

## CAPÍTULO 2.2.8.

# INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LAS MANCHAS BLANCAS

---

## 1. Ámbito de aplicación

La infección por el virus del síndrome de las manchas blanca es una infección por el agente patógeno denominado virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB), que pertenece al género *Whispovirus*, familia *Nimaviridae*.

## 2. Información sobre la enfermedad

### 2.1. Factores del agente

#### 2.1.1. Agente etiológico

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) asignó al VSMB la categoría de único miembro del género *Whispovirus*, dentro de la familia *Nimaviridae*. Los viriones del VSMB tienen forma ovoide o elipsoide a baciliforme, presentan una simetría regular y miden 80–120 nm de diámetro y 250–380 nm de longitud. En un extremo del virión puede observarse una extensión similar a un flagelo (apéndice). El VSMB se ha clasificado en tres posibles grupos: cepas procedentes de Tailandia (WSSV-TH-96-II), cepas procedentes de la India (WSSV-IN-07-I) y otra cepa india (WSSV-IN-06-I). Se especuló que la mayoría de las cepas del VSMB se originaron en el Océano Índico y luego se propagaron por todo el mundo (Zeng, 2021). Hoy en día, aunque se han identificado varias cepas con variabilidad genotípica en función del lugar de origen, todas se clasifican como una sola especie (VSMB) dentro del género *Whispovirus* (Lo et al., 2012; Wang et al., 2019).

#### 2.1.2. Supervivencia y estabilidad en muestras procesadas o conservadas

El agente es viable durante al menos 30 días a 30°C en agua de mar en condiciones de laboratorio (Momoyama et al., 1998); y es viable en estanques durante al menos 3–4 días (Nakano et al., 1998). Las emulaciones de laboratorio de estanques drenables y no drenables sugieren que el virus ya no es infeccioso después de 21 días de secado al sol o después de 40 días en sedimentos de estanques anegados (Satheesh Kumar et al., 2013).

Se encontró que una carga vírica inicial de 1000 viriones del VSMB ml<sup>-1</sup> era viable durante un período de 12 días en agua de mar de 27 ppt de salinidad y un pH de 7,5 a 29–33°C. En sedimento de estanque de camarones (con una carga vírica inicial de 211 500 viriones g<sup>-1</sup>), el virus fue viable e infeccioso hasta 19 días a pesar del secado al sol. En el caso de condiciones no drenables, el VSMB (753 600 copias g<sup>-1</sup>) permaneció infeccioso durante un periodo de 35 días (Satheesh Kumar et al., 2013).

Para los métodos de inactivación, véase la sección 2.4.5.

### 2.2. Factores del hospedador

#### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

De todas las especies que se han analizado hasta la fecha, no se ha notificado ningún crustáceo decápodo (orden *Decapoda*) de origen marino, salobre o de agua dulce que sea resistente a la infección por el VSMB (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo y Kou, 1998; Maeda et al., 2000; Stentiford et al., 2009).

[Nota: aún no ha finalizado la evaluación de las especies que cumplen los criterios para figurar en la lista de especies susceptibles a la infección por el VSMB, de conformidad con el Capítulo 1.5.]

### 2.2.2. Especies con pruebas insuficientes de susceptibilidad

Todos los estadios de la vida son potencialmente susceptibles, desde los huevos hasta los reproductores (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999). Se ha detectado material genético del VSMB en órganos reproductores (Lo *et al.*, 1997), pero no se ha determinado definitivamente la susceptibilidad de los gametos a la infección por el VSMB.

### 2.2.3. Probabilidad de infección por especie, estadio de vida del hospedador, población o subpoblaciones

Los mejores estadios de la vida de los crustáceos para la detección del VSMB son las postlarvas (PL) tardías, los juveniles y los adultos. La probabilidad de detección puede aumentar por la exposición a condiciones estresantes (por ejemplo, ablación del pedúnculo ocular, desove, muda, cambios de salinidad, temperatura o pH, y durante las floraciones de plancton).

### 2.2.4. Distribución del agente patógeno en el hospedador

Los principales tejidos diana del VSMB son de origen embrionario ectodérmico y mesodérmico, especialmente el epitelio cuticular y los tejidos conjuntivos subcuticulares (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Aunque el VSMB infecta el tejido conjuntivo subyacente en el hepatopáncreas y el intestino medio de los crustáceos, las células epiteliales tubulares de estos dos órganos son de origen endodérmico y no se infectan.

### 2.2.5. Animales acuáticos reservorios de la infección

Entre los decápodos salvajes de los que se sabe que son reservorios de la infección por el VSMB figuran *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995), *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., y *Stomatopoda* sp. (Desrina *et al.*, 2022; He & Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002). Estas especies pueden expresar la enfermedad en condiciones ambientales adecuadas. Sin embargo, los crustáceos no decápodos, como los copépodos (Huang *et al.*, 1995), los rotíferos (Yan *et al.*, 2004), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), *Artemia* (Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010) y *Tachyleidue* sp. (He y Zhou, 1996) pueden ser animales portadores aparentemente sanos. Otros moluscos marinos, gusanos poliquetos (Vijayan *et al.*, 2005), así como artrópodos acuáticos no crustáceos como las pizarras de mar (Isopoda), y larvas de insectos *Euphydradae* pueden portar mecánicamente el virus sin signos de infección (Lo y Kou, 1998).

### 2.2.6. Vectores

El copépodo harpacticoide *Nitocra* sp. (Zhang *et al.*, 2008), las microalgas (Liu *et al.*, 2007) y el poliqueto *Dendronereis* spp. (Peters) (Desrina *et al.*, 2013; Haryadi *et al.*, 2015) son vectores del VSMB.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

La infección por el VSMB causa a veces enfermedad clínica (Tsai *et al.*, 1999), dependiendo de factores poco conocidos pero relacionados con la tolerancia de las especies y los desencadenantes ambientales. Con una dosis de infección adecuada que permita un tiempo suficiente antes de la mortalidad, los animales susceptibles a la enfermedad muestran un gran número de viriones circulando en la hemolinfa (Lo *et al.*, 1997), pero esto también puede ocurrir en especies tolerantes que no presentan mortalidad. Así pues, las cargas víricas altas *per se* no causan enfermedad ni mortalidad en todas las especies susceptibles.

### 2.3.1. Mortalidad, morbilidad y prevalencia

Todas las especies de camarones peneidos son muy susceptibles a la infección por el VSMB, lo que a menudo provoca una mortalidad alta. Los cangrejos, los cangrejos de río, los langostinos de agua dulce, las langostas espinosas y las langostas con pinzas son susceptibles a la infección por el VSMB, pero la morbilidad y la mortalidad como consecuencia de la infección son muy variables (Lo y Kou, 1998). Se conocen infecciones de alto nivel con el VSMB en algunos decápodos en ausencia de enfermedad clínica.

La prevalencia de la infección por el VSMB es muy variable, desde <1% en poblaciones salvajes infectadas hasta el 100% en poblaciones de piscifactoría (Lo y Kou, 1998).

### 2.3.2. Signos clínicos, incluidas alteraciones conductuales

Las manchas blancas incrustadas en el exoesqueleto son el signo clínico más observado. En la mayoría de los camarones, estas manchas oscilan entre apenas visibles y 3 mm de diámetro, y a veces se unen formando placas más grandes. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los factores de estrés ambiental, como la alcalinidad alta o ciertas enfermedades bacterianas también pueden causar manchas blancas en el caparazón de los camarones, y que los camarones moribundos con infección por el VSMB pueden tener pocas manchas blancas, si es que tienen alguna. Por lo tanto, la aparición de manchas blancas no es un signo diagnóstico fiable de infección por el VSMB. En las poblaciones enfermas se observan grandes variaciones de color, con predominio de camarones de color rojizo o rosado.

Las infecciones por el VSMB pueden ser subclínicas o manifestarse como enfermedad clínica. Los camarones peneidos en acuicultura mostrarán generalmente signos clínicos asociados a una morbilidad y mortalidad altas. Algunos animales pueden morir sin mostrar signos clínicos. Las especies no peneidas (por ejemplo, el cangrejo o la langosta) generalmente presentan infecciones subclínicas en condiciones naturales.

Los animales afectados pueden presentar letargo, disminución o ausencia de consumo de alimento y comportamiento natatorio anormal - nado lento, nado de lado, nado cerca de la superficie del agua y agrupamiento alrededor de los bordes de las unidades de cría (Corbel *et al.*, 2001; Sahul Hameed *et al.*, 1998; 2001). Cabe esperar una tasa de mortalidad muy alta en la población de camarones a los pocos días de la aparición de los signos conductuales.

### 2.3.3 Lesiones macroscópicas

Además de los signos clínicos y conductuales de la sección 2.3.2., se han descrito las siguientes lesiones macroscópicas en camarones penaeidos con signos clínicos: aflojamiento de la unión del caparazón con el epitelio cuticular subyacente (Sánchez-Paz, 2010), de modo que el caparazón se puede quitar fácilmente (Zhan *et al.*, 1998); tracto gastrointestinal vacío debido a la anorexia (Escobedo-Bonilla, 2008); retraso en la coagulación de la hemolinfa (Heidarieh *et al.*, 2013); incrustación excesiva de las branquias (Wu *et al.*, 2013) y el exoesqueleto.

### 2.3.4. Mecanismos de transmisión y ciclo de vida

La infección por el VSMB puede transmitirse horizontalmente por ingesta de tejidos infectados (por ejemplo, canibalismo, depredación, fómites, etc.), por vías acuáticas y por otras vías de transmisión (por ejemplo, a través de aves marinas, desplazamientos antropogénicos, alimentación, rotíferos, copépodos, etc.) (Haryadi *et al.*, 2015; Vanpatten *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; 2008). La transmisión del VSMB puede producirse a partir de animales aparentemente sanos en ausencia de enfermedad. Los animales muertos y moribundos pueden ser una fuente de transmisión de la enfermedad (Lo y Kou, 1998). Las microalgas podrían servir como posible vía de transmisión horizontal del VSMB (Liu *et al.*, 2007).

No se ha demostrado una verdadera transmisión vertical (intraóvulo) del VSMB a la progenie.

Estudios *in vitro* con cultivos celulares primarios y estudios *in vivo* con postlarvas muestran que el ciclo de replicación dura aproximadamente 20 horas a 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

### 2.3.5. Factores medioambientales

Los brotes de la enfermedad pueden ser inducidos por factores de estrés, como los cambios rápidos de salinidad. La temperatura del agua tiene un profundo efecto en la expresión de la enfermedad, siendo las temperaturas medias del agua de entre 18 y 30°C las que favorecen los brotes del VSMB (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001). En condiciones experimentales de desafío, la mortalidad inducida por el VSMB en los camarones se reduce cuando la temperatura aumenta por encima de 32°C (Vidal *et al.*, 2001).

### 2.3.6. Distribución geográfica

La infección por el VSMB se ha identificado en crustáceos de Asia, el Mediterráneo (Stentiford y Lightner, 2011), Oriente Medio, Oceanía (Moody *et al.*, 2022) y América. Se conocen zonas y compartimentos libres de infección por el VSMB dentro de estas regiones (Lo *et al.*, 2012).

Véase WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) para información reciente sobre la distribución a nivel de cada país.

## 2.4. Estrategias de bioseguridad y de control de la enfermedad

### 2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método de vacunación eficaz contra la infección por el VSMB.

### 2.4.2. Quimioterapia, incluidos agentes bloqueantes

No existe ningún método publicado y validado.

### 2.4.3. Inmunoestimulación

Varios informes han descrito que el betaglucano, la vitamina C, los extractos de algas marinas (fucoidan) y otros inmunoestimulantes pueden mejorar la resistencia a la infección por el VSMB (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

### 2.4.4. Cría de cepas resistentes

Se han registrado avances en la mejora genética de *P. vannamei* para aumentar su resistencia a las infecciones por el VSMB. (Cuellar-Anjel *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

### 2.4.5. Métodos de inactivación

Método	Tratamiento	Referencia
Calor	55°C/90 min 70°C/5 min	Chang <i>et al.</i> , 1998
	50°C/60 min 60°C/1 min 70°C/0.2 min	Nakano <i>et al.</i> , 1998
pH	pH 3/60 min pH 12/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
UV	$9,30 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Ozono	$0,5 \mu\text{g ml}^{-1}/10 \text{ min}$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Cloro	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
Iodóforos	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998

### 2.4.6. Desinfección de huevos y larvas

Para la transmisión transovárica, es probable que la desinfección del huevo sea eficaz (Lo y Kou, 1998), pero esto aún no se ha confirmado mediante ensayos científicos formales.

### 2.4.7. Prácticas generales de manejo

Las prácticas de manejo en las zonas endémicas consisten principalmente en excluir el virus del síndrome de las manchas blancas de las poblaciones de producción o evitar los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad clínica. Algunos ejemplos son evitar la cría en la estación fría, el uso de reservas de inóculos de siembra libres de patógenos específicos (SPF) o negativos para el VSMB según la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o el uso de agua y sistemas de cultivo bioseguros

(Withyachumnarnkul, 1999). Se ha propuesto el policultivo de camarones y peces para reducir la transmisión del virus en poblaciones infectadas (Wang *et al.*, 2021).

### **3. Elección de ejemplares y obtención, transporte y manipulación de las muestras**

Esta sección se basa en la información de las secciones 2.2, 2.3 y 2.4 para identificar las poblaciones, los ejemplares y las muestras que tienen más probabilidades de estar infectados

#### **3.1. Elección de poblaciones y de ejemplares**

Para la detección del VSMB, deberán obtenerse muestras de camarones moribundos o que presenten signos clínicos o alteraciones conductuales (secciones 2.3).

#### **3.2. Elección de órganos o tejidos**

El análisis del tropismo tisular tanto de camarones infectados experimentalmente como de reproductores en libertad y capturados muestra que los tejidos procedentes del ectodermo y el mesodermo, especialmente el epitelio cuticular y los tejidos conjuntivos subcuticulares, así como otros tejidos diana (por ejemplo, la glándula antenal, el órgano hematopoyético, etc.), son los principales tejidos diana para la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas. Se recomienda tomar muestras de los pleópodos, las branquias, la hemolinfa, el estómago o el músculo abdominal (Lo *et al.*, 1997).

#### **3.3. Muestras o tejidos que no son adecuados para la detección del agente patógeno**

Aunque el VSMB infecta el tejido conjuntivo subyacente en el hepatopáncreas y el intestino medio del camarón, las células epiteliales columnares de estos dos órganos son de origen embrionario endodérmico (Lo *et al.*, 1997) y no son tejidos apropiados para la detección. El ojo compuesto puede contener un inhibidor de la PCR (Lo *et al.*, 1997) y, por lo tanto, no es adecuado para el diagnóstico mediante PCR.

#### **3.4. Muestreo no letal**

Las branquias, la hemolinfa o el pleópodo son tejidos adecuados para el muestreo no letal y el cribado mediante PCR.

Si los tipos de muestras de tejidos no letales difieren de los tejidos recomendados (véase la sección 3.2.) o de las muestras de tejidos utilizadas en los estudios de validación, deberá tenerse en cuenta el efecto sobre el rendimiento del diagnóstico.

#### **3.5. Conservación de muestras para el envío**

Para información sobre los métodos de conservación de las muestras destinadas a las pruebas previstas, véase el capítulo 2.2.0 *Información general* (enfermedades de los crustáceos).

##### **3.5.1. Muestras para el aislamiento del agente patógeno**

Los resultados del bioensayo dependen en gran medida de la calidad de las muestras (tiempo transcurrido desde su obtención y tiempo de conservación). Las muestras frescas deben conservarse en hielo y, preferiblemente, enviarse al laboratorio en las 24 horas siguientes a su obtención. Para evitar la degradación de las muestras, deben emplearse métodos de conservación alternativos sólo previa consulta con el laboratorio receptor.

##### **3.5.2. Conservación de las muestras para la detección molecular**

Las muestras de tejido para PCR deben conservarse en etanol de grado analítico/regenerativo (no desnaturalizado) al 90% (v/v). La proporción recomendada de etanol respecto a tejido es de 10:1 según estudios en animales terrestres y de salud humana. No se recomienda el uso de etanol de grado inferior (de laboratorio o industrial). Si el material no puede fijarse, puede congelarse.

En la sección B.5.5. del capítulo 2.2.0 *Información general* (enfermedades de los crustáceos) figuran métodos normalizados de obtención, conservación y procesamiento de muestras para técnicas histológicas.

### 3.5.3. Muestras para histopatología, inmunohistoquímica o hibridación *in-situ*

Los métodos normalizados de obtención, conservación y procesamiento de muestras para las técnicas histológicas pueden consultarse en el Capítulo 2.2.0 *Información general* (enfermedades de los crustáceos).

### 3.5.4. Muestras para otras pruebas

No es aplicable.

## 3.6. Combinación de varias muestras

La combinación de muestras de más de un animal individual para un fin determinado sólo debe recomendarse cuando se hayan obtenido datos de apoyo sólidos sobre la sensibilidad y la especificidad diagnósticas y se hayan considerado adecuados. No se ha evaluado a fondo el efecto de la agrupación en la sensibilidad diagnóstica, por lo que los ejemplares de mayor tamaño deben procesarse y analizarse individualmente. Los estadios de vida pequeños pueden combinarse para obtener la cantidad mínima de material para el aislamiento del virus o la detección molecular.

## 4. Métodos de diagnóstico

Los métodos actualmente existentes para la detección de agentes patógenos que pueden utilizarse en i) la vigilancia de animales aparentemente sanos, ii) el diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos y iii) con fines de diagnóstico confirmativo se enumeran en la Tabla 4.1. por estadio de vida del animal.

**Calificaciones para cada finalidad de uso.** Para cada ensayo recomendado se proporciona una calificación cualitativa para cada finalidad de uso. Las calificaciones se determinan en función de múltiples factores de rendimiento y operacionales pertinentes para la aplicación de un ensayo para una finalidad definida. Estos factores son: si las características de rendimiento diagnóstico son apropiadas, el nivel de validación del ensayo, la disponibilidad, el coste, la lo que se tarda en obtener los resultados y el rendimiento y operatividad de la muestra. Para una finalidad de uso definida, los ensayos se clasifican como:

Clave:

+++ =	Métodos más adecuados, con características deseables de rendimiento y operatividad.
++ =	Métodos adecuados, con un rendimiento y unas características operativas aceptables en la mayoría de las circunstancias.
+ =	Métodos adecuados, pero con un rendimiento o unas características operativas que pueden limitar la aplicación en algunas circunstancias.
Casillas sombreadas =	Métodos no adecuados para esta finalidad.

**Etapas de validación.** La etapa de validación corresponde al proceso de desarrollo y validación de ensayos del Capítulo 1.1.2. La etapa de validación es específica para cada finalidad de uso. Cuando se dispone de ella, en la Sección 6.3 se ofrece información sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados.

Los Laboratorios de Referencia de la OMSA agradecen todo posible comentario sobre el rendimiento diagnóstico de los ensayos recomendados, en particular las PCR. Son de especial interés los factores que afectan a la sensibilidad esperada (por ejemplo, componentes tisulares que inhiben la amplificación) o a la especificidad esperada (por ejemplo, no detección de genotipos particulares o detección de secuencias homólogas dentro del genoma del hospedador) de un ensayo. Estas cuestiones deberán comunicarse a los Laboratorios de Referencia de la OMSA para que se pueda asesorar a los laboratorios de diagnóstico y modificar las normas en caso necesario.

**Tabla 4.1. Métodos de diagnóstico recomendados por la OMSA y su nivel de validación para la vigilancia de animales aparentemente sanos y la investigación de animales con signos clínicos**

Método	A. Vigilancia de animales aparentemente sanos				B. Diagnóstico preliminar de animales con signos clínicos				C. Diagnóstico confirmativo <sup>1</sup> de un resultado sospechoso en la vigilancia o de un diagnóstico preliminar			
	Estadios de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV	Estadios de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV	Estadios de vida tempranos <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adultos	NV
Preparaciones húmedas												
Histopatología					+	+	+	1				
Cultivo celular												
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4
PCR convencional	++	++	++	2	++	++	++	2				
PCR convencional seguida de secuenciación del amplicón									+++	+++	+++	2
Hibridación <i>in-situ</i>					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioensayo					+	+	+	1				
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1	+	+	+	1
Ac-ELISA					+	+	+	1				
Ag-ELISA					+	+	+	1				
Otros métodos de detección de antígeno					+	+	+	1				
Otros métodos												

NV = nivel de validación, hace referencia a la fase de validación del Proceso de la OMSA (capítulo 1.1.2); NA = no disponible; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle; Ac-ELISA o Ag-ELISA = enzimoimmunoanálisis de detección de anticuerpo o de detección de antígeno, respectivamente; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta. <sup>1</sup>En el caso de los diagnósticos confirmativos, deben combinarse varios métodos (véase la Sección 6). <sup>2</sup>La susceptibilidad de estadios de vida tempranos y juveniles se describe en la Sección 2.2.3. El sombreado indica que la prueba es inadecuada o que no debe utilizarse para esta finalidad.

#### 4.1. Preparaciones húmedas

Demostración de núcleos hipertrofiados en preparaciones por aplastamiento de branquias y/o epitelio cuticular, que pueden estar teñidas o sin teñir.

##### *Tinción T-E*

Se puede preparar una solución de tinción T-E a partir de azul Trypan al 0,6%, Eosina Y 0,2%, NaCl al 0,5%, fenol al 0,5% y glicerol al 20% (Huang y Yu, 1995) y utilizarla de la siguiente manera:

- i) Colocar un trozo de tejido enfermo (por ejemplo, un trozo de epitelio branquial o estomacal sin la cutícula) en un portaobjetos y picarlo con un bisturí.
- ii) Añadir 1–2 gotas de la solución de tinción T-E al tejido picado, mezclar y dejar teñir durante 3–5 minutos.
- iii) Colocar un cubreobjetos sobre el tejido teñido y cubrirlo con varios trozos de papel absorbente. Utilizar un pulgar para aplastar el picado y formar una sola capa de células.

Si la muestra se ha tomado de un camarón muy infectado, pueden observarse núcleos hipertrofiados y cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos o vacuolados mediante microscopía óptica (400–1000× aumentos).

#### 4.2. Histopatología y citopatología

##### *Frotis*

Demostración de agregados de viriones del VSMB en preparaciones de tipo frotis de hemolinfa sin teñir mediante microscopía de campo oscuro.

NOTA: Esta es la más sencilla de las técnicas microscópicas y se recomienda para las personas con poca experiencia en el diagnóstico de la infección por el VSMB. Los agregados aparecen como pequeñas manchas reflectantes de 0,5 µm de diámetro. (Momoyama *et al.*, 1995).

##### *Cortes fijados*

Las alteraciones histológicas que se suelen observar en las especies susceptibles son: núcleos hipertrofiados con material cromatínico marginado en las células infectadas por el virus; inclusiones víricas intranucleares teñidas de color eosinófilo a basófilo pálido (con tinción de hematoxilina y eosina) dentro de los núcleos hipertrofiados, y necrosis multifocal asociada a núcleos picnóticos y cariorrequeéticos en los tejidos afectados de origen ectodérmico y mesodérmico. La infección por el virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, otro virus de ADN, produce inclusiones similares que deben diferenciarse de las ocasionadas por el VSMB.

#### 4.3. Cultivo celular para el aislamiento

El VSMB puede aislarse a partir de cultivos primarios de células linfoides u ováricas. Sin embargo, NO se recomienda utilizar el cultivo celular como método de aislamiento habitual debido a: 1) el alto riesgo de contaminación, y, 2) la composición del medio varía en función del tipo de tejido, la especie hospedadora y el propósito experimental; es decir, hasta la fecha no existe un medio estándar o reconocido que pueda recomendarse. Como el cultivo celular primario es tan difícil de iniciar y mantener con fines de aislamiento del virus, el bioensayo debería ser el medio principal para la propagación del virus.

#### 4.4. Amplificación de ácido nucleico

Las PCR deben realizarse siempre con los controles especificados en la Sección 5.5 *Uso de técnicas moleculares y basadas en anticuerpos para pruebas de confirmación y diagnóstico* del Capítulo 2.2.0 *Información general* (enfermedades de los crustáceos). Cada muestra deberá analizarse por duplicado.



*Extracción de ácido nucleico*

Se pueden utilizar diferentes kits y procedimientos para la extracción de ácido nucleico. La calidad y la concentración del ácido nucleico extraído son importantes y pueden comprobarse mediante un método adecuado a las circunstancias:

**4.4.1. PCR en tiempo real**

Los métodos de PCR en tiempo real descritos por Durand y Lightner (2002) y Sritunyalucksana *et al.* (2006) se describen aquí modificados y validados por Moody *et al.*, (2022).

Agente patógeno/diana	Cebador/sonda (5'-3')	Concentración	Parámetros de ciclo
Método 1: Durand y Lightner, 2002 <sup>1</sup> ; N.º acceso a GenBank: NC_003225			
VSMB/ Proteína de la cápsida	Dir WSS1011F: TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG Inv WSS1079R: GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A Sonda: 6FAM-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-TAMRA	900 nM 900 nM 250 nM	50°C/2 min, 95°C/10 min, después 45 ciclos de: 94°C/15 seg. y 60°C/1 min
Método 2: Sritunyalucksana, 2006 <sup>1</sup> ; N.º acceso a GenBank: AF440570			
VSMB/ Proteína de la cápsida	Dir CSIRO WSSV-F: CCG-ACG-CCA-AGG-GAA-CT Inv CSIRO WSSV-R: TTC-AGA-TTC-GTT-ACC-GTT-TCC-A Sonda: 6FAM-CGC-TTC-AGC-CAT-GCC-AGC-CG-TAMRA	900 nM 900 nM 250 nM	50°C/2 min, 95°C/10 min, después 45 ciclos de: 94°C/15 seg. y 60°C/1 min

<sup>1</sup>El método aquí descrito ha sido modificado y validado por Moody *et al.*, 2022

**4.4.2. PCR convencional**

Agente patógeno/diana	Cebador (5'-3')	Concentración	Parámetros de ciclo
Método 1: Lo <i>et al.</i> , 1996a N.º acceso a GenBank: AF440570; tamaño del amplicón: 1447/941 pb			
VSMB	Primario Dir 146F1: ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG Inv 146R1: TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A	100 pmol 100 pmol	39 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min
	Anidado Dir 146F2: GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A Inv 146R2: TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG	100 pmol 100 pmol	39 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min

Se comercializan kits de PCR. Consulte el registro de la OMSA para saber qué kits han sido certificados por la OMSA (<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/>).

**4.4.3. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)**

El protocolo aquí descrito procede de Kono *et al.* (2004). El método LAMP es sensible y rápido, y amplifica los ácidos nucleicos diana en condiciones isotérmicas, por lo que no necesita ninguna máquina sofisticada para el termociclado.

#### Extracción de ADN

La extracción de ADN puede realizarse según el protocolo descrito en la sección 4.4.2 PCR convencional o mediante otros métodos adecuados o kits comerciales.

#### Reacción LAMP

- i) Añadir ADN a un tubo para preparar una mezcla de reacción de 25 µl (Tris/HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 8 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM, 0,1% Tween 20, Betaína 0,8M, cada dNTP a 1,4 mM, 40 pmol de cebadores FIP y BIP para el VSMB, 5 pmol de cebadores F3 y B3 para el VSMB).
- ii) Las secuencias de cebadores son: FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC-GCA-CCA-ATC-TGT-G-3'; BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3'; F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3'; y B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
- iii) Calentar la mezcla a 50°C durante 5 minutos y a 95°C durante 5 minutos, enfriar en hielo y añadir 1 µl (8 U) de ADN polimerasa *Bst*.
- iv) Incubar la mezcla a 65°C durante 60 minutos y, a continuación, terminar la reacción a 80°C durante 10 minutos.
- v) Para visualizarlos, someter a electroforesis 2 µl de los productos de la reacción LAMP en geles de agarosa al 2% que contengan bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg ml<sup>-1</sup>. Esta reacción produce productos de la LAMP específicos del VSMB con múltiples bandas de varios tamaños desde aproximadamente 200 pb hasta el pocillo de carga.

Los kits comerciales de LAMP fiables pueden ser una alternativa para el diagnóstico del VSMB.

### 4.5. Secuenciación del amplicón

Debe verificarse el tamaño del amplicón de la PCR, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de agarosa. Las dos cadenas de ADN del producto de la PCR deben secuenciarse y analizarse para compararlas con las secuencias de referencia.

### 4.6. Hibridación *in-situ*

El uso de sondas de ADN específicas del VSMB con cortes histológicos es útil para demostrar la presencia de ácido nucleico del VSMB en células infectadas (Nunan y Lightner, 1997). Véanse los comentarios generales sobre la hibridación *in situ* en la sección 5.5.4 del Capítulo 2.2.0.

### 4.7. Inmunohistoquímica

Véase la sección 4.9.

### 4.8. Bioensayo

Si se dispone de camarones SPF, el método de bioensayo basado en Nunan *et al.* (1998) y Durand *et al.* (2000) es adecuado para el diagnóstico del VSMB.

### 4.9. Métodos de detección de antígeno

Para detectar el VSMB, se han utilizado anticuerpos policlonales y monoclonales creados contra el virus o contra una proteína estructural del virus recombinante en varios ensayos inmunológicos, como la inmunoelectrotransferencia, el ensayo inmunodot, la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), la inmunohistoquímica (IHC) o el ensayo inmunoenzimático (ELISA). (Huang *et al.*, 1995; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004).

### 4.10. Otros métodos

Se comercializan pruebas de flujo lateral, pero es necesario evaluar su rendimiento antes de recomendarlas.

## 5. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia destinada a demostrar ausencia de la infección en poblaciones aparentemente sanas

La PCR en tiempo real es la prueba recomendada para la vigilancia con el fin de demostrar la ausencia de infección por el VSMB en poblaciones aparentemente sanas, tal como se describe en la sección 4.4.1.

## 6. Criterios de diagnóstico confirmativo

Esta sección sólo aborda los resultados de las pruebas de diagnóstico para la detección de la infección en ausencia (Sección 6.1.) o en presencia de signos clínicos (Sección 6.2.), pero no evalúa si el agente infeccioso es la causa del episodio clínico.

Las definiciones de caso sospechoso y de caso confirmado se han creado para respaldar la toma de decisiones relacionadas con el comercio y la confirmación del estatus sanitario a nivel de país, zona o compartimento. Las definiciones de caso para la confirmación de la enfermedad en zonas afectadas endémicamente pueden ser menos estrictas. Si una Autoridad Competente no está en condiciones de realizar las pruebas de diagnóstico necesarias, deberá pedir asesoramiento al Laboratorio de Referencia de la OMSA apropiado y, si es necesario, remitir muestras a dicho laboratorio para que realice pruebas de confirmación de las muestras del caso índice en un país, una zona o un compartimento considerado libre de la enfermedad.

### 6.1. Animales aparentemente sanos o que no se sabe si están infectados<sup>1</sup>

Las poblaciones aparentemente sanas pueden caer bajo sospecha, y por lo tanto ser objeto de muestreo, si existe(n) un vínculo epidemiológico con una población infectada. La proximidad hidrográfica a una población infectada o el desplazamiento de animales o productos de origen animal o equipos, etc., desde una población infectada conocida equivalen a un vínculo epidemiológico. Como alternativa, se toman muestras de poblaciones sanas en estudios destinados a demostrar la ausencia de enfermedad.

#### 6.1.1. Definición de caso sospechoso en poblaciones aparentemente sanas

Se sospechará la presencia de infección por VSMB si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Positivo en una PCR convencional
- ii) Positivo en una PCR en tiempo real
- iii) Positivo en una prueba LAMP

#### 6.1.2. Definición de caso confirmado en poblaciones aparentemente sanas

La presencia de infección por VSMB se considera confirmada si se cumplen uno o varios de los siguientes criterios:

- i) Positivo en PCR en tiempo real y PCR convencional seguidos de secuenciación del amplicón
- ii) Positivo en LAMP y PCR convencional seguidos de secuenciación del amplicón

### 6.2 Animales con signos clínicos

Los signos clínicos no son patognomónicos de una única enfermedad; sin embargo, pueden reducir el abanico de posibles diagnósticos.

---

<sup>1</sup> Por ejemplo, instalaciones transfronterizas.

### 6.2.1. Definición de caso sospechoso en animales con signos clínicos

Se sospechará la presencia de infección por VSMB si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) Lesiones macroscópicas o signos clínicos compatibles con la enfermedad descrita en el presente capítulo, con o sin mortalidad alta
- ii) Histopatología compatible con la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas
- iii) Resultado positivo en la PCR convencional
- iv) Resultado positivo por PCR en tiempo real
- v) Resultado positivo por el método LAMP
- vi) Resultado positivo por hibridación *in situ*

### 6.2.2. Definición de caso confirmado en animales con signos clínicos

La presencia de infección por el virus del síndrome de las manchas blancas se considera confirmada si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) Resultados positivos en PCR en tiempo real y PCR convencional seguidos de secuenciación de amplicones
- ii) Resultados positivos en LAMP y PCR convencional seguidos de secuenciación de amplicones
- iii) Resultados positivos por hibridación *in situ* y detección del virus del síndrome de las manchas blancas por PCR en tiempo real
- iv) Resultados positivos por hibridación *in situ* y detección del virus del síndrome de las manchas blancas por PCR convencional seguida de secuenciación de amplicones

## 6.3. Sensibilidad y especificidad diagnóstica de las prueba de diagnóstico

En las Tablas de los apartados 6.3.1. y 6.3.2. figuran los resultados de diagnóstico de las pruebas recomendadas para la vigilancia o el diagnóstico de la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas. No obstante, cabe señalar que el rendimiento diagnóstico es específico de las circunstancias de cada estudio de precisión diagnóstica (incluida la finalidad de la prueba, la población de origen, los tipos de muestras de tejidos y las especies hospedadoras) y puede variar según las condiciones. Solo se presentan datos cuando las pruebas han sido validadas al menos en el nivel 2 del proceso de validación descrito en el Capítulo 1.1.2. y se dispone de información de los estudios de precisión diagnóstica publicados.

### 6.3.1. Para el diagnóstico preliminar en animales con signos clínicos

Tipo de prueba	Finalidad de la prueba	Poblaciones de origen	Tipos de tejidos o muestras	Especies	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita bibliográfica
Real-time PCR (Durand y Lightner, 2002)	Diagnóstico	Camarones de piscifactoría con signos clínicos	Branquias, pleópodo	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	PCR en tiempo real	Moody et al., 2022
PCR en tiempo real (Sritunyalucksana et al., 2006)	Diagnóstico	Camarones de piscifactoría con signos clínicos	Branquias, pleópodo	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	PCR en tiempo real	Moody et al., 2022

DSe = sensibilidad diagnóstica, DSp = especificidad diagnóstica, n = número de muestras utilizadas en el estudio, PCR: = reacción en cadena de la polimerasa.

\*La PCR anidada (Lo et al., 1996a) se ha relacionado con falsos negativos respecto al VSMB cuando se utiliza para analizar especies de *Cherax quadricarinatus* (Claydon et al., 2004).

**6.3.2. Para la vigilancia de animales aparentemente sanos**

Tipo de prueba	Finalidad de la prueba	Poblaciones de origen	Tipos de tejidos o muestras	Especies	DSe (n)	DSp (n)	Prueba de referencia	Cita bibliográfica
PCR en tiempo real (Durand y Lightner, 2002)	Vigilancia en animales aparentemente sanos	Poblaciones salvajes de crustáceos	Branquias, pleópodo	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	76,8% (n=1591)	99,7% (n=1591)	Análisis bayesiano de clases latentes	Moody et al., 2022
PCR en tiempo real (Sritunyalucksana et al., 2006)	Vigilancia en animales aparentemente sanos	Poblaciones salvajes de crustáceos	Branquias, pleópodo	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	82,9% (n=1591)	99,7% (n=1591)	Análisis bayesiano de clases latentes	Moody et al., 2022
Dos métodos de PCR en tiempo real en paralelo (Sritunyalucksana et al., 2006 y Durand y Lightner, 2002)	Vigilancia en animales aparentemente sanos	Poblaciones salvajes de crustáceos	Branquias, pleópodo	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	98,3% (n=1591)	99,4% (n=1591)	Análisis bayesiano de clases latentes	Moody et al., 2022

DSe = sensibilidad diagnóstica, DSp = especificidad diagnóstica, n = número de muestras utilizadas en el estudio, PCR: = reacción en cadena de la polimerasa.

**7. Bibliografía**

- BALASUBRAMANIAN G., SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *J. Fish Dis.*, **29**, 569–572.
- CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary  $\beta$ -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., CHEN H.C. & WANG Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233–242.
- 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* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.
- CHANG Y., CHEN T., LIU W., HWANG J. & LO C. (2011). Assessment of the roles of copepod *Apocyclops royi* and bivalve mollusk *Meretrix lusoria* in white spot syndrome virus transmission. *Mar. Biotechnol.*, **13**, 909–917.
- 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.
- CHEN W.Y., ZHANG H., GU L., LI F. & YANG F. (2012). Effects of high salinity, high temperature and pH on capsid structure of white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.*, **101**, 167–171.
- 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.

- CORBEL V., ZUPRIZAL Z., SHI C., HUANG, SUMARTONO, ARCIER J.-M. & BONAMI J.-R. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377–382.
- CUELLAR-ANJEL J., WHITE-NOBLE B., SCHOFIELD P., CHAMORRO R. & LIGHTNER D.V. (2012). Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, **368–369**, 36–39.
- DESRINA, PRAYITNO S.B., VERDEGEM M.C.J., VERRETH J.A.J. & VLAK J.M. (2022). White spot syndrome virus host range and impact on transmission. *Rev. Aquacult.*, 1–18.
- DESRINA, VERRETH J.A.J., PRAYITNO S.B., ROMBOUT J.H.W.M., VLAK J.M. & VERDEGEM M.C.J. (2013). Replication of white spot syndrome virus (WSSV) in the polychaete *Dendronereis* spp. *J. Invertebr. Pathol.*, **114**, 7–10.
- 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.
- EAST I.J. (2008). Addressing the problems of using the polymerase chain reaction technique as a stand-alone test for detecting pathogens in aquatic animals. *Sci. Tech. Rev.*, **27**, 829–837.
- ESCOBEDO-BONILLA C. M., ALDAY-SANZ V., WILLE M., SORGELOOS P., PENZAERT M.B. & NAUWYNCK H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.*, **31**, 1–18.
- FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.
- HASSON K.W., FAN Y., REISINGER T., VENUTI J. & VARNER P.W. (2006). White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas fresh water systems through imported, frozen bait-shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 91–100.
- HARYADI D., VERRETH J.A.J., VERDEGEM M.C.J. & VLAK J.M. (2015). Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from *Dendronereis* spp. (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. *J. Fish Dis.*, **38**, 419–428.
- HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.
- HEIDARIEH M., SOLTANI M., MOTAMEDI SEDEH F. & SHEIKHZADEH N. (2013). Low water temperature retards white spot syndrome virus replication in *Astacus leptodactylus* Crayfish. *Acta Sci. Vet.*, **41**, 1–6.
- 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. (1995). 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.
- HUANG Y., YIN Z., WENG S., HE J. & LI S. (2012). Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, **364–365**, 111–117.
- 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.
- LI Q., ZHANG J.H., CHEN Y.J. & YANG F. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 261–264.

- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- LIU B., YU Z.M., SONG X.X. & GUAN Y.Q. (2007). Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebr. Pathol.*, **95**, 87–92.
- 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, 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.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of White Spot Syndrome virus and Yellow head virus in prawns imported into Australia. *Australian Vet. J.*, **82**, 69–74.
- 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.
- MOODY N.J.G., MOHR P.G., WILLIAMS L.M., CUMMINS D.M., HOAD J., SLATER J., VALDETER S.T., COLLING A., SINGANALLUR N.B., GARDNER I.A., GUDKOV N. & CRANE M.St.J. (2022). Performance characteristics of two real-time, TaqMan polymerase chain reaction assays for the detection of WSSV in clinically diseased and apparently health prawns. *Dis. Aquat. Org.*, <https://www.int-res.com/prepress/d03687.html>.
- 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.
- SAHUL HAMEED A.S., ANILKUMAR M., STEPHEN RAJ M.L. & JAYARAMAN K. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, **160**, 31–45.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SATHISH S., RASHEED M., MURUGAN V. & JAYARAMAN K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, **201**, 179–186.
- SANCHEZ-PAZ A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, **41**, 43.
- SATHEESH KUMAR S., ANANDA BHARATHI R., RAJAN J.J.S., ALAVANDI S.V., POORNIMA M., BALASUBRAMANIAN C.P. & PONNIAH A.G. (2013). Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture*, **402–403**, 119–126.
- SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA 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.
- SRITUNYALUCKSANA K., SRISALA J., MCCOLL K., NIELSEN L. & FLEGEL T.W. (2006). Comparison of PCR methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **255**, 95–104.
- 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.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Sea birds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- 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.
- 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 SEKHAR 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.
- WANG H.C., HIRONO I, MANINGAS M.B.B., SOMBOONWIWA K., STENTIFORD G. & ICTV REPORT CONSORTIUM. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: The ICTV 10<sup>th</sup> Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature*. The ICTV website ([www.ictv.global/report/nimaviridae](http://www.ictv.global/report/nimaviridae)).



WANG M., CHEN Y., ZHAO Z., WENG S., YANG J., LIU S., LIU C., YUAN F., AI B., ZHANG H., ZHANG M., LU L., YUAN K., YU Z., MO B., LIU X., GAI C., LI Y., LU R., ZHONG Z., ZHENG L., FENG G., LI S.C. & HE J. (2021). A convenient polyculture system that controls a shrimp viral disease with a high transmission rate. *Commun Biol.*, **4**, 1276.

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.

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.

WU J.L., SUZUKI K., ARIMOTO M., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (2002). Preparation of an Inoculum of White Spot Syndrome Virus for Challenge Tests in *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **37**, 65–69.

WU W., WU B., YE T., HUANG H., DAI C., YUAN J. & WANG W. (2013). TCTP is a critical factor in shrimp immune response to virus infection. *PLoS One*, **8**, e74460.

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.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J. & ZHANG J.S. (2007). White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J. Invertebr. Pathol.*, **94**, 144–148.

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.

ZENG Y. (2021). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus in the world. *Aquaculture*, **537**, 736509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736509>.

ZHAN W.B., WANG Y.H., FRYER J.L., YU K.K., FUKUDA H. & MENG Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 405–410.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L., CAO Y.C. & LI Z.J., YAN D.C. (2010). Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Vet. Res. Commun.*, **34**, 25–32.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L. & HOU C.Q. (2008). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *J. Invertebrate Pathol.*, **97**, 33–39.

ZHANG J.S., DONG S.L., TIAN X.L., DONG Y.W., LIU X.Y. & YAN D.C. (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, **261**, 1181–1185.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la infección por el virus del síndrome de las manchas blancas (consultese la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Para más información sobre el virus del síndrome de las manchas blancas, por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OMSA.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1997 COMO ENFERMEDAD DE LAS MANCHAS BLANCAS. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.