

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA CABEZA AMARILLA GENOTIPO 1

1. Ámbito de aplicación

La expresión infección por el genotipo 1 del virus de la cabeza amarilla indica la enfermedad causada por el agente patógeno genotipo 1 del virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (VECA1), que pertenece al género *Okavirus* y a la Familia *Roniviridae*.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

El genotipo 1 del virus de la enfermedad de la cabeza amarilla (VECA1) es uno de los ocho genotipos conocidos del complejo del virus de la cabeza amarilla y es el único agente causal conocido de la enfermedad de la cabeza amarilla. El VECA 1 y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla están formalmente clasificados por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus) como especies únicas (*virus asociado a las branquias*) del género *Okavirus*, que pertenece a la Familia *Roniviridae*, Orden *Nidovirales* (Cowley *et al.*, 2012). El genotipo 2 del virus de la cabeza amarilla suele denominarse virus asociado a las branquias (VAB). Cuatro genotipos del complejo (los genotipos 3–6) se presentan con frecuencia en *Penaeus monodon* sanos del este de África, de Asia y de Australia, y casi nunca o nunca se asocian a enfermedad (Walker *et al.*, 2001, Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). Recientemente, se han documentado dos nuevos genotipos del complejo del VECA, uno denominado VECA7, que se detectó en *P. monodon* de Australia (Mohr *et al.*, 2015), y otro, un octavo genotipo, que se detectó en *Penaeus chinensis* sospechoso de sufrir necrosis hepatopancreática aguda (Liu *et al.*, 2014). Existen indicios de la existencia de recombinación genética entre genotipos (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

El VECA1 consiste en partículas baciliformes con envoltura (40–50 nm × 150–180 nm) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Las envolturas están repletas de prominentes espículas que sobresalen unos 11 nm de la superficie. Las nucleocápsidas tienen aspecto de bastones (de un diámetro de 20–30 nm) y poseen una simetría helicoidal, con una periodicidad de 5–7 nm. Los viriones están formados por tres proteínas estructurales (nucleoproteína p20 y glucoproteínas de envoltura gp64 y gp116) y un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva de unas 26 kb.

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

El VECA1 permanece viable en agua de mar aireada hasta 72 horas (Flegel *et al.*, 1995b).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

El VECA1 puede inactivarse aplicando 60°C durante 15 minutos (Flegel *et al.*, 1995b). Se dispone de poca información sobre otros métodos de inactivación, pero el virus parece ser susceptible al tratamiento con cloro a 30 partes por millón (0,03 mg ml⁻¹) (Flegel *et al.*, 1997).

2.1.4. Ciclo de vida

No se han notificado infecciones por el VECA1 de alta multiplicidad en cultivo celular. La infección a una multiplicidad de infección de 0,001 en cultivo celular primario de órgano linfóide ha indicado que el máximo título vírico se obtiene a los 4 días post-infección (Assavalapsakul *et al.*, 2003). En *P. monodon* tienen lugar signos clínicos de infección por el VECA1 en un plazo de 7-10 días tras la exposición. El VECA1 se replica en el citoplasma de células infectadas en las que hay abundantes precursores filamentosos largos de las nucleocápsidas y los viriones germinan hacia el interior de vesículas citoplásmicas en disposiciones paracrísticas densamente concentradas para salir a nivel de la membrana citoplásmica (Chantanachookin *et al.*, 1993).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Las especies que cumplen los criterios para ser consideradas susceptibles a la infección por el VECA1 según el Capítulo 1.5 del *Código Sanitario de los Animales Acuáticos (Código Acuático)* son el camarón azul (*P. stylirostris*), el camarón carpintero (*Palaemonetes pugio*), el langostino jumbo (*P. monodon*), el camarón jinga (*Metapenaeus affinis*) y el camarón patiblanco (*P. vannamei*).

2.2.2. Especies con signos ambiguos de susceptibilidad

Las especies respecto a las cuales no se dispone de pruebas fehacientes según el Capítulo 1.5 del *Código Acuático* son las siguientes: el langostino banana (*Penaeus merguensis*), el camarón carpintero (*Palaemon serrifer*), el langostino japonés (*Penaeus japonicus*), el camarón café norteño (*Penaeus aztecus*), el camarón rosado norteño (*Penaeus duorarum*), el camarón blanco norteño (*Penaeus setiferus*), el camarón rosna (*Palaemon styliiferus*), la langosta de agua dulce australiana (*Cherax quadricarinatus*), el camarón krakatoa (*Macrobrachium sintangense*) y el camarón amarillo (*Metapenaeus brevicornis*).

Además, en las siguientes especies se han descrito resultados positivos en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de patógeno, pero no se ha demostrado una infección activa: *Chelonibia patula*, *Callinectes sapidus*, *Ergasilus manicatus*, *Octolasmis muelleri*, *Fundulus grandis* y *Acetes* sp.

2.2.3. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Penaeus monodon es susceptible a la infección por el VECA1 a partir del estadio de PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995).

2.2.4. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Las infecciones por el VECA1 se suelen detectar solo en caso de enfermedad manifiesta y, aunque no aparecen con frecuencia en *P. monodon* sanos, sí se han detectado en poblaciones salvajes sanas de *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). Durante los brotes de enfermedad en los estanques de acuicultura, la prevalencia de la infección por el VECA1 puede considerarse alta. Se han detectado infecciones naturales por el VECA1 en *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, y *P. styliiferus* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b), pero todavía se dispone de poca información sobre la prevalencia natural.

2.2.5. Órganos diana y tejidos infectados

Los tejidos diana del VECA1, que son de origen ectodérmico y mesodérmico, son el órgano linfoide, los hemocitos, el tejido hematopoyético, las laminillas de las branquias y el tejido conjuntivo esponjoso del subcutis, el intestino, la glándula antenal, las gónadas, los tractos nerviosos y los ganglios (Chantanachookin *et al.*, 1993; Lightner, 1996).

2.2.6. Infección persistente

En 2003, se detectó VECA1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en *P. stylirostris* salvaje clínicamente normal recogido con fines de vigilancia en el Golfo de California (Castro-Longoria *et al.*, 2008). Se confirmó que el VECA1 detectado era infeccioso mediante infecciones experimentales. También se ha comprobado que el VECA1 puede persistir en los supervivientes a la infección experimental (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

2.2.7. Vectores

No existen vectores conocidos del VECA1.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La infección por el VECA1 se puede transmitir horizontalmente mediante inyección, ingesta de tejido infectado, inmersión en agua de mar que contenga extractos de tejidos y filtrada para estar libre de bacterias, o por cohabitación de camarones nunca antes infectados con camarones infectados (Flegel *et al.*, 1995b; Lightner, 1996). También se ha demostrado infección de camarones por inyección de extractos del camarón de pasta (*Aschetes* sp.) obtenido de estanques infectados (Flegel *et al.*, 1995a). No se ha estudiado la dinámica de la infección por el VECA1 en estanques de acuicultura, pero la

rápida acumulación de muertes durante los brotes de enfermedad sugiere una transmisión horizontal muy eficaz.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia de la infección por los virus del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos (según la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa anidada con transcripción inversa [RT-nPCR] es muy alta (50-100%) en la mayoría de poblaciones salvajes y de piscifactoría analizadas en Australia, Asia y el este de África así como en piscifactorías de *P. vannamei* de México (Cowley *et al.*, 2004; Sánchez-Barajas *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). La prevalencia de cada genotipo depende del origen geográfico del camarón. Es probable que el uso de métodos de detección menos sensibles que la PCR anidada (como la histología, la inmunoelectrotransferencia, la transferencia puntual o la hibridación *in-situ*), dé lugar a una subestimación de la prevalencia real de la infección en las poblaciones de camarón.

2.3.3. Distribución geográfica

El VECA1 se ha notificado en Taipei chino, Indonesia, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam (Walker *et al.*, 2001). Se han detectado VAB y otros genotipos del complejo de la cabeza amarilla en *P. monodon* sanos de Australia, Taipei chino, India, Indonesia, Malasia, Mozambique, Filipinas, Tailandia y Vietnam (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). El VECA1 también se ha detectado en *P. vannamei* de México (Sánchez-Barajas *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Dado que *P. monodon* se cría en estanques, la enfermedad causada por el VECA1 puede causar hasta un 100% de mortalidad en un plazo de 3–5 días tras la aparición de los signos clínicos (Chantanachookin *et al.*, 1993). Aunque experimentalmente es fácil inducir mortalidades por exposición al VECA1 o al VAB, mediante bioanálisis se ha observado que el VECA1 es mucho más virulento (~10⁶ veces más, según el cálculo de la dosis letal 50 [DL₅₀]) (Oanh *et al.*, 2011). Los genotipos 3, 4, 5 y 6 todavía no se han asociado a esta enfermedad (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

2.3.5. Factores ambientales

Puede aparecer un nivel alto de infección por este virus y la enfermedad correspondiente como consecuencia del estrés fisiológico inducido por cambios repentinos en el pH o el oxígeno disuelto, o por otros factores ambientales (Flegel *et al.*, 1997).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se ha desarrollado ningún método eficaz de vacunación.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Todavía no se dispone de ningún producto antivírico comercial eficaz.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de informes científicamente confirmados.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Ninguna comunicada.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Todas las especies de camarón marino criadas comercialmente parecen ser susceptibles al VECA1.

2.4.6. Agentes bloqueantes

La inyección a camarones de ARN bicatenario (ds) homólogo a regiones del gen ORF1a/1b del VECA1 o del VAB (que acceden así al ARN vírico de todo el genoma) puede inhibir la replicación vírica y prevenir mortalidades tras la exposición experimental. El mecanismo de acción antivírica del dsARN parece incluir la vía de la interferencia por ARN (ARNi) (Tirasophon *et al.*, 2007).

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Ninguna notificada.

2.4.8. Prácticas generales de manejo

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

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

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

3.2. Conservación de muestras para su envío

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

Las muestras para el cribado molecular mediante PCR deben conservarse en etanol (absoluto) de grado reactivo/analítico al 80-90%. Debe usarse un volumen de etanol al menos 10 veces superior al del tejido. No se recomienda utilizar etanol de grado inferior (de laboratorio o de grado industrial).

Las muestras para histología deben obtenerse de camarón fresco y conservarse en fijador de Davidson. La formalina (10%) en agua marina puede ser una alternativa útil. Debe usarse un volumen de fijador al menos 10 veces superior al del tejido.

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

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

3.3. Combinación de varias muestras

Para la detección de infecciones por el VECA1 en poblaciones grandes de camarones, la combinación de varias muestras es aceptable para el cribado o la vigilancia de lotes de fases de vida entre misis y PL de un tanque de vivero o bien de lotes de camarones juveniles de un estanque. Las cantidades totales de camarones muestreados, tanto a modo de una sola muestra combinada como en forma de combinaciones múltiples más pequeñas, se escogen en función de la prevalencia esperable y del intervalo de confianza exigido en la detección. Lo habitual en poblaciones de más de 100 000 camarones, si la prevalencia de la infección supera el 5%, es que para detectar el VECA1 con un límite de confianza del 95% se necesite un total de 60 animales analizados en muestras combinadas de los tamaños adecuados. Sin embargo, la detección definitiva puede resultar comprometida si las cargas de VECA1 en los camarones infectados son muy bajas o si se utilizan pruebas menos sensibles que la RT-PCR de dos pasos o la RT-PCR en tiempo real. Véase también el Capítulo 2.2.0.

3.4. Órganos o tejidos de elección

Los tejidos más adecuados de camarones moribundos sospechosos de estar infectados por el VECA1 son los del órgano linfoide y las branquias. Para el cribado o vigilancia de camarones juveniles o adultos con aspecto macroscópico normal, el órgano más adecuado es el linfoide pero pueden utilizarse branquias o hemolinfa para el muestreo sin sacrificio en el caso de las fases comprendidas entre las misis y las PL.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Sin determinar.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

El VECA1 puede infectar camarones de piscifactoría a partir del estadio de postlarva tardía en adelante, pero la mayor parte de la mortalidad tiene lugar en los estadios de juvenil temprano a tardío. Los camarones moribundos pueden presentar un aspecto general descolorido y un color amarillento en el cefalotórax debido a que el hepatopáncreas se encuentra debajo, y a que puede estar excepcionalmente blando en comparación con el de los camarones normales, que es marrón. En muchos casos se produce una pérdida total de la producción en cuestión de días tras la aparición de los primeros signos macroscópicos de VECA1 (Chantanachookin *et al.*, 1993). No obstante, estas características no son especialmente particulares de la enfermedad, y en ausencia de otros signos macroscópicos patognomónicos, no son fiables ni siquiera para un diagnóstico provisional del VECA1.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Puede observarse un nivel de ingesta excepcionalmente alto seguido de un cese repentino de la ingesta en un plazo de 2 a 4 días tras la aparición de los signos clínicos macroscópicos de enfermedad y mortalidad. Pueden acumularse camarones moribundos en los márgenes del estanque cerca de la superficie (Chantanachookin *et al.*, 1993).

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Véase el apartado 4.1.

4.2.2. Bioquímica clínica

No está descrita.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Se fijan tejidos del cefalotórax de camarones moribundos sospechosos de estar afectados por el VECA1 en fijador de Davidson, se preparan cortes de tejido y se tiñen con hematoxilina y eosina (H/E) de Meyer utilizando procedimientos histológicos estándar (Lightner, 1996). Se examinan los cortes mediante microscopía óptica y se averigua si presentan cantidades moderadas a altas de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, esféricas, de unos 2 µm de diámetro o más pequeñas en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico (Chantanachookin *et al.*, 1993). Los tejidos del órgano linfóide, la subcutícula del estómago y las branquias son especialmente útiles.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Se fijan camarones enteros o filamentos de branquias en fijador de Davidson (Lightner, 1996) durante toda la noche. Tras la fijación, se lavan bien algunos filamentos de branquias con agua de grifo para eliminar el fijador, y se tiñen con la tinción de hematoxilina y eosina (H/E) de Meyer (Lightner, 1996). Tras la tinción y la deshidratación, cuando el tejido está en xileno, se coloca un filamento de branquia sobre un porta de microscopio en una gota de xileno y, utilizando un par de agujas finas (un microscopio estereó es útil), se rompen varios filamentos secundarios. Se sustituye el filamento principal en xileno donde pueda conservarse indefinidamente como referencia permanente en un vial cerrado. Con cuidado de no dejar que el xileno se seque, se separan los filamentos secundarios sobre un porta y se retiran todos los fragmentos grandes o partículas que pudieran espesar la preparación innecesariamente. Por último, se añade una gota de líquido de montaje y un cubreobjetos. Se aplica una ligera presión para allanar la preparación lo máximo posible. Este procedimiento también puede utilizarse con capas finas de tejido subcuticular. Se examina al microscopio óptico mediante el objetivo de x40. En el caso de las muestras de camarones afectados por el VECA1, se observarán cantidades moderadas a grandes de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme, esféricas (de unos 2 µm de diámetro o menos) (Flegel *et al.*, 1997). Este hallazgo debe utilizarse junto con los resultados de los frotis de hemolinfa (véase abajo) para establecer un diagnóstico provisional de VECA1. En cuanto a los tejidos y filamentos fijados en xileno, estos portas de preparaciones completas pueden guardarse como registro permanente.

Si se precisan resultados rápidos, el paso de la fijación puede acortarse a solo 2 horas cambiando el ácido acético del fijador de Davidson por HCl al 50%. Para optimizar los resultados, este fijador no debe guardarse más que durante unos pocos días antes de su uso. Tras la fijación, se lava bien para

eliminar el fijador y se comprueba que el pH haya vuelto casi a la neutralidad antes de teñir. No se fija durante periodos más largos ni a temperaturas superiores a los 25°C, puesto que ello podría dar lugar a lesiones tisulares excesivas que dificultarían o imposibilitarían la interpretación.

4.2.5. Microscopía electrónica/citopatología

Para la microscopía electrónica de transmisión (MET), los tejidos más adecuados de camarones moribundos sospechosos de estar infectados por el VECA1 son los del órgano linfoide y de las branquias. Para el cribado o la vigilancia de camarones macroscópicamente normales, el tejido más adecuado es el órgano linfoide.

Se aturden camarones vivos mediante inmersión en agua helada solo hasta que queden inmovilizados o bien se sacrifican mediante una inyección de fijador. Se diseccionan rápidamente y se toman pequeños trozos de tejido diana (de no más de unos pocos mm de diámetro) y se fijan en al menos 10 volúmenes de glutaraldehído al 6% mantenido a 4°C y tamponado con solución de cacodilato de sodio ($\text{Na}[\text{CH}_3]_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (8,6 g de cacodilato de Na, 10 g de NaCl, agua destilada para llegar a los 100 ml, ajustado a pH 7 con HCl 0,2 N) o solución de fosfato (0,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,5 g de Na_2HPO_4 , 1 g de NaCl, 0,5 g de sacarosa, agua destilada para llegar a los 100 ml, se ajusta a pH 7 con HCl 0,2 N). Se fijan durante al menos 24 horas antes de procesarlos. En el caso de una conservación larga en fijador a 4°C, se reduce el glutaraldehído al 0,5–1,0%. El procesado consiste en la post-fijación con tetróxido de osmio al 1%, deshidratación, inclusión, corte y tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo según los métodos estándar de MET. Los reactivos utilizados para este procedimiento se han descrito en otra parte (Lightner, 1996).

En el citoplasma de células infectadas por el VECA1, se observan tanto precursores de la nucleocápsida como viriones con envoltura completos. Los precursores de la nucleocápsida son filamentos largos de unos 15 nm de diámetro y de longitud variable (80–450 nm) que aparecen en el citoplasma, a veces densamente concentrados en series paracristalinas. Los viriones son partículas baciliformes con envoltura (40–50 nm x 150–180 nm) con los extremos redondeados y protuberancias prominentes (8–11 nm) que sobresalen de la superficie. Los viriones suelen observarse en el citoplasma de las células infectadas y junto a vesículas intracelulares. También pueden observarse germinando en la membrana citoplasmática y en espacios intersticiales. Mediante MET no es posible diferenciar los viriones y las nucleocápsidas del VAB de los del VECA1.

Los esferoides del órgano linfoide se observan a menudo en *P. monodon* sanos crónicamente infectados por el VECA1 o el VAB, y la enfermedad con frecuencia cursa con necrosis del órgano linfoide (Spann *et al.*, 1998). Sin embargo, la formación de esferoides y la degeneración del tejido del órgano linfoide también pueden tener lugar durante la infección por otros virus de camarones (Lightner, 1996).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Véase el apartado 4.2.4.

4.3.1.1.2. Frotis

Véase el apartado 4.2.5.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Véase el apartado 4.2.3.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Aunque se dispone de métodos de cultivo primario de células de camarón, no se recomiendan para el aislamiento/identificación del VECA1 por el alto riesgo de contaminación por agentes extraños. Por el momento no existen líneas celulares continuas adecuadas para el cultivo del VECA1.

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

Se han publicado los reactivos y los protocolos de detección de proteínas del VECA 1 con anticuerpos (Lu *et al.* 1994 ; Loh *et al.* 1998). Se han usado viriones purificados a partir de hemolinfa de camarón infectado experimentalmente para producir antisuero en conejos blancos de raza Neozelandés. A partir de este suero, se ha purificado una inmunoglobulina (IgG) utilizando columnas de proteína G y se han extraído antígenos de camarón normales de reacción cruzada mediante adsorción a tejido muscular y hemolinfa de camarón triturados y secados con acetona. Para detectar proteínas del VECA1 mediante inmunoelectrotransferencia, se diluye 0,1 ml de hemolinfa obtenida de un camarón vivo en un volumen igual de tampón citrato y se analiza de inmediato o bien se conserva a -80°C hasta que se use. Se clarifican 200 μl de la muestra a 8 000 **g** durante 5 minutos y a continuación se precipitan los viriones del sobrenadante clarificado mediante una ultracentrifugación a 140 000 **g** durante 5 minutos. Se resuspenden los precipitados en 100 μl de tampón de carga 2x (2,5 ml de Tris/NCI 0,5 mM, a pH 6,8, 4 ml de dodecil sulfato de sodio [SDS] al 10%, 2 ml de glicerol, 1 μl de beta-mercaptoetanol y 0,5 ml de agua destilada desionizada) y se calientan a 95°C durante 5 minutos. Se carga una muestra de 10 μl y se lleva a cabo la electroforesis a 200 V. Se transfiere el gel situándolo sobre una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro de 0,1 mm) en tampón de transferencia (3,03 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 200 ml de metanol por litro) a 100 V durante 1 hora. Se lava la membrana con solución salina tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,4, se empapa en leche desnatada al 5% (en PBS) durante 1 hora y se lava con PBS durante 5 minutos. A continuación, se trata la membrana con una dilución del anticuerpo primario (IgG) anti VECA1 a 1/1000 durante 1 hora, se lava tres veces con PBS durante 5 minutos y a continuación se trata durante 1 hora con una dilución a 1/2.500 de anticuerpo anti-IgG de conejo generada en cabra y conjugada a peroxidasa de rábano. Se lava la membrana de nuevo tres veces con PBS durante 5 minutos y a continuación se trata con sustrato, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, hasta que aparece un color azulado/morado. Se detiene la reacción empapando la membrana en agua destilada. Todas las incubaciones deben llevarse a cabo a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se utiliza una preparación vírica purificada como control positivo para identificar las posiciones de las proteínas estructurales de 116 kDa, 64 kDa y 20 kDa del VECA1. La sensibilidad de la detección del VECA1 mediante inmunoelectrotransferencia es de unos 0,4 ng de proteína del VECA1 ($\approx 10^6$ viriones).

4.3.1.2.3. *Técnicas moleculares*4.3.1.2.3.1 *Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)*

Existen tres métodos de RT-PCR descritos. El primer protocolo es una RT-PCR de un solo paso adaptado de Wongteerasupaya *et al.* (1997) que puede utilizarse para detectar el VECA1 en camarones afectados. Este protocolo detectará solo el VECA1 y no el VAB ni otros genotipos actualmente reconocidos. El segundo protocolo es un procedimiento de RT-PCR anidada múltiple más sensible, adaptado de Cowley *et al.* (2004). Puede utilizarse para la detección diferencial de VECA1 y VAB en camarones que se hallen en un brote de enfermedad, o bien para el cribado de portadores sanos. La primera fase o paso de la RT-PCR anidada múltiple (RT-PCR primaria) detectó VECA7 (Mohr *et al.*, 2015). Tanto la RT-PCR como la PCR anidada (segunda fase o paso) detectaron el nuevo genotipo de VECA de China (Liu *et al.*, 2014). Esta prueba existe en una forma creada por una marca comercial que la ha modificado convenientemente (YHV/GAV IQ2000, GeneReach Biotechnology Corp., Chinese Taipei). No obstante, actualmente este kit no forma parte de la lista de los que han superado el proceso formal de la OIE de validación y certificación de pruebas comerciales (se puede consultar la lista de kits y fabricantes de pruebas certificados en: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/#ui-id-5>). El tercer protocolo es una RT-PCR anidada múltiple sensible, proporcionada por Wijegoonawardane *et al.* (2008b). Esta prueba se puede utilizar para la detección de virus del complejo de la cabeza amarilla a efectos del cribado de camarones. Detecta los seis genotipos víricos actualmente conocidos del complejo de la cabeza amarilla. La determinación del genotipo se logra mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos del producto de la RT-PCR. Se desconoce si este ensayo detectará el genotipo del VIH detectado recientemente en China (Rep. de).

Preparación de la muestra: En el caso de camarones juveniles o adultos, para preparar ARN total pueden utilizarse órgano linfóide, tejido de branquias o hemolinfa. Es preferible el tejido fresco. El tejido de órgano linfóide y de branquias conservado en etanol de grado analítico al 80-95% o bien conservado en congelación a -70°C también es adecuado para la preparación de ARN total. Se procesan 10-20 mg de tejido de órgano linfóide o de branquias o 50 μl de hemolinfa en 500 μl del reactivo TrizolTM1 y se extrae ARN total siguiendo el manual de instrucciones del producto. Se resuspende el ARN en 25 μl de agua tratada con DEPC (dietil-pirocarbonato), se calienta a 55°C durante 10 minutos, se enfría sobre hielo y se utiliza de inmediato o se conserva a -70°C hasta

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

que tenga que utilizarse. La cantidad de ARN depende del tipo y frescor de los tejidos, así como de la calidad del conservante utilizado y del tiempo durante el cual se haya conservado. Sin embargo, las cantidades de ARN aproximadas extraídas de tejidos frescos oscilan entre los 0,2 y los 2,0 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Los tejidos también pueden homogeneizarse mediante molido con perlas y extraerse con kits comerciales (como el QIAmp Viral RNA Mini Kit) (Mohr *et al.*, 2015).

De un tanque de precriadero o vivero que contenga 100 000 PL o más, se toma una muestra de unas 1 000 PL de cinco puntos distintos. Se combinan las muestras en un estanque, se remueve suavemente el agua y a continuación se escoge y se analiza una muestra de cinco PL vivas que se extraen del centro del estanque. El tamaño de la muestra se determina según la prevalencia supuesta o la que se tenga por objetivo. Se homogeneiza la muestra en un volumen adecuado del reactivo Trizol™ y se extrae ARN según el manual de instrucciones del producto. En base al procedimiento estándar de extracción con Trizol™, se utilizan masas de tejido equivalentes a 25–30 x PL5, 15 x PL10 y 5 x PL5 y se produce ARN total de alta calidad libre de contaminación por proteínas.

Para cada grupo de muestras de ARN a analizar, deben incluirse agua tratada con DEPC y extractos que se sepa que contienen ARN del VECA1 y/o ARN del VAB (según la prueba) como controles negativo y positivo, respectivamente.

Protocolo 1: RT-PCR para la detección específica del VECA1 en camarones enfermos

El protocolo que se usa en el Laboratorio de Referencia de la OIE, basado en la técnica de Mohr *et al.* (2015), es el siguiente: Se añade molde (2 μl) a 23 μl de mezcla de reacción que contenga 12,5 μl de mezcla de reacción 2x, 1 μl de mezcla Superscript III RT/Platinum Taq (Invitrogen), 180 nM de cada cebador y agua de grado molecular. Tras un ciclo de 50°C durante 30 minutos y 94°C durante 2 minutos, la amplificación por PCR consiste en 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 45 segundos, 68°C durante 45 segundos y finalmente 68°C durante 7 minutos. Junto a un marcador apropiado de ADN a modo de escala, se añaden 20 μl del producto amplificado de la PCR a un gel de agarosa/TAE (Tris-acetato-EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) al 1,5 % que contenga SYBR seguro y tras la electroforesis, se detecta la banda de ADN de 135 pb esperable para el VECA empleando un transiluminador de luz azul.

La sensibilidad de esta prueba es de unos 0,01 pg de ARN purificado de VECA1 ($\approx 10^3$ genomas).

Secuencias del cebador de la PCR:

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

Protocolo 2: RT-PCR anidada para la detección diferencial del VECA1 y del VAB en camarones sanos o enfermos

El protocolo que se usa en el Laboratorio de Referencia de la OIE, basado en la técnica de Mohr *et al.* (2015), es el siguiente: Para la PCR primaria, se añade molde (2 μl) a 23 μl de mezcla de reacción que contenga 12,5 μl de mezcla de reacción 2x, 1 μl de mezcla Superscript III RT/Platinum Taq (Invitrogen), 180 nM de cada cebador (GY1 y GY4) y agua de grado molecular. Tras un ciclo de 50 °C durante 30 minutos y 94°C durante 2 minutos, la amplificación mediante PCR consiste en 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos y 68°C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final de 68°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR anidada, se preparan 25 μl de mezcla de reacción que contengan 2 μl del producto de la PCR del primer paso, 12,5 μl de HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 360 nM de cada cebador (GY2, Y3 y G6) y agua de grado molecular. La amplificación por PCR consiste en 1 ciclo de 95°C durante 15 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos, y 72°C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Junto a un marcador apropiado de ADN a modo de escala, se añaden 20 μl del producto amplificado de la PCR a un gel de agarosa/TAE (Tris-acetato-EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) al 1,5 % que contenga SYBR seguro y tras la electroforesis, se detectan los amplicones empleando un transiluminador de luz azul.

Si la carga vírica es lo suficientemente alta, se amplificará un fragmento de ADN de 794 pb del VAB o del VECA1 en el primer paso de la PCR. En el segundo paso de la PCR, la presencia de un producto de 277 pb indicará la detección de VECA1, y un producto de 406 pb indicará la detección del VAB. La presencia de productos tanto de 406 como de 277 pb indicará una infección dual por VAB y VECA1. La sensibilidad de detección de la PCR de segundo paso es unas 1.000 veces superior a la de la PCR de un solo paso, y permite detectar ARN del VAB o del VECA1 hasta un límite de 10 fg de ARN total de órgano linfoide. La PCR anidada puede ejecutarse como dos pruebas independientes específicas de VECA 1 y de VAB omitiendo o bien el cebador G6 o bien el

cebador Y3, respectivamente. El cebador contiene una discordancia para el VAB pero es específico del VECA1. En el casodel VAB, la 7ª base desde la izquierda (T) está sustituida por C, de tal forma que la secuencia del cebador para el VAB debería ser 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', según los datos de secuencia del genoma del VAB (número de acceso de la base de datos, NC_010306.1 y AF227196.2).

Las secuencias de los cebadores de la RT-PCR genéricos para el VAB y el VECA1 (GY) o específicos del VAB (G) o el VECA1 (Y) son las siguientes:

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

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

Protocolo 3: RT-PCR anidada para la detección de todos los genotipos caracterizados del complejo de la cabeza amarilla actualmente conocidos (de VECA1 a VECA7).

El protocolo que se usa en el Laboratorio de Referencia de la OIE, basado en la técnica de Mohr *et al.* (2015), es el siguiente: Para la PCR primaria, se añade molde (2 µl) a 23 µl de mezcla de reacción que contenga 12,5 µl de mezcla de reacción 2x, 1 µl de mezcla Superscript III RT/Platinum Taq (Invitrogen), 180 nM de cada cebador primario (YC-F1ab y YC-R1ab) y agua de grado molecular. Tras un ciclo de 50°C durante 30 minutos y 94°C durante 2 minutos, la amplificación mediante PCR consiste en 1 ciclo de 95°C durante 15 minutos seguido de 25 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos y 68°C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final de 68°C durante 7 minutos. Para el segundo paso de la PCR anidada, se preparan 25 µl de mezcla de reacción que contengan 2 µl del producto de la PCR del primer paso, 12,5 µl de HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 180 nM de cada conjunto de cebadores (YV-F2ab y YC-R2ab) y agua de grado molecular. La amplificación por PCR consiste en 1 ciclo de 95°C durante 15 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 60°C durante 45 segundos, y 72°C durante 45 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 7 minutos. Junto a un marcador apropiado de ADN a modo de escala, se añaden 20 µl del producto amplificado de la PCR a un gel de agarosa/TAE (Tris-acetato-EDTA) al 1,5 % que contenga SYBR seguro y tras la electroforesis, se detectan los amplicones empleando un transiluminador de luz azul.

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

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

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

4.3.1.2.3. Hibridación *in-situ*

A continuación se describe el protocolo de Tang *et al.* (2002). Es un método adecuado para la detección tanto del VECA1 como del VAB (Tang y Lightner (1999). Para conservar la accesibilidad al ARN vírico, se fijan tejidos obtenidos de camarones vivos con fijador de Davidson modificado, tamponado con solución neutra, sin ácido acético (fijador RF) (Hasson *et al.*, 1997). Para lograr una buena conservación del tejido y al mismo tiempo conservar la accesibilidad al ARN, puede utilizarse fijador normal de Davidson siempre que el tiempo de fijación no supere las 24 horas (máximo de 48 horas). Se procesan los camarones fijados utilizando métodos histológicos estándar y se preparan cortes de 4 µm de espesor sobre portas Superfrost Plus (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.). Antes de la hibridación, se incuban los cortes a 65°C durante 45 minutos, se retira la parafina con Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.) y se rehidratan pasándolos por una serie decreciente de diluciones de etanol en agua. Se digieren los cortes con proteinasa K (100 µg ml⁻¹, en Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM) durante 15 minutos a 37°C, y a continuación se fijan en formaldehído (0,4%) durante 5 minutos. Se lavan en SSC (citrito salino estándar) 2x, después se pre-hibridan con 500 µl de solución de pre-hibridación (SSC 4x, formamida al 50%, solución de Denhardt 1x, 0,25 mg ml⁻¹ de ARN de levadura, 0,5 mg ml⁻¹ de ADN de esperma de salmón sonicado, sulfato de dextrano al 5%) a 42°C durante 30 minutos. Para la hibridación se recubren los cortes con 250 µl de solución de hibridación que contenga una sonda de ADN marcada con digoxigenina (20–40 ng ml⁻¹) a 42°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavan los cortes del siguiente modo: con SSC 2x una vez durante 30 minutos a temperatura ambiente; SSC 1x dos veces durante 5 minutos a 37°C; SSC 0,5x dos veces durante 5 minutos a 37°C. Se incuban los cortes con un suero de anticuerpos de oveja anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) a 37°C durante 30 minutos. Se lavan con una solución de Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5, y NaCl 0,15 M dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente y con una solución de Tris/HCl 0,1 M, pH 9,5, y NaCl 0,1 M. Se incuban con nitroazul de tetrazolio y con 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en la oscuridad durante 1-2 horas para que aparezca color. Se aplica una tinción de contraste con Marrón Bismarck Y (0,5%), se rehidratan pasándolos por una serie de diluciones de etanol y Hemo-De, se añade Permout (Fisher Scientific, Pennsylvania, EE.UU.) y se cubren con un cubreobjetos. Las células infectadas por el VECA1 se tiñen de un color azul a negro-morado que destaca sobre la tinción de contraste marrón. Se incluyen controles positivos de tejido infectado por el VECA1 y controles negativos de tejido de camarón no infectado. La sonda de diagnóstico se prepara mediante marcaje por PCR utilizando los siguientes cebadores:

VECA11051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'
 VECA11051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4.3.1.2.3 Purificación del agente patógeno

El método de purificación del VECA1 se basa en una ultracentrifugación por gradiente de densidad, descrita por Wongteersupaya *et al.* (1995). Lo ideal es utilizar unos 250 ejemplares juveniles sanos de camarón *P. monodon* (o *P. vannamei*) (alrededor de 10 g) como fuente de virus para la purificación. Tras un periodo de varios días de aclimatación en tanques de 1 500 litros (unos 80 camarones/tanque) a una salinidad de 3,5 partes por mil (mg/ml), se inocula a cada camarón por vía intramuscular 100 µl de una suspensión a 1/100 de extracto de branquia preparado a partir de camarones infectados por el VECA. El día 2 post-infección, se recogen los camarones moribundos que presenten signos característicos del VECA1. Mediante una jeringa, se extrae hemolinfa de los senos de la base de las patas locomotrices y se mezcla con cuidado sobre hielo con el mismo volumen de medio de hemolinfa de langosta (LHM) (NaCl 486 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, Na₂HPO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 8,1 mM, NaHCO₃ 36 mM, dextrosa al 0,05% en Medio Mínimo de Eagle's, a pH ajustado a 7,6 con NaOH 1 N). Se centrifuga la mezcla a 480 **g** durante 30 minutos a 4°C para retirar los detritos celulares. Se ultracentrifuga el sobrenadante a 100 000 **g** durante 1 hora a 4°C. Se desecha el sobrenadante y se resuspende cuidadosamente el sedimento durante una noche a 4°C en 1 ml de LHM. Se deposita una capa de esta suspensión sobre un gradiente continuo de Urografin al 20–40% y se ultracentrifuga a 100 000 **g** durante 1 hora a 4°C. Tras la centrifugación, se recoge la banda vírica mediante una pipeta Pasteur y se vuelve a diluir con tampón NTE (EDTA 0,02 M, NaCl 0,2 M, Tris/HCl 0,2 M [pH 7,4]) hasta un volumen final de 12 ml. Se ultracentrifuga la suspensión a 100 000 **g** durante 1 hora a 4°C y se resuspende el sedimento (virus purificado) en 100 µl de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 7,4]) y se conserva en alícuotas de 20 µl a –80°C hasta que sea necesario.

4.3.1.2.4 Bioanálisis

El procedimiento del bioanálisis se basa en el descrito por Spann *et al.* (1998), pero otros autores han descrito procedimientos similares (Lu *et al.*, 1994). El bioanálisis debe llevarse a cabo en camarones susceptibles (véase el apartado 2.2, arriba) que hayan sido certificados como SPF y

que procedan de instalaciones de cría bioseguras. Como alternativa, deberá realizarse un cribado de los camarones susceptibles salvajes o de piscifactoría que vayan a utilizarse para el bioanálisis, mediante una PCR anidada con transcripción inversa (RT) utilizando muestras de tejido o de hemolinfa con el fin de confirmar la ausencia de infecciones crónicas pre-existentes por el complejo del VECA o virus relacionados. Los camarones deben mantenerse a lo largo de todo el procedimiento en las condiciones óptimas de supervivencia de la especie en cultivo de laboratorio.

Se obtienen camarones moribundos de estanques de cría afectados por el VECA1 o sospechosos de ser portadores de la infección, y se mantienen a 4°C o sobre hielo. Se retiran y desechan la cola y los apéndices. Si es necesario, el camarón entero o el cefalotórax pueden congelarse de inmediato y conservarse a -80°C o en nitrógeno líquido hasta que vayan a utilizarse. Se descongelan rápidamente las muestras conservadas sumergiéndolas en un baño de agua a 37°C dentro de dos bolsas de plástico de auto cierre y a continuación se mantienen a 4°C o sobre hielo durante todo el procedimiento. Se retira el caparazón y los aparatos bucales calcíferos. Se suspenden los tejidos restantes en seis volúmenes de tampón TN (Tris/HCl 0,02 M, pH 7,4, NaCl 0,4 M) y se homogeneizan en una trituradora de tejido para formar una suspensión sin grumos. Se clarifica el homogenado a 1300 **g** durante 20 minutos a 4°C. Se retira el líquido sobrenadante que se encuentra bajo la capa lipídica y se pasa por un filtro de 0,45 µm. Se mantiene el filtrado a 4°C para su utilización inmediata o se congela enseguida y se conserva en alícuotas a -80°C o en nitrógeno líquido. Se descongela el filtrado rápidamente a 37°C y se mantiene sobre hielo hasta que se utiliza.

Se inyectan 5 µl de filtrado por gramo de peso corporal a un mínimo de doce juveniles de camarón (1-5 g) de una especie susceptible (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*), en el segundo segmento abdominal utilizando una aguja de 0,45 mm de diámetro externo. Se inyecta tampón TN y un extracto de tejido filtrado preparado a partir de camarones no infectados a dos grupos equivalentes de al menos 12 camarones cada uno. A otro grupo de al menos 12 camarones se inyectará por último un inóculo calibrado y de composición conocida preparado a partir de camarones infectados por el VECA1, que funcionará como control positivo. Se mantiene cada grupo de camarones en un tanque cubierto independiente, con una entrada independiente de agua a lo largo de todo el bioanálisis. Debe garantizarse que no se produzca ninguna transferencia inadvertida de agua entre los tanques, mediante la aplicación de las buenas prácticas de laboratorio. Se observan los camarones y se registran las mortalidades durante al menos 21 días o hasta que los grupos analizados y el control positivo alcancen un 100% de mortalidad. Se obtiene al menos un camarón moribundo de cada uno de los cuatro grupos para examinarlo mediante histología, MET, hibridación *in-situ* de ácido nucleico y PCR o inmunoelectrotransferencia, con el fin de confirmar la presencia del VECA1 en la muestra (los procedimientos de cada prueba se hallan descritos en los apartados anteriores).

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

4.3.2. Métodos serológicos

No aplicables.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia específica y el diagnóstico de la VECA1 se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a = el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva, ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia específica y diagnóstico

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

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

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia específica destinada a declarar la ausencia de infección por el genotipo 1 del virus de la cabeza amarilla

El método de elección para declarar la ausencia de enfermedad es la RT-PCR anidada (apartado 4.3.1.2.3.1; Protocolo 3) seguida de una secuenciación confirmativa del producto amplificado mediante la PCR. Se precisa obtener unos resultados negativos en la PCR de dos pasos.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de infección por el VECA1 se define como un brote de enfermedad en camarones marinos en el que rápidamente aumenta la mortalidad (pudiendo llegar al 100%) en los estadios de juveniles tempranos a tardíos, que puede ir precedida de un cese de la ingesta y de una acumulación de camarones en los márgenes de los estanques. Los camarones moribundos pueden presentar un aspecto general descolorido y un color amarillento en el cefalotórax, debido a que debajo se encuentra el hepatopáncreas, de color amarillo. El examen histológico del órgano linfoide fijado debe poner de manifiesto cantidades moderadas a altas de inclusiones citoplasmáticas intensamente basófilas, teñidas de manera uniforme y esféricas (de unos 2 µm de diámetro o menores).

7.2. Definición de caso confirmado

El VECA puede confirmarse por la detección de niveles altos de infección diseminada en los tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico mediante hibridación *in situ*, junto con la detección de productos amplificados del tamaño indicado, utilizando RT-PCR confirmativas y secuenciación, como se describe en el apartado 4.3 de este capítulo.

8. Bibliografía

ASSAVALAPSAKUL W., SMITH D.R. & PANYIM S. (2003). Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 253–258.

- CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31** (12), 953–956.
- CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.
- COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.
- COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.
- COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012). Family Roniviridae. In: *Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A., Adams M., Carstens E. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.
- FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: *Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.
- FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAIRATANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. In: *Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.
- FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S., WONGTERRASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: *Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). In: *Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.
- LIGHTNER D.V. (Ed.) (1996). *Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., 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** (4), 703–709.
- LOH P.C., CESAR E., NADALA B. JR, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: *Advances in Shrimp Biotechnology*, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.
- LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.
- LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAIVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.
- LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.

MOHR P.G., MOODY N.J.G, HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.STJ. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.

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

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

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

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

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

TIRASOPHON W., YODMUANG S., CHINNIRUNVONG W., PLONGTHONGKUM & PANYIM S. (2007). Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res.*, **74**, 150–155.

WALKER P.J., COWLEY J.A. SPANN K.M., HODGSON R.A.J. HALL M.R & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 292–302.

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

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

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

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

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

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por genotipo 1 del virus de la cabeza amarilla (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>). Para más información sobre la Infección por el genotipo 1 del virus de la cabeza amarilla, por favor contactar con el Laboratorio de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1995 COMO ENFERMEDAD DE LA CABEZA AMARILLA.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.