión de calidad equivalente y, por lo tanto, perderá el estatus de laboratorio de referencia de la OIE a finales de 2017.

La Comisión agradeció los esfuerzos realizados por los laboratorios para lograr la certificación.

La Comisión tomó nota de que la Comisión de Normas Biológicas había revisado los documentos recibidos de los laboratorios de referencia de Norteamérica que demostraban que su sistema de gestión de calidad era equivalente a la norma ISO 17025.

Ítem 31. Procedimientos para la aprobación y el mantenimiento de la categoría de laboratorio de referencia

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el procedimiento para la designación de los laboratorios de referencia de la OIE, desarrollado en colaboración con la Comisión de Normas Biológicas. Se proponen cinco criterios para evaluar el desempeño de los laboratorios:

- i) presentación de un informe anual;
- ii) obtención de la certificación ISO 17025 o de un sistema de gestión de calidad equivalente, idealmente con las pruebas pertinentes en el ámbito de aplicación de la certificación;
- iii) suficiente actividad de diagnóstico o producción y suministro de material de referencia relacionado con la enfermedad o el agente patógeno;
- iv) rápida respuesta a las solicitudes de asesoramiento científico emitidas por la sede de la OIE;
- v) rápida respuesta a las solicitudes de la OIE sobre temas administrativos relacionados con la transparencia y la confidencialidad (por ejemplo, renovar la declaración de un eventual conflicto de intereses y respeto de la cláusula de confidencialidad).

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que se había añadido “con pruebas pertinentes incluidas en el ámbito de la acreditación” en el criterio ii) y en el punto 5 de las *Directrices para los candidatos a laboratorio de referencia* después de “la certificación según la norma ISO 17025 o un sistema de gestión de calidad equivalente”. La Comisión notó que esta adición sería problemática para algunos laboratorios acuáticos cuando las pruebas se están desarrollando y validando para nuevas enfermedades o en circunstancias en las que las pruebas existentes requieren mejoras para tratar nueva información sobre la enfermedad (por ejemplo, nuevas cepas de un agente patógeno). La Comisión consideró que no sería apropiado retirar la designación en tales circunstancias. Con el fin de responder a esta preocupación, la Comisión propuso añadir “idealmente” al principio de la expresión para que se lea: “idealmente con pruebas pertinentes incluidas en el ámbito de la acreditación”. Esta modificación se transmitió al presidente de la Comisión de Normas Biológicas que aceptó efectuar este cambio.

El documento se presentará para adopción del Consejo de la OIE antes de su presentación para adopción por Resolución de la Asamblea Mundial en la Sesión General en mayo de 2017.

Ítem 32. Proyectos de hermanamiento

La Comisión para los Animales Acuáticos recibió información sobre la situación actual de los proyectos de hermanamiento para las enfermedades de los animales acuáticos.

Hasta el mes de febrero de 2017, se habían finalizado dos proyectos (Canadá con Chile para la anemia infecciosa del salmón; Estados Unidos de América con China para la necrosis hematopoyética infecciosa) y cinco proyectos seguían en curso (Noruega con Brasil para la anemia infecciosa del salmón; Japón con Indonesia para la herpesvirosis de la carpa koi; Estados Unidos de América con Indonesia y Arabia Saudí para la enfermedad del camarón; Dinamarca con la República de Corea para la septicemia hemorrágica viral). La Comisión tomó nota de las conclusiones del proyecto recientemente finalizado entre Estados Unidos de América y China para la necrosis hematopoyética infecciosa.

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de una nueva propuesta entre el Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Italia (laboratorio de referencia) y el Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie, Túnez (laboratorio candidato) para la encefalopatía y retinopatía virales. La Comisión analizó la propuesta y transmitió comentarios técnicos.

I. OTROS TEMAS

Ítem 33. Actualización de las actividades de la OIE en el campo de la resistencia a los agentes antimicrobianos

La Comisión para los Animales Acuáticos recibió información sobre las actividades de la OIE en el campo de la resistencia a los agentes antimicrobianos incluyendo el trabajo en curso del grupo *ad hoc* en esta área. La Comisión reconoció la importancia de continuar estudiando este tema y de actualizar el *Código Acuático* y el *Manual* cuando sea pertinente.

Ítem 34. Autodeclaración de ausencia de enfermedad

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que la OIE había iniciado una revisión de los procedimientos relacionados con la autodeclaración de ausencia de enfermedad para un país, zona o compartimento para las enfermedades de los animales terrestres y acuáticos de la lista de la OIE. Si bien no es responsabilidad de la OIE la autodeclaración de ausencia de enfermedad, un País Miembro puede publicar información en el *Boletín* de la OIE con fines de información para los otros Países Miembros. La OIE está emprendiendo esta tarea en un esfuerzo de mejorar los procedimientos para la presentación, evaluación y publicación de las autodeclaraciones.

La Comisión destacó la importancia de este asunto para los Países Miembros, al no existir un procedimiento de reconocimiento oficial del estatus sanitario para las enfermedades de los animales acuáticos de la lista de la OIE. La Comisión solicitó se le mantuviera informada acerca de su evolución.

Ítem 35. Protocolo Nagoya

La sede de la OIE informó a la Comisión acerca del Protocolo de Nagoya adoptado en octubre de 2010 por el Convenio de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica que trata del acceso a los recursos genéticos y la participación justa y equitativa en los beneficios que se derivan de su utilización entre los países para cualquier intercambio de muestras de investigación que contengan material genético. La Comisión tomó nota de que tanto la Comisión de Normas Biológicas como el Grupo de trabajo de la OIE sobre la fauna silvestre habían examinado este tema en sus reuniones respectivas en 2016 con el objetivo de determinar las respectivas experiencias de los miembros sobre este protocolo y las posibles consecuencias sobre el transporte de muestras de origen animal.

La Comisión tomó nota de que la OIE convocará en 2017 un Grupo *ad hoc* de la OIE sobre el transporte de materiales biológicos que actualizará el Capítulo 1.1.3. *Transporte de muestras de origen* del *Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas de los animales terrestres*, incluyendo las consideraciones del Protocolo de Nagoya.

J. PROGRAMA DE TRABAJO DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN 2017/2018

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó y actualizó su programa de trabajo, teniendo en cuenta los comentarios de los Países Miembros, de la sede y el trabajo realizado.

El plan de trabajo revisado figura en el [Anexo 31](#) para información de los Países Miembros.

K. ACTIVIDADES DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

La Comisión para los Animales Acuáticos desea informar a los Países Miembros sobre las actividades de sus integrantes en el ejercicio de sus funciones desde la última reunión de septiembre de 2016.

Los miembros de la Comisión participaron en las siguientes actividades:

El Dr. Ingo Ernst sostuvo una teleconferencia el 8 de diciembre de 2016 con los Delegados de la OIE y los puntos focales para los animales acuáticos de la región Asia-Pacífico, organizada por el representante regional de la OIE para Asia y el Pacífico. El propósito de la teleconferencia fue presentar a los Países Miembros el informe de la reunión de septiembre de 2016 de la Comisión, en particular, los anexos para comentario de los Países Miembros.

La Dra. Joanne Constantine participó en una conferencia en línea el 20 de diciembre de 2016 dirigido a los Delegados de la OIE, los puntos focales para los animales acuáticos y otros participantes de las Américas, organizado por el representante regional de la OIE para las Américas. El propósito de la conferencia en línea fue informar a los participantes sobre el informe de la reunión de septiembre de 2016 de la Comisión para los Animales Acuáticos, en particular, los anexos para comentario de los Países Miembros. La Dra. Constantine realizó una presentación que resumió los puntos fundamentales del informe de septiembre y respondió a las preguntas de los Países Miembros. También se examinó el informe de la reunión de septiembre de 2016 de la Comisión del Código.

El Dr. Peeler aceptó una invitación de la Comisión Europea para participar en un grupo de trabajo el día 24 de noviembre de 2016, con el fin de coordinar las respuestas de la Unión Europea sobre el informe de la reunión de septiembre de 2016 de la Comisión para los Animales Acuáticos. El Dr. Peeler respondió a las preguntas y se refirió al plan de trabajo de la Comisión.

El profesor Mohamed Shariff Bin Mohamed Din representó a la OIE en la 15.^a reunión del Grupo asesor regional de Asia sobre la sanidad de los animales acuáticos organizada por la Red de centros de acuicultura de Asia-Pacífico (NACA), en Bangkok del 21 al 23 de noviembre de 2016. Presentó las normas relacionadas con los animales acuáticos de la OIE adoptadas en la 84.^a Sesión General en mayo de 2016 y los resultados de la reunión de septiembre de 2016 de la Comisión para los Animales Acuáticos. Los informes de las reuniones del grupo asesor están disponibles en el sitio web de la NACA (www.enaca.org).

L. COLABORACIÓN

Ítem 36. FAO

La Dra. Melba Reantaso, representante de la FAO, se unió a la reunión de la Comisión para los Animales Acuáticos por teleconferencia y brindó una actualización de los programas de cooperación técnica, en particular aquellos relativos al virus de la tilapia de lago en Egipto y Asia y un proyecto FAO de fortalecimiento de capacidades, políticas y planes de acción nacionales sobre el uso prudente y responsable de agentes antimicrobianos en la industria pesquera, a realizarse en India, en abril de 2017. A su vez el Dr. Ernst resumió las actividades de la Comisión que revisten un interés para la FAO.

Los miembros de la Comisión agradecieron esta actualización y destacaron la importancia de la relación con la FAO.

M. PRÓXIMA REUNIÓN

La próxima reunión de la Comisión para los Animales Acuáticos está prevista del 12 al 19 de septiembre de 2017 inclusive.

.../Anexos

INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

París, 22 de febrero–1 de marzo de 2017

Lista de participantes

MIEMBROS DE LA COMISIÓN

**Dr Ingo Ernst
(Presidente)**

Director Aquatic Pest and Health Policy
Animal Division
Department of Agriculture and Water
Resources
GPO Box 858 Canberra ACT 2601
AUSTRALIA
Tel.: +61 2 6272 5615
ingo.ernst@agriculture.gov.au

Dr Maxwell Barson

Senior lecturer
(Parasitology & histopathology)
University of Zimbabwe
Department of Biological Sciences
Box MP 167 Mt. Pleasant
ZIMBABUE
Tel.: +263 4 303 211
barson001@yahoo.co.uk
barson@science.uz.ac.zw

Dr Joanne Constantine

National Manager
Animal Health Import/Export, Aquatics
Section
Canadian Food Inspection Avenue
Floor 3 E, Room 116
59 Camelot Drive
Ottawa ON K1A 0Y9
CANADÁ
Tel.: + 1-613-773-7426
joanne.constantine@inspection.gc.ca

**Dr Alicia Gallardo Lagno
(Vicepresidente)**

Subdirectora nacional de acuicultura
Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
Calle Victoria 2832
CHILE
Tel.: +56 32 281 9282
agallardol@sernapesca.cl

**Dr Edmund Peeler
(Vicepresidente)**

Group Manager Aquatic Pest &
Pathogens
CEFAS
Barrack Road, Weymouth
Dorset, DT4 8UB UK
REINO UNIDO
Tel.: +44 (0)1305 206746
ed.peeler@cefaz.co.uk

**Prof. Mohamed Shariff Bin
Mohamed Din**

Faculty of Veterinary Medicine
Universiti Putra Malaysia
43400 Serdang, Selangor
MALASIA
Tel.: +6012 2839 845
shariff@upm.edu.my
pshariff@gmail.com

OTROS PARTICIPANTES

Dr Nick Moody

CSIRO
Australian Animal Health Laboratory
Private Bag 24 (Ryrie Street)
Geelong
Victoria 3220
AUSTRALIA
nick.moody@csiro.au

SEDE DE LA OIE

Dra. Gillian Mylrea

Jefe adjunta
Departamento de normas
OIE
g.mylrea@oie.int

Srta. Sara Linnane

Secretaria de redacción científica
Departamento de ciencias
y nuevas tecnologías
OIE
s.linnane@oie.int

Dr Stian Johnsen

Chargé de mission
Departamento de normas
s.johnsen@oie.int

**INFORME DE LA REUNIÓN DE LA
COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS
París, 22 de febrero–1 de marzo de 2017**

Orden del día adoptado

- A. REUNIÓN CON EL DIRECTOR GENERAL ADJUNTO**
- B. APROBACIÓN DEL ORDEN DEL DÍA**
- C. REUNIÓN CON EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES TERRESTRES DE LA OIE**
- D. EXAMEN DE LOS COMENTARIOS DE LOS PAÍSES MIEMBROS SOBRE EL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE**
 - Ítem 3. Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.)
 - Ítem 4. Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.)
 - 4.1. Modificación de los nombres de las enfermedades de crustáceos
 - 4.2. *Batrachochytrium salamandrivorans*
 - 4.3. Infección por Ranavirus
 - 4.4. Evaluación de un nuevo orthomyxo-like virus- Virus de la tilapia de lago - TiLV (por sus siglas en inglés - Tilapia Lake Virus)
 - Ítem 5. Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico (Capítulo 1.5.)
 - Ítem 6. Desinfección de establecimientos y equipos de acuicultura (Capítulo 4.3.)
 - Ítem 7. Recomendaciones para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos (Capítulo 4.4.)
 - Ítem 8. Obligaciones generales en materia de certificación (Capítulo 5.1.)
 - Ítem 9. Modificaciones de los capítulos específicos de las enfermedades de crustáceos
 - 9.1. Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*) (Capítulo 9.1.)
 - 9.2. Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (Capítulo 9.2.)
 - 9.3. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 9.3.)
 - 9.4. Mionecrosis infecciosa (Capítulo 9.4.)
 - 9.5. Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 9.5.)
 - 9.6. Síndrome de Taura (Capítulo 9.6.)
 - 9.7. Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 9.8.)
 - 9.8. Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 9.8.)
 - Ítem 10. Nuevo capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (Capítulo 9.X.)

Anexo 2 (cont.)

Ítem 11. Artículo revisado X.X.8.

Ítem 12. Inclusión para las recomendaciones para la desinfección de la superficie de los huevos cuando se practica en las especies distintas de los salmónidos y es importante para garantizar el comercio seguro

Ítem 13. Iridovirus de la dorada japonesa (Capítulo 10.8.)

E. OTROS TEMAS RELATIVOS AL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE Y A LA LABOR DE LOS GRUPOS AD HOC

Ítem 14. Criterios para la evaluación de la inocuidad de las mercancías de animales acuáticos (Capítulo 5.4.)

Ítem 15. Grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE

Ítem 16. Grupo *ad hoc* sobre la demostración del estatus libre de enfermedad

Ítem 17. Grupo *ad hoc* sobre la bioseguridad de los establecimientos de acuicultura

F. MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS DE LA OIE – EXAMEN DE LOS COMENTARIOS DE LOS PAÍSES MIEMBROS

Ítem 18. Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo proyecto de Capítulo 2.2.X.)

Ítem 19. Plaga del cangrejo del río (*Aphanomyces astaci*) (Capítulo 2.2.1.)

Ítem 20. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 2.2.3.)

Ítem 21. Mionecrosis infecciosa (Capítulo 2.2.4.)

Ítem 22. Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 2.2.5.)

Ítem 23. Síndrome de Taura (Capítulo 2.2.6.)

Ítem 24. Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 2.2.8.)

Ítem 25. Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 2.2.7)

G. OTROS TEMAS RELATIVOS AL MANUAL DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS Y A LA LABOR DE LOS GRUPOS AD HOC

Ítem 26. Revisión del informe del Grupo *ad hoc* de la OIE sobre el *Manual Acuático*

H. CENTROS DE REFERENCIA DE LA OIE

Ítem 27. Revisión de los informes de los laboratorios de referencia y de los centros colaboradores

Ítem 28. Solicitudes para la designación de centros de referencia de la OIE o el cambio de expertos

Ítem 29. Retiro de un laboratorio de referencia de la OIE

Ítem 30. Avances de los sistema de gestión de calidad de los laboratorios de referencia

Ítem 31. Procedimientos para la aprobación y el mantenimiento de la categoría de laboratorio de referencia

Ítem 32. Proyectos de hermanamiento

I. OTROS TEMAS

Ítem 33. Actualización de las actividades de la OIE en el campo de la resistencia a los agentes antimicrobianos

Ítem 34. Autodeclaración de ausencia de enfermedad

Ítem 35. Protocolo Nagoya

J. PROGRAMA DE TRABAJO DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN 2017/2018**K. ACTIVIDADES DE LA COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS DE LA OIE PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS****L. COLABORACIÓN**

Ítem 36. FAO

M. PRÓXIMA REUNIÓN

GLOSARIO

ANIMALES ACUÁTICOS

designa los peces, moluscos, crustáceos y anfibios (*huevos* y *gametos* inclusive) en cualquiera de sus fases viables de desarrollo, procedentes de *establecimientos de acuicultura* o ~~capturados en el~~ medio ambiente natural y destinados a la cría, a la repoblación o al consumo humano o al uso ornamental.

PRODUCTOS BIOLÓGICOS

designa:

- a) los reactivos biológicos que se utilizan para el *diagnóstico* de ciertas *enfermedades*;
- b) los sueros que se utilizan para la prevención o el tratamiento de ciertas *enfermedades*;
- c) las vacunas inactivadas o modificadas que se utilizan para la vacunación preventiva contra ciertas *enfermedades*;
- d) el material genético de *agentes patógenos infecciosos*;
- e) los tejidos endocrinos de peces o utilizados en peces.

ENFERMEDAD

designa la *infección*, clínica o no, provocada por uno o varios agentes *patógenos*.

ZONA

~~designa una parte claramente delimitada un área de un país o de varios países con un sistema hidrológico homogéneo que contiene una población de animales acuáticos con un estatus sanitario específico particular respecto de una o más enfermedades, es determinadas contra la(s) cuales se han aplicado en la que se aplican medidas de vigilancia y de control y se cumplen condiciones elementales de bioseguridad. Estas La zona deberá ser definida claramente documentadas por la(s) autoridad(es) competente(s).~~

designa una porción de un país o de un conjunto de países que abarca:

- a) la totalidad de una *cuenca hidrográfica* (desde el manantial de un río hasta el estuario o lago), o
- b) más de una *cuenca hidrográfica*, o
- c) parte de una *cuenca hidrográfica* (desde el manantial de un río hasta una barrera que impide la introducción de una *enfermedad* o *enfermedades* específica[s]), o
- d) parte de una zona costera bien delimitada geográficamente, o
- e) un estuario bien delimitado geográficamente,

~~que constituye un sistema hidrológico homogéneo con un estatus sanitario particular respecto de una enfermedad o enfermedades determinada(s). Las zonas deben ser claramente documentadas por la(s) autoridad(es) competente(s) (por ejemplo, en un mapa o con otros medios de localización precisa, como las coordenadas GPS [sistema global de navegación]).~~

— Texto suprimido

CAPÍTULO 1.2.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE ENFERMEDADES EN LA LISTA DE LA OIE

Artículo 1.2.1.

Introducción

El presente capítulo describe los criterios para la inclusión de las *enfermedades* en el Capítulo 1.3.

El objetivo de la inclusión de *enfermedades* es apoyar a los Países Miembros proporcionándoles la información necesaria para que puedan tomar las medidas apropiadas en la prevención de la propagación transfronteriza de importantes *enfermedades* de los *animales acuáticos*, lo que se logra gracias a una *notificación* transparente, oportuna y coherente.

Normalmente, cada *enfermedad* de la lista cuenta con un capítulo correspondiente que ayuda a los Países Miembros en la armonización en materia de detección, prevención y control de *enfermedades* y proporciona las normas aplicables para garantizar el *comercio internacional* seguro de los *animales acuáticos* y de sus productos.

Los requisitos de *notificación* figuran en el Capítulo 1.1.

Los principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico se describen en el Capítulo 1.1.2. del *Manual Acuático*.

Artículo 1.2.2.

Los criterios para incluir una *enfermedad* en la lista de la OIE son los siguientes:

- 1) Es probable la propagación internacional del *agente patógeno* (a través de *animales acuáticos*, sus productos, vectores o fómites).

Y

- 2) Al menos un país puede demostrar en el país o en una *zona* la ausencia de *enfermedad* en *animales acuáticos* susceptibles, basándose en las disposiciones del Capítulo 1.4.

Y

- 3) Se dispone de una *definición de caso* precisa y existen métodos de detección y diagnóstico fiables.

Y

4)

- a) Se ha demostrado la transmisión natural de la *enfermedad* al ser humano y la infección humana se asocia con consecuencias graves.

O

- b) Se ha demostrado que la *enfermedad* afecta la sanidad de los *animales acuáticos* de cultivo a nivel de un país o una *zona* lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo, pérdidas de producción, morbilidad o mortalidad.

O

- c) Se ha demostrado o las pruebas científicas indican que la *enfermedad* puede afectar la sanidad de los *animales acuáticos* silvestres lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo, morbilidad o mortalidad a nivel de la población, productividad reducida o impactos ecológicos.

— Texto suprimido

CAPÍTULO 1.2.

~~CRITERIOS PARA LA DE INCLUSIÓN DE LAS ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN LA LISTA DE LA OIE~~

Artículo 1.2.1.

Introducción

El presente capítulo describe los criterios para la inclusión de las *enfermedades* en el Capítulo 1.3.

El objetivo de la ~~inscripción~~ inclusión de enfermedades es apoyar a los Países Miembros proporcionándoles la información necesaria para que puedan tomar las medidas apropiadas en la prevención de la propagación transfronteriza de importantes *enfermedades* de los *animales acuáticos*, por medio de una lo que se logra gracias a una notificación transparente, oportuna y coherente.

~~Para las enfermedades listadas de acuerdo con el Artículo 1.2.2., los capítulos correspondientes de Normalmente, cada enfermedad de la lista cuenta con un capítulo correspondiente que ayudan los Países Miembros en la armonización en materia de detección, prevención y control de enfermedades y proporcionan las normas aplicables para garantizar el comercio internacional ~~inocuo~~ seguro de los animales acuáticos y de sus productos.~~

Los requisitos de *notificación de las enfermedades de la lista de la OIE* figuran en el Capítulo 1.1.

Los principios y métodos para la selección de validación de las pruebas de diagnóstico se describen presentan en el Capítulo 1.1.2. del Manual Acuático.

Artículo 1.2.2.

Los criterios para incluir una *enfermedad* de los animales acuáticos en la lista de la OIE son los siguientes:

~~Las enfermedades que se propongan para inscripción en la lista deberán reunir los criterios pertinentes, tal como se indican en: A. Consecuencias, B. Propagación y C. Diagnóstico. Por consiguiente, para ser inscrita en la lista, una enfermedad debe reunir las siguientes características: 1 ó 2 ó 3; y 4 ó 5; y 6; y 7; y 8. Estas propuestas irán acompañadas por una definición de caso para la enfermedad considerada.~~

| No | | Criterios para la inscripción | Notas explicativas |
|-------------------------|------|--|---|
| A. Consecuencias | | | |
| 4-Q | b. | Se ha demostrado que la enfermedad afecta tiene pérdidas significativas de producción a nivel nacional o multinacional (zonas o regiones) <u>un impacto significativo en la sanidad de los animales acuáticos de cultivo a nivel de un país o una zona teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo: pérdidas directas de producción, y o morbilidad y la mortalidad a nivel del país o zona.</u> | Se ha establecido un patrón general según el cual la enfermedad provocará pérdidas en las especies susceptibles, y la morbilidad y la mortalidad están relacionadas básicamente con el agente infeccioso y no con factores relativos a la gestión o el medio ambiente. (La morbilidad incluye, por ejemplo, pérdida de producción por falta de desove.) Las repercusiones económicas directas de la enfermedad están relacionadas con su morbilidad, mortalidad y efectos en la calidad de producto. |
| 2-Q | c. Q | Se ha demostrado o las pruebas científicas indican que es probable que la enfermedad puede causar una morbilidad o mortalidad importantes <u>tener un impacto significativo en afectar la sanidad naturales de los animales acuáticos silvestres lo que conlleva consecuencias significativas, por ejemplo: morbilidad y la o mortalidad a nivel de la población, productividad reducida e impactos ecológicos, teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción, la mortalidad y las amenazas ecológicas.</u> | Las poblaciones naturales de animales acuáticos pueden ser poblaciones que se capturan con fines comerciales (pesquerías naturales) y representan, por lo tanto, desde el punto de vista económico, un capital. Este capital también puede ser ecológico o medioambiental (por ejemplo, si los animales acuáticos que componen la población pertenecen a una especie potencialmente amenazada por la enfermedad). |

Anexo 4B (cont.)

| | | | |
|-------------------------|----------------|--|---|
| <u>Y</u> | | | |
| 3.4. | a.Ø | El agente infeccioso constituye un peligro para la salud pública. Se ha demostrado la transmisión natural de la enfermedad al ser humano, y la infección humana se asocia con consecuencias graves. | |
| Y B. Propagación | | | |
| 4. | - | Se ha demostrado la etiología infecciosa de la enfermedad. | - |
| 5. | Ø | Se ha establecido una estrecha relación entre un agente infeccioso y la enfermedad pero se desconoce aún la etiología. | Al igual que las enfermedades cuya etiología infecciosa ha sido demostrada, las enfermedades infecciosas de etiología desconocida pueden tener consecuencias peligrosas. Mientras se recolectan datos sobre la presencia de la enfermedad, se deben realizar investigaciones a fin de dilucidar la etiología de la enfermedad y los resultados deben darse a conocer en un período de tiempo razonable. |
| 6.1. | Y | Probabilidad de Se ha demostrado. Es probable la propagación internacional, del agente patógeno (a través de animales acuáticos vivos, sus productos, vectores o fomites). | El comercio internacional de especies de animales acuáticos susceptibles a la enfermedad está ya establecido o tiene probabilidades de establecerse, siendo probable la introducción y radicación de la enfermedad por el comercio internacional. |
| <u>Y</u> | | | |
| 7.2. | Y | Varios países o zonas pueden ser declarados libres de la enfermedad, de conformidad con los principios generales de vigilancia descritos en el Al menos un país o una zona pueden ha demostrar en el país o una zona demostrado la ausencia efectiva o eminente de enfermedad en poblaciones de animales acuáticos susceptibles, basándose en las disposiciones del los Capítulos 1.4. y 1.5. | Los países libres o las zonas libres de enfermedad podrían ser protegidos. La inscripción en la lista de enfermedades presentes en todo el mundo o muy extendidas imposibilitaría la notificación, no obstante, los países que aplican un programa de control pueden proponer la inscripción de estas enfermedades en la lista, siempre que hayan emprendido una evaluación científica para respaldar su solicitud. La protección de los reproductores contra las enfermedades extendidas, o la protección de las últimas zonas libres existentes contra una enfermedad muy extendida serían ejemplos. |
| Y C. Diagnóstico | | | |
| <u>Y</u> | | | |
| 8.3. | | Se dispone de una definición precisa de caso y Existen un métodos de detección y diagnóstico fiables y se dispone de una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras enfermedades. | Debe existir una prueba de diagnóstico asequible y que, preferentemente, haya sido sometida a un proceso de normalización y validación con muestras de terreno (véase el Manual acuático), o existe una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras patologías. |

 — Texto suprimido.

CHAPTER 1.3.

ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OIE

Preámbulo: las *enfermedades* que figuran a continuación se han incluido en la lista de la OIE teniendo en cuenta los criterios para la inclusión de una *enfermedad* de los *animales acuáticos* (véase Artículo 1.2.2.).

En caso de modificación, aprobada en la Asamblea Mundial de Delegados, de esta lista de *enfermedades*, la nueva lista entrará en vigor el 1 de enero del año siguiente.

[...]

Artículo 1.3.3.

Están incluidas en la lista de la OIE las siguientes *enfermedades* de los crustáceos:

- Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
- Infección por *Aphanomyces astaci* (~~P~~laga del cangrejo de río (~~*Aphanomyces astaci*~~)
- Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1
- Infección por el virus de la Nnecrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
- Infección por el virus de la Mmionecrosis infecciosa
- Infección por *Hepatobacter panaei* (~~H~~epatopancreatitis necrotizante)
- Infección por el virus del Ssíndrome de Taura
- ~~Enfermedad~~ Infección por el virus del síndrome de las manchas blancas
- Infección por el nodavirus *Macrobrachium rosenbergii* (~~E~~nfermedad de la cola blanca)

Artículo 1.3.4.

Están incluidas en la lista de la OIE las siguientes *enfermedades* de los anfibios:

- Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*
- Infección por *Batrachochytrium salamandrivorans*
- Infección por las especies de *Ranavirus* spp. ~~ranavirus.~~

-
-
- Texto suprimido

CAPÍTULO 4.3.

DESINFECCIÓN DE ESTABLECIMIENTOS
Y EQUIPOS DE ACUICULTURA

Artículo 4.3.1.

Finalidad

La finalidad del presente capítulo es brindar recomendaciones sobre la planificación y realización de procedimientos de *desinfección* destinados a prevenir la introducción, establecimiento o propagación de *agentes patógenos*.

Artículo 4.3.2.

Ámbito de aplicación

Este capítulo describe recomendaciones para la *desinfección* de los establecimientos y equipos de *acuicultura* en las actividades de rutina en materia de bioseguridad para la respuesta a las urgencias sanitarias. Se brindan recomendaciones sobre los principios generales, la planificación e implementación de las actividades de *desinfección*.

Los métodos específicos de inactivación de los agentes patógenos figuran en los capítulos específicos de *enfermedad* en el *Manual Acuático*.

Artículo 4.3.3.

Introducción

La *desinfección* se emplea como una herramienta de lucha contra las *enfermedades* en los *establecimientos de acuicultura* y como parte de un *plan de bioseguridad*. La *desinfección* se utiliza para prevenir la entrada o salida de *agentes patógenos* diana de o hacia un *establecimiento de acuicultura* o *compartimento*, así como su propagación dentro de los *establecimientos de acuicultura*. La *desinfección* se puede aplicar en el marco de una respuesta a una situación de urgencia sanitaria, con el fin de contribuir al mantenimiento de las *zonas de control de enfermedades* y permitir su erradicación (procedimientos de sacrificio sanitario) en los *establecimientos de acuicultura* afectados. El objetivo específico de la *desinfección* determinará la elección de la estrategia utilizada y su aplicación.

En lo posible, deberá prevenirse la propagación de los *agentes patógenos* evitando las vías de transmisión en lugar de tratar su presencia por medio de la *desinfección*. Por ejemplo, cuando los equipos son difíciles de desinfectar (guantes, equipo de submarinismo y buceo, cuerdas y redes), se deberá limitar su uso a una zona específica en vez de desplazarlos dentro de las unidades de producción o entre los *establecimientos de acuicultura* después de la *desinfección*.

Artículo 4.3.4.

Principios generales

La *desinfección* es un proceso estructurado que recurre a procedimientos físicos y químicos para eliminar material orgánico y, con el fin de destruir o inactivar los *agentes patógenos*. El proceso deberá incluir una planificación y la implementación de etapas que tengan en cuenta opciones eventuales, la eficacia y los *riesgos*.

El proceso de *desinfección* puede variar si el objetivo global es la prevención, control o erradicación de las *enfermedades*. Los procedimientos de erradicación implicarán en general que se retiren todos los *animales acuáticos*, así como una *desinfección* de los *establecimientos de acuicultura* y de sus equipos. Los procedimientos utilizados para controlar la *enfermedad* tienen como meta limitar su propagación entre o dentro de *establecimientos de acuicultura*. Si bien se pueden utilizar distintos enfoques para alcanzar el objetivo identificado, se deberán aplicar en todos los casos los principios generales detallados a continuación.

1) El proceso de *desinfección* deberá incluir las siguientes etapas:

a) Limpieza y lavado

Antes de aplicar los desinfectantes, siempre se deberán limpiar y lavar las superficies y los equipos. La limpieza y lavado de las superficies y los equipos es necesaria para eliminar los desechos sólidos, la materia orgánica (incluyendo la bioincrustación) y los residuos químicos, puesto que pueden reducir la eficacia de los desinfectantes. representan una parte importante del proceso de desinfección y siempre deberán preceder la aplicación de los desinfectantes. El uso de detergente también es importante para vencer las barreras de los biofilms. Es necesario eliminar los desechos sólidos, la materia orgánica (incluyendo la bioincrustación) y los residuos químicos, puesto que pueden reducir la eficacia de los desinfectantes. El detergente utilizado deberá ser compatible con el desinfectante y la superficie tratada. Tras los procedimientos de la limpieza, deberá drenarse el exceso de agua y, antes de aplicar los desinfectantes, todas las superficies y equipos deberán controlarse para verificar que no exista material orgánico restante.

Anexo 6 (cont.)

Cuando hay que tratar el agua, la presencia de sólidos en suspensión también puede reducir la eficacia de algunos *desinfectantes*. Se deberán eliminar estos sólidos en suspensión mediante distintos procesos como la filtración, la sedimentación, la coagulación o la floculación.

Los biofilms, a menudo considerados como babaza, constituyen finas películas conformadas por microorganismos y sustancias poliméricas extracelulares que adhieren a las superficies. Los biofilms forman una barrera física que protege de los *desinfectantes* a los microorganismos incrustados. Para lograr una *desinfección* eficaz, se deberán eliminar los biofilms durante la etapa de limpieza y lavado, antes de aplicar los *desinfectantes*.

Todos los desechos producidos deberán eliminarse de manera biosegura, ya que pueden contener *agentes patógenos* viables y que tienen el potencial de propagar la *infección* si no se controlan.

b) Aplicación de los desinfectantes

Esta etapa implica la aplicación de compuestos químicos o de procesos físicos apropiados para inactivar el *agente patógeno*.

La aplicación de *desinfectantes* deberá tener en cuenta el tipo de material que necesita una *desinfección* y la forma de aplicarlos. Los materiales duros y no permeables (por ejemplo, las superficies metálicas y pulidas, los plásticos y el hormigón pintado) se pueden limpiar por completo y soportan el contacto con el *desinfectante*, puesto que no presentan asperezas donde puede alojarse el material infeccioso. La eficacia de la *desinfección* disminuirá si la superficie está corroída, picada o si la pintura está descascarada; **por lo tanto**, resulta esencial el mantenimiento correcto de **las superficies y los equipos**. En el caso de los materiales y las superficies permeables (por ejemplo, material de madera, redes y suelo), se requiere una mayor concentración de *desinfectante* y un tiempo de contacto más prolongado en razón de una superficie mayor, de productos químicos que no pueden penetrar fácilmente y de la presencia de materia orgánica residual.

La elección del método de aplicación deberá garantizar que todas las superficies entren en contacto con el agente durante el periodo de tiempo requerido. La aplicación de *desinfectantes* ha de ser metódica (por ejemplo, utilizando un modelo cuadriculado) para garantizar una cobertura completa de la superficie y el respeto de los tiempos de contacto. Cada etapa deberá iniciarse en el punto más alto y continuar hasta el más bajo, comenzando por las áreas menos contaminadas. Sin embargo, para ciertos equipos, basta con enjuagar las superficies con el *desinfectante*. Cuando los *desinfectantes* se aplican en superficies verticales, se deberá respetar cuidadosamente el tiempo de contacto mínimo indicado antes de que se escurra el *desinfectante*. Las superficies verticales pueden necesitar un nuevo tratamiento o **requerir** un suplemento de agentes espumantes compatibles, con el fin de prolongar su adherencia a las superficies.

Los tubos y biofiltros deberán rellenarse con la solución de *desinfectante* para garantizar el contacto con todas las superficies. Las áreas complejas y de acceso difícil pueden requerir fumigación o la utilización de equipos de pulverización.

c) Eliminación o inactivación del desinfectante

La eliminación o inactivación de los residuos químicos es importante con el fin de evitar la toxicidad para los *animales acuáticos*, la corrosión de los equipos y los impactos sobre el medio ambiente. Los procedimientos que pueden emplearse para la eliminación o inactivación de los residuos químicos incluyen: enjuague de las superficies, dilución en niveles aceptables, tratamiento que inactiva los agentes químicos o un tiempo de espera suficiente para la desactivación o disipación del componente activo. Estos procedimientos se pueden utilizar en forma independiente o combinados.

- 2) Los *desinfectantes* deberán utilizarse de conformidad con las medidas previstas por la legislación pertinente. Los *desinfectantes* pueden presentar *riesgos* para la salud de las personas, los *animales acuáticos* y el medio ambiente. Los *desinfectantes* químicos se deberán almacenar, utilizar y eliminar de acuerdo con la legislación y las instrucciones del fabricante.
- 3) La *desinfección* deberá controlarse para garantizar su eficacia y la dosis de *desinfectante*. Dependiendo del procedimiento de aplicación y del *agente patógeno* en cuestión, este control se puede efectuar de distintas formas. Los ejemplos incluyen la medición del agente activo (por ejemplo, niveles de cloro residual), la medición indirecta del agente activo mediante un indicador de proceso (por ejemplo, seguimiento de la posible reducción de oxígeno), y medición de su eficacia mediante bacterias indicadoras (por ejemplo, conteo de las colonias de bacterias heterotróficas en placa).

En las instalaciones vacías y desinfectadas, se puede considerar el uso de una población centinela antes de la reintroducción de animales. La población centinela deberá ser susceptible al agente patógeno en cuestión y exponerse a condiciones que favorezcan la expresión clínica de la *enfermedad* para que el agente siga siendo viable.

- 4) Los *establecimientos de acuicultura* deberán llevar un registro de los procesos de *desinfección* aplicados. Los registros deberán estar completos para permitir una evaluación del plan de *desinfección*.

Artículo 4.3.5.

Planificación

A la elaboración de un plan de *desinfección* deberá incorporarse una evaluación de las rutas de transmisión, el tipo de material que se desinfectará, los *agentes patógenos* que han de inactivarse, las precauciones en términos de sanidad y seguridad, las medidas de control requeridas y el entorno donde va a realizarse el proceso. El plan de *desinfección* deberá ~~revisarse regularmente~~ y prever un mecanismo para determinar su eficacia. El plan de *desinfección* deberá revisarse regularmente para garantizar que el proceso de *desinfección* siga siendo eficaz y eficiente. Cualquier cambio en el plan de *desinfección* también deberá documentarse.

El proceso de planificación deberá permitir la evaluación de los puntos de control críticos en los que la *desinfección* deberá ser más eficaz. Las prioridades en materia de *desinfección* se determinarán en función de la propagación potencial de los *agentes patógenos* y de la probabilidad relativa de contaminación. Para lograr una *desinfección* eficaz de las instalaciones que contengan *vectores* (por ejemplo, estanques), los *vectores* deberán excluirse, quitarse o destruirse como parte del proceso de *desinfección*.

Cuando resulte práctico se deberá establecer un inventario de todos los artículos que necesiten *desinfección*. Se deberá efectuar una evaluación de los materiales utilizados en la construcción, de la porosidad de sus superficies y su resistencia a los daños químicos, así como del acceso para su *desinfección*. Después se deberá decidir el método apropiado de *desinfección* para cada artículo.

Deberá evaluarse el nivel de limpieza requerido previo a la *desinfección* para cada tipo de equipo. Si existe mucha suciedad con acumulación de sólidos y partículas, se deberá prestar atención específica al proceso de limpieza y a los recursos requeridos. El proceso de limpieza físico o químico deberá ser compatible con el *desinfectante* elegido.

El personal, los equipos y materiales que se desinfectarán deberán evaluarse teniendo en cuenta el tipo y el número de artículos por tratar y la manera cómo se gestionarán los desechos.

En la etapa de planificación se deberá tener en cuenta la capacidad de controlar el flujo y el volumen de agua dependiendo de las características del establecimiento (sistemas de recirculación cerrados o abiertos). El agua puede desinfectarse por medio de distintos métodos, como se describe en el Artículo 4.3.11.

Artículo 4.3.6.

Desinfección en una respuesta de emergencia

La *desinfección* constituye una parte esencial de cualquier respuesta de emergencia en apoyo a actividades de control de las *enfermedades* como la *cuarentena* de los *establecimientos de acuicultura* afectados y los procedimientos de sacrificio sanitario. Las condiciones asociadas con la respuesta de emergencia exigen enfoques distintos en términos de *desinfección* con respecto a los empleados habitualmente en materia de bioseguridad. Estas condiciones incluyen un alto nivel de *riesgo* de *enfermedad* (debido a la importancia de la *enfermedad*), una importante concentración de agentes patógenos, volúmenes potencialmente altos de *animales acuáticos* infectados y de residuos, amplias superficies que requieran una *desinfección* y grandes volúmenes de agua contaminada. La planificación deberá tener en cuenta estas circunstancias, incorporar una evaluación de los *riesgos* e incluir métodos para controlar la eficacia del seguimiento de los resultados.

En una respuesta de emergencia puede ser preferible evitar las vías de transmisión en lugar de confiar en la *desinfección*. El equipo no deberá moverse de un *establecimiento de acuicultura* infectado a menos de que se haya completado una *desinfección* eficaz. Puede que, en algunas circunstancias, el equipo o el material que sea difícil de desinfectar y con una alta probabilidad de contaminación tenga que eliminarse de manera segura en lugar de desinfectarse.

Artículo 4.3.7.

Tipos de desinfectantes

Entre los tipos de *desinfectantes* comúnmente utilizados en la *acuicultura* se encuentran:

1. Agentes oxidantes

La mayoría de los agentes oxidantes son *desinfectantes* eficaces que actúan de manera relativamente rápida frente a una amplia gama de microorganismos. Estos componentes se inactivan con la materia orgánica y, por lo tanto, deberán utilizarse tras una etapa de limpieza eficaz. La materia orgánica consume los agentes oxidantes cuya concentración inicial (dosis de carga) disminuye rápidamente, lo que hace difícil anticipar niveles de dosis eficaces (dosis residual). Por lo tanto, deberán controlarse sistemáticamente los niveles de concentración residual, con el fin de confirmar que siguen siendo superiores a las concentraciones mínimas durante el período de tiempo requerido.

Anexo 6 (cont.)

Los agentes oxidantes pueden resultar tóxicos para los *animales acuáticos* y, por lo tanto, deberán eliminarse o inactivarse.

Los agentes oxidantes utilizados habitualmente son los compuestos clorados, cloramina-T, yodóforos, compuestos de peróxigeno, dióxido de cloro y ozono.

2. Modificadores de pH (álcalis y ácidos)

La modificación del pH se puede realizar añadiendo compuestos alcalinos o ácidos. La utilización de modificadores de pH tiene la ventaja de que la concentración se puede medir fácilmente y de que no se inactivan con la materia orgánica. Además, se pueden utilizar en zonas en las que no es posible aplicar otros desinfectantes eficaces, como, por ejemplo, las tuberías o los filtros biológicos. Los modificadores de pH son compuestos alcalinos o ácidos utilizados para modificar el pH del entorno. Tienen la ventaja de que no se inactivan con la materia orgánica y que, por consiguiente, por lo que se pueden utilizar en zonas en las que no es posible realizar una etapa de limpieza eficaz como es el caso de las tuberías o de los filtros biológicos.

3. Aldehídos

Los aldehídos actúan desnaturalizando las proteínas. Dos componentes a base de aldehídos que se pueden utilizar para la descontaminación de los *establecimientos de acuicultura* son el formaldehído y el glutaraldehído, que son extremadamente eficaces contra un gran número de organismos pero requieren un tiempo prolongado de exposición. Los aldehídos mantienen su actividad en presencia de materia orgánica y sólo son un poco corrosivos. El glutaraldehído se utiliza en forma líquida como un esterilizante en frío, en particular, en equipos sensibles al calor. El formaldehído puede emplearse como aerosol o como gas de fumigación.

4. Biguanidas

De las numerosas biguanidas disponibles, la clorhexidina es la más utilizada. Sin embargo, no son eficaces en aguas duras o alcalinas y son menos eficaces contra muchos *agentes patógenos* si se comparan con otros grupos de *desinfectantes*. Estos compuestos son comparativamente menos corrosivos y relativamente seguros, por lo que se suelen utilizar habitualmente para la *desinfección* de las superficies cutáneas y de los equipos más delicados.

5. Compuestos de amonio cuaternario

La eficacia biocida de los compuestos de amonio cuaternario es variable y selectiva. Son eficaces contra algunas bacterias vegetales y algunos hongos, pero no contra todos los virus. Los compuestos de amonio cuaternario son particularmente activos frente a las bacterias gram positivas; su acción contra las bacterias gram negativas es lenta y algunas cepas muestran cierta resistencia. Estos compuestos no son eficaces contra las esporas. Presentan la ventaja de que no son corrosivos y tienen propiedades humidificantes, lo que aumenta el contacto con las superficies. Los compuestos de amonio cuaternario pueden ser tóxicos para los *animales acuáticos* y se les debe eliminar de las superficies tras los procedimientos de *desinfección*.

6. Irradiación por rayos ultravioleta

La irradiación por rayos ultravioleta (UV) es una opción válida para el tratamiento del agua que entra o sale de los *establecimientos de acuicultura* donde se efectúa un cierto control del flujo de agua en los sistemas de recirculación o abiertos. La irradiación UV deberá emplearse tras un filtrado correcto puesto que la presencia de sólidos en suspensión reduce la transmisión de los rayos UV y la eficacia de este método.

7. Tratamiento térmico

La susceptibilidad de los *agentes patógenos* frente al tratamiento térmico varía de forma significativa, por lo tanto, deberán tomarse en cuenta las características del agente patógeno. En la mayoría de las condiciones, el calor húmedo es más eficaz que el calor seco.

8. Desecación

La desecación puede resultar un *desinfectante* eficaz para los *agentes patógenos* susceptibles y utilizarse cuando los otros métodos de *desinfección* no se pueden realizar o como un método complementario de otros métodos de *desinfección*.

La desecación se puede considerar como un método de *desinfección* si se logra el secado completo de los equipos, puesto que la ausencia de agua elimina numerosos *agentes patógenos*. Sin embargo, el contenido de humedad puede ser difícil de controlar en ciertas circunstancias. La eficacia varía dependiendo de condiciones ambientales como la temperatura y la humedad.

9. Métodos combinados de desinfección

Los métodos combinados de *desinfección* tomarán en consideración cuando actúan en forma sinérgica y ofrecen una mayor garantía de la inactivación eficaz del *agente patógeno*. Algunos ejemplos:

- a) la asociación de la exposición directa a la luz del sol y la desecación constituye un método combinado de *desinfección* que ofrece tres acciones potenciales de *desinfección*, es decir, la irradiación UV, el tratamiento térmico y la desecación. Este método no tiene ningún costo operativo y se puede utilizar después de otros métodos;
- b) el ozono y la irradiación de UV a menudo se combinan en serie ya que se utilizan como complemento de otros métodos de *desinfección* y presentan modos de acción diferentes. La irradiación de UV también tiene la ventaja de eliminar los residuos de ozono proveniente del agua tratada.

Se pueden observar efectos antagonistas cuando se combinan agentes químicos o detergentes.

Artículo 4.3.8.

Selección de un desinfectante

El *desinfectante* se deberá seleccionar teniendo en consideración lo siguiente:

- eficacia contra los *agentes patógenos*;
- concentración eficaz y tiempo de exposición;
- capacidad de evaluación de la eficacia;
- naturaleza de los artículos que se van a desinfectar y la posibilidad de que se deterioren;
- compatibilidad con el tipo de agua disponible (por ejemplo, agua dulce, agua dura o agua de mar);
- disponibilidad del *desinfectante* y del equipo;
- facilidad de aplicación;
- capacidad para remover materia orgánica;
- costo;
- impacto de los residuos sobre los *animales acuáticos* y el entorno; y
- seguridad del usuario.

Artículo 4.3.9.

Tipos de establecimientos y equipos de acuicultura

Las características de los distintos tipos de equipos y *establecimientos de acuicultura* varían ampliamente. Esta sección presenta ciertas consideraciones para proceder a la *desinfección* eficaz de los distintos tipos de *establecimientos de acuicultura* y sus equipos.

1. Estanques

En general, los estanques son de buen tamaño, tener directamente un fondo de tierra o poseer un recubrimiento de plástico. Estas características, junto con la presencia de grandes volúmenes de agua, hacen muy difícil la limpieza que precede la descontaminación, y las grandes cargas de materias orgánicas pueden afectar la acción de muchos *desinfectantes* químicos. Antes de la *desinfección*, a los estanques se les debe drenar el agua y eliminar el máximo posible de materia orgánica. **El** **Todas las** **aguas** y la materia orgánica deberán desinfectarse o eliminarse de manera biológicamente segura. Los estanques de tierra deberán vaciarse por completo y recibir un tratamiento con compuestos calizos para aumentar el nivel de pH y facilitar la inactivación de los *agentes patógenos*. El raspado, **y el** arado **o recubrimiento** de los fondos de los estanques sin revestimiento facilitará también la incorporación de los componentes calizos y el secado.

Anexo 6 (cont.)

2. Tanques

El material de construcción del tanque (por ejemplo, fibra de vidrio, hormigón o plástico) determinará el tipo de método de *desinfección* utilizado. Los tanques de hormigón son sensibles a la corrosión de los ácidos y a los daños potencialmente ocasionados por los pulverizadores de alta presión. Dado que también son porosos, para garantizar la *desinfección* es necesario prever un tiempo de aplicación prolongado de los productos químicos. Los tanques de plástico, pintados y de fibra de vidrio son más fáciles de desinfectar puesto que disponen de superficies lisas y no porosas fáciles de limpiar por completo y resistentes a la mayoría de los productos químicos.

Antes de la *desinfección* se deberá vaciar el agua de los tanques y retirar la mayor cantidad posible de materia orgánica. El agua y la materia orgánica deberán desinfectarse o eliminarse de manera biológicamente segura. El equipo de los tanques deberá sacarse para una limpieza y *desinfección* por separado, eliminando los desechos orgánicos y los escombros. La superficie del tanque deberá lavarse con pulverizadores de alta presión o mediante un cepillado mecánico, en asociación con productos detergentes, con el fin de eliminar la suciedad como las algas o los biofilms. Se puede utilizar agua caliente para reforzar la limpieza. Antes de aplicar los *desinfectantes*, se deberá drenar todo excedente de agua para facilitar el proceso de limpieza; todo exceso de agua debe drenarse, desinfectarse o eliminarse respetando las condiciones de bioseguridad.

Cuando los *desinfectantes* se aplican en superficies verticales, se deberá respetar cuidadosamente el tiempo de contacto mínimo indicado antes de que se escurra el *desinfectante*. Tras la *desinfección*, los tanques se deberán enjuagar para eliminar los residuos y permitir que se sequen por completo.

3. Tuberías

La *desinfección* de las tuberías puede complicarse debido a la dificultad de acceso. Al seleccionar el método de *desinfección*, deberán tenerse en cuenta los materiales utilizados en la fabricación de las tuberías.

Las tuberías pueden limpiarse con eficacia utilizando soluciones alcalinas o ácidas, o bien sistemas de limpieza con chorro de espuma. Para que sea una limpieza eficaz, la desinfección de las tuberías requiere la eliminación del biofilm; deberá eliminarse, se deberán evacuar seguida de la evacuación de las partículas en suspensión generadas y, por último, se deberá realizar un enjuague completo.

Una vez que las tuberías estén limpias, se pueden aplicar los *desinfectantes* químicos o una corriente de agua caliente. En todas las etapas, las tuberías deben estar completamente llenas para que las superficies internas se traten correctamente.

4. Redes de la jaula y otros materiales fibrosos

Las redes utilizadas en las cajas de *acuicultura* a menudo son grandes, difíciles de manipular y acumulan residuos biológicos, además de estar fabricadas a partir de materiales fibrosos que capturan la materia orgánica y la humedad. Las redes deberán reservarse a un solo *establecimiento de acuicultura* o área debido a la alta probabilidad de contaminación y a que puede ser difícil desinfectarlas.

Una vez retiradas del agua, deberán transferirse directamente a la zona dedicada a su lavado. Las redes deberán lavarse por completo antes de desinfectarse, con el fin de eliminar la materia orgánica y ayudar a la penetración de los *desinfectantes* químicos. Se logrará una mejor limpieza si se eliminan primero los residuos de gran tamaño y si después se lavan con una solución detergente. El agua y la materia orgánica se deberán eliminar en condiciones biológicamente seguras.

Al terminar la limpieza, las redes se pueden desinfectar por inmersión total en una solución de productos químicos desinfectantes o agua caliente. La duración del tratamiento deberá ser suficiente para permitir su penetración en los materiales que constituyen la red. El método de tratamiento se ha de determinar teniendo en cuenta la posibilidad que se tiene de deteriorar o dañar las redes. El tratamiento puede tener un impacto perjudicial en la solidez de las redes, lo que se deberá tener en cuenta al decidir el método de tratamiento que se aplicará para garantizar que no se comprometa su integridad. Al terminar la *desinfección*, las redes se deben secar antes de guardarse. Si las redes enrolladas no están completamente secas, conservan cierta humedad susceptible de favorecer la supervivencia de los *agentes patógenos*.

Los otros materiales fibrosos como la madera, las cuerdas y las redes de los salabres tienen características similares a las de las redes de las jaulas y exigen una atención particular. Siempre que sea posible, se recomienda que la utilización de equipos con materiales fibrosos se reserve a una zona específica.

5. Vehículos

La probabilidad de contaminación de los *vehículos* se determinará con respecto a su uso, por ejemplo, transporte de *animales acuáticos* muertos, vivos o recién recolectados. Se deberán desinfectar todas las superficies exteriores e interiores potencialmente contaminadas, prestando una atención particular a las zonas que se puedan contaminar como la superficie interna de los *contenedores*, las tuberías, el agua de transporte y los desechos. Deberá evitarse la utilización de *desinfectantes* corrosivos para los *vehículos*, o si se utilizan la eliminación de los residuos con una acción corrosiva deberá realizarse por medio de un cuidadoso enjuague. Los compuestos oxidantes como la clorina son los más utilizados para los *vehículos*.

Todos los barcos deberán desinfectarse de manera rutinaria para evitar la transferencia de *agentes patógenos*. El nivel de contaminación de los barcos se determinará en función de su uso. Los barcos utilizados para la recuperación de los *animales acuáticos* vivos o muertos en los sitios para *acuicultura* se deberán considerar con una alta probabilidad de contaminación. La materia orgánica deberá eliminarse regularmente de puentes y zonas de trabajo.

El proceso de planificación de la *desinfección* deberá incluir una evaluación para identificar las áreas que se puedan contaminar tales como el interior y los alrededores de la maquinaria, los tanques, la sentina y la tubería. Todos los equipos desmontables se deberán retirar, **limpiar y desinfectar por separado** antes de la ***desinfección del barco***. Se han de elaborar procedimientos adicionales para los barcos vivero, puesto que pueden transferir *agentes patógenos* durante la evacuación del agua contaminada. Las aguas efluentes contaminadas se desinfectarán antes de evacuarse (ver Artículo 4.3.11.).

Siempre que sea posible, los barcos deberán estar en dique seco para la *desinfección* con el fin de limitar la evacuación de aguas usadas en el entorno acuático y poder acceder al casco **y a los recodos** de la embarcación. Deberán eliminarse los organismos bioincrustantes que pueden actuar como *vectores y fómites*.

Cuando los barcos no pueden instalarse **en dique seco**, se elegirá el método de *desinfección* que genere menos vertidos de productos químicos tóxicos en el medio acuático. Se emplearán buzos para efectuar la inspección y limpieza del casco. Cuando sea necesario, los métodos mecánicos como la pulverización a alta presión o la limpieza con vapor se considerarán como una alternativa de la *desinfección* química para la limpieza de toda la línea de flotación. Se puede contemplar también la fumigación para las superficies importantes, siempre que las áreas puedan aislarse de forma adecuada.

6. Edificios

Los *establecimientos de acuicultura* incluyen instalaciones destinadas a la cría, la recuperación y la transformación de los *animales acuáticos*, y al almacenamiento de los *alimentos para animales* (o *piensos*) y del equipo.

El enfoque utilizado para la *desinfección* puede variar según la estructura del edificio y del grado de exposición a los materiales y equipos contaminados.

Los edificios deberán diseñarse para permitir una limpieza eficaz y una aplicación minuciosa de los *desinfectantes* en todas las superficies internas. Algunos edificios poseen sistemas complejos de tuberías, maquinaria y depósitos que dificultan la *desinfección*. Siempre que sea posible, se deben quitar todos los escombros en las instalaciones y sacar los equipos antes de proceder a la *desinfección*.

Los agentes espumantes o nebulizadores constituyen opciones para la *desinfección* de áreas difíciles y superficies verticales. Para las superficies grandes y de difícil acceso, se podrá considerar la fumigación, siempre que los edificios puedan aislarse de forma adecuada.

7. Contenedores

El término *contenedor* designa tanto los simples recipientes de plástico utilizados para el transporte de *productos de animales acuáticos* y de *animales acuáticos* muertos, como los sistemas complejos de tanques utilizados para el transporte de los *animales acuáticos* vivos.

En general, los *contenedores* se fabrican con materiales no porosos (por ejemplo, el plástico o el acero **inoxidable**) que pueden desinfectarse con facilidad. Deben considerarse artículos de alto *riesgo* puesto que están en contacto directo con los *animales acuáticos* o sus *productos* (por ejemplo, sangre, *animales acuáticos* enfermos). Además, la necesidad de transportarlos de un lugar a otro los transforma en fómites potenciales, susceptibles de propagar los *agentes patógenos*. En el caso del transporte de *animales acuáticos* vivos, los *contenedores* pueden poseer sistemas de tuberías y bombeo, al igual que espacios confinados que también deberán desinfectarse.

Se deberá sacar toda el agua del *contenedor* y se removerán los *animales acuáticos*, las materias fecales y todo material orgánico por medio de un enjuague con inyección de agua limpia y se eliminarán de manera biológicamente segura. Todas las tuberías y bombas asociadas deberán inspeccionarse y enjuagarse. Los *contenedores* se deberán lavar con detergentes químicos apropiados, asociados a un lavado de alta presión o un cepillado mecánico.

Todas las superficies internas y externas de los *contenedores* deberán tratarse empleando un método de *desinfección* adecuado. Después se enjuagarán e inspeccionarán para garantizar la ausencia de residuos orgánicos, y se guardarán para facilitar que se escurran y sequen rápidamente.

8- Barcos

~~Todos los barcos deberán desinfectarse de manera rutinaria para evitar la transferencia de *agentes patógenos*. El nivel de contaminación de los barcos se determina en función de su uso. Los barcos utilizados para la recuperación de los *animales acuáticos* vivos o muertos en los sitios para *acuicultura* se deberán considerar con una alta probabilidad de contaminación. La materia orgánica deberá eliminarse regularmente de puentes y zonas de trabajo.~~

Anexo 6 (cont.)

~~El proceso de planificación de la *desinfección* deberá incluir una evaluación para identificar las áreas que se puedan contaminar tales como el interior y los alrededores de la maquinaria, los tanques, la sentina y la tubería. Todos los equipos desmontables se deberán retirar antes de la *desinfección*. Se han de elaborar procedimientos adicionales para los barcos vivero puesto que pueden transferir *agentes patógenos* durante la evacuación del agua contaminada. Las aguas efluentes contaminadas se desinfectarán antes de evacuarse (ver Artículo 4.3.11.).~~

~~Siempre que sea posible, los barcos deberán estar en dique seco para la *desinfección* con el fin de limitar la evacuación de aguas usadas en el entorno acuático y poder acceder al casco de la embarcación. Deberán eliminarse los organismos bioincrustantes que pueden actuar como *vectores* y *fómites*.~~

~~Cuando los barcos no pueden instalarse en dique seco, se elegirá el método de *desinfección* que genere menos vertidos de productos químicos tóxicos en el medio acuático. Se emplearán buzos para efectuar la inspección y limpieza del casco. Cuando sea necesario, los métodos mecánicos como la pulverización a alta presión o la limpieza con vapor se considerarán como una alternativa de la *desinfección* química para la limpieza de toda la línea de flotación. Se puede contemplar también la fumigación para las superficies importantes, siempre que las áreas puedan aislarse de forma adecuada.~~

89. Biofiltros

Los biofiltros utilizados en los sistemas de producción cerrados o semi cerrados constituyen un punto de control importante de las *enfermedades*. Los biofiltros están diseñados para hospedar colonias de bacterias benéficas, **utilizadas** para mejorar la calidad del agua. Las condiciones de mantenimiento de dichas bacterias también pueden favorecer la supervivencia de algunos *agentes patógenos* presentes. Normalmente, es imposible desinfectar los biofiltros sin destruir las bacterias benéficas. Por lo tanto, los problemas relativos a la calidad del agua deberán tomarse en cuenta durante la planificación de las estrategias de *desinfección* de los biofiltros.

En caso de *desinfección* de los biofiltros y de sus sustratos, es necesario vaciar el sistema, eliminar los residuos orgánicos y limpiar las superficies. La *desinfección* de los sistemas de biofiltros se puede realizar modificando los niveles de pH del agua (utilizando soluciones ácidas o alcalinas). Durante esta operación, los niveles de pH deberán ser suficientes como para inactivar el *agente patógeno* sin por ello ser corrosivo para las bombas y el equipo dentro del sistema de filtro. Como alternativa, es posible desmontar completamente el biofiltro, retirar el sustrato, limpiar los componentes y aplicar los *desinfectantes* por separado. Se recomienda este último procedimiento, para la respuesta a una situación de emergencia sanitaria. Se reemplazará el sustrato del biofiltro en caso de que no se pueda desinfectar eficazmente. Los sistemas de biofiltros se lavarán por completo antes de la reintroducción de los animales.

940. Equipos **necesarios** para la cría **y recolección**

En los *establecimientos de acuicultura* siempre hay una gran variedad de equipos que están en contacto directo con los *animales acuáticos* y actúan potencialmente como *fómites* (por ejemplo, seleccionadoras, sistemas automatizados de vacunación y bombas de peces).

Los principios generales descritos en el Artículo 4.3.4. se deberán aplicar a la *desinfección* de los equipos para la cría **y la recolección**. Se examinará cada objeto para identificar las partes que están en contacto directo con los *animales acuáticos* y las zonas de acumulación de material orgánico. Si es necesario, los equipos se desmontarán para facilitar la limpieza y la *desinfección* adecuadas.

Artículo 4.3.10.

Equipo individual

La *desinfección* del equipo individual deberá tener en cuenta el nivel la probabilidad y el grado de contaminación asociado con un uso previo. Si es posible, la utilización del equipo individual se reservará a un sitio específico para evitar al recurso sistemático a la *desinfección*.

El equipo elegido debe ser no absorbente y fácil de limpiar. Todo el personal que entre en la zona de producción deberá utilizar prendas de protección limpias y no contaminadas. A la entrada como a la salida de las zonas de producción, las botas se limpiarán y desinfectarán. En caso de utilización de pediluvios, es necesario prever un procedimiento de limpieza para eliminar la acumulación de material orgánico y barro, una profundidad suficiente para recubrir las botas, la utilización de una solución desinfectante que no se inactive por la materia orgánica y su renovación regular.

Cierto tipo de equipos individuales. Los equipos altamente contaminados como los equipos de buceo **requieren pueden requerir** una atención particular puesto que **son difíciles de desinfectar, se llevan de un lugar a otro y**, a menudo, son propensos a la corrosión química. Su enjuague frecuente constituirá una ayuda muy valiosa para reducir la acumulación de materia orgánica y para una mayor eficacia de la *desinfección*. Es necesario que el equipo se seque por completo y así limitar la aparición de microentornos húmedos, susceptibles de hospedar *agentes patógenos*.

Artículo 4.3.11.

Desinfección del agua

Los *establecimientos de acuicultura* pueden necesitar desinfectar el agua entrante y saliente para eliminar los *agentes patógenos*. El método de *desinfección* más apropiado dependerá del objetivo de la *desinfección* y de las características del agua que se va a desinfectar.

Antes de la aplicación de los *desinfectantes*, es esencial retirar los *animales acuáticos* y eliminar los sólidos en suspensión del agua que se va a tratar. Los agentes patógenos se caracterizan por adherir a la materia orgánica e inorgánica, la remoción de los sólidos en suspensión permite reducir en forma significativa la carga de *agentes patógenos* en el agua. Es posible eliminar los sólidos en suspensión mediante la filtración o la sedimentación de los materiales en suspensión. La elección del mejor sistema de filtración dependerá de la calidad inicial del agua, de los volúmenes que se filtrarán, los costos de inversión de capital y operativos además de su fiabilidad.

Los *desinfectantes* físicos (por ejemplo, la irradiación con rayos UV) y químicos (por ejemplo, el ozono, el cloro y el dióxido de cloro) se utilizan habitualmente para desinfectar el agua. Los sólidos en suspensión deben retirarse antes de la aplicación de dichos *desinfectantes* puesto que la materia orgánica es susceptible de inhibir el proceso de oxidación y los sólidos en suspensión inhiben la transmisión de rayos UV y reducen la eficacia de la irradiación ~~protegiendo a los agentes patógenos~~. Una combinación de los métodos puede resultar benéfica cuando actúan de forma sinérgica o cuando es necesario repetir las operaciones.

Resulta esencial controlar la eficacia de la *desinfección* del agua, lo que se puede lograr directamente a partir de muestras de *agentes patógenos* de interés, o indirectamente mediante la búsqueda de organismos indicadores o el control de los niveles de las concentraciones residuales de los *desinfectantes*.

La gestión de los residuos químicos es importante para evitar efectos tóxicos en los *animales acuáticos*. Por ejemplo, los residuos formados entre el ozono y el agua de mar, como los compuestos de bromuro son tóxicos en las etapas de desarrollo precoz de los *animales acuáticos* y pueden eliminarse con un filtro de carbón. El cloro residual deberá eliminarse del agua mediante la desactivación química o la liberación de gases residuales.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 4.4.

RECOMENDACIONES PARA LA DESINFECCIÓN DE LA SUPERFICIE DE HUEVOS DE SALMÓNIDOS

Artículo 4.4.1.

Introducción

La práctica de *desinfección* de los *huevos* de salmónidos en los criaderos resulta fundamental para garantizar que ~~las enfermedades endémicas~~ los agentes patógenos no se transfieran entre incubadoras ni entre instalaciones, y forma parte integrante de los protocolos de higiene de rutina de los criaderos. El proceso de *desinfección* también es importante para el comercio internacional de cuando se comercializan *huevos* de salmónidos entre países, zonas o compartimentos, zonas o países para prevenir la transferencia de algunos *agentes patógenos*. Si bien el uso de *desinfectantes* suele ser eficaz para la *desinfección* de la superficie del *huevo* y de los fluidos de reproducción, no previene la transmisión vertical.

Los *huevos* de salmónidos se pueden desinfectar utilizando un cierto número de agentes químicos; sin embargo, el método más comúnmente utilizado es la *desinfección* con povidona yodada, un producto a base de yodo.

Los iodóforos, comúnmente soluciones de povidona yodada, tienen la ventaja de suministrar un pH neutro, no ser irritantes y ser relativamente poco tóxicos. El pH neutro es importante para minimizar la toxicidad y lograr una mayor eficacia. Se recomienda seguir las instrucciones del fabricante con el fin de identificar las circunstancias en las que el pH sea motivo de preocupación. Si se utilizan otros agentes con contenido de yodo para la *desinfección*, es esencial que hayan sido adecuadamente tamponados.

Artículo 4.4.2.

Protocolo de desinfección para los huevos de salmónidos

Este protocolo de *desinfección* se puede aplicar a los *huevos* de salmónidos recientemente fertilizados o embrionados. Sin embargo, los *huevos* recientemente fertilizados deben haber iniciado su endurecimiento antes de someterse al protocolo de *desinfección*. Si bien existe un margen de seguridad considerable para los *huevos* endurecidos, el protocolo de *desinfección* no se recomienda para los óvulos no fertilizados o durante la fertilización. Es esencial que el pH de la solución yodada se mantenga entre 6 y 8.

Para desinfectar los *huevos* de salmónidos se deberá seguir el siguiente protocolo de *desinfección*:

- 1) enjuague con una solución salina ~~al~~ del 0,9% al 1,1% libre de agentes patógenos (30-60 segundos) para remover los restos de material orgánico;
- 2) inmersión en una solución yodada de 100 ppm de yodo disponible durante un mínimo de 10 minutos. ~~La Se ha de hacer el seguimiento de la concentración solución~~ La Se ha de hacer el seguimiento de la concentración solución yodada con el fin de asegurarse que se mantienen los niveles de eficacia. ~~se debe utilizar sólo una vez.~~ La proporción de *huevos* respecto a la solución yodada deberá ser como **mínimo máximo** de 1:4;
- 3) nuevo enjuague en una solución salina ~~al~~ del 0,9% al 1,1% libre de agentes patógenos durante 30-60 segundos;
- 4) mantenimiento en agua libre de agentes patógenos.

Todas las soluciones de enjuague y *desinfección* deberán prepararse usando agua libre de agentes patógenos. Las soluciones podrán tamponarse con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) si el pH es bajo.

— Texto suprimido.

CAPITULO 5.1.

OBLIGACIONES GENERALES EN MATERIA DE CERTIFICACIÓN

[...]

Artículo 5.1.4.

Responsabilidades en caso de incidente relacionado con una importación

1. El *comercio internacional* implica una responsabilidad ética permanente. Por consiguiente, si dentro de un periodo razonable con posterioridad a una exportación, la *autoridad competente* tiene conocimiento de que ha aparecido o reaparecido una *enfermedad* expresamente mencionada en el *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, o cualquier otra *enfermedad* que revista importancia epidemiológica para el *país importador*, dicha *autoridad competente* tendrá la obligación de notificar el caso al *país importador*, para que las *mercancías* importadas puedan ser inspeccionadas o sometidas a pruebas y se adopten las medidas pertinentes para limitar la propagación de la *enfermedad* si ha sido introducida inadvertidamente.
2. Si aparece una *enfermedad* en los *animales acuáticos* ~~en el país importador~~ asociada con la importación de *mercancías*, deberá notificarse el hecho a la *autoridad competente* del *país exportador* para que pueda efectuar una investigación, ya que puede tratarse de la primera información disponible relativa a la aparición de la *enfermedad* en una población de *animales acuáticos* anteriormente libre de la misma. La *autoridad competente* del ~~país exportador~~ deberá informar al país importador deberá ser informada del resultado de la investigación pues puede que el origen de la *infección* no esté en el *país exportador*.
3. En caso de que se tengan motivos para sospechar la falsificación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, las *autoridades competentes* del *país importador* y del *país exportador* procederán a una investigación. También se notificará la sospecha a cualquier tercer país concernido. Todas las remesas relacionadas con el certificado deberán permanecer bajo control oficial hasta que se conozca el resultado de la investigación. Las *autoridades competentes* de todos los países concernidos deberán colaborar en la investigación. Si el *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* resulta ser falso, se hará todo lo posible por identificar a los responsables y tomar las medidas previstas por la legislación pertinente.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.1.

INFECCIÓN POR APHANOMYCES ASTACI (PLAGA DEL CANGREJO DE RÍO)

Artículo 9.1.1.

A efectos del Código Acuático, ~~la plaga del cangrejo de río es la infección debida a por~~ *Aphanomyces astaci* es la infección por el agente patógeno *Aphanomyces astaci* Schikora, de la familia de los Leptolegniaceae. Este organismo forma parte y del filo Oomycota de la clase oomycetes grupo conocido con el nombre de (hongos acuáticos) (oomicetos). La enfermedad se conoce comúnmente como plaga del cangrejo del río. Los sinónimos generalmente empleados para designar esta infección figuran en el capítulo correspondiente del Manual Acuático.

La información sobre los métodos de diagnóstico figura en el Manual Acuático.

Artículo 9.1.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a todas las especies de cangrejos que pertenecen a las tres familias Cambaridae, Astacidae y Parastacidae. Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el Manual Acuático que sean objeto de comercio internacional.

Artículo 9.1.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la infección por *A. astaci* no declarados libres de plaga del cangrejo de río

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *A. astaci* esta enfermedad cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de los siguientes productos de animales acuáticos derivados de para las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2. siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.
 - a) productos de cangrejo termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *A. astaci*);
 - b) productos de cangrejo cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante al menos un minuto (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *A. astaci*);
 - c) productos de cangrejo pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *A. astaci*);
 - d) productos de cangrejo congelados que se hayan sometido a temperaturas de -20 °C o inferiores durante al menos 72 horas;
 - e) aceite de cangrejo de río;
 - f) harina de cangrejo de río;
 - g) quitina extraída por medios químicos.

Anexo 9 (cont.)

- 2) Las *autoridades competentes* deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.1.7. a 9.1.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de cualesquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de relacionados con las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.1.3.
- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su *territorio* de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.1.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de transmisión de la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río. La *autoridad competente* del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis. ~~la evaluación.~~

Artículo 9.1.4.

País libre de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta *infección* (véase el Artículo 9.1.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.1.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.1.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por *A. astaci* enfermedad durante, por lo menos, los 25 últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los 10 últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por *A. astaci* enfermedad antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los cinco últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los cinco últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río;

O
- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río y perdió posteriormente su estatus libre de enfermedad por haberse detectado la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado *A. astaci* la enfermedad, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de transmisión de *A. astaci* de propagación de la enfermedad y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y

- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por *A. astaci* la enfermedad, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los cinco últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona libre*, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.1.5.

Artículo 9.1.5.

Zona o compartimento libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(s) *autoridad(es) competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.1.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.1.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por *A. astaci* enfermedad durante, por lo menos, los 25 últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los 10 últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por *A. astaci* enfermedad antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los cinco últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los cinco últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río;

O
- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río y perdió posteriormente su estatus libre de enfermedad por haberse detectado la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado *A. astaci* la enfermedad, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión de *A. astaci* de propagación de la enfermedad y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y

Anexo 9 (cont.)

- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por *A. astaci* enfermedad, y
- d) se ha ~~aplicado~~ una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los cinco últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río.

Artículo 9.1.6.

Conservación del estatus libre de país, zona o compartimento libres de plaga del cangrejo de río

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.1.4. ó 9.1.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de infección por *A. astaci* esta enfermedad si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.1.4. ó 9.1.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de esta enfermedad si reúnen condiciones propicias para su la manifestación clínica de la infección por *A. astaci*, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *enfermedad*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.1.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río

Cuando se importen *animales acuáticos* y de las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2., o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, la *autoridad competente* del *país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente* del *país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*,²³ El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.1.4. ó 9.1.5. (según proceda) y 9.1.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río.

El *certificado sanitario internacional para los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las *mercaderías productos de animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.1.3.

Artículo 9.1.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río

4) Cuando se importen, para la acuicultura, ~~para la acuicultura~~, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados ~~2)1 y 3) 2~~ que figuran a continuación.

12) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos*, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos a instalaciones de cuarentena donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y

- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar *A. astaci* (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7 y 5.5.).

Q

- 2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

2) 3) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la acuicultura, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del Código Acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: http://www.ices.dk/publications/our_publications/Pages/Miscellaneous.aspx) son los siguientes:

a) en el país exportador.

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la infección por *A. astaci*;

b) en el país importador.

- i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
ii) examinar la población (F-0) para *A. astaci* de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por *A. astaci* (según se describe en el Capítulo 2.2.1. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección de *A. astaci* de conformidad con el Capítulo 1.4.;
v) si no se detecta *A. astaci*, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por *A. astaci* y liberada de la cuarentena;
vi) si se detecta *A. astaci* en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.
- a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;
b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;
c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia de *A. astaci* y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;
d) importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);
e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;
f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia de *A. astaci* y de parásitos y para determinar su estado general de salud;
g) si no se detecta la presencia de *A. astaci* ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río o del agente patógeno específico de esta enfermedad;
h) liberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.

Anexo 9 (cont.)

- 4) ~~Con respecto al apartado 3 o, las condiciones de *cuarentena* deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de *cuarentena* no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de *infección* bajo.~~

~~Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.1.3.~~

Artículo 9.1.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por *A. astaci* ~~plaga del cangrejo de río~~

Quando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2. y o *productos de animales acuáticos* de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de ~~*infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río*~~, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su procesamiento su transformación en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.1.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 9.1.11. o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de *A. astaci*; o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5. de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de *A. astaci* o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.

En lo que se refiere a estos *animales acuáticos o productos de animales acuáticos* as *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.1.10.

Importación de animales acuáticos o productos de animales acuáticos vivos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación o ~~a un~~ el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de *infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río*

Quando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, de investigación o farmacéutico, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2. o los productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de ~~*infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río*~~, la *autoridad competente* del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos para su sacrificio y hasta transformación en uno de los productos referidos en el apartado 1 del Artículo 9.1.3. u otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de *A. astaci*; o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5. de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de *A. astaci* o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.

~~Este artículo no se aplica a las *mercancías* enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.1.3.~~

Artículo 9.1.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos ~~de un país, una zona o un compartimento no declarados libres~~ independientemente de su estatus sanitario del país, zona o compartimento de exportación con respecto a la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *A. astaci* esta enfermedad, cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de las siguientes mercancías productos de animales acuáticos que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.:
 - ninguna mercancías producto de animales acuáticos mencionadoa.
- 2) Cuando se importen animales acuáticos y o productos de animales acuáticos, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.1.2. de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por *A. astaci* plaga del cangrejo de río, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.2.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA CABEZA AMARILLA GENOTIPO 1

Artículo 9.2.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 es la *infección* causada por el agente patógeno del genotipo 1 del virus de la cabeza amarilla, del género *Okavirus*, de la familia de los *Rodiviridae* y del orden de los *Nidovirales*, de la familia *Rodiviridae* y del género *Okavirus* de la familia *Rodiviridae* y en el orden de los *Nidovirales*.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.2.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5. para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5. camarón jinga (*Metapenaeus affinis*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón de coral (*Palaemonetes pugio*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*) y camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*). ~~camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*), camarón de coral (*Palaemonetes pugio*) y camarón jinga (*Metapenaeus affinis*).~~

Artículo 9.2.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con esta infección el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de los siguientes *productos de animales acuáticos* para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la cabeza amarilla genotipo 1);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 60 °C durante al menos 15 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la cabeza amarilla genotipo 1);
 - c) productos de crustáceos pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante al menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la cabeza amarilla genotipo 1);
 - d) aceite de crustáceos;
 - e) *harina* de crustáceos;
 - f) quitina extraída por medios químicos.
- 2) Las *autoridades competentes* deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.2.7. a 9.2.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de cualesquiera animales acuáticos o y productos de animales acuáticos relacionados con derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.2.3.

Anexo 10 (cont.)

- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos o y productos de animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.2.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de ~~infección por el~~ transmisión del virus de la cabeza amarilla genotipo 1. La *autoridad competente* del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis ~~la evaluación~~.

Artículo 9.2.4.

País libre de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta ~~infección~~ enfermedad (véase el Artículo 9.2.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.2.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.2.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) no se ha observado la presencia de la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
- b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
- b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del ~~infección por el~~ virus de la cabeza amarilla genotipo 1;

O

- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado ~~la infección por~~ el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) nada más haberse detectado la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
- b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas~~ dentro de la zona infectada se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo la probabilidad de una mayor transmisión propagación del ~~enfermedad~~ virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del virus de la cabeza amarilla genotipo 1.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona libre*, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.2.5.

Artículo 9.2.5.

Zona o compartimento libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la *autoridad competente* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.2.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.2.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de ~~la infección por~~ el virus de la cabeza amarilla genotipo 1;

O
- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la cabeza amarilla y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado ~~la infección por~~ el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado ~~la enfermedad~~ el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas~~ dentro de la zona infectada se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo la probabilidad de una mayor transmisión propagación de la enfermedad del virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la ~~enfermedad~~ infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del virus de la cabeza amarilla genotipo 1.

Anexo 10 (cont.)

Artículo 9.2.6.

Conservación del estatus libre

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.2.4. ó 9.2.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de esta *infección* si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.2.4. ó 9.2.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de esta *infección* si reúnen condiciones propicias para su manifestación clínica, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *infección*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.2.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2. y o productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, la *autoridad competente* del *país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente* del *país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*, ~~que~~. El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá acreditar acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.2.4. ó 9.2.5. (según proceda) y 9.2.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1.

El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a ~~las mercancías~~ productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.2.3.

Artículo 9.2.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1

4) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y ~~aplicar, si se justifican,~~ las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del *riesgo* de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.

21) Si la intención es el crecimiento y cría de *animales acuáticos importados*, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de ~~la remesa~~ los *animales acuáticos importados* a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y: a instalaciones biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local; y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, ~~de los equipos,~~ de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación del con el fin de inactivar el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (de conformidad con el los Capítulo 4.3., 4.7. y 5.5).

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del ~~Código Acuático~~, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son las siguientes:

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus *animales acuáticos*;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de *animales acuáticos* con un alto estatus sanitario para la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1;

b) en el país importador:

- i) importar la población F-0 a instalaciones de *cuarentena*;
- ii) examinar la población (F-0) para el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
- iii) producir una población de primera generación (F-1) en *cuarentena*;
- iv) criar la población F-1 en *cuarentena* bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (según se describe en el Capítulo 2.2.2 del *Manual Acuático*) y realizar pruebas para el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 de conformidad con el Capítulo 1.4.;
- v) si no se detecta el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, la población F-1 puede ser definida libre de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y liberada de la *cuarentena*;
- vi) si se detecta el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de la *cuarentena* y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.

a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;

b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;

c) ~~tomar y examinar muestras para detectar la presencia del virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;~~

d) ~~importar y mantener en *cuarentena*, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);~~

e) ~~producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en *cuarentena*;~~

f) ~~criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia del virus de la cabeza amarilla genotipo 1 y de parásitos y para determinar su estado general de salud;~~

g) ~~si no se detecta la presencia del virus de la cabeza amarilla genotipo 1 ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las *condiciones elementales de bioseguridad* requeridas por el país, la zona o el *compartimento* de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 o del agente patógeno específico de esta *infección*;~~

h) ~~liberar de la *cuarentena* la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el *compartimento* para fines de *acuicultura* o de repoblación.~~

4) Con respecto al apartado 3 e), las condiciones de *cuarentena* deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de *cuarentena* no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de *infección* bajo.

Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.2.3.

Anexo 10 (cont.)

Artículo 9.2.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos ~~o y~~ productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2. ~~y, o~~ *productos de animales acuáticos* ~~derivados de estas especies, provenientes de~~ un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su ~~transformación~~ **procesamiento** en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.2.3. ~~o en productos descritos~~ en el apartado 1 del Artículo 9.2.11. ~~o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y~~
- 2) tratamiento del agua y todos los contenedores ~~utilizados~~ **utilizados** para el transporte ~~utilizada para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación~~ de modo que garantice la inactivación del virus de la cabeza amarilla genotipo 1, ~~o la eliminación de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles biosegura~~ **de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y**
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la cabeza amarilla genotipo 1 o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.**

En lo que se refiere a ~~estas mercancías~~ **estos animales acuáticos o productos de animales acuáticos**, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ~~ellas ellos~~ para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.2.10.

Importación de animales acuáticos ~~vivos~~ **o productos de animales acuáticos destinados a **usos distintos del consumo humano incluyendo** la alimentación de los animales, **la investigación o a un el** uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1**

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, ~~de investigación o farmacéutico,~~ *animales acuáticos* ~~vivos~~ de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2., ~~o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes~~ de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, la *autoridad competente* del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos ~~para su sacrificio y hasta~~ transformación en ~~uno de los~~ productos ~~referidos en el apartado 1 del Artículo 9.2.3. u otros productos~~ autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) el tratamiento del agua y todos los contenedores ~~utilizados~~ **utilizados** para el transporte ~~y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo~~ que garantice la inactivación del virus de la cabeza amarilla genotipo 1, ~~o la eliminación biosegura~~ **de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y**
- 3) el tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la cabeza amarilla genotipo 1 o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.**

~~Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.2.3.~~

Artículo 9.2.11.

Importación ~~(o tránsito)~~, para venta directa al por menor para el consumo humano, de ~~animales acuáticos y o~~ productos de animales acuáticos ~~de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de~~ **independientemente del estatus sanitario del un país, una la zona o un el compartimento **de exportación con respecto** a la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1**

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, cuando autoricen la importación ~~(o el tránsito)~~ por su *territorio* de camarones o crustáceos decápodos congelados y pelados (sin caparazón, ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen animales acuáticos y o *productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.2.2. de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.3.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA NECROSIS HIPODÉRMICA Y HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA

Artículo 9.3.1.

A efectos del Código Acuático, la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa es la infección por el agente patógeno del debida al virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa del género *Brevidensovirus* y de la familia de los Parvoviridos, género *Brevidensovirus*. Este virus está clasificado en la especie *Penaeus stylirostris densovirus*, del género *Brevidensovirus* y de la familia de los *Parvoviridos*.

† La información sobre los métodos de diagnóstico de esta enfermedad figura en el Manual Acuático.

Artículo 9.3.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5. para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: camarón gigante (*Macrobrachium rosenbergii*), camarón patiamarillo (*Penaeus californiensis*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón blanco norteno (*Penaeus setiferus*), camarón azul (*Penaeus stylirostris*) y camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*), y camarón azul (*P. stylirostris*), camarón patiamarillo (*P. californiensis*), camarón tigre gigante (*Penaeus monodon*), camarón patiblanco (*P. vannamei*), y camarón azul (*P. stylirostris*), camarón patiamarillo (*P. californiensis*), camarón blanco norteno (*P. setiferus*) y camarón gigante (*Macrobrachium rosenbergii*). Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el Manual Acuático que sean objeto de comercio internacional.

Artículo 9.3.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con esta enfermedad el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de los siguientes productos de animales acuáticos para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante al menos 20 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa);
 - c) aceite de crustáceos;
 - d) harina de crustáceos.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.3.7. a 9.3.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.3.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un análisis del riesgo acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.3.2. pero que se considere que podría plantear un riesgo de propagación de la transmisión del infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa. La autoridad competente del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis. la evaluación.

Anexo 11 (cont.)

Artículo 9.3.4.

País libre de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~esta enfermedad~~ (véase el Artículo 9.3.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.3.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.3.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~la enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~la enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa;

O
- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado ~~la infección por el virus de la~~ infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el ~~riesgo~~ la probabilidad de una mayor transmisión en medios que reducen al mínimo el riesgo ~~la probabilidad de propagación del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa~~ la enfermedad y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación ~~de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa~~ la enfermedad, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona* libre, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.3.5.

Artículo 9.3.5.

Zona o compartimento libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(s) *autoridad(es) competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.3.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.3.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~la enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa;

O
- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y perdió posteriormente su estatus libre de ~~enfermedad~~ por haberse detectado el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~enfermedad~~ y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~la enfermedad~~, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de el virus de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa.

Anexo 11 (cont.)

Artículo 9.3.6.

Conservación del estatus libre de país, zona o compartimento libres de necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.3.4. ó 9.3.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa esta enfermedad si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.3.4. ó 9.3.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres ~~de esta enfermedad~~ si reúnen condiciones propicias para ~~su~~ la manifestación clínica de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *enfermedad*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.3.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2. y o *productos de animales acuáticos* derivados de estas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la *autoridad competente* del país importador deberá exigir la presentación de un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos, extendido por la *autoridad competente* del país exportador o por un *certificador oficial* aprobado por el país importador. El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.3.4. ó 9.3.5. (según proceda) y 9.3.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o* *productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa.

El *certificado* sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las mercancías los animales acuáticos y productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.3.3.

Artículo 9.3.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

1) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos* vivos de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, ~~las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.~~

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos* importados, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos ~~de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5.).~~

Q

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la acuicultura, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del Código Acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa;

b) en el país importador:

- i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
- ii) examinar la población (F-0) para el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
- iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
- iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (según se describe en el Capítulo 2.2.3. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa de conformidad con el Capítulo 1.4.;
- v) si no se detecta el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y liberada de la cuarentena;
- vi) si se detecta el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.

- a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;
- b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;
- c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;
- d) importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);
- e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;
- f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa y de parásitos y para determinar su estado general de salud;
- g) si no se detecta la presencia del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa o del agente patógeno específico de esta enfermedad;
- h) liberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.

4) Con respecto al apartado 3 e), las condiciones de cuarentena deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de cuarentena no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de infección bajo.

Este artículo no se aplica a los animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.3.3.

Anexo 11 (cont.)

Artículo 9.3.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos ~~y o~~ productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2. ~~y o~~ *productos de animales acuáticos* derivados de estas especies, provenientes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su transformación su procesamiento en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.3.3. ~~o en productos descritos~~ en el apartado 1 del Artículo 9.3.11. ~~o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y~~
- 2) tratamiento del agua y todos los contenedores ~~utilizados-utilizada~~ para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, o la eliminación ~~de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles.~~ biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

En lo que se refiere a ~~estas mercancías~~ estas animales acuáticos o productos de animales acuáticos, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ~~ellas ellos~~ para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.3.10.

Importación de animales acuáticos ~~vivos o~~ productos de animales acuáticos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación o a un el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, de investigación o farmacéutico, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2. ~~o~~ productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la *autoridad competente* del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos para su sacrificio y hasta su transformación en uno de los productos referidos en el apartado 1 del Artículo 9.4.3. u otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) el tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo que garantice la inactivación del virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.

~~Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.3.3.~~

Artículo 9.3.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento independientemente del su estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa esta enfermedad, cuando autoricen la importación (o el tránsito) por su *territorio* de camarones congelados y pelados (sin caparazón, ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Anexo 11 (cont.)

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen ~~animales acuáticos y e~~ *productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.3.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.4.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA MIONECROSIS INFECCIOSA

Artículo 9.4.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa es la ~~infección debida a~~ por el agente patógeno del virus de la mionecrosis infecciosa. Este virus que se asemeja a miembros de la familia de los Totiviridos (clasificación provisional).

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.4.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5. para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: camarón tigre marrón (*Penaeus esculentus*), camarón banana (*Penaeus merguensis*), y camarón patiblanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*). ~~Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el Manual Acuático que sean objeto de comercio internacional.~~

Artículo 9.4.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación no declarados libres de con respecto a la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con ~~esta enfermedad el virus de la mionecrosis infecciosa~~ cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de los siguientes *productos de animales acuáticos* para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121°C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la mionecrosis infecciosa);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante al menos tres minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la mionecrosis infecciosa);
 - c) aceite de crustáceos;
 - d) *harina* de crustáceos;
 - e) quitina extraída por medios químicos.
- 2) Las *autoridades competentes* deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.4.7. a 9.4.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de cualesquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.4.3.
- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su *territorio* de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.4.2. pero que se considere que podría plantear un *riesgo* de ~~propagación de transmisión del infección por el virus de la mionecrosis infecciosa~~. La *autoridad competente* del *país exportador* deberá ser informada del resultado de este análisis. ~~la evaluación.~~

Anexo 12 (cont.)

Artículo 9.4.4.

País libre de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa ~~esta enfermedad~~ (véase el Artículo 9.4.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.4.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.4.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del infección por virus de la mionecrosis infecciosa;

O
- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado el virus de la mionecrosis infecciosa, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado el virus de la mionecrosis infecciosa ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de propagación~~ enfermedad del virus de la mionecrosis infecciosa y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa ~~la enfermedad~~, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del infección por el virus de la mionecrosis infecciosa.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona libre*, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.4.5.

Artículo 9.4.5.

Zona o compartimento libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(s) *autoridad(es) competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.4.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.4.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa;

O
- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa y perdió posteriormente su estatus libre de ~~enfermedad~~ por haberse detectado la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado el virus de la mionecrosis infecciosa ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo~~ la probabilidad de una mayor transmisión del virus de la mionecrosis infecciosa ~~enfermedad~~ y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación ~~de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa~~ de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa ~~de la enfermedad~~; y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del infección por el virus de la mionecrosis infecciosa.

Anexo 12 (cont.)

Artículo 9.4.6.

Conservación del estatus libre de país, zona o compartimento libres de mionecrosis infecciosa

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.4.4. ó 9.4.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa ~~esta enfermedad~~ si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.4.4. ó 9.4.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de ~~esta enfermedad~~ si reúnen condiciones propicias para su manifestación clínica, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *enfermedad*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.4.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2. y o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, la *autoridad competente* del *país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente* del *país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*; El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.4.4. ó 9.4.5. (según proceda) y 9.4.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa.

El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las mercancías los productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.4.3.

Artículo 9.4.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos ~~vivos~~ de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de mionecrosis infecciosa

1) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de animales acuáticos importados, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos ~~de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar el~~ virus de la mionecrosis infecciosa (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5.).

Q

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

- 2) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la acuicultura, se tendrá en cuenta lo siguiente:-A efectos del Código Acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:
- a) en el país exportador:
 - i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
 - ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa;
 - b) en el país importador:
 - i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
 - ii) examinar la población (F-0) para el virus de la mionecrosis infecciosa de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
 - iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
 - iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa (según se describe en el Capítulo 2.2.4. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección del virus de la mionecrosis infecciosa de conformidad con el Capítulo 1.4.;
 - v) si no se detecta el virus de la mionecrosis infecciosa, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa y liberada de la cuarentena;
 - vi) si se detecta el virus de la mionecrosis infecciosa en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.
- a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;
 - b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;
 - c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia del virus de la mionecrosis infecciosa y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;
 - d) importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);
 - e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;
 - f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia del virus de la mionecrosis infecciosa y de parásitos y para determinar su estado general de salud;
 - g) si no se detecta la presencia del virus de la mionecrosis infecciosa ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de mionecrosis infecciosa o del agente patógeno específico de esta enfermedad;
 - h) liberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.
- 4) Con respecto al apartado 3 o, las condiciones de cuarentena deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de cuarentena no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de infección bajo.

Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.4.3.

Artículo 9.4.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2. y o *productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes de* un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su transformación su procesamiento en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.4.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 9.4.11. o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y

Anexo 12 (cont.)

- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la mionecrosis infecciosa, o la eliminación de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles. biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la mionecrosis infecciosa o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

En lo que se refiere a estas mercancías estos animales acuáticos o productos de animales acuáticos, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas ellos para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.4.10.

Importación de animales acuáticos vivos o productos de animales acuáticos vivos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación o a un el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, de investigación o farmacéutico, animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2., o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, la *autoridad competente* del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos para su sacrificio y hasta su transformación en uno de los productos referidos en el apartado 1 del Artículo 9.4.3. u otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) el tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo que garantice la inactivación del virus de la mionecrosis infecciosa o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la mionecrosis infecciosa o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.4.3.

Artículo 9.4.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento independientemente del su estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el virus de la mionecrosis infecciosa esta enfermedad, cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de camarones congelados y pelados (sin caparazón, ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen ~~animales acuáticos y o~~ productos de animales acuáticos, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, ~~derivados de~~ las especies mencionadas en el Artículo 9.4.2. de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus de la mionecrosis infecciosa, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.5.

**INFECCIÓN POR HEPATOBACTER PENAEI
(HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE)**

Artículo 9.5.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por *Hepatobacter penaei* hepatopancreatitis necrotizante es la infección por el agente patógeno *Candidatus Hepatobacter penaei*. Esta una bacteria intracelular obligada pertenece a de la orden de las Proteobacterias. La enfermedad se conoce comúnmente como hepatopancreatitis necrotizante.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.5.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5. para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5. camarón patiblanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*), camarón azul (*P. stylirostris*), camarón blanco del norte (*P. setiferus*) y camarón pardo del norte (*P. aztecus*). Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el *Manual Acuático* que sean objeto de *comercio internacional*.

Artículo 9.5.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la infección por *H. penaei* no declarados libres de hepatopancreatitis necrotizante

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con *H. penaei* esta enfermedad cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de los siguientes productos de animales acuáticos para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *Candidatus Hepatobacter penaei*);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante al menos tres minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva *Candidatus Hepatobacter penaei*);
 - c) productos de crustáceos pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico de 63 °C durante al menos 30 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado inactivar *Candidatus H.epatobacter penaei*);
 - d) aceite de crustáceos;
 - e) *harina* de crustáceos;
 - f) quitina extraída por medios químicos.
- 2) Las *autoridades competentes* deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.5.7. a 9.5.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por *H. penaei* la hepatopancreatitis necrotizante cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de cualesquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.5.3.

Anexo 13 (cont.)

- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de ~~animales acuáticos y a~~ animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.5.2. pero que se considere que podría plantear un ~~riesgo de propagación de transmisión de la infección por *H. penaei* la hepatopancreatitis necrotizante.~~ La *autoridad competente* del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis. la evaluación.

Artículo 9.5.4.

País libre de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta *enfermedad* (véase el Artículo 9.5.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.5.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.5.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por *H. penaei* esta enfermedad durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por *H. penaei* esta enfermedad antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante;

O
- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante y perdió posteriormente su estatus libre de enfermedad por haberse detectado *H. penaei*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado *H. penaei* la enfermedad, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión de *H. penaei* de propagación de la enfermedad y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por *H. penaei* la enfermedad, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona* libre, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.5.5.

Artículo 9.5.5.

Zona o compartimento libres de infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~ si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~ podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(~~s~~) *autoridad*(~~es~~) *competente*(~~s~~) de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.5.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.5.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por *H. penaei* ~~la enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
 - 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por *H. penaei* ~~la enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~;

O
 - 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~ y perdió posteriormente su estatus libre de ~~enfermedad~~ por haberse detectado la infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~ en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado *H. penaei* ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión de *H. penaei* de propagación de la enfermedad y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por *H. penaei* ~~la enfermedad~~, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por *H. penaei* ~~hepatopancreatitis necrotizante~~.

Anexo 13 (cont.)

Artículo 9.5.6.

Conservación del estatus libre de país, zona o compartimento libres de hepatopancreatitis necrotizante

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.5.4. ó 9.5.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de infección por *H. penaei* esta enfermedad si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.5.4. ó 9.5.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de esta enfermedad si reúnen condiciones propicias para su la manifestación clínica de la infección por *H. penaei*, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *enfermedad*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.5.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2. y o *productos de animales acuáticos* derivados de estas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante, la *autoridad competente del país importador* deberá exigir la presentación de un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos, extendido por la *autoridad competente del país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*; El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.5.4. ó 9.5.5. (según proceda) y 9.5.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante.

El certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las mercancías los productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.5.3.

Artículo 9.5.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante

1) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos importados*, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar *Candidatus H. penaei* (de conformidad con el los Capítulos 4.3, 4.7 y 5.5.).

Q

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del Código Acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la infección por *H. penaei*;

b) en el país importador:

- i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
- ii) examinar la población (F-0) para *H. penaei* de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
- iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
- iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por *H. penaei* (según se describe en el Capítulo 2.2.5. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección de *H. penaei* de conformidad con el Capítulo 1.4.;
- v) si no se detecta *H. penaei*, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por *H. penaei* y liberada de la cuarentena;
- vi) si se detecta *H. penaei* en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.

a) ~~identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;~~

b) ~~evaluar el historial sanitario de las poblaciones;~~

c) ~~tomar y examinar muestras para detectar la presencia de *Candidatus Hepatobacter penaei* y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;~~

d) ~~importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);~~

e) ~~producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;~~

f) ~~criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia de *Candidatus Hepatobacter penaei* y de parásitos y para determinar su estado general de salud;~~

g) ~~si no se detecta la presencia de *Candidatus Hepatobacter penaei* ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante o del agente patógeno específico de esta enfermedad;~~

h) ~~liberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.~~

4) ~~Con respecto al apartado 3 e, las condiciones de cuarentena deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de cuarentena no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de infección bajo.~~

~~Este artículo no se aplica a los animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.5.3.~~

Anexo 13 (cont.)

Artículo 9.5.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2. y o *productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes* de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de *infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante*, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su *transformación procesamiento* en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.5.3. o en *productos descritos en* el apartado 1 del Artículo 9.5.11. o en otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) tratamiento del agua *utilizada* y todos los contenedores *utilizados* para el transporte *y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación* de modo que garantice la inactivación de *Candidatus *H. hepatobacter penaei**; o *la eliminación de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y*
- 3) *tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de *H. penaei* o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.*

En lo que se refiere a *estas mercancías estos animales acuáticos o productos de animales acuáticos*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de *ellas estos* para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.5.10.

Importación de animales acuáticos vivos o productos de animales acuáticos vivos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, *la investigación o a un el* uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de *infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante*

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial o farmacéutico, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2., *o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes* de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de *infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante*, la *autoridad competente* del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos *para su sacrificio y hasta su* transformación en *uno de los* productos *referidos en el apartado 1 del Artículo 9.5.3. u otros productos* autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) *el tratamiento del agua utilizada* y todos los contenedores *utilizados* para el transporte *y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo* que garantice la inactivación de *Candidatus *H. hepatobacter penaei* o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.*

Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.5.3.

Artículo 9.5.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres independientemente del su estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el *compartimento* de exportación respecto de la *infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante*, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con **H. penaei* esta enfermedad*, cuando autoricen la importación (o el tránsito) por su *territorio* de camarones congelados y pelados (sin caparazón, ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen animales acuáticos y o *productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.5.2. de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por *H. penaei* hepatopancreatitis necrotizante, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.6.

**INFECCIÓN POR EL VIRUS
DEL SÍNDROME DE TAURA**

Artículo 9.6.1.

A efectos del Código Acuático, la infección por el virus del síndrome de Taura es la *infección* debida al virus del síndrome de Taura, un agente patógeno de la familia del género *Aparavirus*, de la familia de los *Dicistrovíridos* y del orden de los *Picornavirales*. Este virus pertenece a una especie clasificada en de la familia de los *Dicistrovíridos*. Los sinónimos generalmente empleados para designar esta enfermedad figuran en el capítulo correspondiente del Manual Acuático.

Información sobre los métodos de diagnóstico de esta enfermedad figura en el Manual Acuático.

Artículo 9.6.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5. para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: camarón resbaloso (*Metapenaeus ensis*), camarón café norteño (*P. aztecus*), camarón tigre gigante (*P. monodon*), camarón blanco del norte (*P. setiferus*), camarón azul (*P. stylirostris*), camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*), camarón blanco del Pacífico o camarón patiblanco (*Penaeus vannamei*), camarón azul (*P. stylirostris*), camarón blanco del norte (*P. setiferus*), camarón blanco del sur (*P. schmitti*), camarón resbaloso (*Metapenaeus ensis*), y langostino jumbo y camarón tigre gigante (*P. monodon*) y camarón café norteño (*P. aztecus*). Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el Manual Acuático que sean objeto de comercio internacional.

Artículo 9.6.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus no declarados libres del síndrome de Taura

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto a la infección por el virus del síndrome de Taura, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el virus del síndrome de Taura esta enfermedad cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de los siguientes productos de animales acuáticos para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado inactivar el virus del síndrome de Taura);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 70 °C durante al menos 30 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado inactivar el virus del síndrome de Taura);
 - c) productos de crustáceos pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante al menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado inactivar el virus del síndrome de Taura);
 - d) aceite de crustáceos;
 - e) harina de crustáceos;
 - f) quitina extraída por medios químicos.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.6.7. a 9.6.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por el virus del síndrome de Taura cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualesquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.6.3.

Anexo 14 (cont.)

- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de ~~animales acuáticos y o productos de animales acuáticos~~ derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.6.2. pero que se considere que podría plantear un ~~riesgo de propagación de transmisión la infección por del virus~~ del síndrome de Taura. La *autoridad competente* del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis. ~~la evaluación.~~

Artículo 9.6.4.

País libre de infección por el virus del síndrome de Taura

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome de Taura si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta *enfermedad* (véase el Artículo 9.6.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome de Taura si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.6.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.6.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por el virus del síndrome de Taura ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus del síndrome de Taura ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por del virus del síndrome de Taura;

O
- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome de Taura y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado el virus del síndrome de Taura, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado ~~la enfermedad el virus del síndrome de Taura~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo~~ la probabilidad de una mayor transmisión del virus del síndrome de Taura y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por el virus del síndrome de Taura ~~la enfermedad~~, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia ~~de infección por del virus del~~ del síndrome de Taura.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona* libre, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.6.5.

Artículo 9.6.5.

Zona o compartimento libres de infección por el virus del síndrome de Taura

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus del síndrome de Taura si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(s) *autoridad(es) competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.6.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.6.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) no se ha observado la presencia de la infección por el virus del síndrome de Taura ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
- b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus del síndrome de Taura ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
- b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del síndrome de Taura;

O

- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome de Taura y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado la infección por el virus del síndrome de Taura en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) nada más haberse detectado el virus del síndrome de Taura ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
- b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión del virus del síndrome de Taura de propagación de la enfermedad~~ y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por el virus del ~~síndrome de Taura~~ *enfermedad*, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia ~~de infección por~~ del virus del síndrome de Taura.

Artículo 9.6.6.

Conservación del estatus libre de país, zona o compartimento libres de síndrome de Taura

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.6.4. ó 9.6.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus del ~~síndrome de Taura~~ *esta enfermedad* si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Anexo 14 (cont.)

Un país, una zona o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.6.4. ó 9.6.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, zona o *compartimento* libres de esta enfermedad si reúnen condiciones propicias para ~~su~~ la manifestación clínica de la infección por el virus del síndrome de Taura, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las zonas o los *compartimentos* declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta enfermedad, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.6.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2. y o *productos de animales acuáticos* derivados de dichas especies, provenientes de un país, una zona o un *compartimento* declarados libres de síndrome de Taura, la *autoridad competente del país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente del país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*., El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.6.4. ó 9.6.5. (según proceda) y 9.6.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o productos de animales acuáticos* es un país, una zona o un *compartimento* declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura.

El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las mercancías los productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.6.3.

Artículo 9.6.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura

1) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2. de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos importados*, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar el virus del síndrome de Taura (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7 y 5.5).

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

O

32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del *Código Acuático*, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la infección por el virus del síndrome de Taura;

- b) en el país importador:
- i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
 - ii) examinar la población (F-0) para el virus del síndrome de Taura de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
 - iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
 - iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por el virus del síndrome de Taura (según se describe en el Capítulo 2.2.6. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección del virus del síndrome de Taura de conformidad con el Capítulo 1.4.;
 - v) si no se detecta el virus del síndrome de Taura, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por el virus del síndrome de Taura y liberada de la cuarentena;
 - vi) si se detecta el virus del síndrome de Taura en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.
- a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;
 - b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;
 - c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia del virus del síndrome de Taura y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;
 - d) importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);
 - e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;
 - f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia del virus del síndrome de Taura y de parásitos y para determinar su estado general de salud;
 - g) si no se detecta la presencia del virus del síndrome de Taura ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de infección por el virus del síndrome de Taura o del agente patógeno específico de esta enfermedad;
 - h) liberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.
- 4) ~~Con respecto al apartado 3 e, las condiciones de cuarentena deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de cuarentena no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de infección bajo.~~

Este artículo no se aplica a los animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.6.3.

Artículo 9.6.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, animales acuáticos de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2. y o productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura, la autoridad competente del país importador deberá evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de cuarentena o contención hasta su transformación su procesamiento en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.6.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 9.6.11. o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de Taura o la eliminación de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de Taura o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

Anexo 14 (cont.)

En lo que se refiere a los animales acuáticos o productos de animales acuáticos ~~as mercancías~~, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.6.10.

Importación de animales acuáticos o productos de animales acuáticos ~~vivos~~ destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación ~~o a un~~ el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, de investigación o farmacéutico, animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2., o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura, la *autoridad competente* del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos para su sacrificio hasta su y transformación en uno de los productos referidos en el apartado 1 del Artículo 9.6.3. u otros productos autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) el tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de Taura o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de Taura o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

~~Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.6.3.~~

Artículo 9.6.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos ~~de un país, una zona o un compartimento no declarados libres~~ independientemente del su estatus sanitario del país, zona o compartimento exportador con respecto a la infección por el virus del síndrome de Taura

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus del síndrome de Taura, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el virus del síndrome de Taura esta enfermedad, cuando autoricen la importación (o el tránsito) por su *territorio* de camarones o crustáceos decápodos congelados y pelados (sin caparazón ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen animales acuáticos y o *productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.6.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus del síndrome de Taura, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.7.

ENFERMEDAD DE LAS INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LAS MANCHAS BLANCAS

Artículo 9.7.1.

A efectos del Código Acuático, ~~la infección por el virus del síndrome de las la enfermedad~~ manchas blancas ~~es designa~~ la infección debida al virus 1 del síndrome de las manchas blancas, un agente patógeno perteneciente al género Whispovirus y a la familia de los Nimavíridos. Este virus pertenece a una especie del género Whispovirus clasificada en la familia de los Nimavíridos. Los sinónimos generalmente empleados para designar esta enfermedad figuran en el capítulo correspondiente del Manual Acuático.

La información sobre los métodos de diagnóstico figura en el Manual Acuático.

Artículo 9.7.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a todos los crustáceos decápodos (orden Decapoda) de aguas marinas, salobres y dulces. Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el Manual Acuático que sean objeto de comercio internacional.

Artículo 9.7.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus del síndrome de la enfermedad de las manchas blancas

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de ~~la la enfermedad~~ infección por el virus del síndrome de las manchas blancas, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con ~~el virus del síndrome de las manchas blancas esta enfermedad~~ cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de los siguientes productos de animales acuáticos para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus del síndrome de las manchas blancas);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 60 °C durante al menos un minuto (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus ~~del síndrome de la enfermedad~~ de las manchas blancas);
 - c) productos de crustáceos pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante al menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus ~~del síndrome de la enfermedad~~ de las manchas blancas);
 - d) aceite de crustáceos;
 - e) harina de crustáceos;
 - f) quitina extraída por medios químicos.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.7.7. a 9.7.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de ~~la infección por el virus enfermedad~~ de las manchas blancas cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de ~~cualesquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con~~ derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.7.3.

Anexo 15 (cont.)

- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.7.2. pero que se considere que podría plantear un ~~riesgo de propagación de transmisión del la infección por~~ virus del síndrome de las manchas blancas. La *autoridad competente* del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis. ~~la evaluación.~~

Artículo 9.7.4.

País libre de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta infección enfermedad (véase el Artículo 9.7.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.7.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.7.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) no se ha observado la presencia de infección por el virus del síndrome de las manchas blancas enfermedad durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
- b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas enfermedad antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
- b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas;

O

- 4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado ~~la enfermedad~~ el virus del síndrome de las manchas blancas, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) nada más haberse detectado el virus del síndrome de las manchas blancas la enfermedad, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
- b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión del virus del síndrome de las manchas blancas~~ y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas la enfermedad, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona* libre, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.7.5.

Artículo 9.7.5.

Zona o compartimento libres de infección por el virus ~~enfermedad~~ de las manchas blancas

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por el virus ~~enfermedad~~ de las manchas blancas si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por el virus ~~enfermedad~~ de las manchas blancas podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(~~s~~) *autoridad*(~~es~~) *competente*(~~s~~) de dicho país o conjunto de países si:

1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.7.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.7.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:

a) no se ha observado la presencia de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para ~~su~~ la manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y

b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y

b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia del virus del síndrome ~~enfermedad~~ de las manchas blancas;

O

4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de ~~enfermedad~~ infección por el virus de las manchas blancas y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado ~~la enfermedad~~ el virus del síndrome de las manchas blancas en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:

a) nada más haberse detectado el virus del síndrome de las manchas blancas ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y

b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión del virus del síndrome de las manchas blancas de propagación de la enfermedad~~ y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y

c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas ~~enfermedad~~ y

d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia ~~de enfermedad~~ del virus del síndrome de las manchas blancas.

Anexo 15 (cont.)

Artículo 9.7.6.

Conservación del estatus de país, zona o compartimento libre de infección por el virus del síndrome de enfermedad de las manchas blancas

Un país, una zona o un compartimento declarados libres de ~~enfermedad de las manchas blancas~~ infección por el virus del síndrome de las manchas blancas, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.7.4. ó 9.7.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, zona o compartimento libres de infección por el virus del síndrome de las manchas blancas ~~esta enfermedad~~ si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una zona o un compartimento declarados libres de ~~enfermedad~~ infección por el virus del síndrome de las manchas blancas, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.7.4. ó 9.7.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, zona o compartimento libres ~~de esta enfermedad~~ si reúnen condiciones propicias para ~~su~~ la manifestación clínica de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las zonas o los compartimentos declarados libres ~~de enfermedad~~ de infección por el virus del síndrome de las manchas blancas y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta ~~enfermedad~~, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.7.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus del síndrome de enfermedad de las manchas blancas

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2. ~~y o productos de animales acuáticos~~ derivados de estas especie, provenientes de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus del síndrome de enfermedad de las manchas blancas, la *autoridad competente del país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente del país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*., El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.7.4. ó 9.7.5. (según proceda) y 9.7.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos* y ~~o~~ productos de animales acuáticos es un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por el virus del síndrome de enfermedad de las manchas blancas.

El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a ~~las mercancías~~ productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.7.3.

Artículo 9.7.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome de enfermedad de las manchas blancas

~~1)~~ Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2. de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome de enfermedad de las manchas blancas, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de animales acuáticos, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos a instalaciones de cuarentena donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos ~~de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar~~ el virus del síndrome de las manchas blancas (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7 y 5.5.).

Q

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del *Código Acuático*, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus *animales acuáticos*;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de *animales acuáticos* con un alto estatus sanitario para la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas;

b) en el país importador:

- i) importar la población F-0 a instalaciones de *cuarentena*;
- ii) examinar la población (F-0) para el virus del síndrome de las manchas blancas de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
- iii) producir una población de primera generación (F-1) en *cuarentena*;
- iv) criar la población F-1 en instalaciones de *cuarentena* bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas (según se describe en el Capítulo 2.2.7. del *Manual Acuático*) y realizar pruebas para la detección del virus del síndrome de las manchas blancas de conformidad con el Capítulo 1.4.;
- v) si no se detecta el virus del síndrome de las manchas blancas, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por el virus del síndrome de las manchas blancas y liberada de la *cuarentena*;
- vi) si se detecta el virus del síndrome de las manchas blancas en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su *cuarentena* y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.

a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;

b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;

c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia del virus del síndrome de las manchas blancas y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;

d) importar y mantener en *cuarentena*, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);

e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en *cuarentena*;

f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia del virus del síndrome de las manchas blancas y de parásitos y para determinar su estado general de salud;

g) si no se detecta la presencia del virus del síndrome de las manchas blancas ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las *condiciones elementales de bioseguridad* requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de enfermedad de las manchas blancas o del agente patógeno específico de esta *enfermedad*;

h) liberar de la *cuarentena* la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de *acuicultura* o de repoblación.

4) Con respecto al apartado 3 e), las condiciones de *cuarentena* deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de *cuarentena* no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de *infección* bajo.

Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.7.3.

Anexo 15 (cont.)

Artículo 9.7.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2. y o productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su transformación en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.7.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 9.7.11. o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas, o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de las manchas blancas o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

En lo que se refiere a estos animales acuáticos o productos de animales acuáticos as mercancías, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas ellos para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.7.10.

Importación de animales acuáticos vivos o productos de animales acuáticos vivos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación o a un el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, de investigación o farmacéutico, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2., o los productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas, la *autoridad competente del país importador* exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos para su sacrificio y hasta transformación en uno de los productos referidos en el apartado 1 del Artículo 9.7.3. u otros productos autorizados por la *autoridad competente, y*
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de las manchas blancas o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5. de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles. y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus del síndrome de las manchas blancas o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3 y 4.7.

Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.7.3.

Artículo 9.7.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres independientemente del su estatus sanitario del país, zona o compartimento de exportación con respecto a la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el *compartimento* de exportación respecto de la infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con el virus del síndrome de las manchas blancas esta enfermedad, cuando autoricen la importación o el tránsito por su *territorio* de camarones o crustáceos decápodos congelados y pelados (sin caparazón ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen animales acuáticos y o *productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.7.2. de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de infección por el virus del síndrome enfermedad de las manchas blancas, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.8.

INFECCIÓN POR EL NODAVIRUS MACROBRACHIUM ROSENBERGII (ENFERMEDAD DE LA COLA BLANCA)

Artículo 9.8.1.

A efectos del *Código Acuático*, la infección por nodavirus *Macrobrachium rosenbergii* es la infección por el agente patógeno nodavirus *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) perteneciente a de la familia de los Nodaviridae. La enfermedad se conoce comúnmente como enfermedad de la cola blanca es la infección debida al nodavirus macrobrachium. Este virus debe aún ser clasificado oficialmente.

La información sobre los métodos de diagnóstico figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.8.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5. para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el Capítulo 1.5.: a la especie gigante de camarones gigante de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*). Los nombres vulgares de otras especies figuran en el *Manual Acuático*. Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el *Manual Acuático* que sean objeto de comercio internacional.

Artículo 9.8.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la infección por MrNV no declarados libres de enfermedad de la cola blanca

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con MrNV esta enfermedad cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de los siguientes productos de animales acuáticos para derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la enfermedad de la cola blanca);
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 60 °C durante al menos 60 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la enfermedad de la cola blanca);
 - c) productos de crustáceos pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 90 °C durante al menos diez minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva el virus de la enfermedad de la cola blanca);
 - d) aceite de crustáceos;
 - e) harina de crustáceos;
 - f) quitina extraída por medios químicos.
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.8.7. a 9.8.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por MrNV enfermedad de la cola blanca cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de cualquiera animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2. que no sean unos de los enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.8.3.

Anexo 16 (cont.)

- 3) La *autoridad competente* deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su *territorio* de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.8.2. pero que se considere que podría plantear un ~~riesgo de propagación de transmisión de la infección por MrNV enfermedad de la cola blanca.~~ La *autoridad competente* del país exportador deberá ser informada del resultado de este análisis. ~~la evaluación.~~

Artículo 9.8.4.

País libre de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta *enfermedad* (véase el Artículo 9.8.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.8.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.8.2. está presente en el país, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) no se ha observado la presencia de la infección por MrNV ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
 - b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O
- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por MrNV ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
 - b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~;

O
- 3) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ y perdió posteriormente su estatus libre de ~~enfermedad~~ por haberse detectado la infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~, pero se han dado las condiciones siguientes:
 - a) nada más haberse detectado MrNV ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
 - b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de~~ la *zona infectada* se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión de MrNV y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
 - c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por MrNV ~~la enfermedad~~, y
 - d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona libre*, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3 del Artículo 9.8.5.

Artículo 9.8.5.

Zona o compartimento libres de enfermedad de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ si las *autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarcan confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de esta *enfermedad* por la(s) *autoridad(es) competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.8.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.8.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) no se ha observado la presencia de la infección por MrNV ~~enfermedad~~ durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
- b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de la infección por MrNV ~~enfermedad~~ antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
- b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~;

O

- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ y perdió posteriormente su estatus libre de ~~enfermedad~~ por haberse detectado la infección por MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~ en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) nada más haberse detectado MrNV ~~la enfermedad~~, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
- b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el ~~riesgo~~ la probabilidad de una mayor transmisión de MrNV de propagación de la enfermedad y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la infección por MrNV ~~enfermedad~~, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de MrNV ~~enfermedad de la cola blanca~~.

Anexo 16 (cont.)

Artículo 9.8.6.

Conservación del estatus libre de país, zona o compartimento libres de enfermedad de la cola blanca

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1 ó 2 de los Artículos 9.8.4. ó 9.8.5. (según proceda), podrán conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de infección por MrNV esta enfermedad si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3 de los Artículos 9.8.4. ó 9.8.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar el estatus de país, *zona* o *compartimento* libres de esta enfermedad si reúnen condiciones propicias para ~~su~~ la manifestación clínica de la infección por MrNV, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de enfermedad de la cola blanca y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *enfermedad*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Artículo 9.8.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca

Cuando importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2. y o *productos de animales acuáticos* derivados de estas especies, provenientes de un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, la *autoridad competente* del *país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente* del *país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*. El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.8.4. ó 9.8.5. (según proceda) y 9.8.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos y o* *productos de animales acuáticos* es un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca.

El *certificado* sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las mercancías los productos de animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.8.3.

Artículo 9.8.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca

4) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos* vivos de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del *riesgo* de los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de *animales acuáticos* importados, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar MrNV enfermedad de la cola blanca (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7 y 5.5.).

0

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).

32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del *Código Acuático*, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la infección por MrNV;

b) en el país importador:

- i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
- ii) examinar la población (F-0) para MrNV de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
- iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
- iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la infección por MrNV (según se describe en el Capítulo 2.2.8. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección de MrNV de conformidad con el Capítulo 1.4.;
- v) si no se detecta MrNV, la población F-1 podrá ser definida libre de infección por MrNV y liberada de la cuarentena;
- vi) si se detecta MrNV en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.

a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;

b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;

c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia del de la infección por MrNV virus de la enfermedad de la cola blanca y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;

d) importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);

e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;

f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia del virus de la enfermedad de la cola blanca y de parásitos y para determinar su estado general de salud;

g) si no se detecta la presencia de la infección por MrNV del virus de la enfermedad de la cola blanca ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca o del agente patógeno específico de esta enfermedad;

h) liberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.

4) Con respecto al apartado 3 e, las condiciones de cuarentena deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de cuarentena no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de infección bajo.

Este artículo no se aplica a los animales acuáticos mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.8.3.

Artículo 9.8.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, animales acuáticos de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2. y o productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, la autoridad competente del país importador deberá evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de cuarentena o contención hasta su transformación procesamiento en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.8.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 9.8.11. o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y

Anexo 16 (cont.)

- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la enfermedad de la cola blanca, o la eliminación de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la enfermedad de la cola blanca o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.

En lo que se refiere a ~~estas mercancías~~ estos animales acuáticos o productos de animales acuáticos, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los riesgos asociados a la utilización de ~~ellas ellos~~ para fines que no sean el consumo humano.

Artículo 9.8.10.

Importación de animales acuáticos vivos o productos de animales acuáticos vivos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, la investigación o a un el uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, de investigación o farmacéutico, animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2., o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, la autoridad competente del país importador exigirá que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de cuarentena y mantenidos en los mismos para su sacrificio hasta su transformación en uno de los productos referidos en el apartado 1 del Artículo 9.8.3. u otros productos autorizados por la autoridad competente, y
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo que garantice la inactivación del virus de la infección por MrNV enfermedad de la cola blanca o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación del virus de la infección por MrNV o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.

~~Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.8.3.~~

Artículo 9.8.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres independientemente del su estatus sanitario del país, zona o compartimento de exportación con respecto a la infección por MrNV enfermedad de la cola blanca

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de la infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con MrNV esta enfermedad, cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de camarones congelados y pelados (sin caparazón, ni cabeza) que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los productos de animales acuáticos enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas mercancías, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los riesgos asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen animales acuáticos y o productos de animales acuáticos, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, derivados de las especies mencionadas en el Artículo 9.8.2. de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de infección por MrNV enfermedad de la cola blanca, la autoridad competente del país importador deberá evaluar el riesgo y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.X.

ENFERMEDAD DE LA NECROSIS
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA

Article 9.X.1.

A efectos del *Código Acuático*, la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND por sus siglas en inglés) es la *infección* por cepas de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* (V_{AHPND}) de la familia de los Vibrionales y *V. harveyi* que poseen un plásmido de ~70-kbp portador de genes que codifican homólogos de toxinas de insectos del género *Photobacterium* (Pir), PirA y PirB, portadora de uno o más plásmido(s) extracromosómico(s) que codifican para una toxina (Pir^{sp}) que induce los cambios histopatológicos de AHPND en el hepatopáncreas (en adelante " V_{AHPND} "). *Vibrio parahaemolyticus* ha sido clasificado como un miembro del clado *V. harveyi*.

La información sobre los métodos de *diagnóstico* de esta enfermedad figura en el *Manual Acuático*.

Artículo 9.X.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies **susceptibles que cumplen los criterios de inclusión como especies susceptibles del Capítulo 1.5.** para su inclusión como susceptibles de acuerdo con el **Capítulo 1.5.**: langostino jumbo (*Penaeus monodon*), camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei*) y langostino jumbo (*Penaeus monodon*).

A efectos de este capítulo, los términos camarón y langostino se utilizan indistintamente.

Artículo 9.X.3.

Importación o tránsito por el territorio de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos cualquiera que sea el uso al que se destinan independientemente del estatus sanitario del de un país, una la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la no declarados libres de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de AHPND, las autoridades competentes no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con esta enfermedad cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de los siguientes productos de animales acuáticos **para derivados de** las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2., cualquiera que sea el uso al que se destinan y siempre que reúnan las condiciones descritas en el Artículo 5.4.1.:
 - [a) productos de crustáceos termoesterilizados y sellados herméticamente (es decir, un tratamiento térmico a 121 °C durante al menos 3,6 minutos o una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva V_{AHPND});
 - b) productos de crustáceos cocinados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 100 °C durante al menos 3 un minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva V_{AHPND});
 - ~~c) productos de crustáceos pasteurizados que se hayan sometido a un tratamiento térmico a 63 °C durante al menos 30 minutos (o a una combinación equivalente de tiempo/temperatura que haya demostrado que inactiva V_{AHPND});~~
 - ~~d) aceite de crustáceos;~~
 - ~~e) harina de crustáceos.~~
 - ~~f) quitina extraída químicamente.]~~
- 2) Las autoridades competentes deberán exigir las condiciones prescritas en los Artículos 9.X.7. a 9.X.11. que correspondan al estatus sanitario del país, la zona o el compartimento de exportación respecto de AHPND cuando autoricen la importación o el tránsito por su territorio de **animales acuáticos y o productos de animales acuáticos relacionados con derivados de** las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2. que no sean los enumerados en el apartado 1) del Artículo 9.X.3.
- 3) La autoridad competente deberá proceder a un *análisis del riesgo* acorde con las recomendaciones del Capítulo 2.1. cuando contemple la importación o el tránsito por su territorio de **animales acuáticos y o productos de animales acuáticos derivados de** cualquier especie no mencionada en el Artículo 9.X.2., pero que se considere que pueda plantear un *riesgo de propagación de la transmisión de* AHPND. Se deberá informar a la autoridad competente del país exportador del resultado de este análisis. ~~la evaluación.~~

Anexo 17 (cont.)

Artículo 9.X.4.

País libre de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de AHNPD si todas las áreas cubiertas por cuerpos de aguas compartidas han sido declaradas países o *zonas* libres de esta *enfermedad* (véase el Artículo 9.X.5.).

Como se describe en el Artículo 1.4.6., un país podrá hacer una *autodeclaración de ausencia* de AHNPD si:

1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.X.2. está presente y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.X.2. está presente, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) no se ha observado la presencia de ~~la enfermedad~~ AHNPD durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
- b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

3) se desconoce el estatus sanitario respecto de ~~la enfermedad~~ AHNPD antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
- b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de AHNPD;

O

4) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de AHNPD y perdió posteriormente su estatus libre de ~~enfermedad~~ por haberse detectado AHNPD, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) una vez detectada ~~la enfermedad~~ AHNPD, el área afectada ha sido declarada *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
- b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo el riesgo la probabilidad de una mayor transmisión de propagación de la enfermedad de AHNPD y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de ~~la enfermedad~~ AHNPD, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de AHNPD.

Mientras tanto, parte o la totalidad del área no afectada podrá ser declarada *zona* libre, siempre que reúna las condiciones descritas en el apartado 3) del Artículo 9.X.5.

Artículo 9.X.5.

Zona o compartimento libres de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

Si una *zona* o un *compartimento* se extienden más allá de las fronteras de un país, sólo podrán ser declarados *zona* o *compartimento* libres de AHNPD si las *autoridades competentes* confirman que reúnen las condiciones exigidas para serlo.

Anexo 17 (cont.)

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecidos en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarados libres de AHNPD podrán ser declarados libres de esta *enfermedad* por la(~~s~~) *autoridad(es)-competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

- 1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 9.X.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 2) cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 9.X.2. está presente en la *zona* o el *compartimento*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) no se ha observado la presencia de ~~la enfermedad~~ AHNPD durante, por lo menos, los diez últimos años a pesar de unas condiciones propicias para su manifestación clínica (de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*), y
- b) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

- 3) se desconoce el estatus sanitario respecto de ~~la enfermedad~~ AHNPD antes de ejercer una *vigilancia específica*, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años, y
- b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., en la *zona* o el *compartimento* durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de AHNPD;

O

- 4) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia* de AHNPD y perdió posteriormente su estatus libre ~~de enfermedad~~ por haberse detectado AHNPD en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:

- a) una vez detectada la ~~enfermedad~~ AHNPD, el área afectada ha sido declarada *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y
- b) las poblaciones infectadas ~~han sido destruidas o desplazadas dentro de la zona infectada~~ se han sacrificado y eliminado con medios que reducen al mínimo ~~el riesgo~~ la probabilidad de una mayor transmisión de propagación de la enfermedad de AHNPD y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el Capítulo 4.3.), y
- c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de ~~la enfermedad~~ AHNPD, y
- d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de AHNPD.

Artículo 9.X.6.

Conservación del estatus libre

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de AHNPD, de conformidad con lo dispuesto en los apartados 1) ó 2) de los Artículos 9.X.4. ó 9.X.5. (según proceda), podrán conservar el estatus libre ~~de esta enfermedad~~ AHNPD si mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Un país, una *zona* o un *compartimento* declarados libres de AHNPD, de conformidad con lo dispuesto en el apartado 3) de los Artículos 9.X.4. ó 9.X.5. (según proceda), podrán interrumpir la *vigilancia específica* y conservar su estatus libre de esta *enfermedad* si reúnen condiciones propicias para ~~su~~ la manifestación clínica, de acuerdo con lo indicado en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, y mantienen ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad*.

Sin embargo, en las *zonas* o los *compartimentos* declarados libres de AHNPD y situados en países infectados, así como en todos los casos en que no se reúnan condiciones propicias para la manifestación clínica de esta *enfermedad*, se deberá mantener un nivel de *vigilancia específica* que determinará el *Servicio de Sanidad de los Animales Acuáticos* en función de la probabilidad de *infección*.

Anexo 17 (cont.)

Artículo 9.X.7.

Importación de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarados libres de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

Cuando se importen *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2. y o productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes un país, una zona o un compartimento declarados libres de AHNPD, la *autoridad competente* del país importador deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *autoridad competente* del país exportador o por un *certificador oficial* aprobado por el país importador. El certificado sanitario internacional deberá acreditar que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 9.X.4. ó 9.X.5. (según proceda) y 9.X.6., que el lugar de producción de los *animales acuáticos y o* de los *productos de animales acuáticos* es un país, una zona o un compartimento declarados libres de AHNPD.

El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a los *mercaderías productos de animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.X.3.

Artículo 9.X.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

1) Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2. de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de AHNPD, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el *riesgo* y aplicar, ~~si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo de los apartados 2) y 3) que figuran a continuación.~~

21) Si la intención es el crecimiento y la cría de animales acuáticos importados, se considerará la aplicación de:

- a) entrega directa de ~~la remesa~~ los animales acuáticos importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local, y
- b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de con el fin de inactivar V_{pAHNPD} (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7 y 5.5.).

2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, ~~deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de Prácticas para la Introducción y Traslado de Organismos Marinos del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES).~~

Q

32) ~~A efectos del Código Acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) se pueden resumir en los siguientes puntos: Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente:~~

a) en el país exportador:

- i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
- ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la AHNPD;

b) en el país importador:

- i) importar la población F-0 a instalaciones de cuarentena;
- ii) examinar la población (F-0) para V_{pAHNPD} de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
- iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
- iv) criar la población F-1 en instalaciones de cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la AHNPD (según se describe en el Capítulo 2.2.X. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección de V_{pAHNPD} de conformidad con el Capítulo 1.4.;

Anexo 17 (cont.)

- v) si no se detecta $V_{p_{AHNPD}}$, la población F-1 podrán ser definida libres de AHNPD y liberada de la cuarentena;
- vi) si se detecta $V_{p_{AHNPD}}$ en la población F-1, estos animales no podrán ser liberados de su cuarentena y deberán sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.
- a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;
- b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;
- c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia de $V_{p_{AHNPD}}$ o de parásitos y determinar el estado general de salud de la población;
- d) importar y mantener en *cuarentena*, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);
- e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en *cuarentena*;
- f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia de $V_{p_{AHNPD}}$ o de parásitos y para determinar su estado general de salud;
- g) si no se detecta la presencia de $V_{p_{AHNPD}}$ ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las *condiciones elementales de bioseguridad* requeridas por el país, la zona o el *compartimento* de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de AHNPD o del agente patógeno específico de $V_{p_{AHNPD}}$;
- h) liberar de la *cuarentena* la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el *compartimento* para fines de *acuicultura* o de repoblación.
- 4) Con respecto al apartado 3 e), las condiciones de *cuarentena* deberán ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de *cuarentena* no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de *infección* bajo.

Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* mencionados en el apartado 1 del Artículo 9.X.3.

Artículo 9.X.9.

Importación, para transformación para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de enfermedad de la necrosis hepato pancreática aguda

Cuando se importen, para transformación para el consumo humano, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2. y o productos de animales acuáticos derivados de estas especies, provenientes de un país, una zona o un *compartimento* no declarados libres de AHNPD, la *autoridad competente* del país importador deberá evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:

- 1) entrega directa de los animales a centros de *cuarentena* o contención hasta su transformación procesamiento en uno de los productos enumerados en el apartado 1 del Artículo 9.3.3. o en productos descritos en el apartado 1 del Artículo 9.3.11. o en otros productos autorizados por la autoridad competente, y
- 2) tratamiento del agua utilizada y todos los contenedores utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de $V_{p_{AHNPD}}$ o la eliminación de modo que impida el contacto de los residuos con especies susceptibles biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y
- 3) tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de $V_{p_{AHNPD}}$ o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.

En lo que se refiere a estos animales acuáticos o productos de animales acuáticos as mercancías, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los riesgos asociados a la utilización de cualquiera de ellas ellos para fines que no sean el consumo humano.

Anexo 17 (cont.)

Artículo 9.X.10.

Importación de animales acuáticos vivos o productos de animales acuáticos vivos destinados a usos distintos del consumo humano incluyendo la alimentación de los animales, **la investigación o a un el** uso agrícola, industrial o farmacéutico y procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para un uso agrícola, industrial, **de investigación o farmacéutico, animales acuáticos vivos** de las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2., **o los productos de animales acuáticos derivados de dichas especies, provenientes** de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de AHNPD, la *autoridad competente del país importador* deberá exigir que:

- 1) los animales sean entregados directamente a centros de *cuarentena* y mantenidos en los mismos **para su sacrificio y hasta su** transformación en **uno de los** productos **referidos en el apartado 1 del Artículo 9.X.3. u otros productos** autorizados por la *autoridad competente*, y
- 2) **el tratamiento del** agua **utilizada y todos los contenedores utilizados** para el transporte **y todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación sean sometidos a un tratamiento de modo que** garantice la inactivación de V_{pAHNPD} o **la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5., y**
- 3) **tratamiento de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de V_{pAHNPD} o la eliminación biosegura de acuerdo con los Capítulos 4.3. y 4.7.**

Este artículo no se aplica a las mercancías enumeradas en el apartado 1 del Artículo 9.3.3.

Artículo 9.X.11.

Importación (o tránsito), para venta directa al por menor para el consumo humano, de animales acuáticos y o productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres independientemente del su estatus sanitario del país, zona o compartimento exportador con respecto a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

- 1) Independientemente del estatus sanitario del país, la *zona* o el *compartimento* de exportación respecto de AHNPD, las *autoridades competentes* no deberán exigir ningún tipo de condición relacionada con AHNPD ~~esta enfermedad~~, cuando autoricen la importación (o el tránsito) por su *territorio* de [*camarones congelados o crustáceos decápodos congelados y pelados (sin caparazón, ni cabeza)*] que han sido elaborados y envasados para la venta directa al por menor y reúnen las condiciones descritas en el Artículo 5.4.2.

Se han establecido algunos supuestos a la hora de evaluar la inocuidad de los *productos de animales acuáticos* enumerados más arriba. Los Países Miembros deberán referirse a tales supuestos, que figuran en el Artículo 5.4.2., y analizar si se aplican a sus condiciones.

En lo que se refiere a estas *mercancías*, los Países Miembros podrán considerar, si lo desean, la oportunidad de introducir medidas internas para afrontar los *riesgos* asociados a la utilización de cualquiera de ellas para fines que no sean el consumo humano.

- 2) Cuando se importen *animales acuáticos y o productos de animales acuáticos*, aparte de los enumerados en el apartado 1 arriba, **derivados** las especies mencionadas en el Artículo 9.X.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de AHNPD, la *autoridad competente del país importador* deberá evaluar el *riesgo* y aplicar medidas apropiadas para reducirlo.

— Texto suprimido.

“VERSIÓN LIMPIA”

ARTÍCULO X.X.8. PARA TODOS LOS CAPÍTULOS ESPECÍFICOS DE ENFERMEDAD (O ARTÍCULO 10.4.12. PARA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN)

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de “infección por patógeno X” / “enfermedad X”

Cuando se importen, para la *acuicultura*, *animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo X.X.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarados libres de “infección por patógeno X”/“enfermedad X”, la *autoridad competente* del *país importador* deberá evaluar el *riesgo* de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del *riesgo* en los apartados 1 y 2 que figuran a continuación.

- 1) Si la intención es el crecimiento y la cría *animales acuáticos* importados se considerará la aplicación de:
 - a) entrega directa de los *animales acuáticos* importados a instalaciones de *cuarentena* donde permanecerán de por vida; y
 - b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, efluentes y despojos con el fin de inactivar el “patógeno X” (de conformidad con los Capítulos 4.3., 4.7. y 5.5.).

O

- 2) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la *acuicultura*, se tendrá en cuenta lo siguiente:
 - a) en el *país exportador*.
 - i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus *animales acuáticos*;
 - ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de *animales acuáticos* con un alto estatus sanitario para la “infección por patógeno X”/ “enfermedad X”;
 - b) en el *país importador*.
 - i) importar la población fundadora (F-0) a instalaciones de *cuarentena*;
 - ii) examinar la población F-0 para la “infección por patógeno X” de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
 - iii) producir una población de primera generación (F-1) en *cuarentena*;
 - iv) criar la población F-1 en *cuarentena* bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la “infección por patógeno X”/“enfermedad X” (según se describe en el Capítulo 2.2.X. del *Manual Acuático*) y realizar pruebas para la detección de la “infección por patógeno X” de conformidad con el Capítulo 1.4.;
 - v) si no se detecta la “enfermedad X”, la población F-1 puede ser definida libre de “infección por patógeno X”/ “enfermedad X” y liberada de la *cuarentena*;
 - vi) si se detecta la “infección por patógeno X”, la población F-1 no puede ser liberada de la *cuarentena* y deberá sacrificarse y eliminarse de manera biológicamente segura.

Versión con modificaciones

ARTÍCULO X.X.8. PARA TODOS LOS CAPÍTULOS ESPECÍFICOS DE ENFERMEDAD (O ARTÍCULO 10.4.12. PARA LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN)

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de "infección por patógeno X"/"enfermedad X"

- 4) Cuando se importen, para la acuicultura, animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo X.X.2. de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de "infección por patógeno X"/"enfermedad X", la autoridad competente del país importador deberá evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo de conformidad con el Capítulo 2.1. y considerar las medidas de mitigación del riesgo en los apartados 21 y 32 que figuran a continuación.
- 21) Si la intención es el crecimiento y la cría de animales acuáticos importados, se considerará la aplicación de:
- a) entrega directa de la remesa los animales acuáticos importados a instalaciones de cuarentena biológicamente seguras donde permanecerán de por vida continuamente aislada del medio local, y
 - b) tratamiento del agua utilizada para el transporte, de los equipos, y de todos los efluentes y despojos de modo que garantice con el fin de inactivar el "patógeno X" (de conformidad con el los Capítulos 4.3., 4.7.3. y 5.5. y eliminación de los efluentes y despojos de manera biológicamente segura.
- 32) Si la intención es establecer nuevas poblaciones para la acuicultura, se tendrá en cuenta lo siguiente: A efectos del Código Acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:
- a) en el país exportador:
 - i) identificar las fuentes posibles de población y evaluar el historial sanitario de sus animales acuáticos;
 - ii) examinar las poblaciones de origen de acuerdo con el Capítulo 1.4. y seleccionar una población fundadora (F-0) de animales acuáticos con un alto estatus sanitario para la "infección por patógeno X"/"enfermedad X";
 - b) en el país importador:
 - i) importar la población fundadora (F-0) a instalaciones de cuarentena;
 - ii) examinar la población F-0 para la "infección por patógeno X"/"enfermedad X" de conformidad con el Capítulo 1.4. para determinar su idoneidad como población reproductora;
 - iii) producir una población de primera generación (F-1) en cuarentena;
 - iv) criar la población F-1 en cuarentena bajo condiciones que sean favorables a la expresión clínica de la "infección por patógeno X"/"enfermedad X" (según se describe en el Capítulo X.X.X. del Manual Acuático) y realizar pruebas para la detección de la "infección por patógeno X"/"enfermedad X" de conformidad con el Capítulo 1.4.;
 - v) si no se detecta la "infección por patógeno X"/"enfermedad X", la población F-1 puede ser definida libre de "infección por patógeno X"/"enfermedad X" y liberada de la cuarentena;

Anexo 17B (cont.)

vi) si se detecta la "infección por patógeno X" "enfermedad X", la población F-1 no puede ser liberada de la cuarentena y deberá sacrificarse destruirse y eliminarse de manera biológicamente segura.

4-

- a) ~~identificar la población de interés (de cultivo o natural) en las instalaciones donde se encuentra;~~
 - b) ~~evaluar el historial sanitario de la población;~~
 - c) ~~tomar y examinar muestras para descartar la presencia del virus de la anemia infecciosa del salmón y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;~~
 - d) ~~importar y aislar en instalaciones seguras de cuarentena una población fundadora (F-0);~~
 - e) ~~producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;~~
 - f) ~~criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para descartar la presencia del virus de la anemia infecciosa del salmón y de parásitos y para determinar su estado general de salud;~~
 - g) ~~si no se detecta la presencia del virus de la anemia infecciosa del salmón ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las condiciones elementales de bioseguridad requeridas por el país, la zona o el compartimento de importación, la población F-1 puede ser reconocida libre de infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón o libre del agente patógeno específico de esta infección;~~
 - h) ~~aliberar de la cuarentena la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la zona o el compartimento para fines de acuicultura o de repoblación.~~
- 3) ~~Con respecto al apartado 3 o, las condiciones de cuarentena deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de cuarentena no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de infección bajo.~~

Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* enumerados en el apartado 1 del Artículo 10.4.3.

— Texto suprimido.

— Texto suprimido.

CHAPTER 2.2.X.

ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE

1. Scope

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) means infection with strains of *Vibrio parahaemolyticus* (V_{AHPND}) and *V. harveyi* that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only V_{AHPND} has been demonstrated to cause AHPND.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

AHPND has a bacterial aetiology (Kondo *et al.*, 2015; Kwai *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2013a; 2013b;). It is caused by specific virulent strains of *Vibrio* species, including *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) and *V. harveyi*, that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within AHPND-causing *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) has been designated pVA1, and its size may vary slightly. Removal (or “curing”) of pVA1 abolishes the AHPND-causing ability of the virulent strain of *V. parahaemolyticus* V_{AHPND} strains. A pVA1-cured strain fails to induce the massive sloughing of cells in the hepatopancreatic tubules that is a primary histopathological characteristic of AHPND (Lee *et al.*, 2015).

Within a population of AHPND-causing V_{AHPND} bacteria, natural deletion of the Pir^{VP} operon region may occur in a few individuals (Lee *et al.*, 2015; Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences or transposase that flank the Pir toxin operon. Although different strains exhibit different levels of stability, When the deletion occurs, it means that a virulent strain of *V. parahaemolyticus* V_{AHPND} strain will lose its ability to induce AHPND. However, if the Pir toxin sequence is used as a target for detection, then a colony that has this deletion will produce a negative result even though the colony was derived from an isolate of AHPND-causing V_{AHPND} bacteria.

The plasmid pVA1 also carries a cluster of genes related to conjugative transfer, which means that this plasmid is potentially able to transfer to other bacteria. The pVA1 plasmid also carries the *pndA* gene, which is associated with a post-segregational killing (psk) system. For a bacterium that harbours a plasmid with the psk system (PSK⁺), only progeny that inherit the PSK⁺ plasmid will be viable. Progeny that do not inherit the PSK⁺ plasmid will die because the stable *pndA* mRNA will be translated to PndA toxin that will kill the bacterium. The presence of a psk system on a plasmid thus ensures that the plasmid is inherited during bacterial replication. The pVA1 plasmid will therefore be passed on to subsequent generations of producing PirA^{VP} and PirB^{VP}.

2.1.2. Survival outside the host

AHPND-causing strains of *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) would be is expected to possess similar properties to other strains of *V. parahaemolyticus* found in seafood that have been shown to survive up to 9 and 18 days in filtered estuarine water and filtered seawater at an ambient temperature of 28 ± 2°C (Karunasagar *et al.*, 1987).

Anexo 19 (cont.)**2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)**

Experimental studies have shown that Vp_{AHPND} AHPND could not be transmitted via frozen infected shrimp (Tran *et al.*, 2013a). ~~In addition~~ Similarly, other strains of *V. parahaemolyticus* are known to be sensitive to freezing, refrigeration, heating and common disinfectants (Andrews *et al.*, 2000; Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Su & Liu, 2007; Thompson & Thacker, 1973).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

Mortalities occur within 30–35 days, and as early as 10 days, of stocking shrimp ponds with postlarvae (PL) or juveniles (Joshi *et al.*, 2014b; Leaño & Mohan, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). ~~There is a report~~ (De la Pena *et al.* (2015) ~~of reported~~ disease outbreaks in the Philippines occurring as late as 46–96 days after pond-stocking.

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

Not applicable.

2.2.5. Target organs and infected tissue

Gut-associated tissues and organs

2.2.6. Persistent infection

No data or not known.

2.2.7. Vectors

None is known, although as *Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment, ~~the possibility presence of vector species would not be unexpected~~ vector species could be expected.

2.3. Disease pattern**2.3.1. Transmission mechanisms**

Vp_{AHPND} AHPND has been transmitted experimentally by immersion, ~~in feed feeding (per os)~~ and reverse gavage (Dabu *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation.

2.3.2. Prevalence

~~Vibrio spp. are ubiquitous in the marine environment.~~ In regions where AHPND is enzootic in farmed shrimp, evidence indicates a near 100% prevalence (Tran *et al.*, 2014a).

2.3.3. Geographical distribution

The disease ~~has been~~ was reported initially in 2010 from China (People's Rep. of) (2010), and subsequently from Vietnam (2010), Malaysia (2011), Thailand (2012) (Flegel, 2012; Lightner *et al.*, 2012), Mexico (2013) (Nunan *et al.*, 2014) and the Philippines (2014) (Dabu *et al.*, 2015; de la Pena *et al.*, 2015).

2.3.4. Mortality and morbidity

AHPND is characterised by sudden, mass mortalities (up to 100%) usually within 30–35 days of stocking grow-out ponds with PLs or juveniles (FAO, 2013; Hong *et al.*, 2016; NACA, 2012) and can be reproduced experimentally (Joshi *et al.*, 2014a; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). Older juveniles may also be affected (de la Pena *et al.*, 2015).

2.3.5. Environmental factors

Water sources with low salinity (<20 ppt) seem to reduce the incidence of the disease. Peak occurrence seems to occur during the hot and dry season from April to July seems to be the peak. Overfeeding, poor seed quality, poor water quality, poor feed quality, algal blooms or crashes are also factors that may lead to occurrences of AHPND in endemic areas (FAO, 2013; NACA, 2012).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

Not applicable.

2.4.2. Chemotherapy

~~None available~~ Not applicable.

2.4.3. Immunostimulation

~~None known to be effective~~ Not applicable.

2.4.4. Resistance-Breeding for resistance

Not applicable.

2.4.5. Restocking with resistant species

None available.

2.4.6. Blocking agents

None available.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

None known.

2.4.8. General husbandry practices

As with other infectious diseases of shrimp, established good sanitary and biosecurity practices, such as improvement of hatchery sanitary conditions and PL screening are likely to be beneficial; good broodstock management, use of high quality post-larvae and good shrimp farm management including strict feeding rate control, ~~reduced over crowding~~ appropriate stocking density etc. are all well-established practices that reduce the impact of disease, including AHPND (NACA, 2012).

Anexo 19 (cont.)**3. Sampling****3.1. Selection of individual specimens**

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 4.1.1) should be selected for AHPND diagnosis. It is assumed that adults (broodstock) can carry ~~Pir toxin bearing strains of *V. parahaemolyticus* *V. DAHPND* or other *Vibrio* spp.~~ (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). Therefore, broodstock without clinical signs may also be selected for diagnostic testing.

3.2. Preservation of samples for submission

Samples to be submitted are (i) fresh and chilled on ice for bacterial isolation, (ii) fixed in 90% ethanol for polymerase chain reaction (PCR) detection and (iii) preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Leaño & Mohan, 2013; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2104; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

3.3. Pooling of samples

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can may need to be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs or tissues

Samples of gut-associated tissues and organs, such as hepatopancreas, stomach, the midgut and the hindgut are suitable. In addition, faecal (non-lethal) samples may be collected from valuable broodstock.

3.5. Samples or tissues that are not suitable (i.e. when it is never possible to detect)

Samples other than gut-associated tissues and organs are not appropriate (FAO, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

4. Diagnostic methods**4.1. Field diagnostic methods****4.1.1. Clinical signs**

The onset of clinical signs and mortality can start as early as 10 days post-stocking ~~and can be used for presumptive diagnosis.~~ Clinical signs include a pale-to-white hepatopancreas (HP), significant atrophy of the HP, soft shells, guts with discontinuous, or no contents, black spots or streaks visible within the HP (due to melanised tubules). In addition, the HP does not squash easily between the thumb and forefinger (probably due to increased fibrous connective tissue and haemocytetes) (NACA, 2012; 2014).

4.1.2. Behavioural changes

Not applicable.

4.2. Clinical methods**4.2.1. Clinical chemistry**

None is known.

4.2.3. Microscopic pathology

The disease has two distinct phases:

Anexo 19 (cont.)

- i) The acute phase is characterised by a massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach in the absence of bacterial cells (FAO, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).
- ii) The terminal phase is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (FAO, 2013; Leañó & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

4.2.4. Wet mounts

Not applicable.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections (for ISH)

ISH is not currently available (October 2015).

4.2.7. Electron microscopy or cytopathology

Not applicable.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods****4.3.1.1. Microscopic methods***4.3.1.1.1. Wet mounts*

Not applicable.

4.3.1.1.2. Smears

Not applicable.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.2.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

~~Pir toxin producing strains of *V. parahaemolyticus* (and other bacterial species) can be isolated on standard media used for isolation of bacteria from diseased shrimp (Lee *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). Bacterial species identification may be carried out using 16S rRNA PCR (Weisburg *et al.*, 1991) or *toxR*-targeted PCR (Kim *et al.*, 1999) and sequencing (Weisburg *et al.*, 1991), and their probable ability to cause AHPND using AHPND-specific PCR methods that target the *Vp*_{AHPND}-toxin genes are described in section ~~4.3.1.2.3.~~ 4.3.1.2.3.1.~~

4.3.1.2.1. Cell culture or artificial media

See sections 4.3.1.2.3.1.1 and 4.3.1.2.3.1.2.

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

None is available to date (October 2015).

Anexo 19 (cont.)

4.3.1.2.3. Molecular techniques

4.3.1.2.3.1. PCR protocols for detection of AHPND-causing bacteria from cultures or infected shrimp

PCR methods have been developed that target the Vp_{AHPND} AHPND-toxin genes. The AP3 method is a single-step PCR that targets the 12.7 kDa PirA^{VP} gene (Sirikharin *et al.*, 2015). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing 104 isolates of Vp_{AHPND} AHPND-causing and non-pathogenic bacteria (including other *Vibrio* and non-*Vibrio* species) that had previously been tested by bioassay (Kwai *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015). Subsequently, Soto-Rodriguez *et al.* (2015), using 9 Vp_{AHPND} AHPND-causing and 11 non-pathogenic isolates of *V. parahaemolyticus* reported that the AP3 method produced the highest positive (90%) and negative (100%) predictive values of five PCR methods tested.

Single-step PCRs such as the AP3 method and others, e.g. VpPirA-284, VpPirB-392 (Han *et al.*, 2015a) and TUMSAT-Vp3 (Tinwongger *et al.*, 2014), have relatively low sensitivity when used for detection of Vp_{AHPND} AHPND-causing bacteria at low levels (e.g. sub-clinical infections) or in environmental samples such as sediments and biofilms. For such samples, a preliminary enrichment step (see 4.3.1.2.3.1.1) is recommended.

Alternatively, a nested PCR method, AP4, has been developed with a 100% positive predictive value for Vp_{AHPND} AHPND-causing bacteria using the same 104 bacterial isolates used to validate AP3 above (Dangtip *et al.*, 2015), and has greater sensitivity (1 fg of DNA extracted from Vp_{AHPND} AHPND-causing bacteria), allowing it to be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

In addition, real-time PCR methods, for example the Vp_{AHPND} AHPND-specific TaqMan real-time PCR developed by Han *et al.* (2015b), and an isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP) method developed by Koiwai *et al.* (2015) also have high sensitivity and can be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

4.3.1.2.3.1.1 Enrichment of samples prior to DNA extraction

Preliminary enrichment culture for detection of Vp_{AHPND} AHPND-causing bacteria from sub-clinical infections or environmental samples may be carried out using any suitable bacteriological medium (e.g. tryptic-~~soy~~ broth or alkaline peptone water containing 2.5% NaCl supplement) incubated for 4 hours at 30°C with shaking. Then, after letting any debris settle, the bacteria in the culture broth are pelleted by centrifugation. Discarding the supernatant, DNA can be extracted from the bacterial pellet in preparation for PCR analysis.

4.3.1.2.3.1.2 Agent purification

Vp_{AHPND} The causative agent of AHPND may be isolated in pure culture from diseased shrimp, sub-clinically infected shrimp, or environmental samples using standard microbiological media for isolation of *Vibrio* species from such sources (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013a; 2013b). Confirmation of identification of Vp_{AHPND} as an AHPND-causing bacteria may be undertaken by PCR analysis and bioassay.

4.3.1.2.3.1.3 DNA extraction

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the stomach or hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp, from cultures of purified bacterial isolates or from bacterial pellets from enrichment cultures (see above). The amount of template DNA in a 25 µl PCR reaction volume should be in the range of 0.01–1 ng of DNA when extracted from bacterial isolates (i.e. directly from a purified culture) and in the range of 10–100 ng of total DNA when extracted from shrimp tissues or from a bacterial pellet derived from an enrichment culture.

4.3.1.2.3.1.4 One-step PCR detection of pVA1 plasmid

Two one-step PCR methods (AP1 and AP2) are described here for detection of the pVA1 plasmid in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.1.

Table 4.1. PCR primers for one-step PCR detection of AHPND-causing bacteria

| Method name | Primers | Target gene | Expected amplicon size | Reference |
|-------------|--|-------------|------------------------|--------------------|
| AP1 | AP1F: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3' AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3' | <i>pVA1</i> | 700bp | Flegel & Lo (2014) |
| AP2 | AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3' AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3' | <i>pVA1</i> | 700bp | Flegel & Lo (2014) |

4.3.1.2.3.1.5 Protocol for the AP1 and AP2 PCR methods

This protocol follows the method described by Flegel & Lo. (2014). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 0.01-1 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 25–30 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 60 seconds with a final extension step at 72°C for 10 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C (http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128).

4.3.1.2.3.1.45 PCR primers for One-step PCR detection of *PirA/PirB* toxin genes AHPND causing bacteria

Four one-step PCR methods (AP3, TUMSAT-Vp3, VpPirA-284 and VpPirB-392) are described here for detection of Pir toxin genes in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.42.

Table 4.42. PCR primers for one-step PCR detection of AHPND-causing bacteria

| Method name | Primers | Target gene | Expected amplicon size | Reference |
|-------------|--|--------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| AP3 | AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3' | <i>pirA^{VP}</i> | 333bp | Sirikharin <i>et al.</i> , 2014, 2015 |
| TUMSAT-Vp3 | TUMSAT-Vp3 F: 5'-GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA-3' TUMSAT-Vp3 R: 5'-TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3' | <i>pirA^{VP}</i> | 360bp | Tinwongger <i>et al.</i> , 2014 |
| VpPirA-284 | VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3' | <i>pirA^{VP}</i> | 284bp | Han <i>et al.</i> , 2015a |
| VpPirB-392 | VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3' | <i>pirB^{VP}</i> | 392bp | Han <i>et al.</i> , 2015a |

4.3.1.2.3.1.56 Protocol for the AP3 PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

4.3.1.2.3.1.67 Protocol for the VpPirA-284 and VpPirB-392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015) and uses PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready-to-go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3-minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Anexo 19 (cont.)

4.3.1.2.3.1.78 Protocol for the TUMSAT-Vp3 PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.01 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

4.3.1.2.3.1.89 AP4 nested PCR primers protocol for detection of *Vp_{AHPND}* AHPND bacteria

4.3.1.2.3.1.10 Protocol for the AP4 nested PCR method

This protocol follows the method described by ~~Sritnyalucksana *et al.* (2015) and Dangtip *et al.* (2015)~~. The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4-F1, 0.5 µl 10 µM AP4-R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10x PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4-F2, 0.375 µl 10 µM AP4-R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.23. The expected amplicon sizes are 1269 bp for the outer primers (AP4-F1 and AP4-R1) and 230 bp for the inner primers (AP4-F2 and AP4-R2). At high concentrations of target DNA, additional amplicons may occur as the product of residual primer AP4-F1 pairing with AP4-R2 (357 bp) or AP4-F2 with AP4-R1 (1142 bp) in the nested step.

Table 4.23. Primers for the AP4, nested PCR method for detection of *Vp_{AHPND}* AHPND causing bacteria

| Method name | Primers | Expected amplicon size | Reference |
|-------------|--|------------------------|----------------------|
| AP4 Step 1 | AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3' | 1269 | Dangtip |
| AP4 Step 2 | AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3' AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3' | 230 | <i>et al.</i> , 2015 |

4.3.1.2.3.1.910 Analysis of conventional PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, amplicons are visualised by agarose gel electrophoresis. Twenty µl of the PCR reaction mixture, with 6x loading dye added, is loaded onto a 1.5% agarose gel and electrophoresis is carried out at 90 volts for 40 minutes. Amplicons are visualised with SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Cat. No. 33102) according to the manufacturer's instructions. Amplicons of the expected size appropriate for the PCR methods used (Tables 4.12, 4.23 and 4.3) indicate a positive result. Positive results must be confirmed by sequence analysis.

4.3.1.2.3.1.1011 Protocol for the AHPND-specific real-time PCR method

This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real-time PCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µl. Real-time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real-time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software-generated characteristic amplification curves. No-template controls must have no evidence of specific amplicons.

4.3.1.2.3.1.6 Primers and Probe for AHPND-specific real-time PCR

The primers and probe and target gene for the Vp_{AHPND}-AHPND-specific real-time PCR are listed in Table 4.34.

Table 4.34. Primers and probe for the real-time PCR method for detection of Vp_{AHPND}-AHPND-causing bacteria

| Primer/ probe name | Sequence | Target gene | Reference |
|-----------------------|--|----------------|------------------------------|
| VpPirA-F | 5'-TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG-3' | pirA | Han <i>et al.</i> , 2015b |
| VpPirA-R | 5'-GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG-3' | | |
| VpPirA Probe | 5'-6FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA-3' | | |

4.3.1.2.3.1.7 Protocol for the AP3-PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

4.3.1.2.3.1.8 Protocol for the VpPirA-284 and VpPirB-392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015) and uses PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready-to-go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3-minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

4.3.1.2.3.1.9 Protocol for the TUMSAT-Vp3 PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.01 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

4.3.1.2.3.1.10 Protocol for the AP4 nested PCR method

This protocol follows the method described by Sritnyalucksana *et al.* (2015) and Dangtip *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4-F1, 0.5 µl 10 µM AP4-R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4-F2, 0.375 µl 10 µM AP4-R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

4.3.1.2.3.1.11 Analysis of conventional PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, amplicons are visualised by agarose gel electrophoresis. Twenty µl of the PCR reaction mixture, with 6× loading dye added, is loaded onto a 1.5% agarose gel and electrophoresis is carried out at 90 volts for 40 minutes. Amplicons are visualised with SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Cat. No. 33102) according to the manufacturer's instructions. Amplicons of the expected size appropriate for the PCR methods used (Tables 4.1, 4.2 and 4.3) indicate a positive result. Positive results must be confirmed by sequence analysis.

4.3.1.2.3.1.12 Protocol for the AHPND-specific real-time PCR method

Anexo 19 (cont.)

~~This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real time PCR mixture containing 0.3 μM of each primer and 0.1 μM probe to a final volume of 10 μl . Real time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software generated characteristic amplification curves. No template controls must have no evidence of specific amplicons.~~

4.3.1.2.3.1. ~~4.12~~ Controls for all PCR methods

The following controls should be included in all V_DAHPND AHPND PCR assays: a) negative extraction control i.e. DNA template extracted at the same time from a known negative sample; b) DNA template from a known positive sample, such as V_DAHPND AHPND-affected shrimp tissue or DNA from an V_DAHPND AHPND-positive bacterial culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a non-template control. In addition, a further control is required to demonstrate that extracted nucleic acid is free from PCR inhibitors, for example for shrimp tissues use of the decapod 18S rRNA PCR (Lo *et al.*, 1996) or the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

~~While details of each PCR protocol are provided here, as with any diagnostic test individual laboratories should validate the tests for the specific reagents and platform used within their own laboratories.~~

4.3.2. Serological methods

Not applicable.

4.3.3. Bioassay

V_DAHPND AHPND has been transmitted experimentally by immersion and reverse gavage (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation. Thus following isolation and purification of a bacterium that is suspected to cause AHPND, a bioassay can be performed to confirm the presence of the causative agent. The immersion procedure is carried out by immersing 15 shrimp for 15 minutes with aeration in a suspension (150 ml clean artificial seawater) of 2×10^8 cells of the cultured bacterium per ml. Following this initial 15 minute period, the shrimp and the inoculum are transferred to a larger tank with a volume of clean artificial seawater to make the final concentration of the bacterium 2×10^6 cells ml⁻¹. Shrimp are monitored at 6- to 8-hour intervals. Dead shrimp are can be processed for V_DAHPND AHPND PCR and sequence analysis. Moribund or surviving shrimp are processed for histology, and bacterial re-isolation, and AHPND-PCR and sequence analysis. A positive bioassay is indicated by the detection of characteristic histological lesions and V_DAHPND by PCR and sequencing.

5. Rating of tests against purpose of use

As an example, the methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of AHPND are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

| Method | Targeted surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|-------------------------|-----------------------|----|-----------|--------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PL | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | d | ed | ed | c | d |
| Bioassay | d | d | d | d | d | a |
| Histopathology | d | c | a | c | a | b |
| Real-time PCR | d | a | a | a | a | b |
| Nested PCR and sequence | d | b | b | b | a | a |
| 1-step PCR and Sequence | d | ec | ec | ec | a | a |

PL = postlarvae; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from AHPND

As indicated in Table 5.1, real-time PCR is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

AHPND shall be is suspected if at least one of the following criteria is met:

- Mortality associated with and clinical signs consistent with of AHPND
- Histopathology indicative of consistent with AHPND
- Detection of Pir toxin genes in the pVA1 plasmid in *Vibrio parahaemolyticus* by PCR or real-time PCR.

7.2. Definition of confirmed case

AHPND is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

- Histopathology indicative of consistent with AHPND
- Detection of Pir toxin gene and in the pVA1 plasmid in *Vibrio parahaemolyticus* by PCR and sequence analysis
- Positive results by bioassay (characteristic histological lesions and detection of clinical signs, mortality, histopathology, V_{AHPND} by PCR and sequencing)

8. References

ANDREWS L.S., PARK D.L. & CHEN Y.P. (2000). Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters. *Food Addit. Contam.*, **17**, 787–791.

DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANANGAS MANINGAS M.B.B. (2015 2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48** 2015, 1–8 792-799.

Anexo 19 (cont.)

DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPAIWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–162.

DE LA PEÑA PEÑA L., CABILLON N.A.R., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D.G. D.D.G. & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.

DE SCHRYVER P., DEFOIRDT T. & SORGELOOS P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.*, **10**, e1003919.

FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), 2013. Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome, Italy, 54 p.

FLEGEL T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 166–173.

FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific Asia-Pacific, Bangkok, Thailand.

GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.

GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.

HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. & TRAN L. (2015a). *Photorhabdus* insect related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.

HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.

HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (~~*Litopenaeus*~~ *Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.

JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>.

JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.

KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I. VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.

KIM Y.B., OKUDA J., MATSUMOTO C., TAKAHASHI N., HASHIMOTO S. & NISHIBUCHI M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1173–1177.

KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.

KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.

KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.

KWAI L., ENG H.U., SIEW W., SH M.Y., WEI Y.W. & KOEN P.Y. (2014). An AP1, 2 & 3 PCR positive non-*Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology. The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture.

LEAÑO E.M. & MOHAN C.V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*, July/August 2012 **July/August 2012**, 38–39.

LEE C.-T., CHEN I.-T., YANG Y.-T., KO T.-P., HUANG Y.-T., HUANG J.-Y., HUANG M.-F., LIN S.-J., CHEN C.-Y., LIN S.-S., LIGHTNER D.V., WANG H.-C., WANG A.H.-J., WANG H.-C., HOR L.-I. & LO C.-F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **112**, 10798–10803.

LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., NOBLE B.L. & TRAN L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, **January/February 2012**, 40.

LIU Q., HUANG J., YANG H.L., YANG B., LIU S., WANG H.L., WANG Q.T., LIU F., ZHANG Q.L. (2014). Detection of a new genotype of yellow head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709 (in Chinese with English abstract and figure illustrations).

LO C.-F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.-H., PENG S.-E., CHEN Y.-T., CHOU C.-M., YEH P.-Y., HUANG C.-J., CHOU H.-Y., WANG C.-H. & KOU G.-H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORA-VENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.

NACA (2012). Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9–10 August 2012. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and the Pacific, Bangkok, Thailand.

NACA (2014). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Card **hepatopancreatic necrosis disease card** (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and the Pacific, Thailand.

NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., FLEGEL T.W., MAVICHAK R. & PROESPRAIWONG P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and the Pacific, Thailand. Source: http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., **THANH D.C CHI T.D.**, MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, **10**: e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.

SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of **culture cultured** shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.

SU Y.C. & LIU C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.*, **24**, 549–558.

Anexo 19 (cont.)

TANIGUCHI H., OHTA H., OGAWA M. & MIZUGUCHI Y. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.*, **162**, 510–515.

THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.

TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPACK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014a). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10** (2), [14-18](#). ~~March/April 2014~~.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014b). *Tilapia* could enhance water conditions, help control EMS in shrimp ponds. *Global Aquaculture Advocate*, ~~January/February~~ [January/February 2014](#), 11–12.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.[M.](#), LIGHTNER D.V. & FITZSIMMONS K. (2013a). EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *Global Aquaculture Advocate*, ~~July/August 2013~~ **July/August 2013**, [18-20](#). ~~46–48~~.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.[L.](#), PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013b). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 45–55.

WEISBURG W.G., BARNES S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.-T., CHEN I.-T., LEE C.-T., CHEN C.-Y., LIN S.-S., HOR L.-I., TSENG T.-C., HUANG Y.-T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.-C. & LO C.-F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

CHAPTER 2.2.1.

INFECTION WITH CRAYFISH PLAGUE (APHANOMYCES ASTACI (CRAYFISH PLAGUE))

1. Scope

Infection with *Aphanomyces astaci* means infection with the pathogenic agent *A. astaci* Schikora, a member of the of the Family Leptolegniaceae, Phylum Class Oomycota (water moulds). The disease is commonly known as crayfish plague. For the purpose of this chapter, crayfish plague is considered to be infection of crayfish with *Aphanomyces astaci* Schikora.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

The aetiological agent of crayfish plague is *Aphanomyces astaci*. *Aphanomyces astaci* is a member of a group of organisms commonly known as the water moulds. Although long regarded to be fungi, this group, the Oomycetida or oomycota, are now considered protists and are classified with diatoms and brown algae in a group called the Stramenopiles or Chromista. Chromista are a eukaryotic supergroup, probably polyphyletic, which may be treated as a separate kingdom or included among the Protista.

Four groups (A–D) of *A. astaci* have been described based on random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1994): Group A (the so called *Astacus* strains) comprises a number of strains that were isolated from *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*; these strains are thought to have been in Europe for a long period of time. Group B (*Pacifastacus* strains I) includes isolates from both *A. astacus* in Sweden and *Pacifastacus leniusculus* from Lake Tahoe, USA. Imported to Europe, *P. leniusculus* have probably introduced *A. astaci* and infected the native *A. astacus* in Europe. Group C (*Pacifastacus* strains II) consists of a strain isolated from *P. leniusculus* from Pitt Lake, Canada. Another strain (Pc), isolated from *Procambarus clarkii* in Spain, sits in group D (*Procambarus* strain). This strain shows temperature/growth curves with higher optimum temperatures compared with isolates from northern Europe (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995). *Aphanomyces astaci* strains that have been present in Europe for many years (group A strains) appear to be less pathogenic than strains introduced more recently with crayfish imports from North America since the 1960s.

2.1.2. Survival outside the host

Although *A. astaci* is not an obligate parasite and will grow well under laboratory conditions on artificial media (Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1988), in the natural environment it does not survive well for long periods in the absence of a suitable host.

Aphanomyces astaci zoospores remain motile for up to 3 days and cysts survive for 2 weeks in distilled water (Svensson & Unestam, 1975; Unestam, 1966). As *A. astaci* can go through three cycles of zoospore emergence, the maximum life span outside of a host could be several weeks. Spores remained viable in a spore suspension kept at 2°C for 2 months (Unestam, 1966).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

Aphanomyces astaci, both in culture and in infected crayfish, is killed by a short exposure to temperatures of 60°C or to temperatures of –20°C (or below) for 48 hours (or more) (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002). Sodium hypochlorite and iodophors are effective for disinfection of contaminated equipment. Equipment must be cleaned prior to disinfection, since organic matter was found to decrease the effectiveness of iodophors (Alderman & Polglase, 1985). Thorough drying of equipment (>24 hours) is also effective as *A. astaci* is not resistant to desiccation.

Anexo 20 (cont.)**2.1.4. Life cycle**

The life cycle of *A. astaci* is simple with vegetative hyphae invading and ramifying through host tissues, eventually producing extramatrical sporangia that release amoeboid primary spores. These initially encyst, but then release a biflagellate zoospore (secondary zoospore). Biflagellate zoospores swim in the water column and, on encountering a susceptible host, attach and germinate to produce invasive vegetative hyphae. Free-swimming zoospores appear to be chemotactically attracted to crayfish cuticle (Cerenius & Söderhäll, 1984a) and often settle on the cuticle near a wound (Nyhlen & Unestam, 1980). Zoospores are capable of repeated encystment and re-emergence, extending the period of their infective viability (Cerenius & Söderhäll, 1984b). Growth and sporulation capacity is strain-and temperature-dependent (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

~~Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *A. astaci* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include: noble crayfish (*Astacus astacus*), Danube crayfish (*A. leptodactylus*), signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), *Austropotamobius torrentium*, *Austropotamobius pallipes*, *Orconectes limosus*, *O. immunis*, *Procambarus alleni* and *Potamon potamios*.~~

To date, all species of freshwater crayfish have to be considered as susceptible to infection with *A. astaci*. The outcome of an infection varies depending on species. All stages of European crayfish species, including the Noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender clawed or Turkish crayfish (*Astacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor are highly susceptible (Alderman, 1996; Alderman *et al.*, 1984; Rahe & Soylu, 1989; Unestam, 1969b; 1976; Unestam & Weiss, 1970). Laboratory challenges have demonstrated that Australian species of crayfish are also highly susceptible (Unestam, 1976). North American crayfish such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Orconectes* spp. are infected by *A. astaci*, but under normal conditions the infection does not cause clinical disease or death. All North American crayfish species investigated to date have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969b; Unestam & Weiss, 1970) and it is therefore currently assumed that this is the case for any other North American species.

The only other crustacean known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) ~~but this was reported only under laboratory conditions~~ (Benisch, 1940; Schrimpf *et al.*, 2014).

2.2.2. Susceptible stages of the host

All live stages should be considered as susceptible to infection.

2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

The host species susceptible to infection with *A. astaci* fall largely into two categories: those highly susceptible to infection with development of clinical disease and mortalities, and those which are infected without associated clinical disease or mortalities.

Highly susceptible species: in natural clinical disease outbreaks of crayfish plague, caused by infection with *A. astaci* are generally known as 'crayfish plague' outbreaks. In such outbreaks, moribund and dead crayfish of a range of sizes (and therefore ages) can be found.

In North American crayfish species, the prevalence of infection tends to be lower in animals that have gone through a recent moult (B. Oidtmann, unpublished data). However, ~~large scale systematic thorough~~ studies have not been undertaken to corroborate these observations. Juvenile crayfish go through several moults per year, whereas adult crayfish usually moult at least once per year in temperate climates. Therefore, animals in which the last moult was some time ago may show higher prevalence compared with animals that have recently moulted.

2.2.4. Target organs and infected tissue

The tissue that becomes initially infected is the exoskeleton cuticle. Soft cuticle, as is found on the ventral abdomen and around joints, is preferentially affected. In the highly susceptible European crayfish species, the pathogen often manages to penetrate the basal lamina located underneath the epidermis cell layer. From there, *A. astaci* spreads throughout the body primarily by invading connective tissue and haemal sinuses; however, all tissues may be affected.

In North American crayfish species, infection is usually restricted to the cuticle. Based on PCR results, the tailfan (consisting of uropods and telson) and soft abdominal cuticle appear to be frequently infected (Oidtmann *et al.*, 2006; Vrålstad *et al.*, 2011).

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

A number of North American crayfish species have been investigated for their susceptibility to infection shown to be infected with *A. astaci* and disease (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969a; Unestam & Söderhäll, 1977). So far, infection has been consistently shown in all North American crayfish species tested to date. Animals investigated were usually clinically healthy. Infected naturalised or aquaculture-reared North American crayfish populations usually do not develop clinical disease or increased mortalities (Oidtmann *et al.*, 2006; Strand *et al.* 2011; 2012).

This is supported by a recent study where the chances of detecting an *A. astaci* positive signal crayfish were shown to increase significantly with increasing crayfish length. Furthermore, large female crayfish expressed significantly higher levels of *A. astaci* than large males (Vrålstad *et al.*, 2011). The results probably reflect the decreased moult frequency of larger mature individuals compared with smaller immature crayfish (Reynolds, 2002), where mature females tend to moult even less frequently than mature males (Skurdal & Qvenild, 1986).

Based on the observations made in North American crayfish species, it seems reasonable to assume that all crayfish species native to the North American continent can be infected with *A. astaci* without development of clinical disease and they may therefore act as lifelong carriers of the pathogen.

A recent report from Finland also suggests that noble crayfish populations in cold water environments may be chronically infected at low prevalence (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

2.2.6. Vectors

Finfish movement may facilitate the spread of *A. astaci* in a number of ways, such as through the presence of spores in the digestive tract of fish, transport water, co-transport of infected crayfish specimens, or a combination of both (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (nets, boots clothing, etc.) (Alderman *et al.*, 1987). There is good field and experimental evidence that movements of fish from areas in which crayfish plague is active can transmit infection from one watershed to another (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2006).

Fomites: The spread of *A. astaci* can also be linked to contaminated equipment (nets, boots, clothing etc.).

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

A number of studies have shown that crayfish species native to North America can act as carriers of *A. astaci* (e.g. signal crayfish, spiny cheek crayfish, red swamp crayfish (Alderman *et al.*, 1990; Oidtmann *et al.*, 2006). Since all North American species tested to date have been shown to be potential carriers of the disease, it is also assumed that North American species not tested to date are likely to act potentially as carriers of *A. astaci*. North American species are wide spread in several regions of Europe.

Anexo 20 (cont.)**2.3. Disease pattern****2.3.1. Transmission mechanisms**

The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, as may occur during fish-movements of finfish, or 3) through colonisation of habitats by North American crayfish species.

Transmission from crayfish to crayfish occurs, ~~in short~~, through the release of zoospores from an infected animal and attachment of ~~such the~~ zoospores to a naïve crayfish. The zoospores of *A. astaci* swim actively in the water column and have been demonstrated to show positive chemotaxis towards crayfish (Cerenius & Söderhäll, 1984a).

The main route of spread of ~~crayfish plague~~ *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms (Alderman, 1996; Dehus *et al.*, 1999). ~~Nowadays~~, Spread now mainly occurs through expanding populations of North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Edsman, 2004; ~~Oidtmann *et al.*, 2005~~).

Colonisation of habitats, initially occupied by highly susceptible species, by North American crayfish species carrying *A. astaci* is likely to result in an epizootic epidemic among the highly susceptible animals. The velocity-rate of spread will depend, among other factors, on the prevalence of infection in the population of North American crayfish.

Finfish transports may facilitate the spread of *A. astaci* in a number of ways, such as through the presence of spores in the transport water, ~~*A. astaci* surviving on fish skin~~, co-transport of infected crayfish specimens, or a combination of both all three (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (nets, boots clothing, etc.) (Alderman *et al.*, 1987).

2.3.2. Prevalence

In the highly susceptible European crayfish species, exposure to *A. astaci* spores usually is considered ~~to lead~~ to infection and eventually to death. The minimal minimum infectious dose has still not been established, but it may be as low as a single spore per animal (B. Oidtmann, unpublished data). Prevalence of infection within a population in the early stage of an outbreak may be low (~~only one or a few animals in a river population may be affected~~). However, the pathogen is amplified in affected animals and subsequently released into the water; usually leading to 100% mortality in a contiguous population. The velocity-rate of spread from initially affected animals depends on several factors, one being water temperature (~~Oidtmann *et al.*, 2005~~). Therefore, the time from first introduction of the pathogen into a population to noticeable crayfish mortalities can vary greatly and may range from a few weeks to months. Prevalence of infection will gradually increase over this time and usually reach 100%. Data from a noble crayfish population in Finland that experienced an acute mortality event due to infection with *A. astaci* outbreak of crayfish plague in 2001 and that was followed in subsequent years suggest that in sparse noble crayfish populations, spread of disease throughout the host population may ~~be take prolonged over a time span~~ of several years (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

Prevalence in North American crayfish appears to vary greatly. Limited studies suggest prevalences ranging from between 0 and 100% are possible (Oidtmann *et al.*, 2006).

2.3.3. Geographical distribution

First In Europe the reports of large ~~crayfish~~ mortalities of crayfish go back to 1860 in Italy (Ninni, 1865; Seligo, 1895). These were followed by further reports of crayfish mortalities, where no other aquatic species were affected, in the Franco-German border region in the third quarter of the 19th century. From there a steady spread of infection occurred, principally in two directions: down the Danube into the Balkans and towards the Black Sea, and across the North German plain into Russia and from there south to the Black Sea and north-west to Finland and, in 1907, to Sweden. In the 1960s, the first outbreaks in Spain were reported, and in the 1980s further extensions of infection to the British Isles, Turkey, Greece and Norway followed (Alderman, 1996). The reservoir of the original infections in the 19th century was never established. *Orconectes* spp. were not known to have been introduced into

Europe until the 1890s, but the post-1960s extensions are largely linked to movements more recent introductions of North American crayfish ~~introduced more recently for purposes of crayfish farming~~ (Alderman, 1996). Escapes of ~~such the~~ introduced species ~~were almost impossible to prevent occurred~~ and *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii* are now widely naturalised in many parts of Europe.

As North American crayfish serve as a reservoir of *A. astaci*, any areas where North American crayfish species are found should be considered as areas where *A. astaci* is present (unless shown otherwise).

Australia and New Zealand have never experienced any outbreaks of infection with *A. astaci* crayfish plague to date and are currently considered free from the infection with *A. astaci* (OIE WAHID website, accessed June 2016).

2.3.4. Mortality and morbidity

When the infection first reaches a naïve population of highly susceptible crayfish species, high levels of mortality are usually observed within a short space of time, so that in areas with high crayfish densities the bottoms of lakes, rivers and streams are covered with dead and dying crayfish. A band of mortality will spread quickly from the initial outbreak site downstream, whereas upstream spread is slower. Where population densities of susceptible crayfish are low fewer zoospores will be produced, the spread of infection will be slower and evidence of mortality less dramatic. Water temperature may affect the speed of spread and this is most evident in low-density crayfish populations where animal-to-animal spread takes longer and challenge intensity will be lower. Lower water temperatures and reduced numbers of zoospores are associated with slower mortalities and a greater range of clinical signs in affected animals (Alderman *et al.*, 1987). Observations from Finland suggest that at low water temperatures, noble crayfish can be infected for several months without the development of noticeable mortalities (S. Viljamaa-Dirks, unpublished data).

On rare occasions, single specimens of the highly susceptible species have been found after a wave of infection with *A. astaci* crayfish plague has gone through a river or lake. This is most likely to be due to lack of exposure of these animals during an outbreak (animals may have been present in a tributary of a river or lake or in a part of the affected river/lake that was not reached by spores, or crayfish may have stayed in burrows during the epizootic crayfish plague wave). However, low-virulent strains of crayfish plague *A. astaci* have been described to persist in a water way, kept alive by a weak infection in the remnant population (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Although remnant populations of susceptible crayfish species remain in many European watersheds, the dense populations that existed 150 years ago are now heavily diminished (Alderman, 1996; Souty-Grosset *et al.*, 2006). Populations of susceptible crayfish may re-establish, but once population density and geographical distribution is sufficient for susceptible animals to come into contact with infection, new outbreaks of infection with *A. astaci* crayfish plague in the form of and large-scale mortalities will occur.

2.3.5. Environmental factors

Under laboratory conditions, the preferred temperature range at which the *A. astaci* mycelium grows slightly varies depending on the strain. In a study, which compared a number of *A. astaci* strains that had been isolated from a variety of crayfish species, mycelial growth was observed between 4 and 29.5°C, with the strain isolated from *Procambarus clarkii* growing better at higher temperatures compared to the other strains. Sporulation efficiency was similarly high for all strains tested between 4 and 20°C, but it was clearly reduced for the non-*P. clarkii* strains at 25°C and absent at 27°C. In contrast, sporulation still occurred in the *P. clarkii* strain at 27°C. The proportion of motile zoospores (out of all zoospores observed in a zoospore suspension) was almost 100% at temperatures ranging from 4–18°C, reduced to about 60% at 20°C and about 20% at 25°C in all but the *P. clarkii* strain. In the *P. clarkii* strain, 80% of the zoospores were still motile at 25°C, but no motile spores were found at 27°C (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

Field observations show that crayfish plague outbreaks of infection with *A. astaci* occur over a wide temperature range, and at least in the temperature range from 4–20°C. The velocity-rate of spread within a population depends on several factors, including water temperature. In a temperature range between 4 and 16°C, the speed of an epizootic epidemic is enhanced by higher water temperatures. At low water temperatures, the epizootic epidemic curve can increase very slowly and the period during which mortalities are observed can be several months (B. Oidtmann, unpublished data).

Anexo 20 (cont.)

In buffered, redistilled water, sporulation occurs between pH 5 and 8, with the optimal range being pH 5–7. The optimal pH range for swimming of zoospores appears to be in a pH range from 6.0–7.5, with a maximum range between pH 4.5 and 9.0 (Unestam, 1966).

Zoospore emergence is influenced by the presence of certain salts in the water. CaCl₂ stimulates zoospore emergence from primary cysts, whereas MgCl₂ has an inhibitory effect. In general, zoospore emergence is triggered by transferring the vegetative mycelium into a medium where nutrients are absent or low in concentration (Cerenius & Söderhäll, 1984b).

2.4. Control and prevention

Once *A. astaci* has been introduced into a population of highly susceptible crayfish species in the wild, the spread within the affected population cannot be controlled. Therefore, prevention of introduction is essential. The following measures are necessary to prevent introduction via identified pathways:

1. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
2. When fish-transfers of finfish are being planned, whether the water source should be assessed for the likelihood that it may harbour infected crayfish (including North American carrier crayfish) should be assessed.
3. Any ~~fish-movements~~ of finfish from the site of a current epizootic epidemic of infection with *A. astaci* crayfish plague carry a high risk of spread and should be avoided.
4. If ~~fish-movements~~ of finfish from a source containing North American crayfish are being planned, harvest methods at the source site should ensure that: a) crayfish are not accidentally co-transported; b) the transport water does not carry *A. astaci* spores, and, c) equipment is disinfected between use; d) the consignment does not become contaminated during transport.
5. The release of North American crayfish into the wild in areas where any of the highly susceptible species are present should be prevented. Once released, North American crayfish tend to spread, sometimes over long distances. If release into the wild is planned, then—Therefore prior to any planned release, a risk assessment should be conducted to estimate careful consideration needs to be given to the long-term potential consequences of such a release. Highly susceptible crayfish populations at a distance from the release site may eventually be affected.
6. Aquaculture facilities for the cultivation of crayfish are very rarely suitable for preventing the spread of crayfish from such sites. Therefore, should careful consideration need to be given as to whether such facilities should be established. Biosecurity measures to ensure crayfish do not escape from aquaculture facilities are extremely difficult to implement. Therefore, a risk assessment needs to be conducted to determine whether these facilities should be established.

Certain pathways of introduction, such as the release of North American crayfish by private individuals are difficult to control.

2.4.1. Vaccination

Currently, there is no evidence that vaccines offer long-term protection in crustaceans and even if this were not to be the case, vaccination of natural populations of crayfish is impossible-not practical.

2.4.2. Chemotherapy

No treatments are currently known that can successfully treat the highly susceptible crayfish species, once infected.

2.4.3. Immunostimulation

No immunostimulants are currently known that can successfully protect the highly susceptible crayfish species against infection and consequent disease due to *A. astaci* infection.

2.4.4. ~~Resistance-Breeding for resistance~~

In the 125 years since infection with *A. astaci* crayfish plague first occurred in Europe, there is little evidence of resistant populations of European crayfish. However, the fact that North American crayfish generally do not ~~are not very susceptible to~~ developing clinical disease suggests that selection for resistance may be possible and laboratory studies using attenuated strains of *A. astaci* might be successful. However, there are currently no published data from ~~referring to~~ such studies.

2.4.5. Restocking with resistant species

North American crayfish have been used in various European countries to replace the lost stocks of native crayfish. However, since North American crayfish is considered a susceptible species are potential hosts for *A. astaci*, restocking with North American crayfish may provide a reservoir would further the spread of *A. astaci*. This would minimise the chances for success of re-introduction of indigenous species. A risk assessment should be conducted to assist in decisions on restocking. ~~Given the high reproduction rates and the tendency of several North American crayfish species to colonise new habitats, restocking with North American crayfish species would largely prevent the re-establishment of the native crayfish species.~~

2.4.6. Blocking agents

No data available.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Limited information is available on the susceptibility of crayfish eggs to infection with *A. astaci*. Unestam & Söderhäll (1977) mention that they experimentally exposed *Astacus astacus* and *P. leniusculus* eggs to zoospore suspensions and were unable to induce infection. However, the details of these studies have not been published.

Although published data are lacking, disinfection of larvae, once infected, is unlikely to be successful, since *A. astaci* would be protected from disinfection by the crayfish cuticle, in which it would be present.

2.4.8. General husbandry practices

If a crayfish farm for highly susceptible species is being planned, it should be carefully investigated whether North American crayfish species are in the vicinity of the planned site or whether North American crayfish populations may be present upstream (for sites that are "online" on a stream or abstracting water from a stream), even if at a great distance upstream. If North American crayfish are present, there is a high likelihood that susceptible farmed crayfish will eventually become infected.

In an endemic area established site, where the highly susceptible species are being farmed, the following biosecurity recommendations should be followed to avoid an introduction of *A. astaci* onto the site:

- 1-6. General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when entering the site is entered; investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, finfish) only from sources known to be free from infection with *A. astaci*.
- 2-1. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
- 3-2. If fish transfers of finfish or crayfish are being planned, these should not come from streams or other waters that harbour potentially infected crayfish (either susceptible crayfish populations that are going through a current outbreak of infection with *A. astaci* crayfish plague or North American carrier crayfish).
- 4-3. North American crayfish should not be brought onto the site.
- 5-4. Finfish obtained from unknown freshwater sources or from sources, where North American crayfish may be present or a current outbreak of infection with *A. astaci* crayfish plague may be taking place, must not be used as bait or feed for crayfish, unless they have been subject to a temperature treatment to kill *A. astaci* (see Section 2.1.3).

Anexo 20 (cont.)

- ~~5-5.~~ Any equipment that is brought onto site should be disinfected.
- ~~6.~~ ~~General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when site investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, fish) only from sources known to be free of crayfish plague infection with *A. astaci*).~~

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

In the case of a suspected outbreak of ~~infection with *A. astaci* crayfish plague~~ in a population of highly susceptible crayfish species, the batch of crayfish selected ~~to identify for investigation for the presence of *A. astaci*~~ should ideally consist of: a) live crayfish showing signs of disease, ~~and~~ b) live crayfish appearing to be still healthy, ~~and~~ c) Dead crayfish that may also be suitable, although this will depend on their condition.

Live crayfish should be transported using polystyrene containers equipped with small holes to allow aeration, or an equivalent container. The temperature in the container should not exceed 16°C.

The container should provide insulation against major temperature differences outside the container. In periods of hot weather, freezer packs should be used to ~~avoid ensure that~~ temperatures ~~are not~~ deleterious to the animals. These can be attached at the inside bottom of the transport container. ~~However, if~~ The crayfish must ~~however~~ be protected from direct contact with freezer packs. This can be achieved using, for instance, cardboard or a several layers of newspaper.

Crayfish should be transported in a moist atmosphere, for example using moistened wood shavings/wood wool, newspaper or grass/hay. Unless transport water is sufficiently oxygenated, live crayfish should not be transported in water, as they may suffocate ~~from lack of oxygen~~.

The time between sampling of live animals and delivery to the investigating laboratory should not exceed 24 hours.

Should only dead animals be found at the site of a suspected outbreak, these might still be suitable for diagnosis. Depending on the condition they are in, they can either be: a) transported chilled (if they appear to have died only very recently), or, b) placed in non-methylated ethanol (minimum concentration 70%; see Section 3.2).

Animals showing advanced decay are unlikely to give a reliable result, however, if no other animals are available, these might still be tested.

3.2. Preservation of samples for submission

The use of non-preserved crayfish is preferred, as described above. If, ~~for practical reasons~~, transport of recently dead or moribund crayfish cannot be arranged ~~quickly~~, crayfish may be fixed in ethanol (minimum 70%). However, fixation may reduce test sensitivity. The crayfish:ethanol ratio should ideally be 1:10 (1 part crayfish, 10 parts ethanol).

3.3. Pooling of samples

Not recommended.

3.4. Best organs or tissues

In highly susceptible species, the tissue recommended for sampling is the soft abdominal cuticle, which can be found on the ventral side of the abdomen.

In the North American crayfish species, sampling of soft abdominal cuticle, uropods and telson are recommended.

3.5. Samples or tissues that are not suitable

Autolytic material is not suitable for analysis.

4. Diagnostic methods

Large numbers of dead crayfish of the highly susceptible species with the remaining aquatic fauna being unharmed gives rise to a suspicion that the population may be affected by infection with *A. astaci* crayfish plague. Clinical signs of infection with *A. astaci* crayfish plague include behavioural changes and a range of visible external lesions. However, clinical signs are of limited diagnostic value. The main available diagnostic methods are PCR and isolation of the pathogen in culture media followed by confirmation of its identity. Isolation can be difficult and requires that samples are in good condition when they arrive at the investigating diagnostic laboratory (Oidtmann *et al.*, 1999). Molecular methods are now available that are less dependent on speed of sample delivery and can deal with a greater range of samples compared with methods relying on agent isolation (Oidtmann *et al.*, 2006; Vrålstad *et al.*, 2009).

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Highly susceptible species

Gross clinical signs are extremely variable and depend on challenge severity and water temperatures. The first sign of an epizootic crayfish plague mortality may be the presence appearance of numbers of crayfish at large during daylight (crayfish are normally nocturnal), some of which may show evident loss of co-ordination, in their movements, and easily falling over onto their backs and remaining unable to right themselves. Often, however, unless waters are carefully observed, the first sign that there is a problem will of an outbreak may be the presence of large numbers of dead crayfish in a river or lake (Alderman *et al.*, 1987)

In susceptible species, where sufficient numbers of crayfish numbers are sufficient present to allow infection to spread rapidly disease spread, particularly at summer water temperatures, infection will spread quickly and all the highly susceptible native crayfish within stretches of over 50 km may die lose all their highly susceptible native crayfish within less than 21 days or less from the first observed mortality (D. Alderman, pers. comm.). Infection with *A. astaci* Crayfish plague has unparalleled severity of effect, since infected susceptible crayfish generally do not survive. It must be emphasised, however, that the presence of large numbers of dead crayfish, even in crayfish plague affected watersheds, is not on its own sufficient for diagnosis. The general condition of other aquatic fauna must be assessed. Mortality or disappearance of other aquatic invertebrates, as well as crayfish, even though fish survive, may indicate pollution (e.g. insecticides such as cypermethrin have been associated with initial misdiagnoses).

North American crayfish species

Melanised cuticle has sometimes been suggested as a sign of infection with *A. astaci*. However, melanisation can have a wide variety of causes and is not a specific sign of infection with *A. astaci* infection. Conversely, animals without signs of melanisation are often infected.

4.1.2. Behavioural changes

Highly susceptible species

Infected crayfish of the highly susceptible crayfish species may leave their hides during daytime (which is not normally seen in crayfish), have a reduced escape reflex, and progressive paralysis. Dying crayfish are sometimes found lying on their backs. The animals are often no longer able to upright themselves. Occasionally, the infected animals can be seen trying to scratch or pinch themselves.

North American crayfish species

Infected North American crayfish do not show any behavioural changes (B. Oidtmann, unpublished data).

Anexo 20 (cont.)**4.2. Clinical methods****4.2.1. Gross pathology***Highly susceptible species*

Depending on a range of factors, the foci of infection in crayfish may be seen by the naked eye or may not be discernable despite careful examination. Such foci can best be seen under a low power stereo microscope and are most commonly recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases a brown colouration of cuticle and muscle may occur, and in others, hyphae are visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle itself. Sites for particular examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and abdomen, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint and finally the gills.

North American crayfish species

Infected North American crayfish can sometimes show melanised spots in their soft cuticle, for example the soft abdominal cuticle. However, ~~it must be stressed that these melanisations can be caused by mechanical injuries or infections with other water moulds and are very unspecific.~~ Conversely, visible melanisation is not always associated with carrier status. Infected animals can appear completely devoid of visible melanisations.

4.2.2. Clinical chemistry

No suitable methods available.

4.2.3. Microscopic pathology

Unless the selection of tissue for fixation has been well chosen, *A. astaci* hyphae can be difficult to find in stained preparations. ~~A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used.~~ Additionally ~~However,~~ such material does not prove that any hyphae observed are those of *A. astaci*. ~~A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used.~~

See also Section 4.2.4.

4.2.4. Wet mounts

Small pieces of soft cuticle excised from the regions mentioned above (Section 4.2.1) and examined under a compound microscope using low to medium power will confirm the presence of aseptate fungal hyphae 7–9 µm wide. The hyphae can usually be found pervading the whole thickness of the cuticle, forming a three-dimensional network of hyphae in heavily affected areas of the cuticle. The presence of host haemocytes and possibly some melanisation closely associated with and encapsulating the hyphae give good presumptive evidence that the hyphae represent a pathogen rather than a secondary opportunist invader. In some cases, examination of the surface of such mounted cuticles will demonstrate the presence of characteristic *A. astaci* sporangia with clusters of encysted primary spores (see Section 4.3).

4.2.5. Smears

Not suitable.

4.2.6. Fixed sections

See section 4.2.3.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not suitable.

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

As indicated above (Section 4.2.4.), presumptive identification of *A. astaci* may be made from i) the presence of hyphae pervading the cuticle and ii) sporangia of the correct morphological types (see below) on the surface of crayfish exoskeletons.

4.3.1.1.2. Smears

Not suitable.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

Highly susceptible species

Care should be taken that animals to be used for isolation of *A. astaci* via culture cultivation are not exposed to desiccation.

Isolation methods have been described by Benisch (1940); Nyhlen & Unestam (1980); Alderman & Polglase (1986); Cerenius *et al.* (1988); Oidtmann *et al.* (1999) and Viljamaa-Dirks (2006).

Isolation medium (IM) according to Alderman & Polglase (1986): 12.0 g agar; 1.0 g yeast extract; 5.0 g glucose; 10 mg oxolinic acid; 1000 ml river water; and 1.0 g penicillin G (sterile) added after autoclaving and cooling to 40°C. River water is defined as any natural river or lake water, as opposed to demineralised water.

Any superficial contamination should first be removed from the soft intersternal abdominal cuticle or any other areas from which cuticle will be excised by thoroughly wiping the cuticle with a wet (using autoclaved H₂O) clean disposable paper towel. Simple aseptic excision of infected tissues, which are then placed as small pieces (3–5 mm²) on the surface of isolation medium plates, will normally result in successful isolation of *A. astaci* from moribund or recently dead (<24 hours) animals. Depending on a range of factors, foci of infection in crayfish may be easily seen by the naked eye or may not be discernable despite careful examination. Such foci can best be seen under a low-power stereo microscope and are most commonly recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases, a brown colouration of cuticle and muscle may occur, and in others, hyphae are visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle itself. Sites for particular examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and tail, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint and finally the gills.

Provided that care is taken in excising infected tissues for isolation, contaminants need not present significant problems. Small pieces of cuticle and muscle may be transferred to a Petri dish of sterile water and there further cut into small pieces with sterile instruments for transfer to isolation medium (IM). Suitable instruments for such work are scalpels, fine forceps and scissors.

To reduce potential contamination problems, disinfection of the cuticle with ethanol and melting a sterile glass ring 1–2 mm deep into the isolation medium can improve isolation success (Nyhlen & Unestam, 1980; Oidtmann *et al.*, 1999). The addition of potassium tellurite into the area inside the glass ring has been described (Nyhlen & Unestam, 1980).

Anexo 20 (cont.)

Inoculated agar can be incubated at temperatures between 16°C and 24°C. The Petri dishes should be sealed with a sealing film (e.g. Parafilm¹) to avoid desiccation.

On IM agar, growth of new isolates of *A. astaci* is almost entirely within the agar except at temperatures below 7°C, when some superficial growth occurs. Colonies are colourless. Dimensions and appearance of hyphae are much the same in crayfish tissue and in agar culture. Vegetative hyphae are aseptate and (5)7–9(10) µm in width (i.e. normal range 7–9 µm, but observations have ranged between 5 and 10 µm). Young, actively growing hyphae are densely packed with coarsely granular cytoplasm with numerous highly refractile globules (Alderman & Polglase, 1986). Older hyphae are largely vacuolate with the cytoplasm largely restricted to the periphery, leaving only thin strands of protoplasm bridging the large central vacuole. The oldest hyphae are apparently devoid of contents. Hyphae branch profusely, with vegetative branches often tending to be somewhat narrower than the main hyphae for the first 20–30 µm of growth.

When actively growing thalli or portions of thalli from broth or agar culture are transferred to river water (natural water with available cations encourages sporulation better than distilled water), sporangia form readily in 20–30 hours at 16°C and 12–15 hours at 20°C. Thalli transferred from broth culture may be washed with sterile river water in a sterile stainless steel sieve, before transfer into fresh sterile river water for induction of sporulation. Thalli in agar should be transferred by cutting out a thin surface sliver of agar containing the ~~fungus-water mould~~ so that a minimum amount of nutrient-containing agar is transferred. Always use a large volume of sterile river water relative to the amount of ~~fungus-water mould~~ being transferred (100:1). Sporangia are myceloid, terminal or intercalary, developing from undifferentiated vegetative hyphae. The sporangial form is variable: terminal sporangia are simple, developing from new extramatrical hyphae, while intercalary sporangia can be quite complex in form. Intercalary sporangia develop by the growth of a new lateral extramatrical branch, which forms the discharge tube of the sporangium. The cytoplasm of such developing discharge tubes is noticeably dense, and these branches are slightly wider (10–12 µm) than ordinary vegetative hyphae. Sporangia are delimited by a single basal septum in the case of terminal sporangia and by septa at either end of the sporangial segment in intercalary sporangia. Such septa are markedly thicker than the hyphal wall and have a high refractive index. Successive sections of vegetative hypha may develop into sporangia, and most of the vegetative thallus is capable of developing into sporangia.

Within developing sporangia, the cytoplasm cleaves into a series of elongate units (10–25 × 8 µm) that are initially linked by strands of protoplasm. Although the ends of these cytoplasmic units become rounded, they remain elongate until and during discharge. Spore discharge is achlyoid, that is, the first spore stage is an aplanospore that encysts at the sporangial orifice and probably represents the suppressed saprolegniaceous primary zoospore. No evidence has been found for the existence of a flagellated primary spore, thus, in this description, the terms 'sporangium' not 'zoosporangium' and 'primary spore' not 'primary zoospore' have been used. Discharge is fairly rapid (<5 minutes) and the individual primary spores (=cytoplasmic units) pass through the tip of the sporangium and accumulate around the sporangial orifice. The speed of cytoplasmic cleavage and discharge is temperature dependent. At release, each primary spore retains its elongate irregularly amoeboid shape briefly before encystment occurs.

Encystment is marked by a gradual rounding up followed by the development of a cyst wall, which is evidenced by a change in the refractive index of the cell. The duration from release to encystment is 2–5 minutes. Some spores may drift away from the spore mass at the sporangial tip and encyst separately. Formation of the primary cyst wall is rapid, and once encystment has taken place the spores remain together as a coherent group and adhere well to the sporangial tip so that marked physical disturbance is required to break up the spore mass.

Encysted primary spores are spherical, (8)9–11(15) µm in diameter, and are relatively few in number, (8)15–30(40) per sporangium in comparison with other *Aphanomyces* spp. Spores remain encysted for 8–12 hours. Optimum temperatures for sporangial formation and discharge for the majority of European isolates of *A. astaci* are between 16 and 24°C (Alderman & Polglase, 1986).

¹ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

For some isolates, particularly from Spanish waters, slightly higher optimal temperatures may prevail (Dehus *et al.*, 1999). The discharge of secondary zoospores from the primary cysts peaks at 20°C and does not occur at 24°C. In new isolates of *A. astaci*, it is normal for the majority of primary spore cysts to discharge as secondary zoospores, although this varies with staling in long-term laboratory culture. Sporangial formation and discharge occurs down to 4°C. *A. astaci* does not survive at -5°C and below for more than 24 hours in culture, although -20°C for >48 hours may be required in infected crayfish tissues, nor does it remain viable in crayfish tissues that have been subject to normal cooking procedures (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002).

In many cases, some of the primary spores are not discharged from the sporangium and many sporangia do not discharge at all. Instead, the primary spores appear to encyst *in situ* within the sporangium, often develop a spherical rather than elongate form and certainly undergo the same changes in refractive index that mark the encystment of spores outside the sporangium. This within-sporangial encystment has been observed on crayfish. Spores encysted in this situation appear to be capable of germinating to produce further hyphal growth.

Release of secondary zoospores is papillate, the papilla developing shortly before discharge. The spore cytoplasm emerges slowly in an amoeboid fashion through a narrow pore at the tip of a papilla, rounds up and begins a gentle rocking motion as a flagellar extrusion begins and the spore shape changes gradually from spherical to reniform. Flagellar attachment is lateral (Scott, 1961); zoospores are typical saprolegniaceous secondary zoospores measuring 8 × 12 µm. Active motility takes some 5–20 minutes to develop (dependent on temperature) and, at first, zoospores are slow and uncoordinated. At temperatures between 16 and 20°C, zoospores may continue to swim for at least 48 hours (Alderman & Polglase, 1986).

Test sensitivity and specificity of the cultivation method can be very variable depending on the experience of the examiner, but in general will be lower than the PCR.

North American crayfish species

Isolation of *A. astaci* by culture following the methods described for the highly susceptible species usually fails. Currently, the recommended method for detecting infection in such species is by PCR.

4.3.1.2.2. *Antibody-based antigen detection methods*

None available.

4.3.1.2.3. *Molecular techniques*

Animals

In the case of a suspected outbreak of the disease in highly susceptible crayfish species, moribund or recently dead (<24 hours) crayfish are preferably selected for DNA extraction. Live crayfish can be killed using chloroform. If the only animals available are animals that have died a few days prior to DNA extraction, they can be tested, but a negative PCR result must be interpreted with caution as DNA degradation may have occurred. Endogenous controls can be used to assess whether degradation may have occurred. These should preferably use host tissues richer in host cells compared to the cuticle; cuticle itself contains very few host cell nuclei. If circumstances prevent delivery of crayfish to the specialist laboratory within 24 hours, fixation in 70% ethanol (≥3:10:1 ethanol to crayfish tissue) is possible, but may result in a reduction of the DNA yield.

DNA extraction

Where animals of the highly susceptible species are analysed, the soft abdominal cuticle is the preferred sample tissue for DNA extraction. Any superficial contamination should first be removed by thoroughly wiping the soft abdominal cuticle with a wet (using autoclaved H₂O) clean disposable paper towel. The soft abdominal cuticle is then excised and 30–50 mg ground in liquid nitrogen to a fine powder using a pestle and mortar (alternative grinding techniques may be used, but should be compared with the liquid nitrogen method before routine use). For carrier identification, 30–50 mg tissue from each soft abdominal cuticle, and telson and uropods are sampled and processed separately. DNA is extracted from the ground cuticle using a proteinase K-based DNA extraction method (e.g. DNeasy tissue kit; Qiagen, Hilden, Germany; protocol for insect tissue) following the manufacturer's instructions (Oidtmann *et al.*, 2006) or using a CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)-based assay (Vrålstad *et al.*, 2009). Negative controls should be run alongside the samples. Shrimp tissues may be used as negative controls.

Anexo 20 (cont.)

4.3.1.2.3.1. PCR

Several PCR assays have been developed with varying levels of sensitivity and specificity. Two assays are described here that have proven highly sensitive and specific. Both assays target the ITS (internal transcribed spacer) region of the nuclear ribosomal gene cluster within the *A. astaci* genome. As should be standard for any PCR-based diagnostic tests, negative controls should be run alongside the samples to control for potential contamination. Environmental controls (using for example shrimp tissue as described above) and extraction blank controls from the DNA extraction should be included along with 'no template' PCR controls (template DNA replaced with molecular grade water). The no template PCR controls should include an environmental PCR control left open during pipetting of sample DNA.

Method 1:

This conventional PCR assay uses species-specific primer sites located in the ITS1 and ITS2 regions. Forward primer (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3' and reverse primer (BO 640) 5'-CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3'. The PCR is carried out in a 50 µl reaction volume containing 1 × PCR buffer 75 mM Tris/HCl, pH 8.8, 20 mM [NH₄]₂SO₄, 0.01% (v/v) Tween 20), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dTTP, and dGTP, 0.5 µM of each primer, and 1.25 units of DNA polymerase (e.g. Thermoprime Plus DNA Polymerase; AB Gene, Epsom, UK) or equivalent Taq polymerase and 2 µl DNA template. The mixture is denatured at 96°C for 5 minutes, followed by 40 amplification cycles of: 1 minute at 96°C, 1 minute at 59°C and 1 minute at 72°C followed by a final extension step of 7 minutes at 72°C. Amplified DNA is analysed by agarose gel electrophoresis. The target product is a 569 bp fragment. Confirmation of the identity of the PCR product by sequencing is recommended. The assay consistently detects down to 500 fg of genomic target DNA or the equivalent amount of ten zoospores submitted to the PCR reaction (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Method 2:

This assay is a TaqMan minor groove binder (MGB) real-time PCR assay that targets a 59 bp unique sequence motif of *A. astaci* in the ITS1 region. Forward primer AphAstITS-39F (5'-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-3'), reverse primer AphAstITS-97R (5'-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-3') and TaqMan MGB probe AphAstITS-60T (5'-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-3') labelled with the fluorescent reporter dye FAM at the 5'-end and a non-fluorescent quencher MGBNFQ at the 3'-end. Real-time PCR amplifications are performed in a total volume of 25 µl containing 12.5 µl PCR Master Mix (e.g. Universal PCR Master Mix or Environmental PCR Master Mix, Applied Biosystems), 0.5 µM of the forward (AphAstITS-39F) and reverse (AphAstITS-97R) primers, 0.2 µM 200 nM of the MGB probe (AphAstITS-60T), 1.5 µl molecular grade water and 5 µl template DNA (undiluted and tenfold diluted). Amplification and detection is performed in Optical Reaction Plates sealed with optical adhesive film or similar on a real-time thermal cycler. The PCR programme consists of an initial decontamination step of 2 minutes at 50°C to allow optimal UNG enzymatic activity, followed by 10 minutes at 95°C to activate the DNA polymerase, deactivate the UNG and denature the template DNA, and successively 50 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 58°C. A dilution series with reference DNA of known DNA content should be run alongside with the samples.

The absolute limit of detection of this assay was reported as approximately 5 PCR forming units (= target template copies), which is equivalent to less than one *A. astaci* genome (Vrålstad *et al.*, 2009). Another study reported consistent detection down to 50 fg using this assay (Tuffs & Oidtmann, 2011).

The diagnostic test sensitivity of either assay largely depends on the quality of the samples taken. Where an ~~an crayfish plague~~ outbreak is investigated, the test sensitivity in animals that had died of ~~infection with *A. astaci* crayfish plague~~ 12 hours or less prior to sampling or in live crayfish showing clear clinical signs of disease is expected to be high. Studies to investigate the effect of sensitivity loss caused by deteriorating sample quality (for instance because of delayed sampling, processing or unsuitable storage of samples) have not been carried out. It is recommended that multiple (5–10) crayfish be tested, to compensate for variations in sample quality and invasion site of the pathogen.

Analytical test specificity has been investigated (Oidtmann *et al.*, 2006; Tuffs & Oidtmann, 2011; Vrålstad *et al.*, 2009) and no cross reaction was observed. However, owing to the repeated discovery of new *Aphanomyces* strains, sequencing is recommended to confirm diagnosis. In the case of the real-time PCR assay, this requires separate amplification of a PCR product, either using the primers as described in method 1, or using primers ITS 1 and ITS4 (see section 'sequencing' below).

4.3.1.2.3.2. Sequencing

A PCR product of 569 bp can be amplified using primers BO42 and BO640. The size of the PCR amplicon is verified by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel (e.g. using the Freeze n' Squeeze DNA purification system, Anachem, Luton, UK). Both DNA strands must be sequenced using the primers used in the initial amplification. The consensus sequence is generated using sequence analysis software and compared with published sequences using an alignment search tool such as BLAST. If 100% identity between the submitted sequence and the published sequences is found, then the amplified product is *A. astaci*. If the sequence is not 100% identical, further sequencing should be performed using primers ITS-1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') and ITS-4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *et al.*, 1990), which generate an amplicon of 757 bp that provides sequence data in the same region, but expanded at both ends relative to the sequence generated by primers BO42 and BO640. This expanded sequence should confirm the identity of the pathogen to the species level.

Highly susceptible species

PCR (conventional or real-time) is a suitable method to investigate suspected outbreaks of infection with *A. astaci* crayfish plague outbreaks (see Section 7.1). Where the conditions of a suspect case are fulfilled, amplification of a PCR product of the expected size using conventional PCR or real-time PCR can be considered sufficient as a confirmatory diagnosis, if a high level of template DNA is detected. Where low levels of template DNA are detected (weak amplification) or the samples are investigated from a site not meeting the conditions of a suspect case, it is recommended to sequence PCR products generated as described under the section sequencing to confirm the diagnosis.

4.3.1.2.4. Agent purification

None available.

4.3.2. Serological methods

None available.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for diagnosis of clinical diseases resulting from infection with *A. astaci* in highly susceptible species are listed in Table 5.1. Methods for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection with *A. astaci* in highly susceptible species are displayed in Table 5.2.

Clinical disease is extremely rare in North American crayfish. Therefore a rating of methods for diagnosing clinical disease in these species is not provided. However, methods for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection in North American crayfish are listed in Table 5.3.

The designations used in the tables indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Anexo 20 (cont.)

Table 5.1. ~~Crayfish plague~~ Diagnostic methods for infection with *A. astaci* in highly susceptible crayfish species

| Method | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
| Gross and microscopic signs | b | d |
| Isolation and culture | b | d |
| Histopathology | d | d |
| PCR | a | b or a ¹ |
| Real-time PCR | a | b or a ¹ |
| Sequencing of PCR products | n/a | a |
| Transmission EM | ∅-n/a | ∅-n/a |
| Antibody-based assays | n/a | n/a |
| <i>In-situ</i> DNA probes | n/a | n/a |

PCR = polymerase chain reaction; EM = electron microscopy;
n/a = not applicable or not available;
1 = see definitions of confirmed case in Section 7.1.

Table 5.2. Methods for targeted surveillance in highly susceptible crayfish species to declare freedom from ~~crayfish plague~~ infection with *A. astaci*

| Method | Screening method | Confirmatory method |
|--|------------------|----------------------------|
| Inspection for gross signs and mortality | a | c |
| Microscopic signs (wet mounts) | c | c |
| Isolation and culture | c | b |
| Histopathology | d | d |
| PCR | a | b, possibly a ¹ |
| Real-time PCR | a | b, possibly a ¹ |
| Sequencing of PCR products | n/a | a |
| Transmission EM | ∅-n/a | ∅-n/a |
| Antibody-based assays | n/a | n/a |
| <i>In-situ</i> DNA probes | n/a | n/a |

PCR = polymerase chain reaction; EM = electron microscopy;
n/a = not applicable or not available;
1 = see definitions of confirmed case in Section 7.1.

Table 5.3. *Methods for targeted surveillance in North American crayfish species to declare freedom from ~~crayfish~~ plague infection with *A. astaci**

| Method | Screening method | Confirmatory method |
|-----------------------------|------------------|---------------------|
| Gross and microscopic signs | d | d |
| Isolation and culture | c | c |
| Histopathology | d | d |
| PCR | a | b |
| Real-time PCR | a | b |
| Sequencing of PCR products | n/a | a |
| Transmission EM | ∅-n/a | ∅-n/a |
| Antibody-based assays | n/a | n/a |
| <i>In-situ</i> DNA probes | n/a | n/a |

/PCR = polymerase chain reaction; EM = electron microscopy;
n/a = not applicable or not available

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from ~~crayfish~~ plague infection with *(Aphanomyces astaci)*

6.1. Highly susceptible species

Crayfish farms keeping susceptible crayfish should be inspected at a frequency outlined in Chapter 2.2.0 *General information* (on diseases of crustaceans). A history of no mortalities (this does not include losses due to predation) occurring within the population over a period of at least 12 months combined with absence of clinical signs, as well as gross and microscopic pathology at the time of inspection are suitable methods for this purpose. Surveillance of wild crayfish stocks presents greater problems, especially where the species concerned is endangered. As movements of both finfish and crayfish stocks from infected waters present a risk of disease transmission, monitoring the status of crayfish populations to confirm that they remain healthy, is necessary.

In a crayfish farm setting, an infection with ~~crayfish plague~~ *A. astaci* should ~~would~~ be noticed relatively quickly, due to the rapid a relatively quick onset of mortalities in the farmed crayfish population.

To undertake targeted surveillance, regular inspections are recommended, where samples are collected if there is any suspicion of mortality or disease. If moribund or dead animals are found, it is recommended that samples are analysed by PCR and if PCR returns a positive result, that PCR products generated using primers 42 and 640, or ITS-1 and -4 are sequenced and the sequences analysed.

6.2. North American crayfish species

In North American crayfish species, animals should be sampled and analysed using one of the PCR assays described above. For reasons of higher sensitivity, the real-time PCR assay is the preferred method. This applies to both farmed and naturalised stocks, and surveillance programmes need to take into account the risks of indirect transmission by movements of fish.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

In highly susceptible crayfish species, infection with *A. astaci* shall be ~~is~~ suspected if at least one of the following criteria is met:

Anexo 20 (cont.)

- i) Any extensive mortality solely of the highly susceptible species of freshwater crayfish where all other aspects of the flora and fauna, particularly other aquatic crustaceans, are normal and healthy.
- ii) The presence of gross and microscopic signs consistent with infection with *A. astaci*.
- iii) Isolation and culture of a water mould consistent with *A. astaci*.
- iv) A positive result for *A. astaci* by PCR.
- v) A positive result for *A. astaci* ~~or by~~ real-time PCR.

North American crayfish species

~~In Any population of North American crayfish is generally to be regarded as potentially infected with *A. astaci* species, infection with *A. astaci* shall be is~~ suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result for *A. astaci* by PCR.
- ii) A positive result for *A. astaci* by real-time PCR.

7.2. Definition of confirmed case*Highly susceptible crayfish species*

~~Confirmation of presence of *A. astaci* by PCR or real time PCR and sequencing.~~

~~In highly susceptible crayfish species, infection with *A. astaci* shall be is~~ confirmed if at least two of the following criteria are met:

- i) Isolation and culture of a water mould consistent with *A. astaci*.
- ii) A positive result for *A. astaci* by PCR.
- iii) A positive result for *A. astaci* ~~or by~~ real-time PCR.
- iv) Sequenced PCR products that match known sequences of *A. astaci*.

~~Where (1) a crayfish mortality meets the definition of a suspect case and (2) PCR results indicate the presence of high levels of template DNA (in case of real time PCR, this corresponds to Ct values ≤ 30), and (3) If the investigated suspect case is not the first case of detection of *A. astaci* in the a country or region zone previously considered free from infection with *A. astaci*, sequencing of PCR products should be conducted for; the PCR result alone may be considered sufficient as a confirmation.~~

~~In North American crayfish species, infection with *A. astaci* shall be is~~ confirmed if at least two of the following criteria are met:

- i) A positive result for *A. astaci* by PCR
- ii) A positive result for *A. astaci* ~~or by~~ real-time PCR
- iii) Sequenced PCR products that match known sequences of *A. astaci*

North American crayfish species

~~Confirmation of presence of *A. astaci* by PCR or real time PCR and sequencing~~

8. References

ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 603–632.

ALDERMAN D.J. (2000). Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*. Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia.

~~ALDERMAN D.J., HOLDICH D. & REEVE I. (1990). Signal crayfish as vectors in crayfish plague in Britain. *Aquaculture*, **86**, 3–6.~~

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquacult. Fish. Manage.*, *Aquac. Res.*, **16**, 203–205.

ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.

ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L., FRAYLING M. & HOGGER J. (1984). Crayfish plague in Britain. *J. Fish Dis.*, **7**, 401–405.

BENISCH J. (1940). Kuenstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.

CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984a). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.

CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984b). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Mycol.*, **8**, 370–377.

CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshw. Crayfish*, **7**, 131–144.

DEHUS P., BOHL E., OIDTMANN B., KELLER M., LECHLEITER S. & PHILLIPSON S. (1999). German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to Make the Best of a Bad Situation?), Gherardi F. & Holdich D.M., eds. A.A Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp. 149–160.

DIEGUEZ DIÉGUEZ-URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL SÖDERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.

EDSMAN L. (2004). The Swedish story about import of live crayfish. *BFPP Bull. Fr. Peche Prot. Milieux Aquat.*, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **372–373**, 281–288.

HUANG, T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL SÖDERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–40 **9**.

NINNI A.P. (1865). Sulla mortalita dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e piu particalarmenta nella provincia trevigiana. *Atti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.

NYHLÉN NYHLÉN L. & UNESTAM T. (1980). Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 187–197.

OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.

OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.

Anexo 20 (cont.)

OIDTMANN B., SCHMID I., ROGERS D. & HOFFMANN R. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshw. Crayfish*, **12**, 303–312.

~~OIDTMANN B., THRUSH M., ROGERS D. & PEELER E. (2005). Pathways for transmission of crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, in England and Wales. Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Nairn, Inverness, Scotland, 30.03–01.04.05, Poster.~~

RAHE R. & SOYLU E. (1989). Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 10–15.

REYNOLDS J.D. (2002). Growth and reproduction. *In: Biology of Freshwater Crayfish*, Holdich D.M., ed. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 152–191.

SCHRIMPF A., SCHMIDT T. & SCHULZ R. (2014). Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquatic Invasions Aquat. Invasions*, **9**, 203–209.

SCOTT W.W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Virginia Agricultural Research Station Technical Bulletin*, **151**, 1–95.

SELIGO A. (1895). Bemerkungen ueber die Krebspest, Wasserpest, Lebensverhaeltnisse des Krebses. *Zeitschrift fuer Fischerei und deren Hilfswissenschaften*, **3**, 247–261.

SKURDAL J. & QVENILD T. (1986). Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshw. Crayfish*, **6**, 182–186.

SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFFNER P. (eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.

STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDBSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.

STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, **160**, 99–107.

SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.

TUFFS S. & OIDTMANN B. (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153**, 345–353.

UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiol. Plant.*, **19**, 1110–1119.

UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiol. Plant.*, **22**, 221–235.

UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute Freshw. Res. Drottningholm*, **49**, 202–206.

UNESTAM T. (1976). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**, 349–359.

UNESTAM T. & SÖDERHÅLL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshw. Crayfish*, **3**, 321–331.

UNESTAM T. & WEISS D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 77–90.

VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **31**, 182–188.

VRÅLSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R. E., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRÅLSTAD T., KNUITSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for Crayfish plague (infection with *Aphanomyces astaci*) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*)

NB: FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

1. Scope

~~Infection with~~ infectious hypodermal and haematopoietic necrosis ~~virus~~ (IHHN) ~~disease means is caused by~~ infection with ~~the pathogenic agent~~ infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), ~~of the~~ Genus *Penstylidensovirus*, Family *Parvoviridae*, ~~g~~Genus *Penstylidensovirus* in the Family *Parvoviridae* (Bonami & Lightner, 1991; Bonami *et al.*, 1990; Lightner, 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b; Lotz *et al.*, 1995; Tang & Lightner, 2002).

~~Synonyms:~~The International Committee on Taxonomy of Viruses has assigned IHHNV (a ~~parvovirus~~) as a tentative species in the genus ~~*Brevidensovirus*, Family *Parvoviridae*~~ with the species name of PstDNV (for ~~*Penaeus stylirostris* densovirus~~) *Decapod penstylidensovirus 1* (Fauquet *et al.*, 2005 ~~King *et al.*, 2012~~). For the purpose of this *Aquatic Manual*, most references to the viral agent of IHHN will be as IHHNV.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

IHHNV is the smallest of the known penaeid shrimp viruses. The ~~IHHN~~-virion is a 20–22 nm, non-enveloped icosahedron, with a density of 1.40 g ml⁻¹ in CsCl, contains linear single-stranded DNA with an estimated a size of 3.9 kb, and has a capsid with four polypeptides of molecular weight 74, 47, 39, and 37.5 kD (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000; GenBank AF218266).

At least two distinct genotypes of IHHNV have been identified (Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003b): Type 1 is from the Americas and East Asia (principally the Philippines). Type 2 is from South-East Asia. These genotypes are infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon*. Two ~~putative related~~ sequences homologous to part of the IHHNV genome are found embedded in the genome of penaeids. These were initially described as Type 3A from East Africa, India and Australia, and Type 3B from the western Indo-Pacific region including Madagascar, Mauritius and Tanzania (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). ~~There is evidence that these sequences are not infectious to *P. vannamei* and *P. monodon* (Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003b; 2007). IHHNV type 3A and type 3B related sequences have been found inserted into the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Tissues containing the putative IHHNV-homologous sequences in the *P. monodon* genome are not infectious to the susceptible representative-host species *P. vannamei* and *P. monodon* (Lightner *et al.*, 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer sets 309F/309R can distinguish the infectious forms of IHHNV from non-infectious forms. Primer sets MG831F/MG831R will distinguish the non-infectious forms of IHHNV.~~

2.1.2. Survival outside the host

No data.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

~~IHHNV is believed to be the most a stable virus of the known penaeid shrimp viruses. Infected virus;~~ infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze-thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1987; 2009).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

Anexo 21 (cont.)

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), yellowleg shrimp (*P. californiensis*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern white shrimp (*P. setiferus*), blue shrimp (*P. stylirostris*), and white leg shrimp (*P. vannamei*).

Most penaeid species can be infected with IHNV, including the principal cultured species, *P. monodon* (black tiger shrimp/prawn), *P. vannamei* (Pacific white shrimp), and *P. stylirostris* (Pacific blue shrimp).

IHNV infections are most severe in the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*, where the virus can cause acute epizootics and mass mortality (> 90%). In *P. stylirostris*, the juvenile and subadult life stages are the most severely affected (Bell & Lightner, 1984; 1987; Brock & Lightner 1990; Brock *et al.*, 1983; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1983a).

IHNV causes the chronic disease runt-deformity syndrome (RDS) in *P. vannamei* in which reduced, irregular growth and cuticular deformities, rather than mortalities, are the principal effects (Bray *et al.*, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Castillo *et al.*, 1993; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner, 1996a; 1996b; Motte *et al.*, 2003). IHNV infection in *P. monodon* is usually subclinical, but RDS, reduced growth rates and reduced culture performance have been reported in IHNV infected stocks (Chayaburakul *et al.*, 2004; Primavera & Quinitio, 2000).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing a species as susceptible to infection with IHNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Evidence is lacking for this species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is IHNV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: northern pink shrimp (*P. duorarum*), western white shrimp (*P. occidentalis*), kuruma prawn (*P. japonicus*), green tiger prawn (*P. semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, Argentine stiletto shrimp (*Artemesia longinaris*), Cuata swimcrab (*Callinectes arcuatus*), Mazatlan sole (*Achirus mazatlanus*), yellowfin mojarra (*Gerres cinereus*), tilapias (*Oreochromis* sp.), Pacific piquitinga (*Lile stolifera*) and blackfin snook (*Centropomus medius*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

IHNV has been ~~detected~~ demonstrated in all life stages (i.e. eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) of *P. vannamei*. Eggs, produced by IHNV-infected females with high virus loads, were found to generally fail to develop and hatch. Those nauplii produced from infected broodstock that do hatch have a high prevalence of infection with IHNV infection (Motte *et al.*, 2003).

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

2.2.5. Target organs and infected tissue

IHNV infects and has been shown to replicate (using *in-situ* hybridisation [ISH] with specific DNA probes) in tissues of ectodermal and mesodermal origin from the embryo. Thus, the principal target organs include: the gills, cuticular epithelium (or hypodermis), all connective tissues, the haematopoietic tissues, the lymphoid organ, antennal gland, and the ventral nerve cord, its branches and its ganglia. The enteric organs (endoderm-derived hepatopancreas, midgut and midgut caeca mucosal epithelia) and smooth, cardiac, and striated muscle show no histological signs of infection with by-IHNV and are usually negative for IHNV by ISH (Lightner, 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1992b).

2.2.56. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of *P. stylirostris* and *P. vannamei* populations that survive infection with IHHNV infections or epizootics, may carry the virus for life and pass the virus on to their progeny and other populations by vertical and horizontal transmission (Bell & Lightner 1984; Lightner, 1996a; 1996b; Morales-Covarrubias & Chavez-Sanchez, 1999; Motte *et al.*, 2003).

2.2.67. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.2.8. Known or suspected wild aquatic animal carriers

IHHNV is common in wild penaeid shrimp in South East Asia (*P. monodon*) and in the Americas (*P. vannamei*, *P. stylirostris* and other Pacific side wild penaeid species) (Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 1999).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission of IHHNV can be by horizontal or vertical routes. Horizontal transmission by cannibalism or by contaminated water (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b; 1985), and vertical transmission via infected eggs (Motte *et al.*, 2003) have been demonstrated.

2.3.2. Prevalence

In regions where the virus is enzootic in wild stocks, the prevalence of IHHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); and from 51 to 63% in *P. vannamei* collected from the Pacific coasts of Ecuador, Colombia and Panama (Motte *et al.*, 2003). Other penaeids collected during some of these surveys and found to be IHHNV positive included the brown shrimp, *P. californiensis* and the Western white shrimp *P. occidentalis*. In farms where IHHNV is present, its prevalence can range from very low to 100%, but high prevalence, approaching 100%, is typical (Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1988; 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1992a; 1983a; Martinez-Cordova, 1992).

2.3.3. Geographical distribution

IHHNV appears to have a world-wide distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996a; 1996b; Owens *et al.*, 1992). In the Western Hemisphere, IHHNV is commonly found in wild penaeid shrimp in the eastern Pacific from Peru to Mexico. Although infection with IHHNV has been reported from cultured *P. vannamei* and *P. stylirostris* in most of the shrimp-culturing regions of the Western Hemisphere and in wild penaeids throughout their range along the Pacific coast of the Americas (Peru to northern Mexico), the virus has not been reported in wild penaeid shrimp on the Atlantic coast of the Americas (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 1992a; Lightner & Redman, 1998a). Infection with IHHNV has also been reported in cultured penaeid shrimp from Pacific islands including the Hawaiian Islands, French Polynesia, Guam, and New Caledonia. In the Indo-Pacific region, the virus has been reported from cultured and wild penaeid shrimp in East Asia, South-East Asia, and the Middle East (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996a).

An IHHN-like virus sequence has been reported from Australia (Krabsetsve *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1992), and the presence of infection with IHHNV in farmed prawns in Australia was reported to the OIE in 2008. As discussed in Section 2.1.1, IHHNV-related sequences have been found inserted into the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

Anexo 21 (cont.)

2.3.4. Mortality and morbidity

Depending on the host ~~The effects of~~ infection with IHHNV ~~varies among shrimp species and the genotype of the virus, IHHN may take three distinct forms: populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with by IHHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon* under some conditions, infection with by IHHNV results in a more subtle, chronic disease, runt-deformity syndrome (RDS), in which high mortalities are unusual, but significant where growth suppression and cuticular deformities are common. In the third situation, a large portion of the IHHNV genome has been found to be inserted in the genome of some genetic lines of *P. monodon*. There is evidence that in *P. monodon*, this inserted IHHNV sequence is not infectious to other penaeids (Tang & Lightner, 2002; 2006 (Kalagayan et al., 1991).~~

~~Infection with IHHNV interferes with normal egg, larval, and postlarval development: poor. When broodstock are used from wild or farmed stocks where the disease IHHNV is enzootic, hatching success of eggs is reduced, and poor survival and culture performance of the larval and postlarval stages is observed when broodstock are used from wild or farmed stocks where IHHNV is enzootic lowered (Motte et al., 2003).~~

~~Farmed Stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults may show persistently high mortality rates. In *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and possibly *P. monodon*, IHHNV-infected stocks infected with IHHNV may show poor and highly disparate growth, poor overall culture performance, and cuticular deformities, particularly including especially bent rostrums and deformed sixth abdominal segments.~~

~~Demonstration of eosinophilic to pale basophilic intranuclear inclusion bodies in the typical target tissues for IHHNV, as IHHNV intranuclear inclusion bodies are nearly identical in appearance to those occurring in the early stages of WSSV IHHNV infections, their presence in tissue sections should be considered as a presumptive diagnosis of IHHNV until confirmed with a second test method, such as dot blot or ISH with IHHNV specific DNA probes or positive PCR test results for IHHNV.~~

2.3.5. Environmental factors

The replication rate of IHHNV at high water temperatures was significantly reduced in a study in which viral replication was compared in *P. vannamei* experimentally infected and held at 24°C and 32°C. After a suitable incubation period, shrimp held at 32°C had approximately 10² times lower viral load than shrimp held at 24°C. However, even at the higher temperature, significant (up to 10⁵ virus copies 50 ng⁻¹ of shrimp DNA) IHHNV replication still occurred in shrimp held at 32°C (Montgomery-Brock et al., 2007).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

No effective vaccination methods for IHHNV have been developed.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Resistance breeding ~~Breeding for resistance~~

Selected stocks of *P. stylirostris* that are resistant to infection with IHHNV disease have been developed and these have had some successful application in shrimp farms (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; 1996b; Weppe 1992; Zarian-Herzberg & Ascencio-Valle, 2001). ~~Some selected However~~ lines of *P. stylirostris* bred for IHHN disease resistance to infection with IHHNV were found to be refractory to infection (Tang et al., 2000). ~~However, such stocks do not have increased resistance to other diseases, such as white spot syndrome virus (WSSV), and, hence, so~~ their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren et al., 1997).

2.4.5. Restocking with resistant species

There has been some limited application and success with IHHNV-disease-resistant *P. stylirostris* (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarin-Herzberg & Ascencio 2001). The relative resistance of *P. vannamei* to IHHN disease-infection with IHHNV, despite infection by IHHNV, is considered to be among the principal factors that led to *P. vannamei* being the principal shrimp species farmed in the Western Hemisphere and, since 2004, globally (Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

2.4.6. Blocking agents

There are reports of shrimp with high viral loads of IHHNV being resistant to infection by WSSV (Bonnichon *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2003a). However, there There are no reports to date for IHHNV blocking agents.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

IHHNV is transmitted vertically by the transovarian route (Motte *et al.*, 2003). Hence, while disinfection of eggs and larvae is good management practice (Chen *et al.*, 1992) and is recommended for its potential to reduce IHHNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them (and contamination by other disease agents), the method is not effective for preventing transovarian transmission of IHHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been successful applied to-in preventing the spread ~~on~~ of IHHNV infections and disease. Among these has been the application of PCR pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii, and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001; Motte *et al.*, 2003), as well as the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992). The latter has proven to be the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with IHHNV (Jaenike *et al.*, 1992; Lightner, 2005; Pruder *et al.*, 1995). Unfortunately, there is a misconception in the industry that SPF is a genetic trait rather than a condition of health status (Lightner *et al.*, 2009). The development of SPF *P. vannamei* that were free not only of IHHNV, but also of all the major known pathogens of penaeid shrimp, has resulted in the introduction of the species to Asia and to its surpassing *P. monodon* in 2005 as the dominant farmed shrimp species in Asia as well as the Americas where the SPF stocks were developed (FAO, 2006; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection by with IHHNV are all life stages (eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) (Motte *et al.*, 2003). While infection with IHHNV may infect affect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be are not suitable samples for IHHNV detection or certification of for IHHN-disease freedom from infection with IHHNV.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, subadults and adults. However, for eggs, larvae and postlarvae, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50-150 postlarvae depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

Anexo 21 (cont.)

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing.

3.4. Best organs and tissues

IHHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHHNV include connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a). Hence, whole shrimp (e.g. larvae or postlarvae) or tissue samples containing the aforementioned target tissues are suitable for most tests using molecular methods.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used for testing (usually for PCR, or dot-blot hybridisation with specific probes) when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a).

3.5. Samples or tissues that are not suitable

IHHNV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection by IHHNV (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Certain cuticular deformities, specifically a deformed rostrum bent to the left or right, which may be presented by *P. vannamei* and *P. stylirostris* with RDS, are pathognomonic for infection with IHHNV (see Section 4.2.1.2). However, this clinical sign is not always apparent in shrimp populations chronically infected with IHHNV. As *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and *P. monodon* can be infected by IHHNV and not present obvious signs of infection (e.g. they may show markedly reduced growth rates or 'runting'), molecular tests are recommended when evidence of freedom from infection with IHHNV disease is required.

4.1.2. Behavioural changes

In acute IHHN-disease, *P. stylirostris* may present behavioural changes (see Section 4.2.1.1) but with RDS, no consistent behavioural changes have been reported for affected shrimp.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

4.2.1.1. Infection with IHHNV disease in *Penaeus stylirostris*

Infection with IHHNV is often causes an acute disease with very high mortalities occurring in juveniles life stages of this species. Vertically infected larvae and early postlarvae do not become diseased, but in approximately 35-day-old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size or age dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 1983; Brock & Main, 1994; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). Gross signs are not of infection with IHHNV are not specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species with infection with IHHNV have been observed to rise slowly in culture tanks to the water surface, where they become motionless and then roll-over and slowly sink (ventral side up) to the tank bottom. Shrimp exhibiting this behaviour may repeat the process for several hours until they become too weak to continue, or until they are attacked and cannibalised by their healthier siblings. *Penaeus stylirostris* at this stage of infection often have white or buff-coloured spots (which differ in appearance and location from the white spots that sometimes occur in shrimp with WSSV infections) in the cuticular epidermis, especially at the junction of the tergal plates of the abdomen, giving such shrimp a mottled appearance. This mottling later fades in moribund *P. stylirostris* as such individuals become more bluish. In *P. stylirostris* and *P. monodon* with terminal-phase infection with IHHNV infections, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b).

4.2.1.2. Infection with IHHNV disease in *Penaeus vannamei*

RDS, a chronic form of infection with IHHNV disease, occurs in *P. vannamei*. ~~as a result of IHHNV infection.~~ The severity and prevalence of RDS in infected populations of juvenile or older *P. vannamei* may be related to infection that occurred during the larval or early postlarval PL-stages. RDS has also been reported in cultured stocks of *P. stylirostris* and *P. monodon*. Juvenile shrimp with RDS may display a bent (45° to 90° bend to left or right) or otherwise deformed rostrum, a deformed sixth abdominal segment, wrinkled antennal flagella, cuticular roughness, 'bubble-heads', and other cuticular deformities. Populations of juvenile shrimp with RDS display disparate growth with a wide distribution of sizes and many smaller than expected ('runted') shrimp. The coefficient of variation (CV = the standard deviation divided by the mean of different size groups within a population) for populations with RDS is typically greater than 30% and may approach 90%, while ~~IHHNV-free (and thus RDS-free)~~ populations of juvenile *P. vannamei* and *P. stylirostris* free from infection with IHHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Bray *et al.*, 1994; Brock & Lightner, 1990; Brock *et al.*, 1983; Brock & Main, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; Lightner, 1996a; Primavera & Quinitio, 2000; Pruder *et al.*, 1995).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology

Acute ~~IHHNV~~-infections in *P. stylirostris* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stained sections ~~histological methods~~ (see Section 4.2.6). Chronic infection with IHHNV ~~IHHNV infections~~ and RDS are much more difficult to diagnose using routine H&E histological methods. For diagnosis of chronic infections, the use of molecular methods are recommended for IHHNV detection (e.g. by PCR or application of IHHNV-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or ISH of histological sections).

Histological demonstration of prominent intranuclear, Cowdry type A inclusion bodies provides a provisional diagnosis of infection with IHHNV ~~IHHNV infection~~. These characteristic IHHNV inclusion bodies are eosinophilic and often haloed (with H&E stains of tissues preserved with fixatives that contain acetic acid, such as Davidson's AFA and Bouin's solution) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a), intranuclear inclusion bodies within chromatin-marginated, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by infection with IHHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.3.1.2.3 of this chapter) of such sections with a DNA probe specific to IHHNV provides a definitive diagnosis of infection with ~~IHHNV infection~~ (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4.2.4. Wet mounts

No reliable methods have been developed for direct microscopic pathology.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

Histopathology: ~~histology may be used to provide a definitive diagnosis of infection with IHHNV~~ ~~IHHNV infection.~~ ~~Because 10% buffered formalin and other fixatives provide, at best, only fair fixation of the shrimp,~~ the use of Davidson's fixative (containing 33% ethyl alcohol [95%], 22% formalin [approximately 37% formaldehyde], 11.5% glacial acetic acid and 33.5% distilled or tap water) is highly recommended for all routine histological studies of shrimp (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). To obtain the best results, dead shrimp should not be used. Only live, moribund, or compromised shrimp should be selected for fixation and histological examination. Selected shrimp are killed by injection of fixative directly into the hepatopancreas; the cuticle over the cephalothorax and abdomen just lateral to the dorsal midline is opened with fine-pointed surgical scissors to enhance fixative penetration (the abdomen may be removed and discarded), the whole shrimp (or cephalothorax) is immersed in fixative for 24 to 48 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol for storage. After transfer to 70% ethyl alcohol, fixed specimens may be transported (via post or courier to the diagnostic laboratory) by wrapping in cloth or a paper towel saturated with 70% ethyl alcohol and packed in leak-proof plastic bags (see Section 4.2.3).

Anexo 21 (cont.)

In-situ hybridisation (see Section 4.3.1.2.3 below).

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Electron microscopy is not recommended for routine diagnosis of IHNV.

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See section 4.2.6.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture or artificial media

IHNV has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; 1998b).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

None has been successfully developed.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

Direct detection methods using DNA probes specific for IHNV are available in dot-blot and ISH formats. PCR tests for IHNV have been developed and a number of methods and commercial products using these methods PCR detection kits are readily available.

DNA probes for dot-blot and ISH applications: gene probe and PCR methods provide greater diagnostic specificity and sensitivity than ~~de more~~ traditional techniques for IHNV diagnosis that employ classic histological approaches. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp. A haemolymph sample may be taken with a tuberculin syringe, or an appendage (a pleopod for example) may be biopsied (Bell *et al.*, 1990), and used as the sample for a ~~direct~~ dot-blot hybridisation test.

~~*Dot-blot hybridisation procedure for IHNV:* the probe is labelled with a non-radioactive label, digoxigenin 11 dUTP (DIG 11 dUTP). The system using DIG to label nucleic acid probes was developed by Boehringer Mannheim Biochemicals (this company is now owned by Roche Diagnostic Corporation), which is described in the Roche *DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide* and *DIG Application Manual for Filter Hybridization™ System User's Guide for Membrane Hybridization* and from Boehringer Mannheim's *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual* (Roche Applied Science, 2006a; 2006b). The protocols given below use a DIG-labelled probe to IHNV produced by one of several methods. Probes may be produced using a fragment of cloned IHNV DNA as the template by the random primed labelling method (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1993). An alternative method for producing DIG-labelled probes uses specific primers from the cloned IHNV DNA and the Roche PCR-DIG Probe Synthesis Kit™.~~

Dot-blot hybridisation procedure for IHNV: the dot-blot hybridisation method given below uses a digoxigenin-11-dUTP (DIG)-labelled DNA probe for IHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996a). Formulas for the required reagents are given after the protocols.

Anexo 21 (cont.)

- i) Prepare a positively charged nylon membrane (~~Roche Diagnostics Cat. No. 1 209 299 or equivalent~~), cut pieces to a size to fit samples and controls and mark with a soft-lead pencil making 1 cm squares for each sample. Include a positive and a negative control on each filter. Lay out on to a piece of filter paper (Whatman 3MM).
- ii) If necessary, ~~dilute samples to can~~ be assayed diluted in TE (~~Tris/EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid)~~) buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) plus 50 µg ml⁻¹ salmon sperm DNA, ~~using 1 µl sample in 9 µl buffer in 1.5 ml microcentrifuge tubes~~. Samples for dot blots blot hybridisation can be haemolymph, tissues homogenised in TN (~~Tris/NaCl: 0.4 M NaCl and buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.4 M NaCl)~~), or extracted DNA in 10 mM Tris-HCl.
- iii) Boil samples for 40 5 minutes and quench on ice for 5-1-2 minutes. ~~Briefly microfuge samples in the cold to bring down all liquid and to pellet any coagulated protein~~. Keep on ice until samples are dotted on to the membrane.
- iv) Dot 1-3 µl of each sample on to an appropriate place on the filters. Allow to air-dry and then fix samples on to the membrane by baking at 80°C for 30 minutes or by UV cross-linking using a DNA transilluminator for 3 minutes.
- ~~v) Adjust a water bath to 68°C and prepare the prehybridisation solution. For a 10 x 15 cm membrane, prepare 8 ml per membrane. Set a stirring hot plate to 'low' and stir while warming the solution for 30 minutes until the blocking agent has dissolved and the solution is cloudy. Also, prepare some heat seal bags that are slightly larger in size than the membrane: five to six bags will be needed per membrane.~~
- v) Remove membranes from the oven or transilluminator and put into a heat-seal bag with 4 ml per membrane of prehybridisation solution. Seal the bags and put into a 68°C water bath for 30 minutes 1 hour.
- vi) Boil the DIG-labelled probe for 40-3-5 minutes and then keep on ice ~~and then microfuge in the cold to bring all the liquid down in the microcentrifuge tube~~. Keep on ice. Remove the prehybridisation solution from the bags. Add 2 ml of fresh prehybridisation solution to each bag and then add the ~~correct~~, predetermined amount of DIG-labelled probe to each, mixing well as it is being added. Seal the bags, place back in the 68°C water bath and incubate for 8-12 hours.
- vii) Wash membranes well with:
- | | | |
|--|-----|--------------------------------|
| 2 x standard saline citrate (SSC/0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) | 2 x | 5 minutes at room temperature |
| 0.1 x SSC/0.1% SDS | 3 x | 15 minutes at 68°C |
| (use 4 ml/filter and seal in bags) | | |
| Buffer I | 1 x | 5 minutes at room temperature |
| Buffer II | 4 x | 30 minutes at room temperature |
| Buffer I | 4 x | 5 minutes at room temperature |
| (Buffers are prepared ahead of time). | | |
- viii) React the membrane in bags with anti-DIG AP alkaline phosphatase conjugate (Roche Diagnostics² 1-093-274) diluted 1/5000 in Buffer I. ~~Use 3 ml per membrane~~; incubate for 30-45 minutes at room temperature on a shaker platform.
- ix) Wash membrane well with:
- | | | |
|------------|-----|--------------------------------|
| Buffer I | 2 x | 15 minutes at room temperature |
| Buffer III | 1 x | 5 minutes at room temperature |
- x) Develop the membranes in bags using ~~3 ml per membrane~~ of a development solution (nitroblue tetrazolium salt [NBT]/X-phosphate in Buffer III) made up just prior to use. React in the dark at room temperature for 1-2 hours. Stop the reactions in Buffer IV and dry the membranes on 3MM filter paper.
- xi) Photograph the results (colour fades over time).
- xii) Store dry membranes in heat-seal bags.

² Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Anexo 21 (cont.)

In-situ hybridisation (ISH) procedure: the ISH method given below uses a DIG-labelled DNA probe for IHHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996a). ~~Formulas for the required reagents are given after the protocols.~~

- i) Embed tissue in paraffin and cut sections at 4–6 μm thickness. Place sections on to positively charged microscope slides (do not put gelatine in water to float sections; just use water).
- ii) Put slides in a slide rack, such as a Tissue-Tek rack. Heat the slides in an oven for 45 minutes at 60°C. In the staining centre, rehydrate the tissue as follows:

| | | |
|---------------------------------|-----|--|
| Xylene (or suitable substitute) | 3 × | 5 minutes each |
| Absolute alcohol | 2 × | 1 minute each |
| 95% alcohol | 2 × | 10 dips each |
| 80% alcohol | 2 × | 10 dips each |
| 50% alcohol | 1 × | 10 dips |
| Distilled water | | six rinses (do not let slides dry out) |
- iii) Wash the slides for 5 minutes in ~~phosphate buffered saline~~ (PBS (or Tris/NaCl/EDTA [TNE] buffer). Prepare fresh proteinase K at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in PBS (or TNE). Place slides flat in a humid chamber, pipette on 500 μl of the proteinase K solution and incubate for 10–15 minutes at 37°C. Drain fluid onto blotting paper.
- iv) Return slides to slide rack. Fix sections in 0.4% cold formaldehyde for 5 minutes at room temperature.
- v) Incubate slides in 2 × SSC for 5 minutes at room temperature.
- vi) With slides flat, add 0.5–1 ml prehybridisation buffer and incubate in a humid chamber for 15–30 minutes at 37°C.
- vii) Boil the DIG-labelled probe for ~~40~~ 3–5 minutes and quench on ice; spin briefly in the cold and keep on ice. Dilute the probe to 25 ng ml^{-1} in prehybridisation solution and cover the tissue with 250 μl of the solution. Incubate the slides for 2–4 hours at 42°C or overnight at 37°C in a humid chamber. ~~Drain fluid onto blotting paper. During this incubation, pre warm the wash buffers at 37°C.~~
- viii) Place slides in slide rack. Wash the slides as follows:

| | | |
|-----------|-----|----------------------|
| 2 × SSC | 2 × | 5–30 minutes at 37°C |
| 1 × SSC | 2 × | 5 minutes at 37°C |
| 0.5 × SSC | 2 × | 5 minutes at 37°C |
- ix) Wash the slides for ~~5–1–3~~ minutes in Buffer I at room temperature. Put the slides flat in a humid chamber and block with 0.5 ml per slide of Buffer II. Incubate for 15 minutes at 37°C. ~~Drain the fluid on to blotting paper.~~
- x) Dilute the anti-DIG alkaline phosphatase conjugate (~~Roche Applied Science cat. 10686322~~) at a ratio of 1/1000 in Buffer II (~~1 μl anti-DIG-AP per 1 ml buffer~~). Cover tissue with 500 μl of diluted conjugate and incubate in a humid chamber for 30 minutes at 37°C.
- xi) Place the slides in a slide rack. Wash in Buffer I twice for 5–10 minutes each time at room temperature. Wash once with Buffer III for ~~5–10~~ 1–2 minutes.
- xii) Prepare the development solution by first adding 4.5 μl NBT per 1 ml buffer III. Mix well. Then add 3.5 μl X-phosphate per ml of solution and mix well. Pipette on 500 μl per slide and incubate in a humid chamber in the dark for 2–3 hours at room temperature.
- xiii) Stop the reaction by returning the slides to a slide rack and washing in Buffer IV for 15 minutes at room temperature.
- xiv) Counterstain the slides by dipping for 5 minutes in 0.5% aqueous Bismarck brown Y.
- xv) Dehydrate the slides in the staining centre as follows:

| | | |
|---------------------------------|-----|--------------|
| 95% alcohol | 3 × | 10 dips each |
| Absolute alcohol | 3 × | 10 dips each |
| Xylene (or suitable substitute) | 4 × | 10 dips each |

 Do not allow the slides to dry out – leave them in the last xylene (or xylene substitute) container until ready for cover-slips.
- xvi) Mount with cover-slips and mounting medium (Permount).

Anexo 21 (cont.)

- xvii) Examine the slides under bright-field for a dark-blue or black precipitate that marks sites where IHHNV DNA is present. Pathodiagnostic intranuclear Cowdry type A inclusions are well marked with the probe. Also often marked are host cell nuclei without obvious inclusions, cytoplasmic inclusions, and accumulation of free virus in the tissue spaces and haemolymph.

NOTE: Always run a known positive and negative control.

Reagent formulas for ISH method:

i) ~~10 × phosphate buffered saline~~

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| NaCl | 160 g |
| KH ₂ PO ₄ | 4 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 23 g |
| KCl | 4 g |
| DD H ₂ O | 1950 ml (qs to 2 litres) |

~~pH to 8.2 with NaOH; autoclave to sterilise; store at room temperature. To make 1 × PBS, dilute 100 ml 10 × PBS in 900 ml DD H₂O; Filter 1 × solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

ii) 10 × Tris/NaCl/EDTA (TNE) buffer

| | |
|------------------|------------------------|
| Tris base | 60.57 g |
| NaCl | 5.84 g |
| EDTA | 3.72 g |
| H ₂ O | 900 ml (qs to 1 litre) |

pH to 7.4 with concentrated or 5 M HCl. To make 1 × TNE, dilute 100 ml 10 × TNE in 900 ml DD H₂O; Filter 1 × solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

iii) Proteinase K, 100 µg ml⁻¹ (prepare just prior to use)

| | |
|--------------|---------------|
| PBS | 10 ml 1 × PBS |
| Proteinase K | 1 mg |

iv) ~~0.4% formaldehyde~~

| | |
|---------------------|--------|
| 37% formaldehyde | 5.4 ml |
| DD H ₂ O | 500 ml |

~~Store at 4°C; can be reused up to four times before discarding.~~

v) Prehybridisation buffer (50 ml final volume)

| | |
|---------------------|----------------------------|
| 4 × SSC | 10 ml 20 × SSC |
| 50% formamide | 25 ml 100% formamide |
| 1 × Denhardt's | 2.5 ml 20 × Denhardt's |
| 5% dextran sulphate | 10 ml 25% dextran sulphate |
| Warm to 60°C | |

Boil 2.5 ml of 10 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA and add to buffer for final concentration of 0.5 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA; store at 4°C.

vi) ~~20 × SSC buffer~~

| | |
|---|--------------------------------------|
| 3M NaCl | 175.32 g NaCl |
| 0.3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O | 88.23 g Na citrate·2H ₂ O |
| DD H ₂ O | 1000 ml (qs) |

~~pH to 7.0; autoclave; store at 4°C.~~

~~To make 2 × SSC, dilute 100 ml 20 × SSC in 900 ml DD H₂O; To make 1 × SSC, dilute 50 ml 20 × SSC in 950 ml DD H₂O; To make 0.5 × SSC, dilute 50 ml 20 × SSC in 1950 ml DD H₂O. Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

Anexo 21 (cont.)vii) ~~20 × Denhardt's solution~~

| | |
|---------------------|----------------------------|
| BSA (Fraction V) | 0.4 g bovine serum albumin |
| Ficoll 400 | 0.4 g Ficoll |
| PVP 360 | 0.4 g polyvinylpyrrolidone |
| DD H ₂ O | 100 ml |

Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C. Aliquot 2.5 ml into small tubes and store frozen.

viii) ~~25% dextran sulphate~~

| | |
|---------------------|--------|
| Dextran sulphate | 25 g |
| DD H ₂ O | 100 ml |

Mix to dissolve; store frozen in 10 ml aliquots.

ix) ~~Salmon sperm DNA (10 mg ml⁻¹)~~

| | |
|---------------------|--------|
| Salmon sperm DNA | 0.25 g |
| DD H ₂ O | 25 ml |

~~To prepare, warm the water and slowly add the DNA with stirring until completely dissolved; boil for 10 minutes; shear the DNA by pushing through an 18-gauge needle several times; aliquot 2.5 ml into small tubes and store frozen; boil for 10 minutes just before using to facilitate mixing in the buffer.~~

xiv) ~~10 × Buffer I~~

| | |
|---------------------|-------------------|
| 1 M Tris/HCl | 121.1 g Tris base |
| 1.5 M NaCl | 87.7 g NaCl |
| DD H ₂ O | 1000 ml (qs) |

pH to 7.5 with HCl. Autoclave; ~~store at 4°C.~~

To make 1 × Buffer I, dilute 100 ml of 10 × stock in 900 ml DD-H₂O. ~~Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

xv) ~~Buffer II (blocking buffer)~~

| | |
|------------------|---|
| Blocking reagent | 0.25 g Blocking reagent (Roche Diagnostics 1-096-476) |
| Buffer I | 50 ml 1 × Buffer I |

Store at 4°C for up to 2 weeks.

xvi) ~~Buffer III~~

| | |
|-------------------------|---|
| 100 mM Tris/HCl | 1.21 g Tris base |
| 100 mM NaCl | 0.58 g NaCl |
| DD H ₂ O | 100 ml (qs) |
| pH to 9.5 with HCl | |
| Then add: | |
| 50 mM MgCl ₂ | 1.02 g MgCl ₂ ·6H ₂ O |

Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

xvii) ~~10% polyvinyl alcohol (PVA)~~

| | |
|---------------------|--------|
| Polyvinyl alcohol | 10 g |
| DD H ₂ O | 100 ml |

~~To prepare, slowly add PVA to water while stirring on low heat. (It takes 2–3 hours for PVA to go into solution.) Dispense 10 ml per tube and store frozen at –20°C.~~

xviii) ~~Development solution~~

Mix 90 ml Buffer III with 10 ml of 10% PVA. Store at 4°C. Just prior to use, for each 1 ml of Buffer III with PVA add:

| | |
|--------------------|---|
| 4.5 µl NBT | 75 mg NBT ml ⁻¹ in 70% dimethylformamide (Roche Diagnostics 1-383-213) |
| 3.5 µl X-phosphate | 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidine salt (50 mg ml ⁻¹ in dimethylformamide) (Roche Diagnostics 1-383-221) |

xviii) Buffer IV

| | |
|---------------------|---|
| 10 mM Tris/HCl | 1.21 g Tris base |
| 1 mM EDTA | 0.37 g EDTA.2H ₂ O (disodium salt) |
| DD-H ₂ O | 1000 ml |

pH to 8.0 with HCl. Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

xvix) 0.5% Bismarck Brown Y

| | |
|---------------------|--------|
| Bismarck Brown Y | 2.5 g |
| DD-H ₂ O | 500 ml |

Dissolve the stain in water. Filter through a Whatman No. 1 filter; store at room temperature.

Polymerase chain reaction for IHNV: several one-step PCR methods (Krabsetve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2007; Tang & Lightner 2004), and a number of commercial PCR kits are available for IHNV detection. Nested methods are also available from commercial sources.

There are multiple geographical variants of IHNV, some of which are not detected by all of the available methods for IHNV. Two primer sets, 392F/R and 389F/R, are the most suitable for detecting all the known genetic variants of IHNV (Krabsetve *et al.*, 2004; Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2000; 2007). However these tests also detect IHNV-related sequences called types 3A and 3B, which are inserted into the genome of certain geographic stocks of *P. monodon* from the western Indo-Pacific, East Africa, Australia and India (Duda & Palumbi, 1999; Saksmerprome *et al.*, 2011; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). PCR primers have been developed that can detect the IHNV viral IHNV sequence but do not react with IHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprome *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHNV), but not types 3A and 3B, which are non-infectious and part of the *P. monodon* genome (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer set MG831F/R reacts only with types 3A and 3B, which are non-infectious and part of the *P. monodon* genome (Tang *et al.*, 2007). Hence, confirmation of unexpected positive or negative PCR results for IHNV with a second primer set, or use of another diagnostic method (i.e. PCR using primers from another region of the genome, real-time PCR, histology, bioassay, ISH) is highly recommended.

Table 4.1. Recommended primer sets for one-step PCR detection of IHNV

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

NOTE: Primers 389F/R and 392F/R described above are from the nonstructural protein-coding region (ORF 1) of the IHNV genome. Primers 77012F/77353R are from a region in between the nonstructural and the structural (coat protein) capsid protein-coding region of the genome. In the event that results are ambiguous using the 389F/R 'universal' primer set, it is recommended to use primers from a different region of the genome for confirmatory testing. In this case, that would mean using primers 77012F/77353R or the 392F/R primer sets and follow up with sequencing of PCR amplicons for confirmation.

Anexo 21 (cont.)

General PCR method for IHHNV: the PCR method described below for IHHNV generally follows the methods outlined in Tang *et al.* (2007) and Nunan *et al.* (2000). However, recent minor modifications including the sources of the reagents and the use of an automated DNA extraction instrument are acceptable. The modifications include DNA extraction method, choice of primers (Table 4.1), and the volume of reaction. These slightly modified methods have been validated in accordance with Chapter 1.1.2 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases and do not affect the diagnostic performance of the assay. Cumulative experience with the technique has led to modifications with respect to template (DNA extraction of clinical specimens), choice of primers (Table 4.1), and volume of reaction.

- i) Use as a template, the DNA extracted from ground tissue homogenate (TN buffer, 0.4 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4) or haemolymph (collected with a small amount of 10% sodium citrate) or from tissues or haemolymph that was fixed-preserved in 95% ethanol and then dried. A control consisting of tissues or haemolymph from known negative animals should be included during the DNA extraction step. The DNA can be extracted by a variety of methods, but excellent results have been obtained using kits from Roche Diagnostics (Cat. No. 1 796 828) or Qiagen (Cat. No. 51304). Other DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega), or DNazol (Life Technologies). Spectrophotometric readings of the final DNA will indicate the purity of the DNA and the amount of total DNA extracted from the sample. Use 1–5 µl of extracted DNA as a template per 50–25 µl reaction volume.
- ii) The following controls should be included in every PCR assay for IHHNV: (a) DNA from a known negative tissue sample; (b) DNA from a known positive sample (either from tissue or haemolymph or from a plasmid clone that contains the fragment that the specific set of primers amplifies; and (c) a 'no template' control.
- iii) Use as primers, primers 389F and 389R, which elicit a band 389 bp in size from IHHNV-infected material, or primers 77012F and 77353R, which elicit a band 356 bp in size from IHHNV-infected material. Prepare primers at 400 µg l⁻¹ 10 µM in distilled water. Keep frozen at -70°C.
- iv) ~~Use a 'hot start' method for the polymerase: if Applied Biosystem's AmpliTaq Gold is used, this. If PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) are used, the PCR profile involves a 3–5 minutes at 95°C to denature DNA prior to the primers binding and activation of the enzyme. This programme is then linked to the cycling programme (followed by 35 cycles) and an of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and final extension programme. The programme is set as follows: at 72°C for 5 minutes.~~

| | | | |
|-----------|-------------|-----------------|-----------|
| Hot start | Programme 1 | 5 minutes 95°C | |
| Linked to | Programme 2 | 30 seconds 95°C | |
| | | 30 seconds 55°C | 35 cycles |
| | | 4 minute 72°C | |
| Linked to | Programme 3 | 7 minutes 72°C | |
| Linked to | Programme 4 | 4°C until off | |

v) Prepare a 'Master Mix' consisting of water and primers.

- vi) For a 50–25 µl reaction mix, add 49–24 µl Master Mix to each tube and then add 1 µl of the sample DNA template to be tested.
- vii) Vortex each tube, spin quickly to bring down all liquid. ~~If the thermal cycler does not have a heated lid to prevent condensation, then carefully overlay the top of each sample with 25–50 µl mineral oil and re-cap the tubes. Insert tubes into the thermal cycler and start programme 1 ('hot start'), which is linked to cycling, extension and soak cycles the PCR program.~~
- viii) ~~If mineral oil was used, recover samples from under the mineral oil using a pipette set at 50 µl and transfer to a fresh tube. Using the long tipped pipette tips (designed for loading gels) results in less oil being carried over with the sample.~~
- ix) ~~Run After PCR, run 6–10 µl of the sample in a 1.5% agarose gel (containing 0.5 µg ml⁻¹ ethidium bromide to stain the DNA). Look for the 389 bp band (if using primers 389F and 389R) or for the 356 bp band (if using primers 77012F and 77353R). Bands are not always seen, as it is necessary to have at least 10 ng DNA µl⁻¹ to see DNA in a gel. A~~

~~Southern transfer of the gel or a dot blot can be run for more sensitive detection. The DNA can also be precipitated (0.3 M sodium acetate and 2.5 volumes 100% ethanol, —70°C, for 1–3 hours, centrifuge for 20 minutes) and resuspended in 1/10th volume (i.e. 4 µl) TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) or water and either re-run in the gel or tested in a dot blot. A direct sequencing of amplified products can be performed through gel extraction of a PCR band with correct size and the sequencing primer(s) used for amplification to confirm the presence of IHNV.~~

Real-time PCR method for IHNV: real-time PCR methods have been developed for the detection of IHNV. These methods offer extraordinary sensitivity that can detect a single copy of the target sequence from the IHNV genome (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). ~~Using primers 309F/309R, it is possible to distinguish infectious forms of IHNV from non-infectious forms. Using MG831F/MG831R it is possible to distinguish the non-infectious forms.~~

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The primers and TaqMan probe are designed by the Primer Express software (Applied Biosystems Life Technologies). The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5'-TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3' and 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3', respectively. The TaqMan probe (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3'), ~~which corresponds to the region from nucleotide 4632 to 4644,~~ is synthesised and labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end ~~(Applied Biosystems, part no. 450025).~~
- ii) Preparation of DNA template: ~~the extraction and purification of DNA template is the same as that described in the section of traditional PCR above.~~
- iii) The real-time PCR reaction mixture contains: TaqMan Universal PCR Fast virus 1-step Master Mix (Applied Biosystems, part no. 4324018 Life Technologies, or commercially-available equivalent reagents), 0.3 µM of each primers, 0.15 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of ~~25~~ 20 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) Amplification is performed with the GeneAmp 5700 Sequence Detection StepOnePlus PCR System (Applied Biosystems; ABI PRISM 7000, 7300, or 7500 Life Technologies; or equivalent can also be used PCR systems). The cycling profile is: ~~activation-initial denaturation of AmpliTaq Gold for 10 minutes~~ 20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for ~~15 seconds~~ 1 second and annealing/extension at 60°C for ~~1 minute~~. ~~The levels of fluorescence are measured at the end of the annealing and extension step~~ 20 seconds.
- v) At the end of the reaction, ~~real-time fluorescence measurements will be taken with a built-in charge-coupled device (CCD) camera~~ fluorescence intensity is measured. A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase of PCR product. A cut-off Ct value is set through the analyses of several independent runs of negative and positive controls. Samples with a Ct value lower than 40 cut-off cycles are considered to be positive.
- vi) It is necessary to include a 'no template' control in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture ~~or in the heat block of the thermal cycler~~. A positive control should also be included, and it can be a plasmid containing the target sequence, or purified virions, or DNA extracted from IHNV-infected tissue.

Sequencing: PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified products from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the insertion of non-infectious IHNV genome in host DNA (Tang & Lightner, 2002; 2006).

Anexo 21 (cont.)

Through PCR, IHHNV was detected in *P. monodon* from South-East Asia. ~~Most~~ Some of these IHHNV PCR assays ~~primers also detected~~ reacted to IHHNV-related sequences in *P. monodon* populations in Africa, Australia and Thailand (Tang & Lightner, 2006; Saksmerprome *et al.*, 2011). To discriminate the IHHNV-related sequences from the actual virus, PCR assays using primers that detect the IHHNV ~~viral sequence~~ and do not react with IHHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa or Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (e.g. Saksmerprome *et al.*, 2011) have been developed.

PCR commercial kits are available for detection of IHHNV diagnosis and can be acceptable provided they have been validated as fit for such purpose. The OIE validation procedure is described in Chapter 1.1.2 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases*.

4.3.2. Serological methods

Shrimp are invertebrate animals and do not produce antibodies. Therefore, serological methods for detection of infection with IHHNV are not available.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of infection with IHHNV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended and/or not available for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for surveillance, detection and diagnosis of IHHNV

| Method | Surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|---|--------------|-----------|-----------|----------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PLs | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | d | d | d | d | d |
| Bioassay | d | d | d | d | c | c |
| Direct LM <u>(wet mount)</u> | d | d | d | d | d | d |
| Histopathology | d | d | c | c | a | b |
| Transmission EM | d | d | d | d | c | c |
| Antibody-based assays | d | d | d | c | d | d |
| <u>In-situ DNA probes hybridisation</u> | d | <u>dc</u> | <u>bc</u> | b | a | a |
| <u>Dot-blot hybridisation</u> | <u>d</u> | <u>d</u> | <u>c</u> | <u>c</u> | <u>a</u> | <u>a</u> |
| PCR, Real-time PCR | a | a | a | a | a | a |
| Sequence | d | d | d | d | d | a |

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus

As indicated in Table 5.1, PCR or real-time PCR is-are the recommended methods for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic IHHNV-induced lesions in the cuticular epithelium by histology (with or without confirmation by ISH with IHHNV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with IHHNV shall be is suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Clinical signs indicative of infection with IHHNV ~~and a positive result by *in-situ* hybridisation~~
- or
- ii) Histopathology indicative of infection with IHHNV ~~and a positive result by *in-situ* hybridisation~~
- or
- iii) Positive result by PCR

7.2. Definition of confirmed case

Infection with IHHNV is considered to be confirmed if two of the following criteria are met:

- i) Positive result by *in-situ* hybridisation
- ii) Positive result by PCR (always genotype specific)
- iii) Sequence analysis to confirm IHHNV nucleic acid sequence.

The two methods must target different areas of the genome.

8. References

- ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H., SWEENEY J. & LOTZ J.M. (1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ~~IHHN virus~~ infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.
- BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1991). Chapter 24. ~~Unclassified Viruses of Crustacea. In: Atlas of Invertebrate Viruses~~, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 597–622.

Anexo 21 (cont.)

- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of **the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis IHHN virus** of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.
- ~~BONNICHON V., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 179–184.~~
- BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.
- BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. *In: Diseases of Marine Animals*, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.
- BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International. Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.
- BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.
- BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crust. Biol.*, **13**, 87–94.
- CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.
- ~~CASTILLE F.L., SAMOCHA T.M., LAWRENCE A.L., HE H., FRELIER P. & JAENIKE F. (1993). Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*, **113**, 65–81.~~
- CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress*, Jory D.E., ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.
- ~~DUDA T.F.JR. & PALUMBI S.R. (1999). Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar. Biol.*, **134**, 705–710.~~
- ~~FAUQUET C.M., MAYO M.A., 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.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.

JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 295–302.

KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquac. Soc.*, **22**, 235–243.

KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (eds.) (2012). *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Academic Press Academic Press, San Diego USA.

KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.

~~LIGHTNER D.V. (1983). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture. Vol. 1. Crustacean Aquaculture*, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 289–320.~~

LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 8–127.

LIGHTNER D.V. (1993). Diseases of penaeid shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

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

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

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992a). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHNV in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES J. Mar. Sci.*, **194**, 97–105.

LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHNV virus of penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.*, **18**, 196–197.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992b). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 233–253.

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

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

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

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

Anexo 21 (cont.)

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

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG, K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAKSMPROM V., JITRORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*(
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for **Infection with** infectious hypodermal and haematopoietic necrosis **virus** (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on **Infection with** infectious hypodermal and haematopoietic necrosis **virus**

NB: FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2015

CHAPTER 2.2.4.

INFECTION WITH INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious myonecrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious myonecrosis virus (IMNV), ~~which that~~ is similar to members of the Family *Totiviridae*. ~~is a viral disease of penaeid shrimp caused by infection with infectious myonecrosis virus (IMNV) (Lightner et al., 2004; Nibert 2007; Poulos et al., 2006).~~

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

~~IMNV is a totivirus.~~ Phylogenetic analysis of its RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene coding sequence indicates that IMNV is most closely related to *Giardia lamblia virus*, a member of the family *Totiviridae* (Fauquet et al., 2005; Lightner, 2011; Nibert, 2007; Poulos et al., 2006).

IMNV particles are icosahedral in shape and 40 nm in diameter, with a buoyant density of 1.366 g ml⁻¹ in caesium chloride. The genome consists of a single, double-stranded (ds) RNA molecule of ~~7560~~ 8226-8230 bp (Loy et al., 2015; Naim et al., 2015). Sequencing of the viral genome reveals two non-overlapping open reading frames (ORFs). The ~~59~~ first ORF (ORF1, nt ~~136-4953-470-5596~~) encodes a putative RNA-binding protein and a capsid protein. The coding region of the RNA-binding protein is located in the first half of ORF1 and contains a dsRNA-binding motif in the first 60 amino acids. The second half of ORF1 encodes a capsid protein, as determined by amino acid sequencing, with a molecular mass of 106 kDa. The ~~39~~ second ORF (ORF2, nt ~~5241-7451-5884-8133~~) encodes a putative RdRp (Poulos et al., 2006).

The complete genomes of IMNV types originating from Brazil and Indonesia have been sequenced and found to be 99.6% identical at the nucleotide level (Poulos et al., 2006; Senapin et al., 2007). The 99.6% full genome sequence identity (and anecdotal information on the introduction of *Penaeus vannamei* stocks from Brazil) indicate that the disease was introduced from Brazil to Indonesia in 2006.

~~Infection with IMNV IMN disease is not the same disease as white tail disease of penaeid shrimp and white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. These two diseases exhibit gross and histological signs that mimic similar to infection with IMNV IMN, but which are caused by two different types of virus: a nodavirus named *Penaeus vannamei* novavirus — PvNV (Tang et al., 2007) and a nodavirus named *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus — MnNV (see Chapter 2.2.8 White tail disease Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus).~~

2.1.2. Survival outside the host

Only anecdotal information is available. IMNV is apparently more difficult to inactivate with typical pond disinfection procedures (e.g. sun drying, chlorination, etc.) than are other penaeid shrimp viruses like white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus genotype 1 (YHV1), Taura syndrome virus (TSV) and infectious hypodermal and haematopoietic virus (IHHNV). Reservoir hosts are suspected, but none have been documented consistently.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

No data.

Anexo 22 (cont.)**2.1.4. Life cycle**

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species (common and Latin names)**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IMNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: brown tiger prawn (*P. esculentus*), banana prawn (*P. merguensis*), and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

~~The principal host species in which IMNV is known to cause significant disease outbreaks and mortalities in farmed populations is *Penaeus vannamei* (commonly called the Pacific white shrimp or white leg shrimp) (Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004). The Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*, and the black tiger shrimp, *P. monodon* have been infected experimentally with IMNV, but mortalities did not occur as a consequence of experimental infection in this laboratory trial (Tang *et al.*, 2005).~~

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: giant tiger prawn (*P. monodon*) and blue shrimp (*P. stylirostris*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: southern brown shrimp (*P. subtilis*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

Juveniles and subadults of *P. vannamei*, farmed in marine, brackish, and low salinity brackish water, appear to be most severely affected by infection with IMNV ~~IMN disease~~ (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No data.

2.2.5. Target organs and infected tissue

The principal target tissues for IMNV include the striated muscles (skeletal and less often cardiac), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005).

2.2.6. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of populations of *P. vannamei* that survive IMNV infections ~~and/or epizootics~~ may carry the virus ~~for life~~ and, although this has not been demonstrated scientifically, are believed to transmit virus vertically to progeny.

2.2.7. Vectors

There are no specific data on vectors. However, because of its non-enveloped particle structure, it is possible that IMNV, like TSV, will remain infectious in the gut and faeces of seabirds that feed on dead or moribund shrimp at farms with on-going infection with IMNV ~~IMN~~ epizootics, and be spread within and among farms by faeces or regurgitated shrimp carcasses (Vanpatten *et al.*, 2004).

2.2.8. Known or suspected wild aquatic animals carriers

~~Native wild penaeid shrimp in north-eastern Brazil have been anecdotally reported as hosts.~~

2.3. Disease pattern

In early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where infection with IMNV is enzootic, outbreaks of infection with IMNV-IMN disease associated with sudden high mortalities may follow stressful events such as capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in water salinity or temperature. ~~Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut.~~ Shrimp in the acute phase of infection with IMNV-IMN disease will present focal to extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some shrimp. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be high immediately following a “stress” event and continue for several days (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). Feed conversion ratios (FCR) of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007).

2.3.1. Transmission mechanisms

IMNV has been demonstrated to be transmitted horizontally by cannibalism (Lightner, 2011; Poulos *et al.*, 2006). Transmission via water and vertical transmission from broodstock to progeny probably occurs. Although vertical transmission is suspected from anecdotal evidence, it is not known whether this occurs via transovarial mechanism or by surface contamination of newly spawned eggs.

2.3.2. Prevalence

In regions where infection with IMNV is enzootic in farmed stocks of *P. vannamei*, its prevalence may reach 100% (Andrade *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2004).

2.3.3. Geographical distribution

Infection with IMNV has been reported to occur in north-eastern Brazil (Andrade *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006) and in the East Java Island (Senapin *et al.*, 2007) as well as west Java, Sumatra, Bangka, west Borneo, south Sulawesi, Bali, Lombok and Sumbawa in South-East Asia-Indonesia (Sutanto, 2011; Naim *et al.*, 2014). There are unofficial and anecdotal reports of infection with IMNV occurring in other South-East Asian countries (Senapin *et al.*, 2011).

2.3.4. Mortality and morbidity

Mortalities from infection with IMNV-IMN disease can range from 40% to 70% in cultivated *P. vannamei*; and feed conversion ratios (FCR) of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007).

2.3.5. Environmental factors

Temperature and salinity effects are considered to be likely predisposing factors to disease outbreaks, but no experimental data are available (Nunes *et al.*, 2004).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

No effective “vaccines” for infection with IMNV-IMN are available.

2.4.2. Chemotherapy

No effective therapeutic agents have been reported for infection with IMNV-IMN.

2.4.3. Immunostimulation

No data.

2.4.4. Breeding for resistance-Resistance breeding

There are anecdotal reports of some selected lines of *P. vannamei* having better survival and culture performance in farms where infection with IMNV-IMN is enzootic. During a 20-day controlled laboratory study in which the shrimp were challenged with IMNV, some domesticated lines of *P. vannamei* were found to survive better than other lines (White-Noble *et al.*, 2010).

Anexo 22 (cont.)**2.4.5. Restocking with resistant species**

While there are no published reports, some shrimp farms in Indonesia are believed to have stocked *P. monodon* and *P. stylirostris* because of data from a preliminary study ~~showing~~ suggesting that these species are more resistant to infection with IMNV-IMN than *P. vannamei* (Tang *et al.*, 2005).

2.4.6. Blocking agents

No data.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

While IMNV is believed to be transmitted vertically, there are no scientific data confirming this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is a good management practice recommended to reduce the transmission potential of a number of penaeid shrimp diseases from female spawners to their eggs or larvae, and the practice may reduce IMNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been applied successfully to prevent infection with IMNV infections and development of clinical disease-IMN disease at shrimp farms. Foremost among these has been the application of reverse-transcription-PCR (RT-PCR) for screening pond-reared broodstock or their spawned eggs or nauplii and discarding those that test PCR-positive (Andrade *et al.*, 2007). Following and restocking of affected farms or entire culture regions with IMNV-free stocks of *P. vannamei*, and the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* most suited to local culture conditions has proven to be the most successful husbandry practice for preventing and controlling other virus diseases of shrimp, and should be applicable to control and prevent infection with IMNV-IMN disease (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

Specimens suitable for testing for infection with IMNV infection—using molecular methods (e.g. RT-PCR, nested RT-PCR, real-time RT-PCR, etc.) include postlarvae (PL), juveniles, subadults and adults. While IMNV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in larval stages, so these life stages may not be suitable for detecting IMNV or for certification for freedom of infection with IMNV-IMN disease.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0 *General information* (on diseases of crustaceans).

3.3. Pooling of samples

~~Tissue taken for molecular tests may be pooled. Pool sizes of 5 or less are recommended for tissue sampled from juveniles, subadults and adults. Eggs, larvae and PL can be pooled in larger numbers (e.g. up to 150 eggs or larvae and 5–50 PL depending on their size/age) may be necessary to extract sufficient RNA for RT-PCR testing. See also chapter 2.2.0.~~

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs or tissues

IMNV infects tissues of mesodermal origin. The principal target tissues in the acute phase of infection with IMNV are the striated muscles (skeletal and less commonly cardiac muscle), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ tubule parenchymal cells. In chronic infections, the lymphoid organ may be the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.5. Samples or tissues that are not suitable

IMNV replicates systemically but does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of IMNV infection.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

~~Only the acute phase of IMN disease can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute phase infection with IMNV IMN disease. Clinical signs may have a sudden onset following stresses (e.g. capture by cast netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity). Affected shrimp present with visibly white tails. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be instantaneously high and continue for several days. Clinical signs may have a sudden onset following stresses (e.g. capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity).~~

4.1.2. Behavioural changes

~~Only shrimp in the acute-phase of IMN disease present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp become lethargic during or soon after stressful events such as capture by cast-netting, feeding, sudden changes in water temperature, sudden reductions in water salinity, etc.). Severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and often have a full gut.~~

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

~~Shrimp in the acute phase of IMN disease present focal to extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp. These signs may have a sudden onset following stresses (e.g. capture by cast netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity). Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be instantaneously high and continue for several days.~~

Exposing the paired lymphoid organs (LO) by simple dissection will show that they are hypertrophied (3–4 times their normal size) (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

Anexo 22 (cont.)**4.2.3. Microscopic pathology**

Infection with IMNV-IMN disease in the acute and chronic phases can be presumptively diagnosed using histology (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). However, the lesions in striated muscles and LO are not pathognomonic for infection with IMNV-IMN. White tail disease of penaeid shrimp caused by the *P. vannamei* nodavirus (PvNV) nodavirus PvNV can mimic infection with IMNV-IMN (Tang *et al.*, 2007). Hence, diagnostic information from other sources (e.g. history, gross signs, morbidity, mortality, or RT-PCR findings) may be required to confirm a diagnosis of infection with IMNV-IMN.

By histology using routine haematoxylin–eosin (H&E) stained paraffin sections (Bell & Lightner, 1988), tissue sections from shrimp with acute-phase infection with IMNV-IMN present myonecrosis with characteristic coagulative necrosis of striated (skeletal) muscle fibres, often with marked oedema among affected muscle fibres. Some shrimp may present a mix of acute and older lesions. In these shrimp, the affected muscle fibres appear to progress from presenting coagulative necrosis to presenting liquefactive necrosis, which is accompanied by moderate infiltration and accumulation of haemocytes. In the most advanced lesions, haemocytes and inflamed muscle fibres are replaced by a loose matrix of fibrocytes and connective tissue fibres that are interspersed with haemocytes and foci of (presumed) regenerating muscle fibres (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

Significant hypertrophy of the LO caused by accumulations of lymphoid organ spheroids (LOS) is a highly consistent lesion in shrimp with acute or chronic-phase infection with IMNV-IMN lesions. Often, many ectopic LOS are found in other tissues not near the main body of the LO. Common locations for ectopic LOS include the haemocoelom in the gills, heart, near the antennal gland tubules, and ventral nerve cord (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.2.4. Wet mounts

Stained or unstained tissue squashes of affected skeletal muscle or of the LO may show abnormalities. Tissue squashes of skeletal muscle when examined with phase or reduced light microscopy may show loss of the normal striations. Fragmentation of muscle fibres may also be apparent. Squashes of the LO may show the presence of significant accumulations of spherical masses of cells (LOS) amongst normal LO tubules.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

See Section 4.2.1.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not applicable for diagnostic purposes.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods****4.3.1.1. Microscopic methods***4.3.1.1.1. Wet mounts*

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Sections 4.2.3 and 4.2.6.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

None reported to date.

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Monoclonal antibodies (MAbs) have been developed to the capsid protein of IMNV (Kunanopparat *et al.*, 2011). Three MAbs were developed and when used in combination, they provided better sensitivity than any one of the MAbs used in isolation. However, the sensitivity was approximately tenfold lower than that of a one-step RT-PCR assay using the same sample.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

Published methods are available for the molecular detection of IMNV by *in-situ* hybridisation (ISH), nested RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005). A nested RT-PCR kit for detection of the virus is available commercially. All PCR tests have proved to be specific to IMNV.

As the sensitivity of the nested and real-time RT-PCR is greater than any other diagnostic method available currently, approaching a detection limit of 10 viral genome copies, these tests are the gold standard for detection of IMNV (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006).

DNA probe for ISH detection of IMNV

A cDNA library was generated from RNA extracted from purified IMNV. A IMNV-specific ISH DNA probe is prepared from clone IMNV-317 by PCR labelling with digoxigenin-11-dUTP (DIG). The PCR primers used for amplification of the 993 bp probe are IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') and IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3'). Following PCR, the DIG-labelled DNA probe is precipitated with ethanol, re-suspended in water and stored at -20°C until used. The ISH procedure for detecting IMNV follows that outlined by Tang *et al.* (2005).

RT-PCR for detection of IMNV

A nested RT-PCR method was developed to detect IMNV that uses two PCR primer sets that produce a 328 bp one-step amplicon and 139 bp two-step amplicon. The 1-step PCR can detect as little as 100 IMNV RNA copies and the 2-step PCR can detect in the order of 10 IMNV RNA copies (Poulos & Lightner, 2006).

Viral RNA can be isolated using any commercially available RNA isolation kit. The amount of tissue required will depend on the kit selected (e.g. Qiagen RNA extraction kit, Promega and Roche RNA purification kit recommend using 25–50 mg of tissue³). Depending on the kit used, the elution volume for Roche and Qiagen and low elution volume RNA isolation Promega extraction kit is 100 µl. The high elution volume RNA isolation Promega extraction kit is 500 µl. Extracted RNA should be maintained at -20°C before testing, however, for long-term storage the RNA should be kept at -70°C.

Following RNA extraction, the method is summarised below:

RNA templates:

1. Frozen or ethanol-fixed tissue (pleopods, cephalothorax, muscle)
2. Haemolymph (less sensitive than when other tissues are used)

³ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Anexo 22 (cont.)

RT-PCR reaction mixture (~~Applied Biosystems rTth Enzyme and 5 × EZ Buffer #N808-0178 SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase, Life Technologies~~):

| Reagent | Volume 25 µl reaction | Final concentration |
|---|-----------------------|------------------------|
| DD dH ₂ O | 6.5 5.5 µl | – |
| 5 × EZ Buffer 2 × reaction mix | 5.0 12.5 µl | 1 × |
| dNTP mix Forward/reverse primer (10mM each) | 3.0 1.0 µl | 300 µM each 0.4 µM |
| Primer F (100 ng µl ⁻¹) RT/Taq enzyme mix | 1.0 µl | 0.62 µM |
| Primer R (100 ng µl ⁻¹) | 1.0 µl | 0.62 µM |
| Mn(Oac) ₂ (25 mM) | 2.5 µl | 2.5 mM |
| rTth Enzyme (2.5 U µl ⁻¹) | 6.5 1.0 µl | 0.1 U µl ⁻¹ |
| RNA template ¹ | 1–5 5.0 µl | 1–50 ng total RNA |

¹Template must be heated to >95°C boiled for 3 minutes and chilled on ice just prior to adding to reaction mix.

| Reagent | Volume 25 µl reaction | Final concentration |
|---|-----------------------|------------------------|
| DD dH ₂ O | 6.5 5.5 µl | – |
| 5 × EZ Buffer 2 × reaction mix | 5.0 12.5 µl | 1 × |
| dNTP mix Forward/reverse primer (10mM each) | 3.0 1.0 µl | 300 µM each 0.4 µM |
| Primer F (100 ng µl ⁻¹) RT/Taq enzyme mix | 1.0 µl | 0.62 µM |
| Primer R (100 ng µl ⁻¹) | 1.0 µl | 0.62 µM |
| Mn(Oac) ₂ (25 mM) | 2.5 µl | 2.5 mM |
| rTth Enzyme (2.5 U µl ⁻¹) | 6.5 1.0 µl | 0.1 U µl ⁻¹ |
| RNA template ¹ | 1–5 5.0 µl | 1–50 ng total RNA |

RT-PCR thermal cycling conditions:

| PCR Primers | Temperature (°C) | Time | No. cycles | Amplicon length |
|-------------|------------------|------------------------|------------|-----------------|
| | 60, 95 | 30 minutes, 2 minutes | 1 | |
| 4587F/4914R | 95, 60 62 | 45 seconds, 45 seconds | 39 | 328 bp |
| | 60 | 7 minutes | 1 | |

Nested PCR reaction (~~Amersham Biosciences pure Taq-illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads #27 9558-04, GE Healthcare~~):

| Reagent | 25 µl reaction | Final concentration |
|--|----------------|---------------------|
| DD H ₂ O | 22.5 23 µl | – |
| Primer NF (100 ng µl ⁻¹ -10 µM) | 4.0 0.5 µl | 0.465 0.2 µM |
| Primer NR (100 ng µl ⁻¹ -10 µM) | 4.0 0.5 µl | 0.465 0.2 µM |
| Template ² | 0.5 1.0 µl | – |

²Template for the nested reaction is the product from the first step reaction

Nested PCR thermal cycling conditions:

| Primers | Temperature (°C) | Time | No. cycles | Amplicon length |
|---------------------|------------------|---------------------------------------|------------|-----------------|
| | 95 | 2 minutes | 1 | |
| 4725 NF/ 4863 NR | 95, 65, 72 | 30 seconds, 30 seconds, 30 seconds | 39 | 139 bp |
| | 72 | 2 minutes | 1 | |

Primer sequences:

| Primer | Sequence (5' to 3') | Amplicon Length | Ref. |
|---------|----------------------------|-------------------|--------------------|
| 4587F | CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA | 328 bp | Poulos & Lightner, |
| 4914R | ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT | | 2006 |
| 4725 NF | GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA | 139 bp | |
| 4863 NR | AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G | | |

Quantitative (real-time) RT-PCR for detection of IMNV

A real-time qRT-PCR method was developed to detect and quantify IMNV in shrimp tissue. The method can detect as few as 10 IMNV RNA copies per μ l total RNA (Andrade *et al.*, 2007). The method as published is summarised below.

The Primer Express software (Applied Biosystems) was used to aid the design of the PCR primers and TaqMan probe targeted to the ORF1 region of the IMNV genome (GenBank accession no. AY570982) (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006). Primers IMNV412F (5'-GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA-3') and IMNV545R (5'-AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT-3') amplify a 134 bp DNA. The TaqMan probe, IMNVp1 (5'-6FAM-CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG-TAMRA-3'), which corresponds to the nucleotides 467–500, is labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) at its 5'-end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) at its 3'-end.

The IMNV genome fragment is amplified using an ~~ABI GeneAmp 5700 sequence detection system StepOnePlus PCR System~~ and the ~~TaqMan One-Fast virus 1-Step RT-PCR master mix (Applied Biosystems) Master Mix (Life Technologies)~~. Prior to the ~~real-time qRT-PCR~~, extracted RNA is boiled at ~~95–100°C~~ for ~~5–3~~ minutes to denature the dsRNA and chilled immediately in ~~wet~~ ice. The reaction mixture contains 1 μ l RNA sample, ~~42.5~~ μ l TaqMan Master mix (2 \times), ~~0.625~~ μ l Multiscribe mix (40 \times), 300 nM each primer IMNV412F and IMNV545R, 200 nM. IMNVp1TaqMan probe in a ~~25–10–20~~ μ l final volume. The ~~RT-qRT-PCR~~ thermal cycling conditions used are ~~48–50°C~~ for ~~30–3~~ minutes, ~~95°C~~ for ~~40–minutes–20~~ seconds followed by 40 cycles of ~~95°C~~ for ~~45–3~~ seconds and ~~60°C~~ for ~~4–minute~~. ~~The IMNV RNA copy number–30 seconds. At the end of the samples reaction, fluorescence intensity is determined using serial dilutions measured, a threshold will be set to be above the baseline. Samples with a Ct value lower than 40 cycles are considered to be positive. It is necessary to include a 'no template' control in each reaction run. This is to rule out the presence of a synthetic fluorescence contaminants in the reaction mixture. A positive control should also be included, and it can be RNA extracted from IMNV-infected tissue, or in-vitro transcribed IMNV RNA standard containing the target sequence (see below), and the Gene Amp 5700 sequence detection software.~~

To synthesise an RNA standard for the real-time qRT-PCR, the PCR primers IMNV218F and IMNV682R (5'-GCT-GGA-CTG-TAT-TGG-TTG-AG-3' and 5'-AAC-CAA-GTT-CTT-CTT-CTC-CAG-TT-3', respectively) are used to amplify a 464 bp DNA product from the IMNV genome. The PCR product purified using a QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) was cloned into pGEM-T Easy Vector. A recombinant plasmid, pIMNV-1, confirmed to contain the 464 bp insert by sequence analysis, is linearised by digestion with *Pst*I and used as the template for an *in-vitro* RNA transcription using T7 RNA polymerase and associated reagents (Promega). RNA is synthesised at 37°C for 2 hours in a 50 μ l reaction containing 1 μ g plasmid DNA, followed by DNase I digestion at 37°C for 30 minutes to remove DNA. The length and integrity of the synthetic ssRNA is confirmed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The RNA is purified using a QIAquick PCR Purification kit, quantified by a spectrophotometer, and stored at –70°C.

Anexo 22 (cont.)

4.3.1.2.4. Agent purification

While IMNV has been purified from infected shrimp tissue by sucrose density gradient ultracentrifugation (Poulos *et al.*, 2006), this is not recommended for diagnostic purposes.

4.3.2. Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrates which do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to IMNV.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of infection infection with IMNV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

| Method | Targeted surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|--|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PLs | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | d | c | c | c | d |
| Bioassay | d | d | c | c | c | c |
| Direct LM (<u>wet mount</u>) | d | d | <u>ed</u> | <u>ed</u> | c | c |
| Histopathology | d | d | b | b | a | c |
| Transmission EM | d | d | d | d | d | d |
| Antibody-based assays | d | d | d | d | c | <u>ec</u> |
| DNA probes (ISH) | d | d | <u>ab</u> | <u>ab</u> | a | a |
| Nested RT-PCR or <u>real-time RT-PCR</u> | a | a | a | a | a | a |
| <u>real-time RT-PCR Sequencing</u> | <u>ed</u> | <u>ed</u> | <u>ad</u> | <u>ad</u> | a | a |

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; ISH = *in-situ* hybridisation (ISH); RT-PCR = reverse-transcription polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with infectious myonecrosis virus

As indicated in Table 5.1, nested RT-PCR (Section 4.3.1.2.3) is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, histological demonstration of characteristic IMNV-induced lesions in the striated muscles and the extreme hypertrophy of the LO caused by LOS formation (with or without confirmation by ISH with IMNV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1). The occurrence of significant mortality distinguishes infection with IMNV IMN from penaeid white tail disease caused by PvNV, in which the gross signs and histopathology mimics infection with IMNV IMN disease (Tang *et al.*, 2007).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with IMNV shall be is suspected if at least one of the following criteria is met:

i) Clinical clinical signs consistent with infection with IMNV

or

ii) histopathology consistent with infection with IMNV

or

iii) a positive result by nested RT-PCR or real-time RT-PCR.

~~Sudden high mortalities, usually following stressful events such as capture by cast net, feeding, sudden changes in salinity or temperature, etc., in early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where IMNV is enzootic or where introduction of *P. vannamei* from infected regions or countries has occurred. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut, and shrimp in the acute phase of infection with IMNV IMN disease will present focal to extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be instantaneously high and continue for several days. Exposing the paired LO by simple dissection will show that they are hypertrophied to 3–4 times their normal size.~~

7.2. Definition of confirmed case

~~Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):~~

Infection with IMNV is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

i) histopathology consistent with infection with IMNV ~~Histological demonstration of diagnostic acute, transition or chronic phase IMNV lesions in the striated muscles or the LO.~~

ii) ISH positive result in target tissues ~~(with an IMNV specific cDNA probe) signal to IMNV type lesions in striated necrotic muscle fibres or to distinctive LOS in the lymphoid organs of shrimp with transition or chronic phase IMNV infections in histological sections.~~

iii) One one ~~step or nested RT-PCR (followed by sequencing), or real-time RT-PCR with positive results for IMNV.~~

8. References

ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**, 9–15.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.

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.

Anexo 22 (cont.)

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A., EDITORS (2005). Totiviridae. *In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Francisco, USA, pp. 571–580.

KUNANOPPARAT A., CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., **LONGYANY LONGYANT** S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, **171**, 141–148.

LEE C.S. & O'BRYEN P.J., EDITORS (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, **106**, 110–130.

LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.F.J., REDMAN R.M., PASOS **DE** ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 85.

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.

LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, **96** (Pt **7**), 1821–1819.1829.

MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17: Selective breeding of penaeid shrimp. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 425–452.

NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, **189, 99–105.**

NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, **160**, 1579–1583.

NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1315–1318.

NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, **83**, 37–51 (in Portuguese).

POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 69–72.

POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **87**, 987–996.

SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, **266**, 32–38.

SENAPIN S., **PHIWSALYA, PHEWSAIYA**, K., GANGNONNGIW W. & FLEGEL T.W. (2011). False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. *J. Negat. Results Biomed.*, **10**, 10.

SUTANTO Y. (2011). IMNV cases in Indonesia. Presented to Shrimp Club Indonesia Workshop, 2 March 2011.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 261–265.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 183–190.

TAUKHID & NUR'AINI Y.L. (2009). Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Israeli J. Aquaculture*, **61**, 255–266.

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.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for **infection with** infectious myonecrosis **virus** (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on **infection with** infectious myonecrosis **virus**

NB: FIRST ADOPTED IN 2009; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

CHAPTER 2.2.5.

INFECTION WITH *HEPATOBACTER PENAELI* (NECROTISING HEPATOPANCREATITIS)

1. Scope

Infection with *Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent **Candidatus Candidatus *Hepatobacter penaei***, an obligate intracellular bacterium of the Order α -*Proteobacteria*. The disease is commonly known as necrotising hepatopancreatitis disease is caused by infection with a Gram negative, pleomorphic intracellular alpha-proteobacterium (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Lightner *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996a; 1996b) preliminarily called *Candidatus Hepatobacter penaei*. The principal host species in which necrotising hepatobacterium (NHPB) can cause significant disease outbreaks and mortalities are *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* (Del Río Rodríguez *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1993; Ibarra Gámez *et al.*, 2007; Lightner & Redman, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

NHP has four distinct phases: initial, acute, transition and chronic. In acute and transition phase disease, pathognomonic lesions are typically present in histological sections of the hepatopancreas, while in the initial and chronic phases of the disease, there are no pathognomonic lesions, and molecular and antibody based methods for NHPB detection are necessary for diagnosis (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2012; Vincent & Lotz, 2005).

Synonyms: necrotising hepatobacterium (NHPB) or NHP bacterium (NHPB); rickettsial-like organism (RLO).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

~~NHPB Candidatus *Hepatobacter penaei*~~ is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium (Nunan *et al.*, 2013). It is a member of the α -subclass of *Proteobacteria* (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 × 0.9 μ m), whereas the helical form (0.25 × 2–3.5 μ m) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ associated with North and South American outbreaks of NHP suggests that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996).

2.1.2. Survival outside the host

No data.

2.1.3. Stability of the agent

~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~-infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine. ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ frozen at –20°C to –70°C and –80°C have been shown to retain infectivity in experimental transmission trials with *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1992).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

Anexo 23 (cont.)**2.2. Host factors****2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing a species as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include: whiteleg shrimp (*P. vannamei*)
Most penaeid species can be infected with NHPB, including the principal cultured species in Latin American, *P. vannamei* (Pacific white shrimp) and *P. stylirostris* (Pacific blue shrimp).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*).

~~NHPB infections are most severe in *P. vannamei* where the intracellular bacterium can cause acute epizootics and mass mortality (>90%). In *P. vannamei*, the juvenile, subadult and broodstock life stages are the most severely affected (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010).~~

~~NHPB causes chronic disease in *P. vannamei*, the main effects of which are slow growth, a soft cuticle and a flaccid body (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).~~

~~Outbreaks of NHP disease have been reported in *P. aztecus* (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). NHP has also been seen in *P. californiensis* and *P. setiferus* (Frelief *et al.*, 1995; Lightner, 1996). *Penaeus setiferus* is reportedly less susceptible to disease than *P. vannamei* (Frelief *et al.*, 1995).~~

~~In an NHP survey of the Gulf of Mexico, *P. setiferus* and *P. duorarum* in the vicinity of coastal prawn farms along the Yucatan and Campeche coast revealed no histological evidence of NHP (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006).~~

2.2.3.2. Susceptible stages of the host

~~NHPB Infection with *H. penaei* has been demonstrated in juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei*.~~

2.2.4.3. Species or sub-population predilection

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

2.2.5.4. Target organs and infected tissue

~~The target tissue is the hepatopancreas; with NHPB infection with *H. penaei* has been reported in all hepatopancreatic cell types.~~

2.2.6.5. Persistent infection with lifelong carriers

~~Some members of *P. vannamei* populations that survive NHPB infection with *H. penaei* or epizootics may carry the intracellular bacteria for life and transmit it to other populations by horizontal transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; 2010; Vincent & Lotz, 2005).~~

Natural transmission of NHPB is thought to occur *per os* by cannibalism (Frelier *et al.*, 1993; 1995; Johnson, 1990; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010), although cohabitation and dissemination of NHPB via the water column may also play a role (Frelier *et al.*, 1993; 1995). NHPB in faeces shed into pond water has also been suggested as a possible means of transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Outbreaks of disease are often preceded by prolonged periods of high water temperature (approximately 30°C) and salinity (up to 40 parts per thousand [ppt]) (Frelier *et al.*, 1995; Lightner & Redman, 1994; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.7.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

NHPB is common in wild penaeid shrimp in Peru (*P. vannamei*) and Laguna Madre of Tamaulipas, Mexico (*P. aztecus*, *P. duorarum* and *P. setiferus*) (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Lightner & Redman, 1994).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Horizontal transmission of NHPB ~~Candidatus-*H. penaei*~~ can be horizontal by through cannibalism; transmission or by contaminated water has also been demonstrated (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelier *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2004). *H. penaei* in faeces shed into pond water has also been suggested as a source of contamination (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006).

2.3.2. Prevalence

~~Some~~ Reported mean values for NHPB ~~Candidatus-*H. penaei*~~ prevalence in wild stocks are between 5.6 and 15% in *P. duorarum*, and between 5 and 17% in *P. aztecus* collected from Carrizal and Carbonera, Laguna Madre of Tamaulipas, Mexico (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010). Lightner & Redman (1994) reported a prevalence of 0.77% in cultured *P. vannamei*, and 0.43% in cultured *P. stylirostris* collected from the Tumbes Region, Peru (Lightner & Redman, 1994).

~~Some~~ Reported mean values for NHPB ~~Candidatus-*H. penaei*~~ prevalence in shrimp farms were between 0.6% and 1.3% in *P. vannamei* collected from shrimp farms in Belize, Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua and Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

2.3.3. Geographical distribution

~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ appears to have a Western Hemisphere distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006). In the Western Hemisphere, NHPB ~~Candidatus-*H. penaei*~~ is commonly found in cultured penaeid shrimp in Belize, Brazil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Peru, United States of America, and Venezuela (Frelier *et al.*, 1992; Ibarra-Gómez *et al.*, 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

2.3.4. Mortality and morbidity

In *P. vannamei*, infection by NHPB with *H. penaei* results in an acute, usually catastrophic disease with mortalities approaching 100%.

2.3.5. Environmental factors

The occurrence of infection with replication rate of NHPB Candidatus-*H. penaei* in farms may increase during lengthy-long periods of high temperatures (>29°C) and high salinity changes (20–38% ppt) (Morales-Covarrubias, 2008). In Mexico, NHPB ~~Candidatus-*H. penaei*~~ has been detected at a low prevalence (<7%) in shrimp farms in the months of April, May, July and August. However, in the months of September and October when temperatures are high during the day and low at night, high prevalence and mortality (>20%) are observed (Morales-Covarrubias, 2010).

Anexo 23 (cont.)

2.4. Control and prevention

Control

The use of the antibiotics, oxytetracycline and florfenicol 50%, in medicated feeds every 8 hours for 10 days is probably the best NHPB treatment currently available, particularly if is detected in the initial phase (Frelier *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

Prevention

- a) Early detection (initial phase) of clinical NHPB infection with *H. penaei* is important for successful treatment because of the potential for cannibalism to amplify and transmit the disease.
- b) Shrimp starvation and cannibalism of infected shrimps NHPB infection with *H. penaei*, as well as and positive conditions for NHPB Candidatus *H. penaei* cultivation multiplication, are important factors for the spread of NHPB Candidatus *H. penaei* propagation in *P. vannamei*.
- c) The use of quick-hydrated lime (Ca(OH)₂) to treat the bottom of ponds during pond preparation before stocking can help reduce the incidence of NHPB infection with *H. penaei*.
- d) Preventive measures include raking, tilling, and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged sun-drying (through exposure to sunlight) of ponds and water distribution canals for several weeks, disinfection of fishing gear and other farm equipment using calcium hypochlorite, and drying and extensive liming of ponds.
- e) The use of specific pathogen-free (SPF) broodstock is an effective preventive measure.

Control

The use of the antibiotics, oxytetracycline and florfenicol 50%, in medicated feeds every 8 hours for 10 days is probably the best NHPB treatment currently available, particularly if infection with *H. penaei* is detected in the initial phase (Frelier *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

2.4.1. Vaccination

No scientifically confirmed reports.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. ~~Resistance breeding~~ Breeding for resistance

No scientifically confirmed reports.

2.4.5. Restocking with resistant species

No scientifically confirmed reports.

2.4.6. Blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Disinfection of eggs and larvae is a good management practice (Lee & O'Bryen, 2003) and is recommended for its potential to reduce NHPB Candidatus *H. penaei* contamination of spawned eggs and larvae (and contamination by other disease agents).

2.4.8. General husbandry practices

The prevalence and severity of infection with *H. penaei* may be increased by rearing shrimp in relatively crowded or stressful conditions. Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of NHPB Candidatus infection with *H. penaei* infections and disease. Among these has been the application of PCR to pre-screening of wild or pond-reared broodstock.

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection by NHPB with *H. penaei* are the following life stages: postlarvae [PL], juveniles and adults.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method, see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, sub-adults and adults. However, for eggs, larvae and PL, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 PL depending on their size or age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs or tissues

NHPB ~~Candidatus~~ *Hepatobacter penaei* infects most enteric tissue. The principal target tissue for NHPB ~~Candidatus~~ *H. penaei* is the hepatopancreas. Faeces may be collected and used for testing (usually by PCR, or dot-blot hybridisation with specific probes) when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Bradley-Dunlop *et al.*, 2004; Briñez *et al.*, 2003; Frelieir *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

3.5. Samples or tissues those are not suitable

NHPB ~~Candidatus~~ *H. penaei* does not replicate in the midgut, caeca, connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

The prevalence and severity of NHPB may be enhanced in a contained population by rearing shrimps in relatively crowded or stressful conditions. The 'crowding stress' factors may include high stocking densities, ablation, and marginal water quality (e.g. low dissolved oxygen, elevated water temperature, or elevated ammonia or nitrite) in the holding tank water. These conditions may encourage expression of low grade NHPB infection with *H. penaei* and the transmission of the agent from carriers to previously uninfected hosts in the population. This results in increased prevalence and severity of infections that can be more easily detected using the available diagnostic and detection methods for NHPB.

4.1.1. Clinical signs

A wide range of gross signs can be used to indicate the possible presence of NHPB infection with *H. penaei*. These include: lethargy, reduced food intake, atrophied hepatopancreas, anorexia and empty guts, noticeably reduced growth and poor length weight ratios ('thin tails'); soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; heavy surface fouling by epicomensal organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic.

Anexo 23 (cont.)**4.1.2. Behavioural changes**

In acute NHPB-disease, *P. vannamei* may present behavioural changes including lethargy and reduced feeding activity.

4.2. Clinical methods**4.2.1. Gross pathology**

~~NHPB Infection with *H. penaei* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adult and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Bastos Gomes *et al.*, 2010; Brock & Main, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012). Gross signs are not NHP-specific, but shrimp with acute NHP-infection with *H. penaei* show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance (see Section 4.1.1).~~

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology

Acute and chronic ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ in *P. vannamei* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stain histological methods (see Section 4.2.6).

4.2.3.1. Initial phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

Initial ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ is more difficult to diagnose using routine H&E histological methods. For diagnosis of initial infections, molecular methods are recommended for ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ detection (e.g. by PCR or application of ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~-specific DNA probes, dot-blot hybridisation tests or *in-situ* hybridisation (ISH) of histological sections).

4.2.3.2. The acute phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

Acute ~~NHPB-disease-infection with *H. penaei*~~ is characterised by atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule epithelia, presence of bacterial cells and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations). Hypertrophic cells, individual epithelial cells appeared to be separated from adjacent cells, undergo necrosis and desquamation in to the tubular lumen. The tubular epithelial cell lipid content is variable.

4.2.3.3. Transition phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

The transitional phase of ~~NHPB-disease infection with *H. penaei*~~ is characterised by haemocytic inflammation of the intertubular spaces in response to necrosis, cytolysis, and sloughing of hepatopancreas tubule epithelial cells. The hepatopancreas tubule epithelium is markedly atrophied, resulting in the formation of large oedematous (fluid filled or 'watery') areas in the hepatopancreas. Tubule epithelial cells within multifocal encapsulation are typically atrophied and reduced from simple columnar to cuboidal morphology. They contain little or no stored lipid vacuoles, markedly reduced or no secretory vacuoles and masses of bacteria. At this phase haemocyte nodules were observed in the presence of masses of bacteria in the centre of the nodule

4.2.3.4. Chronic phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

In the chronic phase of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~, tubular lesions, multifocal encapsulation and oedematous areas decline in abundance and severity and are replaced by infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. There are areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells with masses of bacteria in the cytoplasm and low numbers of haemocyte nodules.

4.2.4. Wet mounts

Wet-mount squash examination of hepatopancreas (HP)-tissue is generally conducted to detect presumptive ~~NHPB-disease~~ infection with *H. penaei*. The hepatopancreas may be atrophied and have any of the following characteristics: soft and watery; fluid filled centre; pale with black stripes (melanised tubules); pale centre instead of the normal orange coloration. For wet mount analysis the shrimp must be in the intermolt stage, and have not undergone a treatment that could alter the tubules. This technique uses tubular deformation or atrophy, mainly of the apical region to indicate early stages of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~.

~~NHPB-disease~~-Infection with *H. penaei* has four phases (a semiquantitative scale):

Initial phase: low presence of tubular deformation ($1-5 \text{ field}^{-1} \text{ organism}^{-1}$) and cell detachment.

Acute phase: infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules ($6-10 \text{ field}^{-1} \text{ organism}^{-1}$), encapsulation present in different regions of the sample (i.e. atrophied tubules surrounded by multiple layers of haemocytes).

Transition phase: infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules ($11-15 \text{ field}^{-1} \text{ organism}^{-1}$), melanised tubules, necrotic tubules and a high level of encapsulation present in different regions of the sample. ~~At this stage haemocyte nodules were observed with masses of bacteria in the centre of the nodule.~~

Chronic phase: areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells ~~with masses of bacteria in the cytoplasm.~~

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Electron microscopy/cytopathology

Not currently applicable for diagnostic purposes

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See section 4.2.4

4.3.1.1.2. Smears

Not applicable

4.3.1.1.3. Fixed sections

See section 4.2.3.

4.3.1.1.4. Bioassay method

Confirmation of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ may be accomplished by bioassay of ~~NHPB-suspect~~ animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the intracellular bacteria (Cock *et al.*, 2009; Johnson, 1990; Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005). Oral protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped hepatopancreas of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks. The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only a normal feed, is required. When the hepatopancreas feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~, ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3-4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3-8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10-15 days) for gross or histological signs of ~~NHPB-disease-infection with *H. penaei*~~ and unusual mortalities.

Anexo 23 (cont.)

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture or artificial media

~~NHPB Candidatus *Hepatobacter penaei*~~ has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2007).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Immunohistochemistry (IHC) tests using monoclonal antibodies (MAbs) to ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~, according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004), are available for *H. penaei* detection.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

ISH and PCR tests for ~~NHPB detection of *H. penaei*~~ have been developed, and PCR kits for ~~NHPB~~ are commercially available. ~~PCR tests for *H. penaei* have been developed and a number of methods and commercial products using these methods are available~~ (Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Gene probes and PCR methods provide greater diagnostic sensitivity than ~~de~~-classic histological approaches to ~~NHP~~ diagnose infection with *H. penaei*. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp.

4.3.1.2.3.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

~~Non-radioactive, digoxigenin-11-dUTP (DIG)-labelled probes for NHPB Candidatus *H. penaei* may be produced in the laboratory.~~ The ISH method of Loy & Frelier (1996) and Lightner (1996) provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ detection and diagnosis of infection that employ classical histological methods (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012). The ISH assay of routine histological sections of acute, transition and chronic phase lesions in hepatopancreas with a specific DIG-labelled cDNA probe to ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~, provides a definitive diagnosis of ~~NHPB~~-infection with *H. penaei* (Lightner, 1996; Loy & Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Pathognomonic ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. (See Chapter 2.2.3 Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

4.3.1.2.3.2. PCR method

Hepatopancreas and faeces may be assayed for ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ using PCR. Primers designated as NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' and NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', amplify a 379 base pair (bp) ~~designed against the GenBank accession number fragment~~ corresponding to the 16S rRNA of ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ (Nunan *et al.*, 2008). The PCR method outlined below generally follows the method described in Aranguren *et al.* (2010) ~~with modifications by an OIE Reference Laboratory in the USA.~~

- i) *Preparation of DNA template:* DNA can be extracted from 25–50 mg of fresh, frozen and ethanol-preserved hepatopancreas. Extraction of DNA should be performed using commercially available DNA tissue extraction kits following the manufacturer's procedures for production of quality DNA templates. DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)⁴.
- ii) The following controls should be included when performing the PCR assay for ~~NHPB~~
 - a) known ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ negative tissue sample; b) a known ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ -positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.

⁴ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Anexo 23 (cont.)

- iii) The PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iv) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of ~~NHPB Candidatus~~ *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl⁻¹), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- v) If the thermal cycler does not have a heated lid, then light mineral oil (50 µl) is overlaid on the top of the 25 µl reaction mixtures to prevent condensation or evaporation during thermal cycling.
- vi) The cycling parameters are: Step 1: 95°C for 5 minutes, 1 cycle; Step 2: 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, 35 cycles; Step 3: 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, 1 cycle; 4°C infinite hold.

Note: The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.

4.3.1.2.3.3. Real-time PCR method

Real-time PCR methods ~~have been developed~~ for detection of ~~NHPB Candidatus~~ *H. penaei*. ~~These methods~~ have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real-time PCR is ~100 copies of the target sequence from the ~~NHPB Candidatus~~ *H. penaei* genome (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for ~~NHPB Candidatus~~ *H. penaei* generally follows the method used in Aranguren *et al* (2010).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the 16S, rRNA gene of ~~NHPB Candidatus~~ *H. penaei* (GenBank U65509) (Loy & Frelie., 1996). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP1300F) and downstream (NHP1366R) primer sequences are: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' and 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *Preparation of DNA template:* the extraction and purification of DNA template from hepatopancreas, is the same as that described in the section for traditional PCR.
- iii) *The real-time PCR reaction mixture contains:* TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng of DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) Amplification is performed with the master cycler Realplex 2.0 (Eppendorf). The cycling consists of initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. After each cycle, the levels of fluorescence are measured.
- v) ~~At the end of the reaction, real time fluorescence measurements will be taken with a built in charge coupled device (CCD) camera. A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase in PCR product.~~
- vi) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture ~~or in the heat block of the thermal cycler, and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay.~~ A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, purified bacteria, or DNA extracted from ~~NHPB~~ *H. penaei*-infected hepatopancreas.

4.3.1.2.3.4. Sequencing

PCR products may be cloned and sequenced or sequenced directly when necessary to confirm infection ~~by NHPB with~~ *H. penaei* or to identify false positives or nonspecific amplification (Aranguren *et al.*, 2010; Bustin *et al.*, 2009; Vincent & Lotz, 2005).

Anexo 23 (cont.)

4.3.1.2.4. Agent purification

Methods for ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~ isolation and purification are available (Aranguren *et al.*, 2010; Nunan *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2004; Vincent & Lotz, 2005). The ~~NHPB-bacterium Candidatus-*Hepatobacter penaei*~~ is unculturable using traditional bacteriological methods, thus ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ must be maintained through continual exposure of uninfected ~~*LP. vannamei*~~ stock to a population undergoing an epizootic of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~.

4.3.2 Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrate animals that do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

| Method | Targeted surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|--------------------------------|-----------------------|-----|-----------|--------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PLs | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | d | ed | ed | bd | d |
| Bioassay | d | d | d | d | c | d |
| Direct LM (<u>wet mount</u>) | d | d | ed | d | ed | d |
| Histopathology | d | bd | bc | c | a | bc |
| <i>In-situ</i> DNA probes | a | a | a | a | a | a |
| Transmission EM | d | d | d | d | c | c |
| Antibody-based assays | d | d | c | c | bc | bc |
| Real-time PCR | a | a | a | a | a | a |
| PCR | a | a | a | a | a | a |
| Sequencing | d | d | d | d | d | a |

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *H. penaei*-Necrotising hepatopancreatitis

As indicated in Table 5.1, real-time PCR (Section 4.3.1.2.3.2) is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity. When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~-induced lesions in the hepatopancreas by histology (with or without confirmation by ISH with ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of a suspect case

Infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

i) histopathology consistent with infection with *H. penaei*

or

ii) ISH positive results in target tissues

or

ii) a positive result by PCR or real-time PCR.

~~The presence of NHPB infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:~~

- ~~• Sudden high mortalities in late PL, juvenile or subadult *P. vannamei* or *P. stylirostris* in regions where NHPB infection with *H. penaei* is enzootic;~~
- ~~• Samples of cultured *P. vannamei* or *P. stylirostris* from ponds with feeding sea birds that present gross signs indicative of acute or transition phase infection with *H. penaei*, such as a general atrophied hepatopancreas, reddish colouration, lethargy, soft shells, empty guts, and the presence of numerous irregular black spots on the cuticle;~~
- ~~• Poor hatching success of eggs, and poor survival and culture performance of the larval and PL stages when broodstock are used from wild or farmed stocks where NHPB infection with *H. penaei* is enzootic.~~

7.2. Definition of confirmed case

Infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

i) histopathology consistent with infection with *H. penaei*

ii) ISH positive result in target tissues

iii) PCR (followed by sequencing), or real-time PCR with positive results for infection with *H. penaei*.

~~Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):~~

- ~~• Histological demonstration of diagnostic acute phase NHPB infection with *H. penaei* lesions in (especially) the atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule mucosa, presence of bacteria and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations).~~
- ~~• ISH positive histological signal to lesions suggestive of NHPB infection with *H. penaei*.~~
- ~~• PCR positive results for NHPB infection with *H. penaei*.~~

8. References

AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.

Anexo 23 (cont.)

ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.

ARANGUREN L.F., TANG K.F. **J.** & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.

~~BASTOS GOMES G., SANTOS DOMINGOS J.A., CAVALCANTI OLIVEIRA K.K., DE PAULA MENDES P., ARNS DA SILVA V. & SHINOZAKI MENDES E. (2010). Diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, through wet mount, histopathology and PCR techniques. *J. World Aquac. Soc.*, **41**, 816–822.~~

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (eds). (2001). Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. *In: Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 p.

BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & **D.V.** LIGHTNER. **D.V.** (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.

BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **69**, ~~55–72~~ **55**, **69–72**.

~~BROCK J.A. & MAIN F. (1994). *A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 241 p.~~

BUSTIN S. **A.**, **BENES V.**, GARSON J. **A.**, HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M. **W.**, SHIPLEY G. **L.**, VANDESOMPELE J. & WITTWER C. **T.** (2009). The MIQE guidelines: **minimal minimum** information for publication of quantitative **real-time** PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.

COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.

CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.

DEL RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, ~~606–201~~ **606–609**.

FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.

FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A. LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. (1995). Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. *In: Swimming Through Troubled Waters. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95. San Diego, CA, USA, 240 p.

FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.

GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPIZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.

IBARRA-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Cienc. Mar.*, **33**, 1–9.

JOHNSON S.K. (1990). *Handbook of Shrimp Diseases*. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA, 25p.

Anexo 23 (cont.)

~~JORY D.E. (1997). Necrotizing hepatopancreatitis and its management in shrimp ponds. *Aquaculture Magazine*, **23**, 98–101.~~

LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (eds). (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

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

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.

~~LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BONAMI J.R. (1992). Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 235–239.~~

LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., **SERBAN I.T., TASCAS S.J.** & TEMPLETON J.W. (1996a). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.

LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones*, Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., **LEMUS-PEREIRA A.M., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P.,** SOLÍS MONTIEL V.T., **RUIZ-LUNA A.** & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXI**, 434–446.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M. (2012). Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXII**, 72–80.

NUNAN L.M., PANTOJA C.R., GOMEZ-JIMENEZ S. & LIGHTNER D.V. (2013). "Candidatus Hepatobacter penaei." an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.*, **79** (4), 1407–1409. doi: 10.1128/AEM.02425-12. Epub 2012 Dec 14.

Anexo 23 (cont.)

NUNAN L.M., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 69–73.

VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to **KONA Kona** stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*
* *

NB: At the time of publication (2015) there was not yet an OIE Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

NB: FIRST ADOPTED IN 2012; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2015

CHAPTER 2.2.6.

INFECTION WITH TAURA SYNDROME VIRUS**1. Scope**

Infection with Taura syndrome virus means infection with the pathogenic agent Taura syndrome virus (TSV), of the Genus Aparavirus, Family Dicistroviridae, Order Picornavirales. Genus Aparavirus genus Aparavirus in the Family Dicistroviridae.

Taura syndrome (TS) is a viral disease of penaeid shrimp caused by infection with Taura syndrome virus (TSV) (Bonami *et al.*, 1997; Fauquet *et al.*, 2005; Lightner 1996a; Mari *et al.*, 1998).

2. Disease information**2.1. Agent factors****2.1.1. Aetiological agent, agent strains**

The aetiological agent of Taura syndrome (TS) is TSV was described as the cause of the disease commonly known as Taura syndrome by Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) of TSV have been documented based on the gene sequence encoding VP1 the largest and presumably dominant of the three major structural proteins of the virus. Based on VP1 sequence variations, these genotypic groups are: 1) the Americas group; 2) the South-East Asian group; 3) the Belize group; and 4) the Venezuelan group (Chang *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

At least two distinct antigenic variants of TSV have been identified by their differential reactivity to monoclonal antibody MAb 1A1, produced to a reference isolate from the Americas (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999): Type A represents those that react with MAb 1A1 (in the enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], Western blots and immunohistochemistry (IHC) with infected tissues) and those that do not. The MAB 1A1 non-reactors were subdivided into Types B (TSV 98 Sinaloa, Mexico) and Type C (TSV 02 Belize), based on host species and virulence. All TSV isolates of the Americas and most, if not all, South-East Asian genotypes react with MAb 1A1. In marked contrast, none of the Belize genotype group reacts with MAb 1A1 (Erickson *et al.*, 2002; 2005), nor does a TSV isolate from the 2005 epizootic in Venezuelan shrimp farms.

TSV particles are 32 nm in diameter, non-enveloped icosahedrons and have a buoyant density of 1.338 g ml⁻¹ in CsCl. The genome of TSV consists of a linear, positive-sense single-stranded RNA 10,205 nucleotides in length, excluding the 3' poly-A tail, and it contains two large open reading frames (ORFs). ORF 1 contains the sequence motifs for nonstructural proteins, such as helicase, protease and RNA-dependent RNA polymerase. ORF 2 contains the sequences for TSV structural proteins, including the three major capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (55, 40, and 24 kDa, respectively). The virus replicates in the cytoplasm of host cells (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

TSV has been assigned to the genus Aparavirus in the Family Dicistroviridae in the 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; King *et al.*, 2012).

Other reported causes of Taura syndrome: TS in Ecuador was initially linked to fungicide contamination of shrimp farms, a contention that was supported by litigation for ~ 16 years after the disease was scientifically shown to have a viral aetiology (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 2005). Hence, several papers in the literature propose a toxic aetiology for TS (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

Anexo 24 (cont.)**2.1.2. Survival outside the host**

No information available.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

No information available.

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with TSV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern white shrimp (*P. setiferus*), blue shrimp (*P. stylirostris*), and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

The principal host species for TSV are the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, and the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*. While the principal host species for TSV all belong to the penaeid subgenus *Litopenaeus*, other penaeid species can be infected with TSV by direct challenge, although disease signs do not develop. Documented natural and experimental hosts for TSV include: *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. indicus* and *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.*, 2005; Stentiford *et al.*, 2009; Wertheim *et al.*, 2009).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: fleshy prawn (*P. chinensis*), giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), the copepod *Ergasilus manicatus*, and the barnacles *Chelonibia patula* and *Octolasmis muelleri*.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: northern pink shrimp (*P. duorarum*), kuruma prawn (*P. japonicus*), southern white shrimp (*P. schmitti*), gulf killifish (*Fundulus grandis*), blue crab (*Callinectes sapidus*), the crabs *Uca vocans* and *Sesarma mederi*, and Indo-Pacific swamp crab (*Scylla serrata*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

Infection with TSV has been documented in all life stages (i.e. post-larvae [PL], juveniles and adults) of *P. vannamei* (the most economically significant of the two principal host species) except eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No data. All postlarval stages of *P. vannamei*, and populations of other known susceptible species.

2.2.5. Target organs and infected tissue

TSV infects and has been shown to replicate (using ISH with specific DNA probes) principally in the cuticular epithelium (or hypodermis) of the general exoskeleton, foregut, hindgut, gills and appendages, and often in the connective tissues, the haematopoietic tissues, the lymphoid organ (LO), and antennal gland. The enteric organs (endoderm-derived hepatopancreas, midgut and midgut caeca mucosal epithelia) and smooth, cardiac, striated muscle, and the ventral nerve cord, its branches and its ganglia typically show no histological signs of infection with TSV and are usually negative for TSV by ISH (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Hasson *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; Jimenez *et al.*, 2000; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998a; 1998b; Lightner *et al.*, 1995; Srisuvan *et al.*, 2005).

2.2.6.5. Persistent infection ~~with lifelong carriers~~

Some members of populations of *P. vannamei* or *P. stylirostris* that survive infection with TSV ~~infections or epizootics~~ may carry the virus for life (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b) and, although not documented, are assumed to pass the virus to their progeny by vertical transmission.

2.2.7. ~~6.~~ Vectors

Sea birds: TSV has been demonstrated to remain infectious for up to 48 hours (after ingestion of TSV-infected shrimp carcasses) in the faeces passed by wild or captive sea gulls (*Larus atricilla*) and chickens (*Gallus gallus domesticus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastro-intestinal system of any bird species. These findings implicate birds as being an important mechanical vector for the transmission of the virus within affected farms or farming regions (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Aquatic insects: the water boatman (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], an aquatic insect that feeds on shrimp carcasses in shrimp farm ponds), has also been shown to serve as a ~~mechanical~~ vector of TSV (Brock, 1997; Lightner, 1995, 1996a, 1996b).

~~Frozen TSV infected commodity products~~: TSV has been found in frozen commodity shrimp (*P. vannamei*) products in samples from markets in the USA that originated in Latin America and South-East Asia. Improper disposal of wastes (liquid and solid, i.e. peeled shells, heads, intestinal tracts, etc.) from value added reprocessing of TSV infected shrimp at coastal locations may provide a source of TSV that may contaminate wild or farmed stocks near the point of the waste stream discharge (Lightner, 1996b; Nunan *et al.*, 2004).

2.2.7. ~~Known or suspected wild aquatic animal carriers~~

~~No data.~~

2.3. Disease pattern

Infection with TSV is best known as a disease of nursery- or grow-out-phase *P. vannamei* that occurs within ~14–40 days of stocking PLs into grow-out ponds or tanks, hence, shrimp with infection with TSV are typically small juveniles of from ~0.05 g to <5 g. Larger shrimp may also be affected, especially if they are not exposed to the virus until they are larger juveniles or adults (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz, 1997).

2.3.1. Transmission mechanisms

~~Transmission of TSV can be by horizontal or vertical routes.~~ Horizontal transmission through by cannibalism or by contaminated water has been demonstrated (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; White *et al.*, 2002). Vertical transmission from infected adult broodstock to their offspring is strongly suspected but has not been experimentally confirmed.

2.3.2. Prevalence

In regions where the virus is enzootic in farmed stocks, the prevalence of infection with TSV has been found in various surveys to range from 0 to 100% (Brock, 1997; Jimenez *et al.*, 2000; Laramore, 1997).

2.3.3. Geographical distribution

TSV is now widely distributed in the shrimp-farming regions of the Americas, South-East Asia and the Middle East (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2009; Yu & Song, 2000).

Anexo 24 (cont.)

The Americas: following its recognition in 1992 as a distinct disease of cultured *P. vannamei* in Ecuador (Brock *et al.*, 1995; Jimenez, 1992; Lightner *et al.*, 1995), TSV spread rapidly throughout many of the shrimp-farming regions of the Americas through shipments of infected PL and broodstock (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012). Within the Americas, TS and/or Infection with TSV has been reported from virtually every penaeid shrimp-growing country in the Americas and Hawaii (Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2012; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001). TSV is enzootic in cultured penaeid shrimp stocks on the Pacific coast of the Americas from Peru to Mexico, and it has been occasionally found in some wild stocks of *P. vannamei* from the same region (Lightner & Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1995). TSV has also been reported in farmed penaeid stocks from the Atlantic, Caribbean, and Gulf of Mexico coasts of the Americas, but it has not been reported in wild stocks from these regions (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 2005; 2011; Lightner *et al.*, 2012).

Asia and the Middle East: Infection with TSV was introduced into Chinese Taipei in 1999 with infected imported Pacific white shrimp, *P. vannamei*, from Central and South American sources (Tu *et al.*, 1999; Yu & Song, 2000). Since that original introduction, the virus has spread with movements of broodstock and PL to China (People's Rep. of), Thailand, Malaysia, and Indonesia where it has been the cause of major epizootics with high mortality rates in introduced unselected stocks of *P. vannamei* not selected for resistance (Chang *et al.*, 2004; Lightner, 2011; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005). Recently In-During 2010 and 2011, infection with TSV has also been was associated with significant mortalities in farmed *P. indicus* being farmed in Saudi Arabia. By a phylogenetic analysis based on the viral capsid protein 2 (also named as VP1) sequence, the Saudi Arabian TSV clustered into a new, distinct group (Tang *et al.*, 2012; Wertheim *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortality and morbidity

At a farm level, TS epizootics outbreaks of infection with TSV involving unselected (i.e. not selected for TSV resistance) stocks of *P. vannamei* not selected for resistance, the principal host species for infection with TSV, typical cumulative mortalities range from 40 to >90% in cultured populations of PL, juvenile, and subadult life stages. TSV-resistant lines of *P. vannamei* are available which show survival rates of up to 100% in laboratory challenge with all four TSV genotypes (Lightner *et al.*, 2009; Moss *et al.*, 2001).

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks of infection with TSV are more frequent when salinities are below 30 ppt (Jimenez *et al.*, 2000).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for TSV are available.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Resistance-Breeding for resistance

After TSV emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to infection with TSV (genotype 1, MAb 1A1 Type A). Following from this discovery and due to the disease occurrence in TSV reaching Mexico in 1994 where it caused crop failures of *P. vannamei*, selected lines of TSV-resistant *P. stylirostris* became the dominant shrimp farmed in western Mexico from 1995. However, in 1998–1999, a new 'strain' of TSV (Type B; Erickson *et al.*, 2002; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarin-Herzberg & Ascencio, 2001) emerged and caused massive epizootics in *P. stylirostris*. The emergence of this new 'strain' of TSV was soon followed in late 1999 by the introduction of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp farms in western Mexico, to which *P. stylirostris* had no resistance, effectively ending any interest in the culture of *P. stylirostris* in Mexico.

TSV-resistant domesticated stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have been developed. Some domesticated lines of TSV-resistant *P. vannamei* (that are also TSV-free) are in widespread use by the shrimp-farming industries of the Americas and South-East Asia (Clifford, 1998; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002). After the appearance of infection with TSV in Central America, improved TSV resistance was reported in wild caught *P. vannamei* PLs used to stock shrimp farms in the region (Laramore, 1997).

2.4.5. Restocking with resistant species

Selected lines of TSV resistant *P. vannamei* have been developed and are commercially available (Clifford, 1998; Laramore, 1997; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002).

2.4.6. Blocking agents

Resistance to infection with TSV was reported by expression of the TSV coat protein antisense RNA in *P. vannamei* zygotes. Transgenic juveniles reared from zygotes protected in this manner showed improved resistance to TSV challenge by *per os* or intramuscular (IM) injection routes (Lu & Sun, 2005). Similar results have been produced by injection of short random double-stranded RNAi sequences into juvenile *P. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

It is possible that TSV might be transmitted vertically (transovarian transmission), despite ~~no the lack of~~ published reports documenting this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is good management practice and it is recommended for its potential to reduce TSV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry and disease control and management practices have been used successfully to reduce the risks of infection with TSV ~~infections and disease~~ occurring during farm grow-out. These include the application of PCR assays for prescreening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), fallowing and restocking of entire culture regions with TSV-free stocks (Dixon & Dorado, 1997), and the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Moss *et al.*, 2001; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992; Wyban *et al.*, 2004). The adoption of the latter technology (SPF stocks) has proven to be among the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with TSV. ~~Unfortunately, there is a misconception in the industry that SPF is a genetic trait rather than a condition of health status. The development of SPF *P. vannamei* that were free not only of TSV, but also of all the major known pathogens of penaeid shrimp, has resulted in the introduction of the species to Asia and to its surpassing *P. monodon* in 2005 as the dominant farmed shrimp species in Asia, as well as the Americas where the SPF stocks were developed (FAO, 2006; Lightner, 2005; Rosenberry, 2004).~~

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection with TSV include PL, juveniles and adults. While TSV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for TSV detection or certification of freedom from infection with TSV.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

~~Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, subadults and adults. However, for eggs, larvae and PL pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.~~

Anexo 24 (cont.)

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs and tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of infection with TSV is the cuticular epithelium. In chronic infections the LO is the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.5. Samples or tissues that are not suitable

TSV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection with TSV.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Only acute-phase ~~TS clinical infection with TSV-disease~~ can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute-phase clinical infection with TSV-disease.

4.1.2. Behavioural changes

Only shrimp with acute-phase clinical infection with TSV ~~TS-disease~~ present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp apparently become hypoxic and move to the pond edges or pond surface where dissolved oxygen levels are higher. Such shrimp may attract seabirds in large numbers. In many ~~TS-disease~~ outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicates the presence of a serious disease outbreak (which is often either infection with TSV or ~~infection with white spot syndrome virus when sea birds are observed~~) to the farm manager.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

Infection with the TSV has three distinct phases, acute, transition, and chronic, which are grossly distinguishable (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Gross signs presented by juvenile, subadult and adult shrimp in the transition phase of infection with TSV are unique and provide a presumptive diagnosis of the disease.

Acute phase: gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase infection with TSV include expansion of the red chromatophores giving the affected shrimp a general, overall pale reddish coloration and making the tail fan and pleopods distinctly red; hence 'red tail' disease was one of the names given by farmers when the disease first appeared in Ecuador (Lightner *et al.*, 1995). In such shrimp, close inspection of the cuticular epithelium in thin appendages (such as the edges of the uropods or pleopods) with a ×10 hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute infection with TSV ~~TS~~ typically have soft shells, an empty gut and are often in the late D stages of the moult cycle. Acutely affected shrimp usually die during ecdysis. ~~If the affected shrimp are larger than ~1 g, moribund shrimp may be visible to sea birds at the pond edges and surface. Thus, during the peak of severe epizootics, hundreds of sea birds (gulls, terns, herons, cormorants, etc.) may be observed feeding on affected moribund shrimp that accumulate at the surface of the affected pond surface and edges (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Garza *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995; Vanpatten *et al.*, 2004).~~

Transition (recovery) phase: although only present for a few days during outbreaks of infection with TSV, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a tentative diagnosis of infection with TSV. During the transition phase (which may be occurring while many shrimp in the affected populations are still in the acute phase and daily mortalities are high), fair to moderate numbers of shrimp in affected ponds show random, multifocal, irregularly shaped melanised cuticular lesions. These melanised spots are haemocyte accumulations indicating the sites of resolving TSV lesions in the cuticular epithelium. Such shrimp may or may not have soft cuticles and red-chromatophore expansion, and may be behaving and feeding normally (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011).

Chronic phase: after successfully moulting, shrimp in the transition phase move into the chronic phase of infection with TSV in which persistently infected shrimp show no obvious signs of disease (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). However, *P. vannamei* that are chronically infected with TSV may be less resistant to normal environmental stressors (i.e. sudden salinity reductions) than uninfected shrimp (Lotz *et al.*, 1995).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology (for penaeid hosts)

Infection with TSV in the acute and chronic phases can be diagnosed ~~most reliably~~ using histological methods (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Pathognomonic TSV-induced pathology is unique in acute-phase infections (Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a; 2011). In chronic infections with TSV, the only lesion typically presented by infected shrimp is the presence of an enlarged LO with multiple LO spheroids (LOS) (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner 2011), which cannot be distinguished from LOS induced by chronic infections of other RNA viruses (Lightner, 1996a). When LOS are observed by routine histology and chronic infection with TSV is suspected, a molecular test (ISH with TSV-specific probes, or reverse-transcription [RT] PCR [see Section 4.3.1.2.7]) is recommended for confirmation of infection with TSV.

4.2.3.1. Acute phase of Taura syndrome

Diagnosis of infection with TSV in the acute phase of the disease is dependent on the histological demonstration (in haematoxylin and eosin [H&E] stained preparations) of multifocal areas of necrosis in the cuticular epithelium of the general body surface, appendages, gills, hindgut, and foregut (the oesophagus, anterior and posterior chambers of the stomach). Cells of the subcuticular connective tissues and adjacent striated muscle fibres basal to affected cuticular epithelium are occasionally affected. In some severe cases of acute-phase infection with TSV, the antennal gland tubule epithelium is also destroyed. Prominent in the multifocal cuticular lesions are conspicuous foci of affected cells that display an increased eosinophilia of the cytoplasm and pyknotic or karyorrhectic nuclei. Cytoplasmic remnants of necrotic cells are often extremely abundant in these infections with TSV acute-phase lesions and these are generally presented as spherical bodies (1–20 µm in diameter) that range in staining from eosinophilic to pale basophilic. These structures, along with pyknotic and karyorrhectic nuclei, give acute-phase TS lesions a characteristic 'peppered' or 'buckshot-riddled' appearance, which is considered to be pathognomonic for the infection when there is no concurrent necrosis of the parenchymal cells of the LO tubules. The absence of necrosis of the LO in acute-phase infection with TSV ~~infections~~ distinguishes it from acute-phase infection with yellowhead virus genotype 1 disease in which similar patterns of necrosis to those induced by infection with TSV may occur in the cuticular epithelium and gills (Lightner, 1996a).

In TSV-infected tissues, pyknotic or karyorrhectic nuclei give a positive (for DNA) Feulgen reaction, which distinguishes them from the less basophilic to eosinophilic cytoplasmic inclusions that do not contain DNA. The absence of haemocytic infiltration or other signs of a significant host-inflammatory response distinguishes the acute phase of infection with TSV from the transitional phase of the disease (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).

Anexo 24 (cont.)**4.2.3.2. Transition (recovery) phase of infection with Taura syndrome virus**

In the transitional phase of infection with TSV, typical acute-phase cuticular lesions decline in abundance and severity and are replaced by conspicuous infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. The masses of haemocytes may become melanised giving rise to the irregular black spots that characterise the transition phase of the disease. In H&E sections, such lesions may show erosion of the cuticle, surface colonisation and invasion of the affected cuticle and exposed surface haemocytes by *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Sections of the LO during the transition phase of infection with TSV may appear normal with H&E staining. However, when sections of the LO are assayed for TSV by ISH with a specific cDNA probe (or by ISH with MAb 1A1 for TSV type A, genotype 1), large quantities of TSV are shown accumulating in the more peripheral parenchymal cells of the LO tubules (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3.3. Chronic phase of infection with Taura syndrome virus

Shrimp in the chronic phase of infection with TSV display no gross signs of infection, and histologically the only sign of infection is the presence of numerous prominent LOS, which may remain associated with the main body of the paired LO, or which may detach and become ectopic LOS bodies that lodge in constricted areas of the haemocoel (i.e. the heart, gills, in the subcuticular connective tissues, etc.). Such LOS are spherical accumulations of LO cells and haemocytes and may be distinguished from normal LO tissues by their spherical nature and the lack of the central vessel that is typical of normal LO tubules. When assayed by ISH with a cDNA probe for TSV (or with MAb 1A1 using ISH) some cells in the LOS give positive reactions to the virus, while no other target tissues react (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011).

4.2.4. Wet mounts

Direct microscopy of simple unstained wet mounts from excised pieces of the gills, appendage tips, etc., examined by phase- or reduced-light microscopy may be used to demonstrate (and make a tentative diagnosis of acute-phase infection with TSV-~~infection~~) focal lesions of acute-phase infection with TSV-~~infection~~ in cuticular epithelial cells. Preparations presenting acute-phase infection with TSV-~~infection~~ will contain numerous spherical structures (see the histopathological methods in Section 4.2.3 above), which are pyknotic and karyorrhectic nuclei and cytoplasmic remnants of necrotic cells.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not currently applicable for diagnostic purposes.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods****4.3.1.1. Microscopic methods***4.3.1.1.1. Wet mounts*

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

TSV has not been grown *in vitro*, as no crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Pantoja et al., 2004). ~~Despite a~~ Although one publication ~~that~~ incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle et al., 2003), two other laboratories ~~that~~ repeated the study ~~and~~ both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines with that are known to have susceptibility to human picornaviruses (Luo et al., 2004; Pantoja et al., 2004).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

An MAb for detection of TSV may be used to assay samples of haemolymph, tissue homogenates, or Davidson's AFA-fixed tissue sections from shrimp (Erickson *et al.*, 2002; 2005; Poulos *et al.*, 1999). TSV MAb 1A1 may be used to distinguish some variants or 'strains' of TSV from other strains (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

4.3.1.2.3. Bioassay method

Confirmation of infection with TSV may be accomplished by bioassay of TSV-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the virus (Brock *et al.*, 1997; Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Oral or injection protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped carcasses of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks (White *et al.*, 2002). The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only SPF (TSV-free) tissue and normal shrimp feed is required. When the carcass feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for TSV, TSV-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of disease and unusual mortalities (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

With the injection bioassay protocol, a variety of sample types may be tested for TSV. Whole shrimp are used if they were collected during an outbreak of infection with TSV-epizootic. Heads only should be used if shrimp display gross transition-phase lesions (multifocal melanised spots on the cuticle) or no clinical signs of infection (chronic phase) as the virus, if present, will be concentrated in the LO (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). For non-lethal testing of broodstock, haemolymph samples may be taken and used to expose the indicator shrimp by IM injection (Lightner, 1996a).

To perform the IM (injection) bioassay for TSV:

Note that tissues and the resulting homogenate should be kept cool during the entire protocol by maintaining on ice.

- i) Prepare a 1:2 or 1:3 ratio of TSV-suspect shrimp heads or whole shrimp with TN buffer (~~see Chapter 2.2.2, infectious hypodermal and haematopoietic necrosis [IHHN], for the composition of this buffer~~ 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.4 M NaCl) or sterile 2% saline prepared with distilled water.
- ii) Homogenise the mixture using a tissue grinder or blender. Do not permit the mixture to heat up by excessive homogenisation or grinding.
- iii) Clarify the homogenate by centrifugation at 3000 **g** for 10 minutes. Decant and save the supernatant fluid. ~~Discard the pellet.~~
- iv) Centrifuge the supernatant fluid at 27,000 **g** for 20–30 minutes at 4°C. Decant and save the supernatant fluid. ~~Discard the pellet.~~
- v) Dilute the supernatant fluid from step iv to 1/10 to 1/100 with sterile 2% saline. This solution may now be used as the inoculum to inject indicator shrimp (or filter sterilised as described in step vi).

Anexo 24 (cont.)

- vi) Filter the diluted supernatant fluid from step v using a sterile syringe (size depends on the final volume of diluted supernatant) and a sterile 0.45 µm syringe filter. ~~Multiple filters may have to be used as they clog easily.~~ Filtrate should be collected in a sterile test tube or beaker. The solution can ~~now~~ be stored frozen (~~recommend -20°C at -20°C (or -80°C for short term [weeks] storage and -80°C for a long-term [months to years] storage)~~) or used immediately to inject indicator shrimp.
- vii) Indicator shrimp should be from **infection with** TSV-susceptible stocks of SPF *P. vannamei* (such as the 'Kona stock') (Moss *et al.*, 2001), which are commercially available from a number of sources in the Americas, and not from selected lines of known **infection with** TSV-resistant stocks.
- viii) Inject 0.01 ml per gram of body weight using a 1 ml tuberculin syringe. Indicator shrimp should be injected intramuscularly into the third tail segment. If the test shrimp begin to die within minutes post-injection, the inoculum contains excessive amounts of proteinaceous materials and should be further diluted prior to injecting additional indicator shrimp. Sudden death occurring post-injection is referred to as 'protein shock', and is the result of systemic clotting of the shrimp's haemolymph in response to the inoculum (Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).
- ix) Haemolymph samples may be diluted (1/10 or 1/20 in TN buffer), filter sterilised (if necessary), and injected into the indicator shrimp without further preparation.
- x) If TSV was present in the inoculum, the indicator shrimp should begin to die within 24–48 hours post-injection. Lower doses of virus may take longer to establish a lethal infection and shrimp should be monitored for at least 10–15 days post-injection.
- xi) The presence (or absence) of TSV in the indicator shrimp should be confirmed by histological analysis (or ISH by gene probe, if available) of Davidson's fixed moribund shrimp. If additional confirmation is needed beyond demonstration of pathognomonic TSV lesions, RT-PCR with sequencing of the resulting amplicon can be carried out.

4.3.1.2.4. *Sentinel shrimp bioassay method*

As a variation to the bioassay technique, a 'sentinel shrimp' system may be used. For example, TSV-sensitive stocks of small juvenile SPF *P. vannamei* may be held in net-pens in tanks, or in the same water system, with other shrimp of unknown **infection with** TSV status to bioassay for the presence of infectious agents such as TSV.

4.3.1.2.5. *Dot-blot immunoassay method*

- i) For the dot-blot immunoassay method, 1 µl of test antigen (purified virus, infected shrimp haemolymph or SPF shrimp haemolymph) is dotted on to the surface of MA-HA-N45 assay plates (Millipore, ~~South San Francisco, California [CA], USA~~)⁵.
- ii) After air drying, the wells are blocked for 1 hour at room temperature with 200 µl of a buffer containing phosphate-buffered saline and 0.05% Tween 20 (PBST) mixed with 10% normal goat serum (Life Technologies, ~~Gibco BRL~~) and 2% Hammersten casein (Amersham Life Sciences, ~~Arlington Heights, Illinois, USA~~).
- iii) The wells are washed three times with PBST and then reacted with 100 µl primary antibody (MAb or mouse polyclonal antibodies) for 30 minutes at room temperature.
- iv) Alkaline-phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG, γ chain specific, secondary antibody (Zymed, ~~South San Francisco, CA~~) diluted 1/1000 in PBST plus 10% normal goat serum is used for detection (30 minutes at room temperature).
- v) After washing three times with PBST, once with PBS and once with distilled water, the reactions are visualised by development for 15 minutes at room temperature with nitroblue tetrazolium and bromo-chloro-indoyl phosphate (Roche Diagnostics, ~~Corp.~~) in 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (~~100 mM each~~) buffer containing 50 mM MgCl₂, pH 9.5.
- vi) Reactions are stopped with distilled water.

⁵ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

- vii) The reactions are graded using a scale from 0 to +4, with the highest intensity reaction being equivalent to the reaction generated using the MAb against the reference control consisting of semi-purified TSV. A negative reaction is one in which no coloured spot is visible in the well.

4.3.1.2.6. Other antibody-based methods

The TSV MAb 1A1 may be applicable to other antibody-based test formats (i.e. indirect fluorescent antibody [IFAT] or immunohistochemistry [IHC] tests with tissue smears, frozen sections, or deparaffinised fixed tissues). MAb 1A1 is applicable for use in an IHC format using Davidson's AFA-fixed tissue sections (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

It is recommended that unexpected results from MAb-based tests for detection of TSV should be interpreted in the context of clinical signs, case history, and in conjunction with other test results (e.g. RT-PCR test results, or findings from histology or ISH with a TSV-specific DNA probe – see appropriate sections in this chapter).

4.3.1.2.7. Molecular techniques

ISH and RT-PCR tests for detection of TSV have been developed, and kits of RT-PCR methods for TSV are commercially available. The dot-blot method for TSV detection is not available.

4.3.1.2.7.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for detection of TSV may be produced in the laboratory. The ISH method provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for TSV detection and diagnosis that employ classic histological methods (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner & Redman 1998b; Mari *et al.*, 1998). The ISH assay of routine histological sections of acute- and transition-phase lesions in the cuticular epithelium, other tissues, and of LOS in transition and chronic phase with a specific DIG-labelled cDNA probe to TSV, provides a definitive diagnosis of infection with TSV infection (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Pathognomonic TSV-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. Not reacting to the probe are the prominent karyorrhectic nuclear fragments and pyknotic nuclei that contribute to the pathognomonic 'buckshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (See Chapter 2.2.3 Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

False-negative ISH results may occur with Davidson's fixed tissues if tissues are left in fixative for more than 24–48 hours. The low pH of Davidson's fixative causes acid hydrolysis of the TSV single-stranded RNA genome, resulting in false-negative probe results. This hydrolysis can be avoided through the use of neutral fixatives, including an 'RNA-friendly' fixative developed for shrimp, or by the proper use (avoiding fixation times over 24 hours) of Davidson's fixative (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998).

4.3.1.2.7.2. Reverse-transcription (RT)-PCR method

Tissue samples (haemolymph, pleopods, whole small shrimp, etc.) may be assayed for TSV using RT-PCR. Primers designated as 9992F and 9195R, amplify a 231 base pair (bp) sequence of the TSV genome (Nunan *et al.*, 1998). The fragment amplified is from a conserved sequence located in the intergenic region and ORF 2 of TSV. Primer 9992F is located near the 3' end of intergenic region and 9195R is located on ORF 2 within VP2 (= CP1) (Mari *et al.*, 2002; Nunan *et al.*, 1998). A new pair of TSV primers (7171F and 7511R) has been developed and shown to have an improved sensitivity for TSV detection (Navarro *et al.*, 2009). ~~These replacement primers are 9992F/9195R and they are located within ORF 2.~~

Anexo 24 (cont.)

| Primer | Product | Sequence | Temperature | G+C% |
|--------|---------|----------------------------------|-------------|------|
| 9992F | 231 bp | 5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3' | 69°C | 55% |
| 9195R | | 5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3' | 63°C | 50% |
| 7171F | 341 bp | 5'-CGA-CAG-TTG-GAC-ATC-TAG-TG-3' | <u>63°C</u> | 50% |
| 7511R | | 5'-GAG-CTT-CAG-ACT-GCA-ACT-TC-3' | | 50% |

The RT-PCR method outlined below for detection of TSV generally follows the method used in Nunan *et al.* (1998).

- i) Preparation of RNA template: RNA can be extracted from fresh, frozen and ethanol-preserved tissues. Extraction of RNA should be performed using commercially available RNA tissue extraction kits, such as the High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Penzberg, Germany) and following the manufacturer's procedures for production of quality RNA templates. Viral RNA can be isolated using any commercially available RNA isolation kit. The amount of tissue required will depend on the kit selected (i.e. Qiagen RNA extraction kit, Promega and Roche RNA purification kit recommend using 25-50 mg of tissue). Depending on the kit used, the elution volume for Roche and Qiagen and low elution volume RNA isolation Promega extraction kit is 100 µl. Extracted RNA should be maintained at -20°C before testing, however, for long-term storage the RNA should be kept at -70°C.
- ii) The RT-PCR assay is carried out in solution, using 40-5 µl of total RNA extracted from haemolymph, frozen shrimp tissues, ethanol-fixed tissue as the template (concentration of RNA = 1-100 ng ml⁻¹).
- iii) The following controls should be included in every RT-PCR assay for TSV: (a) known TSV-negative tissue sample; (b) a known TSV-positive sample (tissue or purified virus); and (c) a 'no-template' control.
- iv) The GeneAmp® EZ rTth RNA PCR kit (Applied Bioscience, Forster City, CA) was used SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase, Life Technologies) can be used for all amplification reactions described here. Alternative kits-Other commercially available equivalent reagent can also be used and adjusted for use for this assay.
- v) The optimised RT-PCR conditions (final concentrations in 50-25 µl total volume) for detection of TSV in shrimp tissue samples are: primers (0.62 µM each), dNTPs (300 µM each), rTth DNA polymerase (2.5 U 50 µl⁻¹), manganese acetate (2.5 mM), in 5 × EZ buffer (25 mM Bicine, 57.5 mM potassium acetate, 40% [w/v] glycerol, pH 8.2).
- vi) If the thermal cycler does not have a heated lid, then light mineral oil (50 µl) is overlaid on the top of the 50 µl reaction mixtures to prevent condensation or evaporation during thermal cycling.

| Reagent | Volume | Final concentration |
|---|----------------|---------------------|
| <u>dH₂O</u> | <u>5.5 µl</u> | |
| <u>2× Reaction Mix</u> | <u>12.5 µl</u> | <u>1×</u> |
| <u>Primer Forward/Reverse (10 M each)</u> | <u>1.0 µl</u> | <u>0.4 µM</u> |
| <u>RT/Taq enzyme Mix</u> | <u>1.0 µl</u> | |
| <u>RNA template*</u> | <u>5.0 µl</u> | <u>1-50 ng</u> |

- vi) The RNA template and all the reagents are combined and reverse transcription is allowed to proceed at 60°C for 30 minutes, followed by 94°C for 2 minutes-95°C for 2 minutes. At the completion of reverse transcription, the samples are amplified for 39 cycles under the following conditions: denaturation at 95°C for 45 seconds, and then annealing/extension at 62°C for 45 seconds. A final extension step for 7 minutes at 60°C follows the last cycle. in a 4°C soak file.

~~Note: The reaction conditions described here were optimised using an automatic Thermal Cycler GeneAmp 980 (Applied Biosystems). The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.~~

- ~~vii) A 6 µl of the completion of reverse transcription, the samples are amplified for 40 cycles under the following conditions: denaturation at 94°C for 45 seconds, and then annealing/extension at 60°C for 45 seconds. A final extension step for 7 minutes at 60°C follows the last cycle and the process is terminated in a 4°C soak file.~~
- ~~ix) Following the termination of RT-PCR, the amplified cDNA solutions are drawn off from beneath the mineral oil and placed into clean 0.5 ml microfuge tubes.~~
- ~~x) A 10 µl sample of the amplified products can then be added to the well of a 2.0-1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 g ml⁻¹), and electrophoresed in 0.5 × TBE (Tris, boric acid, ethylene diamine tetra-acetic acid [EDTA]).~~
- ~~xi) A 1 kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) is used as a marker.~~
- ~~xiii) Details of the composition of the reagents and buffers used here may be found in Chapter 2.2.2 IHHN.~~

4.3.1.2.7.3. Real-time RT-PCR method for TSV

Real-time RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of ~~real~~ real-time RT-PCR is ~100 copies of the target sequence from the TSV genome (~~Dahr~~ Dhar et al., 2002; Tang et al., 2004).

The real-time RT-PCR method using TaqMan chemistry described below for TSV generally follows the method used in Tang et al. (2004).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the ORF1 region of the TSV genomic sequence (GenBank AF4277675) that encodes for nonstructural proteins. The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software (~~Applied Biosystems—Life Technologies~~). The upstream (TSV1004F) and downstream (TSV1075R) primer sequences are: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' and 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3', respectively. The TaqMan probe, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), which corresponds to the region from nucleotide 1024 to 1051, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end (~~Applied Biosystems, catalog no. 450025~~).
- ii) Preparation of RNA template: the extraction and purification of RNA template from haemolymph, or shrimp tissue, is the same as that described in the section for ~~traditional~~ conventional RT-PCR.
- iii) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of contaminants in the reaction mixture ~~or in the heat block of the thermal cycler~~. A positive control should also be included, and this can be an *in-vitro* transcribed RNA containing the target sequence, purified virions, or RNA extracted from TSV-infected tissue.
- iv) The real-time RT-PCR reaction mixture contains: TaqMan ~~One-step RT-PCR-Fast virus 1-Step Master Mix~~ (Applied Biosystems, part no. 4309169-Life Technologies), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng of RNA, and water in a reaction volume of 25 10 µl. ~~For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.~~
- v) Amplification can be performed with the ~~GeneAmp 5700 Sequence Detection StepOnePlus PCR System~~ (Applied Biosystems; ABI PRISM 7000, 7300, 7500, or newer models-Life Technologies or equivalent thermocycler real-time PCR systems). The cycling consists of reverse transcription at ~~48-50~~ 50°C for 30 minutes and initial denaturation at 95°C for ~~40 minutes-20 seconds~~, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for ~~45 3~~ 3 seconds and annealing/extension at 60°C for ~~4 minute~~ 30 seconds. ~~The levels of fluorescence are measured at the end of each annealing/extension cycle 30 seconds.~~

Anexo 24 (cont.)

- vi) At the end of the reaction, real-time fluorescence measurements are analysed. A threshold will be set to be above the baseline ~~that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase in PCR product~~. Samples will be defined as negative if there is no Ct (threshold cycle) value after 40 cycles. Samples with a Ct value lower than 40 cycles are considered to be positive.

4.3.1.2.7.4. Sequencing

RT-PCR products may be ~~cloned and~~ sequenced when necessary to confirm infection by TSV or to identify false positives or nonspecific amplification (Mari *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2005; Srisuvan *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

4.3.1.2.8. Agent purification

Methods for TSV isolation and purification are available (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999), but these are not recommended for routine diagnosis of TS.

4.3.2. Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrate animals which do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to TSV.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of **infection with** TSV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended or not available for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for surveillance, detection and diagnosis

| Method | Surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|--------------------------------|--------------|-----|-----------|-----------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PLs | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | d | c | c | b | c |
| Bioassay | d | d | d | d | c | b |
| Direct LM (wet mount) | d | d | c | dc | c | d |
| Histopathology | d | b | b | c | a | a |
| Transmission EM | d | d | d | d | c | c |
| Antibody-based assays | d | d | c | c | b | b |
| <i>In-situ</i> DNA probes | d | c | b | b | a | a |
| RT-PCR, Real-time RT-PCR | a | a | a | a | a | a |
| Sequence | d | d | d | d | d | a |

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy;
RT-PCR = reverse-**transcription transcriptase**-polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from **infection with Taura syndrome virus**

As indicated in Table 5.1, RT-PCR (Section 4.3.1.2.7.2) **or real-time RT-PCR (Section 4.3.1.2.7.3) are** the recommended methods for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic TSV-induced lesions in the cuticular epithelium by histology (with or without confirmation by ISH with TSV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with TSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

i) histopathology consistent with infection with TSV

or

ii) a positive result by RT-PCR or real-time RT-PCR.

A suspect case is represented by:

- Sudden high mortalities in late PL, juvenile or subadult *P. vannamei* or *P. stylirostris* in regions where TSV is enzootic;
- The sudden presence of numerous sea birds (gulls, cormorants, herons, terns, etc.) 'fishing' in one or more shrimp culture ponds;
- Samples of cultured *P. vannamei* or *P. stylirostris* from ponds with feeding sea birds that present gross signs indicative of acute or transition phase TS, such as a general reddish colouration, lethargy, soft shells, empty guts, and the presence of numerous irregular black spots on the cuticle; or
- Demonstration of foci of necrosis in the cuticular epithelium using low magnification (i.e. a $\times 10$ hand lens or by direct microscopic examination of wet mounts) to examine the edges of appendages such as uropods or pleopods, or the gills.

7.2. Definition of confirmed case

Infection with TSV is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

i) histopathology consistent with infection with TSV

ii) ISH positive result in target tissues

iii) RT-PCR (followed by sequencing), or real-time RT-PCR with positive results for **infection with TSV**.

Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):

- Histological demonstration of diagnostic acute phase lesions of infection with TSV in (especially) the cuticular epithelia of the foregut (oesophagus, anterior, or posterior chambers of the stomach) and/or in the gills, appendages, or general cuticle. Such lesions are pathognomonic for infection with TSV only when they occur without accompanying severe acute necrosis (with nuclear pyknosis and karyorrhexis) of the parenchymal cells of the lymphoid organ tubules (which may occur in acute phase yellowhead virus infections).

Anexo 24 (cont.)

- ~~ISH positive (with a TSV specific cDNA probe) signal to TSV type lesions in histological sections (i.e. cuticular acute phase TS lesions) or to distinctive lymphoid organ spheroids (LOS) in the lymphoid organs of shrimp with chronic phase TS lesions.~~
- ~~RT-PCR positive results for infection with TSV.~~
- ~~Sequencing of PCR product encompassing CP2 may be accomplished, as needed, to determine the TSV genotype (Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).~~

8. References

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. & BRISENO-GARCIA 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., EDITORS (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 Biotechnol.*, **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 ensis* 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 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 syndrome Virus 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. POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK 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.M. (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 syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration 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*. Cámara 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., EDITORS (2012). Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, UK, 840–845.

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, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquac.*, **9**, 27–52.

Anexo 24 (cont.)

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

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.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOTZ J.M. (1997). 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.

LU Y. & SUN P. [S](#) (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 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**, 947–928 [915-926](#).

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.

NAVARRO S.A., TANG K.F.J & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.

NIELSEN L., SANG-OUW W., 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. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.
- 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 Res.*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., NAVARRO S.A., PANTOJA C.R., ARANGUREN F.L. & LIGHTNER D.V. (2012) New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 179–185.
- 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**, 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 Aquac. 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.

Anexo 24 (cont.)

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in pacific Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32** **35**, 21–24.

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

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for Infection with Taura syndrome virus
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).
Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Infection with Taura syndrome virus

NB: FIRST ADOPTED IN 2000; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2015

CHAPTER 2.2.8.

INFECTION WITH *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* NODAVIRUS (WHITE TAIL DISEASE)

1. Scope

~~Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus means infection with the pathogenic agent *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV), (of the Family Nodaviridae. The disease is commonly known as white tail disease (WTD), or white muscle disease (WMD) is defined as a viral infection caused by *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associate extra small virus (XSV). They cause a milky whitish appearance in larvae/postlarvae (PL) early juveniles, and are responsible for large scale mortalities in the freshwater prawn *M. rosenbergii*.~~

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

The aetiological agents are two viral pathogens, namely MrNV (primary) and extra small virus (XSV) (associate) (Qian *et al.*, 2003; Romestand & Bonami, 2003). MrNV is important in ~~WTD disease~~ outbreaks in prawns, but the role of XSV in pathogenicity remains unclear. Strains are not yet known. MrNV belongs in the family Nodaviridae (Bonami *et al.*, 2005; King *et al.*, 2012 Van Regenmortel *et al.*, 2000). XSV is the first sequenced satellite virus in animals and it is also the first record of a satellite-nodavirus association (Bonami *et al.*, 2005).

2.1.2. Survival outside the host

Survival outside the host is not known, however viral inoculum prepared from tissue homogenate stored at -20°C caused 100% mortality in post-larvae (PL) of *M. rosenbergii* by immersion challenge (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

Agent stability is not known. However, heat treatment at 65°C for 2 hours destroyed infectivity of MrNV and XSV in challenge experiments (Qian *et al.*, 2003).

2.1.4. Life cycle

Not known.

2.2. Host factors

~~Infection with MrNV is responsible for huge mortalities in larvae and PL of the freshwater prawn, *M. rosenbergii*, in hatcheries with subsequent economic losses to nursery systems.~~

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with MrNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).

~~The giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879). Other proven or suspected hosts are not yet known.~~

Anexo 25 (cont.)**2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility**

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results (but not active infection) have been reported in the following species: kuruma prawn (*P. japonicus*), Indian white prawn (*P. indicus*), giant tiger prawn (*P. monodon*), dragonfly (*Aeshna* sp.), giant water bug (*Belostoma* sp.), beetle (*Cybister* sp.), backswimmer (*Notonecta* sp.), hairy river prawn (*Macrobrachium rude*), monsoon river prawn (*Macrobrachium malcolmsonii*), brine shrimps (*Artemia* sp.) and red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*).

2.2.32. Susceptible stages of the host

Larvae, PL and early juveniles are susceptible, whereas adults are resistant ~~and act as carriers~~ (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.2.34. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No mortality was observed either in naturally or experimentally (MrNV/XSV) infected subadult and adult prawns. Experimental studies confirmed vertical transmission from infected broodstock to PL (Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a).

2.2.45. Target organs and infected tissue

MrNV and XSV are confined to gill tissue, head muscle, heart, abdominal muscle, ovaries, pleopods and tail muscle, but not the hepatopancreas or eyestalk (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003). ~~The presence of both viruses in ovarian tissue indicates the possibility of vertical transmission of infection with MrNV WTD from broodstock to larvae and PL. Experiments proved that Pleopods are would be a convenient source of RNA for non-destructive screening of MrNV and XSV without stress to the prawns~~ (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.2.56. Persistent infection with lifelong carriers

Challenge experiments indicate long-term persistent infection in adults and also the possibility of transmitting MrNV WTD from broodstock to larvae and PL (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a).

2.2.67. Vectors

Not known. Penaeid shrimp (*Penaeus indicus*, *P. monodon*, *P. japonicus*) (Sudhakaran *et al.*, 2006b), *Artemia* (Sudhakaran *et al.*, 2006c), and aquatic insects (*Belostoma* sp., *Aeshna* sp., *Cybister* sp., and *Notonecta* sp.) are vectors of WTD (Sudhakaran *et al.*, 2008).

2.2.8. Known or suspected wild aquatic animal carriers

~~Not known.~~

2.3. Disease pattern

A high prevalence of infection with MrNV-WTD infection has been reported in hatchery-reared larvae and PL of *M. rosenbergii*. The disease WTD may be transmitted both vertically and horizontally in culture systems.

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission is vertical (trans-ovum) and horizontal by the waterborne route (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a).

2.3.2. Prevalence

Prevalence is variable from 10% to 100% in hatchery, nursery and grow-out systems, as well as in experimental infection by immersion challenge, and 100% mortality has been reported 5–7 days after the appearance of the first gross signs in PL in natural or experimental infection (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b).

2.3.3. Geographical distribution

The disease was first reported in the French West Indies (Arcier *et al.*, 1999), later in China (People's Rep. of) (Qian *et al.*, 2003), India (Sahul Hameed *et al.*, 2004b), Chinese Taipei (Wang & Chang, 2006; Wang *et al.*, 2008), Thailand (Yoganandhan *et al.*, 2006) and Australia (Owens *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortality and morbidity

Larvae, PL and juveniles of *M. rosenbergii* are highly susceptible to infection with MrNV-WTD, which often causes high mortalities in these life stages. Mortality may reach a maximum in about 5 or 6 days after the appearance of the first gross signs. Very few PL with infection with MrNV-WTD survive beyond 15 days in an outbreak, and PL that survive may grow to market size like any other normal PL. Adults are resistant to infection with MrNV-WTD, but act as carriers (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.3.5. Environmental factors

Not much is known about environmental factors. However, outbreaks of infection with MrNV-WTD may be induced by rapid changes in salinity, temperature and pH (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003).

2.4. Control and prevention

~~No work has been carried out~~ Information on control and prevention of infection with MrNV is limited-WTD. However, proper preventive measures, such as screening of brood stock and PL, and good management practices may help to prevent infection with MrNV-WTD in culture systems. As the life cycle of *M. rosenbergii* is completed under controlled conditions, specific pathogen free (SPF) brood stock and PL can be produced by screening using sensitive diagnostic methods such as reverse-transcription PCR (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

2.4.1. Vaccination

Not yet available.

2.4.2. Chemotherapy

No known chemotherapeutic agents reported for infection with MrNV-WTD.

2.4.3. Immunostimulation

No reports available concerning the use of immunostimulants infection with MrNV-WTD.

2.4.4. ~~Resistance breeding~~ Breeding for resistance

None reported.

2.4.5. Restocking with resistant species

No report on the occurrence of resistant species.

2.4.6. Blocking agents

Not known.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Routine procedures followed for crustacean viral disease control are suggested. For example, application of formalin or iodophor helps to eliminate virus (Chen *et al.*, 1992).

Anexo 25 (cont.)**2.4.8. General husbandry practices**

Experimental infection confirmed the possibility of horizontal and vertical transmission of MrNV-WTD in culture systems (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a). Good husbandry practices, such as proper disinfection of tanks, water and broodstock, and the use of RT-PCR negative broodstock in the hatchery grow-out ponds may be useful in the prevention of infection with MrNV-WTD in culture systems (Chen *et al.*, 1992; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2008-2008a). There is no evidence of WTD prevention that crop rotation either with rice or polyculture with fish prevents infection with MrNV. Some farmers have considered either mixed culture of shrimp (*P. monodon*) with *M. rosenbergii* or crop rotation of these two species as a viable alternative for their sustenance and economic viability. This situation invites the possibility of transmitting pathologically significant organisms from native to non-native hosts as observed by Sudhakaran *et al.* (2006b-2006a) and Ravi *et al.* (2009) in their studies. Based on their results, it would seem that mixed culture of *M. rosenbergii* with *P. monodon* should be avoided before adopting any preventive measures in the management of infection with MrNV.

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

Infection with MrNV WTD of freshwater prawns is mainly diagnosed ~~indicated~~ by the whitish coloration of abdominal and tail muscle (Arcier *et al.*, 1999; Romestand & Bonami, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004b). However, this clinical sign is not specific to infection with MrNV WTD and diagnosis is not easy, particularly in the earlier stages of infection. ~~WTD affected-PL~~ affected by infection with MrNV are more milky and opaque. Once this clinical sign appears, death usually follows; mortality rates are variable and reach up to 95%. The tissues most affected in moribund PLs/early juveniles are striated muscles of the abdomen, cephalothorax and tail. PLs with whitish muscle are suitable for diagnostic purposes (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.2. Preservation of samples for submission

Infected larvae or PL with prominent signs of whitish muscle in the abdominal region are collected from disease outbreak areas. Samples are washed in sterile saline, transferred to sterile tubes, transported to the laboratory on dry ice and stored at -70°C until further processed (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). Frozen samples can be used for virus isolation and detection by RT-PCR or ELISA (Romestand & Bonami, 2003). Samples for virus detection by RT-PCR can be transported to the laboratory after fixing in 70% ethanol (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). See also Chapter 2.2.0 *General information* (on diseases of crustaceans).

3.3. Pooling of samples

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated. Infected larvae or PL (5 to 10 in number) can be pooled for screening tests. See also chapter 2.2.0.

3.4. Best organs or tissues

The whole PL body is preferred (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). All the organs, except eyestalks and the hepatopancreas, of adult *M. rosenbergii* are best for screening the viruses by RT-PCR. Pleopods (swimming legs) are a convenient source of RNA for non-destructive screening of MrNV and XSV ~~without stress to the broodstock~~ (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.5. Samples or tissues that are not suitable

Eyestalks and the hepatopancreas of adult prawns are not suitable (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003).

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Infected PL become opaque and develop a whitish appearance, particularly in the abdominal region. The whitish discolouration appears first in the second or third abdominal segment and gradually diffuses both anteriorly and posteriorly. In severe cases, degeneration of telson and uropods may occur. Mortality may reach a maximum in about 5 days after the appearance of the first gross signs.

4.1.2. Behavioural changes

PLs are highly susceptible to infection with MrNV ~~WTD~~ and mortality reaches a maximum in about 5 days after the appearance of whitish discolouration. Floating exuviae (moult) in the tanks appear abnormal and resemble 'mica flakes' (Arcier *et al.*, 1999). The infected PL show progressive weakening of their feeding and swimming ability (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

~~Infection with MrNV~~ ~~WTD of *M. rosenbergii*~~, resulting from MrNV and XSV infection, is mainly ~~diagnosed~~ ~~indicated~~ by whitish coloration of abdominal muscle; however, this clinical sign is not ~~pathognomonic~~ ~~specific to WTD~~, but it is ~~associated with high mortality rates~~.

4.2.2. ~~Clinical chemistry~~

~~The prophenol oxidase activity significantly increased in MrNV and XSV injected prawns on day 3 and 5 post injection (p.i.) and became normal on 10 day p.i. onwards. Superoxide anion concentration was found to be increased significantly on day 3, 5, and 10 p.i. whereas SOD activity decreased significantly up to 10 day p.i. and became normal after 15 day p.i. The total haemocyte count decreased significantly in MrNV and XSV injected prawns on day 1 and 3 p.i. and there was no significant change in the level of hemocyanin in MrNV and XSV injected and normal prawns (Ravi *et al.*, 2010).~~

4.2.3. Microscopic pathology

The most affected tissue in infected PL is striated muscle of the cephalothorax, abdomen and tail. Histological features include the presence of acute Zenker's necrosis of striated muscles, characterised by severe hyaline degeneration, necrosis and muscular lysis. Moderate oedema and abnormal open spaces among the affected muscle cells are also observed, as is the presence of large oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies in infected muscles (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006). Pathognomonic oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies are demonstrated in the target tissues by histology (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

The presence of MrNV in infected cells can be demonstrated in histological sections using a DIG-labelled DNA *in-situ* hybridisation probe specific for MrNV (Sri Widada *et al.*, 2003).

4.2.4. Wet mounts

None to date.

4.2.5. Smears

None to date.

4.2.6. Electron microscopy/cytopathology

Using transmission electron microscopy (TEM), infected cells appear necrotic, exhibiting a disorganised cytoplasm. TEM studies reveal the presence of two types of non-enveloped par-spherical virus particles of different sizes within the cytoplasm of connective cells and muscle cells. Large viral particles are five- to six-sided, with a diameter of 26–27 nm, and would be characteristic of MrNV. Smaller viral particles similar in structure (five- to six-sided), but with a diameter of 14–16 nm, would be characteristic of XSV (Qian *et al.*, 2003).

Anexo 25 (cont.)**4.3. Agent detection and identification methods****4.3.1. Direct detection methods**

Genome and antibody-based diagnostic methods are available to detect MrNV/XSV (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

4.3.1.1. Microscopic methods*4.3.1.1.1. Wet mounts*

None to date.

4.3.1.1.2. Smears

None to date.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification*4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media*

MrNV/XSV can be easily propagated in the C6/36 mosquito *Aedes albopictus* cell line (Sudhakaran *et al.*, 2007a 2007b) and this cell line can be cultured easily in Leibovitz L-15 medium containing 100 International Units ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 2.5 µg ml⁻¹ fungizone supplemented with 10% fetal bovine serum at 28°C (Sudhakaran *et al.*, 2007a 2007b). The C6/36 cell line was found to be useful for propagation of these viruses, and viral replication was confirmed by RT-PCR, acridine orange staining, infectivity studies and electron microscopy. A specific cytopathic effect was not observed in MrNV-infected cell lines, but multiple vacuolations were observed. Other cell lines, namely the fish SSN-1 cell line, partially support the multiplication of these viruses (Hernandez-Herrera *et al.*, 2007).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Antibody-based diagnostic methods for MrNV include the ELISA described by Romestand & Bonami (2003) or the triple-antibody sandwich (TAS) ELISA based on a monoclonal antibody (Qian *et al.*, 2006).

4.3.1.2.2.1. ELISA protocol (Romestand & Bonami, 2003)

- i) Homogenise infected or healthy PL samples in 0.5 ml phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuge at 10,000 **g** for 15 minutes. Collect and store the supernatant at -20°C for diagnostic purposes.
- ii) Coat ELISA plates with 50 µl per well sample supernatant and incubate overnight at 4°C.
- iii) Block with 250 µl 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 hour at 37°C.
- iv) Add 50 µl IgG anti-MrNV with 1% BSA and incubate for 2 hours at room temperature.
- v) Add 50 µl of an anti-mouse IgG conjugated to peroxidase at 0.4 µg ml⁻¹ and incubate for 1 hour at room temperature.
- vi) Add 50 µl orthophenylene diamine chromogen at 0.4 mg ml⁻¹ in substrate buffer (citric acid 0.1 M, sodium acetate 0.1 M, pH 5.4, H₂O₂ at a 0.33% final concentration).
- vii) Stop the reaction after 15 minutes by adding 25 µl of H₂SO₄ to each well.
- viii) Measure OD (optical density) at 492 nm with an ELISA plate reader.

NOTE: two rinses with PBS should be performed between each step described above.

4.3.1.2.2.2. TAS-ELISA protocol (Qian et al., 2006)

- i) Coat ELISA plates with rabbit polyclonal antibody raised against MrNV and incubate for 2 hours at 37°C and keep at 4°C before use.
- ii) Block with 250 µl 1% BSA in PBS for 1 hour at 37°C.
- iii) Homogenise infected or healthy PL samples in 0.5 ml PBS and centrifuge at 10,000 **g** for 15 minutes. Collect and store the supernatant at –20°C for diagnostic purposes.
- iv) Add 100 µl of sample to each well and incubate overnight at 4°C.
- v) Add 50 µl of a monoclonal antibody raised against MrNV with 1% BSA and incubate for 2 hours at room temperature.
- vi) Add 50 µl of an anti-mouse IgG conjugated to peroxidase at 0.4 µg ml⁻¹ and incubate for 1 hour at room temperature.
- vii) Add 50 µl orthophenylene diamine chromogen at 0.4 mg ml⁻¹ in substrate buffer (citric acid 0.1 M, sodium acetate 0.1 M, pH 5.4, H₂O₂ at a 0.33% final concentration).
- viii) Stop the reaction after 15 minutes by adding 25 µl H₂SO₄ to each well.
- ix) Measure OD (optical density) at 492 nm with an ELISA plate reader.

NOTE: two rinses with PBS should be performed between each step described above.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

4.3.1.2.3.1. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

The protocol for the RT-PCR for detection of MrNV/XSV developed by Sri Widada *et al.* (2003) and Sahul Hameed *et al.* (2004a; 2004b) is recommended for all situations. MrNV and XSV can be detected by RT-PCR separately using a specific set of primers or these two viruses can be detected simultaneously using a single-tube one-step multiplex RT-PCR (Yoganandhan *et al.*, 2005). Nested RT-PCR (RT-nPCR) is also available and recommended for screening broodstock and seed (Sudhakaran *et al.*, [2006a](#) [2007a](#)).

Total RNA extraction

- i) Collect 50 mg of PL or 100 mg of an organ piece (gill tissue, abdominal muscle, tail muscle or pleopods) from adult prawns and homogenate in 300 µl TN buffer (20 mM Tris/HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4).
- ii) Centrifuge the homogenate at 12,000 **g** for 15 minutes at room temperature and collect the supernatant.
- iii) Take 150 µl of supernatant and add 1 ml TRIzol. Mix thoroughly and incubate for 5 minutes at room temperature.
- iv) After 5 minutes, add 200 µl chloroform to the sample, mix well and centrifuge at 12,000 **g** for 15 minutes at room temperature.
- v) Collect the aqueous phase and transfer to a fresh tube, and precipitate RNA by mixing with 500 µl isopropanol.
- vi) Incubate the sample for 10 minutes at room temperature and centrifuge at 12,000 **g** for 10 minutes at 4°C.
- vii) Dissolve the RNA pellet in 50 µl of TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], pH 7.5) after a wash with 75% ethyl alcohol.
- viii) Quantify the RNA by measuring the absorbance at 260 nm using UV spectrophotometer and check the purity by measuring the ratio of OD_{260nm}/OD_{280nm}.

Anexo 25 (cont.)*RT-PCR protocol*

Three RT-PCR methods are described to detect MrNV and XSV. The first protocol is a one-step RT-PCR adapted from Sri Widada *et al.* (2003) and Sahul Hameed *et al.* (2004b), and this method can be used for confirmation of MrNV and XSV in PL of prawns collected from suspected WTD outbreaks. The second protocol is a sensitive RT-nPCR protocol described by Sudhakaran *et al.* (2006a 2007a). This test can be used for screening healthy PL, juveniles and broodstock for viruses. The third protocol is a multiplex RT-PCR procedure adapted from Yoganandhan *et al.* (2005). It can be used for the simultaneous detection of MrNV and XSV in disease outbreaks or for screening seeds and broodstock. In all the protocols described here, a commercial RT-PCR kit allowing reverse transcription and amplification in a single reaction tube is used.

Protocol 1: RT-PCR for specific detection of MrNV or XSV in infected prawn PL or juveniles (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2007b 2008b):

The following controls should be included in every RT-PCR assay for MrNV or XSV: a) a known MrNV/XSV-negative tissue sample; b) a known MrNV/XSV-positive sample (tissue or purified virus); and c) a 'no-template' control.

For RT-PCR, a commercial RT-PCR kit is used. The reaction is performed in 50 µl RT-PCR buffer containing 20 pmol of each primer specific to MrNV or XSV and RNA template (10–100 ng), using the following cycles: RT at 52°C for 30 minutes; denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds, annealing at 55°C for 40 seconds, and elongation at 68°C for 1 minute, ending with an additional elongation step for 10 minutes at 68°C. Analyse the RT-PCR products by electrophoresis on a 1% agarose gel stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker and detect using an ultraviolet transilluminator.

A positive reaction will be indicated by a 425 bp product for MrNV and a 546 bp product for XSV. The sensitivity of the assay is approximately 2.5 fg of total RNA.

PCR primer sequences for MrNV (annealing temperature 55°C; product size 425 bp):

Forward: 5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'
Reverse: 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'

PCR primer sequences for XSV (annealing temperature 55°C; product size 546 bp):

Forward: 5'-CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA-3'
Reverse: 5'-CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA-3'

Protocol 2: The RT-nPCR for detection of MrNV and XSV (Sudhakaran et al., 2007a)

The RT-nPCR is more sensitive and useful for screening seed and broodstock (Sudhakaran *et al.*, 2006a 2007a):

For the RT-nPCR, the first step of the RT-PCR, as described in protocol 1, should be performed with external primers and the nPCR should be carried out using an RT-PCR product as a template. For RT-nPCR, add 2 µl RT-PCR product to a PCR tube containing 20 µl of reaction mixture (10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 µM of each dNTP, 20 pmol of each internal primer, 1.25 units of heat-stable DNA polymerase). The RT-nPCR protocol for both viruses comprise an initial 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 55°C and 1 minute at 72°C with a final extension at 72°C for 5 minutes. Analyse the RT-nPCR products by electrophoresis on a 1% agarose gel, stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker, and detect using an ultraviolet transilluminator.

If the viral load is sufficiently high, a 425 bp DNA-product will be amplified for MrNV and 546 bp DNA-product for XSV in the first PCR step. In the nPCR step, a 205 bp product indicates detection of MrNV and a 236 bp product indicates detection of XSV. The detection sensitivity of the RT-nPCR is ~1000-fold greater than the one-step RT-PCR.

Anexo 25 (cont.)

The sequence of external primers for MrNV and XSV is given in protocol 1 and the sequence of internal primers is given below:

The sequence of internal primers for MrNV (annealing temperature 55°C; product size 205 bp):

Forward: 5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3'
Reverse: 5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'

The sequence of internal primers for XSV (annealing temperature 55°C; product size 236 bp):

Forward: 5'-ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA-3'
Reverse: 5'-GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3'

Protocol 3: multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of MrNV and XSV (Yoganandhan *et al.*, 2005).

To avoid the necessity of carrying out two separate RT-PCR reactions, a modified method for simultaneous detection of MrNV and XSV in a single-tube, one-step multiplex RT-PCR assay can be performed. The reaction is performed in 50 µl RT-PCR buffer containing 20 pmol of each primer specific to MrNV and XSV, and RNA template (10–100 ng), using the following cycles: RT at 52°C for 30 minutes; denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds, annealing at 55°C for 40 seconds, and elongation at 68°C for 1 minute, ending with an additional elongation step for 10 minutes at 68°C. Analyse the RT-PCR products by electrophoresis on a 1% agarose gel, stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker, and detect using an ultraviolet transilluminator.

If MrNV and XSV are present in the sample, a 681 bp **DNA-product** for MrNV and 500 bp **DNA-product** for XSV will be amplified. The presence of both 681 bp and 500 bp products indicates the presence of MrNV and XSV. The detection sensitivity of the multiplex RT-PCR assay is approximately 25 fg of total RNA.

PCR primer sequences for MrNV (annealing temperature 55°C; product size 681 bp):

Forward: 5'-GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C-3'
Reverse: 5'-GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC-3'

PCR primer sequences for XSV (annealing temperature 55°C; product size 500 bp):

Forward: 5'-GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G-3'
Reverse: 5'-CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C-3'

Protocol 4: Real-time RT-PCR assay

Real-time RT-PCR assay can be performed to quantify the MrNV/XSV in the infected samples using the SYBR Green dye based on the method described by Hernandez-Herrera *et al.* (2007) and Zhang *et al.* (2006).

- i) Extraction of total RNA from the samples as per the procedure mentioned above.
- ii) Incubate the RNA samples at 37°C for 1 hour in RT mixture (150 ng of total RNA, 8 U µl⁻¹ M-MLV RT in buffer, 20 ng µl⁻¹ hexaprimers and 0.2 mM dNTP) to obtain total cDNA and quantify the amount of cDNA by measuring the absorbance at 260 nm.
- iii) Perform real-time RT-PCR using real-time PCR mixture (1 µl of cDNA [10 ng], 6 µl of sterile water, 0.5 µl of each primer specific to MrNV and XSV [25 µM concentration] and 2 µl of reaction mixture containing Fast Start *Taq* polymerase, dNTP mix, SYBR Green, 10 mM MgCl₂ and 1 µl dye solution).
- iv) The PCR programme consists of initial *Taq* polymerase activation for 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 5 seconds at 60°C and 10 seconds at 72°C. Melting temperatures will be measured by returning to 70°C for 30 seconds and gradual heating to 95°C in 10 minutes. The negative control reactions should contain water in place of cDNA template in each run to ensure the absence of viruses.

Anexo 25 (cont.)

- v) The number of viral cDNA copies in the sample will be determined using Light Cycler fit point method.

PCR primer sequences for MrNV (annealing temperature 60°C; product size 211 bp):

Forward: 5'-AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG-3'

Reverse: 5'-CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G-3'

PCR primer sequences for XSV (annealing temperature 58°C; product size 68 bp):

Forward: 5'-AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA-3'

Reverse: 5'-CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG-3'

4.3.1.2.3.2. *In-situ* hybridisation method (Sri Widada *et al.*, 2003; Zsikla *et al.*, 2004)

- i) Fix infected PL in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RNA friendly fixative) (Hasson *et al.*, 1997).
- ii) Embed the tissues in paraffin according to standard procedures (Bell & Lightner, 1988) and cut into 7 µm sections. Place sections on to positively charged microscope slides.
- iii) Dry the slides in an oven at 60°C. Remove paraffin and rehydrate through an ethanol series to water.
- iv) Incubate the sections twice for 5 minutes with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated Tris/HCl (0.2 M, pH 7.4) and 10 minutes with DEPC-treated Tris/HCl containing 100 mM glycine.
- v) Treat the sections for 5 minutes at 37°C with TE buffer (10 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) containing 10 µg ml⁻¹ RNase-free proteinase K.
- vi) Post-fix the sections with DEPC-treated PBS containing 4% formaldehyde for 5 minutes.
- vii) The sections are acetylated for 10 minutes with 0.1 M triethanolamine (TEA) buffer, pH 8, containing 0.25% (v/v) acetic anhydride.
- viii) After dehydration, incubate the slides at 42°C for 16 hours in a humid chamber with hybridisation buffer containing 40% deionised formamide, 10% dextran sulphate, 1× Denhart's solution, 4× SSC (standard saline citrate), 10 mM dithiothreitol (DTT), 1 mg ml⁻¹ yeast tRNA, 1 mg ml⁻¹ denatured and sheared salmon sperm DNA and 40 ng ml⁻¹ denatured digoxigenin-labelled DNA probe specific to MrNV.
- ix) Wash the slides at 37°C for 10 minutes with 1 × SSC, for 10 minutes with 0.5 × SSC and for 5 minutes twice with buffer III (100 mM Tris/HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl).
- x) Incubate for 20 minutes in buffer IV (buffer III, 1% normal goat serum) at room temperature.
- xi) Incubate the slides for 1 hour in a humid chamber with buffer III containing 1% normal goat serum and 0.1% sheep anti-DIG alkaline phosphatase.
- xii) Wash the slides successively for 10 minutes three times with buffer III and for 5 minutes twice with buffer V (100 mM Tris/HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂).
- xiii) Develop the reaction by incubating the slides in buffer V containing NBT and BCIP in a dark and humid chamber for a minimum of 2 hours or overnight. Stop the reaction by incubating the slides in buffer III 2× for 15 minutes.
- xiv) Counterstain the slides with 1% Brown Bismarck, mount with a cover-slip and examine with a bright field microscope.
- xv) Positive hybridisation appears as a dark blue to black precipitate against the yellow to brown counterstain.

4.3.1.2.3.3. *Loop-mediated isothermal amplification* (Haridas *et al.*, 2010; Pillai *et al.*, 2006; Puthawibool *et al.*, 2010)

Haridas *et al.* (2010) and Pillai *et al.* (2006) have applied loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid diagnosis of MrNV and XSV in the freshwater prawn. A set of four primers, two outer and two inner, have been designed separately for detection of MrNV and XSV. In addition, a pair of loop primers specific to MrNV and XSV has been used to accelerate LAMP reaction.

- i) Extraction of total RNA from the samples as per the procedure mentioned above.
- ii) Carry out the RT-LAMP reaction in the reaction mixture (2 μM each of inner primers FIP and BIP, 0.2 μM each of outer primers F3 and B3, 1400 μM of dNTP mix, 0.6 M betaine, 6 mM MgSO_4 , 8 U of Bst DNA polymerase along with 1 \times of the supplied buffer, 0.125 U of AMV RTase and the specified amount of template RNA in a final volume of 25 μl) at 55, 60, 63 and 65°C for 1 each, followed by heat inactivation at 80°C for 2 minutes to terminate the reaction. Uninfected samples and reaction mix without template serve as the negative controls.
- iii) Analyse the LAMP products by electrophoresis on a 2% agarose gel, stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker, and detect using an ultraviolet transilluminator.
- iv) Without use of agarose electrophoresis, amplification of DNA can be detected by addition 1.0 μl of 10^{-1} diluted SYBR Green to the reaction mixture and observe the colour change.

4.3.1.2.3.4. Sequencing

For confirmation of suspected new hosts of MrNV/XSV, the DNA fragment amplified from the PCR should be sequenced according to standard protocols (Sambrook & Russell, 2001).

4.3.1.2.4. Agent purification

MrNV and XSV can be purified according to the protocol described by Bonami *et al.* (2005). The detailed procedure for viral purification is given below:

- i) Collect sufficient quantity of infected PL and ~~homogenate~~ homogenise in PBS buffer (pH 7.4) using a tissue blender.
- ii) Centrifuge at 10,000 g for 25 minutes at 4°C. Collect supernatant and centrifuge again at 160,000 g for 4 hours at 4°C.
- iii) Suspend the pellet in PBS and extract two or three times with freon (1,1,2-trichloro-2,2,1-trifluoroethane).
- iv) Collect the aqueous layer and centrifuge at 160,000 g for 4 hours at 4°C.
- v) Suspend the pellet in TN buffer and separate the two viruses with a 15–30% (w/v in PBS) sucrose gradient, followed by a CsCl gradient.
- vi) Examine the purity of the viruses by TEM using collodion-carbon-coated grids, negatively stained with 2% PTA (phosphotungstic acid), pH 7.0.

4.3.2. Serological methods

None developed

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of infection with MrNV WTD are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Anexo 25 (cont.)

Table 5.1. Methods for targeted ~~MrNV~~ surveillance and diagnosis

| Method | Targeted surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|--------------------------------------|-----------------------|-----|-----------|--------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PLs | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | c | c | d | c | d |
| Bioassay | d | c | d | d | c | c |
| Direct LM | d | c | c | d | c | c |
| Histopathology | d | c | c | c | b | b |
| Transmission EM | d | d | d | d | d | a |
| Antibody-based assays | d | c | d | d | b | b |
| <i>In-situ</i> DNA probes | c | b | b | c | a | a |
| PCR, Real-time RT-PCR, RT-PCR | a | a | a | a | a | a |
| Sequence | d | d | d | a | d | a |

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

The method for targeted surveillance to declare freedom from infection with MrNV WTD is RT-nPCR.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with MrNV is considered to be confirmed is suspected if at least two or more one of the following criteria are met:

i) clinical signs consistent with infection with MrNV

or

ii) histopathology consistent with infection with MrNV

or

iii) a positive result by RT-PCR.

or

iv) a positive result by real-time RT-PCR.

Appearance of whitish muscle associated with mortality is a suspected case of infection with MrNV WTD. It usually affects larval, PL and juvenile stages of *M. rosenbergii* and may appear as a cessation of feeding, reduced swimming activity and whitish coloration of the abdominal and tail muscles. Mortality reaches a maximum of up to 95% at 5 days after the appearance of the whitish colouration. Corroborative diagnostic criteria are summarised in Section 4.2 above.

7.2. Definition of confirmed case

Infection with MrNV is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

- i) histopathology consistent with infection with MrNV
- ii) ISH positive result in target tissues.
- iii) RT-PCR (followed by sequencing).
- iv) **Real-time RT-PCR.**

~~Suspect cases should first be checked by RT-PCR and confirmed by nRT-PCR, sequencing, TEM and DNA probes.~~

8. References

- ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI. J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.
- BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of monodon baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, pp 177–184.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR **C.B.**, NAIR **C.M.** & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.
- 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 **probe probes**. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
- HSIEH C.Y., WU Z.B., TUNG M.C., TU C., LO S.P., CHANG T.C., CHANG C.D., CHEN S.C., HSIEH Y.C. & TSAI S.S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671.
- KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (2012). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA, p.1327.**
- OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.
- PILLAI D., BONAMI J.-R. & SRI WIDADA J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **29**, 275–283.

Anexo 25 (cont.)

PUTHAWIBOOL T., SENAPIN S., FLEGEL T.W. & KIATPATHOMCHAI W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Mol. Cell. Probes*, **24**, 244–249.

QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W. LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.

RAVI M., NAZEER BASHA A., SARATHI M., ROSA IDALIA H.H., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by ~~MrNV~~ *MrNV* and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, **292**, 117–120.

RAVI M., NAZEER BASHA A., TAJU G., RAM KUMAR R. & SAHUL HAMEED A.S. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (~~MrNV~~ *MrNV*) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 428–433.

ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of ~~MrNV~~ *MrNV* in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (~~MrNV~~ *MrNV*) and its associated small virus (~~XSV~~ *XSV*), like particles in *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.

SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). Chapter 12 DNA Sequencing. *In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Editions. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, P 12.1–12.120.

SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.

SUDHAKARAN R., HARIBABU P., RAJESH KUMAR S., SARATHI M., ISHAQ AHMED V.P., ~~SARATH BABU V.~~ VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008 ~~2008a~~). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* ~~noda virus~~ nodavirus (~~MrNV~~ *MrNV*) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145.

SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2006a ~~2007a~~). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (~~MrNV~~ *MrNV*) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **29**, ~~1–9~~ **30**, 27–35.

SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a ~~2007b~~). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* ~~Noda virus~~ (~~MrNV~~ *MrNV*) nodavirus and extra small virus (XSV) in C6/36 ~~mosquito~~ cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.

SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006b ~~2006a~~). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* ~~noda virus~~ nodavirus (~~MrNV~~ *MrNV*) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.

SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., RAJESH KUMAR S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b ~~2008b~~). Cloning and sequencing of capsid protein of Indian isolate of extra small virus from *Macrobrachium rosenbergii*. *Virus Res.*, **131**, 283–287.

SUDHAKARAN R., YOGANANDHAN K., ISHAQ AHMED V.P. & SAHUL HAMEED A.S. (2006c). *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 155–160.

VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M., MANILOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, USA.

WANG C.S. & CHANG J.S. (2006). RT-PCR amplification and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) associated with white tail disease of *M. rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan. GenBank direct submission.

WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H., & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.

YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAN LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.

YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 1–5 65-69.

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

ZSIKLA V., BAUMANN M. & CATHOMAS G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.*, **57**, 54 654–656.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

NB: FIRST ADOPTED IN 2009; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

CAPÍTULO 1.5.

CRITERIOS PARA LA INCLUSIÓN DE ESPECIES SUSCEPTIBLES DE INFECCIÓN POR UN AGENTE PATÓGENO ESPECÍFICO

Artículo 1.5.1.

La finalidad del presente capítulo es proponer criterios para determinar las especies que pueden figurar como *especies susceptibles* en el Artículo ~~1.5.2- X.X.2~~ de cada capítulo específico de *enfermedad de la lista de la OIE del Código Acuático*.

Artículo 1.5.2.

Ámbito de aplicación

La susceptibilidad puede incluir una *infección* clínica o no clínica, pero no incluye las posibles especies portadoras del *agente patógeno* sin replicación.

La decisión de incluir una especie en particular como susceptible en los capítulos específicos de enfermedad deberá basarse en la conclusión de que las pruebas son definitivas de acuerdo con el Artículo 1.5.3. Todas las especies en un grupo taxonómico pueden incluirse en la lista de especies susceptibles si se cumplen ciertos criterios de acuerdo con el Artículo 1.5.9.

No obstante, la posible susceptibilidad de las especies también constituye una información importante y deberá incluirse en la sección ~~2.2- 2.2.1, 2.2.2~~. Especies con signos ambiguos de susceptibilidad de los correspondientes capítulos específicos de *enfermedad de la lista de la OIE del Manual Acuático*.

Artículo 1.5.3.

Enfoque

En este capítulo, se describe un enfoque en tres etapas para evaluar la susceptibilidad de una especie a la *infección* por un *agente patógeno* específico, basado en:

- 1) criterios para determinar si la vía de transmisión es coherente con las vías naturales de *infección* (tal y como se describe en el Artículo 1.5.4.);
- 2) criterios para determinar si el *agente patógeno* se ha identificado adecuadamente (tal y como se describe en el Artículo 1.5.5.);
- 3) criterios para determinar si las pruebas indican que la presencia del *agente patógeno* constituye una *infección* (tal y como se describe en el Artículo 1.5.6.).

Artículo 1.5.4.

Etapas 1: criterios para determinar si la vía de transmisión es coherente con las vías naturales de infección

Las pruebas se clasificarán como transmisión a través de:

- 1) aparición natural: incluye las situaciones en que la *infección* se haya producido sin intervención experimental, p. ej., una *infección* en las poblaciones silvestres o de cría; o
- 2) procedimientos experimentales no invasivos: incluye la cohabitación con hospedadores infectados, o la *infección* por inmersión o ingestión; o
- 3) procedimientos experimentales invasivos: incluye la inyección, la exposición a cargas de *agente patógeno* anormalmente elevadas o a factores estresantes (p. ej., temperatura) que no se encuentran en el entorno natural o de cultivo del hospedador.

Anexo 26 (cont.)

Es importante determinar si los procedimientos experimentales (por ejemplo, inoculación, carga infecciosa) reproducen las vías naturales de transmisión de la *enfermedad de la lista de la OIE*. Deberán tenerse en cuenta asimismo los factores medioambientales, ya que estos pueden afectar a la resistencia de los hospedadores o la transmisión del *agente patógeno*.

Artículo 1.5.5.

Etapas 2: criterios para determinar si el agente patógeno se ha identificado adecuadamente

El *agente patógeno* deberá identificarse y confirmarse de acuerdo con los métodos descritos en la sección 7 (criterios de diagnóstico corroborativo) de los correspondientes capítulos de *enfermedad de la lista de la OIE* del *Manual Acuático*, o con otros métodos que hayan demostrado ser equivalentes

Artículo 1.5.6.

Etapas 3: criterios para determinar si las pruebas indican que la presencia del agente patógeno constituye una infección

Con el fin de determinar la *infección*, deberá utilizarse una combinación de los siguientes criterios (véase el Artículo 1.5.7.):

- A. el *agente patógeno* se multiplica o se encuentra en estadio de desarrollo en el hospedador;
- B. un *agente patógeno* viable se ha aislado en las *especies susceptibles* propuestas, o se ha demostrado su infecciosidad por medio de la transmisión a individuos inmunológicamente desprotegidos;
- C. los cambios clínicos o patológicos asociados con la *infección*;
- D. la localización específica del agente patógeno se da en los tejidos diana esperados.

El tipo de pruebas para demostrar la *infección* dependerá del *agente patógeno* y de las correspondientes especies hospedadoras potenciales.

Artículo 1.5.7.

Resultados de la evaluación

La decisión de incluir una especie como susceptible deberá basarse en la conclusión de que las pruebas son definitivas. Deberá demostrarse que:

- 1) la transmisión se ha producido naturalmente o mediante procedimientos experimentales que reproducen las vías naturales de *infección* de acuerdo con lo contemplado en el Artículo 1.5.4.;
- Y
- 2) la identificación del *agente patógeno* se ha confirmado de acuerdo con lo contemplado en el Artículo 1.5.5.;
- Y
- 3) existen pruebas de la *infección* por el *agente patógeno* en las especies hospedadoras sospechosas de acuerdo con lo contemplado en los criterios A a D del Artículo 1.5.6. Las pruebas para confirmar el criterio A son suficientes para determinar la *infección*. En ausencia de pruebas que cumplan el criterio A, deberán satisfacerse al menos dos de los criterios B, C, o D para determinar la *infección*.

Artículo 1.5.8.

Especies cuya susceptibilidad no quede completamente demostrada

La decisión de incluir una especie como susceptible en el Artículo 1.5.2. de cada capítulo de *enfermedad de la lista de la OIE* deberá basarse en la conclusión de que las pruebas son definitivas.

Sin embargo, cuando las pruebas sean insuficientes para demostrar la susceptibilidad mediante el enfoque descrito en el Artículo 1.5.3. porque la transmisión no es coherente con las vías naturales de *infección*, o no se ha confirmado la identidad del *agente patógeno* o la *infección* solo está probada parcialmente, se informará de ello en el correspondiente capítulo del *Manual Acuático* dedicado a esa *enfermedad de la lista de la OIE*.

Si las pruebas para demostrar la susceptibilidad de una especie son insuficientes, la *autoridad competente* deberá evaluar el riesgo de propagación del agente patógeno considerado, de acuerdo con las recomendaciones del Capítulo 2.1., antes de aplicar medidas sanitarias a las importaciones.

Artículo 1.5.9.

~~Agentes patógenos con una amplia variedad de hospedadores~~ **Inclusión de especies susceptibles con una clasificación superior al de las especies**

En el caso de los *agentes patógenos* con una amplia variedad de hospedadores, puede ser apropiado para el resultado de la evaluación que se efectúe una clasificación taxonómica superior a la de las especies (por ejemplo, género y familia).

1) La decisión para determinar la susceptibilidad a un nivel taxonómico superior al de las especies sólo se tomará cuando:

A. se haya demostrado la susceptibilidad en al menos una especie por familia, por cada tres familias o más;

Y

AB. se haya encontrado susceptibilidad en más de una especie en el **grupo rango** taxonómico de acuerdo con los criterios antes citados;

Y

BC. no se haya encontrado ninguna especie en el **grupo rango** taxonómico resistente a la *infección*.

Los taxones **El rango taxonómico** seleccionados deberán constituir el nivel más bajo respaldado por estas pruebas.

2) Las pruebas que fundamentan que una especie es resistente a la *infección* pueden incluir: Se demuestra que una especie es resistente a la *infección* si existe:

A. ausencia de *infección* en **las** una especies **expuestas** al *agente patógeno* en entornos naturales cuando se sabe que el *agente patógeno* está presente y que causa enfermedad en las especies susceptibles;

O

B. ausencia de *infección* en las especies expuestas al *agente patógeno* a través de situaciones controladas utilizando procedimientos experimentales.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 5.4.

CRITERIOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA INOCUIDAD DE LOS PRODUCTOS LAS MERCANCIAS DE ANIMALES ACUÁTICOS

En el presente contexto el término «inocuidad» se aplica únicamente a consideraciones zoonositarias para las enfermedades catalogadas por la OIE.

Artículo 5.4.1.

Crerios para evaluar la inocuidad de los productos de animales acuáticos y productos de animales acuáticos importados (o en tránsito) cualquiera que sea el uso independientemente del estatus sanitario del país, la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la enfermedad X, al que se destinan de un país, una la zona no declarados libres de enfermedad X

En todos los capítulos sobre enfermedades del Código Acuático, e apartado 1 del Artículo X.X.3. sobre todos los capítulos específicos de enfermedad (Secciones 8-11) contiene la lista de animales acuáticos y productos de animales acuáticos que pueden ser importados (o en tránsito) objeto de comercio para cualquier uso independientemente del estatus sanitario del país, la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la enfermedad X o declarados libres de la enfermedad X. Los criterios de inclusión de los animales acuáticos y productos de animales acuáticos en este apartado 1 del Artículo X.X.3. se basan en la ausencia del agente patógeno en los animales acuáticos y los productos de animales acuáticos o en su inactivación mediante tratamiento o durante el proceso de transformación.

La evaluación de la inocuidad de los animales acuáticos y productos de animales acuáticos según los criterios relacionados con su tratamiento o su transformación sólo es posible si el tratamiento o el proceso de transformación están bien definidos. Puede que no sea necesario describir exhaustivamente el tratamiento o el proceso de transformación; sin embargo, las etapas consideradas esenciales para la inactivación del agente patógeno en cuestión deben explicarse con todo detalle.

Se presupone que el tratamiento o la transformación se lleva a cabo (i) utilizando protocolos normalizados, que comprenden las etapas consideradas esenciales para la inactivación del agente patógeno en cuestión, y (ii) respetando las buenas prácticas de fabricación, y (iii) que las demás etapas de tratamiento, transformación y manipulación ulterior del producto de animal acuático no ponen en peligro su inocuidad.

Crerios

Para ser considerado inocuo para el comercio internacional conforme a las disposiciones del Artículo X.X.3., un animal acuático o producto de animal acuático deberá cumplir los siguientes crerios:

- 1) Ausencia del agente patógeno en el animal acuático o el producto de animal acuático comercializado
 - a) existen pruebas convincentes de que el agente patógeno no está presente en los tejidos de los que se deriva el animal acuático o el producto de animal acuático;

Y

 - b) el agua (helo incluido) utilizada para preparar o transportar el animal acuático o el producto de animal acuático no está contaminada por el agente patógeno, y el procedimiento empleado evita la contaminación cruzada el animal acuático o del producto de animal acuático.

O
- 2) Aunque el agente patógeno esté presente o contamine los tejidos de los que se deriva el animal acuático o el producto de animal acuático, el tratamiento o procedimiento empleado para producir el animal acuático o el producto de animal acuático inactiva el agente patógeno gracias a procesos:
 - a) físicos (por ejemplo: temperatura, secado, ahumado);

Y / O

 - b) químicos (por ejemplo: yodo, pH, sal, humo);

Y / O

 - c) biológicos (por ejemplo: fermentación).

Anexo 27 (cont.)

Artículo 5.4.2.

de los animales acuáticos o de los productos de animales acuáticos importados (o en tránsito) para la venta directa al por menor para el consumo humano independientemente del estatus sanitario del país, la zona o un el compartimento de exportación con respecto a la enfermedad X no declarados libres de enfermedad X para la venta directa al por menor para el consumo humano

En todos los capítulos sobre enfermedades del Código Acuático, eE) apartado 1 del Artículo X.X.12. (capítulos **específicos** sobre las enfermedades de los anfibios y peces) y del Artículo X.X.11. (capítulos sobre las enfermedades de los crustáceos y moluscos) contiene la lista de **animales acuáticos o productos de animales acuáticos** para la venta directa al por menor para el consumo humano. Los criterios de inclusión de estos productos en el apartado 1 del Artículo X.X.12. (capítulos **específicos** sobre las enfermedades de los anfibios y peces) y del Artículo X.X.11. (capítulos **específicos** sobre las enfermedades de los crustáceos y moluscos) toman en consideración la forma y presentación del producto, el volumen previsto de residuos de tejidos generados por el consumidor y la presencia probable de agente patógeno en los residuos.

A efectos de estos criterios, por «comercio al por menor» se entiende la venta o suministro de **animales acuáticos o productos de animales acuáticos** directamente al consumidor para fines de consumo humano. El circuito de comercialización puede incluir la distribución de los productos al por mayor, a condición que no sean sometidos a otros procesos de transformación por el mayorista o el minorista, es decir, que no sean objeto de evisceración, limpieza, corte en filetes, congelación, descongelación, cocción, desensado, envasado o reembalaje.

Se presupone que (i) **los animales acuáticos o los productos de animales acuáticos** se utilizan para consumo humano exclusivamente, (ii) no siempre será posible manipular los residuos de modo apropiado para disminuir la introducción del agente patógeno; el nivel del riesgo depende de las prácticas de eliminación de residuos en el país o territorio de cada Miembro, (iii) el tratamiento o proceso de transformación previo a la importación se lleva a cabo respetando las buenas prácticas de fabricación, y (iv) las demás etapas de tratamiento, transformación y manipulación ulterior previamente a la importación no ponen en peligro la inocuidad de **los animales acuáticos o los productos de animales acuáticos**.

Criterios

Para ser considerados para el comercio internacional conforme a las disposiciones del apartado 1 del Artículo X.X.12. (capítulos **específicos** sobre las enfermedades de los anfibios y peces) y del Artículo X.X.11. (capítulos **específicos** sobre las enfermedades de los crustáceos y moluscos), **los animales acuáticos o los productos de animales acuáticos** deberán cumplir los siguientes criterios:

- 1) ser productos preparados y envasados para el comercio al por menor destinado al consumo humano; Y

SEA

- 2) incluir sólo una pequeña cantidad de residuos de tejido generados por el consumidor;

SEA

- 3) el agente patógeno no se encuentra normalmente en esos residuos generados por el consumidor.

— Texto suprimido.

CHAPTER 2.2.7.

INFECTION WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS DISEASE

1. Scope

For the purpose of this chapter, Infection with disease (WSD) is considered to be infection with white spot syndrome virus (WSSV) means infection with the pathogenic agent white spot syndrome virus (WSSV), Family *Nimaviridae*, Genus *Whispovirus*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

Various WSSV isolates with small genetic polymorphisms have been identified (variants). It should be realised, however, that as the *Nimaviridae* is a newly recognised family, the species concept will be subject to change after existing and new isolates have been studied in more detail.

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

WSSV was assigned by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) as the only member of the genus *Whispovirus* within the *Nimaviridae* family. Virions of WSSV are ovoid or ellipsoid to bacilliform in shape, have a regular symmetry, and measure 80–120 nm in diameter and 250–380 nm in length. Most notable is the thread- or flagella-like extension (appendage) at one end of the virion. Today, although various geographical isolates with genotypic variability have been identified, they are all classified as a single species (white spot syndrome virus) within the genus *Whispovirus* (Lo *et al.*, 2012).

2.1.2. Survival outside the host

The agent is viable for at least 30 days at 30°C in seawater under laboratory conditions (Momoyama *et al.*, 1998); and is viable in ponds for at least 3–4 days (Nakano *et al.*, 1998).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

The agent is inactivated in <120 minutes at 50°C and <1 minute at 60°C (Nakano *et al.*, 1998).

2.1.4. Life cycle

In-vitro studies with primary cell culture and *in-vivo* studies with postlarvae (PL) show that the replication cycle is approximately 20 hours at 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

2.2. Host factors

WSSV has an extremely wide host range. The virus can infect a wide range of aquatic crustaceans especially decapod, including marine, brackish and freshwater prawns, crabs, crayfish and lobsters (Maeda *et al.*, 2000).

2.2.1. Susceptible host species

To date, no decapod (order Decapoda) crustacean from marine and brackish or freshwater sources has been reported to be resistant to infection with WSSV (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2009).

2.2.2. Susceptible stages of the host

All life stages are potentially susceptible, from eggs to broodstock (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999).

Anexo 28 (cont.)**2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)**

The best life stages of crustaceans for detection of infection with WSSV are late PL stages, juveniles and adults. Probability of detection can be increased by exposure to stressful conditions (e.g. eye-stalk ablation, spawning, moulting, changes in salinity, temperature or pH, and during plankton blooms).

2.2.4. Target organs and infected tissue

The major targets of infection with WSSV infection are tissues of ectodermal and mesodermal embryonic origin, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the tubular epithelial cells of these two organs are of endodermal origin, and they do not become infected.

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

Persistent infection occurs commonly and lifelong infection has been shown (Lo & Kou, 1998). Viral loads during persistent infection can be extremely low and are very hard to detect even by sensitive methods such as real-time and nested PCR.

2.2.6. Vectors

The virus can transmit from host to host and does not need a biological vector.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

Wild decapods include *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995a), *Acetes* sp., *Alpheus* sp., *Callinassa* sp., *Exopalaemon* sp., *Helice* sp., *Hemigrapsus* sp., *Macrophthalmus* sp., *Macrophthel* sp., *Metaplex* sp., *Orithyia* sp., *Palaemonoidea* sp., *Scylla* sp., *Sesarma* sp., *Stomatopoda* sp. and (He & Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002), can be easily infected by WSSV and may express the disease under suitable environmental conditions. However, non-decapodal crustaceans, such as copepods (Huang *et al.*, 1995a), rotifers (Yan *et al.*, 2004), *Artemia salina* (Chang *et al.*, 2002), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), and *Tachypleidue* sp. (He & Zhou, 1996) may become wild aquatic animal carriers by latent infection without disease. Other marine molluscs, polychaete worms (Vijayan *et al.*, 2005), as well as non-crustacean aquatic arthropods such as sea slaters (*Isopoda*) and Euphydradae insect larvae can mechanically carry the virus without evidence of infection (Lo & Kou, 1998).

2.3. Disease pattern

Infection with WSSV sometimes causes disease and sometimes not (Tsai *et al.*, 1999), depending on factors as yet poorly understood but related to species tolerance and environmental triggers. With an appropriate infection dose to allow sufficient time before mortality, animals susceptible to disease show large numbers of virions circulating in the haemolymph (Lo *et al.*, 1997), but this may also occur for tolerant species that show no mortality. Thus, high viral loads *per se* do not cause disease or mortality for all susceptible species.

2.3.1. Transmission mechanisms

The infection with WSSV can be transmitted vertically (trans-ovum), horizontally by consumption of infected tissue (e.g. cannibalism, predation, etc.), and by water-borne routes. Transmission of infection with WSSV can occur from apparently healthy animals in the absence of disease. Dead and moribund animals can be a source of disease transmission (Lo & Kou, 1998).

2.3.2. Prevalence

Prevalence of infection with WSSV is highly variable, from <1% in infected wild populations to up to 100% in captive populations (Lo & Kou, 1998).

2.3.3. Geographical distribution

WSD Infection with WSSV has been identified from crustaceans in China (People's Rep. of), Japan, Korea (Rep. of), South-East Asia, South Asia, the Indian Continent, the Mediterranean (Stentiford & Lightner, 2011), the Middle East, and the Americas. WSD free Zones and compartments free from infection with WSSV are known within these regions (Lo *et al.*, 2012).

2.3.4. Mortality and morbidity

All penaeid shrimp species are highly susceptible to infection with WSSV, often resulting in high mortality. Crabs, crayfish, freshwater prawns, spiny lobsters and clawed lobsters are susceptible to infection with WSSV, but morbidity and mortality as a consequence of infection is highly variable (Lo & Kou, 1998). High level infections with WSSV are known in some decapods in the absence of clinical disease.

2.3.5. Environmental factors

Disease outbreaks may be induced by stressors, such as rapid changes in salinity. Water temperature has a profound effect on disease expression, with average water temperatures of between 18 and 30°C being conducive to WSD WSSV outbreaks (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001).

2.4. Control and prevention

Although the underlying mechanism remains unknown, laboratory experiments have shown that 'vaccinated' shrimp and crayfish have better survival rates after WSSV challenge. It was first shown that *Penaeus japonicus* shrimp that survived natural and experimental WSSV infections displayed resistance to subsequent challenge with WSSV (Venegas *et al.*, 2000). Later studies showed that intramuscular injection of inactivated WSSV virions or recombinant structural protein, (VP28), provided shrimp with some protection against experimental WSSV infection. Furthermore, shrimp fed with food pellets coated with inactivated bacteria over expressing VP28 showed better survival rates after WSSV challenge (Witteveldt *et al.*, 2004). However, although these results seemed promising, the protection was effective only when the shrimp were infected with a low dosage of WSSV. Also, the effect usually lasted for only a few days, or in the case of crayfish, for about 20 days. Another potential means of protecting shrimp against infection with WSSV infection is to use RNA interference (RNAi). WSSV gene-specific double-stranded (ds) RNAs produced strong anti-WSSV activity, protecting the shrimp against infection with WSSV infection, but the same study showed that long dsRNA induced both sequence-dependent and independent anti-viral responses in shrimp (Robalino *et al.*, 2005). A more recent study even showed that oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA could protect shrimp against infection with WSSV infection (Sarathi *et al.*, 2008). To date, however, there are still no field trial data for either the vaccination or the RNAi approach.

2.4.1. Vaccination

No consistently effective vaccination methods have been developed for infection with WSSV.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports for infection with WSSV.

2.4.3. Immunostimulation

Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (fucoidan) and other immunostimulants may improve resistance to infection with WSSV-WSD (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

2.4.4. Resistance breeding

No significant improvements have been reported for infections with WSSV.

2.4.5. Restocking with resistant species

Not applicable for infection with WSSV-WSD.

2.4.6. Blocking agents

There are no efficient blocking agents that can be recommended at this time. rVP28 has an effect, but it cannot yet be used as a practical blocking agent.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

For transovum transmission, disinfection of egg is likely to be effective (Lo & Kou, 1998), but this has not yet been confirmed in formal scientific trials.

Anexo 28 (cont.)**2.4.8. General husbandry practices**

A number of husbandry practices have been used successfully to manage **infection with WSSV-WSD**, such as avoiding stocking in the cold season, use of specific pathogen free (SPF) or polymerase chain reaction (PCR)-negative seed stocks, and use of biosecure water and culture systems (Withyachumnarkul, 1999) polyculture of shrimp and fish (He *et al.*, unpublished data).

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 4.1.1) or exhibit behavioural changes (Section 4.1.2) should be selected for ~~WSSV~~ **detection of infection with WSSV**.

3.2. Preservation of samples for submission

See Chapter 2.2.0 *General information* (for diseases of crustaceans) for guidance on preservation of samples for the intended test method.

3.3. Pooling of samples

~~Samples taken for molecular or antibody based test methods for **infection with WSSV-WSD** may be combined as pooled samples of no more than five specimens per pooled sample of juveniles or subadults. However, for eggs, larvae and PL, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50 to 150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material. See also chapter 2.2.0.~~

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger life stages should be processed and tested individually. However, small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing.

3.4. Best organs or tissues

Tissue tropism analysis from both experimentally infected shrimp and wild-captured brooders shows that tissues originating from the ectoderm and mesoderm, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues, as well as other target tissues (e.g. antennal gland, haematopoietic organ, etc.), are the main target tissues for **infection with** WSSV. Samples of or from the pleopods, gills, haemolymph, stomach or abdominal muscle are recommended for submission (Lo *et al.*, 1997).

For non-destructive screening by PCR, it is recommended to submit (a small piece of) gill, (a small aliquot of) haemolymph or (a small piece of) pleopod. There is also some evidence to suggest that an ablated eyestalk would be a good alternative, provided that the compound eye is removed prior to submission.

Please see section 4.3.1.2.4.1 for details of the sample procedure.

3.5. Samples/tissues that are not suitable

Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the columnar epithelial cells of these two organs are of endodermal embryonic origin (Lo *et al.*, 1997), and they are not appropriate tissues for detection. The compound eye may contain a PCR inhibitor (Lo *et al.*, 1997) and it is therefore not suitable for PCR-based diagnosis.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

White spots embedded within the exoskeleton are the most commonly observed clinical sign. In most shrimp, these spots range from barely visible to 3 mm in diameter, and they sometimes coalesce into larger plates. However, it should be noted that environmental stress factors, such as high alkalinity, or bacterial disease can also cause white spots on the carapace of shrimp, and that moribund shrimp with **infection with WSSV-WSD** may in fact have few, if any, white spots. Therefore, the appearance of white spots is absolutely not a good diagnostic sign of **infection with WSSV-infection**. Furthermore, other crustaceans, such as most crayfish, are often reported to show no sign of white spots when infected with WSSV.

High degrees of colour variation with a predominance of reddish or pinkish discoloured shrimp are seen in diseased populations.

4.1.2. Behavioural changes

The presence of white spots does not always mean that the condition is terminal. For instance, under non-stressful conditions, infected shrimp that have white spots may survive indefinitely. However, if the shrimp also appear lethargic, if their colour changes to pink or reddish-brown, if they gather around the edges of ponds/tanks at the water surface, or if there is a rapid reduction in food consumption, then a very high mortality rate in the shrimp population can be expected within a few hours to a few days of the onset of these signs.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

See Section 4.1.1 and 4.1.2 above.

4.2.2. Clinical chemistry

Haemolymph withdrawn from WSSV-infected shrimp always has a delayed (or sometimes completely absent) clotting reaction.

4.2.3. Microscopic pathology

4.2.3.1. Wet mounts

Demonstration of hypertrophied nuclei in squash preparations of the gills and/or cuticular epithelium, which may be stained or unstained.

4.2.3.1.1 T-E staining

A T-E staining solution may be prepared from Trypan blue 0.6%, Eosin Y 0.2%, NaCl 0.5%, phenol 0.5%, and glycerol 20% (Huang & Yu, 1995).and used as follows:

- i) Place a piece of lesion tissue (e.g. a piece of gill or stomach epithelium without the cuticle) on a slide and mince with a scalpel.
- ii) Add 1–2 drops of the T-E staining solution to the minced tissue, mix and allow to stain for 3–5 minutes.
- iii) Lay a cover glass over the stained tissue and cover with several pieces of absorbent paper. Use a thumb to squash the mince into a single layer of cells.

If the sample was taken from a heavily infected shrimp, it should be easy to see the hypertrophied nuclei and intranuclear eosinophilic or vacuolation-like inclusion bodies under a 400– 000× light microscope.

Anexo 28 (cont.)**4.2.3.2. Smears**

Demonstration of aggregates of WSSV virions in unstained smear preparations of haemolymph by dark-field microscopy.

NOTE: This is the simplest of the microscopic techniques and is recommended for people with limited expertise in **diagnosing infection with** WSSV. The aggregates appear as small reflective spots of 0.5 µm in diameter (Momoyama *et al.*, 1995).

4.2.3.3. Fixed sections

Histological demonstration of pathognomonic inclusion bodies in target tissues.

4.2.3.4. *In situ* hybridisation

Use of WSSV-specific DNA probes with histological sections to demonstrate the presence of WSSV nuclei acid in infected cells.

4.2.3.5. Immunohistochemistry

Use of WSSV-specific antibodies with histological sections or wet mounts to demonstrate the presence of WSSV antigen in infected cells.

4.2.4. Electron microscopy/cytopathology

Demonstration of the virus in tissue sections or in semi-purified negatively stained virus preparations (e.g. from haemolymph). See Section 2.1.1 for virion morphology.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods**

Not reported.

4.3.1.1. Microscopic methods

See Section 4.2.3 above.

4.3.1.1.1. Wet mounts

See Section 4.2.4 above.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5 above.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3 above.

4.3.1.2. Agent isolation and identification*4.3.1.2.1. Bioassay method*

If SPF shrimp are available, the following bioassay method is based on Nunan *et al.* (1998) and Durand *et al.* (2000), is suitable for WSSV diagnosis.

- i) For bioassay, remove the pleopods from shrimp suspected **of being infected with** WSSV **infection** and homogenise in TN buffer (0.02 M Tris/HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4).
- ii) Following centrifugation at 1000 **g** for 10 minutes, dilute the supernatant fluid 1/10 with 2% NaCl and filter (0.2 µm filter).

- iii) Inject 0.2 ml of inoculum into the dorso-lateral aspect of the fourth abdominal segment of indicator shrimp (e.g. SPF *P. vannamei* at the juvenile stage), injecting between the tergal plates into the muscle of the third abdominal segment.
- iv) Examine moribund shrimp grossly or by using the methods described above. If at 3–5 days after inoculation there are still no moribund shrimp and all test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

4.3.1.2.2. Cell culture/artificial media

WSSV can be isolated from primary cultures of lymphoid or ovary cells. However, it is NOT recommended to use cell culture as a routine isolation method because of: 1) the high risk of contamination, and, 2) the composition of the medium varies depending on the tissue type, host species and experimental purpose; that is, to date there is no standard or recognised medium that can be recommended. As primary cell culture is so difficult to initiate and maintain for virus isolation purposes, bioassay should be the primary means for virus propagation.

4.3.1.2.3. Antibody-based antigen detection methods

Both polyclonal and monoclonal antibodies raised against either the virus or a recombinant viral structural protein have been used in various immunological assays including western blot analysis, immunodot assay, indirect fluorescent antibody test (IFAT), immunohistochemistry (IHC) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect WSSV (Huang *et al.*, 1995a; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004). Antibody-based methods can be fast, convenient and applicable to field use, but as they have only about the same sensitivity as 1-step PCR, they are recommended only to confirm acute **infection with WSSV-WSD**.

4.3.1.2.4. Molecular techniques

4.3.1.2.4.1 Polymerase chain reaction (PCR)

The PCR protocol described here is from Lo *et al.* 1996a and b, and uses sampling methods from Lo *et al.* 1997). It is recommended for all situations where **infection with WSSV** diagnosis is required. A positive result in the first step of this standard protocol implies a serious **infection with WSSV-infection**, whereas, when a positive result is obtained in the second amplification step only, a latent or carrier-state infection is indicated. Alternative PCR assays have also been developed (e.g. Numan & Lightner, 2011), but before use they should first be compared with the protocol described here.

PCR commercial kits are available for WSSV **detection diagnosis** and are acceptable provided they have been validated as fit for such purpose. Please consult the OIE Register for kits that have been certified by the OIE (<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests/>).

DNA extraction

- i) Collect 100–200 mg shrimp tissue (pleopod of live juvenile to subadult shrimp, postlarvae 11 upwards [PL11 up] with removed heads, or whole PL10, or use 100 µl haemolymph) in a 1.5 ml microfuge tube with 600 µl lysis solution (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8, 25 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], 0.5% SLS [sodium N-laurylsarcosinate] or 2% SDS [sodium dodecyl sulphate], and 0.5 mg ml⁻¹ proteinase K added just before use). For non-destructive screening, pleopods can be removed using red-hot forceps. For this procedure, the animal should be wrapped in a wet towel such that only the organ to be excised is left exposed.
- ii) Using a disposable stick, homogenise the tissue in the tube thoroughly.
- iii) After homogenisation, incubate at 65°C for 1 hour.
- iv) Add 5 M NaCl to a final concentration of 0.7 M. Next, slowly add 1/10 volume of N-cetyl N,N,N-trimethylammonium bromide (CTAB)/NaCl solution (10% CTAB in 0.7 M NaCl) and mix thoroughly.

NOTE: In addition to the CTAB extraction method described here, commercial extraction kits are often used as part of normal surveillance activities.

Anexo 28 (cont.)

- v) Incubate at 65°C for 10 minutes, and then, at room temperature, add an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol (24/1) and mix gently. Centrifuge at 13,000 *g* for 5 minutes and then transfer the aqueous solution (upper layer) to a fresh 1.5 ml tube and add an equal volume of phenol.
- vi) Mix gently and centrifuge at 13,000 *g* for 5 minutes. Collect the upper layer solution and repeat the phenol extraction process once or twice.
- vii) Transfer the final upper layer to a new tube, mix gently with two volumes of chloroform/isoamyl alcohol (24/1) and centrifuge at 13,000 *g* for 5 minutes.
- viii) Transfer the upper layer to a new tube and precipitate DNA by adding two volumes of 95% or absolute ethanol followed by standing at –20°C for 30 minutes or –80°C for 15 minutes.
- ix) Centrifuge at 13,000 *g* for 30 minutes and discard the ethanol. Wash the DNA pellet with 70% ethanol, dry and resuspend in 100 µl sterilised double-distilled water at 65°C for 15 minutes.
- x) Use 1 µl of this DNA solution for one PCR.

Note: the following nested PCR procedures are well established and provide reliable diagnostic results under the specified conditions. Care should be taken, however, to ensure that DNA samples are prepared from the recommended organs, and that the PCR temperature is accurately applied (particularly for annealing, the recommended temperature is 62°C). To prevent the possibility of false positive results, it is important to adhere to the specified procedures, especially when they are used to test new candidate hosts such as *Cherax quadricarinatus* (Claydon *et al.*, 2004), as well as *Procambarus clarkii* (red swamp crayfish) and *Procambarus zonangulus* (Southern white river crayfish). For diagnosed incidences of **infection with** WSSV in a new host or in a previously free zone, DNA sequencing should be used to confirm the positive results.

First-step PCR

- i) Add 1 µl DNA template solution (containing about 0.1–0.3 µg DNA) to a PCR tube containing 100 µl of reaction mixture (10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 µM of each dNTP, 100 pmol of each primer, 2 units of heat-stable DNA polymerase).
- ii) The outer primer sequences are 146F1, 5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3' and 146R1, 5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'.
- iii) The PCR profile is one cycle of 94°C for 4 minutes, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes, followed by 39 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes and a final 5-minute extension at 72°C. The WSSV-specific amplicon from this reaction is 1447 bp. The sensitivity is approximately 20,000 copies of a plasmid template.

Second step of the (nested) PCR

This second step is necessary for the detection of **infection with** WSSV in shrimp at the carrier stage.

- i) Add 10 µl of the first-step PCR product to 90 µl of a PCR cocktail with the same composition as above except that it contains the second (inner) primer pair: 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3') and 146R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3').
- ii) Use the same PCR amplification protocol as above. The WSSV-specific amplicon from this reaction is 941 bp. The overall sensitivity of both steps is approximately 20 copies of a WSSV plasmid template.
- iii) To visualise, electrophorese 10 µl PCR products on 1% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 µg ml⁻¹.
- iv) Decapod-specific primers (143F 5'-TGC-CTT-ATC-AGCTNT-CGA-TTG-TAG-3' and 145R 5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3' yielding an 848 bp amplicon; N represents G, A, T, or C) should be used in control reactions to verify the quality of the extracted DNA and the integrity of the PCR. In the penaeid shrimp *P. aztecus*, the PCR product generated by this decapod-specific primer pair corresponds to nucleotide sequence 352–1200 of the 18s rRNA. The decapod 18s RNA sequence is highly conserved and produces a similar sized PCR product in almost all decapods. A positive control (WSSV DNA template) and negative controls (no template and shrimp DNA template) should be included in every assay.

4.3.1.2.4.2 DNA sequencing of PCR products

For confirmation of suspected new hosts of **infection with** WSSV, the DNA fragment amplified from the two-step nested diagnostic PCR should be sequenced. The cloning and sequencing protocols described here are according to Claydon *et al.* (2004).

Note: to save time and money, it is acceptable to sequence the PCR amplicon directly. If a positive result is obtained, then go to step iv below. In the event that only band[s] of unexpected size are obtained, then the sample should be tested again using the cloning and sequencing procedures described below.

- i) Excise the DNA fragments selected for further analysis from the agarose gels and purify them using any of the commercially available PCR clean up kits.
- ii) Ligate amplicons into vector plasmid and clone the construct.
- iii) Use suitable primers to amplify the inserted amplicon, and then subject the amplified product to DNA sequencing.
- iv) Compare the sequences obtained with available databases using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to determine approximate phylogenetic affiliations.

4.3.1.2.4.3 Taqman real-time PCR method

The protocol described here is from Durand & Lightner (2002). This detection method is highly specific to WSSV, is extremely sensitive (four copies) and has a wide dynamic range (seven logs).

Construction of positive control vector and preparation of standard curve

The DNA fragment of 69 bp amplified by the forward and reverse primers (indicated below) is cloned in pGEM-T easy or other suitable vectors, and then confirmed by sequencing. The plasmid DNA is purified by any commercial plasmid extraction kits and the concentration is determined by using a spectrophotometer or other methods. The gene copy number is determined according to the molar mass derived from the plasmid DNA containing the 69 bp insert. The plasmid DNAs are then serially diluted tenfold to generate standard curves ranging from 10^2 to 10^7 copies.

DNA extraction

DNA extraction should be performed according to the above protocol described for PCR (4.3.1.2.4.1) or by using a commercial kit. The concentration of purified DNA can be determined by spectrophotometer or by other methods.

Real-time PCR

The TaqMan assay is carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix, which contains AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs with dUTP and optimised buffer components (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA⁶). Primer sequences are WSS1011F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3', WSS1079R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3', Taqman Probe: 5'-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-3'.

- i) Add a sample of 10–50 ng of DNA to set up a 25 μ l reaction mixture containing 0.3 μ M of each primer and 0.15 μ M of TaqMan probe.
- ii) The PCR profile is one cycle of 50°C for 2 minutes for AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG) and 95°C for 10 minutes for activation of AmpliTaq, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

⁶ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Anexo 28 (cont.)

- iii) To determine the WSSV copy number of the extracted DNA samples, the samples are subjected to PCR reaction alongside the serially diluted plasmid DNA standard. After reaction, the software accompanying the PCR system automatically determines the Ct value for each PCR sample. Based on the Ct values, the software calculates the standard curve for standard dilution and determines the WSSV copy number for the DNA samples by extrapolating values from the standard curve.

4.3.1.2.4.4. *In-situ hybridisation (ISH) method*

The protocol described here is based on that developed by Nunan & Lightner (1997).

- i) Fix moribund shrimp with Davidson's AFA fixative for 24–48 hours.
- ii) Embed the tissues in paraffin and cut into 5 µm sections. Place sections on to positively charged microscope slides.
- iii) Heat the slide on a hot plate at 65°C for 30 minutes.
- iv) Deparaffinise, rehydrate and then treat for 2–30 minutes (depending on tissue type) with 100 µg ml⁻¹ proteinase K in Tris/NaCl/EDTA (TNE) buffer at 37°C.
- v) Post-fix the slides by chilling in pre-cooled 0.4% formaldehyde for 5 minutes at 4°C and wash the slides in 2 × standard saline citrate (SSC; 1 × SSC = 150 mM NaCl, 15 mM tri-sodium citrate, pH 7.0) at room temperature.
- vi) Pre-hybridise the slides with pre-hybridisation solution (50% formamide, 0.2% Ficoll 400, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin, 5 × SSC, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8) for 30 minutes at 42°C.
- vii) Follow with hybridisation with the 1447 bp WSSV-specific PCR amplicon (or with any other WSSV-specific PCR amplicon; see Section 4.3.1.2.3.1 "First-step PCR" above) that has been labelled with digoxigenin. It is recommended that the probe be labelled by incorporating DIG-dNTP by the PCR method. Optimum concentration should be determined by testing and adjusting until a high specific signal is obtained against a low background.
- viii) For hybridisation, boil the probe for 10 minutes and immediately place on ice. Dilute the probe to 30–50 ng ml⁻¹ in pre-hybridisation solution and apply 500 µl to each slide.
- ix) Put the slide on a hotplate at 85–95°C for 6–10 minutes (make sure that it does not reach boiling point), quench slides on ice for 5 minutes and then transfer to a humid chamber for 16–20 hours at 42°C.
- x) After hybridisation, wash the slides twice for 15 minutes each time with 2 × SSC at room temperature, twice for 5 minutes with 1 × SSC at 37°C, and twice for 5 minutes with 0.5 × SSC at 37°C.
- xi) For hybridisation detection, wash slides with maleic acid buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5) for 5 minutes at room temperature.
- xii) Block the slides with blocking solution (2% normal goat serum and 0.3% Triton X-100 in maleic acid buffer) for 30 minutes at 37°C.
- xiii) Add 250 µl anti-DIG alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody solution (1 µl ml⁻¹ anti-DIG/AP-Fab fragment in maleic acid buffer containing 1% normal goat serum and 0.3% Triton X-100) to each slide, and incubate at 37°C for 30 minutes.
- xiv) Wash the slides twice with maleic acid buffer for 10 minutes each and once with detection buffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5) at room temperature.
- xv) Add 500 µl development solution (prepare immediately before use by adding 45 µl NBT salt solution [75 mg ml⁻¹ in 70% dimethylformamide], 35 µl 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidinum salt [X-phosphate] solution [50 mg ml⁻¹ in dimethylformamide] and 1 ml 10% PVA to 9 ml of detection buffer) to each slide and incubate in the dark in a humid chamber for 1–3 hours.

- xvi) Stop the reaction by washing the slides in TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) for 15 minutes at room temperature. Wash the slides in distilled water for ten dips, counterstain the slides in 0.5% aqueous Bismarck Brown Y for approximately 5 minutes and then rinse with water. Wet mount using aqueous mounting media for observation immediately or dehydrate the slides and mount with mounting media for long-term preservation.
- xvii) Mount the slides with cover-slips and examine with a bright field microscope. Positive hybridisation appears as a dark blue to black precipitate against the yellow to brown counterstain.

4.3.1.2.4.5. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

The protocol described here is from Kono *et al.* (2004). The LAMP method is sensitive and rapid, and it amplifies the target nucleic acids under isothermal conditions, therefore needing no sophisticated machine for thermal cycling.

DNA extraction

DNA extraction could be performed according to the above protocol described for PCR (4.3.1.2.4.1) or by other suitable methods or by commercial kits.

LAMP reaction

- i) Add DNA to a tube to set up a 25 μ l reaction mixture (20 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8M Betaine, 1.4 mM of each dNTP, 40 pmol of WSSV-FIP and -BIP primers, 5 pmol of WSSV-F3 and -B3 primers).
- ii) The primer sequences are WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
- iii) Heat the mixture at 50°C for 5 minutes and at 95°C for 5 minutes, then chill on ice, and add 1 μ l (8 U) of *Bst* DNA polymerase.
- iv) Incubate the mixture at 65°C for 60 minutes, and then terminate the reaction at 80°C for 10 minutes.
- v) To visualise, electrophorese 2 μ l LAMP reaction products on 2% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 μ g ml⁻¹. This reaction produces WSSV-specific LAMP products with multiple bands of various sizes from approximately 200 bp to the loading well.

Reliable LAMP commercial kits may be alternative for WSSV diagnosis.

4.3.1.2.5. Agent purification

The WSSV virion can be purified as described previously with slight modifications (Xie *et al.*, 2005). Briefly, collect five or six moribund crayfish or shrimp (20–25 g each) at 3 days to 1 week post-infection. Homogenise all tissues excluding the hepatopancreas for 2 minutes using a mechanical homogeniser in 1200 ml TNE buffer (50 mM Tris/HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine, and 1 mM Na₂S₂O₅). Centrifuge at 3500 *g* for 5 minutes. Save the supernatant and rehomogenise the pellet in 1200 ml TNE buffer. Filter the pooled supernatant through a nylon net (400 mesh) and centrifuge at 30,000 *g* for 30 minutes. Discard the supernatant and carefully rinse out the upper loose layer (pink) of the pellet using a Pasteur pipette. Resuspend the lower compact layer (grey) in 10 ml TM buffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5). Pool the crude virus suspension and centrifuge at 3000 *g* for 5 minutes. Centrifuge the supernatant again at 30,000 *g* for 20 minutes. Remove the supernatant and pink loose layer and resuspend the white pellet in 1.2 ml TM buffer containing 0.1% NaN₃. Transfer to a 1.5-ml Eppendorf tube. Centrifuge the suspension three to five times at 650 *g* for 5 minutes each time to remove pink impurities. Finally, store the milk-like pure virus suspension at 4°C until use.

Anexo 28 (cont.)**4.3.2. Serological methods**

None developed.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of **infection with** WSSV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category A or B have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

| Method | Targeted surveillance | | | | Presumptive diagnosis | Confirmatory diagnosis |
|---------------------------|-----------------------|-----|-----------|--------|-----------------------|------------------------|
| | Larvae | PLs | Juveniles | Adults | | |
| Gross signs | d | d | c | c | c | d |
| Bioassay | d | d | d | d | c | b |
| Direct LM | d | d | c | c | c | c |
| Histopathology | d | c | c | c | a | c |
| Transmission EM | d | d | d | d | d | a |
| Antibody-based assays | d | d | c | c | a | b |
| <i>In-situ</i> DNA probes | d | d | c | c | a | a |
| PCR | d | b | a | a | a | a |
| LAMP | d | d | a | a | a | a |
| Sequence | d | d | d | d | d | a |

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy;
 PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from **infection with white spot **syndrome virus** disease**

~~Two step PCR and sequencing are the recommended methods for declaring freedom, only for juveniles and adults and possibly PLs. Two step PCR negative results are required. Where a two step PCR positive result cannot be confirmed as **infection with** WSSV by sequencing, this also counts as a negative result.~~

Real-time PCR is the recommended test for targeted surveillance to declare freedom from white spot disease.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

For juvenile and adult shrimp: gross signs of WSD (See Sections 4.1.1 and 4.1.2 above).

For shrimp at any life stage (larva to adult): mortality.

For shrimp and crab at any life stage (larva to adult): hypertrophied nuclei in squash preparations of gill and/or cuticular epithelium; unusual aggregates in haemolymph by dark field microscopy; inclusion bodies in histological sections in target tissues.

Infection with WSSV is suspected if at least one of the following criteria is met:

1. Histopathology consistent with WSSV
2. Positive conventional PCR result
3. Positive real-time PCR result

Positive LAMP result

7.2. Definition of confirmed case

Suspect cases should first be checked by PCR or LAMP. If in a previously WSSV free country/zone/compartiment, where PCR results are positive, they should be confirmed by sequencing. Histopathology, probes and electron microscopy also can be used to confirm the case.

Infection with WSSV is considered to be confirmed if one or more of the following criteria are met:

1. Histopathology consistent with WSSV and positive *in-situ* hybridisation test
2. Positive conventional PCR and conventional PCR targeting a different region of the WSSV genome
3. Positive real-time PCR and conventional PCR targeting a different region of the WSSV genome
4. Positive LAMP and conventional PCR targeting a different region of the WSSV genome

For confirmation of an index case in a previously free zone or country, sequence analysis of conventional PCR amplicons is required.

8. References

CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.

CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in-situ in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.

CHANG Y.S., LO C.F., PENG S.E., LIU K.F., WANG C.H. & KOU G.H. (2002). White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield

PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 1–10.

Anexo 28 (cont.)

CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F., WANG H.C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.

CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.

CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.

DURAND, S. V. & LIGHTNER, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.

DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.

FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.

HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.

HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. (*Chinese J.*) *Mar. Fish. Res.*, **16**, 31–39.

HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995a). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. (*Chinese J.*) *Mar. Fish. Res.*, **16**, 40–50.

KONO T., SAVAN R., SAKAI M., & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.

LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.

LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.

LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W., WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 229–234.

LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.

LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, **erab crabs** and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.

LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.

LO C.F., LEU J.H., **Ho C.H.**, CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

- MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. & KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.
- NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.
- ROBALINO J., BARTLETT T., SHEPARD E., PRIOR S., JARAMILLO G., SCURA E., CHAPMAN R.W., GROSS P.S., BROWDY C.L. & WARR G.W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J. Virol.*, **79**, 13561–13571.
- SARATHI M., SIMON M.C., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *J. Mar. Biotechnol.*, **10**, 242–249.
- SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAVISUTHANGKURA P. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.
- SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.
- 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.
- STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, **319**, 302–306.
- TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999). Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 107–114.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., NISHIZAWA T. & MUROG K. (2000). Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 83–89.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.

Anexo 28 (cont.)

VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 364–372.

VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEK HAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.

WITTEVELDT J., CIFUENTES C.C., VLAK J.M. & VAN HULTEN M.C. (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, **78**, 2057–2061.

WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRATANA S., NASH G.L., AKARAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69–77.

XIE X., LI H., XU L. & YANG F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res.*, **108**, 63–67.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.

YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for infection with white spot syndrome virus disease (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on for infection with white spot syndrome virus disease

NB: FIRST ADOPTED IN 1997; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

Este documento se propuso para comentario en el informe de septiembre de 2016.

Este documento se modificó durante la reunión de febrero de 2017.

Revisión de la evaluación para inclusión de *Batrachochytrium salamandrivorans* en el Código Acuático

Evaluación general

La Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos evaluó *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) según los criterios para incluir una enfermedad de los animales acuáticos en la lista de la OIE que figuran en el Artículo 1.2.2. del *Código Acuático* y acordó que *Bsal* cumple con los criterios de inclusión de la OIE, en particular con: criterio A - Consecuencias: impacto negativo en las poblaciones de anfibios silvestres; criterio B - Propagación: se ha demostrado la etiología infecciosa, la alta probabilidad de propagación a través del comercio internacional y la existencia de zonas libres del patógeno; y criterio C - Diagnóstico: existe un método de diagnóstico o de detección fiable (ver cuadro 1).

Cuadro 1. Resumen de la evaluación de *Bsal*

| | Criterios de inclusión | | | | | | | | Conclusión |
|--|------------------------|---|----|---|----|---|---|---|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> | NA | + | NA | + | NA | + | + | + | Inclusión |

NA = no aplica.

Contexto

Se sabe con certeza que las poblaciones de anfibios están en crisis a través del mundo debido a una variedad de factores, entre ellos, las enfermedades. *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), una infección por hongos, surgió como un importante patógeno de los anfibios en los últimos años y ha causado el declive de más de 200 poblaciones de anfibios y reducido más del 40% de las especies de anfibios en Centroamérica, además de generar pérdidas en Europa, Australia y Norteamérica (Fisher *et al.*, 2012). *Bd* se añadió a la lista de enfermedades de la OIE en 2008.

En 2013, se notificó una rápida reducción de salamandras comunes (*Salamandra salamandra*) en los Países Bajos (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2013). Aunque las investigaciones iniciales no lograron identificar una causa clara, los estudios posteriores sobre la mortalidad de las salamandras cautivas identificaron una nueva especie de hongos quitridios, *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (Martel *et al.*, 2013). Martel *et al.* (2014) concluyeron que el patógeno ha coexistido con un clado de salamandras como huésped durante millones de años en Asia. Como resultado de la globalización y, específicamente, del comercio internacional de salamandras, se introdujo recientemente en Europa donde ha cambiado de huéspedes con serias implicaciones para la biodiversidad. Se han atribuido a los desplazamientos de animales acuáticos por fuera de su hábitat natural (Peeler *et al.*, 2011) otras enfermedades emergentes que han causado un serio declive de las poblaciones silvestres de animales acuáticos.

Criterios para incluir una enfermedad de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Artículo 1.2.2.)

A. Consecuencias

Criterio No. 1. *Se ha demostrado que la enfermedad causa pérdidas significativas de producción a nivel nacional o multinacional (zonas o regiones).*

Conclusión: este criterio no se aplica.

O

Anexo 29 (cont.)

Criterio No. 2. *Se ha demostrado o pruebas científicas indican que es probable que la enfermedad puede causar una morbilidad o mortalidad importantes en poblaciones naturales de animales acuáticos.*

Evaluación:

Investigaciones de Martel *et al.* (2013) ofrecen evidencia sólida que *Bsal* es una causa necesaria y a la vez suficiente de enfermedad en salamandras comunes en los Países Bajos. *Bsal* se aisló de la piel de salamandras comunes en poblaciones afectados en el bosque de Bunderbos (Países Bajos). Los análisis evidencian que *Bsal* es un nuevo hongo quitridio, en un clado con *Bd*. Los animales infectados muestran patología severa (erosiones y ulceraciones multifocales) y mueren dentro de los siete días. Las observaciones de campo y los estudios experimentales indican que el índice de letalidad se aproxima al 100%. Entre 2010 y 2013, en los Países Bajos las poblaciones afectadas de salamandras comunes se redujeron en un 96%.

Estudios de infección experimental han demostrado que 41 de las 44 especies de salamandra del Paleártico occidental son susceptibles a *Bsal* y que éste es letal para algunas especies de salamandras del Nuevo Mundo (Martel *et al.*, 2014). Por consiguiente, la enfermedad tiene el potencial de impactar negativamente a muchas poblaciones de anfibios. Yap *et al.* (2015) han modelado el posible impacto de *Bsal* en Norteamérica y concluyeron que se trata de una seria amenaza para la biodiversidad. Esta conclusión fue respaldada por una revisión del informe del Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos de América que establece que «la introducción de *Bsal* en dicho país podría causar efectos significativos y adversos a nivel de la población de las especies autóctonas»⁷.

Un análisis de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (2017) concluyó que, si bien los tamaños de las muestras eran pequeños, existían suficientes pruebas para respaldar que la disminución del número de salamandras de fuego en Bunderbos en los Países Bajos se podía atribuir a *Bsal*. Dicho análisis concluyó que se necesitaban más investigaciones para obtener las pruebas definitivas de que *Bsal* se asociaba a otras disminuciones del número de individuos en las poblaciones silvestres.

Conclusión: este criterio se cumple.

O

Criterio No. 3. *El agente infeccioso constituye un peligro para la salud pública.*

Conclusión: este criterio no se aplica.

Y

B. Propagación

Criterio No. 4. *Se ha demostrado la etiología infecciosa de la enfermedad.*

Evaluación:

Bsal se aisló de la piel de salamandras infectadas (Martel *et al.*, 2013). Pese a las amplias investigaciones emprendidas no se detectaron otros patógenos. Se observaron en microscopio un gran número de colonias talo. A través de la microscopía electrónica de transmisión, el examen de las lesiones de la piel de los animales clínicamente afectados demostró la presencia del patógeno (estructuras intracelulares compatibles con colonias talo) (Martel *et al.*, 2013). La etiología infecciosa y la función de *Bsa* se comprobó en muestras de poblaciones en declive y estables de salamandras comunes (Martel *et al.*, 2013). 13 de los 33 hisopos tomados de salamandras comunes de poblaciones en disminución arrojaron resultados positivos para *Bsal* por PCR, frente 0 sobre 51 en una población estable.

⁷ <https://www.federalregister.gov/documents/2016/01/13/2016-00452/injurious-wildlife-species-listing-salamanders-due-to-risk-of-salamander-chytrid-fungus>.

Los estudios de transmisión aportaron pruebas adicionales del agente etiológico de enfermedad. Tras la exposición de cinco salamandras a zoosporas *Bsal* (Martel *et al.*) todos los animales murieron. El patógeno volvió a aislarse de un animal y se confirmó por PCR en los cinco.

Conclusión: este criterio se cumple.

O

Criterio No. 5. Se ha establecido una estrecha relación entre un agente infeccioso y la enfermedad, pero se desconoce aún la etiología.

Conclusión: este criterio no se aplica.

Y

B. Propagación

Criterio No. 6. Probabilidad de propagación internacional de la enfermedad por los animales acuáticos vivos, sus productos o fomites.

Evaluación:

Martel *et al.* (2014) especularon que *Bsal* se originó en Asia y se propagó en Europa por medio del comercio internacional de salamandras como mascotas; igualmente, identificaron tres especies de salamandras asiáticas activamente comercializadas como reservorios de *Bsal* (*Cynops cyanurus*, *Cynops pyrrhogaster* y *Paramesotriton deloustali*) (Martel *et al.*, 2015). La identificación de *Bsal* en una remesa de anfibios importados al Reino Unido (Cunningham *et al.*, 2015) puso de manifiesto una propagación transfronteriza por medio de los desplazamientos de animales vivos. Las muestras de piel de 1765 anfibios tomadas en tiendas de mascotas, en el aeropuerto londinense de Heathrow y en locales de un exportador de Hong Kong, dieron 3 muestras positivas (2 de ellas habían sido importadas a Europa en 2010); (Martel *et al.*, 2014). Un análisis del comercio de salamandras como mascotas a cargo de Yap *et al.* (2015) concluyó que el comercio representa un alto riesgo de introducción de *Bsal* en Norteamérica.

Conclusión: este criterio no se aplica.

Y

Criterio No. 7. Varios países o zonas pueden ser declarados libres de la enfermedad, de conformidad con los principios generales de vigilancia descritos en el Capítulo 1.4.

Evaluación:

Bsal fue descrito por primera vez en 2013, por lo que hasta el momento ha habido escasa oportunidad de completar la vigilancia para demostrar el estatus libre o instaurar medidas sanitarias encaminadas a prevenir su introducción. La vigilancia de *Bsal* se ha basado en *Bd*-específico qPCR, y no puede emplearse para evaluar su dispersión mundial. No obstante, Martel *et al.* (2013) desarrollaron una prueba PCR específica que se ha utilizado para monitorear a más 500 anfibios silvestres en cuatro continentes (Martel *et al.*, 2014). Se han obtenido resultados positivos en el sudeste asiático, los Países Bajos y Bélgica (donde el patógeno se asoció con la enfermedad). Dos estudios en Norteamérica no encontraron evidencia de *Bsal* en salamandras silvestres (Bales *et al.*, 2015; Muletz *et al.*, 2014). Yap *et al.* (2015) estimaron que, aunque Norteamérica se encuentra libre, existe un riesgo de introducción de *Bsal*. Un estudio en 30 especies de anfibios (665 muestras) de 15 provincias de China no encontró evidencia de *Bsal* (Zhu *et al.*, 2014). Habida cuenta de la susceptibilidad de las salamandras comunes y su amplia distribución en el centro y sur de Europa, es razonable concluir que, actualmente, el patógeno tiene una distribución geográfica restringida dentro de Europa.

Pese a que la distribución mundial es incierta, a partir de la información disponible se puede estimar que varios países puedan ser declarados libres de la enfermedad partiendo de los principios generales de vigilancia descritos en el Capítulo 1.4. Sin embargo, es improbable que en este momento los países hayan implementado medidas para prevenir la introducción de *Bsal*.

Conclusión: este criterio se cumple.

Anexo 29 (cont.)

Y

C. Diagnósis

Criterio No. 8. Existe un método de diagnóstico o de detección fiable y asequible.

Evaluación

Los métodos desarrollados para el cultivo de *Bd* se han usado sin éxito para el cultivo de *Bsal*. Los cultivos a diferentes temperaturas indicaron que la incubación a 20°C en medio de cultivo TGH (Tryptona Gelatina hidrolizada Lactosa) arrojaba los mejores resultados (Martel *et al.*, 2013).

Se ha desarrollado una prueba PCR para amplificar el gen ARN ribosomal 5.8S de *Bsal* y sus regiones separadoras internas complementarias del costado (Martel *et al.*, 2013). Los resultados PCR mostraron que el ADN de *Bsal* estaba presente en los cinco animales infectados experimentalmente y se asoció con lesiones histopatológicas (con una gran cantidad de colonias tali de *Bsal*), conformes con las lesiones encontradas en los animales silvestres. Esto aporta evidencias de la alta sensibilidad de la prueba. La PCR no ha demostrado una reacción cruzada con *Bd*, lo que demuestra una alta especificidad analítica.

Blooi *et al.* (2013) siguieron desarrollando una prueba PCR multiplex en tiempo real para detectar el mismo blanco (gen ARN ribosomal – o ribosómico - 5.8S). Las muestras de anfibios provenían de poblaciones infectadas experimentalmente y de poblaciones (en disminución y saludables). La precisión se evaluó mediante pruebas intraensayo e interensayo y mostró ser alta y reproducible. La especificidad se evaluó mediante extractos de ADN de 10 diferentes aislados de Chytridiomycota. La prueba PCR solo arrojó resultados positivos de muestras de *Bsal* indicando un alto nivel de especificidad analítica. El límite de detección se fijó en 0,1, el equivalente genómico a las zoosporas. Las muestras pequeñas limitan la capacidad de generar estimaciones exactas de las características de las pruebas de diagnóstico PCR multiplex. Sin embargo, un análisis de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (2017) concluyó que «los datos sugieren categóricamente un alto nivel de rendimiento».

La prueba PCR multiplex en tiempo real ha sido suficientemente validada lo suficiente como para reconocer el número limitado de muestras disponibles para detectar con fiabilidad *Bsal* por lo que se concluye que el método de diagnóstico puede detectar *Bsal* de manera precisa, fiable y contundente. Las características demostradas (en especial el nivel de especificidad y el límite de detección) hacen que la prueba sea idónea para estudios de cribado y confirmación en individuos afectados.

Cuando se aplique este nuevo método, se espera surja información adicional que contribuya a la validación.

Conclusión: *este criterio se cumple.*

Referencias

Bales E.K., et al. HYMAN O.J., LOUDON A.H., HARRIS R.N., LIPPS G., CHAPMAN E., ROBLEE K., KLEOPFER J.D. & TERRELL K.A. (2015). Pathogenic Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. *PloS one ONE* 10(2): 10. e0116405. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4335058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

BLOOI, M., PASMANS, F., LONGCORE, J. E., SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., VERCAMMEN, F., & MARTEL, A. (2013). Duplex real-Time time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology J. Clin. Microbiol.*, 51 51 (12), 4173–4177. <http://doi.org/10.1128/JCM.02313-13>

CUNNINGHAM, A. A., BECKMANN, K., PERKINS, M., FITZPATRICK, L., CROMIE, R., REDBOND, J., O'BRIEN M.F., GHOSH P., SHELTON J. & FISHER, M. C. (2015). Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record Vet. Rec.*, 476 176 (18), 468. <http://doi.org/10.1136/vr.h2264>

EFSA (European Food Safety Authority) European Food Safety Authority (EFSA), BALÁZ V., GORTÁZAR SCHMIDT C., MURRAY K., CARNESECCHI E., GARCIA A., GERVELMEYER A., MARTINO L., MUNOZ GUAJARDO I., VERDONCK F., ZANCANARO G. and FABRIS C. (2017). Scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in the EU. *EFSA Journal* *EFSA Journal* 2017;15(2): 15. 4739. 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4739

FISHER, M. C., HENK, D. A., BRIGGS, C. J., BROWNSTEIN, J. S., MADOFF, L. C., MCCRAW, S. L., & GURR, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393) 484, 186–194. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature10947>

MARTEL, A., BLOOI, M., ADRIAENSEN, C., VAN ROOIJ, P., BEUKEMA, W., FISHER, M. C., FARRER R.A., SCHMIDT B.R., TOBLER U., GOKA K., LIPS K.R., MULETZ C., ZAMUDIO K.R., BOSCH J., LOTTERS S., WOMBWELL E., GARNER T.W.J., CUNNINGHAM A.A., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SALVIDIO S., DUCATELLE R., NISHIKAWA K., NGUYEN T.T., KOLBY J.E., VAN BOCXLAER I., BOSSUYT F. & PASMANS, F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346(6209) 346, 630–631. <http://doi.org/10.1126/science.1258268>
 MARTEL, A., SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., BLOOI, M., BERT, W., DUCATELLE, R., FISHER, M. C., WOELTJES A., BOSMAN W., CHIERS K., BOSSUYT F. & PASMANS, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(38) 110, 15325–15329. <http://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>

MULETZ, CARLY C., et al. CARUSO N.M., FLEISCHER R.C., MCDIARMID R.W. & LIPS K.R. (2014). “Unexpected Rarity of the Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian Plethodon Salamanders 1957–2011.” *PLoS ONE*, 9(8): 9, e103728. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103728>.

PEELER, E. J., OIDTMANN, B. C., MIDTLYNG, P. J., MIOSSEC, L., & GOZLAN, R. E. (2011). Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biological Invasions*, 13(6) 13, 1291–1303. <http://doi.org/10.1007/s10530-010-9890-9>

SPITZEN-VAN DER SLUIJS, ANNEMARIEKE; FRANK SPIKMANS, WILBERT BOSMAN, M. de Z., & TOM VAN DER MEIJ, EDO GOVERSE, MARJA KIK, FRANK PASMANS, A. M. SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SPIKMANS F., BOSMAN W., DE ZEEUW M., VAN DER MEIJ T., GOVERSE E., KIK M., PASMANS F. & MARTEL A. (2013). Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34, 233–239. Retrieved from http://www.ravon.nl/Portals/0/spitzen_et_al_2013_rapid_decline_fire_salamander_Netherlands.pdf

YAP, A., MICHELLE S. KOO, RICHARD F. AMBROSE, DAVID B. WAKE, and V. T. V. YAP T.A., KOO M.S., AMBROSE R.F., WAKE D.B. & VREDENBURG V.T. (2015). Averting a North American biodiversity crisis. *Science*, 349 349, 6247–6248. doi:10.1126/science.1268148

ZHU, W., XU, F., BAI, C., LIU, X., WANG, S., GAO, X., LI, Y. ZHU W., XU F., BAI C., LIU X., WANG S., GAO X., YAN S., LI X., LIU Z. & LI, Y. (2014). A survey for *Batrachochytrium salamandrivorans* in Chinese amphibians. *Current Zoology Curr. Zool.*, 60(6) 60, 729–735. <http://doi.org/10.1093/czoolo/60.6.729>

FICHA TÉCNICA DE LA ENFERMEDAD

VIRUS DE LA TILAPIA DEL LAGO (TiLV) – UN NUEVO VIRUS DE TIPO ORTHOMYXO

INFORMACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO

1. AGENTE PATÓGENO CAUSANTE DE LA ENFERMEDAD

1.1. Tipo de agente patógeno

Virus.

1.2. Nombre de la enfermedad y sinónimos

Enfermedad del virus de la tilapia del lago (TiLV).

1.3. Nombres comunes del agente patógeno y sinónimos

Virus de la tilapia del lago (TiLV).

1.4. Categoría taxonómica

La filiación taxonómica todavía no se ha determinado definitivamente, TiLV se ha descrito como un nuevo virus de la familia *Orthomyxoviridae* (Eyngor *et al.*, 2014).

1.5. Autoridad (primera descripción científica, referencia)

Este virus fue descrito por Eyngor *et al.* (2014).

1.6. Entorno del agente patógeno (agua dulce, de mar y agua salobre)

Agua dulce y salobre.

2. MODOS DE TRANSMISIÓN

2.1. Vías de transmisión (horizontal, vertical, indirecta)

Estudios de cohabitación han demostrado que la transmisión horizontal directa constituye una importante vía de transmisión. No existen pruebas de transmisión vertical. Las características biofísicas del virus no están bien caracterizadas y, lo que dificulta la determinación de la importancia de la transmisión indirecta por fómites.

2.2. Reservorio

Las poblaciones infectadas de peces, tanto de cría como silvestres, constituyen los únicos reservorios establecidos de infección. Se desconoce la fuente original de TiLV.

2.3. Factores de riesgo (temperatura, salinidad, etc.)

La enfermedad se ha asociado con la transferencia entre estanques y, por lo tanto, se puede asociar al estrés (Ferguson *et al.*, 2014). No se han identificado otros factores de riesgo potencial (temperatura, salinidad, etc.).

Anexo 30 (cont.)**3. GAMA DE HOSPEDADORES****3.1. Especies susceptibles**

La mortalidad atribuida a TiLV se ha observado en tilapias silvestres *Sarotherodon (Tilapia) galilaeus*, tilapias de cría *Oreochromis niloticus* y tilapias híbridas para el cultivo comercial (*O. niloticus* X *O. aureus*) (Bacharach *et al.*, 2016; Ferguson *et al.*, 2014; Eyngor *et al.*, 2014). Hasta la fecha, sólo los peces tilapia han demostrado ser susceptibles a la enfermedad. Es posible que se encuentren otras especies susceptibles.

3.2. Etapa de la vida afectada por la enfermedad

En el brote notificado por Ferguson *et al.* (2014) los alevines fueron los principales afectados. Otros informes no se refirieron a sobre los distintos niveles de mortalidad según la etapa de la vida (Eyngor *et al.*, 2014).

3.3. Comentarios adicionales

Existen pruebas que demuestran que ciertas cepas genéticas de tilapias son resistentes. Ferguson *et al.* (2014) observó que una cepa de tilapia (genéticamente un pez tilapia macho) había registrado un nivel de mortalidad más bajo (10-20 %) en comparación con otras cepas (~80% mortalidad).

4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El virus TiLV se ha notificado en Colombia, Ecuador e Israel (Bacharach *et al.*, 2016; Ferguson *et al.*, 2014; Tsofack *et al.*, 2016) y, recientemente, en Egipto (Fathi *et al.*, 2017). Sin embargo, ante la ausencia de investigaciones exhaustivas sobre todos los casos de mortalidad, es posible que la distribución geográfica de TiLV pueda ser más amplia que la actual. Por ejemplo, los informes de mortalidad de pez tilapia en Ghana y Zambia en 2016 no se atribuyeron a TiLV, pero la información disponible no indica que se haya investigado la presencia del virus.

5. SIGNOS CLÍNICOS Y DESCRIPCIÓN DE CASO**5.1. Tejidos hospedadores y órganos infectados**

Los principales órganos donde se ha observado la patología son los ojos, el cerebro y el hígado (Eyngor *et al.*, 2014).

5.2. Observaciones generales y lesiones macroscópicas

Las lesiones generales incluyen alteraciones oculares, como la opacidad del cristalino y, en casos graves, su ruptura. Otras lesiones: erosiones dérmicas, hemorragias en las leptomeninges y congestión del bazo (Eyngor *et al.*, 2014).

5.3. Lesiones microscópicas y anormalidad del tejido

Se han observado lesiones histológicas en el cerebro, los ojos y el hígado (Eyngor *et al.*, 2014). Las lesiones en el cerebro incluyen edema, hemorragias focales en las leptomeninges, congestión capilar en la materia blanca y gris y degeneración neural/neuronal. Se han detectado focos de gliosis y “puños de camisa” perivasculares ocasionales de linfocitos. Las lesiones oculares incluyen la ruptura de cápsula lenticular y modificaciones en las cataratas. Se observaron focos de inflamación hepatocelular. Se observó un bazo hiperplástico, con una proliferación de linfocitos. Aumento de los centros melanomacrófagos (MMC, por sus siglas en inglés) tanto en tamaño como en número, en el hígado y el bazo. El microscopio electrónico de transmisión confirmó la presencia de un virus de la familia orthomyxo en hepatocitos enfermos y, por lo tanto, confirmó los informes tempranos de hepatitis sincitial (del-Pozo *et al.*, 2016).

5.4. Situación actual en el marco de la OIE

En estudio de inclusión en la lista de enfermedades, pero en la actualidad no cumple con todos los criterios de inclusión descritos en el Capítulo 1.2. del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* (OIE, 2016).

6. IMPORTANCIA SOCIAL Y ECONÓMICA

Existen más de 100 especies de tilapias que constituyen el segundo grupo de peces de cultivo más importante del mundo después de la carpa. Se estima que la producción mundial es de 4,5 millones de toneladas métricas con un valor superior a 7.500 millones de dólares estadounidenses (FAO, 2014). En algunas regiones, tienen una importancia ecológica (control de algas y mosquitos y mantenimiento del hábitat para la cría de camarones) y son una especie importante para la captura de especies silvestres. Se ha demostrado que la introducción del virus causa una mortalidad significativa (hasta del 80 %), lo que genera serias pérdidas económicas, tanto para los criadores como para los pescadores (Eyngor *et al.*, 2014).

7. IMPORTANCIA ZONÓTICA

Ninguna

8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

8.1. Definición de sospecha

Altos niveles de mortalidad en las especies de tilapias, asociados con alteraciones oculares (opacidad del cristalino o patología más severa) deberán considerarse “sospecha de TiLV”. En inspecciones *post-mortem*, se pueden observar erosiones cutáneas, hemorragias en leptomeninges y una congestión moderada del bazo y el riñón.

8.2. Métodos de prueba de presunción

Cultivo de células del virus en células primarias de cerebro de tilapia o en una línea celular E-II, induciendo un efecto citopático en los días 5-10 (Eyngor *et al.*, 2014). Tsofack *et al.* (2016) describen las condiciones óptimas de cultivo de TiLV.

8.3. Métodos de prueba de confirmación

Se ha diseñado un primer grupo de PCR y se ha desarrollado un prueba PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) (Eyngor *et al.*, 2014), aunque la prueba no ha sido validada por completo. Se ha publicado y se recomienda una prueba RT-PCR idónea para la detección de casos clínicos de TiLV (Tsofack *et al.*, 2016).

9. MÉTODOS DE CONTROL

La propagación de la enfermedad se limitará mediante restricciones de la circulación de tilapias entre granjas y pesquerías en las que se sabe que el virus ha aparecido. Igualmente, se deberán implementar medidas genéricas de bioseguridad, con el fin de minimizar la propagación de fómites a través de equipos, vehículos y personal (es decir, limpieza y desinfección).

Hasta la fecha, no se han publicado métodos que demuestran ser eficaces en limitar el impacto de un brote en una granja infectada. Se ha sugerido que la cría de animales resistentes o el desarrollo de una vacuna puede ofrecer perspectivas a largo plazo para el control de la enfermedad (Ferguson *et al.*, 2014). Un programa de cría necesitará seleccionar y poner a prueba una variedad de diferentes cepas de tilapia con miras a detectar las menos susceptibles.

10. RIESGO DE TRANSMISIÓN

Dado que TiLV se ha transmitido horizontalmente a través de la cohabitación, es probable que la transmisión se efectúe por medio de los desplazamientos de animales acuáticos vivos. Existe poca información acerca de las propiedades biofísicas del TiLV y de los riesgos asociados con los productos de animales acuáticos. No obstante, se puede asumir que comparte algunas propiedades con otros virus de tipo orthomyxo como el de la anemia infecciosa del salmón. Pruebas recientes sugieren que los ojos, el cerebro y el hígado tienen probabilidades de contener altas concentraciones de TiLV y que, por lo tanto, pueden estar contaminados los residuos líquidos o sólidos. Sin embargo, es posible que el agente patógeno también se pueda encontrar en la musculatura del pez infectado.

Anexo 30 (cont.)**11. REFERENCIAS**

Bacharach, E., Mishra, N., Briese, T., Zody, M. C., Kembou Tsofack, J. E., Zamostiano, R., ... Lipkin, W. I. (2016). Characterization of a Novel Orthomyxo-like Virus Causing Mass Die-Offs of Tilapia. *mBio*, 7(2), e00431-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-16>

del-Pozo, J., Mishra, N., Kabuusu, R., Cheetham, S., Eldar, A., Bacharach, E., Lipkin, W.I., & Ferguson, H. W. (2016). Syncytial Hepatitis of Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is Associated With Orthomyxovirus-Like Virions in Hepatocytes. *Veterinary Pathology* . <https://doi.org/10.1177/0300985816658100>

Eyngor, M., Zamostiano, R., Tsofack, J. E. K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., Lev, M., Huryitz, A., Galeotti, M., 7 Eldar, A. (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4137–4146. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-14>

FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Vol. 2014). <https://doi.org/92-5-105177-1>

Ferguson, H. W., Kabuusu, R., Beltran, S., Reyes, E., Lince, J. A., & del Pozo, J. (2014). Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): A case report. *Journal of Fish Diseases*, 37(6), 583–589. <https://doi.org/10.1111/jfd.12142>

Fathi, M., Dickson, C., Dickson, M., Leschen, W., Baily, J., Muir, F., Ulrich, K., & Weidmann, M. (2017). Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome. *Aquaculture* Vol. 472, 430-432

OIE. (2016). Aquatic Animal Health Code (19th ed.). Paris: OIE. Retrieved from <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-code/access-online/>

Tsofack, J. E. K., Zamostiano, R. Watted, S., Berkowitz, E., Mishra, N., Briese, T., Lipkin, W.I., Kabuusu, R.M., Ferguson, H., del Pozo, J., Eldar, A., and Bacharach, E. (2016) Detection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in Clinical Samples by Culturing and Nested RT-PCR. *J. Clin. Microbiol.* JCM.01808-16; Accepted manuscript posted online 14 December 2016, doi:10.1128/JCM.01808-16

**PLAN DE TRABAJO 2017–2018 DE LA
COMISIÓN DE NORMAS SANITARIAS PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS**

| Tarea | Septiembre de 2016 | Febrero de 2017 | Sesión General de mayo de 2017 | Septiembre de 2017 |
|---|---|--|----------------------------------|---|
| CÓDIGO ACUÁTICO | | | | |
| Glosario | Proponer modificaciones de ciertas definiciones a los Países Miembros para que formulen sus comentarios. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Criterios para la inclusión de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. Revisar la evaluación del virus TiLV para inclusión en la lista de enfermedades de la OIE. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Criterios para la inclusión de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico (Capítulo 1.5.) | Desarrollar un nuevo Artículo 1.5.9. para tratar las enfermedades con una amplia variedad de hospedadores. | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | | Revisar los comentarios de los Países Miembros. |
| Desinfección de establecimientos y equipos de acuicultura (Capítulo 4.3.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Recomendación para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos (Capítulo 4.4.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Obligaciones generales en materia de certificación (Capítulo 5.1.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Plaga del cangrejo de río (<i>Aphanomyces astaci</i>) (Capítulo 9.1.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Infección por el virus de la cabeza amarilla genotipo 1 (Capítulo 9.2.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 9.3.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Mionecrosis infecciosa (Capítulo 9.4.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |

Anexo 31 (cont.)

| Tarea | Septiembre de 2016 | Febrero de 2017 | Sesión General de mayo de 2017 | Septiembre de 2017 |
|--|---|--|----------------------------------|---|
| CÓDIGO ACUÁTICO (cont.) | | | | |
| Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 9.5.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Síndrome de Taura (Capítulo 9.6.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 9.7.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 9.8.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo Capítulo 9.X.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Artículo X.X.8. revisado (texto limpio y texto con cambios) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Desarrollar listas revisadas de especies susceptibles – en todos los capítulos sobre las enfermedades de los peces | Organizar una reunión del grupo <i>ad hoc</i> para iniciar la evaluación de las especies de peces sensibles a las enfermedades de la lista de la OIE. | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> en enero de 2017. Solicitar que el grupo <i>ad hoc</i> continúe con sus tareas. | | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> en abril de 2017 y modificar en consecuencia los capítulos correspondientes del Código Acuático. |
| Desarrollar principios para determinar los períodos de vigilancia que figuran en los capítulos específicos de enfermedad y brindar recomendaciones para las modificaciones del Capítulo 1.4. | Reunir al grupo <i>ad hoc</i> en enero de 2017. Prever una reunión antes de septiembre de 2017. | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> . Solicitar que el grupo <i>ad hoc</i> se reúna antes de septiembre de 2017 para continuar los progresos. | | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> . |
| Nuevo capítulo sobre bioseguridad (4.X.) | Preparar el mandato del grupo <i>ad hoc</i> establecido con vistas a elaborar el texto de este nuevo capítulo. | Reunir al grupo <i>ad hoc</i> antes de septiembre de 2017 | | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> . |

Anexo 31 (cont.)

| Tarea | Septiembre de 2016 | Febrero de 2017 | Sesión General de mayo de 2017 | Septiembre de 2017 |
|---|--|---|----------------------------------|--|
| CÓDIGO ACUÁTICO (cont.) | | | | |
| Revisión de los Capítulos 4.2.–4.4. | | | | Dar la prioridad a estas tareas una vez iniciado el proyecto de nuevo capítulo sobre la bioseguridad. |
| Nuevo capítulo sobre la preparación frente a las situaciones de emergencia | | | | Dar la prioridad a estas tareas una vez iniciado el proyecto de nuevo capítulo sobre la bioseguridad. |
| Armonización entre el Capítulo 5.3. del <i>Código Acuático</i> y la versión revisada del capítulo correspondiente del <i>Código Terrestre</i>) | | | | Actualización con la inclusión en este capítulo de las modificaciones adoptadas en el capítulo correspondiente del <i>Código Terrestre</i> . |
| Revisión del Capítulo 5.4. | | Revisar el capítulo para que se adecúe con el texto que figura en los capítulos que tratan las enfermedades específicas y difundirlo para comentario. | | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. |
| Reemplazar ciertos términos que figuran en el <i>Código Acuático</i> por el término «agente patógeno» | | Implementar de modo progresivo en función de la revisión de los capítulos. | | |
| MANUAL ACUÁTICO | | | | |
| Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo Capítulo 2.2.X.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Plaga del cangrejo de río (<i>Aphanomyces astaci</i>) (Capítulo 2.2.1.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 2.2.3.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Mionecrosis infecciosa (Capítulo 2.2.4.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 2.2.5.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Síndrome de Taura (Capítulo 2.2.6.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |

Anexo 31 (cont.)

| Tarea | Septiembre de 2016 | Febrero de 2017 | Sesión General de mayo de 2017 | Septiembre de 2017 |
|--|--|---|--|---|
| MANUAL ACUÁTICO (cont.) | | | | |
| Enfermedad de la cola blanca (Capítulo 2.2.8.) | Revisar los comentarios de los Países Miembros y difundir el capítulo para comentario. | Revisar los comentarios de los Países Miembros. | Proponer el texto para adopción. | |
| Enfermedad de las manchas blancas (Capítulo 2.2.7.) | Revisar las modificaciones propuestas para el título y el ámbito de aplicación. | Modificar la definición de caso y difundirla para comentario. | | Revisar los comentarios de los Países Miembros. |
| Efectuar la revisión de las listas de especies susceptibles de cada uno de los capítulos dedicados a las enfermedades de los peces | Reunir al grupo <i>ad hoc</i> para iniciar la evaluación de la lista de especies susceptibles de la OIE de los animales acuáticos. | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> (enero de 2017). Solicitar al grupo <i>ad hoc</i> que continúe su labor. | | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> y modificar en consecuencia las partes correspondientes del <i>Manual Acuático</i> . |
| Grupo <i>ad hoc</i> sobre el <i>Manual Acuático</i> | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> . Proponer la organización de otra reunión. | Revisar el informe del grupo <i>ad hoc</i> . Proponer modificaciones de la versión provisoria. | | Revisar la versión final y todos los capítulos objeto de una revisión a partir de este modelo. |
| LABORATORIOS DE REFERENCIA (en colaboración con la Comisión de Normas Biológicas) | | | | |
| Procedimientos operativos normalizados para validar y conservar la designación como laboratorio de referencia | Desarrollar y revisar el proyecto relativo a los procedimientos operativos normalizados. | Finalizar los procedimientos operativos normalizados. | Propuesta de la Comisión de Normas Biológicas para que se adopte el texto. | |
| Centros colaboradores | | Elaborar una clasificación de las posibles diferencias. | | Revisión |
| OTROS TRABAJOS | | | | |
| Documento de orientación para las evaluaciones de nuevas inclusiones | | Desarrollar una guía y difundirla antes de septiembre de 2017. | | Revisión |

© **Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2017**

El presente documento fue preparado por especialistas a solicitud de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Excepto en el caso de su adopción por la Asamblea Mundial de Delegados, lo expresado refleja únicamente las opiniones de dichos especialistas.

Todas las publicaciones de la OIE están protegidas por un Copyright internacional. Se pueden copiar, reproducir, traducir, adaptar o publicar extractos en publicaciones periódicas, documentos, libros o medios electrónicos y en cualquier otro medio destinado al público, con intención informativa, didáctica o comercial, siempre y cuando se obtenga previamente una autorización escrita por parte de la OIE.

Las designaciones y nombres utilizados y la presentación de los datos que figuran en esta publicación no constituyen de ningún modo el reflejo de cualquier opinión por parte de la OIE sobre el estatuto legal de los países, territorios, ciudades o zonas ni de sus autoridades, fronteras o límites territoriales.

La responsabilidad de las opiniones profesadas en los artículos firmados incumbe exclusivamente a sus autores. La mención de empresas particulares o de productos manufacturados, sean o no patentados, no implica de ningún modo que estos se beneficien del apoyo o de la recomendación de la OIE, en comparación con otros similares que no hayan sido mencionados.