



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

Original: inglés

Marzo de 2015

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

París (Francia), 2–6 de marzo de 2015

La Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos de la OIE (en lo sucesivo, Comisión para los Animales Acuáticos) se reunió en la Sede de la Organización del 2 al 6 de marzo de 2015.

La lista de participantes y el orden del día adoptado figuran en los [Anexos 1 y 2](#).

La Comisión para los Animales Acuáticos agradece a los siguientes Países Miembros por el envío de sus comentarios sobre los distintos proyectos de texto que se difundieron tras su reunión de septiembre de 2014: Australia, Brasil, Canadá, Chile, China (Rep. Pop. de), Costa Rica, Cuba, El Salvador, Estados Unidos de América, Guatemala, Honduras, Japón, Nueva Zelanda, Nicaragua, Noruega, Panamá, Suiza, Taipéi Chino, Tailandia, los Estados Miembros de la Unión Europea (UE) y la Unión Africana - Oficina Interafricana de Recursos Animales (AU-IBAR) en nombre de los Delegados de África. La Comisión para los Animales Acuáticos acusó recibo del gran número de comentarios recibidos y expresó su satisfacción por las observaciones de Países Miembros que no habían presentado observaciones anteriormente.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó los comentarios remitidos por los Países Miembros antes del 30 de enero de 2015 sobre los textos modificados e introdujo enmiendas en textos del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OIE (en lo sucesivo, *Código Acuático*) allí donde lo consideró oportuno. Las enmiendas se señalan del modo habitual, mediante doble subrayado y ~~tachado~~, y figuran en los anexos del informe. Los cambios introducidos en la reunión de marzo de 2015 se han mostrado con un fondo de color para distinguirlos de los efectuados en la reunión de septiembre de 2014.

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

La Comisión para los Animales Acuáticos invita a los Países Miembros a referirse a informes previos a la hora de preparar comentarios sobre cuestiones ya tratadas y los invita a examinar el presente informe junto con los de los grupos *ad hoc*, que presentan información de gran interés para la Comisión para los Animales Acuáticos.

El cuadro presentado más abajo sintetiza los textos recogidos en los anexos. Los Países Miembros deben tomar nota de que los textos de los [Anexos 3 a 21](#) se propondrán para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015, los [Anexos 22 a 25](#) se presentan para comentario y los [Anexos 26 a 28](#) para información.

La Comisión para los Animales Acuáticos alienta encarecidamente a los Países Miembros a participar con sus comentarios en el desarrollo de las normas internacionales de la OIE. Sería de gran utilidad que los comentarios se presentaran como propuestas específicas de modificación de texto, basadas en argumentos científicos. Las propuestas de supresión de texto deberán indicarse con ~~tachado~~ y las de modificación, con doble subrayado. Los Países Miembros no deberán recurrir a la función automática de 'control de cambios' del procesador de textos, ya que dichos cambios se pierden al compilar las propuestas de los Países Miembros en los documentos de trabajo de la Comisión para los Animales Acuáticos.

Los comentarios de los anexos 22 a 25 del presente informe deberán hacerse llegar a la Sede de la OIE antes del **30 de enero de 2015**, para que puedan someterse durante la próxima reunión de la Comisión para los Animales Acuáticos, que se celebrará en septiembre de 2015.

Los comentarios deberán enviarse al Departamento de Comercio Internacional: trade.dept@oie.int.

Textos para comentario de los Países miembros	Número de anexo
<i>Código Acuático:</i>	
Guía del usuario	Anexo 3
Glosario	Anexo 4
Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.)	Anexo 5
Análisis del riesgo asociado a las importaciones (Capítulo 2.1.)	Anexo 6
Recomendaciones para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos (nuevo Capítulo 4.X.)	Anexo 7
Control de peligros asociados a los alimentos de los animales acuáticos (Capítulo 4.7.)	Anexo 8
Obligaciones generales en materia de certificación (Capítulo 5.1.)	Anexo 9
Procedimientos de certificación (Capítulo 5.2.)	Anexo 10
Análisis del riesgo asociado a la resistencia a los agentes antimicrobianos como consecuencia de su uso en los animales acuáticos (Nuevo Capítulo 6.5.)	Anexo 11
Infección por <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> (Capítulo 8.1.)	Anexo 12
Infección por ranavirus (Capítulo 8.2.)	Anexo 13
Artículos X.X.7. y X.X.11. de capítulos específicos de enfermedad	Anexo 14
Correcciones en los Artículos 10.4.4. y 10.4.6.	Anexo 15
Infección por <i>Perkinsus olseni</i> (Artículo 11.6.2.)	Anexo 16
<i>Manual Acuático:</i>	
Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (Capítulo 2.2.2.)	Anexo 17
Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 2.2.4.)	Anexo 18
Síndrome de Taura (Capítulo 2.2.5.)	Anexo 19
Enfermedad de la cabeza amarilla (Capítulo 2.2.8.)	Anexo 20
Infección por <i>Perkinsus olseni</i> (Capítulo 2.4.7.)	Anexo 21
Textos para comentario de los Países Miembros	Número de anexo
<i>Código Acuático:</i>	
Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos (Capítulo 1.1.)	Anexo 22
Criterios para la inscripción de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.)	Anexo 23
Infección por el virus de la cabeza amarilla (Capítulo 9.2.)	Anexo 24

Manual Acuático:	
Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (nuevo proyecto de Capítulo X.X.X.)	Anexo 25
Anexos para información de los Países miembros	
Informe del Grupo <i>ad hoc</i> de la OIE sobre Notificación de enfermedades animales y agentes patógenos (enero de 2015)	Anexo 26
Informe de la primera reunión del Grupo <i>ad hoc</i> de la OIE sobre Susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE (febrero de 2015)	Anexo 27
Plan de trabajo de la Comisión para los Animales Acuáticos en 2015/2016	Anexo 28

1. Código Sanitario para los Animales Acuáticos de la OIE

1.1 Comentarios generales

Se recibieron comentarios de Chile y Noruega. La Comisión para los Animales Acuáticos concuerda con los comentarios de los Países Miembros sobre la necesidad de recomendaciones más detalladas sobre la prevención y el control de las enfermedades y la bioseguridad, incluidas las medidas para la prevención de enfermedades emergentes. La Comisión también reconoció la importancia del tema y continuará trabajando en las revisiones de los capítulos referidos a las recomendaciones generales para la prevención y el control de las enfermedades del Título 4 del *Código Acuático*.

La Comisión para los Animales Acuáticos también reconoce la necesidad de mejorar las orientaciones relativas a la compartimentación sugerida por un País Miembro. Este tema se examina en el ítem 6.

1.2. Guía del usuario

Se recibieron comentarios de Canadá, Chile, Estados Unidos de América, Japón, Noruega, China, Suiza, Tailandia, la Unión Europea y AU-BAR. En aras de armonización, la Comisión también examinó las enmiendas efectuadas por la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Terrestres (en lo sucesivo, Comisión del Código), en su reunión de febrero de 2015.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia. En respuesta a un comentario de un País Miembro, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó el texto del punto 5 de la Sección A, con el fin de aclarar la aplicación del análisis de riesgo ante la ausencia de recomendaciones de la OIE sobre agentes patógenos o mercancías particulares.

La Comisión para los Animales Acuáticos aclaró que la referencia a la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón ilustra el enfoque propuesto para la diferenciación de patógenos y brinda un ejemplo de las opciones de gestión de riesgo basadas en la diferenciación de cepas.

La Comisión para los Animales Acuáticos aceptó la propuesta de un País Miembro de modificar el texto del punto 4 (requisitos comerciales) y el punto 5 (certificados sanitarios internacionales) en la Sección C para la correspondiente armonización con los textos de la Guía del usuario del *Código Terrestre*.

La versión revisada de la Guía del usuario figura en el [Anexo 3](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.3. Glosario

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó en consideración los comentarios de Australia, Canadá, Chile, China, Costa Rica, Cuba, Nueva Zelanda, Noruega y la Unión Europea. Igualmente, analizó las modificaciones propuestas a las definiciones pertinentes redactadas por la Comisión del Código en su reunión de febrero de 2015.

Atendiendo varios comentarios de los Países Miembros, la Comisión para los Animales Acuáticos modificó la definición de 'bioseguridad'. En respuesta a un comentario que proponía la inclusión de 'medidas químicas' en la definición, la Comisión observó que las 'medidas físicas' se referían a la infraestructura y a los equipos requeridos para contener a los agentes patógenos y que no deberían confundirse con los medios químicos y físicos de la desinfección. La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que la definición modificada estaba de acuerdo con la propuesta para el *Código Terrestre*.

La Comisión para los Animales Acuáticos recordó a los Países Miembros que el Grupo *ad hoc* sobre Desinfección había transmitido definiciones revisadas de ‘desinfectantes’ y ‘desinfección’. Se encomendó a este grupo *ad hoc* la tarea de redactar un nuevo capítulo con recomendaciones sobre la desinfección de los establecimientos de acuicultura, del agua y de los huevos de pescado para el Título 4 del *Código Acuático*. La Comisión explicó que las definiciones propuestas eran importantes para garantizar una clara comprensión del uso de dichos términos en el nuevo proyecto de capítulo.

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó los comentarios de numerosos Países Miembros sobre los tipos de procesos que deben figurar en la definición de desinfectantes. La Comisión consideró que los procesos físicos como el calentamiento y secado deberían formar parte de la definición, puesto que se aplican con propósitos similares a los desinfectantes químicos, es decir, para destruir o inhibir el crecimiento de los agentes patógenos.

La Comisión para los Animales Acuáticos también estudió los comentarios de los Países Miembros sobre los tipos de acciones que ejercen los desinfectantes en los agentes patógenos. La Comisión para los Animales Acuáticos no aceptó el comentario de un País Miembro de incluir ‘eliminación’ de los agentes patógenos en la definición. Por otra parte, aceptó que la exclusión de agentes patógenos y de otros materiales, por ejemplo por filtrado, puede constituir una etapa importante en el proceso de desinfección, pero que no se pueden considerar como “desinfectantes”. La Comisión para los Animales Acuáticos solicitó que el grupo *ad hoc* analizara la eliminación de agentes patógenos en el contexto del nuevo capítulo en desarrollo sobre desinfección de los establecimientos de acuicultura.

En respuesta a un comentario de un País Miembro que indicó que muchas sustancias químicas que, normalmente no se consideran desinfectantes pueden inhibir el crecimiento de microorganismos, la Comisión para los Animales Acuáticos aceptó modificar la definición para incluir ‘durante la desinfección’.

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó en consideración los comentarios de los Países Miembros sobre los artículos sobre los que se puede aplicar la desinfección. La Comisión determinó que, en el marco de la definición, no era necesario especificar qué es lo que se desinfecta y aclaró que el término ‘artículos’ se refería a todo lo que podía necesitar una desinfección.

La Comisión para los Animales Acuáticos explicó que no se habían recibido comentarios sobre su propuesta de borrar la definición de ‘identificación del peligro’.

La Comisión para los Animales Acuáticos no aceptó un comentario de un País Miembro de mantener la definición de ‘período de infecciosidad’. En efecto, una vez adoptadas las modificaciones propuestas en el Capítulo 1.1, esta definición sólo aparecerá en el Capítulo 4.5. y su utilización en el contexto de este capítulo no requiere ninguna definición particular.

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que sólo se habían emitido comentarios de menor importancia sobre las definiciones de ‘análisis del riesgo’ y ‘evaluación del riesgo’, y acordó que dichos comentarios no justificaban modificaciones adicionales a las definiciones. La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que las definiciones propuestas eran acordes con las elaboradas por la Comisión del Código.

En respuesta a una solicitud de un País Miembro de mencionar explícitamente la salud pública veterinaria en la definición de ‘Autoridad veterinaria’, la Comisión para los Animales Acuáticos estableció que, dado que esta definición es común al *Código Acuático* y al *Código Terrestre*, ambas comisiones deberán revisarla.

El Glosario revisado figura en el [Anexo 4](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.4. Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos (Capítulo 1.1.)

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó los comentarios brindados por los Países Miembros sobre los cambios propuestos en el Artículo 1.1.5. al igual que las modificaciones sugeridas por el Grupo *ad hoc* sobre Notificación de enfermedades animales y agentes patógenos al Artículo 1.1.4.

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que los comentarios apoyaban los cambios propuestos al Artículo 1.1.5. La Comisión aceptó las modificaciones propuestas en el Artículo 1.1.4. y revisó el texto en consecuencia.

El informe del Grupo *ad hoc* sobre Notificación de las enfermedades animales y agentes patógenos figura en el [Anexo 26](#) para información de los Países Miembros.

El Capítulo 1.1. revisado sobre notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos figura en el [Anexo 22](#) para comentario de sus Países Miembros.

1.5. Criterios para la inscripción de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.)

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó el informe del Grupo *ad hoc* sobre Notificación de enfermedades animales y agentes patógenos. La Comisión reconoció el interés de que en la reunión de este grupo *ad hoc* contara con representantes de las tres comisiones especializadas de la OIE en calidad de observadores. Igualmente, hizo hincapié en seguir estrechando la colaboración con la Comisión del Código para garantizar la coherencia de los capítulos horizontales en ambos *Códigos*, cuando se considere apropiado.

El mandato del Grupo *ad hoc* sobre Notificación de enfermedades animales y agentes patógenos incluyó una revisión de los criterios para la inscripción de las enfermedades (es decir, los capítulos 1.2. del *Código Terrestre* y el *Código Acuático*).

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que el grupo *ad hoc* propuso un conjunto de criterios simplificados para el Capítulo 1.2. del *Código Acuático*. Si bien la Comisión observó que los criterios propuestos se habían simplificado, aún existe la necesidad de aclarar dichos criterios. La Comisión observó que la eliminación de las notas explicativas impedía la comprensión de las condiciones de aplicación de los criterios y los principios subyacentes. La Comisión acordó que era fundamental que los conceptos subyacentes de los criterios de inclusión en la lista se comprendieran fácilmente. Actualmente, las notas explicativas favorecen tal claridad y su eliminación podría generar cambios en los principios subyacentes reflejados por los criterios.

La Comisión para los Animales Acuáticos debatió algunos de los principios subyacentes de los actuales criterios que se plasman en el Capítulo 1.2. del *Código Acuático* y que se resumen a continuación.

Propagación internacional – este criterio se cumple actualmente “*siendo probable la introducción y radicación de la enfermedad por el comercio internacional*”. La redacción propuesta para este criterio por el grupo *ad hoc* es “*Se haya demostrado la propagación internacional del agente*. Varios países o zonas pueden ser declarados libres de enfermedad – Este criterio se satisface actualmente si “*Varios países o zonas pueden ser declarados libres de enfermedad...*” La redacción propuesta para este criterio por el grupo *ad hoc* es “*Al menos un país ha demostrado la ausencia efectiva o eminente de enfermedad*”, lo que establece una norma diferente al actual criterio en cuanto al número de países y a las medidas que se deben tomar para declararse libre de enfermedad. Las actuales notas explicativas indican un principio subyacente (aunque no explícito) que se debe garantizar la notificación para respaldar los esfuerzos de control de enfermedad. El nuevo criterio propuesto puede resultar problemático, puesto que resulta difícil demostrar la ausencia de una enfermedad si la misma no forma parte de la lista.

Método de diagnóstico o de detección fiable y asequible – este criterio se satisface actualmente si “*Existe un método de diagnóstico o de detección fiable y asequible*”. Las notas explicativas indican que las pruebas de diagnóstico deben haber sido sometidas a un proceso de normalización y validación o existe una definición precisa de los casos. La redacción propuesta para este criterio por el grupo *ad hoc* refleja la necesidad de una definición de caso, pero no la necesidad de disponer de un método de validación.

Consecuencias – los actuales criterios se dividen en impactos sobre la producción, las poblaciones naturales de animales acuáticos y la salud pública. La redacción propuesta para este criterio por el grupo *ad hoc* se divide en forma similar, aunque el criterio sobre los impactos sobre la producción se refiere en forma menos explícita a las poblaciones de las granjas acuícolas. La Comisión para los Animales Acuáticos observó que el tipo de impactos puede separarse de distintas maneras; por ejemplo, por los valores afectados (comercial o medioambiental) o el tipo de recursos afectados (de granja o silvestre), dejando constancia de que los animales acuáticos silvestres pueden implicar en forma simultánea valores comerciales y medioambientales.

El informe del Grupo *ad hoc* sobre Notificación de enfermedades animales y agentes patógenos se presenta en el [Anexo 26](#) para información de los Países Miembros.

La Comisión para los Animales Acuáticos invita a los Países Miembros a comentar los aspectos presentados y la redacción específica propuesta por el grupo *ad hoc*, lo que contribuirá al debate de su reunión de septiembre de 2015 sobre los criterios de inscripción en la lista.

El Capítulo 1.2. revisado sobre los criterios de inscripción de las enfermedades figura en el [Anexo 23](#) para comentario de los Países Miembros.

1.6. Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.)

a) Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó los comentarios recibidos de Canadá, China, Noruega, Tailandia, Taipéi Chino, y la Unión Europea relativos a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda de conformidad con el Artículo 1.2.2. del *Código Acuático*. Si bien algunos Países Miembros aceptaron su inclusión en la lista, tres de ellos se opusieron. La Comisión para los Animales Acuáticos observó que los comentarios desfavorables se basaban en un reciente informe que indicaba que otras especies de *Vibrio* distintas de *Vibrio parahaemolyticus* habían dado resultado positivo a la PCR para el plásmido portador del gen responsable de la enfermedad.

Si bien la Comisión para los Animales Acuáticos reconoció este nuevo avance en la comprensión de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda, coincidió en que este hallazgo deberá analizarse a la luz de la cantidad considerable de información científica existente y que demuestra que una cepa de *V. parahaemolyticus* con el plásmido pVA-1 es la causa de esta enfermedad.

En septiembre de 2014, la Comisión para los Animales Acuáticos recomendó la creación de un grupo *ad hoc* con la tarea de desarrollar un proyecto de capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda para su inclusión en el *Manual Acuático*. El proyecto de capítulo del *Manual Acuático* ya se ha redactado (ver punto 2.6.) y brinda información para una identificación confiable del agente etiológico. En la sección 1 del proyecto de capítulo del *Manual Acuático* figura una definición para esta enfermedad y el numeral 7 presenta definiciones de casos sospechosos y confirmados.

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que, tal como se indica en el Capítulo 1.2. del *Código Acuático*, el objetivo de la inscripción es respaldar los esfuerzos de los Países Miembros destinados a prevenir la propagación transfronteriza de las principales enfermedades de los animales acuáticos, gracias a una notificación completa y transparente.

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó que debía proponerse la inscripción de la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda en la lista de la OIE en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

Consultar el Ítem 2.6. relativo a la redacción de un nuevo proyecto de capítulo sobre la enfermedad destinado al *Manual Acuático*.

La Comisión para los Animales Acuáticos invita a los Países Miembros a consultar la evaluación efectuada por la Comisión sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda según los criterios de inscripción en la lista (presentada en el Anexo 21 de su informe de septiembre de 2014).

b) Infección por las variantes con supresión en la HPR y HPR0 del virus de la anemia infecciosa del salmón

En respuesta al comentario de un País Miembro sobre la discrepancia entre el título del Capítulo 10.4. y el nombre de la enfermedad en el Capítulo 1.3., la Comisión para los Animales Acuáticos aclaró que la lista en el Capítulo 1.3. se brinda con fines de información y notificación, y el nombre no necesita forzosamente ser idéntico al del título del capítulo específico del *Código Acuático*. En el caso de la infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón, la Comisión prefiere mantener el nombre indicado en el Capítulo 1.3. para enfatizar el hecho de que la infección por las variantes con supresión en la HPR y HPR0 del virus de la anemia infecciosa del salmón se deben notificar a la OIE.

c) Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*)

En respuesta a una solicitud de un País Miembro para cambiar el nombre de la enfermedad por ‘infección por *Aphanomyces astaci*’, la Comisión acordó que la propuesta era acorde con el enfoque actual de la OIE para designar a las enfermedades. Sin embargo, decidió no cambiar el nombre actual hasta que no se hayan revisado los capítulos correspondientes en el *Código Acuático* y *Manual Acuático*. La Comisión para los Animales Acuáticos aceptó revisar los nombres de la lista de enfermedades y los títulos correspondientes del *Código* y el *Manual* cuando se modifiquen los capítulos en función de la lista de especies susceptibles.

La Comisión para los Animales Acuáticos también recordó a los Países Miembros que los cambios del nombre de las enfermedades de la lista de la OIE acarrearán consecuencias para las legislaciones nacionales de los Países Miembros.

d) Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

La Comisión para los Animales Acuáticos rechazó el comentario de un País Miembro para suprimir de la lista la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, puesto que no se había brindado ningún fundamento basado en los criterios del Capítulo 1.2. que sustentara la propuesta.

La Comisión para los Animales Acuáticos recordó a los Países Miembros que, para retirar una enfermedad de la lista, se exige un fundamento científico que demuestre que la enfermedad ya no cumple con los criterios de inscripción descritos en el Capítulo 1.2. del *Código Acuático*.

e) Infección por ranavirus

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó en consideración un comentario de un País Miembro señalando que el ranavirus es un gen que incluye varias especies de virus. La Comisión observó que el objetivo de inscripción en la lista de la OIE es respaldar los esfuerzos de los Países Miembros destinados a prevenir la propagación transfronteriza de las principales enfermedades de los animales acuáticos a través de una notificación completa y transparente. La Comisión reconoció que optar por el género en lugar de la especie no constituía una base sólida a la hora de tomar decisiones y efectuar acciones específicas.

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que, dado que la infección por ranavirus se inscribió en la lista por primera vez en 2008, es posible revisar la definición de caso de esta enfermedad.

La Comisión para los Animales Acuáticos acordó transmitir el tema a los expertos designados de la OIE para consulta y revisión de este tema en su próxima reunión.

f) Otras enfermedades de los anfibios

La Comisión para los Animales Acuáticos observó un comentario de un País Miembro sobre la posible inscripción de enfermedades adicionales de los anfibios como la infección por *Batrachochytrium salamandrivorans*, un hongo quítrico que causa una rápida disminución de la población de anfibios silvestres. La Comisión aceptó añadir este tema a su plan de trabajo y observó que, actualmente, no existía ningún Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* que pudiera brindar asistencia para la realización de esta tarea.

El Capítulo 1.3. revisado sobre las enfermedades de la lista de la OIE figura en el [Anexo 5](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.7. Análisis del riesgo asociado a las importaciones (Capítulo 2.1.)

Se recibieron comentarios de Australia, Brasil, Chile, China, Noruega y la Unión Europea.

En respuesta a una sugerencia de un País Miembro de añadir en el capítulo una referencia a la ‘evaluación de la difusión’, la Comisión para los Animales Acuáticos subrayó que, desde la edición 2012 del *Código Acuático*, el término ‘evaluación de la difusión’ se había reemplazado por ‘evaluación del riesgo de introducción’ en el Artículo 2.1.4. Indicó que este cambio era coherente con la expresión utilizada en la segunda edición del *OIE Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products*.

La Comisión para los Animales Acuáticos reiteró la importancia de garantizar la coherencia entre el Capítulo 2.1. del *Código Acuático* y los cambios en los artículos 2.1.5. y 2.1.6. recientemente adoptados en el Capítulo 2.1 del *Código Terrestre*.

El Capítulo 2.1. revisado sobre el análisis del riesgo asociado a las importaciones figura en el [Anexo 6](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.8. Recomendaciones para la desinfección de la superficie de los huevos de salmónidos (nuevo Capítulo 4.X.)

Se recibieron comentarios de Canadá, Chile, China, Noruega, Nueva Zelanda, Suiza y la Unión Europea y se modificó el proyecto de capítulo en consecuencia.

El nuevo capítulo sobre las recomendaciones para la desinfección de los huevos de salmónidos (Capítulo 4.X.) figura en el [Anexo 7](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que, si el Capítulo 4.X. se adopta en la Sesión General de mayo de 2015, se deberá borrar el Capítulo 1.1.3. ‘Métodos de desinfección de los establecimientos de acuicultura’ del *Manual Acuático*. La Comisión recordó a los Países Miembros que el Capítulo 1.1.3. no estaba en el lugar correcto en el *Manual Acuático* y que el Grupo *ad hoc* sobre Desinfección estaba revisando el Capítulo 4.3 del *Código Acuático*, con el fin de brindar más recomendaciones detalladas sobre este tema.

1.9. Control de peligros asociados a los piensos para los animales acuáticos (Capítulo 4.7.)

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó en consideración los comentarios brindados por Australia, Canadá, Chile, China, Noruega, Nueva Zelanda, Suiza y la Unión Europea. La Comisión analizó los comentarios recibidos y modificó el proyecto del capítulo en consecuencia.

El Capítulo 4.7. revisado sobre el control de peligros asociados a los piensos para los animales acuáticos figura en el Anexo 8 para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.10. Obligaciones generales en materia de certificación (Capítulo 5.1.)

Se recibieron comentarios de Australia, Chile, Japón y la Unión Europea. Además, la Comisión para los Animales Acuáticos tomó en consideración el texto del Capítulo 5.1. del *Código Terrestre* modificado por la Comisión del Código en su reunión de febrero de 2015. La Comisión enmendó el texto a partir de dichas consideraciones.

El Capítulo 5.1. revisado sobre las obligaciones generales en materia de certificación figura en el Anexo 9 para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.11. Procedimientos de certificación (Capítulo 5.2.)

Se recibieron comentarios de Chile y la Unión Europea. La Comisión para los Animales Acuáticos también analizó el texto del Capítulo 5.2. del *Código Terrestre* modificado por la Comisión del Código en su reunión de febrero de 2015. La Comisión enmendó el texto a partir de dichas consideraciones.

El Capítulo 5.2. revisado sobre los procedimientos de certificación figura en el Anexo 10 para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.12. Análisis del riesgo asociado a la resistencia a los agentes antimicrobianos como consecuencia de su uso en animales acuáticos (proyecto de Capítulo 6.5.)

Se recibieron comentarios de Australia, China, Estados Unidos de América, Nueva Zelanda, Noruega, Suiza, Tailandia y la Unión Europea y se modificó el proyecto de capítulo en consecuencia.

A efectos de este capítulo, la Comisión para los Animales Acuáticos desplazó el texto que definía la 'identificación del peligro', y añadió una referencia al riesgo para la salud pública y al riesgo para la sanidad de los animales acuáticos, al nuevo punto 3 del Artículo 6.5.1. para más claridad. Se amplió la lista de factores que hay que tomar en consideración en los puntos sobre 'evaluación de la difusión', 'evaluación de la exposición' y 'evaluación de las consecuencias' en los artículos 6.5.3. y 6.5.4. y se simplificó el texto en los puntos sobre la 'estimación del riesgo' para mayor claridad. La Comisión también reemplazó 'evaluación de la difusión' por 'evaluación del riesgo de introducción' en todo el capítulo en aras de coherencia con el Capítulo 2.1.

El nuevo Capítulo 6.5 revisado sobre el análisis del riesgo asociado a la resistencia a los agentes antimicrobianos como consecuencia de su uso en animales acuáticos figura en el Anexo 11 para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.13. Capítulos de enfermedades específicas de los anfibios (Capítulos 8.1. y 8.2.)

Se recibieron comentarios de Australia, El Salvador, Taipéi Chino, Nueva Zelanda y la Unión Europea y se modificó el proyecto de capítulo en consecuencia.

La Comisión para los Animales Acuáticos recordó a los Países Miembros que, como se indicara en el informe de su reunión de septiembre de 2014, existe una incoherencia entre el *Código Acuático* y el *Manual Acuático* en las recomendaciones para el tratamiento previo a la importación de anfibios destinados al comercio de mascotas. El tratamiento de los animales vivos previo a la importación no se considera una medida de mitigación del riesgo adecuada para prevenir la propagación de la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*. Por lo tanto, la Comisión propuso suprimir la disposición para el tratamiento de los animales acuáticos vivos de los artículos 8.1.8. y 8.1.10.

Un País Miembro comentó que, dado que ahora se sabe que los cangrejos son portadores eficaces de *Batrachochytrium dendrobatidis*, es necesario actualizar los capítulos del *Código Acuático* y del *Manual Acuático*. La Comisión aceptó revisar las evidencias en su próxima reunión.

El Capítulo 8.1. revisado sobre la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* figura en el [Anexo 12](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

El Capítulo 8.2. revisado sobre la infección por ranavirus figura en el [Anexo 13](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

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

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó un comentario de un País Miembro para añadir por el ‘genotipo 1’ después del nombre de la infección por el virus de la cabeza amarilla, dado que el genotipo 1 es el único agente patógeno conocido de la enfermedad de la cabeza amarilla. (Ver también Ítem 1.18.).

El Capítulo 9.2. revisado sobre la infección por el virus de la cabeza amarilla figura en el [Anexo 24](#) para comentario de los Países Miembros.

1.15. Artículos X.X.7. y X.X.11. de los capítulos específicos de enfermedades

En el informe de su reunión de septiembre de 2014, la Comisión para los Animales Acuáticos reconoció que el texto de los Artículos X.X.7. y X.X.11. de los capítulos específicos de enfermedades era casi idéntico y, por lo tanto, propuso fusionarlos en todos los capítulos específicos de enfermedad del *Código Acuático*, en los cuales se aplican a la importación de animales acuáticos vivos (Artículo X.X.7.) y a la importación de productos de animales acuáticos (Artículo X.X.11.) de un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de enfermedad salvo en el Capítulo 10.4. en el que las modificaciones se aplican a los Artículos 10.4.10., 10.4.11., 10.4.15. y 10.4.16.

La Comisión para los Animales Acuáticos destacó que todos los comentarios recibidos respaldaban de esta propuesta.

Los modelos revisados de los Artículos X.X.7. y X.X.11. figuran en el [Anexo 14](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.16. Correcciones en los Artículos 10.4.4. y 10.4.6.

En el informe de la reunión de septiembre de 2014, la Comisión para los Animales Acuáticos observó que no era correcto el texto en el punto 2 de los Artículos 10.4.4. y 10.4.6. en el Capítulo 10.4. Todos los comentarios recibidos respaldaron esta propuesta.

Los artículos revisados 10.4.4. y 10.4.6. figuran en el [Anexo 15](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.17. Infección por *Perkinsus olseni* (Capítulo 11.6.)

En el informe de su reunión de septiembre de 2014, la Comisión para los Animales Acuáticos propuso la eliminación de *Crassostrea gigas* como una especie susceptible a la infección por *Perkinsus olseni*, puesto que no existe información que fundamente que esta especie es susceptible. No se recibieron objeciones para esta propuesta.

El artículo revisado 10.6.2. figura en el [Anexo 16](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

1.18. Lista de especies susceptibles a las enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE

La Comisión para los Animales Acuáticos examinó el informe del Grupo *ad hoc* sobre Susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades inscritas en la lista de la OIE y agradeció a los miembros del grupo *ad hoc* la excelente labor realizada.

La Comisión para los Animales Acuáticos estudió los cambios propuestos por el grupo *ad hoc* a la lista de especies susceptibles del Capítulo 9.2. Infección por el virus de la cabeza amarilla. La Comisión observó que la aplicación hecha por el grupo *ad hoc* de los nuevos criterios para la inscripción de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico (descrito en el Capítulo 1.5.) a la infección por el virus de la cabeza amarilla, dio como resultado una lista modificada de especies susceptibles (ver detalles en el informe del grupo *ad hoc* que figura en el [Anexo 27](#)). La Comisión aceptó circular los cambios propuestos a la lista de especies susceptibles en el Artículo 9.2.2. para comentario de los Países Miembros.

La Comisión para los Animales Acuáticos también solicitó a los autores del Capítulo 2.2.8. del *Manual Acuático* sobre la enfermedad de la cabeza amarilla modificar la lista de especies susceptibles en este capítulo para mayor coherencia con las recomendaciones del informe del grupo *ad hoc*. La Comisión revisará el capítulo del *Manual* en su próxima reunión de septiembre de 2015.

La Comisión para los Animales Acuáticos también recomendó que el grupo *ad hoc* continuara su tarea de revisión de la lista de especies susceptibles de infección por otros agentes patógenos de las enfermedades de crustáceos de la lista de la OIE.

El informe del Grupo *ad hoc* sobre Susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por las enfermedades de la lista de la OIE figura en el [Anexo 27](#) para información de los Países Miembros.

El Capítulo 9.2. revisado sobre la infección por el virus de la cabeza amarilla figura en el [Anexo 24](#) para comentario de los Países Miembros.

2. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos de la OIE

2.1. Capítulo 2.2.2. Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa

La Comisión para los Animales Acuáticos, en consulta con los autores del capítulo, revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia.

El Capítulo 2.2.2. revisado sobre la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa figura en el [Anexo 17](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

2.2. Capítulo 2.2.4. Hepatopancreatitis necrotizante

La Comisión para los Animales Acuáticos, en consulta con los autores del capítulo, revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia.

El Capítulo 2.2.4. revisado sobre la hepatopancreatitis necrotizante figura en el [Anexo 18](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

2.3. Capítulo 2.2.5. Síndrome de Taura

La Comisión para los Animales Acuáticos, en consulta con los autores del capítulo, revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia.

El Capítulo 2.2.5. revisado sobre el síndrome de Taura figura en el [Anexo 19](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

2.4. Capítulo 2.2.8. Infección por el virus de la cabeza amarilla

La Comisión para los Animales Acuáticos, en consulta con los autores del capítulo, revisó los comentarios de los Países Miembros y modificó el texto en consecuencia.

El Capítulo 2.2.8. revisado sobre la infección por el virus de la cabeza amarilla figura en el [Anexo 20](#) para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

2.5. Capítulo 2.4.6. Infección por *Perkinsus olseni*

No se recibió ningún comentario de los Países Miembros sobre la sección revisada 2.2.1. del Capítulo 2.4.6.

El Capítulo 2.4.6. revisado sobre la infección por *Perkinsus olseni* figura en el Anexo 21 para adopción en la 83.^a Sesión General de mayo de 2015.

2.6. Nuevo capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda

En su reunión de septiembre de 2014, la Comisión para los Animales Acuáticos recomendó que un grupo *ad hoc* redacte un proyecto de capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND por sus siglas en inglés) para inclusión en el *Manual Acuático*, a partir de la propuesta de inscripción en la lista de enfermedades.

La Comisión para los Animales Acuáticos agradeció la labor del grupo *ad hoc* y revisó el proyecto de capítulo. La Comisión aclaró la definición de la enfermedad que se refiere a la enfermedad causada por cepas únicas de *Vibrio parahaemolyticus* portadoras de genes con una codificación para una toxina binaria (Pir^{VP}), localizadas en un plásmido denominado pVA1. La Comisión para los Animales Acuáticos enfatizó que el principal propósito de inscribir una enfermedad en la lista es compartir información importante sobre su diagnóstico, distribución y notificación. Para este propósito, la sección 7 de los capítulos específicos de enfermedad del *Manual Acuático* brinda definiciones de un caso sospechoso y confirmado de la enfermedad en cuestión. En cuanto a la AHPND, un caso se considera sospechoso a partir de observaciones histopatológicas concluyentes, de detección de una cepa de *V. parahaemolyticus* portadora del plásmido o de mortalidades asociadas a los signos clínicos; un caso puede ser confirmado a través de la detección de una cepa de *V. parahaemolyticus* portadora del plásmido y de observaciones histopatológicas concluyentes, de mortalidades asociadas a los signos clínicos o ensayos biológicos.

El nuevo proyecto de capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (Capítulo X.X.X.) figura en el Anexo 25 para comentario de los Países Miembros.

3. Centros de Referencia de la OIE

3.1. Candidaturas para la designación de Centros de Referencia de la OIE o cambios de expertos

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de que no existía ningún laboratorio de referencia de la OIE para la hepatopancreatitis necrotizante o para la infección por *Batrachochytrium dendrobatidis* e invita a los Países Miembros con pericia en estas enfermedades que afectan a crustáceos y anfibios a proponer su candidatura.

3.2. Informes anuales de las actividades de los centros de referencia en 2014

Se presentó a la Comisión para los Animales Acuáticos un análisis de las actividades de 2014 de los laboratorios de referencia y los centros colaboradores para las enfermedades de los animales acuáticos. Se recibieron informes de 35 de los 42 laboratorios de referencia de la OIE y de uno de los dos centros colaboradores para los animales acuáticos.

La Comisión para los Animales Acuáticos apreció la calidad de la tarea llevada a cabo por los laboratorios y expresó su agradecimiento a los expertos por la calidad de su trabajo.

La Comisión para los Animales Acuáticos observó que había disminuido el número de laboratorios de referencia de la OIE que no contaban con un sistema de gestión de calidad reconocido internacionalmente. La Comisión alienta a los laboratorios de referencia no acreditados a tomar las medidas necesarias para lograr este objetivo.

La Comisión para los Animales Acuáticos también observó que un gran número de laboratorios de referencia de la OIE estaba produciendo reactivos de diagnóstico, pero que ninguno de ellos se había incluido en la actual lista de los reactivos de referencia estándar aprobados por la OIE (ver: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/productos-veterinarios/reactivos-de-referencia/>). La Comisión invita a los laboratorios de referencia de la OIE sobre las enfermedades de los animales acuáticos a presentar sus reactivos de referencia para aprobación de la OIE.

4. Proyectos de hermanamiento

Se informó a la Comisión para los Animales Acuáticos del estatus de los proyectos de hermanamiento de las enfermedades de los animales acuáticos. En septiembre de 2014, finalizó el proyecto sobre la anemia infecciosa del salmón entre Canadá y Chile. Los proyectos en curso son: necrosis hematopoyética infecciosa entre Estados Unidos de América y China; anemia infecciosa del salmón entre Noruega y Brasil, Herpesvirus Koi; entre Japón e Indonesia y enfermedades de los camarones entre Estados Unidos de América e Indonesia.

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó una propuesta de proyecto de hermanamiento y brindó comentarios técnicos.

5. Seguimiento de las recomendaciones de la tercera conferencia mundial de los centros de referencia de la OIE, Seúl (República de Corea), 14-16 de octubre de 2014

La Comisión para los Animales Acuáticos tomó nota de las recomendaciones de la tercera conferencia mundial de los centros de referencia de la OIE.

La Comisión para los Animales Acuáticos apreció la inclusión de una sesión sobre las enfermedades de los animales acuáticos, que incluyó valiosas presentaciones centradas en la validación de las pruebas de diagnóstico y la garantía de calidad. La Comisión observó que las recomendaciones principales de esta sesión eran mejorar las normas y directrices en materia de validación de las pruebas de diagnóstico para las enfermedades de los animales acuáticos, la comunicación entre los laboratorios de referencias de los animales acuáticos y continuar impulsando a estos los laboratorios de referencia para que alcancen la acreditación de la norma ISO 17025 o de un sistema equivalente de gestión de calidad.

Las recomendaciones están disponibles en el sitio web de la OIE en http://www.oie.int/esp/refcentre2014/E_Final_Recommendations_Korea_2014.pdf.

6. Seguimiento de la conferencia mundial de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos: “Preparar el futuro” Ho Chi Minh City (Vietnam), 20-22 de enero de 2015

La Comisión para los Animales Acuáticos debatió sobre los resultados y las recomendaciones de la conferencia mundial de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos llevada a cabo en Ho Chi Minh City (Vietnam), del 20 al 22 de enero de 2015.

La Comisión para los Animales Acuáticos destacó el gran interés de los participantes durante la sesión consagrada a la vigilancia. Las presentaciones y los debates del panel evocaron varios puntos relativos al refuerzo de las recomendaciones sobre vigilancia en el *Código Acuático*. En particular, la sesión hizo énfasis en la necesidad de brindar recomendaciones sobre enfoques más flexibles en materia de vigilancia, a la vez que se tratan los desafíos que representan las acciones de vigilancia de las enfermedades de los animales acuáticos. La Comisión reconoció la necesidad de directrices en torno a enfoques económicos de vigilancia (vigilancia basada en los resultados y en los riesgos). La Comisión también reconoció la necesidad de considerar los principios epidemiológicos cuando se especifican periodos requeridos de vigilancia en los capítulos específicos de enfermedad.

La Comisión para los Animales Acuáticos también se refirió al interés de los participantes durante la sesión dedicada a la compartimentación y tomó nota de la necesidad de aclarar este concepto. Recordó a los Países Miembros que el propósito de la compartimentación en el *Código Acuático* es facilitar el comercio internacional, lo que lo diferencia de las medidas de bioseguridad que no tienen como objetivo dicha facilitación.

La conferencia hizo hincapié en el Proceso PVS para acompañar a los Países Miembros en el refuerzo de las capacidades de sus servicios de sanidad de los animales acuáticos y de sus servicios veterinarios. La Comisión para los Animales Acuáticos recomendó a los Países Miembros que consideraran solicitar una misión de evaluación de sus servicios veterinarios o de sus servicios sanitarios de los animales acuáticos con el objetivo de mejorar las competencias y el cumplimiento general con las normas de la OIE para los animales acuáticos. La Comisión tomó nota de que muchos países habían manifestado su interés por una misión de evaluación de los animales acuáticos y consideró este aspecto como muy positivo.

De conformidad con las recomendaciones de la tercera conferencia mundial de los centros de referencia de la OIE, la conferencia permitió destacar diferentes maneras de mejorar el *Manual Acuático* para brindar directrices claras sobre la validación de las pruebas. La Comisión para los Animales Acuáticos considera que se trata de una oportunidad para basarse en el conocimiento y pericia de la red de los centros de referencias de la OIE para continuar esta tarea.

La Comisión para los Animales Acuáticos expresó su agradecimiento a los donantes que financiaron el evento, al gobierno de Vietnam sede de la conferencia, a los ponentes por sus excelentes presentaciones y a los participantes por su contribución a los debates.

Uno de los objetivos de la conferencia fue establecer prioridades para la futura labor de la Comisión para los Animales Acuáticos. La Comisión reconoció que el objetivo se había alcanzado y los temas establecidos deberán tomarse en consideración en la formulación de su nuevo plan de trabajo en la próxima reunión de septiembre de 2015.

Las recomendaciones, las presentaciones y los resúmenes de la conferencia están disponibles en el sitio web de la OIE http://www.oie.int/esp/A_AAHRWF2015/recommandations.htm

7. Plan de trabajo de la Comisión para los Animales Acuáticos para 2015/2016

La Comisión para los Animales Acuáticos revisó y actualizó su plan de trabajo que brinda a los Países Miembros un panorama general de las actividades actuales y futuras.

El plan de trabajo para 2015/16 figura en el Anexo 28 para información de los Países Miembros.

8. Otros asuntos

8.1. Notificación de nuevas especies susceptibles a la infección por *Perkinsus olseni*

Tras la notificación de un País Miembro sobre una nueva especie *Haliotis iris* susceptible a la infección por *P. olseni*, la Comisión para los Animales Acuáticos solicitó a la OIE que expertos designados revisaran las pruebas científicas que fundamenten la inscripción de esta nueva especie de huésped susceptible de acuerdo con los criterios del Capítulo 1.5. del *Código Acuático*. La Comisión observó que la versión actual del *Manual Acuático* indica una amplia variedad de especies susceptibles, y sugiere explícitamente que existen más especies por identificar. La Comisión para los Animales Acuáticos aceptó incluir este ítem en su plan de trabajo.

8.2. Trematodos zoonóticos portados por los peces

La Comisión para los Animales Acuáticos llevó a cabo una teleconferencia con el Dr. Rohana Subasinghe (FAO) para debatir sobre el tema de los trematodos zoonóticos portados por los peces surgido durante la conferencia mundial de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos en Vietnam.

La Comisión para los Animales Acuáticos reconoce la importancia de los trematodos zoonóticos portados por los peces, que se estima que no sólo infectan a más de 18 millones de personas en el mundo sino también a otros mamíferos (por ejemplo, gatos, perros, cerdos, aves que comen peces). La Comisión también observó que los trematodos zoonóticos portados por los peces se habían añadido recientemente a la lista de la OMS de enfermedades tropicales desatendidas. En los sistemas acuáticos, uno de los principales factores de riesgo para la infección y la transmisión por trematodos zoonóticos portados por los peces es la contaminación de los estanques con huevos de huéspedes infectados (es decir, el hombre, los animales domésticos y las aves que se alimentan con peces). Los factores que promueven el crecimiento de poblaciones intermedias de caracoles hospedadores también aumenta el riesgo de trematodos zoonóticos portados por los peces. En los sistemas de acuicultura, debería poderse disminuir la contaminación medioambiental con los trematodos zoonóticos portados por los peces a través de la eliminación mecánica de los huéspedes intermediarios (caracoles). Esto es muy importante, puesto que la producción de los peces dependerá cada vez más de la acuicultura.

La Comisión para los Animales Acuáticos aceptó incluir este importante asunto en su plan de trabajo y consideró la redacción de un capítulo que brinde asesoramiento en la gestión de los riesgos asociados a los trematodos zoonóticos portados por los peces.

9. Próxima reunión

Septiembre de 2015 (fecha específica por confirmar).

.../Anexos

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

París (Francia), 2–6 de marzo de 2015

Lista de participantes

MIEMBROS DE LA COMISIÓN

Dr. Franck Berthe

Presidente

European Food Safety Authority - EFSA
Head of the Animal and Plant Health Unit
Risk Assessment and Scientific Assistance
Via Carlo Magno 1, Parma
ITALIA

Tel.: + 39 052 1 036 870

Fax: + 39 052 1 036 0870

Franck.Berthe@efsa.europa.eu

Dr. Jie Huang

Vicepresidente

Maricultural Organism Diseases Control &
Molecular Pathology Laboratory,
Yellow Sea Fisheries Research Institute,
Chinese Academy of Fishery Sciences
106 Nanjing Road
Qingdao, SD 266071
PR CHINA

Tel.: +86 532 858 230 62

Fax: +86-532-858 11514

huangjie@ysfri.ac.cn

Dr. Victor Manuel Vidal Martínez

Vicepresidente

Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional
Carretera Antigua a Progreso Km. 6
Apartado Postal 73 Cordemex
Mérida,
Yucatán C.P. 97310
MÉXICO

Tel.: +52 99 99 42 94 72

Fax: +52 99 81 29 17

vvidal@mda.cinvestav.mx

Dr. Ingo Ernst

Director Aquatic Pest and Health Policy
Animal Division
Department of Agriculture
18 Marcus Clarke Street
Canberra ACT 2601
AUSTRALIA
Tel.: +61 2 6272 5615
Ingo.Ernst@agriculture.gov.au

Dr. Brit Hjeltnes

Deputy Director, Fish and Shellfish Health
National Veterinary Institute
PO Box 750 Sentrum, N-0106
Bergen
NORUEGA
Tel.: +47 918 893 76
brit.hjeltnes@vetinst.no

Dr. Alicia Gallardo Lagno

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

SEDE DE LA OIE

Dr Bernard Vallat

Director General
12, rue de Prony
75017 PARIS
FRANCIA
Tel.: 33 - (0)1 44 15 18 88
Fax: 33 - (0)1 42 67 09 87
oie@oie.int

Dr Derek Belton

Jefe
Departamento de comercio internacional
OIE
d.belton@oie.int

Ms Sara Linnane

Secretaria de redacción científica
Departamento científico y técnico
OIE
s.linnane@oie.int

Dr Gillian Mylrea

Jefa adjunta
Departamento de comercio internacional
OIE
g.mylrea@oie.int

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

París (Francia), 2–6 de marzo de 2015

Orden del día adoptado

1. *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OIE
 - 1.1. Comentarios generales
 - 1.2. Guía del usuario
 - 1.3. Glosario
 - 1.4. Notificación de enfermedades y aportación de datos epidemiológicos (Capítulo 1.1.)
 - 1.5. Criterios para la inscripción de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE (Capítulo 1.2.)
 - 1.6. Enfermedades de la lista de la OIE (Capítulo 1.3.)
 - 1.7. Análisis del riesgo asociado a las importaciones (Capítulo 2.1.)
 - 1.8. Recomendaciones para la desinfección de la superficie de los huevos de salmónidos (nuevo Capítulo 4.X.)
 - 1.9. Control de peligros asociados a los piensos para los animales acuáticos (Capítulo 4.7.)
 - 1.10. Obligaciones generales en materia de certificación (Capítulo 5.1.)
 - 1.11. Procedimientos de certificación (Capítulo 5.2.)
 - 1.12. Análisis del riesgo asociado a la resistencia a los agentes antimicrobianos como consecuencia de su uso en animales acuáticos (proyecto de Capítulo 6.5.)
 - 1.13. Capítulos de enfermedades específicas de los anfibios (Capítulos 8.1. y 8.2.)
 - 1.14. Infección por el virus de la cabeza amarilla (Capítulo 9.2.)
 - 1.15. Artículos X.X.7. y X.X.11. de los capítulos específicos de enfermedades
 - 1.16. Correcciones en los Artículos 10.4.4. y 10.4.6.
 - 1.17. Infección por *Perkinsus olseni* (artículo 11.6.2.)
 - 1.18. Lista de especies susceptibles a las enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE
2. *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos* de la OIE
 - 2.1. Necrosis hipodérmica y hemoatopoyética infecciosa (Capítulo 2.2.2.)
 - 2.2. Hepatopancreatitis necrotizante (Capítulo 2.2.4.)
 - 2.3. Síndrome de Taura (Capítulo 2.2.5.)
 - 2.4. Enfermedad de la cabeza amarilla (Capítulo 2.2.8.)

Anexo 2 (cont.)

- 2.5. Infección por *Perkinsus olseni* (Capítulo 2.4.7.)
 - 2.6. Nuevo capítulo sobre la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)
 3. Centros de Referencia de la OIE
 - 3.1. Candidaturas para la designación de Centros de Referencia de la OIE o cambios de expertos
 - 3.2. Informes anuales de las actividades de los centros de referencia en 2014
 4. Proyectos de hermanamiento
 5. Seguimiento de las recomendaciones de la tercera conferencia mundial de los centros de referencia de la OIE, Seúl (República de Corea), 14-16 de octubre de 2014
 6. Seguimiento de la conferencia mundial de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos: “Preparar el futuro” Ho Chi Minh City (Vietnam), 20-22 de enero de 2015
 7. Plan de trabajo de la Comisión para los Animales Acuáticos para 2015/2016
 8. Otros asuntos
 - 8.1. Notificación de nuevas especies susceptibles a la infección por *Perkinsus olseni*
 - 8.2. Trematodos zoonóticos portados por los peces
 9. Próxima reunión
-

GUÍA DEL USUARIO PARA LA UTILIZACIÓN DEL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS

A. Introducción

- 1) El *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* (en lo sucesivo, *Código Acuático*) ~~establece~~ brinda normas para la mejora mundial de la sanidad de los animales acuáticos. ~~Más recientemente, el Código Acuático ha incluido~~ incluye igualmente normas para el bienestar de los peces de cultivo y el uso de los agentes antimicrobianos en los animales acuáticos. La finalidad de esta guía es ayudar a las Autoridades Veterinarias y otras autoridades competentes de los Países Miembros de la OIE a utilizar el *Código Acuático*.
- 2) Las ~~Autoridades Veterinarias y otras~~ autoridades competentes deberán emplear las normas del *Código Acuático* para ~~instaurar~~ desarrollar medidas en materia de detección precoz, declaración, notificación y control de agentes patógenos en animales acuáticos (anfibios, crustáceos, peces y moluscos), que impidan la propagación de dichos agentes a través del comercio internacional de animales acuáticos y productos de animales acuáticos sin imponer barreras sanitarias injustificadas al comercio.
- 3) ~~El Código acuático no comprende actualmente ninguna enfermedad zoonótica; sin embargo, la salud pública veterinaria forma parte del mandato de la OIE, incluido en el ámbito de la sanidad de los animales acuáticos.~~
- 34) Las normas de la OIE se basan en la información científica y técnica más reciente. Si se aplican correctamente, protegen la sanidad de los animales acuáticos durante la producción y el comercio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos así como ~~y~~ el bienestar de los peces de cultivo durante la producción y el comercio de animales acuáticos y productos de animales acuáticos.
- 45) Cuando el Código Acuático no incluya La ausencia de capítulos, artículos o recomendaciones sobre agentes patógenos o mercancías específicos particulares, ~~no significa que~~ las ~~Autoridades Veterinarias y otras~~ autoridades competentes ~~no puedan~~ aplicar las debidas medidas sanitarias adecuadas siempre que estén basadas en un análisis de riesgos llevado a cabo de acuerdo con lo estipulado en el Código Acuático, de sanidad y bienestar animal. Sin embargo, esas medidas basadas en el análisis de riesgo de acuerdo con lo establecido en el Código acuático, deberán basarse en una sólida justificación científica de conformidad con los principios del Acuerdo para la aplicación de las medidas sanitarias y fitosanitarias de la OMC (Acuerdo MSF).
- 56) El texto completo del *Código Acuático* se halla disponible en el sitio web de la OIE y cada capítulo individual es puede descargarse desde <http://www.oie.int>.

B. Contenido del Código Acuático

- 1) Las palabras y expresiones clave empleadas en más de un capítulo del *Código Acuático* ~~con un significado contextual~~ se definen en el glosario. Al leer y utilizar el *Código Acuático*, el lector deberá ser consciente de las definiciones recogidas en el glosario; las palabras que cuentan con una definición aparecen en cursiva. En la versión en línea del *Código Acuático*, un hipervínculo permite acceder directamente a la correspondiente definición.
- 2) La anotación "(en estudio)", que figura en contadas ocasiones en referencia a un artículo o parte de este, significa que esa parte del texto todavía no ha sido aprobada por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE y esas disposiciones no forman parte aún del *Código Acuático*.
- 3) Las normas de los capítulos del Título 1 tratan de la aplicación de medidas en materia de diagnóstico, vigilancia y notificación de agentes patógenos. La sección incluyen los criterios para la inscripción de los animales acuáticos, las enfermedades de la lista de la OIE, ~~y~~ los procedimientos de notificación a la OIE y los criterios para las especies susceptibles a la infección por un agente patógeno específico.
- 4) Las normas de los capítulos del Título 2 tratan de orientar al país importador para la realización de análisis del riesgo asociado a las importaciones en ausencia de normas comerciales de la OIE. El país importador también podrá usar esas normas para justificar medidas de importación que restrinjan más el comercio más estrictas que superen las normas comerciales existentes de la OIE.

Anexo 3 (cont.)

- 5) Las normas de los capítulos del Título 3 tratan del establecimiento, de la conservación y de la evaluación de los servicios de sanidad de los animales acuáticos, incluida la comunicación. Esas normas pretenden ayudar a las autoridades competentes ~~los Servicios veterinarios y los Servicios de sanidad de los animales acuáticos~~ de los Países Miembros a cumplir sus objetivos de mejora de la sanidad de los animales acuáticos y del bienestar de los peces de cultivo, y a crear y mantener la confianza en sus certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos.
- 6) Las normas de los capítulos del Título 4 tratan de la aplicación de medidas en materia de prevención y control de agentes patógenos. Incluyen la zonificación, la compartimentación, la desinfección, los planes de contingencia, y la eliminación de residuos de animales acuáticos y el control de los peligros en los alimentos para los animales acuáticos.
- 7) Las normas de los capítulos del Título 5 tratan de la aplicación de medidas sanitarias generales al comercio. En particular, ~~los capítulos~~ abordan la certificación y las medidas aplicables por los países de exportación, tránsito e importación. ~~Este título~~ Se incluye ~~brindan igualmente~~ diversos modelos de certificados sanitarios internacionales para los animales acuáticos, como con el fin de facilitar documentación coherente que deben emplearse como base armonizada para el comercio internacional.
- 8) Las normas de los capítulos del Título 6 pretenden garantizar el uso responsable y prudente de los agentes antimicrobianos en los animales acuáticos.
- 9) Las normas de los capítulos del Título 7 tratan de la aplicación de medidas para el bienestar de los peces de cultivo. Esas normas cubren los principios generales de bienestar de los peces de cultivo, el bienestar de estos durante el transporte, en el momento del aturdimiento, y de la matanza para consumo humano, así como en la situación de su y la matanza con fines de control sanitario.
- 10) Las normas de cada uno de los capítulos de los Títulos 8 a 11 están destinadas a impedir que los agentes patógenos etiológicos de las enfermedades de la lista de la OIE se introduzcan en un país importador. Cada capítulo de enfermedad incluye una lista de las especies susceptibles actualmente conocidas. y Las normas tienen en cuenta la naturaleza de la mercancía comercializada, el estatus sanitario respecto de los animales acuáticos del país, de la zona o del compartimento de exportación, y las medidas de atenuación del riesgo aplicables a cada mercancía.

Esas normas parten del supuesto que el agente no está presente en el país importador o bien es objeto de un programa de control o de erradicación. Los Títulos 8 a 11 se distribuyen en función de que los hospedadores sean anfibios, crustáceos, peces o moluscos, respectivamente. Los capítulos contemplan medidas específicas para prevenir y controlar las infecciones de interés mundial.

C. Cuestiones específicas

1) Notificación

El Capítulo 1.1. describe las obligaciones de los Países Miembros en virtud de los Estatutos Orgánicos de la OIE. Las enfermedades de la lista de la OIE del Capítulo 1.1. y las enfermedades emergentes, en su caso, son de declaración obligatoria. Se invita a los Países Miembros a proporcionar también a la OIE información sobre cualquier otro episodio zoonosario acuático significativo desde el punto de vista epidemiológico, incluyendo el surgimiento de enfermedades emergentes.

El Capítulo 1.2. describe los criterios de inscripción de una enfermedad en la lista de la OIE.

El Capítulo 1.3. plasma específica la lista de enfermedades de la OIE. Las enfermedades se dividen en cuatro categorías, correspondientes a los anfibios, crustáceos, peces o moluscos, respectivamente.

2) Diferenciación de agentes patógenos

Algunos agentes patógenos tienen una o más variantes. El *Código Acuático* reconoce la existencia de variantes de alta patogenicidad y la necesidad de diferenciarlas de variantes más benignas. Cuando un agente patógeno tenga cepas estables, con características utilizables a efectos diagnósticos y con diferentes niveles de patogenicidad, deberán aplicarse distintas las normas de protección deberán adecuarse proporcionales al riesgo que entrañan las diversas cepas de dicho agente. La infección por el virus de la anemia infecciosa del salmón es una la primera enfermedad de la lista que incluye opciones de gestión del riesgo basadas en la diferenciación de cepas es la infección por virus de la anemia infecciosa del salmón.

3) Determinación de la susceptibilidad de las especies

El *Código Acuático* propone utilizar criterios para determinar la susceptibilidad de las especies hospedadoras a los agentes patógenos de las enfermedades de la lista del *Código Acuático*. Esto ~~reviste particular importancia es importante~~ en el contexto de la acuicultura, dado el sinfín de especies ~~y el número de especies~~ nuevas existentes ~~en este ámbito~~.

4) Requisitos comerciales

Las medidas sanitarias aplicables a los animales acuáticos a efectos del comercio internacional deberán basarse en las normas de la OIE. Un País Miembro puede autorizar la importación de animales acuáticos o de productos de animales acuáticos a su territorio ~~bajo condiciones diferentes a las en virtud de requisitos más o menos restrictivos que los~~ recomendados en el *Código Acuático*. ~~Para justificar científicamente~~ Si las medidas comerciales ~~son más restrictivas que superan~~ las normas de la OIE, el país importador deberá presentar una justificación científica mediante ~~llevar a cabo un análisis~~ del riesgo de acuerdo con ~~las normas de la OIE en la materia, descritas en~~ el Capítulo 2.1. Los Miembros de la Organización Mundial del Comercio deberán remitirse al Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias.

Los Capítulos 5.1. a 5.3. describen las obligaciones y las ~~normas de responsabilidades éticas de los países~~ importadores y exportadores en materia de comercio internacional. Las ~~Autoridades Veterinarias y otras~~ autoridades competentes así como todos los veterinarios o certificadores oficiales que participen directamente en el comercio internacional deberán familiarizarse con estos capítulos. ~~Estos e~~Capítulo 5.3. también ~~describe el procedimiento de proporcionan directrices para la~~ mediación informal de la OIE.

~~Los capítulos de enfermedades del Código Acuático incluyen mercancías consideradas seguras para el comercio sin imposición de medidas sanitarias de enfermedad específica e independientemente del estatus zoonosario del país o la zona de exportación respecto del agente patógeno considerado. En caso de existir dicha lista, los países importadores no deberán requerir condiciones relacionadas con el agente patógeno considerado imponer restricciones comerciales a para las mercancías de la lista respecto del agente patógeno considerado.~~

5) Comercio de mercancías de animales acuáticos

El Capítulo 5.4. describe los criterios para evaluar la inocuidad de las mercancías de animales acuáticos.

Basándose en evaluaciones según los criterios del Artículo 5.4.1., en todos los capítulos de enfermedades, el punto 1 del Artículo X.X.3. contiene la lista de las mercancías de animales acuáticos que pueden ser objeto de comercio para cualquier finalidad, de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de la enfermedad en cuestión. Los criterios de inclusión de estas mercancías en este punto 1 del Artículo X.X.3. se basan en la ausencia del agente patógeno o en su inactivación mediante tratamiento o durante el proceso de transformación.

Basándose en evaluaciones según los criterios del Artículo 5.4.2., en todos los capítulos de enfermedades, el punto 1 del Artículo X.X.12. (para el Capítulo 10.4. corresponde el Artículo 10.4.17) contiene la lista de ~~animales acuáticos e~~ mercancías de animales acuáticos para la venta directa al por menor para el consumo humano ~~de un país, una zona o un compartimento no declarados libres de la enfermedad en cuestión~~. Los criterios de inclusión de estas mercancías en el punto 1 del Artículo X.X.12. toman en consideración la forma y presentación del producto, el volumen previsto de residuos de tejidos generados por el consumidor y la presencia probable del agente patógeno en los residuos.

~~Los capítulos de enfermedades del Código Acuático reflejan la realidad del comercio y, por ello, incluyen mercancías comercializadas teniendo en cuenta su diversidad y proponen una lista de mercancías seguras para facilitar el comercio. Los capítulos de enfermedades del Código Acuático contienen un artículo en el que se enumeran las mercancías consideradas inocuas para el comercio sin imposición de medidas sanitarias, independientemente del estatus zoonosario del país o de la zona respecto del agente patógeno considerado. Se trata de una iniciativa en curso y algunos capítulos no contienen todavía un artículo con la lista de las mercancías inocuas. En caso de existir dicha lista, los países importadores no deberán imponer restricciones comerciales a las mercancías de la lista respecto del agente patógeno considerado.~~

Anexo 3 (cont.)

6) Certificados sanitarios internacionales

Un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos es un documento oficial que la ~~Autoridad Veterinaria u otra~~ autoridad competente del país exportador expide de acuerdo con lo dispuesto en los Capítulos 5.1. y 5.2. Los certificados enumeran los requisitos de sanidad de los animales acuáticos que reúne la mercancía exportada. La calidad de los servicios veterinarios o los servicios de sanidad de los animales acuáticos del país exportador es esencial para ofrecer garantías a los socios comerciales de la seguridad sanitaria de ~~los animales y productos acuáticos~~ las mercancías de animales acuáticos exportadas. Esto incluye los principios éticos de los ~~Servicios veterinarios o los~~ servicios de sanidad de los animales acuáticos en cuanto a la expedición de certificados sanitarios internacionales y sus antecedentes en el cumplimiento de sus obligaciones de notificación.

Los certificados sanitarios internacionales son los pilares del comercio internacional y ofrecen garantías al país importador sobre el estado sanitario de ~~los animales y productos acuáticos~~ las mercancías de animales acuáticos importadas. Las medidas sanitarias prescritas deberán tener en cuenta el estatus zoonosario tanto del país exportador como del país importador y basarse en las normas del *Código Acuático*.

Al redactar un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos, deberán respetarse las pautas siguientes:

- a) ~~Enumerar~~ Identificar las enfermedades contra las que el país importador puede protegerse legítimamente, teniendo en cuenta su propio estatus; los países importadores no deberán imponer medidas contra enfermedades que estén presentes en su territorio pero no sean objeto de un programa oficial de control ~~e de~~ erradicación.
- b) Para las mercancías capaces de transmitir dichas enfermedades a través del comercio internacional, el país importador deberá aplicar los artículos ~~que tratan de la mercancía considerada~~ pertinentes en los capítulos específicos de enfermedades. La aplicación de los artículos deberá adaptarse al estatus zoonosario del país, de la zona o del compartimento de exportación. Dicho estatus deberá determinarse de acuerdo con el Artículo 1.4.6., excepto cuando los artículos del correspondiente capítulo de enfermedad dispongan otra cosa.
- c) Al preparar certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos, el país importador deberá velar por emplear términos y expresiones acordes con las definiciones que constan en el glosario; como se indica en el Artículo 5.2.3., los certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos deberán ser lo más sencillos posible y estar claramente redactados para evitar malentendidos sobre los requisitos exigidos por el país importador.
- d) Para orientar a los Países Miembros, el Capítulo 5.10. prevé modelos de certificados, que deberán utilizarse como base para expedir certificados.

67) Folleto explicativo para importadores y exportadores

Se recomienda a las ~~Autoridades Veterinarias y otras~~ autoridades Competentes que redacten "folletos explicativos" para ayudar a los importadores y los exportadores a entender los requisitos comerciales. Estos folletos deberán indicar y explicar las condiciones comerciales, entre otras, las medidas que deberán aplicarse antes y después de la exportación, durante el transporte y la descarga, las obligaciones legales y los trámites necesarios. En los folletos, se especificarán igualmente todos los detalles que deben figurar en los certificados sanitarios que acompañen a las remesas hasta su lugar de destino. Se recordarán también a los exportadores las reglas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo que rigen el transporte aéreo de animales acuáticos y productos ~~de~~ origen animal de animales acuáticos.

 — Texto suprimido.

GLOSARIO

BIOSEGURIDAD

designa el conjunto de medidas físicas y de gestión diseñadas para reducir el *riesgo de introducción, desarrollo radicación* y propagación de los *agentes patógenos* hacia, desde y dentro de una población de *animales acuáticos*.

DESINFECTANTES

designa los compuestos químicos o procedimientos físicos capaces de destruir los microorganismos *agentes patógenos* o de detener su crecimiento durante la desinfección. e capacidad de supervivencia.

DESINFECCIÓN

designa la aplicación, después de una limpieza completa, de procedimientos destinados a destruir los agentes infecciosos o parasitarios responsables de *enfermedades* de los *animales acuáticos*, incluidas las zoonosis. Esta operación se aplica a los *establecimientos de acuicultura* (es decir, criaderos, piscifactorías, criaderos de ostras, criaderos de camarones, viveros, etc.) y a los *vehículos* y objetos/equipos diversos que puedan haber sido directa o indirectamente contaminados.

designa el procedimiento de limpieza y aplicación de *desinfectantes* para inactivar los *agentes patógenos* en artículos potencialmente contaminados.

IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO

designa el proceso de identificación de los *agentes patógenos* que puede contener la *mercancía* que se prevé importar.

PERÍODO DE INFECCIOSIDAD

designa el período más largo durante el cual un *animal acuático* infectado puede ser fuente de *infección*.

ANÁLISIS DEL RIESGO

designa el proceso que comprende la ~~identificación~~ identificación del *peligro*, la *evaluación del riesgo*, la *gestión del riesgo* y la *comunicación sobre el riesgo*.

EVALUACIÓN DEL RIESGO

designa la evaluación científica de la probabilidad y de las consecuencias biológicas y económicas de la entrada, radicación o propagación de un *peligro* en el *territorio de un país importador*.

 — Texto suprimido.

CAPÍTULO 1.3.

ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OIE

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

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

Artículo 1.3.1.

Están inscritas en la lista de la OIE las siguientes *enfermedades* de los peces:

- Herpesvirosis de la carpa koi
- Infección por alfavirus de los salmónidos
- Infección por *Aphanomyces invadans* (Síndrome ulcerante epizoótico)
- Infección por *Gyrodactylus salaris*
- Infección por las variantes con supresión en la HPR y HPR0 del virus de la anemia infecciosa del salmón
- Iridovirosis de la dorada japonesa
- Necrosis hematopoyética epizoótica
- Necrosis hematopoyética infecciosa
- Septicemia hemorrágica viral
- Viremia primaveral de la carpa.

Artículo 1.3.2.

Están inscritas en la lista de la OIE las siguientes *enfermedades* de los moluscos:

- Infección por *Bonamia ostreae*
- Infección por *Bonamia exitiosa*
- Infección por herpesvirus del abalón
- Infección por *Marteilia refringens*
- Infección por *Perkinsus marinus*
- Infección por *Perkinsus olseni*
- Infección por *Xenohaliotis californiensis*.

Anexo 5 (cont.)

Artículo 1.3.3.

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

- Enfermedad de la cola blanca
- Enfermedad de las manchas blancas
- Enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda
- Hepatopancreatitis necrotizante
- Infección por virus de la cabeza amarilla
- Mionecrosis infecciosa
- Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa
- Plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*)
- Síndrome de Taura.

Artículo 1.3.4.

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

- Infección por *Batrachochytrium dendrobatidis*
 - Infección por ranavirus.
-

CAPÍTULO 2.1.

ANÁLISIS DEL RIESGO ASOCIADO
A LAS IMPORTACIONES

Artículo 2.1.1.

Introducción

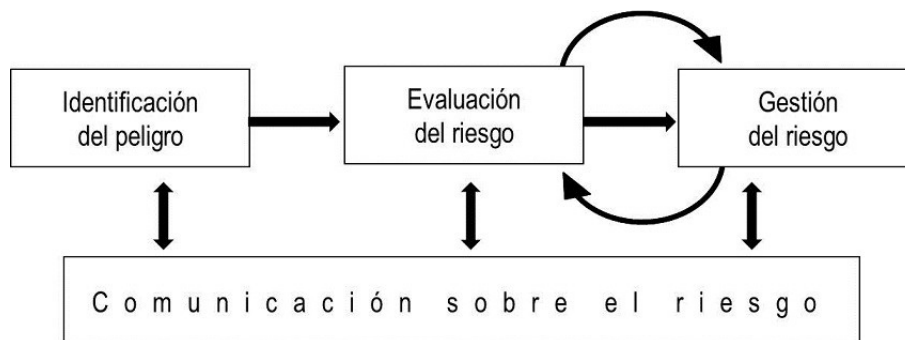
Las importaciones de *animales acuáticos* y *productos de animales acuáticos* implican cierto *riesgo* de *enfermedad* para el *país importador*. Ese *riesgo* pueden constituirlo una *enfermedad* o varias *enfermedades* o *infecciones*.

La principal finalidad del *análisis del riesgo* asociado a las importaciones es proporcionar a los *países importadores* un método objetivo y justificable para evaluar los *riesgos* de *enfermedad* asociados a cualquier importación de *animales acuáticos*, *productos de animales acuáticos*, material genético de *animales acuáticos*, *alimentos para animales*, *productos biológicos* y *material patológico*. Los principios y métodos que se aplican a las *mercancías* constituidas por *animales acuáticos* y a las constituidas por animales terrestres son los mismos. El análisis debe ser transparente para poder dar al *país exportador* una explicación clara y documentada de los motivos que justifican las condiciones impuestas a la importación o el rechazo de ésta.

La transparencia también es esencial por el hecho de que los datos son a menudo inciertos o incompletos y la falta de una documentación completa puede crear confusión entre los hechos y el valor que les concede la persona que los analiza.

En este capítulo se definen las recomendaciones y los principios que permiten realizar *análisis de riesgos* transparentes, objetivos y justificables para el *comercio internacional*. No se pueden dar en él detalles, sin embargo, sobre los medios que conviene utilizar para realizar un *análisis del riesgo*, ya que el objetivo del *Código acuático* es describir simplemente sus etapas fundamentales. Las etapas del *análisis del riesgo* que se describen en este Capítulo son la *identificación del peligro*, la *evaluación del riesgo*, la *gestión del riesgo* y la *comunicación sobre el riesgo* (Figura 1).

Fig. 1. Las cuatro etapas del análisis del riesgo



La *evaluación del riesgo* es la etapa del análisis en que se intentan estimar los *riesgos* asociados a un *peligro*. Una *evaluación del riesgo* puede ser cualitativa o cuantitativa. Muchas *enfermedades*, en particular las que figuran en el *Código acuático*, que contiene normas difundidas y reconocidas internacionalmente, son objeto de un amplio consenso sobre los *riesgos* posibles. En estos casos es más probable que una evaluación cualitativa sea suficiente. La evaluación cualitativa no requiere competencias particulares en materia de modelización matemática y por eso se utiliza con frecuencia para las decisiones corrientes. Ningún método de *evaluación del riesgo* asociado a las importaciones es aplicable a todas las situaciones y, según las circunstancias, un método puede convenir más que otro.

En el proceso de *análisis del riesgo* asociado a las importaciones de *animales acuáticos* y *productos de animales acuáticos* suele ser necesario tener en cuenta los resultados de una evaluación de los *Servicios de sanidad de los animales acuáticos*, la zonificación y la compartimentación, así como los sistemas de *vigilancia* utilizados en el *país exportador* para el seguimiento de las *enfermedades* de los *animales acuáticos*. Estos aspectos se describen en otros capítulos del *Código acuático*.

Anexo 6 (cont.)

Artículo 2.1.2.

Identificación del peligro

La *identificación del peligro* consiste en identificar los *agentes patógenos* que podrían producir efectos perjudiciales al importar una *mercancía*.

Los *peligros posibles* que se identifiquen serán, en principio, los que corresponden a la especie animal que se prevé importar, o de la que deriva la *mercancía*, y que pueden estar presentes en el *país exportador*. Será necesario identificar, por consiguiente, si cada *peligro* potencial existe ya en el *país importador* y si se trata de una *enfermedad de la lista de la OIE* o sujeta a control o erradicación, y asegurarse de que las medidas impuestas a la importación no son más restrictivas para el comercio que las que se aplican en el país.

La *identificación del peligro* es una etapa de clasificación en la que se identifican dicotómicamente los agentes biológicos como *peligros* potenciales o no. La *evaluación del riesgo* debe concluir en esta etapa si no se identifica ningún *peligro* potencial asociado a la importación prevista.

Las evaluaciones de los *Servicios de sanidad de los animales acuáticos*, de los programas de *vigilancia* y control y de los sistemas de zonificación y compartimentación son elementos importantes para evaluar la probabilidad de presencia de *peligros* en la población de *animales acuáticos* del *país exportador*.

Un *país importador* también puede autorizar la importación basándose en las normas sanitarias pertinentes recomendadas por el *Código acuático* y no tendrá entonces necesidad de proceder a una *evaluación del riesgo*.

Artículo 2.1.3.

Principios de la evaluación del riesgo

- 1) La *evaluación del riesgo* debe ser flexible para adaptarse a la complejidad de las situaciones reales. No existe ningún método que se aplique a todos los casos. La *evaluación del riesgo* debe poder tener en cuenta la variedad de *mercancías* que constituyen los *animales acuáticos*, los múltiples *peligros* que se pueden identificar en una importación y la especificidad de cada *enfermedad*, así como los sistemas de detección y *vigilancia*, las condiciones de exposición y los tipos y cantidades de datos y de información.
- 2) Son válidos tanto el método de evaluación cualitativa como el de evaluación cuantitativa del riesgo.
- 3) La *evaluación del riesgo* debe basarse en la información científica disponible más actualizada. Debe estar debidamente documentada y sustentada por referencias a publicaciones científicas y a otras fuentes, incluida la opinión de expertos.
- 4) La coherencia y la transparencia de los métodos de *evaluación del riesgo* son esenciales para garantizar la imparcialidad y racionalidad de la evaluación, la coherencia de las decisiones y la facilidad de comprensión por todas las partes interesadas.
- 5) Las *evaluaciones del riesgo* deben dar cuenta de las incertidumbres y las hipótesis formuladas, así como de su influencia en el resultado final.
- 6) El *riesgo* es mayor cuanto mayor es la cantidad de *mercancías* importadas.
- 7) Debe ser posible actualizar la *evaluación del riesgo* en caso de que se obtenga información complementaria.

Artículo 2.1.4.

Etapas de la evaluación del riesgo1. Evaluación del riesgo de introducción

La evaluación del riesgo de introducción consiste en describir el(los) proceso(s) biológico(s) necesario(s) para que una actividad de importación provoque la introducción de un agente patógeno en un medio determinado, y en estimar la probabilidad de que se desarrolle el proceso completo, o bien cualitativamente (en forma de texto) o bien cuantitativamente (en forma de estimación numérica). La evaluación del riesgo de introducción describe la probabilidad de introducción de cada uno de los ~~posibles~~ *peligros* (los agentes patógenos) en cada circunstancia, en función de las cantidades y del momento, así como los cambios que pueden resultar de diversas acciones, circunstancias o medidas. Entre los parámetros que pueden ser necesarios para la evaluación del riesgo de la introducción, cabe citar:

- a) Factores biológicos
 - Especie, cepa o genotipo y edad del *animal acuático*,
 - cepa del agente,
 - tejidos en que se produce la *infección* y/o la contaminación,
 - eficacia de la vacunación, de las pruebas de diagnóstico, del tratamiento y de la *cuarentena*.
- b) Factores relacionados con el país
 - *Incidencia/prevalencia*,
 - evaluación de los *Servicios de sanidad de los animales acuáticos*, de los programas de *vigilancia* y control y de los sistemas de zonificación y compartimentación del *país exportador*.
- c) Factores relacionados con la mercancía
 - Estado de la *mercancía* (viva o muerta),
 - cantidad de *mercancía* que se prevé importar,
 - facilidad de contaminación por el agente,
 - efecto de los procedimientos de transformación en el *agente patógeno* presente en la *mercancía*,
 - efecto del almacenamiento y del transporte en el *agente patógeno* presente en la *mercancía*.

Si la evaluación del riesgo de introducción no pone de manifiesto ningún *riesgo* significativo, la *evaluación del riesgo* concluye ahí.

2. Evaluación de la exposición

La evaluación de la exposición consiste en describir el(los) proceso(s) biológico(s) necesario(s) para que los animales y las personas del *país importador* se vean expuestos a los *peligros* (en este caso a los agentes patógenos) de una fuente de *riesgo* determinada, y en estimar la probabilidad de advenimiento de esa exposición, o bien cualitativamente (en forma de texto) o bien cuantitativamente (en forma de estimación numérica).

La probabilidad de exposición a los *peligros* identificados se estima con relación a determinadas condiciones de exposición, en función de las cantidades, el momento, la frecuencia, la duración de la exposición, las vías de exposición y del número, la especie y otras características de la población animal y humana expuesta a los *peligros*. Entre los parámetros necesarios para la evaluación de la exposición, cabe citar:

Anexo 6 (cont.)

- a) Factores biológicos
 - Propiedades del *agente patógeno* (virulencia, patogenicidad y parámetros de supervivencia),
 - genotipo del huésped.
- b) Factores relacionados con el país
 - Presencia de posibles vectores o huéspedes intermediarios,
 - demografía de los *animales acuáticos* (presencia de *especies susceptibles* o reservorio conocidas y distribución de las mismas),
 - demografía humana y de los animales terrestres (posible presencia de buitres o de aves piscívoras),
 - usos y costumbres,
 - características geográficas y medioambientales (datos hidrográficos, variaciones de temperatura, corrientes de agua).
- c) Factores relacionados con la mercancía
 - Estado de la *mercancía* (viva o muerta),
 - cantidad de *mercancía* que se prevé importar,
 - uso previsto de los *animales acuáticos* o *productos de animales acuáticos* importados (consumo nacional, repoblación, incorporación a los *alimentos para animales* o utilización como cebo),
 - métodos de eliminación de los despojos.

Si la evaluación de la exposición no pone de manifiesto ningún *riesgo* significativo, la *evaluación del riesgo* puede concluir ahí.

3. Evaluación de las consecuencias

La evaluación de las consecuencias consiste en describir la relación existente entre las exposiciones especificadas a un agente biológico y las consecuencias de estas exposiciones. Debe existir una causa por la que las exposiciones tienen consecuencias sanitarias o medioambientales perjudiciales, que a su vez pueden comportar consecuencias socioeconómicas. La evaluación de las consecuencias describe las posibles consecuencias de una exposición dada y realiza una estimación de la probabilidad de que se produzcan. Esta estimación puede ser o bien cualitativa (en forma de texto) o bien cuantitativa (en forma de estimación numérica). Entre las consecuencias, cabe citar:

- a) Consecuencias directas
 - Pérdidas de producción y cierre de empresas por *infección* o *enfermedad* de los *animales acuáticos*,
 - consecuencias para la salud pública.
- b) Consecuencias indirectas
 - Gastos de *vigilancia* y control,
 - gastos de indemnización,
 - pérdidas de posibles operaciones comerciales.
 - consecuencias adversas, y posiblemente irreversibles, para el medioambiente.

4. Estimación del riesgo

La estimación del *riesgo* consiste en sumar los resultados de la evaluación del riesgo de introducción, la evaluación de la exposición y la evaluación de las consecuencias para medir todos los *riesgos* asociados a los *peligros* identificados al principio. Así pues, la estimación del *riesgo* toma en cuenta todo el proceso de materialización de un *riesgo*, desde el *peligro* identificado hasta el efecto indeseable.

Los resultados finales de una evaluación cuantitativa pueden incluir:

- una evaluación de las poblaciones de *animales acuáticos* y/o una estimación del número de *establecimientos de acuicultura* o de personas que pueden tener problemas de salud más o menos graves a lo largo del tiempo;
- las distribuciones de probabilidades, los intervalos de confianza y otros medios de expresión de la incertidumbre en este tipo de estimaciones;
- la representación de la variancia de todos los parámetros iniciales del modelo;
- un análisis de sensibilidad para clasificar los parámetros en función de su contribución a la variancia de los resultados de la estimación del *riesgo*;
- el análisis de la interdependencia y correlación de los parámetros.

Artículo 2.1.5.

Principios de la gestión del riesgo

- 1) La *gestión del riesgo* es el proceso que consiste en decidir y aplicar medidas para hacer frente a los *riesgos* identificados en la *evaluación del riesgo* que permiten alcanzar el nivel de protección que el País miembro considera apropiado, y en asegurarse al mismo tiempo de que los efectos negativos de esas medidas en el comercio son mínimos. El objetivo es llegar a establecer el equilibrio entre la voluntad de un país de reducir al mínimo la probabilidad o la frecuencia de introducción de *enfermedades*, así como de sus consecuencias, y su deseo de importar *mercancías* y de cumplir con las obligaciones impuestas por los acuerdos sobre *comercio internacional*.
- 2) Las normas internacionales de la OIE son las *medidas sanitarias* recomendadas para la *gestión del riesgo*. La aplicación de estas medidas sanitarias debe atenerse a los objetivos de las normas.

Artículo 2.1.6.

Componentes de la gestión del riesgo

- 1) *Apreciación del riesgo* - el proceso que consiste en comparar el nivel de *riesgo* estimado por la *evaluación del riesgo* con la reducción del *riesgo* que se espera de las medidas de *gestión del riesgo* propuestas con el nivel de protección considerado apropiado por el País miembro.
- 2) *Evaluación de las opciones* - el proceso que consiste en identificar, evaluar en términos de eficacia y factibilidad y seleccionar *medidas sanitarias* para reducir el *riesgo* asociado a una importación con el fin de adaptarse al nivel de protección considerado apropiado por el País miembro. La eficacia de una opción es el grado en que ésta reduce la probabilidad o la magnitud de las consecuencias sanitarias y económicas perjudiciales. La evaluación de la eficacia de las opciones seleccionadas es un proceso iterativo que implica la inclusión de esas opciones en la *evaluación del riesgo* y la posterior comparación del nivel de *riesgo* obtenido con el que se considera aceptable. La evaluación de la factibilidad se concentra normalmente en factores técnicos, operativos y económicos relacionados con la aplicación de las opciones de *gestión del riesgo*.
- 3) *Aplicación* - el proceso que consiste en llevar a cabo la decisión de *gestión del riesgo* y en velar por la aplicación de las medidas prescritas.

Anexo 6 (cont.)

- 4) Control continuo y revisión - el proceso ininterrumpido por el que se verifican continuamente las medidas de *gestión del riesgo* para asegurarse de que están dando los resultados esperados.

Artículo 2.1.7.

Principios de la información sobre el riesgo

- 1) La *comunicación sobre el riesgo* es el proceso por el que se recaba información y opiniones de partes potencialmente afectadas o interesadas acerca de los *peligros* y *riesgos* durante un *análisis de riesgos*, y por el que se comunican los resultados de la *evaluación del riesgo* y se proponen medidas de *gestión del riesgo* a quienes toman las decisiones y a las partes interesadas del *país importador* y del *país exportador*. Es un proceso multidimensional e iterativo que debería comenzar al principio del *análisis de riesgos* y continuar hasta el final.
- 2) Cada vez que se emprende un *análisis de riesgos* debe definirse una estrategia de *comunicación sobre el riesgo*.
- 3) La *comunicación sobre el riesgo* debe ser un intercambio de información abierto, interactivo, iterativo y transparente que puede prolongarse después de la decisión sobre la importación.
- 4) Los principales participantes en la *comunicación sobre el riesgo* son las autoridades del *país exportador* y otras partes interesadas, como los acuicultores nacionales, los pescadores aficionados y profesionales, las asociaciones de protección de la fauna silvestre, las asociaciones de consumidores y los grupos industriales nacionales y extranjeros.
- 5) Las hipótesis y la incertidumbre del modelo y de los parámetros iniciales, así como los resultados de la *evaluación del riesgo*, deben formar parte de la *información*.
- 6) La *comunicación sobre el riesgo* debe ser sometida a una revisión por pares, a fin de obtener a una crítica científica y garantizar que los datos, la información, los métodos y las hipótesis son los mejores posibles.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 4.X.

RECOMENDACIONES PARA LA DESINFECCIÓN
DE LA SUPERFICIE DE HUEVOS DE SALMÓNIDOS

Artículo 4.X.1.

Introducción

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

Los *huevos* de salmónidos se pueden desinfectar utilizando un cierto número de agentes químicos; sin embargo, el método más comúnmente utilizado es la *desinfección* con povidona yodada, un producto a base de yodo. ~~Se deberán aplicar distintos protocolos según la etapa de desarrollo del huevo.~~

Los iodóforos, ~~comúnmente soluciones de povidona yodada~~, ~~se usan comúnmente como desinfectantes para tratar los huevos de salmónidos.~~ Tienen la ventaja de suministrar un pH neutro, no ser irritantes y ser poco tóxicos. El pH neutro es importante para minimizar la toxicidad y lograr una mayor eficacia. ~~Se recomienda seguir las instrucciones del fabricante para identificar las circunstancias donde el pH se considere pertinente.~~ Los ~~iodóforos más utilizados son las soluciones de povidona yodada, por su baja toxicidad y pH neutro en la mayoría de las circunstancias.~~ Si se utilizan otros agentes con contenido de yodo para la *desinfección*, es esencial que hayan sido adecuadamente tamponados.

Artículo 4.X.2.

Protocolo de desinfección para los huevos de salmónidos

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

~~Para desinfectar~~ Los *huevos* de salmónidos ~~deberán someterse al~~ ~~se deberá seguir el~~ siguiente protocolo de *desinfección*:

- 1) enjuague con una solución salina al 0,9% ~~libre de agentes patógenos~~ (30–60 segundos) para quitar los restos orgánicos;
- 2) inmersión en una solución yodada de 100 ppm de yodo disponible durante un mínimo de 10 minutos. La solución yodada se debe utilizar sólo una vez. La proporción de huevos respecto a la solución yodada deberá ser como mínimo de 1:4;
- 3) nuevo enjuague en una solución salina al 0,9% ~~libre de agentes patógenos~~ durante 30–60 segundos;
- 4) mantenimiento en agua libre de agentes patógenos.

Anexo 7 (cont.)

Todas las soluciones de enjuague y desinfección deberán prepararse usando agua libre de agentes patógenos. Las soluciones podrán tamponarse con 100 mg de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) por litro de solución yodada si el pH es bajo.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 4.7.

CONTROL DE LOS AGENTES PATÓGENOS EN LOS ALIMENTOS PARA ANIMALES ACUÁTICOS

Artículo 4.7.1.

Introducción

Los *alimentos para animales* (o *piensos*) pueden representar una fuente de *enfermedades* infecciosas en los *animales acuáticos*.

Dado que, a menudo, los *animales acuáticos* son uno de los principales *ingredientes de alimentos* para los propios *animales acuáticos*, y que el uso de *alimentos* o *piensos* semielaborados, crudos o vivos o sin elaborar constituye una práctica común, es necesario se deberá examinar el *riesgo* de transmisión de *enfermedad* a través de los *alimentos*.

Artículo 4.7.2.

Ámbito de aplicación

El propósito de este capítulo es tratar la transmisión de *enfermedades* infecciosas de los *animales acuáticos* a través de los *alimentos* para prevenir la entrada y la propagación en un país, una *zona* o un *compartimento* libres de los *agentes patógenos* causantes de tales *enfermedades*.

Este capítulo se aplica a la elaboración y el uso de todos los productos destinados a los *alimentos* y a los *ingredientes de alimentos*, ya sea que se produzcan en la explotación o con fines comerciales.

Los principios del *análisis del riesgo* (de acuerdo con el Capítulo 2.1.) deberán aplicarse para determinar los *riesgos* asociados a la producción y el uso de *alimentos* en los *animales acuáticos*.

Este capítulo complementa las orientaciones establecidas por el Código de Prácticas del Codex sobre Buena Alimentación Animal (CAC/RCP 54-2004).

Artículo 4.7.3.

Responsabilidades

La *autoridad competente* tiene la responsabilidad de establecer y hacer cumplir los requisitos reglamentarios relacionados con la alimentación animal, y verificar el cumplimiento de dichos requisitos. Asimismo, ha de aumentar el conocimiento de los *riesgos* relacionados con el uso en la *acuicultura* de *alimentos* semielaborados y no elaborados.

Los productores de *alimentos* tienen la responsabilidad de garantizar que su producción se efectúe de manera en que se prevenga la propagación de enfermedades de los animales acuáticos, cumpla con los requisitos reglamentarios. Se deberán establecer registros y planes de urgencia para determinar el origen de los productos que no sean conformes, poder retirarlos o destruirlos. Todo el personal que intervenga en la cría, la fabricación, el transporte, el almacenamiento y la manipulación de *alimentos* e *ingredientes de alimentos* deberá estar debidamente capacitado y ser consciente de su función y su responsabilidad en la prevención de la introducción o la propagación de enfermedades infecciosas de los *animales acuáticos*. Los equipos destinados a la producción, almacenamiento y transporte de los *alimentos* y los *ingredientes de alimentos* deberán mantenerse limpios y en funcionamiento.

Los propietarios y responsables de la gestión de los *establecimientos de acuicultura* deberán respetar los requisitos reglamentarios e implementar planes de bioseguridad programas sanitarios en sus granjas para enfrentar los *riesgos* relacionados con el uso de *alimentos* semielaborados, crudos o vivos, y no elaborados. Esto se puede llevar a cabo a través de la identificación de las fuentes de alimentos libres de enfermedad y registros que indiquen la fuente de los alimentos con fines de trazabilidad, implementación de medidas de mitigación del riesgo en la explotación y detección temprana de *enfermedades* infecciosas.

Se podrá requerir que los veterinarios del sector privado y otros *profesionales de sanidad para los animales acuáticos* que brindan servicios especializados a los productores y a la industria de los *alimentos* cumplan con los requisitos reglamentarios asociados a los servicios que suministran (por ejemplo, notificación de *enfermedades*, normas de calidad y transparencia).

Anexo 8 (cont.)

Artículo 4.7.4.

Peligros asociados con la alimentación de los animales acuáticos

Los peligros biológicos que pueden estar presentes en asociados a los *alimentos* e *ingredientes de alimentos* incluyen *agentes patógenos* como bacterias, virus, hongos y parásitos. El alcance de estas recomendaciones abarca las *enfermedades* de la lista de la OIE y otros *agentes patógenos* que causan un efecto adverso en la sanidad de los *animales acuáticos*.

Los peligros químicos y físicos asociados con los *alimentos* y los *ingredientes de alimentos* no figuran en este capítulo.

La resistencia a los antimicrobianos derivada del uso de *agentes antimicrobianos* en los *alimentos* se trata en el Título 6.

Artículo 4.7.5.

Vías de riesgo y exposición

Los *alimentos para animales* pueden contaminarse por *agentes patógenos* presentes en el momento de la producción, transporte, almacenamiento y procesamiento de *mercancías* utilizadas como *ingredientes de alimentos*. La contaminación también puede ocurrir durante su fabricación, transporte, almacenamiento y uso. Las prácticas de higiene deficientes durante el procesamiento y la fabricación, el transporte y el almacenamiento constituyen fuentes potenciales de contaminación por *agentes patógenos*.

Los *animales acuáticos* pueden estar expuestos directamente a los *agentes patógenos* presentes en los *alimentos para animales*. Los *animales acuáticos* también pueden estar expuestos indirectamente a través de la contaminación del entorno por los *alimentos*.

Artículo 4.7.6.

Gestión del riesgo1. Uso de los alimentos y de los ingredientes de alimentos seguros provenientes de cualquier tipo de fuente

Algunas *mercancías* son objeto de un procesamiento significativo como tratamiento térmico, acidificación, extrusión y extracción. Existe una a probabilidad riesgo insignificante de que los *agentes patógenos* sobrevivan en los productos que se han preparado respetando las Buenas Prácticas de Fabricación.

Los criterios indicados en el Capítulo 5.4. se pueden utilizar para evaluar la seguridad de las *mercancías* que servirán de base a los se utilizarán como alimento para animales o *ingredientes de alimentos*.

El Artículo X.X.3. de todos los capítulos sobre enfermedades específicas de los Títulos 8 a 11 enumeran las *mercancías* consideradas como seguras para cualquier finalidad, incluyendo el uso como *alimento para animales* o *ingrediente de alimentos*.

Las *autoridades competentes* también deberán conocer el origen de los *alimentos* e *ingredientes de alimentos* de un país, una *zona* o un *compartimento* libres de un determinado *agente patógeno*.

2. Uso de alimentos para animales e ingredientes de alimentos cuyo lugar de origen puede no estar libre de un determinado agente patógeno

Al utilizar *alimentos para animales* e *ingredientes de alimentos* cuyo origen puede no estar libre de determinados *agentes patógenos*, las *autoridades competentes* deberán aplicar las siguientes medidas de mitigación del riesgo:

- a) tratamiento (por ejemplo, térmico o acidificación) de la *mercancía* utilizando un método aprobado por la *autoridad competente* para inactivar el o los *agentes patógenos* como indicado en los artículos X.X.10. (para el Capítulo 10.4. consultar el Artículo 10.4.174.) de todos los capítulos sobre enfermedades en los Títulos 8 a 11; o
- b) confirmación (por ejemplo, mediante pruebas) de que los *agentes patógenos* no están presentes en la *mercancía*; o
- c) uso de los *alimentos para animales* sólo en poblaciones que no son susceptibles al o los *agentes patógenos* en cuestión y cuando las *especies susceptibles* no entren en contacto con los *alimentos* o los residuos de los mismos.

3. Producción de alimentos

Para prevenir la contaminación por *agentes patógenos* durante el procesamiento, la fabricación, el almacenamiento y el transporte de *alimentos para animales* e *ingredientes de alimentos*, se recomienda que:

- a) se efectúe una limpieza con chorro de agua, secuenciación o limpieza en vacío de las líneas de producción y las instalaciones de almacenamiento entre cada lote cuando corresponda;
- b) se construyan los edificios y equipos destinados al procesamiento y el transporte de *alimentos* e *ingredientes de alimentos* de forma que se faciliten las operaciones de higiene, mantenimiento y limpieza y se prevenga la contaminación;
- c) se diseñen y organicen las plantas de fabricación de *alimentos* de manera que se evite la contaminación cruzada entre lotes;
- d) se almacenen los *alimentos* e *ingredientes de alimentos* procesados por separado de los *ingredientes de alimentos* sin procesar;
- e) se mantengan limpios los *alimentos* y los *ingredientes de alimentos*, las instalaciones de almacenamiento y su entorno inmediato;
- f) se apliquen medidas para inactivar los *agentes patógenos*, como el tratamiento térmico, si es necesario;
- g) se coloquen etiquetas para la identificación de los *alimentos* e *ingredientes de alimentos* en el lote, con el lugar y la fecha de fabricación para permitir la trazabilidad de los *alimentos* e *ingredientes de alimentos*.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 5.1.

OBLIGACIONES GENERALES
EN MATERIA DE CERTIFICACIÓN

Artículo 5.1.1.

Se debe tomar en cuenta un conjunto de factores para facilitar el *comercio internacional* de *animales acuáticos* y *productos de animales acuáticos*, sin que ello implique *riesgos* inaceptables para la salud pública y para la salud de los *animales acuáticos*.

Dada la diferencia de situaciones zoonositarias entre países, el *Código acuático* propone diversas opciones. Antes de determinar las condiciones para el comercio, se debe considerar la situación zoonositaria del *país exportador*, del o de los *países de tránsito* y del *país importador*. Para armonizar en la mayor medida posible los aspectos del *comercio internacional* relativos a la salud de los *animales acuáticos*, las *Autoridades competentes* de los Países miembros deben basar sus condiciones para la importación en las normas de la OIE.

Dichas condiciones deben figurar en certificados redactados según los modelos de *certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos* que figuran en el Capítulo 5.11.

Las ~~condiciones estipuladas certificación~~ deberán ser precisas y concisas y expresar claramente las condiciones del *país importador*. Para ello será necesaria una concertación previa entre las *Autoridades competentes* de los *países importadores* y *exportadores* que contribuirá a determinar los requisitos concretos de la certificación.

Los certificados deberán expedirse y firmarse por un *único certificador oficial competente*, autorizado por la *Autoridad competente* para llevar a cabo inspecciones, y deberán ratificarse mediante la firma o el sello oficial de la *Autoridad competente*. Los requisitos de certificación no deberán incluir condiciones de *enfermedades* que no se transmitan por el producto en cuestión. El certificado deberá firmarse de conformidad con lo dispuesto en el Capítulo 5.2.

Si los representantes de una *Autoridad competente* desean visitar otro país por motivos profesionales que interesan a la *Autoridad competente* de ese otro país, esta última deberá ser informada de la visita. Conviene prever de antemano la visita según el acuerdo suscrito entre las *Autoridades competentes* interesadas.

Artículo 5.1.2.

Responsabilidades del país importador

- 1) Los requisitos de importación que figuran en el *certificado veterinario internacional aplicable a los animales acuáticos* deberán garantizar que las *mercancías* introducidas en el *país importador* cumplen las normas de la OIE. Los *países importadores* deberán ~~adaptar/limitar~~ sus requisitos ~~a aquellos recomendados en con las recomendaciones de~~ las normas pertinentes de la OIE ~~que sean necesarios para alcanzar el nivel de protección nacional adecuado. Si tal norma recomendación no existe o si el país elige un nivel de protección que requiere medidas Si éstos son más estrictos que superen~~ las normas de la OIE, las mismas deberán basarse en un *análisis del riesgo* asociado a la importación ~~realizado de conformidad con el Capítulo 2.1.~~
- 2) Entre los requisitos exigidos en el *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* no deberá figurar el de ausencia de *agentes patógenos* o *enfermedades* de los *animales acuáticos* que estén presentes en el *territorio* del *país importador* y no sean objeto de un programa oficial de control, ~~salve cuando la patogenicidad de la cepa en el país exportador es muy superior o si su gama de hospedadores es muy amplia, o en ambos casos.~~ Las medidas impuestas a las importaciones para la gestión de los *riesgos* asociados a determinado *agente patógeno* o a determinada *enfermedad* no deben exigir un nivel de protección superior al que confieren las medidas del programa oficial de control que se aplica en el *país importador*. Las medidas impuestas a las importaciones para la gestión de los *riesgos* asociados a determinado agente patógeno o a determinada *enfermedad* ~~no deben sobrepasar ser más estrictas exigir un nivel de protección superior al que aquellas que se aplican como parte del confieren las medidas del programa oficial de control que se aplica en del~~ *país importador*.

Anexo 9 (cont.)

- 3) El *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* no incluirá medidas contra *agentes patógenos* o *enfermedades* que no figuren en la lista de la OIE, a no ser que el *país importador* haya demostrado que el *agente patógeno* o la *enfermedad* entraña un *riesgo* significativo para este país, tras realizar un *análisis de riesgos* de las importaciones, de conformidad con el Título 2.
- 4) La transmisión por parte de la *Autoridad competente* del *país importador* de requisitos o certificados de importación o la comunicación de las condiciones exigidas en materia de importación a personas que no sean la *Autoridad competente* de otro país exigirá que se envíen también copias de los referidos documentos a la *Autoridad competente* del *país exportador*. Con esta importante norma se evitarán los retrasos y dificultades que pueden surgir entre los negociantes y las *Autoridades competentes* cuando no está establecida la autenticidad de los certificados o de las licencias.

La responsabilidad de esta información suele incumbir a las *Autoridades competentes* del *país exportador*, podrá, sin embargo, incumbir a *veterinarios* del sector privado de los lugares de origen de las *mercancías*, siempre y cuando se haya obtenido la aprobación y autenticación de las *Autoridades competentes*.

- 5) Puede ocurrir que cambie el destinatario, la identificación del medio de transporte o el *puesto fronterizo* después de haber expedido el certificado. Por ser cambios que no modifican el estado sanitario de la remesa, ninguno de ellos deberá impedir que se acepte el certificado.

Artículo 5.1.3.

Responsabilidades del país exportador

- 1) Cualquier *país exportador* deberá estar dispuesto a facilitar al *país importador*, siempre que éste lo solicite, datos sobre:
 - a) su situación zoonosanitaria y sus sistemas nacionales de información sobre *enfermedades* de los *animales acuáticos*, con el fin de determinar si está libre o dispone de *zonas libres* o *compartimentos libres* de las *enfermedades de la lista de la OIE*, y sobre el método seguido para lograr la ausencia de *enfermedad*, por ejemplo, ausencia histórica o ausencia de *especies susceptibles* o de *vigilancia* específica, así como sobre la regulación y los procedimientos vigentes para mantener esa situación;
 - b) la aparición de *enfermedades de la lista de la OIE*, que deberá comunicar con regularidad y rapidez;
 - c) su capacidad para aplicar medidas de prevención y control de las *enfermedades de la lista de la OIE*;
 - d) la estructura de la *Autoridad competente* y los poderes de que ésta dispone;
 - e) las técnicas que utiliza, y en particular sobre las pruebas biológicas y las vacunas utilizadas en la totalidad o parte de su *territorio*.
- 2) Las *Autoridades competentes* de los *países exportadores* deberán:
 - a) disponer de procedimientos oficiales de autorización de los *certificadores oficiales* que definan sus funciones y deberes, así como las condiciones de supervisión y responsabilización, incluida la posibilidad de ser privados temporal o definitivamente de autorización;
 - b) asegurarse de que los *certificadores oficiales* reciben las instrucciones y la formación necesarias;
 - c) vigilar la actividad de los *certificadores oficiales* para comprobar su integridad y su imparcialidad.
- 3) La *Autoridad competente* del *país exportador* es responsable en última instancia del certificado utilizado en una operación de *comercio internacional*

Artículo 5.1.4.

Responsabilidades en caso de incidente relacionado con una importación

- 1) El *comercio internacional* implica una responsabilidad ética permanente. Por consiguiente, si dentro de un periodo razonable con posterioridad a una exportación, la *Autoridad competente* tiene conocimiento de que ha aparecido o reaparecido una *enfermedad* expresamente mencionada en el *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, o cualquier otra *enfermedad* que revista importancia epidemiológica para el *país importador*, dicha *Autoridad competente* tendrá la obligación de notificar el caso al *país importador*, para que las *mercancías* importadas puedan ser inspeccionados o sometidos a pruebas y se adopten las medidas pertinentes para limitar la propagación de la *enfermedad* si ha sido introducida inadvertidamente.

Anexo 9 (cont.)

- 2) En caso de aparición de una *enfermedad* en *animales acuáticos* importados, dentro de un período razonable posterior a la importación, la *Autoridad competente* del *país exportador* deberá ser informada para que pueda realizar una investigación, ya que puede tratarse de la primera información disponible sobre la presencia de la *enfermedad* en una población de *animales acuáticos* anteriormente libre de ella. La *Autoridad competente* del *país importador* deberá ser informada del resultado de la investigación, pues puede que el origen de la *infección* no esté en el *país exportador*.
- 3) ~~En caso de sospecha, razonablemente fundada, de que un certificado oficial sea fraudulento, las *Autoridades competentes* del *país importador* y del *país exportador* deberán proceder a una investigación. Deberán considerar también la necesidad de notificar el hecho a terceros países que puedan verse afectados. Todos los lotes asociados a la sospecha deberán mantenerse bajo control oficial, en espera del resultado de la investigación. Las *Autoridades competentes* de todos los países interesados deberán cooperar plenamente con la investigación. Si se demuestra que el certificado es fraudulento, se hará todo lo posible por identificar a los responsables y tomar las medidas apropiadas en virtud de la legislación pertinente.~~

Si aparece una *enfermedad* en los *animales acuáticos* en el *país importador* asociada con la importación de *mercancías*, deberá notificarse el hecho a la *Autoridad competente* del *país exportador* para que pueda efectuar una investigación, ya que puede tratarse de la primera información disponible relativa a la aparición de la *enfermedad* en una población de *animales acuáticos* anteriormente libre de la misma.

- 4) En caso de que se tengan motivos para sospechar la falsificación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, las *Autoridades competentes* del *país importador* y del *país exportador* procederán a una investigación. También se notificará la sospecha a cualquier tercer país concernido. Todas las remesas relacionadas con el certificado deberán permanecer bajo control oficial hasta que se conozca el resultado de la investigación. Las *Autoridades competentes* de todos los países concernidos deberán colaborar en la investigación. Si el *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos* resulta ser falso, se hará todo lo posible por identificar a los responsables y tomar las medidas previstas por la legislación pertinente.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 5.2.

PROCEDIMIENTOS DE CERTIFICACIÓN

Artículo 5.2.1.

Protección de la integridad profesional de los certificadores oficiales

La certificación deberá basarse en normas éticas rigurosas, la principal de las cuales será el respeto y amparo de la integridad profesional del *certificador oficial*.

Será fundamental incluir en el certificado únicamente aquellos requisitos específicos que puedan ser reconocidos con precisión y plena conciencia por un *certificador oficial*. No deberá exigirse, por ejemplo, que se certifique que una zona está libre de *enfermedades* que no son de declaración obligatoria en el *país importador* y de cuya existencia el *certificador oficial* firmante no está necesariamente informado. Será inaceptable exigir que se certifiquen hechos que tendrán lugar después de la firma del documento y que, por lo tanto, no están bajo el control ni la inspección directa del *certificador oficial* firmante.

Artículo 5.2.2.

Certificadores oficiales

Los *certificadores oficiales* deberán:

- 1) estar autorizados por la *Autoridad competente* del *país exportador* para firmar los *certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos*;
- 2) certificar exclusivamente hechos de los que tengan conocimiento en el momento de firmar el certificado o de los que haya dado testimonio otra persona ~~competente~~ autorizada por la *Autoridad competente*;
- 3) firmar solamente en el momento oportuno certificados que estén correcta y completamente cumplimentados; cuando los *certificadores oficiales* firmen un certificado a partir de otros justificantes, deberán haber comprobado o poseer los justificantes antes de firmar el certificado;
- 4) no tener ningún conflicto de intereses con los aspectos comerciales vinculados a los *animales acuáticos* o *productos de animales acuáticos* objeto del certificado y ser independientes de las partes comerciales interesadas.

Artículo 5.2.3.

Preparación de los certificados sanitarios internacionales aplicables a los animales acuáticos

Los certificados se establecerán de conformidad con los principios siguientes:

- 1) Los certificados se diseñarán de forma que reduzca al mínimo la posibilidad de falsificarlos, lo que implica dotarlos de un número de identificación exclusivo y utilizar otros medios de seguridad apropiados. Los certificados impresos en papel deberán llevar la firma del *certificador oficial* y el sello oficial de identificación de la *Autoridad competente* que los expide. En el caso de certificados de varias páginas, cada página deberá llevar el número exclusivo del certificado y el número de página correspondiente. Los procedimientos de certificación electrónica deberán incluir garantías equivalentes.
- 2) Los certificados deberán redactarse utilizando términos sencillos, claros y lo más comprensibles posible, sin dejar de tener por ello fuerza legal.
- 3) Los certificados deberán estar escritos en el idioma del *país importador*, si éste lo solicita. En ese caso deberán estar escritos también en un idioma que comprenda el *certificador oficial*.

Anexo 10 (cont.)

- 4) Los certificados deberán prever la mención de una identificación apropiada de los *animales acuáticos* y *productos de animales acuáticos*, salvo si esa operación es irrealizable (*huevos embrionados*, por ejemplo).
- 5) Los certificados no deberán prever la certificación de hechos que un *certificador oficial* desconozca o no pueda comprobar y confirmar.
- 6) Los certificados deberán ser entregados al *certificador oficial* acompañados, si procede, de notas de instrucciones sobre las investigaciones, los exámenes y las pruebas que es preciso realizar antes de firmar el certificado.
- 7) El texto de un certificado no deberá ser enmendado, excepto por tachaduras, las cuales deberán ser selladas y firmadas por el *certificador oficial*.
- 8) La firma y el sello deberán ser de un color distinto del utilizado para imprimir el certificado. El sello podrá ser en relieve en lugar de tener un color diferente.
- 9) Sólo se aceptarán los certificados originales por el *país importador*.
- 10) La *Autoridad competente* podrá expedir certificados de sustitución para reemplazar certificados que se hayan perdido, deteriorado, contengan errores o en los que figuren datos que ya no sean correctos, por ejemplo. Estos certificados deberán llevar una marca que indique claramente que son certificados de sustitución. En ellos deberá figurar el número y la fecha de expedición del certificado original. El certificado original se anulará y, si fuere posible, se devolverá a la autoridad que lo ha expedido.

Artículo 5.2.4.

Certificación electrónica

- 1) Los certificados podrán presentarse en forma de ~~documentos electrónicos~~ intercambio de datos enviados directamente por la *Autoridad competente* del *país exportador* a la del *país importador*.
 - a) Los sistemas que proporcionan certificados electrónicos suelen poseer una interfaz con las empresas que comercializan las *mercancías* para que esas empresas suministren información a la autoridad encargada de la certificación. El *certificador oficial* deberá tener acceso a toda la información que juzgue necesaria, como el origen de los *animales acuáticos* y los resultados de laboratorio.
 - b) Al intercambiar certificados electrónicos y con el fin de utilizar plenamente el intercambio de datos electrónicos, las *Autoridades competentes* deberán emplear el lenguaje, la estructura de mensaje y los protocolos de intercambio normalizados internacionalmente. El Centro de las Naciones Unidas de Facilitación del Comercio y de las Transacciones Electrónicas (CEFACT-ONU) proporciona directrices para la certificación electrónica en el lenguaje extensible de marcas normalizado (**sistemas XML**) **del Consorcio World Wide Web (W3C)**, así como mecanismos de intercambio seguro entre *Autoridades competentes*.
 - c) Un método seguro de intercambio electrónico de datos deberá garantizar la autenticación digital de los certificados, la codificación, los mecanismos de rechazo, el control y la verificación del acceso y cortafuegos.

- 2) Los certificados electrónicos deberán contener la misma información que los certificados convencionales.
- 3) La *Autoridad competente* deberá establecer sistemas de seguridad que impidan el acceso de personas u organizaciones no autorizadas a los certificados electrónicos.
- 4) El *certificador oficial* deberá asumir oficialmente la responsabilidad de proteger su firma electrónica.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 6.5.

ANÁLISIS DEL RIESGO ASOCIADO A LA RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS COMO CONSECUENCIA DE SU USO EN ANIMALES ACUÁTICOS

Artículo 6.5.1.

Recomendaciones para analizar los riesgos para la salud humana y la sanidad de los animales acuáticos que entrañan los microorganismos de origen animal resistentes a los agentes antimicrobianos

1. Introducción

La resistencia a los *agentes antimicrobianos* es un fenómeno que se produce naturalmente y que está influenciado por muchos factores. No obstante, la principal causa para la selección y diseminación de microorganismos resistentes es la utilización de agentes antimicrobianos en cualquier situación, incluido el uso en el hombre, los animales y demás utilizaciones (en estudio). Los problemas relacionados con la resistencia a los *agentes antimicrobianos* están intrínsecamente relacionados con el uso de *agentes antimicrobianos* en cualquier entorno, ya sea humano o no humano.

La resistencia a los *agentes antimicrobianos* derivada de la administración de *agentes antimicrobianos* con fines terapéuticos o no terapéuticos ha inducido la selección y diseminación de microorganismos resistentes a los *agentes antimicrobianos*, y la consecuente pérdida de eficacia terapéutica de uno o varios *agentes antimicrobianos*, tanto en la medicina humana como en veterinaria.

2. Objetivo

A efectos del presente capítulo, el principal objetivo del *análisis del riesgo* es ofrecer a los Países miembros un método transparente, objetivo y justificable científicamente para proceder a la *evaluación y gestión de los riesgos* que entrañan para la salud de las personas y la sanidad de los *animales acuáticos* la selección y la propagación de la resistencia que puede surgir como consecuencia de la administración de *agentes antimicrobianos* a los *animales acuáticos*.

Las Directrices del Codex para el análisis de riesgos de resistencia a los antimicrobianos transmitida por los alimentos (CAC/GL77-2011) incluyen información sobre dicho tema en relación con el uso de *agentes antimicrobianos* en especies distintas del ser humano.

3. Definiciones

A efectos del presente capítulo, el *peligro* es el microorganismo resistente o el determinante de resistencia que surge como consecuencia de la administración de un *agente antimicrobiano* específico a los *animales acuáticos*. Esta definición refleja la posibilidad de que los microorganismos resistentes causen efectos adversos en la salud, así como la posibilidad de una transferencia horizontal de determinantes genéticos entre microorganismos. Las circunstancias en las que el *peligro* puede tener consecuencias adversas son todas las situaciones en las cuales personas o *animales acuáticos* puedan verse expuestos a un agente patógeno resistente a los *agentes antimicrobianos*, caer enfermos y ser tratados con un *agente antimicrobiano* que haya dejado de ser eficaz.

A efectos del presente capítulo, el *riesgo* para la sanidad de los *animales acuáticos* es la *infección de animales acuáticos* por microorganismos que han adquirido resistencia debido a la administración de *agentes antimicrobianos* en *acuicultura*, y la consecuente pérdida del beneficio de la terapia antimicrobiana destinada a combatir las *enfermedades* de los *animales acuáticos*.

A efectos del presente capítulo, el *riesgo* para la salud pública es la *infección* de seres humanos por microorganismos que han adquirido resistencia debido a la administración de *agentes antimicrobianos* a los *animales acuáticos*, y la consecuente pérdida del beneficio de la terapia antimicrobiana destinada a combatir la *infección humana*.

Anexo 11 (cont.)

34. Proceso de análisis del riesgo

Los componentes del *análisis del riesgo* que se describen en este capítulo son la *identificación del peligro*, la *evaluación del riesgo*, la *gestión del riesgo* y la *información sobre el riesgo*.

El capítulo incluye factores que se deben tener en cuenta en las distintas etapas del proceso de *análisis del riesgo*. Estos factores no pretenden ser exhaustivos y no todos los elementos serán aplicables en todas las situaciones.

4. Identificación del peligro

A efectos del presente capítulo, el *peligro* es el microorganismo resistente o el determinante de resistencia que surge de la administración a los *animales acuáticos* de un *agente antimicrobiano* específico. Esta definición refleja la posibilidad de que los microorganismos resistentes causen efectos adversos en la salud, así como la posibilidad de una transferencia horizontal de determinantes genéticos entre microorganismos. Las circunstancias en las que el *peligro* puede tener consecuencias adversas son todas las situaciones en las cuales personas o *animales acuáticos* puedan verse expuestos a un *agente patógeno* resistente a los *agentes antimicrobianos*, caigan enfermos y se traten con un *agente antimicrobiano* que haya perdido eficacia.

5. Evaluación del riesgo

La *evaluación del riesgo* que entrañan para la salud de las personas y la sanidad de los *animales acuáticos* los microorganismos resistentes a los *agentes antimicrobianos* como resultado de la administración de *agentes antimicrobianos* a los *animales acuáticos* deberá tener en cuenta:

- la probabilidad de emergencia de microorganismos resistentes como consecuencia de la administración de un *agente antimicrobiano* o, más específicamente, la propagación de determinantes de resistencia, si existe posibilidad de transmisión entre microorganismos;
- todas las vías posibles y su contribución a la probabilidad de exposición de las personas y los *animales acuáticos* a microorganismos resistentes o a determinantes de resistencia, la importancia de dichas vías y las probabilidades de exposición;
- las consecuencias de la exposición en términos de *riesgos* para la salud de las personas o la sanidad de los *animales acuáticos*.

Los principios generales de la *evaluación del riesgo* definidos en el Capítulo Artículo 2.1.3. se aplican por igual, tanto a la *evaluación del riesgo* cuantitativa como a la cualitativa. Como mínimo, siempre deberá llevarse a cabo una evaluación del riesgo cualitativa.

Artículo 6.5.2.

Consideraciones especiales para efectuar un análisis del riesgo de resistencia a los agentes antimicrobianos en acuicultura

1. Introducción

El *análisis de riesgo* de resistencia a los *agentes antimicrobianos* en *acuicultura* se enfrenta a una variedad de factores que tienen un impacto tanto en la *evaluación* como en la *gestión del riesgo*, entre ellos, la diversidad de la *acuicultura*, la ausencia relativa de métodos para el cultivo y de pruebas de susceptibilidad a los *agentes antimicrobianos*, la falta relativa de información acerca del uso de medicamentos aprobados y el potencial para el desarrollo de reservorios de microorganismos resistentes y de determinantes de resistencia con un potencial de transmisión horizontal.

Sin embargo, los principios fundamentales del *análisis del riesgo* (*evaluación del riesgo*, *gestión del riesgo* e *información sobre el riesgo*) brindan un marco de trabajo tan válido para la *acuicultura* como para la producción de animales terrestres.

2. Colecta de datos Definición del riesgo

~~Las definiciones de *riesgo* utilizadas en este capítulo son aquellas asociadas con el uso de *agentes antimicrobianos* en la *acuicultura*.~~

En la evaluación del riesgo, se deberá prestar una atención especial al diseño de los programas de colecta de datos, con el fin de tener en cuenta los posibles factores de desviación.

Debido a que muchas de las operaciones de *acuicultura* (en particular, en los sistemas abiertos) se entrecruzan con la producción de animales terrestres y con entornos humanos, es esencial identificar claramente el *riesgo* que se ha de evaluar. La selección y la diseminación de microorganismos resistentes o de determinantes de resistencia pueden estar asociadas con el uso de *agentes antimicrobianos* en *animales acuáticos*, o resultar de su utilización en operaciones cercanas de producción ganadera o de la presencia de *agentes antimicrobianos* en aguas residuales provenientes del consumo humano.

~~Por consiguiente, en la evaluación del riesgo, se deberá prestar una atención especial al diseño de los programas de colecta de datos para abarcar estos factores de interferencia.~~

3. Diversidad de la acuicultura

La variedad de especies cultivadas, la cantidad y diversidad de sistemas de cultivos y la gama de *agentes antimicrobianos* y sus vías de administración tienen un impacto en los elementos de la *evaluación de riesgos*, en particular, en la evaluación de la difusión. De este modo, se ha de ser muy cuidadoso a la hora de agrupar sectores aparentemente similares de la industria acuícola.

La diversidad de la acuicultura también influye en la identificación, la selección y el seguimiento de las opciones de *gestión del riesgo*.

4. Ausencia de métodos estandarizados para las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

En la actualidad, en la acuicultura, se carece de métodos estandarizados para las pruebas de susceptibilidad a los *agentes antimicrobianos* en muchas especies importantes para la acuicultura, lo que resulta en una pérdida en la incapacidad de cuantificar riesgos específicos y en un aumento de la incertidumbre concomitante. Siempre que existan, se deberán usar los métodos estandarizados de susceptibilidad y, en su ausencia, aplicar enfoques claramente definidos y basados en la ciencia.

5. Falta de medicamentos aprobados

El número reducido de *agentes antimicrobianos* aprobados para uso en la *acuicultura* plantea desafíos en el *análisis del riesgo*, tanto en términos de la *evaluación* como de la *gestión del riesgo*.

Es importante la colecta y utilización de información detallada acerca de los tipos y las cantidades de *agentes antimicrobianos* utilizados en la *acuicultura* y pertinentes para el *análisis del riesgo*. En algunas circunstancias, también se ha de tener en cuenta la utilización derogatoria o no prevista en la autorización de comercialización. Ver Capítulo 6.3.

Para la *gestión del riesgo*, factores como la cantidad reducida de medicamentos aprobados y la diversidad de aspectos reglamentarios y de infraestructura sanitaria para los *animales acuáticos* en los países activos en el sector representan un desafío adicional. Las opciones de *gestión del riesgo* deberán ser prácticas y tener en cuenta la posibilidad real de aplicación y ejecución.

En cuanto a los programas de seguimiento y *vigilancia*, la ausencia de medicamentos aprobados implica recurrir a sistemas de colecta de datos e información sobre las cantidades de *agentes antimicrobianos* empleados que no se limiten a la distribución autorizada o a los medicamentos aprobados, sino que también contemplen el uso de medicamentos sin autorización.

6. Potencial para el desarrollo de un reservorio (transmisión horizontal)

Los microorganismos que habitan el entorno acuícola constituyen el reservorio fundamental de determinantes de resistencia en la biosfera. Este reservorio representa el origen básico de todos los determinantes de resistencia a los *agentes antimicrobianos*, tanto en medicina humana como veterinaria. La frecuencia de determinantes de resistencia en microorganismos ambientales se mantiene por factores intrínsecos no generados por el hombre, y todos los usos de *agentes antimicrobianos*, incluyendo en la *acuicultura*, tienen el potencial de aumentar el tamaño del reservorio.

Anexo 11 (cont.)

Existe el *riesgo* que la utilización de *agentes antimicrobianos* en la *acuicultura* traiga como consecuencia un incremento de la frecuencia de determinantes de resistencia en el microbioma ambiental, ye Este aumento de frecuencia se transfiere a los microorganismos capaces de infectar a los humanos, y a los animales terrestres y acuáticos. La *evaluación y gestión del riesgo* es extremadamente compleja. Las vías biológicas para la evaluación de la difusión y la exposición son innumerables y, por el momento, no se pueden brindar orientaciones específicas.

Artículo 6.5.3.

Análisis de los riesgos para la salud humana

1. Definición del riesgo

Infección de seres humanos por microorganismos que han adquirido en los que ha surgido la resistencia debido a la administración de *agentes antimicrobianos* a los *animales acuáticos*, y la consecuente pérdida del beneficio de la terapia antimicrobiana destinada a combatir la *infección* humana.

2. Identificación del peligro

- Microorganismos que han adquirido resistencia, (incluso resistencia múltiple), como consecuencia de la administración de un *agente antimicrobiano* a los *animales acuáticos*.
- Microorganismos que han adquirido un determinante de resistencia de otros microorganismos que, a su vez, han adquirido resistencia como consecuencia de la administración de un *agente antimicrobiano* a los *animales acuáticos*.

La identificación del *peligro* deberá tener en cuenta la clase o subclase del *agente antimicrobiano* considerado. Esta definición deberá leerse conjuntamente con el punto 4 del Artículo 6.5.1.

3. Evaluación del riesgo de introducción de la difusión

La evaluación del riesgo de introducción de la difusión describe las vías biológicas necesarias para que el uso de un *agente antimicrobiano* específico en los *animales acuáticos* conlleve a la liberación de microorganismos resistentes o de determinantes de resistencia en un ambiente dado. Asimismo, estima Esta evaluación incluye una estimación cualitativa o cuantitativamente de la probabilidad de que se produzca ese proceso completo. La evaluación del riesgo de introducción de la difusión describe la probabilidad de entrada de cada uno de los *peligros* posibles en una serie de circunstancias concretas con respecto a cantidades y momentos, e indica las posibilidades de modificación debido a diferentes acciones, acontecimientos o medidas.

La evaluación del riesgo de introducción de la difusión deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- especies de *animales acuáticos* tratados con el *agente antimicrobiano* considerado;
- sistema de producción acuícola (intensivo, o extensivo, en redes, tanques, jaulas, estanques, etc.);
- número de *animales acuáticos* tratados, su edad y distribución geográfica;
- prevalencia de la *enfermedad* para la cual esté indicado el *agente antimicrobiano* en la población de *animales acuáticos* de destino;
- datos sobre las tendencias de la utilización del *agente antimicrobiano* y de los cambios en los sistemas de producción en *acuicultura*;
- datos sobre usos no autorizados o no previstos en la etiqueta;
- métodos y vías de administración del *agente antimicrobiano*;
- régimen de dosificación (dosis, intervalo de administración y duración del tratamiento);
- propiedades farmacocinéticas y pertinentes propiedades farmacodinámicas del *agente antimicrobiano*;

- lugar y tipo de infección;
- desarrollo de microorganismos resistentes;
- prevalencia de los *agentes patógenos* que pueden desarrollar resistencia en una especie de *animales acuáticos*;
- mecanismos y vías de transmisión directa o indirecta de la resistencia;
- posible relación entre las características de la virulencia y la resistencia;
- resistencia cruzada o coresistencia con otros *agentes antimicrobianos*;
- datos sobre las tendencias y la aparición de microorganismos resistentes obtenidos mediante la *vigilancia* de los *animales acuáticos*, de los productos derivados de *animales acuáticos* y de los consiguientes residuos.

En la evaluación del riesgo de introducción de la difusión se deberán considerar los siguientes factores de interferencia:

- los microorganismos resistentes o los determinantes de resistencia asociados con los *animales acuáticos* o con los *productos de animales acuáticos* resultado de la contaminación del entorno terrestre o acuático, de los piensos o del procesamiento poscría.

4. Evaluación de la exposición

La evaluación de la exposición describe las vías biológicas necesarias para la exposición de las personas a los microorganismos resistentes o a los determinantes de resistencia propagados por la administración de un *agente antimicrobiano* a los *animales acuáticos*, y calcula la probabilidad de que se produzcan esas exposiciones. La probabilidad de exposición a los *peligros* identificados se estima con relación a determinadas condiciones de exposición, en función de las cantidades, el momento, la frecuencia, la duración de la exposición, las vías de exposición, la especie y otras características de la población humana expuesta.

La evaluación de la exposición deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- demografía humana, incluidas subpoblaciones, y hábitos de consumo de alimentos, incluidas las costumbres y tradiciones culturales respecto a la preparación y al almacenaje de alimentos;
- prevalencia de microorganismos resistentes en los alimentos en el momento de consumirlos;
- carga microbiana en alimentos contaminados en el momento de consumirlos;
- contaminación medioambiental por microorganismos resistentes;
- transmisión de microorganismos resistentes y sus determinantes de resistencia entre las personas, los *animales acuáticos* y el medio ambiente;
- medidas tomadas para la descontaminación microbiana de los alimentos;
- capacidad de supervivencia y propagación de los microorganismos resistentes durante el proceso de producción de los alimentos (incluidas las operaciones de sacrificio, transformación, almacenamiento, transporte y venta al por menor);
- métodos de eliminación de los desechos y probabilidad de exposición humana a microorganismos resistentes o a determinantes de resistencia a través de dichos residuos;
- capacidad de los microorganismos resistentes de establecerse en los seres humanos;
- transmisión de los microorganismos considerados de ser humano a ser humano;

Anexo 11 (cont.)

- capacidad de los microorganismos resistentes de transmitir resistencia a los microorganismos comensales del organismo humano y a los agentes zoonóticos;
- cantidad y tipo de *agentes antimicrobianos* utilizados para tratar a los seres humanos;
- propiedades farmacocinéticas, como metabolismo, biodisponibilidad y distribución en la flora intestinal;
- nivel de contacto directo de los trabajadores del sector de la acuicultura o de las industrias de transformación con los organismos resistentes.

5. Evaluación de las consecuencias

La evaluación de las consecuencias describe la relación entre determinadas exposiciones a microorganismos resistentes o a determinantes de resistencia y las consecuencias de esas exposiciones. Deberá existir un proceso causal por el que las exposiciones tienen consecuencias sanitarias o medioambientales perjudiciales que puedan, a su vez, tener consecuencias socioeconómicas. La evaluación de las consecuencias describe las posibles repercusiones de una exposición dada y estima la probabilidad de que se produzcan.

La evaluación de las consecuencias deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- dosis microbiana y consiguientes interacciones de respuesta del hospedador;
- variaciones de susceptibilidad de las poblaciones o subpoblaciones expuestas;
- variaciones y frecuencia de los efectos en la salud humana de la pérdida de eficacia de los *agentes antimicrobianos* y los costes derivados (por ejemplo: enfermedad y hospitalización);
- posible relación entre las características de la virulencia y la resistencia;
- cambios de hábitos de consumo de alimentos debidos a una pérdida de confianza en la seguridad sanitaria de los productos alimentarios y *riesgos secundarios* asociados;
- interferencia con una terapia antimicrobiana en los seres humanos;
- importancia del *agente antimicrobiano* en la sanidad animal y en la salud pública (ver Lista de agentes antimicrobianos de importancia veterinaria y la lista de antimicrobianos de importancia crítica de la OMS) medicina humana;
- prevalencia de la resistencia en los seres humanos de los agentes patógenos bacterianos considerados.

6. Estimación del riesgo

La estimación del *riesgo* integra los resultados de la evaluación del riesgo de introducción de la difusión, la evaluación de la exposición y la evaluación de las consecuencias para obtener una estimación general de los *riesgos* asociados a los *peligros*. Por consiguiente, la estimación del *riesgo* toma en cuenta todo el proceso de materialización del *riesgo*, desde la *identificación del peligro* hasta los efectos indeseables.

La estimación del riesgo deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- número de personas que se enferman y proporción de estas personas infectadas por microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos;
- efectos adversos en subpoblaciones humanas vulnerables (niños, personas inmunocomprometidas, personas de edad avanzada, mujeres embarazadas, etc.);
- aumento de la gravedad o de la duración de la enfermedad infecciosa;
- número de personas/días de enfermedad al año;

- ~~muertes (número total de muertes al año; probabilidad de que muera al año cualquier miembro de la población o un miembro de una determinada subpoblación, o de que vea reducida su esperanza de vida) vinculadas a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos en comparación con las muertes vinculadas a microorganismos sensibles de la misma especie;~~
- ~~gravedad de la enfermedad causada por los microorganismos resistentes considerados;~~
- ~~disponibilidad y coste de una terapia antimicrobiana alternativa;~~
- ~~posibles repercusiones de cambiar por un agente antimicrobiano alternativo (por ejemplo, mayor toxicidad de los productos de sustitución);~~
- ~~aparición de resistencia a agentes antimicrobianos en los agentes patógenos considerados observada en las personas.~~

7. Gestión del riesgo

La OIE define la gestión del riesgo como es el conjunto de los siguientes pasos.

a) Evaluación del riesgo

Evaluación del riesgo: designa el proceso de comparación del *riesgo* estimado en la *evaluación del riesgo* con la reducción del *riesgo* que se espera de las medidas de gestión del *riesgo* propuestas.

b) Evaluación de las opciones

Existen varias opciones de *gestión del riesgo* para minimizar la aparición y diseminación de resistencia a los *agentes antimicrobianos*, que pueden ser reglamentarias o no, como la elaboración de códigos de práctica para el uso de *agentes antimicrobianos* en la acuicultura ganadería.

En la toma de decisiones en materia de *gestión del riesgo*, es necesario tener en cuenta todas las implicaciones de las diferentes opciones en la salud de las personas y en la sanidad y el bienestar de los *animales acuáticos*, así como las consideraciones económicas y medioambientales asociadas. Un control eficaz de ciertas *enfermedades* de los *animales acuáticos* puede tener la doble ventaja de reducir los *riesgos* para la salud humana derivados tanto del agente bacteriano en consideración como de la resistencia a los *agentes antimicrobianos*.

c) Implementación

Los gestores del *riesgo* deberán desarrollar un plan de implementación que describa cómo, quién y cuándo se aplicará la decisión. Las *autoridades competentes* deberán garantizar un marco reglamentario y una infraestructura adecuados.

d) Seguimiento y revisión

Deberá llevarse a cabo un seguimiento ininterrumpido y una revisión continua de las distintas opciones de *gestión del riesgo*, con el fin de garantizar que se estén cumpliendo los objetivos.

8. Comunicación sobre el riesgo

Deberá promoverse la comunicación con todas las partes interesadas a la menor oportunidad, e integrarse en todas las fases de *análisis del riesgo*. Ello permitirá que todas las partes interesadas, incluidos los gestores del *riesgo*, comprendan mejor los enfoques de la *gestión del riesgo*. La *comunicación sobre el riesgo* también deberá quedar bien documentada.

Anexo 11 (cont.)

Artículo 6.5.4.

Análisis de los riesgos para la salud de los animales acuáticos

1. Definición del riesgo

Infeción de animales acuáticos por microorganismos en los que ha surgido la que han adquirido resistencia debido a la administración de agentes antimicrobianos a los animales acuáticos, y la consecuente pérdida del beneficio de la terapia antimicrobiana destinada a combatir la infección en los animales acuáticos.

2. Identificación del peligro

- Microorganismos que han adquirido resistencia (incluso resistencia múltiple) como consecuencia de la administración de un agente antimicrobiano a los animales acuáticos.
- Microorganismos que han adquirido un determinante de resistencia de otros microorganismos que, a su vez, han adquirido resistencia como consecuencia de la administración de un agente antimicrobiano a los animales acuáticos.

La identificación del peligro deberá tener en cuenta la clase o subclase del agente antimicrobiano considerado. Esta definición deberá leerse conjuntamente con el punto 4 del Artículo 6.5.1.

3. Evaluación del riesgo de introducción de la difusión

La evaluación del riesgo de introducción de la difusión deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- especies de animales acuáticos tratados con el agente antimicrobiano en cuestión;
- sistema de producción acuícola (intensivo Lo extensivo, en redes, tanques, jaulas, estanques, etc.);
- número de animales acuáticos tratados, y su edad, distribución geográfica y, en su caso, sexo;
- prevalencia de la enfermedad para la cual esté indicado el agente antimicrobiano en la población de animales acuáticos de destino;
- datos sobre las tendencias de la utilización o las ventas del agente antimicrobiano y de los cambios en los sistemas de producción de acuicultura;
- datos sobre los posibles usos no autorizados o no previstos en la etiqueta;

– métodos y vías de administración del agente antimicrobiano;

- régimen de dosificación (dosis, intervalo de administración y duración del tratamiento);

– métodos y vías de administración del agente antimicrobiano;

- propiedades farmacocinéticas y pertinentes propiedades farmacodinámicas del agente antimicrobiano;
- lugar y tipo y lugar de infección;
- desarrollo de microorganismos resistentes;

– prevalencia de los agentes patógenos que pueden desarrollar resistencia en una especie de animales acuáticos;

- mecanismos y vías de transmisión directa o indirecta de la resistencia;
- resistencia cruzada o coresistencia con otros *agentes antimicrobianos*;
- datos sobre las tendencias y la aparición de microorganismos resistentes obtenidos mediante la *vigilancia* de los *animales acuáticos*, de los productos derivados de *animales acuáticos* y de los consecuentes residuos.

En la evaluación del riesgo de introducción de la difusión, se deberán considerar los siguientes factores de interferencia:

- los microorganismos resistentes o los determinantes de resistencia asociados con los *animales acuáticos* o con los *productos de animales acuáticos* resultado de la contaminación del entorno terrestre o acuático, de los piensos o del procesamiento poscría.

4. Evaluación de la exposición

La evaluación de la exposición deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- prevalencia y tendencias de los microorganismos resistentes en los *animales acuáticos* clínicamente enfermos y clínicamente no afectados;
- prevalencia de microorganismos resistentes en los *alimentos* y en los entornos acuáticos;
- transmisión de microorganismos resistentes y sus determinantes de resistencia de animal a animal (prácticas de producción de los *animales acuáticos* y desplazamientos de los *animales acuáticos*);
- número o porcentaje de *animales acuáticos* tratados;
- cantidades y tendencias de los *agentes antimicrobianos* administrados a los *animales acuáticos*;
- capacidad de supervivencia y propagación de los microorganismos resistentes;
- exposición de la fauna silvestre a microorganismos resistentes;
- métodos de eliminación de los residuos y probabilidad de exposición de los *animales acuáticos* a microorganismos resistentes o a determinantes de resistencia a través de dichos residuos;
- capacidad de los microorganismos resistentes de establecerse en los *animales acuáticos*;
- exposición a determinantes de resistencia procedentes de otras fuentes, como agua, aguas residuales, contaminación por residuos, etc.;
- propiedades farmacocinéticas, como metabolismo, biodisponibilidad y distribución en la flora intestinal, puesto que la flora gastrointestinal de muchas especies de animales acuáticos puede ser transitorias;
- transmisión de microorganismos resistentes y determinantes de resistencia entre las personas, los *animales acuáticos* y el medio ambiente.

5. Evaluación de las consecuencias

La evaluación de las consecuencias deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- dosis microbiana y consiguientes interacciones de respuesta del hospedador;
- variaciones de susceptibilidad a la *enfermedad* de las poblaciones o subpoblaciones expuestas;
- variaciones y frecuencia de los efectos de la pérdida de eficacia de los *agentes antimicrobianos* en la salud de los *animales acuáticos* y los costes derivados;

Anexo 11 (cont.)

- posible relación entre las características de la virulencia y la resistencia;
- importancia del *agente antimicrobiano* en la salud de los *animales acuáticos* y en la salud pública (consúltese la lista de la OIE de agentes antimicrobianos de importancia en veterinaria y la lista de antimicrobianos de importancia crítica de la OMS);
- carga adicional de enfermedad debido a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos;
- número de fracasos terapéuticos debidos a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos;
- aumento de la gravedad o de la duración de la enfermedad infecciosa;
- consecuencias para el bienestar de los animales acuáticos;
- estimación del impacto económico y del coste para la salud y la producción de animales acuáticos;
- muerres (número total de muertes al año; probabilidad de que muera al año cualquier miembro de la población o un miembro de una determinada subpoblación) vinculadas a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos en comparación con las muertes vinculadas a microorganismos sensibles de la misma especie;
- disponibilidad de una terapia antimicrobiana alternativa;
- posibles repercusiones por pasar a un agente antimicrobiano alternativo (por ejemplo, una mayor toxicidad de los productos de sustitución);

6. Estimación del riesgo

La estimación del riesgo integra los resultados de la evaluación del riesgo de introducción, la evaluación de la exposición y la evaluación de las consecuencias para obtener una estimación general de los riesgos asociados a los peligros. Por consiguiente, la estimación del riesgo toma en cuenta todo el proceso de materialización del riesgo, desde la identificación del peligro hasta los efectos indeseables.

La estimación del riesgo deberá tener en cuenta los siguientes factores:

- carga adicional de enfermedad debido a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos;
- número de fracasos terapéuticos debidos a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos;
- aumento de la gravedad o de la duración de la enfermedad infecciosa;
- consecuencias para el bienestar de los animales;
- estimación del impacto económico y del coste para la salud y la producción de animales acuáticos;
- muerres (número total de muertes al año; probabilidad de que muera al año cualquier miembro de la población o un miembro de una determinada subpoblación) vinculadas a microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos en comparación con las muertes vinculadas a microorganismos sensibles de la misma especie;
- disponibilidad y coste de una terapia antimicrobiana alternativa;
- posibles repercusiones por pasar a un agente antimicrobiano alternativo (por ejemplo, una mayor toxicidad de los productos de sustitución);

7. Gestión del riesgo

Serán de aplicación las pertinentes disposiciones del punto 7 del Artículo 6.5.3.

8. Información sobre el riesgo

Serán de aplicación las pertinentes disposiciones del punto 8 del Artículo 6.5.3.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 8.1.

INFECCIÓN POR *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

[...]

Artículo 8.1.8.

Importación, para la acuicultura, de animales acuáticos vivos de un país, una zona o un compartimento no declarado(a) libre de infección por *B. dendrobatidis*

- 1) Cuando se importen, para la acuicultura, animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2. de un país, una zona o un compartimento no declarado(a) libre de infección por *B. dendrobatidis*, la Autoridad competente del país importador deberá exigir:
 - a) ~~la presentación de un certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos, extendido por la Autoridad competente del país exportador que acredite que los animales acuáticos de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2. han sido tratados de modo apropiado para erradicar la infección y posteriormente han sido sometidos a pruebas que confirman la ausencia de la enfermedad, de conformidad con las disposiciones que figuran en el capítulo correspondiente del Manual Acuático;~~

⊖

 - b) evaluar el riesgo y aplicar, si se justifican, las siguientes medidas para reducirlo:
 - a) entrega directa de la remesa a instalaciones biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local;
 - b) tratamiento del agua y de los equipos utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de *B. dendrobatidis*.
- 2) Si el objetivo de la importación es la creación de una población nueva, deberán tomarse en cuenta los aspectos pertinentes del Código de prácticas para la introducción y traslado de organismos marinos del Consejo internacional para la exploración del mar (ICES).
- 3) A efectos del Código acuático, los elementos pertinentes que establece el Código del ICES (versión íntegra: <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) son los siguientes:
 - a) identificar las poblaciones de interés (de cultivo o naturales) en las instalaciones donde se encuentran;
 - b) evaluar el historial sanitario de las poblaciones;
 - c) tomar y examinar muestras para detectar la presencia de *B. dendrobatidis* y de parásitos y para determinar el estado general de salud de la población;
 - d) importar y mantener en cuarentena, en instalaciones seguras, una población fundadora (F-0);
 - e) producir una generación F-1 con la población F-0 mantenida en cuarentena;
 - f) criar la población F-1 y tomar y examinar muestras de la misma en los momentos críticos de su desarrollo (ciclo de vida) para detectar la presencia de infección por *B. dendrobatidis* y de parásitos y para determinar su estado general de salud;

Anexo 12 (cont.)

- g) si no se detecta la presencia de *infección* por *B. dendrobatidis* ni de parásitos y si se considera que el estado general de salud de la población reúne las *condiciones elementales de bioseguridad* requeridas por el país, la *zona* o el *compartimento* de importación, la población F-1 podrá ser reconocida libre de *infección* por *B. dendrobatidis* o del agente patógeno específico de esta *infección*;
 - h) liberar de la *cuarentena* la población F-1 libre del agente patógeno específico e introducirla en el país, la *zona* o el *compartimento* para fines de *acuicultura* o de repoblación.
- 4) Con respecto al apartado 3 e), las condiciones de *cuarentena* deben ser propicias a la multiplicación del agente patógeno y, en última instancia, a la expresión clínica. Si las condiciones de *cuarentena* no son adecuadas para la multiplicación y el desarrollo del agente patógeno, el enfoque de diagnóstico recomendado podría no ser lo suficientemente sensible como para detectar un nivel de *infección* bajo.

Este artículo no se aplica a los *animales acuáticos* mencionados en el punto 1 del Artículo 8.1.3.

[...]

Artículo 8.1.10.

Importación de animales acuáticos vivos destinados a la alimentación de los animales, ~~a los laboratorios, a los parques zoológicos, al comercio de mascotas~~ o al uso agrícola, industrial o farmacéutico, procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarado libre de infección por *B. dendrobatidis*

Cuando se importen, para la alimentación de los animales o para uso agrícola, industrial o farmacéutico, *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarado(a) libre de *infección* por *B. dendrobatidis*, la *Autoridad competente* del país importador deberá exigir:

- 1) entrega directa de la remesa a instalaciones de *cuarentena* en donde permanecerán para sacrificio y transformación en productos autorizados por la *Autoridad competente*; y
- 2) tratamiento del agua y de los equipos utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos de la resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de *B. dendrobatidis*.

~~Cuando se importen *animales acuáticos vivos* de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2. de un país, una *zona* o un *compartimento* no declarado(a) libre de *infección* por *B. dendrobatidis*, la *Autoridad competente* del país importador exigirá:~~

- 1) ~~la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *Autoridad competente* del país exportador que acredite que los *animales acuáticos* han sido tratados de modo apropiado para erradicar la *infección* y posteriormente han sido sometidos a pruebas que confirman la ausencia de *enfermedades*, de conformidad con las disposiciones que figuran en el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*;~~

Q

- 2) ~~evaluar el *riesgo* y aplicar las siguientes medidas para reducirlo:~~
 - a) ~~entrega directa de la remesa a instalaciones biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local;~~
 - b) ~~tratamiento del agua utilizada para el transporte y de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de *B. dendrobatidis*.~~

Este artículo no se aplica a las *mercancías* mencionadas en el punto 1 del Artículo 8.1.3.

[...]

Artículo 8.1.13.

Importación de animales acuáticos vivos destinados al uso en laboratorios o parques zoológicos de un país, una zona o un compartimento no declarado libre de infección por *B. dendrobatidis*

Cuando se importen, para uso en laboratorios y zoológicos animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 8.1.2. de un país, una zona o un compartimento no declarado(a) libre de infección por *B. dendrobatidis*, la Autoridad competente del país importador deberá exigir:

- 1) entrega directa de la remesa a instalaciones de cuarentena autorizadas por la Autoridad competente en donde permanecerán definitivamente; y
- 2) tratamiento del agua y de los equipos utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de *B. dendrobatidis*;
- 3) eliminación de las canales de acuerdo con el Capítulo 4.6.

- Texto suprimido.

CAPÍTULO 8.2.

INFECCIÓN POR RANAVIRUS

[...]

Artículo 8.2.10.

Importación de animales acuáticos vivos destinados a la alimentación de los animales, a los laboratorios, a los parques zoológicos, al comercio de mascotas o al uso agrícola, industrial o farmacéutica, procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarado libre de infección por ranavirus

Quando se importen, para la alimentación de los animales o para uso agrícola, industrial o farmacéutico, animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 8.2.2. de un país, una zona o un compartimento no declarado(a) libre de infección por ranavirus, la Autoridad competente del país importador deberá exigir:

- 1) entrega directa de la remesa a instalaciones de cuarentena en donde permanecerán para sacrificio y transformación en productos autorizados por la Autoridad competente; y
- 2) tratamiento del agua y de los equipos utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos resultantes de la transformación de modo que garantice la inactivación de se inactiva ranavirus;

~~Quando se importen animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 8.2.2. de un país, una zona o un compartimento no declarado(a) libre de infección por ranavirus, la Autoridad competente del país importador exigirá evaluar el riesgo y aplicar las siguientes medidas para reducirlo:~~

- ~~1) entrega directa de la remesa a instalaciones biológicamente seguras donde permanezca el resto de su vida continuamente aislada del medio local;~~
- ~~2) tratamiento del agua utilizada para el transporte y de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de ranavirus.~~

Este artículo no se aplica a las mercancías mencionadas en el punto 1 del Artículo 8.2.3.

[...]

Artículo 8.2.13.

Importación de animales acuáticos vivos destinados a los laboratorios o parques zoológicos procedentes de un país, una zona o un compartimento no declarado libre de infección por ranavirus

Quando se importen, para uso en laboratorios y zoológicos animales acuáticos vivos de las especies mencionadas en el Artículo 8.2.2. de un país, una zona o un compartimento no declarado(a) libre de infección por ranavirus, la Autoridad competente del país importador deberá exigir:

- 1) entrega directa de la remesa a instalaciones de cuarentena autorizadas por la Autoridad competente en donde permanecerán definitivamente;
- 2) tratamiento del agua y de los equipos utilizados para el transporte y de todos los efluentes y despojos de modo que garantice la inactivación de ranavirus;
- 3) eliminación de las canales de acuerdo con el Capítulo 4.6.

— Texto suprimido.

Artículos X.X.7. y X.X.11.

[Nota: En el Capítulo 10.4. estas modificaciones se aplican a los Artículos 10.4.10., 10.4.11., 10.4.15. y 10.4.16.

Artículo X.X.7.

Importación de animales acuáticos vivos y de productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de necrosis hematopoyética epizoótica

Cuando se importen *animales acuáticos vivos y de productos de animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 10.1.2. de un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de necrosis hematopoyética epizoótica, la *Autoridad competente del país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *Autoridad competente del país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*, que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 10.1.4. ó 10.1.5. (según proceda) y 10.1.6., que el lugar de producción de la remesa de *animales acuáticos vivos y de productos de animales acuáticos* de es un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de necrosis hematopoyética epizoótica.

El *certificado* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.

Este artículo no se aplica a las *mercancías* enumeradas en el punto 1 del Artículo 10.1.3.

Artículo X.X.11.

Importación de productos de animales acuáticos de un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de necrosis hematopoyética epizoótica

~~Cuando se importen *productos de animales acuáticos* de las especies mencionadas en el Artículo 10.1.2. de un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de necrosis hematopoyética epizoótica, la *Autoridad competente del país importador* deberá exigir la presentación de un *certificado sanitario internacional aplicable a los animales acuáticos*, extendido por la *Autoridad competente del país exportador* o por un *certificador oficial* aprobado por el *país importador*, que acredite, según los procedimientos descritos en los Artículos 10.1.4. ó 10.1.5. (según proceda) y 10.1.6., que el lugar de producción de la remesa de *productos de animales acuáticos* es un país, una zona o un compartimento declarado(a) libre de necrosis hematopoyética epizoótica.~~

~~El *certificado* deberá ser conforme al modelo de certificado que figura en el Capítulo 5.11.~~

~~Este artículo no se aplica a las *mercancías* enumeradas en el punto 1 del Artículo 10.1.3.~~

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 10.4.

INFECCIÓN POR VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMÓN

[...]

Artículo 10.4.4.

País libre de infección por virus de la anemia infecciosa del salmón

En este artículo, todas las consideraciones se entenderán hechas a un país libre de *infección* por cualquier virus detectable de la anemia infecciosa del salmón, incluido el virus de la anemia infecciosa del salmón HPR0.

Si el país comparte una *zona* con otro u otros países, sólo podrá hacer una *autodeclaración de ausencia de infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón cuando todos los perímetros de aguas compartidas hayan sido declarados países o *zonas* libres de esta *infección* (véase el Artículo 10.4.6.).

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

1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 10.4.2. está presente en el país y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

2) ~~se desconoce el estatus de la enfermedad antes de la vigilancia específica, cualquiera de las especies susceptibles mencionadas en el Artículo 10.4.2. está presente en el país y no se ha observado la presencia detectable de infección por virus de la anemia infecciosa del salmón,~~ pero se han dado las condiciones siguientes:

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

b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón;

O

3) había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia de infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón y perdió posteriormente su estatus libre de *enfermedad* por haberse detectado la *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón, pero se han dado las condiciones siguientes:

a) nada más haberse detectado la *enfermedad*, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y

b) las poblaciones infectadas han sido destruidas o desplazadas de la *zona infectada* con medios que reducen al mínimo el *riesgo* de propagación de la *enfermedad* y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el *Manual Acuático*), y

c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la *enfermedad*, y

d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón.

Mientras tanto, parte o la totalidad del lugar no afectado podrá ser declarada *zona* libre, siempre que reúna las condiciones descritas en el punto 3 del Artículo 10.4.6.

Anexo 15 (cont.)

No podrá seguirse la vía de *autodeclaración de ausencia de infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón HPR0 basada en la ausencia de *enfermedad* clínica (la ausencia histórica a la que se refiere el Artículo 1.4.6.) porque es poco probable que la *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón dé lugar a signos clínicos.

[...]

Artículo 10.4.6.

Zona o compartimento libre de infección por virus de la anemia infecciosa del salmón

En este artículo, todas las consideraciones se entenderán hechas a una *zona* o un *compartimento* libre de *infección* por cualquier virus detectable de la anemia infecciosa del salmón, incluido el virus de la anemia infecciosa del salmón HPR0.

Si una *zona* o un *compartimento* se extiende más allá de las fronteras de un país, sólo podrá ser declarada(o) *zona* o *compartimento* libre de *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón si las *Autoridades competentes* de todos los *territorios* que abarca confirman que reúne las condiciones exigidas para serlo.

Como se describe en el Artículo 1.4.6., una *zona* o un *compartimento* establecida(o) en el *territorio* de un país o de un conjunto de países no declarado(s) libre(s) de *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón podrá ser declarada(o) *zona* o *compartimento* libre de esta *infección* por la(s) *Autoridad(es) competente(s)* de dicho país o conjunto de países si:

1) ninguna *especie susceptible* de las mencionadas en el Artículo 10.4.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y se han reunido ininterrumpidamente las *condiciones elementales de bioseguridad* durante, por lo menos, los dos últimos años;

O

2) ~~se desconoce el estatus de la *enfermedad* antes de la *vigilancia específica*, cualquiera de las *especies susceptibles* mencionadas en el Artículo 10.4.2. está presente en la *zona* o el *compartimento* y no se ha observado la presencia detectable de *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón, pero se han dado las condiciones siguientes:~~

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

b) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de *infección* por virus de la anemia infecciosa del salmón;

O

3) una *zona* había hecho previamente una *autodeclaración de ausencia de infección* por virus de la anemia infecciosa y perdió posteriormente su estatus libre de *enfermedad* por haberse detectado la *infección* por virus de la anemia infecciosa en ella, pero se han dado las condiciones siguientes:

a) nada más haberse detectado la *enfermedad*, el lugar afectado ha sido declarado *zona infectada* y se ha establecido una *zona de protección*, y

b) las poblaciones infectadas han sido destruidas o desplazadas de la *zona infectada* con medios que reducen al mínimo el *riesgo* de propagación de la *enfermedad* y se han aplicado los procedimientos de *desinfección* apropiados (descritos en el *Manual Acuático*), y

c) las *condiciones elementales de bioseguridad* vigentes anteriormente han sido debidamente revisadas y modificadas y se han reunido ininterrumpidamente desde la erradicación de la *enfermedad*, y

d) se ha aplicado una *vigilancia específica*, de conformidad con lo descrito en el Capítulo 1.4., durante, por lo menos, los dos últimos años y no se ha detectado la presencia de *infección* por virus de la anemia infecciosa.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 11.6.

INFECCIÓN POR *PERKINSUS OLSENI*

Artículo 11.6.1.

A efectos del *Código acuático*, la infección por *Perkinsus olseni* es la *infección* debida exclusivamente a *P. olseni*.

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

Artículo 11.6.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies: las almejas (*Austrovenus stutchburyi*, *Venerupis pullastra*, *V. aurea*, *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*), la oreja de mar (*Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. cyclobates* y *H. scalaris*) y otras especies (*Anadara trapezia*, *Barbatia novaezelandiae*, *Macomona liliiana*, *Paphies australis*, *Crassostrea gigas* y *C. ariakensis*). Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás especies susceptibles mencionadas en el *Manual Acuático* que sean objeto de *comercio internacional*.

[...]

— Texto suprimido.

CHAPTER 2.2.2.

INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS

1. Scope

Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (IHHN) disease is caused by infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) (Bonami & Lightner, 1991; Bonami *et al.*, 1990; Lightner, 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b; Lotz *et al.*, 1995; Tang & Lightner, 2002). A large portion of the IHHNV genome has been found to be inserted in the genome of some genetic lines of *Penaeus monodon*. There is no evidence that this variant of IHHNV is infectious (Tang & Lightner, 2002; 2006).

Synonyms: the International Committee on Taxonomy of Viruses has assigned IHHNV (a parvovirus) as a tentative species in the genus *Brevidensovirus*, family *Parvoviridae* with the species name of PstDNV (for *Penaeus stylirostris* densovirus) (Fauquet *et al.*, 2005). For the purpose of this *Aquatic Manual*, most references to the viral agent of IHHN will be as IHHNV.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

IHHNV is the smallest of the known penaeid shrimp viruses. The IHHN virion is a 20–22 nm, non-enveloped icosahedron, with a density of 1.40 g ml⁻¹ in CsCl, contains linear single-stranded DNA with an estimated size of 3.9 kb, and has a capsid with four polypeptides of molecular weight 74, 47, 39, and 37.5 kD (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000; GenBank AF218266).

At least two three distinct genotypes of IHHNV have been identified (Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003b): Type 1) from the Americas and East Asia (principally the Philippines). Type 2 is from South-East Asia. These genotypes are infectious to *P. vannamei* and *P. monodon*. Two putative related sequences are found embedded in the genome of penaeids Type 3A) from East Africa, India and Australia, and Type 3B) from the western Indo-Pacific region including Madagascar, Mauritius and Tanzania (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). The first two genotypes are infectious to the representative penaeids, *P. vannamei* and *P. monodon*. There is evidence that these sequences are not infectious to *P. vannamei* and *P. monodon* two genetic variants are not infectious to these species (Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003b; 2007). IHHNV type 3A and type 3B related sequences have been found inserted into the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). The putative IHHNV sequences in the *P. monodon* genome are not infectious to the representative host species *P. vannamei* and *P. monodon* (Lightner *et al.*, 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer sets 309F/309R can distinguish the infectious forms of IHHNV from non-infectious forms. Primer sets MG831F/MG831R will distinguish the non-infectious forms of IHHNV.

2.1.2. Survival outside the host

No data.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

IHHNV is believed to be the most stable virus of the known penaeid shrimp viruses. Infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1987; 2009).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

Anexo 17 (cont.)**2.2. Host factors****2.2.1. Susceptible host species**

Most penaeid species can be infected with IHHNV, including the principal cultured species, *P. monodon* (black tiger shrimp/prawn), *P. vannamei* (Pacific white shrimp), and *P. stylirostris* (Pacific blue shrimp).

IHHNV infections are most severe in the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*, where the virus can cause acute epizootics and mass mortality (> 90%). In *P. stylirostris*, the juvenile and subadult life stages are the most severely affected (Bell & Lightner, 1984; 1987; Brock & Lightner 1990; Brock *et al.*, 1983; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1983a).

IHHNV causes the chronic disease runt-deformity syndrome (RDS) in *P. vannamei* in which reduced, irregular growth and cuticular deformities, rather than mortalities, are the principal effects (Bray *et al.*, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Castille *et al.*, 1993; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner, 1996a; 1996b; Motte *et al.*, 2003). IHHNV infection in *P. monodon* is usually subclinical, but RDS, reduced growth rates and reduced culture performance have been reported in IHHNV-infected stocks (Chayaburakul *et al.*, 2004; Primavera & Qunitio, 2000).

2.2.2. Susceptible stages of the host

IHHNV has been demonstrated in all life stages (i.e. eggs, larvae, postlarvae [PL], juveniles and adults) of *P. vannamei*. Eggs produced by IHHNV-infected females with high virus loads were found to generally fail to develop and hatch. Those nauplii produced from infected broodstock that do hatch have a high prevalence of IHHNV infection (Motte *et al.*, 2003).

2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

2.2.4. Target organs and infected tissue

IHHNV infects and has been shown to replicate (using *in-situ* hybridisation [ISH] with specific DNA probes) in tissues of ectodermal and mesodermal origin from the embryo. Thus, the principal target organs include: the gills, cuticular epithelium (or hypodermis), all connective tissues, the haematopoietic tissues, the lymphoid organ, antennal gland, and the ventral nerve cord, its branches and its ganglia. The enteric organs (endoderm-derived hepatopancreas, midgut and midgut caeca mucosal epithelia) and smooth, cardiac, and striated muscle show no histological signs of infection by IHHNV and are usually negative for IHHNV by ISH (Lightner, 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1992b).

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of *P. stylirostris* and *P. vannamei* populations that survive IHHNV infections and/or epizootics, may carry the virus for life and pass the virus on to their progeny and other populations by vertical and horizontal transmission (Bell & Lightner 1984; Lightner, 1996a; 1996b; Morales-Covarrubias & Chavez-Sanchez, 1999; Motte *et al.*, 2003).

2.2.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

IHHNV is common in wild penaeid shrimp in South-East Asia (*P. monodon*) and in the Americas (*P. vannamei*, *P. stylirostris* and other Pacific side wild penaeid species) (Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 1999; Nunan *et al.*, 2001).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission of IHNV can be by horizontal or vertical routes. Horizontal transmission by cannibalism or by contaminated water (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b; 1985), and vertical transmission via infected eggs (Motte *et al.*, 2003) have been demonstrated.

2.3.2. Prevalence

In regions where the virus is enzootic in wild stocks, the prevalence of IHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); and from 51 to 63% in *P. vannamei* collected from the Pacific coasts of Ecuador, Colombia and Panama (Motte *et al.*, 2003). Other penaeids collected during some of these surveys and found to be IHNV positive included the brown shrimp, *P. californiensis* and the Western white shrimp *P. occidentalis*. In farms where IHNV is present, its prevalence can range from very low to 100%, but high prevalence, approaching 100%, is typical (Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1988; 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1992a; 1983a; Martinez-Cordova, 1992).

2.3.3. Geographical distribution

IHNV appears to have a world-wide distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996a; 1996b; Owens *et al.*, 1992). In the Western Hemisphere, IHNV is commonly found in wild penaeid shrimp in the eastern Pacific from Peru to Mexico. Although IHNV has been reported from cultured *P. vannamei* and *P. stylirostris* in most of the shrimp-culturing regions of the Western Hemisphere and in wild penaeids throughout their range along the Pacific coast of the Americas (Peru to northern Mexico), the virus has not been reported in wild penaeid shrimp on the Atlantic coast of the Americas (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 1992a; Lightner & Redman, 1998a). IHNV has also been reported in cultured penaeid shrimp from Pacific islands including the Hawaiian Islands, French Polynesia, Guam, and New Caledonia. In the Indo-Pacific region, the virus has been reported from cultured and wild penaeid shrimp in East Asia, South-East Asia, and the Middle East (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996a).

Infectious IHNV was detected for the first time in farmed prawns in Australia in 2008. Additionally an IHNV-like virus sequence has been reported from Australia (Krabsetsve *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1992), and the presence of IHNV in farmed prawns in Australia was reported to the OIE in 2008. As discussed in Section 2.1.1, IHNV-related sequences have been found inserted into the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

2.3.4. Mortality and morbidity

Depending on the host species and the genotype of the virus, IHNV may take three distinct forms: in unselected *P. stylirostris*, infection by IHNV results in an acute, usually catastrophic disease with mortalities approaching 100%. In contrast, in *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and in *P. monodon* under some conditions, infection by IHNV results in a more subtle, chronic disease, RDS, in which high mortalities are unusual, but significant growth suppression and cuticular deformities are common. In the third situation, a large portion of the IHNV genome has been found to be inserted into the genome of some genetic lines of *P. monodon*. There is no evidence that in *P. monodon*, this variant of inserted-IHNV sequence is not infectious to other penaeids (Tang & Lightner, 2002; 2006).

IHNV interferes with normal egg and larval development: poor hatching success of eggs, and poor survival and culture performance of the larval and PL stages is observed when broodstock are used from wild or farmed stocks where IHNV is enzootic (Motte *et al.*, 2003).

Farmed stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults and adults may show persistently high mortality rates. In *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and possibly *P. monodon*, IHNV-infected stocks may show poor and highly disparate growth, poor overall culture performance, and cuticular deformities, including especially bent rostrums and deformed sixth abdominal segments.

Anexo 17 (cont.)

Demonstration of eosinophilic to pale basophilic intranuclear inclusion bodies in the typical target tissues for IHHNV, as IHHNV intranuclear inclusion bodies are nearly identical in appearance to those occurring in the early stages of WSSV infections, their presence in tissue sections should be considered as a presumptive diagnosis of IHHNV until confirmed with a second test method, such as dot-blot or ISH with IHHNV-specific DNA probes or positive PCR test results for IHHNV.

2.3.5. Environmental factors

The replication rate of IHHNV at high water temperatures was significantly reduced in a study in which viral replication was compared in *P. vannamei* experimentally infected and held at 24°C and 32°C. After a suitable incubation period, shrimp held at 32°C had approximately 10² lower viral load than shrimp held at 24°C. However, even at the higher temperature, significant (up to 10⁵ virus copies 50 ng⁻¹ of shrimp DNA) IHHNV replication still occurred in shrimp held at 32°C (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

No effective vaccination methods for IHHNV have been developed.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Resistance breeding

Selected stocks of *P. stylirostris* that are resistant to IHHN disease have been developed and these have had some successful application in shrimp farms (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; 1996b; Weppe 1992; Zarian-Herzberg & Ascencio-Valle, 2001). Some selected lines of *P. stylirostris* bred for IHHN disease resistance were found to be refractory to infection (Tang *et al.*, 2000). However, such stocks do not have increased resistance to diseases such as white spot syndrome virus (WSSV), and, hence, their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHHN susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

2.4.5. Restocking with resistant species

There has been some limited application and success with IHHNV-resistant *P. stylirostris* (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarin-Herzberg & Ascencio 2001). The relative resistance of *P. vannamei* to IHHN disease, despite infection by IHHNV, is considered to be among the principal factors that led to *P. vannamei* being the principal shrimp species farmed in the Western Hemisphere and, since 2004, globally (Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

2.4.6. Blocking agents

There are reports of shrimp with high viral loads of IHHNV being resistant to infection by WSSV (Bonnichon *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2003a). However, there are no reports to date for IHHNV blocking agents.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

IHHNV is transmitted vertically by the transovarian route (Motte *et al.*, 2003). Hence, while disinfection of eggs and larvae is good management practice (Chen *et al.*, 1992) and is recommended for its potential to reduce IHHNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them (and contamination by other disease agents), the method is not effective for preventing transmission of IHHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of IHNV infections and disease. Among these has been the application of polymerase chain reaction (PCR) pre-screening of wild or pond-reared broodstock and/or their spawned eggs/nauplii, and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001; Motte *et al.*, 2003), as well as the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992). The latter has proven to be the most successful husbandry practice for the prevention and control of IHNV (Jaenike *et al.*, 1992; Lightner, 2005; Pruder *et al.*, 1995). Unfortunately, there is a misconception in the industry that SPF is a genetic trait rather than a condition of health status (Lightner *et al.*, 2009). The development of SPF *P. vannamei* that were free not only of IHNV, but also of all the major known pathogens of penaeid shrimp, has resulted in the introduction of the species to Asia and to its surpassing *P. monodon* in 2005 as the dominant farmed shrimp species in Asia as well as the Americas where the SPF stocks were developed (FAO, 2006; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection by IHNV are all life stages (eggs, larvae, PL, juveniles and adults) (Motte *et al.*, 2003). While IHNV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for IHNV detection or certification for IHNV disease freedom.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, subadults and adults. However, for eggs, larvae and PL, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

3.4. Best organs and tissues

IHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHNV include connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a). Hence, whole shrimp (e.g. larvae or PLs) or tissue samples containing the aforementioned target tissues are suitable for most tests using molecular methods.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used for testing (usually for PCR, or dot-blot hybridisation with specific probes) when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a).

3.5. Samples/tissues that are not suitable

IHNV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection by IHNV (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Certain cuticular deformities, specifically a deformed rostrum bent to the left or right, which may be presented by *P. vannamei* and *P. stylirostris* with RDS, are pathognomonic for infection by IHNV (see Section 4.2.1.2). However, this clinical sign is not always apparent in shrimp populations chronically infected with IHNV. As *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and *P. monodon* can be infected by IHNV and not present obvious signs of infection (e.g. they may show markedly reduced growth rates or 'runting'), molecular tests are recommended when evidence of freedom from IHNV disease is required.

Anexo 17 (cont.)

4.1.2. Behavioural changes

In acute IHHN disease, *P. stylirostris* may present behavioural changes (see Section 4.2.1.1) but with RDS, no consistent behavioural changes have been reported for affected shrimp.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

4.2.1.1. IHHN disease in *Penaeus stylirostris*

IHHNV often causes an acute disease with very high mortalities in juveniles of this species. Vertically infected larvae and early PL do not become diseased, but in approximately 35-day-old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size and/or age dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 1983; Brock & Main, 1994; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). Gross signs are not IHHN specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute IHHN show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species with acute IHHN have been observed to rise slowly in culture tanks to the water surface, where they become motionless and then roll-over and slowly sink (ventral side up) to the tank bottom. Shrimp exhibiting this behaviour may repeat the process for several hours until they become too weak to continue, or until they are attacked and cannibalised by their healthier siblings. *Penaeus stylirostris* at this stage of infection often have white or buff-coloured spots (which differ in appearance and location from the white spots that sometimes occur in shrimp with WSSV infections) in the cuticular epidermis, especially at the junction of the tergal plates of the abdomen, giving such shrimp a mottled appearance. This mottling later fades in moribund *P. stylirostris* as such individuals become more bluish. In *P. stylirostris* and *P. monodon* with terminal-phase IHHNV infections, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b).

4.2.1.2. IHHN disease in *Penaeus vannamei*

RDS, a chronic form of IHHN disease, occurs in *P. vannamei* as a result of IHHNV infection. The severity and prevalence of RDS in infected populations of juvenile or older *P. vannamei* may be related to infection during the larval or early PL stages. RDS has also been reported in cultured stocks of *P. stylirostris* and *P. monodon*. Juvenile shrimp with RDS may display a bent (45° to 90° bend to left or right) or otherwise deformed rostrum, a deformed sixth abdominal segment, wrinkled antennal flagella, cuticular roughness, 'bubble-heads', and other cuticular deformities. Populations of juvenile shrimp with RDS display disparate growth with a wide distribution of sizes and many smaller than expected ('runted') shrimp. The coefficient of variation (CV = the standard deviation divided by the mean of different size groups within a population) for populations with RDS is typically greater than 30% and may approach 90%, while IHHNV-free (and thus RDS-free) populations of juvenile *P. vannamei* and *P. stylirostris* usually show CVs of 10–30% (Bray *et al.*, 1994; Brock & Lightner, 1990; Brock *et al.*, 1983; Brock & Main, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; Lightner, 1996a; Primavera & Quinitio, 2000; Pruder *et al.*, 1995).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology

Acute IHHNV infections in *P. stylirostris* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stained histological methods (see Section 4.2.6). Chronic IHHNV infections and RDS are much more difficult to diagnose using routine H&E histological methods. For diagnosis of chronic infections, the use of molecular methods are recommended for IHHNV detection (e.g. by PCR or application of IHHNV-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or ISH of histological sections).

Histological demonstration of prominent intranuclear, Cowdry type A inclusion bodies provides a provisional diagnosis of IHNV infection. These characteristic IHNV inclusion bodies are eosinophilic and often haloed (with H&E stains of tissues preserved with fixatives that contain acetic acid, such as Davidson's AFA and Bouin's solution) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a), intranuclear inclusion bodies within chromatin-marginated, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by IHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.3.1.2.3 of this chapter) of such sections with a DNA probe specific to IHNV provides a definitive diagnosis of IHNV infection (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4.2.4. Wet mounts

No reliable methods have been developed for direct microscopic pathology.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

Histopathology: histology may be used to provide a definitive diagnosis of IHNV infection. Because 10% buffered formalin and other fixatives provide, at best, only fair fixation of the shrimp, the use of Davidson's fixative (containing 33% ethyl alcohol [95%], 22% formalin [approximately 37% formaldehyde], 11.5% glacial acetic acid and 33.5% distilled or tap water) is highly recommended for all routine histological studies of shrimp (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). To obtain the best results, dead shrimp should not be used. Only live, moribund, or compromised shrimp should be selected for fixation and histological examination. Selected shrimp are killed by injection of fixative directly into the hepatopancreas; the cuticle over the cephalothorax and abdomen just lateral to the dorsal midline is opened with fine-pointed surgical scissors to enhance fixative penetration (the abdomen may be removed and discarded), the whole shrimp (or cephalothorax less the abdomen) is immersed in fixative for from 24 to no more than 48 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol for storage. After transfer to 70% ethyl alcohol, fixed specimens may be transported (via post or courier to the diagnostic laboratory) by wrapping in cloth or a paper towel saturated with 70% ethyl alcohol and packed in leak-proof plastic bags (see Section 4.2.3).

In-situ hybridisation (see Section 4.3.1.2.3 below).

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Electron microscopy is not recommended for routine diagnosis of IHNV.

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See section 4.2.6.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

IHNV has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; 1998b).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

None has been successfully developed.

Anexo 17 (cont.)

4.3.1.2.3. Molecular techniques

Direct detection methods using DNA probes specific for IHNV are available in dot-blot and ISH formats. PCR tests for IHNV have been developed and a number of methods and commercial products using these methods are readily available.

DNA probes for dot-blot and ISH applications: gene probe and PCR methods provide greater diagnostic sensitivity than do more traditional techniques for IHNV diagnosis that employ classic histological approaches. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp. A haemolymph sample may be taken with a tuberculin syringe, or an appendage (a pleopod for example) may be biopsied (Bell *et al.*, 1990), and used as the sample for a direct dot-blot test.

Dot-blot hybridisation procedure for IHNV: the probe is labelled with a non-radioactive label, digoxigenin-11-dUTP (DIG-11-dUTP). The system using DIG to label nucleic acid probes was developed by Boehringer Mannheim Biochemicals (this company is now owned by Roche Diagnostic Corporation), which is described in the Roche *DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide* and *DIG Application Manual for Filter Hybridization™ System User's Guide for Membrane Hybridization* and from Boehringer Mannheim's *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual* (Roche Applied Science, 2006a; 2006b). The protocols given below use a DIG-labelled probe to IHNV produced by one of several methods. Probes may be produced using a fragment of cloned IHNV DNA as the template by the random primed labelling method (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1993). An alternative method for producing DIG-labelled probes uses specific primers from the cloned IHNV DNA and the Roche PCR DIG Probe Synthesis Kit™.

Dot-blot hybridisation procedure: the dot-blot hybridisation method given below uses a DIG-labelled DNA probe for IHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996a). Formulas for the required reagents are given after the protocols.

- i) Prepare a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics Cat. No. 1-209-299 or equivalent¹): cut pieces to fit samples and controls and mark with soft-lead pencil making 1 cm squares for each sample. Include a positive and a negative control on each filter. Lay out on to a piece of filter paper (Whatman 3MM).
- ii) If necessary, dilute samples to be assayed in TE (Tris/EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid]) buffer plus 50 µg ml⁻¹ salmon sperm DNA, using 1 µl sample in 9 µl buffer in 1.5 ml microcentrifuge tubes. Samples for dot-blot tests can be haemolymph, tissues homogenised in TN (Tris/NaCl: 0.4 M NaCl and 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) buffer, or extracted DNA in 10 mM Tris/HCl.
- iii) Boil samples for 10 minutes and quench on ice for 5 minutes. Briefly microfuge samples in the cold to bring down all liquid and to pellet any coagulated protein. Keep on ice until samples are dotted on to the membrane.
- iv) Dot 1–3 µl of each sample on to an appropriate place on the filters. Allow to air-dry and then fix samples on to the membrane by baking at 80°C for 30 minutes or by UV cross-linking using a DNA transilluminator for 3 minutes.
- v) Adjust a water bath to 68°C and prepare the prehybridisation solution. For a 10 × 15 cm membrane, prepare 8 ml per membrane. Set a stirring hot plate to 'low' and stir while warming the solution for 30 minutes until the blocking agent has dissolved and the solution is cloudy. Also, prepare some heat-seal bags that are slightly larger in size than the membrane: five to six bags will be needed per membrane.
- vi) Remove membranes from the oven or transilluminator and put into a heat-seal bag with 4 ml per membrane of prehybridisation solution. Seal the bags and put into a 68°C water bath for 30 minutes 1 hour.
- vii) Boil the DIG-labelled probe for 10 minutes, quench on ice and then microfuge in the cold to bring all the liquid down in the microcentrifuge tube. Keep on ice. Remove the prehybridisation solution from the bags. Add 2 ml of fresh prehybridisation solution to each bag and then add the correct, predetermined amount of DIG-labelled probe to each, mixing well as it is being added. Seal the bags, place back in the 68°C water bath and incubate for 8–12 hours.

¹ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

- viii) Wash membranes well with:
- | | | |
|--|-----|--------------------------------|
| 2 × standard saline citrate (SSC)/0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) | 2 × | 5 minutes at room temperature |
| 0.1 × SSC/0.1% SDS
(use 4 ml/filter and seal in bags) | 3 × | 15 minutes at 68°C |
| Buffer I | 1 × | 5 minutes at room temperature |
| Buffer II | 1 × | 30 minutes at room temperature |
| Buffer I | 1 × | 5 minutes at room temperature |
- (Buffers are prepared ahead of time).
- ix) React the membrane in bags with anti-DIG AP conjugate (Roche Diagnostics 1-093-274) diluted 1/5000 in Buffer I. Use 3 ml per membrane; incubate for 30–45 minutes at room temperature on a shaker platform.
- x) Wash membrane well with:
- | | | |
|------------|-----|--------------------------------|
| Buffer I | 2 × | 15 minutes at room temperature |
| Buffer III | 1 × | 5 minutes at room temperature |
- xi) Develop the membranes in bags using 3 ml per membrane of development solution (nitroblue tetrazolium salt [NBT]/X-phosphate in Buffer III) made up just prior to use. React in the dark at room temperature for 1–2 hours. Stop the reactions in Buffer IV and dry the membranes on 3MM filter paper.
- xii) Photograph the results (colour fades over time).
- xiii) Store dry membranes in heat-seal bags.

In-situ hybridisation (ISH) procedure: the ISH method given below uses a DIG-labelled DNA probe for IHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996a). Formulas for the required reagents are given after the protocols.

- i) Embed tissue in paraffin and cut sections at 4–6 µm thickness. Place sections on to positively charged microscope slides (do not put gelatine in water to float sections; just use water).
- ii) Put slides in a slide rack, such as a Tissue-Tek rack. Heat the slides in an oven for 45 minutes at 60°C. In the staining centre, rehydrate the tissue as follows:
- | | | |
|---------------------------------|-----|--|
| Xylene (or suitable substitute) | 3 × | 5 minutes each |
| Absolute alcohol | 2 × | 1 minute each |
| 95% alcohol | 2 × | 10 dips each |
| 80% alcohol | 2 × | 10 dips each |
| 50% alcohol | 1 × | 10 dips |
| Distilled water | | six rinses (do not let slides dry out) |
- iii) Wash the slides for 5 minutes in phosphate buffered saline (PBS or Tris/NaCl/EDTA [TNE] buffer). Prepare fresh proteinase K at 100 µg ml⁻¹ in PBS (or TNE). Place slides flat in a humid chamber, pipette on 500 µl of the proteinase K solution and incubate for 10–15 minutes at 37°C. Drain fluid onto blotting paper.
- iv) Return slides to slide rack. Fix sections in 0.4% cold formaldehyde for 5 minutes at room temperature.
- v) Incubate slides in 2 × SSC for 5 minutes at room temperature.
- vi) With slides flat, add 0.5–1 ml prehybridisation buffer and incubate in a humid chamber for 15–30 minutes at 37°C.
- vii) Boil the DIG-labelled probe for 10 minutes and quench on ice; spin briefly in the cold and keep on ice. Dilute the probe to 25 ng ml⁻¹ in prehybridisation solution and cover the tissue with 250 µl of the solution. Incubate the slides for 2–4 hours at 42°C or overnight at 37°C in a humid chamber. Drain fluid onto blotting paper. During this incubation, pre-warm the wash buffers at 37°C.
- viii) Place slides in slide rack. Wash the slides as follows:
- | | | |
|-----------|-----|----------------------|
| 2 × SSC | 2 × | 5–30 minutes at 37°C |
| 1 × SSC | 2 × | 5 minutes at 37°C |
| 0.5 × SSC | 2 × | 5 minutes at 37°C |

Anexo 17 (cont.)

- ix) Wash the slides for 5 minutes in Buffer I at room temperature. Put the slides flat in a humid chamber and block with 0.5 ml per slide of Buffer II. Incubate for 15 minutes at 37°C. Drain the fluid on to blotting paper.
- x) Dilute the anti-DIG AP conjugate (Roche Applied Science cat. 10686322) 1/1000 in Buffer II (1 µl anti-DIG AP per 1 ml buffer). Cover tissue with 500 µl of diluted conjugate and incubate in a humid chamber for 30 minutes at 37°C.
- xi) Place the slides in a slide rack. Wash in Buffer I twice for 5–10 minutes each time at room temperature. Wash once with Buffer III for 5–10 minutes.
- xii) Prepare the development solution by first adding 4.5 µl NBT per 1 ml buffer III. Mix well. Then add 3.5 µl X-phosphate per ml of solution and mix well. Pipette on 500 µl per slide and incubate in a humid chamber in the dark for 2–3 hours at room temperature.
- xiii) Stop the reaction by returning the slides to a slide rack and washing in Buffer IV for 15 minutes at room temperature.
- xiv) Counterstain the slides by dipping for 5 minutes in 0.5% aqueous Bismarck brown Y.
- xv) Dehydrate the slides in the staining centre as follows:
- | | | |
|---------------------------------|-----|--------------|
| 95% alcohol | 3 x | 10 dips each |
| Absolute alcohol | 3 x | 10 dips each |
| Xylene (or suitable substitute) | 4 x | 10 dips each |
- Do not allow the slides to dry out – leave them in the last xylene (or xylene substitute) container until ready for cover-slips.
- xvi) Mount with cover-slips and mounting medium (Permount).
- xvii) Examine the slides under bright-field for a dark-blue or black precipitate that marks sites where IHHNV DNA is present. Pathodiagnostic intranuclear Cowdry type A inclusions are well marked with the probe. Also often marked are host cell nuclei without obvious inclusions, cytoplasmic inclusions, and accumulation of free virus in the tissue spaces and haemolymph.

NOTE: Always run a known positive and negative control.

Reagent formulas for ISH method:

- i) 10 x phosphate buffered saline

NaCl	160 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	23 g
KCl	4 g
DD H ₂ O	1950 ml (qs to 2 litres)

pH to 8.2 with NaOH; autoclave to sterilise; store at room temperature. To make 1 x PBS, dilute 100 ml 10 x PBS in 900 ml DD H₂O; Filter 1 x solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

- ii) 10 x Tris/NaCl/EDTA (TNE) buffer

Tris base	60.57 g
NaCl	5.84 g
EDTA	3.72 g
DD H ₂ O	900 ml (qs to 1 litre)

pH to 7.4 with concentrated or 5 M HCl. To make 1 x TNE, dilute 100 ml 10 x TNE in 900 ml DD H₂O; Filter 1 x solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

- iii) Proteinase K, 100 µg ml⁻¹ (prepare just prior to use)

PBS	10 ml 1 x PBS
Proteinase K	1 mg

- iv) 0.4% formaldehyde

37% formaldehyde	5.4 ml
DD H ₂ O	500 ml

Store at 4°C; can be reused up to four times before discarding.

Anexo 17 (cont.)

v) Prehybridisation buffer (50 ml final volume)

4 × SSC	10 ml 20 × SSC
50% formamide	25 ml 100% formamide
1 × Denhardt's	2.5 ml 20 × Denhardt's
5% dextran sulphate	10 ml 25% dextran sulphate

Warm to 60°C

Boil 2.5 ml of 10 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA and add to buffer for final concentration of 0.5 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA; store at 4°C.

vi) 20 × SSC buffer

3M NaCl	175.32 g NaCl
0.3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	88.23 g Na citrate·2H ₂ O
DD H ₂ O	1000 ml (qs)

pH to 7.0; autoclave; store at 4°C.

To make 2 × SSC, dilute 100 ml 20 × SSC in 900 ml DD H₂O; To make 1 × SSC, dilute 50 ml 20 × SSC in 950 ml DD H₂O; To make 0.5 × SSC, dilute 50 ml 20 × SSC in 1950 ml DD H₂O. Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

vii) 20 × Denhardt's solution

BSA (Fraction V)	0.4 g bovine serum albumin
Ficoll 400	0.4 g Ficoll
PVP 360	0.4 g polyvinylpyrrolidone
DD H ₂ O	100 ml

Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C. Aliquot 2.5 ml into small tubes and store frozen.

viii) 25% dextran sulphate

Dextran sulphate	25 g
DD H ₂ O	100 ml

Mix to dissolve; store frozen in 10 ml aliquots.

ix) Salmon sperm DNA (10 mg ml⁻¹)

Salmon sperm DNA	0.25 g
DD H ₂ O	25 ml

To prepare, warm the water and slowly add the DNA with stirring until completely dissolved; boil for 10 minutes; shear the DNA by pushing through an 18-gauge needle several times; aliquot 2.5 ml into small tubes and store frozen; boil for 10 minutes just before using to facilitate mixing in the buffer.

x) 10 × Buffer I

1 M Tris/HCl	121.1 g Tris base
1.5 M NaCl	87.7 g NaCl
DD H ₂ O	1000 ml (qs)

pH to 7.5 with HCl. Autoclave; store at 4°C.

To make 1 × Buffer I, dilute 100 ml of 10 × stock in 900 ml DD H₂O. Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

xi) Buffer II (blocking buffer)

Blocking reagent	0.25 g Blocking reagent (Roche Diagnostics 1-096-176)
Buffer I	50 ml 1 × Buffer I

Store at 4°C for up to 2 weeks.

Anexo 17 (cont.)

xii) Buffer III

100 mM Tris/HCl	1.21 g Tris base
100 mM NaCl	0.58 g NaCl
DD H ₂ O	100 ml (qs)
pH to 9.5 with HCl	
Then add:	
50 mM MgCl ₂	1.02 g MgCl ₂ ·6H ₂ O
Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.	

xiii) 10% polyvinyl alcohol (PVA)

Polyvinyl alcohol	10 g
DD H ₂ O	100 ml

To prepare, slowly add PVA to water while stirring on low heat. (It takes 2–3 hours for PVA to go into solution.) Dispense 10 ml per tube and store frozen at –20°C.

xiv) Development solution

Mix 90 ml Buffer III with 10 ml of 10% PVA. Store at 4°C. Just prior to use, for each 1 ml of Buffer III with PVA add:

4.5 µl NBT	75 mg NBT ml ⁻¹ in 70% dimethylformamide (Roche Diagnostics 1-383-213)
3.5 µl X-phosphate	5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidine salt (50 mg ml ⁻¹ in dimethylformamide) (Roche Diagnostics 1-383-221)

xv) Buffer IV

10 mM Tris/HCl	1.21 g Tris base
1 mM EDTA	0.37 g EDTA·2H ₂ O (disodium salt)
DD H ₂ O	1000 ml
pH to 8.0 with HCl. Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.	

xvi) 0.5% Bismarck Brown Y

Bismarck Brown Y	2.5 g
DD H ₂ O	500 ml

Dissolve the stain in water. Filter through a Whatman No. 1 filter; store at room temperature.

Polymerase chain reaction for IHHNV: several single-step PCR methods (Krabsetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2007; Tang & Lightner 2001), and a number of commercial PCR kits are available for IHHNV detection. Nested methods are also available from commercial sources.

There are multiple geographical variants of IHHNV, some of which are not detected by all of the available methods for IHHNV. Two primer sets, 392F/R and 389F/R, are the most suitable for detecting all the known genetic variants of IHHNV (Krabsetsve *et al.*, 2004; Tang & Lightner, 2002). However these tests also detect IHHNV-related sequences called including types 3A and 3B, which are inserted into the genome of certain geographic stocks of *P. monodon* from the western Indo-Pacific, East Africa, Australia and India (Duda & Palumbi, 1999; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007; Saksmerprome *et al.*, 2011). New PCR primers have been developed that can detect the IHHN viral sequence but do not react with IHHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprome *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a segment from IHHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHHNV), but not types 3A and 3B, which are non-infectious and part of the *P. monodon* genome (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer set MG831F/R reacts only with types 3A and 3B, which are non-infectious and part of the *P. monodon* genome (Tang *et al.*, 2007). Hence, confirmation of unexpected positive and/or negative PCR results for IHHNV with a second primer set, or use of another diagnostic method (i.e. PCR using primers from another region of the genome, real-time PCR, bioassay, ISH) is highly recommended.

Table 4.1. Recommended primer sets for one-step PCR detection of IHNV

Primer	Product	Sequence	G+C%/Temp.	GenBank & References
389F	389 bp	5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	50%/72°C	AF218266
389R		5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000)
77012F	356 bp	5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	50%/68°C	AF218266
77353R		5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	55%/63°C	(Nunan <i>et al.</i> , 2000 2004)
392F	392 bp	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	50%/68°C	AF218266
392R		5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	50%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000; 2007)
309F	309 bp	5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	36%/68°C	AF218266
309R		5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	40%/69°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)
MG831F	831 bp	5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	45%/58°C	DQ228358
MG831R		5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	55%/62°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)

NOTE: Primers 389F/R and 392F/R described above are from the nonstructural protein-coding region (ORF 1) of the IHNV genome. Primers ~~77012F/77353R~~ ~~77353/77012~~ are from a region in between the nonstructural and the structural (coat protein) protein-coding regions of the genome. In the event that results are ambiguous using the 389F/R 'universal' primer set, it is recommended to use primers from a different region of the genome for confirmatory testing. In this case, that would mean using primers 77012F/77353R or the 392F/R primer sets and follow up with sequencing of PCR amplicons for confirmation.

General PCR method for IHNV: the PCR method described below for IHNV generally follows the methods outlined in Nunan *et al.* (2000). Cumulative experience with the technique has led to modifications with respect to template (DNA extraction of clinical specimens), choice of primers (Table 4.1), and volume of reaction.

- i) Use as a template, the DNA extracted from ground tissue homogenate (TN buffer, 0.4 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4) or haemolymph (collected with a small amount of 10% sodium citrate) or from tissue or haemolymph that was fixed in 95% ethanol and then dried. A control consisting of tissue or haemolymph from known negative animals should be included during the DNA extraction step. The DNA can be extracted by a variety of methods, but excellent results have been obtained using kits from Roche Diagnostics (Cat. No. 1-796-828) or Qiagen (Cat. No. 51304). Other DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega), or reagents from Gibco Life Sciences-DNAzol Cat. No. 40503-027 (Life Technologies). Spectrophotometric readings of the final DNA will indicate the purity of the DNA and the amount of total DNA extracted from the sample. Use 1–5 µl of extracted DNA per 50 µl reaction volume.
- ii) The following controls should be included in every PCR assay for IHNV: a) DNA from a known negative tissue sample; b) DNA from a known positive sample (either from tissue or haemolymph or from a plasmid clone that contains the fragment that the specific set of primers amplifies; and c) a 'no template' control.
- iii) Use as primers, primers 389F and 389R, which elicit a band 389 bp in size from IHNV-infected material, or primers 77012F and 77353R, which elicit a band 356 bp in size from IHNV-infected material. Prepare primers at 100 ng µl⁻¹ in distilled water. Keep frozen at -70°C.
- iv) Use a 'hot start' method for the polymerase: if Applied Biosystem's AmpliTaq Gold is used, this involves a 5-minute step at 95°C to denature DNA prior to the primers binding and activation of the enzyme. This programme is then linked to the cycling programme (35 cycles) and an extension programme. The programme is set as follows:

Anexo 17 (cont.)

Hot start	Programme 1	5 minutes 95°C	
Linked to	Programme 2	30 seconds 95°C	
		30 seconds 55°C	35 cycles
		1 minute 72°C	
Linked to	Programme 3	7 minutes 72°C	
Linked to	Programme 4	4°C until off	

- v) Prepare a 'master mix' consisting of water, 10 × PCR buffer, the four dNTPs, the two primers, MgCl₂, AmpliTaq Gold and water (assume use of 1 µl of template; if using more, adjust water accordingly). Add mix to each tube. Use thin-walled tubes designed for PCR. Always run a positive and a negative control.

'Master Mix':

DD H ₂ O	32.5 µl × number of samples
10 × PCR buffer	5 µl × number of samples
10 mM dTTP	1 µl × number of samples
10 mM dATP	1 µl × number of samples
10 mM dCTP	1 µl × number of samples
10 mM dGTP	1 µl × number of samples
25 mM MgCl ₂	4 µl × number of samples
Forward primer (100 ng µl ⁻¹)	1.5 µl × number of samples
Reverse primer (100 ng µl ⁻¹)	1.5 µl × number of samples
AmpliTaq Gold	0.5 µl × number of samples

Vortex this solution to mix all reagents well; keep on ice.

NOTE: The volume of the PCR reaction may be modified. Previously, the PCR reactions for IHNV were run in 100 µl volumes, but it is not necessary to use that amount of reagents, therefore 50 µl volumes are described in this procedure. Likewise, the PCR reactions can also be run in volumes as small as 25 µl. To do this, increase or decrease the volume of the reagents accordingly.

- vi) For a 50 µl reaction mix, add 49 µl Master Mix to each tube and then add 1 µl of the sample to be tested.
- vii) Vortex each tube, spin quickly to bring down all liquid. If the thermal cycler does not have a heated lid to prevent condensation, then carefully overlay the top of each sample with 25–50 µl mineral oil and re-cap the tubes. Insert tubes into the thermal cycler and start programme 1 ('hot start'), which is linked to cycling, extension and soak cycles.
- viii) If mineral oil was used, recover samples from under the mineral oil using a pipette set at 50 µl and transfer to a fresh tube. Using the long-tipped pipette tips (designed for loading gels) results in less oil being carried over with the sample.
- ix) Run 10 µl of the sample in a 1.5% agarose gel (containing 0.5 µg ml⁻¹ ethidium bromide to stain the DNA). Look for the 389 bp band (if using primers 389F and 389R) or for the 356 bp band (if using primers 77012F and 77353R). Bands are not always seen, as it is necessary to have at least 10 ng DNA µl⁻¹ to see DNA in a gel. A Southern transfer of the gel or a dot-blot can be run for more sensitive detection. The DNA can also be precipitated (0.3 M sodium acetate and 2.5 volumes 100% ethanol, -70°C, for 1–3 hours, centrifuge for 20 minutes) and resuspended in 1/10th volume (i.e. 4 µl) TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) or water and either re-run in the gel or tested in a dot-blot.

Real-time PCR (qPCR) method for IHNV: qPCR methods have been developed for the detection of IHNV. These methods offer extraordinary sensitivity that can detect a single copy of the target sequence from the IHNV genome (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). Using primers 309F/309R, it is possible to distinguish infectious forms of IHNV from non-infectious forms. Using MG831F/MG831R it is possible to distinguish the non-infectious forms.

The qPCR method using TaqMan chemistry described below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for non-structural protein. The primers and TaqMan probe are designed by the Primer Express software (Applied Biosystems). The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5'-TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3' and 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3', respectively. The TaqMan probe (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3'), which corresponds to the region from nucleotide 1632 to 1644, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end (Applied Biosystems, part no. 450025).
- ii) Preparation of DNA template: the extraction and purification of DNA template is the same as that described in the section of traditional PCR.
- iii) The qPCR reaction mixture contains: TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, part no. 4324018), 0.3 µM of each primers, 0.15 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) Amplification is performed with the GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems; ABI PRISM 7000, 7300, or 7500 or equivalent can also be used). The cycling profile is: activation of AmpliTaq Gold for 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. The levels of fluorescence are measured at the end of the annealing and extension step.
- v) At the end of the reaction, real-time fluorescence measurements will be taken with a built in charge-coupled device (CCD) camera. A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase of PCR product. Samples will be defined as negative if there is no Ct (threshold cycle) value after 40 cycles the Ct (threshold cycle) values exceed 40 cycles. Samples with a Ct value lower than 40 cycles are considered to be positive. To confirm the real-time PCR results, an aliquot of PCR product can be subjected to electrophoresis on a 4% ethidium bromide agarose gel and photographed. An 81-bp DNA fragment can be visualised in the samples that are positive for IHNV.
- vi) It is necessary to include a 'no template' control in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture or in the heat block of the thermal cycler. A positive control should also be included, and it can be a plasmid containing the target sequence, or purified virions, or DNA from IHNV-infected tissue.

Sequencing: PCR products may be cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified product from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the insertion of non-infectious IHNV genome in host DNA (Tang & Lightner, 2002; 2006).

Through PCR, IHNV was detected in *P. monodon* from South-East Asia. Most of these IHNV PCR assays also detected IHNV-related sequences in *P. monodon* populations in Africa, Australia and Thailand (Tang & Lightner, 2006; Saksmerprome *et al.*, 2011). To discriminate the IHNV-related sequences from the actual virus, PCR assays using primers that detect the IHNV viral sequence and do not react with IHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa or Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (e.g. Saksmerprome *et al.*, 2011) have been developed.

PCR commercial kits are available for IHNV diagnosis and can be acceptable provided they have been validated as fit for such purpose. The OIE validation procedure is described in Chapter 1.1.2 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases.

4.3.2. Serological methods

Shrimp are invertebrate animals and do not produce antibodies. Therefore, serological methods for IHNV are not available.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of IHNV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended and/or not available for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable

Table 5.1. IHNV surveillance, detection and diagnostic methods

Method	Surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	d	d	d	d
Bioassay	d	d	d	d	c	c
Direct LM	d	d	d	d	d	d
Histopathology	d	d	c	c	a	b
Transmission EM	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	d	c	d	d
DNA probes – <i>in situ</i>	d	d	b	b	a	a
PCR, qPCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; qPCR = real-time polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infectious hypodermal and haematopoietic necrosis

As indicated in Table 5.1, PCR is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic IHNV-induced lesions in the cuticular epithelium by histology (with or without confirmation by ISH with IHNV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

IHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

i) Clinical signs indicative of IHNV and a positive result by *in-situ* hybridisation

or

ii) Histopathology indicative of IHNV and a positive result by *in-situ* hybridisation.

Poor hatching success of eggs, and poor survival and culture performance of the larval and PL stages when broodstock are used from wild or farmed stocks where IHNV is enzootic.

Farmed stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults and adults may show persistently high mortality rates. In *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and possibly *P. monodon*, IHNV-infected stocks may show poor and highly disparate growth, poor overall culture performance, and cuticular deformities, including especially bent rostrums and deformed sixth abdominal segments.

Demonstration of eosinophilic to pale basophilic intranuclear inclusion bodies in the typical target tissues for IHNV, as IHNV intranuclear inclusion bodies are nearly identical in appearance to those occurring in the early stages of WSSV infections, their presence in tissue sections should be considered as a presumptive diagnosis of IHNV until confirmed with a second test method, such as dot blot or ISH with IHNV-specific DNA probes or positive PCR test results for IHNV.

7.2. Definition of confirmed case

IHNV is considered to be confirmed if two of the following criteria are met:

- i) Positive result by *in-situ* hybridisation
- ii) Positive result by PCR (always genotype specific)
- iii) Sequence analysis to confirm IHNV nucleic acid sequence.

The two methods must target different areas of the genome.

Any combination of at least two of the following four methods (with positive results):

- Positive dot-blot hybridisation test results for IHNV.
- ISH positive histological signal to IHNV type lesions.
- PCR positive results for IHNV.
- Sequencing of PCR specific products may be required when the purpose is to determine the genotype of IHNV.

8. References

- ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H. SWEENEY J. & LOTZ J. (1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV Disease of *Penaeus stylirostris*: Effects of Shrimp Size on Disease Expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of IHNV virus infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.
- BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1991). Chapter 24. Unclassified Viruses of Crustacea. *In: Atlas of Invertebrate Viruses*, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 597–622.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.

Anexo 17 (cont.)

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.

BONNICHON V., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 179–184.

BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHNV virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.

BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. *In: Diseases of Marine Animals*, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.

BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.

BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.

BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean Biol.*, **13**, 87–94.

CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.

CASTILLE F.L., SAMOCHA T.M., LAWRENCE A.L., HE H., FRELIER P. & JAENIKE F. (1993). Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*, **113**, 65–81.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S., & WITHYACHUMNARNKUL. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress*, Jory D.E., ed. Panama City, Panama, 1–11.

DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.

DUDA T.F.JR. & PALUMBI S.R. (1999). Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar. Biol.*, **134**, 705–710.

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.

FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.

- JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 295–302.
- KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquaculture Soc.*, **22**, 235–243.
- KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.
- LIGHTNER D.V. (1983). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture*. Vol. 1. Crustacean Aquaculture, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 289–320.
- LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp and Prawns. *In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 8–127.
- LIGHTNER D.V. (1993). Diseases of penaeid shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996b). The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 579–601.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.
- LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992a). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES Marine Science Symposia*, **194**, 97–105.
- LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture Soc.*, **18**, 196–197.
- LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992b). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 233–253.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathology*, **33**, 165–180.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific Pathogen-Free (SPF) Shrimp Stocks in Shrimp Farming Facilities as a Novel Method for Disease Control in Crustaceans, *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384-424.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983b). Detection of IHHN virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mariculture Soc.*, **14**, 212–225.

Anexo 17 (cont.)

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG, K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., WILLIAMS R.R., MOHNEY L.L., CLERX J.P.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1985). Recent advances in penaeid virus disease investigations. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. World Aquaculture. Soc.*, **16**, 267–274.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.

MARTINEZ-CORDOVA L.R. (1992). Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *The Progressive Fish Culturist*, **54**, 265–266.

MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B., & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J. World Aquaculture Soc.*, **30**, 192–200.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDENO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 330–334.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHHN parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.

PRIMAVERA, J.H. & QUINTIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crustacean Biol.*, **20**, 796–802.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

- ROCHE APPLIED SCIENCE (2006a). DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics. www.roche-applied-science.com/frames/frame_publications.htm. Indianapolis, USA.
- ROCHE APPLIED SCIENCE (2006b). DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide. Catalog Number 03 908 089 001. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA.
- ROSENBERRY B. (2004). World Shrimp Farming 2004. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.
- SAKSMEPRROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160** (1–2), 180–190.
- SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito Brevdensoviruses. *Virology*, **277**, 167–177.
- TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (2003a). Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus – a preliminary study. *Aquaculture*, **216**, 19–29.
- TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 93–97.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.
- TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and the virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.
- TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH, H.H. & LIGHTNER D.V. (2003b). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.
- WEPPE M. (1992). Demonstration de altas cuaidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress, CENAIM, Guayaquil, Ecuador, 229–232.
- WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.
- ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis

CHAPTER 2.2.4.

NECROTISING HEPATOPANCREATITIS

1. Scope

Necrotising hepatopancreatitis (NHP) disease is caused by infection with a Gram-negative, pleomorphic intracellular alpha-proteobacterium (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Lightner *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996a; 1996b) preliminarily called *Candidatus Hepatobacter penaei*. The principal host species in which necrotising hepatobacterium (NHPB) can cause significant disease outbreaks and mortalities are *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1993; Ibarra-Gómez *et al.*, 2007; Lightner & Redman, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

NHP has four distinct phases: initial, acute, transition and chronic. In acute and transition-phase disease, pathognomonic lesions are typically present in histological sections of the hepatopancreas, while in the initial and chronic phases of the disease, there are no pathognomonic lesions, and molecular and antibody-based methods for NHPB detection are necessary for diagnosis (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2012; Vincent & Lotz, 2005).

Synonyms: necrotising hepatobacterium (NHPB) or NHP bacterium (NHPB); rickettsial-like organism (RLO).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

NHPB is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium preliminarily called *Candidatus Hepatobacter penaei*. It is a member of the α -subclass of proteobacteria ~~and remains unclassified~~ (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 \times 0.9 μ m), whereas the helical form (0.25 \times 2–3.5 μ m) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). Genetic analysis of the NHPB associated with North and South American outbreaks of NHP suggest that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy *et al.*, 1996a; 1996b).

2.1.2. Survival outside the host

No data.

2.1.3. Stability of the agent

NHPB-infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine. NHPB frozen at -20°C -70°C and -80°C have been shown to retain infectivity in experimental transmission trials with *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1992).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Most penaeid species can be infected with NHPB, including the principal cultured species in Latin American, *P. vannamei* (Pacific white shrimp) and *P. stylirostris* (Pacific blue shrimp).

NHPB infections are most severe in *P. vannamei* where the intracellular bacterium can cause acute epizootics and mass mortality (>90%). In *P. vannamei*, the juvenile, subadult and broodstock life stages are the most severely affected (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010).

Anexo 18 (cont.)

NHPB causes chronic disease in *P. vannamei*, the main effects of which are slow growth, a soft cuticle and a flaccid body (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

Outbreaks of NHP disease have been reported in *P. aztecus* (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). NHP has also been seen in *P. californiensis* and *P. setiferus* (Frelie *et al.*, 1995; Lightner, 1996). *Penaeus setiferus* is reportedly less susceptible to disease than *P. vannamei* (Frelie *et al.*, 1995).

In an NHP survey of the Gulf of Mexico, *P. setiferus* and *P. duorarum* in the vicinity of coastal prawn farms along the Yucatan and Campeche coast revealed no histological evidence of NHP (Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006).

2.2.2. Susceptible stages of the host

NHPB has been demonstrated in juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei*.

2.2.3. Species or sub-population predilection

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

2.2.4. Target organs and infected tissue

The target tissue is the hepatopancreas, with NHPB infection reported in all hepatopancreatic cell types.

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of *P. vannamei* populations that survive NHPB infections and/or epizootics may carry the intracellular bacteria for life and pass it on to other populations by horizontal transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; 2010; Vincent & Lotz, 2005).

Natural transmission of NHPB is thought to occur *per os* by cannibalism (Frelie *et al.*, 1993; 1995; Johnson, 1990; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010), although cohabitation and dissemination of NHPB via the water column may also play a role (Frelie *et al.*, 1993; 1995). NHPB in faeces shed into pond water has also been suggested as a possible means of transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Outbreaks of disease are often preceded by prolonged periods of high water temperature (approximately 30°C) and salinity (up to 40 parts per thousand [ppt]) (Frelie *et al.*, 1995; Lightner & Redman, 1994; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

NHPB is common in wild penaeid shrimp in Peru (*P. vannamei*) and Laguna Madre of Tamaulipas, Mexico (*P. aztecus*, *P. duorarum* and *P. setiferus*) (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Lightner & Redman, 1994).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission of NHPB can be horizontal by cannibalism; transmission by contaminated water has been demonstrated (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelie *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2004).

2.3.2. Prevalence

Some reported mean values for NHPB prevalence in wild stocks are between 5.6 and 15% in *P. duorarum*, and between 5 and 17% in *P. aztecus* collected from Carrizal and Carbonera, Laguna Madre of Tamaulipas, Mexico (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010); 0.77% in *P. vannamei*, and 0.43% in *P. stylirostris* collected from Tumbes Region, Peru (Lightner & Redman, 1994).

Some reported mean values for NHPB prevalence in shrimp farms are between 0.6% and 1.3% in *P. vannamei* collected from shrimp farms in Belize, Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua and Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

2.3.3. Geographical distribution

NHPB appears to have a Western hemisphere distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006). In the Western Hemisphere, NHPB is commonly found in cultured penaeid shrimp in Belize, Brazil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Peru, United States of America, and Venezuela (Frelieir *et al.*, 1992; Ibarra-Gómez *et al.*, 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

2.3.4. Mortality and morbidity

In *P. vannamei*, infection by NHPB results in an acute, usually catastrophic disease with mortalities approaching 100%.

2.3.5. Environmental factors

The replication rate of NHPB increases at lengthy periods of high temperatures (>29°C) and salinity changes (20–38%). In Mexico, NHPB has been detected at a low prevalence (<7%) in shrimp farms in the months of April, May, July and August. However, in the months of September and October when temperatures are high during the day and low at night, high prevalence and mortality (>20%) are observed (Morales-Covarrubias, 2010).

2.4. Control and prevention

Control

The use of the antibiotics, oxytetracycline and florfenicol 50%, in medicated feeds every 8 hours for 10 days is probably the best NHP treatment currently available, particularly if disease is detected in the initial phase (Frelieir *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

Prevention

- a) Early detection (initial phase) of clinical NHP is important for successful treatment because of the potential for cannibalism to amplify and transmit the disease.
- b) Shrimp starvation and cannibalism of shrimps with NHPB, as well as positive conditions for NHPB cultivation, are important factors for NHPB propagation in *P. vannamei*.
- c) The use of **quick** hydrated lime (Ca(OH)₂) to treat pond bottoms during pond preparation before stocking can help reduce NHP incidence.
- d) Preventive measures can include raking, tilling and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged sun drying of ponds and water distribution canals for several weeks, disinfection of fishing gear and other farm equipment using calcium hypochlorite, and drying and extensive liming of ponds.
- e) The use of specific pathogen-free (SPF) **and female** broodstock is an effective preventive measure.

2.4.1. Vaccination

No scientifically confirmed reports.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

Anexo 18 (cont.)

2.4.4. Resistance breeding

No scientifically confirmed reports.

2.4.5. Restocking with resistant species

No scientifically confirmed reports.

2.4.6. Blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

NHPB has been demonstrated to be transmitted horizontally by cannibalism (Frelter *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996b; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011b; Vincent & Lotz, 2005; 2007). Disinfection of eggs and larvae is, therefore, a good management practice (Lee & O'Bryen, 2003) and is recommended for its potential to reduce NHPB contamination of spawned eggs and larvae (and contamination by other disease agents).

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of NHPB infections and disease. Among these has been the application of polymerase chain reaction (PCR) to pre-screening of wild or pond-reared broodstock.

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

Suitable specimens for testing for infection by NHPB are life stages (postlarvae [PL], juveniles and adults).

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method, see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, sub adults and adults. However, for eggs, larvae and PL, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

3.4. Best organs or tissues

NHPB infects most enteric tissue. The principal target tissue for NHPB is hepatopancreas. Faeces may be collected and used for testing (usually by PCR, or dot-blot hybridisation with specific probes) when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Bradley-Dunlop *et al.*, 2004; Briñez *et al.*, 2003; Frelter *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

3.5. Samples/tissues those are not suitable

NHPB ~~are enteric bacteria and~~ do not replicate in the midgut (~~enteric tissues~~), caeca (~~enteric tissues~~), connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells.

4. Diagnostic methods**4.1. Field diagnostic methods**

The prevalence and severity of NHPB infections may be 'enhanced' in a contained population by rearing shrimps in relatively crowded or stressful conditions. The 'crowding stress' factors may include high stocking densities, ablated, and marginal water quality (i.e. low dissolved oxygen, elevated water temperature, or elevated ammonia or nitrite) in the holding tank water. These conditions may encourage expression of low-grade NHPB infections and the transmission of the agent from carriers to previously uninfected hosts in the population. This results in increased prevalence and severity of infections that can be more easily detected using the available diagnostic and detection methods for NHPB.

4.1.1. Clinical signs

A wide range of gross signs can be used to indicate the possible presence of NHP. These include: lethargy, reduced food intake, atrophied hepatopancreas, anorexia and empty guts, noticeably reduced growth and poor length weight ratios ('thin tails'); soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; heavy surface fouling by epicomensal organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic.

4.1.2. Behavioural changes

In acute NHP disease, *P. vannamei* may present behavioural changes including lethargy and reduced feeding activity.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

NHPB often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adult and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Bastos Gomes *et al.*, 2010, Brock & Main, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012). Gross signs are not NHP specific, but acute NHP shows a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance (see Section 4.1.1).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology

Acute and chronic NHP in *P. vannamei* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stain histological methods (see Section 4.2.6).

4.2.3.1. Initial phase of necrotising hepatopancreatitis

Initial NHPB infection is more difficult to diagnose using routine H&E histological methods. For diagnosis of initial infections, molecular methods are recommended for NHPB detection (e.g. by PCR or application of NHPB-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or *in-situ* hybridisation (ISH) of histological sections).

4.2.3.2. The acute phase of necrotising hepatopancreatitis

The acute NHP disease is characterised by atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule epithelia, presence of bacterial ~~form cells~~ and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations). Hypertrophic cells, individual epithelial cells appeared to be separated from adjacent cells, undergo necrosis and desquamation in to the tubular lumen. The tubular epithelial cell lipid content is variable.

4.2.3.3. Transition phase of necrotising hepatopancreatitis

The transitional phase of NHP disease is characterised by haemocytic inflammation of the intertubular spaces in response to necrosis, cytolysis, and sloughing of hepatopancreas tubule epithelial cells. The hepatopancreas tubule epithelium is markedly atrophied, resulting in the formation of large oedematous (fluid filled or 'watery') areas in the hepatopancreas. Tubule epithelial cells within multifocal encapsulation are typically atrophied and reduced from simple columnar to cuboidal in morphology. They contain little or no stored lipid vacuoles, markedly reduced or no secretory vacuoles and masses of bacteria. At this phase haemocyte nodules were observed in the presence of masses of bacteria in the centre of the nodule

4.2.3.4. Chronic phase of necrotising hepatopancreatitis

In the chronic phase of NHP, tubular lesions, multifocal encapsulation and oedematous areas decline in abundance and severity and are replaced by infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. There are areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells with masses of bacteria in the cytoplasm and low numbers of haemocyte nodules.

Anexo 18 (cont.)

4.2.4. Wet mounts

Wet-mount squash examination of hepatopancreas (HP) tissue is generally conducted to detect presumptive NHP disease. The hepatopancreas may be atrophied and have any of the following characteristics: soft and watery; fluid filled centre; pale with black stripes (melanised tubules); pale centre instead of the normal orange coloration. ~~Elevated mortality rates reaching over 90% can occur within 30 days of onset of clinical signs if not treated.~~ For wet mount analysis the shrimp must be in the intermolt stage, and have not undergone a treatment that could alter the tubules. This technique ~~uses is based on the~~ tubular deformation or ~~tubular~~ atrophy, mainly of the apical region ~~to indicate early stages of NHP.~~

NHP disease has four phases ~~(a semiquantitative scale):~~

Initial phase: low presence of tubular deformation (1–5 field⁻¹ organism⁻¹) and cell detachment.

Acute phase: infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules (6–10 field⁻¹ organism⁻¹), encapsulation present in different regions of the sample, which is atrophied tubules surrounded by multiple layers of haemocytes.

Transition phase: infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules (11–15 field⁻¹ organism⁻¹), melanised tubules, necrotic tubules and a high level of encapsulation present in different regions of the sample. At this stage haemocyte nodules were observed with masses of bacteria in the centre of the nodule.

Chronic phase: areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells with masses of bacteria in the cytoplasm.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Electron microscopy/cytopathology

Not currently applicable for diagnostic purposes

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See section 4.2.4

4.3.1.1.2. Smears

Not applicable

4.3.1.1.3. Fixed sections

See section 4.2.3.

4.3.1.1.4. Bioassay method

Confirmation of NHPB infection may be accomplished by bioassay of NHPB-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the intracellular bacteria (Cock *et al.*, 2009; Johnson, 1990; Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005). Oral protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped hepatopancreas of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks. The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only a normal feed, is required. When the hepatopancreas feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for NHPB, NHP-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of NHP disease and unusual mortalities.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

NHPB has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2007).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Immunohistochemistry (IHC) tests using monoclonal antibodies (MAbs) specific cDNA probes to NHPB according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004) and Loy & Frelier (1996).

4.3.1.2.3. Molecular techniques

ISH and reverse transcription (RT)-PCR tests for NHPB have been developed, and RT-PCR kits for NHPB are commercially available. PCR tests for NHPB have been developed and a number of methods and commercial products using these methods are available (Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996b). Gene probes and PCR methods provide greater diagnostic sensitivity than do classic histological approaches to NHPB diagnosis. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp.

4.3.1.2.3.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for NHPB may be produced in the laboratory. The ISH method of Loy & Frelier (1996) and Lightner (1996) provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for NHPB detection and diagnosis that employ classical histological methods (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012). The ISH assay of routine histological sections of acute, transition and chronic phase lesions in hepatopancreas with a specific DIG-labelled cDNA probe to NHPB, provides a definitive diagnosis of NHPB infection (Lightner, 1996; Loy & Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Pathognomonic NHPB-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. (See Chapter 2.2.2 IHHN for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

4.3.1.2.3.2. Reverse transcription (RT)-PCR method

Hepatopancreas and faeces may be assayed for NHPB using PCR. Primers designated as NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' and NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-C-3', amplify a 379 base pair (bp) designed against the GenBank accession number corresponding to the ribosomal 16S rRNA of NHPB, which amplify a 379 bp fragment (Nunan *et al.*, 2008). The primer concentration (F2/R2) used for each is 0.31 μ M. The cycling parameters are: Step 1: 95°C for 2 minutes, 1 cycle; Step 2: 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds and 95°C for 30 seconds, 25 cycles; Step 3: 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, 1 cycle; 4°C infinite hold. The RT-PCR method outlined below for NHPB generally follows the method used described in Nunan *et al.* (2008) Aranguren *et al.* (2010) with modifications by an OIE Reference Laboratory in the USA.

- i) Preparation of RNA-DNA template: RNA DNA can be extracted from 25–50 mg of fresh, frozen and ethanol-preserved hepatopancreas. Extraction of RNA-DNA should be performed using commercially available RNA-DNA tissue extraction kits, such as the High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Germany) and following the manufacturer's procedures for production of quality DNA RNA templates. Other DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucelic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)².
- ii) The RT-PCR assay is carried out in solution, using final RNA concentration must be 10–1000 ng ml⁻¹.
- ii) The following controls should be included in every when performing the RT-PCR assay for NHPB: a) known NHPB negative tissue sample; b) a known NHPB-positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.
- iii) The GeneAmp® EZ rTth RNA PCR kit (Applied Bioscience, USA) PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.

² Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Anexo 18 (cont.)

- iv) The optimised RT-PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 50–25 µl total volume) for detection of NHPB in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.46–0.2 µM each), dNTPs (300–200 µM each), ~~rTth DNA Taq~~ polymerase (2.5 U–50–0.1 U µl⁻¹), magnesium ~~acetate chloride~~ (2.5–1.5 mM), in ~~5 × EZ buffer~~ (25 mM Bicine, 57.5 mM potassium acetate, 40% [w/v] glycerol, pH 8.2) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- v) If the thermal cycler does not have a heated lid, then light mineral oil (50 µl) is overlaid on the top of the 50–25 µl reaction mixtures to prevent condensation or evaporation during thermal cycling.
- vii) ~~The RNA template and all the reagents are combined and reverse transcription was allowed to proceed at 60°C for 30 minutes, followed for 2 minutes.~~
- vi) The cycling parameters are: Step 1: 95°C for 2–5 minutes, 1 cycle; Step 2: 60–95°C for 30 seconds, 72–60°C for 30 seconds and 95–72°C for 30 seconds, 25–35 cycles; Step 3: 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, 1 cycle; 4°C infinite hold.

Note: The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.

- ix) ~~Details of the composition of the reagents and buffers used here may be found in Chapter 2.2.2 HHH.~~

4.3.1.2.3.3. Real-time PCR method

Real-time PCR methods have been developed for the detection of NHPB. These methods have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real-time PCR is ~100 copies of the target sequence from the NHPB genome (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for NHPB generally follows the method used in Aranguren *et al* (2010).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the 16S, rRNA gene of NHPB (GenBank U65509) (Loy & Frelier., 1996). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP1300F) and downstream (NHP1366R) primer sequences are: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' and 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,Ntetramethyl- 6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *Preparation of RNA-DNA template*: the extraction and purification of ~~RNA-DNA~~ template from hepatopancreas, is the same as that described in the section for traditional real-time-PCR.
- iii) *The real-time PCR reaction mixture contains*: TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng of RNA-DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) Amplification is performed with the master cycler Realplex 2.0 (Eppendorf). The cycling consists of initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. After each cycle, the levels of fluorescence are measured.
- v) At the end of the reaction, real time fluorescence measurements will be taken with a built in charge-coupled device (CCD) camera. A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase in PCR product. Samples will be defined as negative if there is no Ct (threshold cycle) value is after 40 cycles.
- vi) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture or in the heat block of the thermal cycler. A positive control should also be included, and this can be an *in-vitro* transcribed RNA-plasmid DNA containing the target sequence, purified bacteria, or ~~RNA-DNA~~ extracted from NHPB-infected hepatopancreas.

4.3.1.2.3.4. Sequencing

RT-PCR products may be cloned and sequenced or sequenced directly when necessary to confirm infection by NHPB or to identify false positives or nonspecific amplification (Aranguren *et al.*, 2010; Bustin *et al.*, 2009; Vincent & Lotz, 2005).

4.3.1.2.4. Agent purification

Methods for NHPB isolation and purification are available (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2004; Vincent & Lotz, 2005), but these are not recommended for routine diagnosis of NHPB. The NHP bacterium is unculturable using traditional bacteriological methods, thus NHPB infection must be maintained through continual exposure of uninfected *L. vannamei* stock to a population undergoing an NHPB epidemic.

4.3.2 Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrate animals that do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to NHPB.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of NHPB are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	c	c	b	d
Bioassay	d	d	d	d	c	d
Direct LM	d	d	c	d	c	d
Histopathology	d	b	b	c	a	b
<i>In-situ</i> DNA probes	a	a	a	a	a	a
Transmission EM	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	c	c	b	b
Real-time PCR	a	a	a	a	a	a
qPCR	a	a	a	a	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Sequencing	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction; qPCR = quantitative PCR.

Anexo 18 (cont.)

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from Necrotising Hepatopancreatitis

As indicated in Table 5.1, real-time PCR (Section 4.3.1.2.3.2) is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity. When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic NHPB-induced lesions in the hepatopancreas by histology (with or without confirmation by ISH with NHPB-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

The presence of NHPB shall be suspected if at least one of the following criteria is met: A suspect case is represented by:

Sudden high mortalities in late PL, juvenile or subadult *P. vannamei* or *P. stylirostris* in regions where NHPB is enzootic;

The sudden presence of numerous sea birds (gulls, cormorants, herons, terns, etc.) 'fishing' in one or more shrimp culture ponds;

Samples of cultured *P. vannamei* or *P. stylirostris* from ponds with feeding sea birds that present gross signs indicative of acute- or transition-phase NHP, such as a general atrophied hepatopancreas, reddish colouration, lethargy, soft shells, empty guts, and the presence of numerous irregular black spots on the cuticle;

Poor hatching success of eggs, and poor survival and culture performance of the larval and PL stages when broodstock are used from wild or farmed stocks where NHPB is enzootic.

7.2. Definition of confirmed case

Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):

- Histological demonstration of diagnostic acute-phase NHPB lesions in (especially) the atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule mucosa, presence of bacterial form and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations).
- ISH positive histological signal to NHPB-type lesions.
- PCR positive results for NHPB.

8. References

AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (nhp) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.

ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.

ARANGUREN L.F., TANG K.F. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.

- BASTOS GOMES G., SANTOS DOMINGOS J.A., CAVALCANTI OLIVEIRA K.K., DE PAULA MENDES P., ARNS DA SILVA V. & SHINOZAKI MENDES E. (2010). Diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, through wet mount, histopathology and PCR techniques. *J. World Aquaculture Soc.*, **41**, 816–822.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (eds). (2001). Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. *In: Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 p.
- BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & D.V. LIGHTNER. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.
- BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 55–72.
- BROCK J.A. & MAIN F. (1994). A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 241 p.
- BUSTIN S., GARSON J., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M., SHIPLEY G., VANDESOMPELE J. & WITTWER C. (2009). The MIQE guidelines: minimal information for publication of quantitative realtime PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55** (4), 611–622.
- COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.
- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.
- DEL RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, 606–209.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A. LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. (1995). Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. *In: Swimming Through Troubled Waters*. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95. San Diego, CA, USA, 240 p.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPÍZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, **33**, 1–9.
- JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA.
- JORY D.E. (1997). Necrotizing hepatopancreatitis and its management in shrimp ponds. *Aquaculture Magazine*, **23**, 98–101.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (eds). (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

Anexo 18 (cont.)

LIGHTNER D.V. (ed.) (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquacult. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BONAMI J.R. (1992). Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 235–239.

LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., SERBAN I.T. & TEMPLETON J.W. (1996a). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.

LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996b). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones*, Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., LEMUS-PEREIRA A.M., SOLÍS MONTIEL V.T., RUÍZ-LUNA A. & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Científica FCV-LUZ*, **XXI** (5), 434–446.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M. (2012). Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Científica, FCV-LUZ*, **XXII** (1), 72–80.

NUNAN M.L., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 69–73.

VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to KONA stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*
* *

NB: At the time of publication (2015) there was not yet
an OIE Reference Laboratory for Necrotising hepatopancreatitis
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

CHAPTER 2.2.5.

TAURA SYNDROME

1. Scope

Taura syndrome (TS) is a viral disease of penaeid shrimp caused by infection with Taura syndrome virus (TSV) (Bonami *et al.*, 1997; Fauquet *et al.*, 2005; Lightner 1996a; Mari *et al.*, 1998).

2. Disease information**2.1. Agent factors****2.1.1. Aetiological agent, agent strains**

The aetiological agent is TSV, as described by Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) have been documented based on the gene sequence encoding VP1 (=CP2), the largest and presumably dominant of the three major structural proteins of the virus. Based on VP1 (=CP2) sequence variations, these genotypic groups are: 1) the Americas group; 2) the South-East Asian group; 3) the Belize group; and 4) the Venezuelan group (Chang *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

At least two distinct antigenic variants of TSV have been identified by their differential reactivity to monoclonal antibody MAb 1A1, produced to a reference isolate from the Americas (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999): Type A represents those that react ~~to~~ with MAb 1A1 (in the enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], Western blots and ~~*in situ* hybridisation [ISH]~~ immunohistochemistry [IHC] with infected tissues) and those that do not. The MAB 1A1 non-reactors were subdivided into Types B (TSV 98 Sinaloa, Mexico) and Type C (TSV 02 Belize), based on host species and virulence. All TSV isolates of the Americas and most, if not all, South-East Asian genotypes react with MAB 1A1. In marked contrast, none of the Belize genotype group reacts with MAB 1A1 (Erickson *et al.*, 2002; 2005), nor does a TSV isolate from the 2005 epizootic in Venezuelan shrimp farms.

TSV particles are 32 nm in diameter, non-enveloped icosahedrons and have a buoyant density of 1.338 g ml⁻¹. The genome of TSV consists of a linear, positive-sense single-stranded RNA 10,205 nucleotides in length, excluding the 3' poly-A tail, and it contains two large open reading frames (ORFs). ORF 1 contains the sequence motifs for nonstructural proteins, such as helicase, protease and RNA-dependent RNA polymerase. ORF 2 contains the sequences for TSV structural proteins, including the three major capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (55, 40, and 24 kDa, respectively). The virus replicates in the cytoplasm of host cells (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

TSV has been assigned to the genus Aparavirus in the Family Dicistroviridae in the 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; King *et al.*, 2012).

Other reported causes of TS: Taura syndrome in Ecuador was initially linked to fungicide contamination of shrimp farms, a contention that was supported by litigation for ~ 16 years after the disease was scientifically shown to have a viral aetiology (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 2005). Hence, several papers in the literature propose a toxic aetiology for TS (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

2.1.2. Survival outside the host

No information available.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

No information available.

Anexo 19 (cont.)**2.1.4. Life cycle**

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

The principal host species for TSV are the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, and the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*. While the principal host species for TSV all belong to the penaeid subgenus *Litopenaeus*, other penaeid species can be infected with TSV by direct challenge, although disease signs do not develop. Documented natural and experimental hosts for TSV include: *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. indicus* and *Metapenaeus ensis* (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004; Lightner, 1996a, 1996b; Overstreet *et al.*, 1997; Srisuvan *et al.*, 2005; Stentiford *et al.*, 2009; Wertheim *et al.*, 2009).

2.2.2. Susceptible stages of the host

TSV has been documented in all life stages (i.e. PL, juveniles and adults) of *P. vannamei* (the most economically significant of the two principal host species) except in eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No data.

2.2.4. Target organs and infected tissue

TSV infects and has been shown to replicate (using ISH with specific DNA probes) principally in the cuticular epithelium (or hypodermis) of the general exoskeleton, foregut, hindgut, gills and appendages, and often in the connective tissues, the haematopoietic tissues, the lymphoid organ (LO), and antennal gland. The enteric organs (endoderm-derived hepatopancreas, midgut and midgut caeca mucosal epithelia) and smooth, cardiac, striated muscle, and the ventral nerve cord, its branches and its ganglia typically show no histological signs of infection by TSV and are usually negative for TSV by ISH (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Hasson *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; Jimenez *et al.*, 2000; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998a; 1998b; Lightner *et al.*, 1995; Srisuvan *et al.*, 2005).

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of populations of *P. vannamei* or *P. stylirostris* that survive TSV infections or epizootics may carry the virus for life (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b) and, although not documented, are assumed to pass the virus to their progeny by vertical transmission.

2.2.6. Vectors

Sea birds: TSV has been demonstrated to remain infectious for up to 48 hours (after ingestion of TSV-infected shrimp carcasses) in the faeces passed by wild or captive sea gulls (*Larus atricilla*) and chickens (*Gallus domesticus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastro-intestinal system of any bird species. These findings implicate birds as being an important mechanical vector for the transmission of the virus within affected farms or farming regions (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Aquatic insects: the water boatman (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], an aquatic insect that feeds on shrimp carcasses in shrimp farm ponds), has also been shown to serve as a mechanical vector of TSV (Brock 1997; Lightner, 1995, 1996a, 1996b).

Frozen TSV-infected commodity products: TSV has been found in frozen commodity shrimp (*P. vannamei*) products in samples from markets in the USA that originated in Latin America and South-East Asia. Improper disposal of wastes (liquid and solid, i.e. peeled shells, heads, intestinal tracts, etc.) from value-added reprocessing of TSV-infected shrimp at coastal locations may provide a source of TSV that may contaminate wild or farmed stocks near the point of the waste stream discharge (Lightner, 1996b; Nunan *et al.*, 2004).

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

No data.

2.3. Disease pattern

TS is best known as a disease of nursery- or grow-out-phase *P. vannamei* that occurs within ~14–40 days of stocking PLs into grow-out ponds or tanks, hence, shrimp with TS are typically small juveniles of from ~0.05 g to <5 g. Larger shrimp may also be affected, especially if they are not exposed to the virus until they are larger juveniles or adults (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz, 1997).

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission of TSV can be by horizontal or vertical routes. Horizontal transmission by cannibalism or by contaminated water has been demonstrated (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; White *et al.*, 2002). Vertical transmission from infected adult broodstock to their offspring is strongly suspected but has not been experimentally confirmed.

2.3.2. Prevalence

In regions where the virus is enzootic in farmed stocks, the prevalence of TSV has been found in various surveys to range from 0 to 100% (Brock, 1997; Jimenez *et al.*, 2000; Laramore, 1997).

2.3.3. Geographical distribution

TS is now widely distributed in the shrimp-farming regions of the Americas, South-East Asia and the Middle East (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2009; Yu & Song, 2000).

The Americas: following its recognition in 1992 as a distinct disease of cultured *P. vannamei* in Ecuador (Brock *et al.*, 1995; Jimenez, 1992; Lightner *et al.*, 1995), TS spread rapidly throughout many of the shrimp-farming regions of the Americas through shipments of infected PL and broodstock (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012). Within the Americas, TS and/or TSV have been reported from virtually every penaeid shrimp-growing country in the Americas and Hawaii (Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2012; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001). TSV is enzootic in cultured penaeid shrimp stocks on the Pacific coast of the Americas from Peru to Mexico, and it has been occasionally found in some wild stocks of *P. vannamei* from the same region (Lightner & Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1995). TSV has also been reported in farmed penaeid stocks from the Atlantic, Caribbean, and Gulf of Mexico coasts of the Americas, but it has not been reported in wild stocks from these regions (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 2005; 2011; Lightner *et al.*, 2012).

Asia and the Middle East: TSV was introduced into Chinese Taipei in 1999 with infected imported Pacific white shrimp, *P. vannamei*, from Central and South American sources (Tu *et al.*, 1999; Yu & Song, 2000). Since that original introduction, the virus has spread with movements of broodstock and PL to China (People's Rep. of), Thailand, Malaysia, and Indonesia where it has been the cause of major epizootics with high mortality rates in introduced unselected stocks of *P. vannamei* (Chang *et al.*, 2004; Lightner, 2011; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005). Recently, TSV has also been associated with significant mortalities in *P. indicus* being farmed in Saudi Arabia (Wertheim *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortality and morbidity

In on-farm epizootics of TS involving unselected (i.e. not selected for TSV resistance) stocks of *P. vannamei*, the principal host species for TSV, typical cumulative mortalities range from 40 to >90% in cultured populations of PL, juvenile, and subadult life stages. TSV-resistant lines of *P. vannamei* are available which show survival rates of up to 100% in laboratory challenge with all four TSV genotypes (Lightner *et al.*, 2009; Moss *et al.*, 2001).

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks of TS are more frequent when salinities are below 30 ppt (Jimenez *et al.*, 2000).

Anexo 19 (cont.)

2.4. Control and prevention**2.4.1. Vaccination**

No effective vaccines for TSV are available.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Resistance breeding

After TS emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to TSV (genotype 1, MAb 1A1 Type A). Following from this discovery and due to TSV reaching Mexico in 1994 where it caused crop failures of *P. vannamei*, selected lines of TSV-resistant *P. stylirostris* became the dominant shrimp farmed in western Mexico from 1995. However, in 1998–1999, a new 'strain' of TSV (Type B; Erickson *et al.*, 2002; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarin-Herzberg & Ascencio, 2001) emerged and caused massive epizootics in *P. stylirostris*. The emergence of this new 'strain' of TSV was soon followed in late 1999 by the introduction of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp farms in western Mexico, to which *P. stylirostris* had no resistance, effectively ending any interest in the culture of *P. stylirostris* in Mexico.

TSV-resistant domesticated stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have been developed. Some domesticated lines of TSV-resistant *P. vannamei* (that are also TSV-free) are in widespread use by the shrimp-farming industries of the Americas and South-East Asia (Clifford, 1998; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002). After the appearance of TS in Central America, improved TS resistance was reported in wild caught *P. vannamei* PLs used to stock shrimp farms in the region (Laramore, 1997).

2.4.5. Restocking with resistant species

Selected lines of TS resistant *P. vannamei* have been developed and are commercially available (Clifford, 1998; Laramore, 1997; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002).

2.4.6. Blocking agents

Resistance to TSV infection was reported by expression of the TSV coat protein antisense RNA in *P. vannamei* zygotes. Transgenic juveniles reared from zygotes protected in this manner showed improved resistance to TSV challenge by *per os* or intramuscular (IM) injection routes (Lu & Sun, 2005). Similar results have been produced by injection of short random double-stranded RNAi sequences into juvenile *P. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

~~While it is possible~~ TSV ~~might is believed to~~ be transmitted vertically (transovarian transmission), ~~despite there have been~~ no published report documenting this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is good management practice and it is recommended for its potential to reduce TSV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry ~~and disease control and management~~ practices have been ~~used applied~~ successfully to reduce the risks TSV infections and disease occurring during farm grow-out. These include the application of polymerase chain reaction (PCR) prescreening of wild or pond-reared broodstock and/or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), fallowing and restocking of entire culture regions with TSV-free stocks (Dixon & Dorado, 1997), and the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Moss *et al.*, 2001; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992; Wyban *et al.*, 2004). The adoption of the latter technology (SPF stocks) has proven to be among the most successful husbandry practice for the prevention and control of TS. Unfortunately, there is a misconception in the industry that SPF is a genetic trait rather than a condition of health status. The development of SPF *P. vannamei* that were free not only of TSV, but also of all the major known pathogens of penaeid shrimp, has resulted in the introduction of the species to Asia and to its surpassing *P. monodon* in 2005 as the dominant farmed shrimp species in Asia, as well as the Americas where the SPF stocks were developed (FAO, 2006; Lightner, 2005; Rosenberry, 2004).

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection by TSV include PL, juveniles and adults. While TSV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for TSV detection or certification of TS disease freedom.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, subadults and adults. However, for eggs, larvae and PL pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

3.4. Best organs and tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of TS is the cuticular epithelium. In chronic infections the LO is the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.5. Samples/tissues that are not suitable

TSV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection by TSV.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Only acute-phase TS disease can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute-phase TS disease.

4.1.2. Behavioural changes

Only shrimp with acute-phase TS disease present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp apparently become hypoxic and move to the pond edges or pond surface where dissolved oxygen levels are higher. Such shrimp may attract seabirds in large numbers. In many TS disease outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicate the presence of a serious disease outbreak (which is often either TS or WSD when sea birds are observed) to the farm manager.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

TS disease has three distinct phases, acute, transition, and chronic, which are grossly distinguishable (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Gross signs presented by juvenile, subadult and adult shrimp in the transition phase of TS are unique and provide a presumptive diagnosis of the disease.

Anexo 19 (cont.)

Acute phase: gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase TS include expansion of the red chromatophores giving the affected shrimp a general, overall pale reddish coloration and making the tail fan and pleopods distinctly red; hence 'red tail' disease was one of the names given by farmers when the disease first appeared in Ecuador (Lightner *et al.*, 1995). In such shrimp, close inspection of the cuticular epithelium in thin appendages (such as the edges of the uropods or pleopods) with a ×10 hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute TS typically have soft shells, an empty gut and are often in the late D stages of the moult cycle. Acutely affected shrimp usually die during ecdysis. If the affected shrimp are larger than ~1 g, moribund shrimp may be visible to sea birds at the pond edges and surface. Thus, during the peak of severe epizootics, hundreds of sea birds (gulls, terns, herons, cormorants, etc.) may be observed feeding on affected moribund shrimp that accumulate at the surface of the affected pond surface and edges (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Garza *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995; Vanpatten *et al.*, 2004).

Transition (recovery) phase: although only present for a few days during TS epizootics, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a tentative diagnosis of TSV infection. During the transition phase (which may be occurring while many shrimp in the affected populations are still in the acute phase and daily mortalities are high), fair to moderate numbers of shrimp in affected ponds show random, multifocal, irregularly shaped melanised cuticular lesions. These melanised spots are haemocyte accumulations indicating the sites resolving TS lesions in the cuticular epithelium. Such shrimp may or may not have soft cuticles and red-chromatophore expansion, and may be behaving and feeding normally (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011).

Chronic phase: after successfully moulting, shrimp in the transition phase move into the chronic phase of TS in which persistently infected shrimp show no obvious signs of disease (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). However, *P. vannamei* that are chronically infected with TSV may be less resistant to normal environmental stressors (i.e. sudden salinity reductions) than uninfected shrimp (Lotz *et al.*, 1995).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology (for penaeid hosts)

TS disease in the acute and chronic phases can be diagnosed most reliably using histological methods (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Pathognomonic TSV-induced pathology is unique in acute-phase infections (Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a; 2011). In chronic TSV infections, the only lesion typically presented by infected shrimp is the presence of an enlarged LO with multiple LO spheroids (LOS) (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner 2011), which cannot be distinguished from LOS induced by chronic infections of other RNA viruses (Lightner, 1996a). When LOS are observed by routine histology and chronic TSV infection is suspected, a molecular test (ISH with TSV-specific probes, or reverse-transcription [RT] PCR [see Section 4.3.1.2.7]) is recommended for confirmation of TSV infection.

4.2.3.1. Acute phase of Taura syndrome

Diagnosis of TS in the acute phase of the disease is dependent on the histological demonstration (in haematoxylin and eosin [H&E] stained preparations) of multifocal areas of necrosis in the cuticular epithelium of the general body surface, appendages, gills, hindgut, and foregut (the oesophagus, anterior and posterior chambers of the stomach). Cells of the subcuticular connective tissues and adjacent striated muscle fibres basal to affected cuticular epithelium are occasionally affected. In some severe cases of acute-phase TS, the antennal gland tubule epithelium is also destroyed. Prominent in the multifocal cuticular lesions are conspicuous foci of affected cells that display an increased eosinophilia of the cytoplasm and pyknotic or karyorrhectic nuclei. Cytoplasmic remnants of necrotic cells are often extremely abundant in these TS acute-phase lesions and these are generally presented as spherical bodies (1–20 µm in diameter) that range in staining from eosinophilic to pale basophilic. These structures, along with pyknotic and karyorrhectic nuclei, give acute-phase TS lesions a characteristic 'peppered' or 'buckshot-riddled' appearance, which is considered to be pathognomonic for TS disease when there is no concurrent necrosis of the parenchymal cells of the LO tubules. The absence of necrosis of the LO in acute-phase TSV infections distinguishes TS disease from acute-phase yellowhead disease in which similar patterns of necrosis to those induced by TSV may occur in the cuticular epithelium and gills (Lightner, 1996a).

In TSV-infected tissues, pyknotic or karyorrhectic nuclei give a positive (for DNA) Feulgen reaction, which distinguishes them from the less basophilic to eosinophilic cytoplasmic inclusions that do not contain DNA. The absence of haemocytic infiltration or other signs of a significant host-inflammatory response distinguishes the acute phase of TS from the transitional phase of the disease (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

4.2.3.2. Transition (recovery) phase of Taura syndrome

In the transitional phase of TS, typical acute-phase cuticular lesions decline in abundance and severity and are replaced by conspicuous infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. The masses of haemocytes may become melanised giving rise to the irregular black spots that characterise the transition phase of the disease. In H&E sections, such lesions may show erosion of the cuticle, surface colonisation and invasion of the affected cuticle and exposed surface haemocytes by *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Sections of the LO during the transition phase of TS may appear normal with H&E staining. However, when sections of the LO are assayed for TSV by ISH with a specific cDNA probe (or by ISH with MAb 1A1 for TSV type A, genotype 1), large quantities of TSV are shown accumulating in the more peripheral parenchymal cells of the LO tubules (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3.3. Chronic phase of Taura syndrome

Shrimp in the chronic phase of TS display no gross signs of infection, and histologically the only sign of infection is the presence of numerous prominent LOS, which may remain associated with the main body of the paired LO, or which may detach and become ectopic LOS bodies that lodge in constricted areas of the haemocoel (i.e. the heart, gills, in the subcuticular connective tissues, etc.). Such LOS are spherical accumulations of LO cells and haemocytes and may be distinguished from normal LO tissues by their spherical nature and the lack of the central vessel that is typical of normal LO tubules. When assayed by ISH with a cDNA probe for TSV (or with MAb 1A1 using ISH) some cells in the LOS give positive reactions to the virus, while no other target tissues react (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011).

4.2.4. Wet mounts

Direct microscopy of simple unstained wet mounts from excised pieces of the gills, appendage tips, etc., examined by phase- or reduced-light microscopy may be used to demonstrate (and make a tentative diagnosis of acute-phase TS) focal lesions of acute-phase TS in cuticular epithelial cells. Preparations presenting TS acute-phase lesions will contain numerous spherical structures (see the histopathological methods in Section 4.2.3 above), which are pyknotic and karyorrhectic nuclei and cytoplasmic remnants of necrotic cells.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not currently applicable for diagnostic purposes.

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See Section 4.2.4.

Anexo 19 (cont.)4.3.1.1.2. *Smears*

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. *Fixed sections*

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification4.3.1.2.1. *Cell culture/artificial media*

TSV has not been grown *in vitro*, as no crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Pantoja *et al.*, 2004). Despite a publication that incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle *et al.*, 2003), two other laboratories repeated the study and both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines with known susceptibility to human picornaviruses (Luo *et al.*, 2004; Pantoja *et al.*, 2004).

4.3.1.2.2. *Antibody-based antigen detection methods*

An MAb for detection of TSV may be used to assay samples of haemolymph, tissue homogenates, or Davidson's AFA-fixed tissue sections from shrimp (Erickson *et al.*, 2002; 2005; Poulos *et al.*, 1999). TSV MAb 1A1 may be used to distinguish some variants or 'strains' of TSV from other strains (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

4.3.1.2.3. *Bioassay method*

Confirmation of TSV infection may be accomplished by bioassay of TSV-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the virus (Brock *et al.*, 1997; Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Oral or injection protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped carcasses of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks (White *et al.*, 2002). The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only SPF (TSV-free) tissue and normal shrimp feed is required. When the carcass feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for TSV, TS-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of TS disease and unusual mortalities (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

With the injection bioassay protocol, a variety of sample types may be tested for TSV. Whole shrimp are used if they were collected during a TSV epizootic. Heads only should be used if shrimp display gross transition-phase lesions (multifocal melanised spots on the cuticle) or no clinical signs of infection (chronic phase) as the virus, if present, will be concentrated in the LO (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). For non-lethal testing of broodstock, haemolymph samples may be taken and used to expose the indicator shrimp by IM injection (Lightner, 1996a).

To perform the IM (injection) bioassay for TSV:

Note that tissues and the resulting homogenate should be kept cool during the entire protocol by maintaining on ice.

- i) Prepare a 1:2 or 1:3 ratio of TSV-suspect shrimp heads or whole shrimp with TN buffer (see Chapter 2.2.2, infectious hypodermal and haematopoietic necrosis [IHHN], for the composition of this buffer) or sterile 2% saline prepared with distilled water.
- ii) Homogenise the mixture using a tissue grinder or blender. Do not permit the mixture to heat up by excessive homogenisation or grinding.
- iii) Clarify the homogenate by centrifugation at 3000 **g** for 10 minutes. Decant and save the supernatant fluid. Discard the pellet.
- iv) Centrifuge the supernatant fluid at 27,000 **g** for 20–30 minutes at 4°C. Decant and save the supernatant fluid. Discard the pellet.

- v) Dilute the supernatant fluid from step iv to 1/10 to 1/100 with sterile 2% saline. This solution may now be used as the inoculum to inject indicator shrimp (or filter sterilised as described in step vi).
- vi) Filter the diluted supernatant fluid from step v using a sterile syringe (size depends on the final volume of diluted supernatant) and a sterile 0.45 µm syringe filter. Multiple filters may have to be used as they clog easily. Filtrate should be collected in a sterile test tube or beaker. The solution can now be stored frozen (recommend -20°C for short-term [weeks] storage and -80°C for long-term [months to years] storage) or used immediately to inject indicator shrimp.
- vii) Indicator shrimp should be from TSV-susceptible stocks of SPF *P. vannamei* (such as the 'Kona stock') (Moss *et al.*, 2001), which are commercially available from a number of sources in the Americas, and not from selected lines of known TSV-resistant stocks.
- viii) Inject 0.01 ml per gram of body weight using a 1 ml tuberculin syringe. Indicator shrimp should be injected intramuscularly into the third tail segment. If the test shrimp begin to die within minutes post-injection, the inoculum contains excessive amounts of proteinaceous material and should be further diluted prior to injecting additional indicator shrimp. Sudden death occurring post-injection is referred to as 'protein shock', and is the result of systemic clotting of the shrimp's haemolymph in response to the inoculum (Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).
- ix) Haemolymph samples may be diluted (1/10 or 1/20 in TN buffer), filter sterilised (if necessary), and injected into the indicator shrimp without further preparation.
- x) If TSV was present in the inoculum, the indicator shrimp should begin to die within 24–48 hours post-injection. Lower doses of virus may take longer to establish a lethal infection and shrimp should be monitored for at least 10–15 days post-injection.
- xi) The presence (or absence) of TSV in the indicator shrimp should be confirmed by histological analysis (and/or ISH by gene probe, if available) of Davidson's fixed moribund shrimp. If additional confirmation is needed beyond demonstration of pathognomonic TSV lesions, RT-PCR with sequencing of the resulting amplicon can be carried out.

4.3.1.2.4. Sentinel shrimp bioassay method

As a variation to the bioassay technique, a 'sentinel shrimp' system may be used. For example, TSV-sensitive stocks of small juvenile SPF *P. vannamei* may be held in net-pens in tanks, or in the same water system, with other shrimp of unknown TSV status to bioassay for the presence of infectious agents such as TSV.

4.3.1.2.5. Dot-blot immunoassay method

- i) For the dot-blot immunoassay method, 1 µl of test antigen (purified virus, infected shrimp haemolymph or SPF shrimp haemolymph) is dotted on to the surface of MA-HA-N45 assay plates (Millipore, South San Francisco, California [CA], USA)³.
- ii) After air drying, the wells are blocked for 1 hour at room temperature with 200 µl of a buffer containing phosphate-buffered saline and 0.05% Tween 20 (PBST) mixed with 10% normal goat serum (Life Technologies, Gibco BRL) and 2% Hammersten casein (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, Illinois, USA).
- iii) The wells are washed three times with PBST and then reacted with 100 µl primary antibody (MAb or mouse polyclonal antibodies) for 30 minutes at room temperature.
- iv) Alkaline-phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG, γ chain specific, secondary antibody (Zymed, South San Francisco, CA) diluted 1/1000 in PBST plus 10% normal goat serum is used for detection (30 minutes at room temperature).
- v) After washing three times with PBST, once with PBS and once with distilled water, the reactions are visualised by development for 15 minutes at room temperature with nitroblue tetrazolium and bromochloro-indoyl phosphate (Roche Diagnostics, Corp.) in Tris-NaCl (100 mM each) buffer containing 50 mM MgCl₂, pH 9.5.
- vi) Reactions are stopped with distilled water.

³ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Anexo 19 (cont.)

- vii) The reactions are graded using a scale from 0 to +4, with the highest intensity reaction being equivalent to the reaction generated using the MAb against the reference control consisting of semi-purified TSV. A negative reaction is one in which no coloured spot is visible in the well.

4.3.1.2.6. *Other antibody-based methods*

The TSV MAb 1A1 may be applicable to other antibody-based test formats (i.e. indirect fluorescent antibody [IFAT] or immunohistochemistry [IHC] tests with tissue smears, frozen sections, or deparaffinised fixed tissues). MAb 1A1 is applicable for use in an IHC format using Davidson's AFA-fixed tissue sections (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

It is recommended that unexpected results from MAb-based tests for TSV should be interpreted in the context of clinical signs, case history, and in conjunction with other test results (e.g. RT-PCR test results, or findings from histology or ISH with a TSV-specific DNA probe – see appropriate sections in this chapter).

4.3.1.2.7. *Molecular techniques*

ISH and RT-PCR tests for TSV have been developed, and kits of RT-PCR methods for TSV are commercially available. The dot-blot method for TSV detection is not available.

4.3.1.2.7.1. *DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes*

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for TSV may be produced in the laboratory. The ISH method provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for TSV detection and diagnosis that employ classic histological methods (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner & Redman 1998b; Mari *et al.*, 1998). The ISH assay of routine histological sections of acute- and transition-phase lesions in the cuticular epithelium, other tissues, and of LOS in transition and chronic phase with a specific DIG-labelled cDNA probe to TSV, provides a definitive diagnosis of TSV infection (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Pathognomonic TSV-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. Not reacting to the probe are the prominent karyorrhectic nuclear fragments and pyknotic nuclei that contribute to the pathognomonic 'buckshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (See Chapter 2.2.2 IHHN for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

False-negative ISH results may occur with Davidson's fixed tissues if tissues are left in fixative for more than 24–48 hours. The low pH of Davidson's fixative causes acid hydrolysis of the TSV single-stranded RNA genome, resulting in false-negative probe results. This hydrolysis can be avoided through the use of neutral fixatives, including an 'RNA-friendly' fixative developed for shrimp, or by the proper use (avoiding fixation times over 24 hours) of Davidson's fixative (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998).

4.3.1.2.7.2. *Reverse-transcription (RT)-PCR method*

Tissue samples (haemolymph, pleopods, whole small shrimp, etc.) may be assayed for TSV using RT-PCR. Primers designated as 9992F and 9195R, amplify a 231 base pair (bp) sequence of the TSV genome (Nunan *et al.*, 1998). The fragment amplified is from a conserved sequence located in the intergenic region and ORF 2 of TSV. Primer 9992F is located near the 3' end of intergenic region and 9195R is located on ORF 2 within VP2 (= CP1) (Mari *et al.*, 2002; Nunan *et al.*, 1998). A new pair of TSV primers (7171F and 7511R) has been developed and shown to have an improved sensitivity for TSV detection (Navarro *et al.*, 2009). These replacement primers are 9992F/9195R and they are located within ORF 2.

Primer	Product	Sequence	Temperature	G+C%
9992F	231 bp	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	69°C	55%
9195R		5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	63°C	50%
<u>7171E</u>	<u>341 bp</u>	<u>5'-CGA-CAG-TTG-GAC-ATC-TAG-TG-3'</u>		50%
<u>7511R</u>		<u>5'-GAG-CTT-CAG-ACT-GCA-ACT-TC-3'</u>		50%

The RT-PCR method outlined below for TSV generally follows the method used in Nunan *et al.* (1998).

- i) *Preparation of RNA template:* RNA can be extracted from fresh, frozen and ethanol-preserved tissues. Extraction of RNA should be performed using commercially available RNA tissue extraction kits, such as the High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Penzberg, Germany) and following the manufacturer's procedures for production of quality RNA templates.
 - ii) The RT-PCR assay is carried out in solution, using 10 µl of total RNA extracted from haemolymph, frozen shrimp tissues, ethanol fixed tissue as the template (concentration of RNA = 1–100 ng ml⁻¹).
 - iii) The following controls should be included in every RT-PCR assay for TSV: a) known TSV-negative tissue sample; b) a known TSV-positive sample (tissue or purified virus); and c) a 'no-template' control.
 - iv) The GeneAmp® EZ rTth RNA PCR kit (Applied Bioscience, Forster City, CA) ~~was is~~ used for all amplification reactions described here. Alternative kits can be used and adjusted for use for this assay.
 - v) The optimised RT-PCR conditions (final concentrations in 50 µl total volume) for detection of TSV in shrimp tissue samples are: primers (~~0.46-0.62~~ µM each), dNTPs (300 µM each), rTth DNA polymerase (2.5 U 50 µl⁻¹), manganese acetate (2.5 mM), in 5 × EZ buffer (25 mM Bicine, 57.5 mM potassium acetate, 40% [w/v] glycerol, pH 8.2).
 - vi) If the thermal cycler does not have a heated lid, then light mineral oil (50 µl) is overlaid on the top of the 50 µl reaction mixtures to prevent condensation or evaporation during thermal cycling.
 - vii) The RNA template and all the reagents are combined and reverse transcription is allowed to proceed at 60°C for 30 minutes, followed by 94°C for 2 minutes.
- Note: The reaction conditions described here were optimised using an automatic Thermal Cycler GeneAmp 980 (Applied Biosystems). The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.
- viii) At the completion of reverse transcription, the samples are amplified for 40 cycles under the following conditions: denaturation at 94°C for 45 seconds, and then annealing/extension at 60°C for 45 seconds. A final extension step for 7 minutes at 60°C follows the last cycle and the process is terminated in a 4°C soak file.
 - ix) Following the termination of RT-PCR, the amplified cDNA solutions are drawn off from beneath the mineral oil and placed into clean 0.5 ml microfuge tubes.
 - x) A 10 µl sample of the amplified product can then be added to the well of a 2.0% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 g ml⁻¹), and electrophoresed in 0.5 × TBE (Tris, boric acid, ethylene diamine tetra-acetic acid [EDTA]).
 - xi) A 1 kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) is used as a marker.
 - xiii) Details of the composition of the reagents and buffers used here may be found in Chapter 2.2.2 IHNN.

4.3.1.2.7.3. Real-time PCR (qPCR) method for TSV

Quantitative RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of qRT-PCR is ~100 copies of the target sequence from the TSV genome (Dahr *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

Anexo 19 (cont.)

The real-time RT-PCR method using TaqMan chemistry described below for TSV generally follows the method used in Tang *et al.* (2004).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the ORF1 region of the TSV genomic sequence (GenBank AFAF277675) that encodes for nonstructural proteins. The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software (Applied Biosystems). The upstream (TSV1004F) and downstream (TSV1075R) primer sequences are: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' and 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3', respectively. The TaqMan probe, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), which corresponds to the region from nucleotide 1024 to 1051, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end (Applied Biosystems, catalog no. 450025).
- ii) *Preparation of RNA template:* the extraction and purification of RNA template from haemolymph, or shrimp tissue, is the same as that described in the section for traditional RT-PCR.
- iii) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture or in the heat block of the thermal cycler. A positive control should also be included, and this can be an *in-vitro* transcribed RNA containing the target sequence, purified virions, or RNA extracted from TSV-infected tissue.
- iv) The RT-PCR reaction mixture contains: TaqMan One-step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems, part no. 4309169), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng of RNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- v) Amplification can be is performed with the GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied osystems; ABI PRISM 7000, 7300, 7500, or newer models or equivalent thermocycler and brands can also be used). The cycling consists of reverse transcription at 48°C for 30 minutes and initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. The levels of fluorescence are measured at the end of each annealing/extension cycle.
- vi) At the end of the reaction, real-time fluorescence measurements are analysed ~~will be taken with a built in charge-coupled device (CCD) camera.~~ A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase in PCR product. Samples will be defined as negative if there is no Ct (threshold cycle) value is after 40 cycles ~~the Ct (threshold cycle) value is 40 cycles.~~ Samples with a Ct value lower than 40 cycles are considered to be positive. To confirm the real-time RT-PCR results, an aliquot of RT-PCR product can be subjected to electrophoresis on a 4% ethidium bromide agarose gel and exposed to UV light. A 72-bp DNA fragment can be visualised in the samples that are positive for TSV.
- ~~vi) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of contaminants in the reaction mixture or in the heat block of the thermal cycler. A positive control should also be included, and this can be an *in-vitro* transcribed RNA containing the target sequence, purified virions, or RNA extracted from TSV-infected tissue.~~

4.3.1.2.7.4. *Sequencing*

RT-PCR products may be cloned and sequenced when necessary to confirm infection by TSV or to identify false positives or nonspecific amplification (Mari *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2005; Srisuvan *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

4.3.1.2.8. *Agent purification*

Methods for TSV isolation and purification are available (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999), but these are not recommended for routine diagnosis of TS.

4.3.2. Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrate animals which do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to TSV.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of TSV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended and/or not available for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. TSV surveillance, detection and diagnostic methods in penaeids

Method	Surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	c	c	b	c
Bioassay	d	d	d	d	c	b
Direct LM	d	d	c	d	c	d
Histopathology	d	b	b	c	a	a
Transmission EM	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	c	c	b	b
DNA probes – <i>in situ</i>	d	c	b	b	a	a
RT-PCR, qRT-PCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy;
RT-PCR = reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from Taura syndrome

As indicated in Table 5.1, RT-PCR (Section 4.3.1.2.7.2) is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic TSV-induced lesions in the cuticular epithelium by histology (with or without confirmation by ISH with TSV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

A suspect case is represented by:

- Sudden high mortalities in late PL, juvenile or subadult *P. vannamei* or *P. stylirostris* in regions where TSV is enzootic;

Anexo 19 (cont.)

- The sudden presence of numerous sea birds (gulls, cormorants, herons, terns, etc.) 'fishing' in one or more shrimp culture ponds;
- Samples of cultured *P. vannamei* or *P. stylirostris* from ponds with feeding sea birds that present gross signs indicative of acute- or transition-phase TS, such as a general reddish colouration, lethargy, soft shells, empty guts, and the presence of numerous irregular black spots on the cuticle; or
- Demonstration of foci of necrosis in the cuticular epithelium using low magnification (i.e. a x10 hand lens or by direct microscopic examination of wet mounts) to examine the edges of appendages such as uropods or pleopods, or the gills.

7.2. Definition of confirmed case

Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):

- Histological demonstration of diagnostic acute-phase TSV lesions in (especially) the cuticular epithelia of the foregut (oesophagus, anterior, or posterior chambers of the stomach) and/or in the gills, appendages, or general cuticle. Such TSV lesions are pathognomonic for TSV only when they occur without accompanying severe acute necrosis (with nuclear pyknosis and karyorrhexis) of the parenchymal cells of the lymphoid organ tubules (which may occur in acute-phase yellowhead virus infections).
- ISH-positive (with a TSV-specific cDNA probe) signal to TSV-type lesions in histological sections (i.e. cuticular acute-phase TS lesions) or to distinctive lymphoid organ spheroids (LOS) in the lymphoid organs of shrimp with chronic phase TS lesions.
- RT-PCR positive results for TSV.
- Sequencing of PCR product encompassing CP2 may be accomplished, as needed, to determine the TSV genotype (Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

8. References

- AGUIRRE GUZMAN G. & ASCENCIO VALLE F. (2000). INFECTIOUS DISEASE IN SHRIMP SPECIES WITH AQUACULTURE POTENTIAL. *RECENT RES. DEV. MICROBIOL.*, **4**, 333–348.
- AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISENO-GARCIA B. (2003). INFECTION OF CULTURED HUMAN AND MONKEY CELL LINES WITH EXTRACT OF PENAEID SHRIMP INFECTED WITH TAURA SYNDROME VIRUS. *EMERG. INFECT. DIS.*, **9**, 265–266.
- BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). TAURA SYNDROME OF MARINE PENAEID SHRIMP: CHARACTERIZATION OF THE VIRAL AGENT. *J. GEN. VIROL.*, **78**, 313–319.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). ASIA DIAGNOSTIC GUIDE TO AQUATIC ANIMAL DISEASES. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER 402, SUPPLEMENT 2. ROME, FAO, 240 PP.
- BROCK J.A. (1997). SPECIAL TOPIC REVIEW: TAURA SYNDROME, A DISEASE IMPORTANT TO SHRIMP FARMS IN THE AMERICAS. *WORLD J. MICROBIOL & TECHNOL.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). AN OVERVIEW ON TAURA SYNDROME, AN IMPORTANT DISEASE OF FARMED *PENAEUS VANNAMEI*. IN: SWIMMING THROUGH TROUBLED WATER, PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SHRIMP FARMING, AQUACULTURE '95, BROWDY C.L. & HOPKINS J.S., EDS. SAN DIEGO, CALIFORNIA, 1–4 FEBRUARY 1995. WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 84–94.
- BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). RECENT DEVELOPMENTS AND AN OVERVIEW OF TAURA SYNDROME OF FARMED SHRIMP IN THE AMERICAS. IN: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE III, FLEGEL T.W. & MACRAE I.H., EDS. FISH HEALTH SECTION, ASIAN FISHERIES SOCIETY, MANILA, THE PHILIPPINES, 275–283.
- CHANG Y.S., PENG S.E., YU H.T., LIU F.C., WANG C.H., LO, C.F. & KOU G.H. (2004). GENETIC AND PHENOTYPIC VARIATIONS OF ISOLATES OF SHRIMP TAURA SYNDROME VIRUS FOUND IN *PENAEUS MONODON* AND *METAPENAEUS ENSIS* IN TAIWAN. *J. GEN. VIROL.*, **85**, 2963–2968.

- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). INFECTION ROUTE AND ERADICATION OF *PENAEUS MONODON* BACULOVIRUS (MBV) IN LARVAL GIANT TIGER PRAWNS, *PENAEUS MONODON*. *IN: DISEASES OF CULTURED PENAEID SHRIMP IN ASIA AND THE UNITED STATES*, FULKS W. & MAIN K.L., EDs. OCEANIC INSTITUTE, HONOLULU, HAWAII, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). MANAGEMENT OF PONDS STOCKED WITH BLUE SHRIMP *LITOPENAEUS STYLIROSTRIS*. *IN: PROCEEDINGS OF THE FIRST LATIN AMERICAN SHRIMP FARMING CONGRESS*, D.E. JORY, ED. PANAMA CITY, PANAMA, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2002). QUANTITATIVE ASSAY FOR MEASURING THE TAURA SYNDROME VIRUS AND YELLOW HEAD VIRUS LOAD IN SHRIMP BY REAL-TIME RT-PCR USING SYBR GREEN CHEMISTRY. *J. VIROL. METHODS*, **104**, 69–82.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). MANAGING TAURA SYNDROME IN BELIZE: A CASE STUDY. *AQUACULTURE MAGAZINE*, MAY/JUNE, 30–42.
- ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). TAURA SYNDROME VIRUS FROM BELIZE REPRESENTS A UNIQUE VARIANT. *DIS. AQUAT. ORG.*, **64**, 91–98.
- ERICKSON H.S., ZARAIN-HERZBERG M. & LIGHTNER D.V. (2002). DETECTION OF TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) STRAIN DIFFERENCES USING SELECTED DIAGNOSTIC METHODS: DIAGNOSTIC IMPLICATIONS IN PENAEID SHRIMP. *DIS. AQUAT. ORG.*, **52**, 1–10.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). VIRUS TAXONOMY. CLASSIFICATION AND NOMENCLATURE OF VIRUSES. EIGHTH REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. ELSEVIER ACADEMIC PRESS, 1259 PP.
- FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). HEALTH MANAGEMENT FOR VIRAL DISEASES IN SHRIMP FARMS. *IN: THE NEW WAVE, PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE. AQUACULTURE 2001*, BROWDY C.L. & JORY D.E., EDs. THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 168–198.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.
- GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). DEMONSTRATION OF INFECTIOUS TAURA SYNDROME VIRUS IN THE FECES OF SEA GULLS COLLECTED DURING AN EPIZOOTIC IN TEXAS. *J. AQUAT. ANIM. HEALTH*, **9**, 156–159.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A NEW RNA-FRIENDLY FIXATIVE FOR THE PRESERVATION OF PENAEID SHRIMP SAMPLES FOR VIROLOGICAL DETECTION USING CDNA GENOMIC PROBES. *J. VIROL. METHODS*, **66**, 227–236.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T., MARI J. & BONAMI J.R. (1999A). THE GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) IN THE AMERICAS: DETERMINATION BY HISTOLOGY AND *IN SITU* HYBRIDIZATION USING TSV-SPECIFIC CDNA PROBES. *AQUACULTURE*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.L. (1999B). TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) LESION DEVELOPMENT AND THE DISEASE CYCLE IN THE PACIFIC WHITE SHRIMP *PENAEUS VANNAMEI*. *DIS. AQUAT. ORG.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). TAURA SYNDROME IN *PENAEUS VANNAMEI*: DEMONSTRATION OF A VIRAL ETIOLOGY. *DIS. AQUAT. ORG.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). EXPERIMENTS ON TOXICOSIS AS THE CAUSE OF TAURA SYNDROME IN *PENAEUS VANNAMEI* (CRUSTACEA: DECAPODA) IN ECUADOR. *IN: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE III*, FLEGEL T.W. & MACRAE I.H., EDs. FISH HEALTH SECTION, ASIAN FISHERIES SOCIETY, MANILA, THE PHILIPPINES, 365–379.
- JIMENEZ R. (1992). SINDROME DE TAURA (RESUMEN). *IN: ACUACULTURA DEL ECUADOR. CAMARA NACIONAL DE ACUACULTURA*, GUAYAQUIL, ECUADOR, 1–16.
- JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). PERIODIC OCCURRENCE OF EPITHELIAL VIRAL NECROSIS OUTBREAKS IN *PENAEUS VANNAMEI* IN ECUADOR. *DIS. AQUAT. ORG.*, **42**, 91–99.
- KING A., ADAMS M., CARSTENS E. & LEFKOWITZ E.J., EDs. (~~IN PRESS 2012~~) VIRUS TAXONOMY, ~~IXTH~~ NINTH REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, ELSEVIER, ACADEMIC PRESS, LONDON, UK, 840–845.

Anexo 19 (cont.)

LARAMORE C.R. (1997). SHRIMP CULTURE IN HONDURAS FOLLOWING THE TAURA SYNDROME VIRUS. *IN: PROCEEDING OF THE 4TH SYMPOSIUM ON AQUACULTURE IN CENTRAL AMERICA: FOCUSING ON SHRIMP AND TILAPIA, TEGUCIGALPA, HONDURAS, WORLD AQUACULTURE SOC., BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 1–7.*

LIGHTNER D.V. (1995). TAURA SYNDROME: AN ECONOMICALLY IMPORTANT VIRAL DISEASE IMPACTING THE SHRIMP FARMING INDUSTRIES OF THE AMERICAS INCLUDING THE UNITED STATES. *PROCEEDINGS OF THE 99TH ANNUAL MEETING US ANIMAL HEALTH ASSOCIATION, RENO, NEVADA, USA, 36–52.*

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996A). A HANDBOOK OF SHRIMP PATHOLOGY AND DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR DISEASES OF CULTURED PENAEID SHRIMP. *WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 304 PP.*

LIGHTNER D.V. (1996B). EPIZOOTIOLOGY, DISTRIBUTION AND THE IMPACT ON INTERNATIONAL TRADE OF TWO PENAEID SHRIMP VIRUSES IN THE AMERICAS. *REV. SCI. TECH. OFFICE INT. EPIZ., 15, 579–601.*

LIGHTNER D.V. (1999). THE PENAEID SHRIMP VIRUSES TSV, IHNV, WSSV, AND YHV: CURRENT STATUS IN THE AMERICAS, AVAILABLE DIAGNOSTIC METHODS AND MANAGEMENT STRATEGIES. *J. APPL. AQUACULTURE, 9, 27–52.*

LIGHTNER D.V. (2005). BIOSECURITY IN SHRIMP FARMING: PATHOGEN EXCLUSION THROUGH USE OF SPF STOCK AND ROUTINE SURVEILLANCE. *J. WORLD AQUACULTURE SOC., 36, 229–248.*

LIGHTNER D.V. (2011). STATUS OF SHRIMP DISEASES AND ADVANCES IN SHRIMP HEALTH MANAGEMENT. *IN: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE VII, BONDAD-REANTASO M.G., JONES J.B., CORSIN F. & AOKI T., EDS. FISH HEALTH SECTION, ASIAN FISHERIES SOCIETY, SELANGOR, MALAYSIA, 121–134.*

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998A). STRATEGIES FOR THE CONTROL OF VIRAL DISEASES OF SHRIMP IN THE AMERICAS. *FISH PATHOL., 33, 165–180.*

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998B). SHRIMP DISEASES AND CURRENT DIAGNOSTIC METHODS. *AQUACULTURE, 164, 201–220.*

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). SPECIFIC PATHOGEN-FREE SHRIMP STOCKS IN SHRIMP FARMING FACILITIES AS A NOVEL METHOD FOR DISEASE CONTROL IN CRUSTACEANS. *IN: SHELLFISH SAFETY AND QUALITY, SHUMWAY S. & RODRICK G., EDS. WOODHEAD PUBLISHERS, LONDON, UK. PP. 384-424.*

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). TAURA SYNDROME IN *PENAEUS VANNAMEI* (CRUSTACEA: DECAPODA): GROSS SIGNS, HISTOPATHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE. *DIS. AQUAT. ORG., 21, 53–59.*

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). HISTORIC EMERGENCE, IMPACT AND CURRENT STATUS OF SHRIMP PATHOGENS IN THE AMERICAS. *J. INVERTEBR. PATHOL., 110, 174–183.*

LOTZ J.M. (1997). EFFECT OF HOST SIZE ON VIRULENCE OF TAURA VIRUS TO THE MARINE SHRIMP *PENAEUS VANNAMEI* (CRUSTACEA: PENAEIDAE). *DIS. AQUAT. ORG., 30, 45–51.*

LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). EFFECT OF CHRONIC TAURA SYNDROME VIRUS INFECTION ON SALINITY TOLERANCE OF *LITOPENAEUS VANNAMEI*. *DIS. AQUAT. ORG., 65, 75–78.*

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP SUGGESTED PROCEDURES AND GUIDELINES FOR ASSURING THE SPECIFIC PATHOGEN STATUS OF SHRIMP BROODSTOCK AND SEED. *IN: SWIMMING THROUGH TROUBLED WATER, PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SHRIMP FARMING, AQUACULTURE '95, BROWDY C.L. & HOPKINS J.S., EDS. SAN DIEGO, CALIFORNIA, 1–4 FEBRUARY 1995. WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 66–75.*

LU Y. & SUN P. (2005). VIRAL RESISTANCE IN SHRIMP THAT EXPRESS AN ANTISENSE TAURA SYNDROME VIRUS COAT PROTEIN GENE. *ANTIVIRAL RES., 67, 141–146.*

LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). TAURA SYNDROME VIRUS AND MAMMALIAN CELL LINES. *EMERG. INFECT. DIS., 10, 2260–2261.*

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). TAURA SYNDROME OF PENAEID SHRIMP: CLONING OF VIRAL GENOME FRAGMENTS AND DEVELOPMENT OF SPECIFIC GENE PROBES. *DIS. AQUAT. ORG., 33, 11–17.*

MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). SHRIMP TAURA SYNDROME VIRUS: GENOMIC CHARACTERIZATION AND SIMILARITY WITH MEMBERS OF THE GENUS CRICKET PARALYSIS-LIKE VIRUSES. *J. GEN. VIROL., 83, 917–928.*

MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). *IN: THE NEW WAVE, PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SUSTAINABLE SHRIMP CULTURE. AQUACULTURE 2001, BROWDY C.L. & JORY D.E., EDS. THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 1–19.*

NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). AN IMPROVED TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) RT-PCR USING NEWLY DESIGNED PRIMERS. *AQUACULTURE*, **293**, 290–292.

NIELSEN L., SANG-OU M., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) IN THAILAND AND ITS RELATIONSHIP TO TSV IN CHINA AND THE AMERICAS. *DIS AQUAT. ORG.*, **63**, 101–106.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) USED FOR THE DETECTION OF TAURA SYNDROME VIRUS (TSV) IN EXPERIMENTALLY INFECTED SHRIMP. *DIS. AQUAT. ORG.*, **34**, 87–91.

NUNAN L.M., TANG-NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). REAL-TIME RT-PCR DETERMINATION OF VIRAL COPY NUMBER IN *PENAEUS VANNAMEI* EXPERIMENTALLY INFECTED WITH TAURA SYNDROME VIRUS (TSV). *AQUACULTURE*, **229**, 1–10.

OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCILWAIN S. & LOTZ J. (1997). SUSCEPTIBILITY TO TSV OF SOME PENAEID SHRIMP NATIVE TO THE GULF OF MEXICO AND SOUTHEAST ATLANTIC OCEAN. *J. INVERTEBR. PATHOL.*, **69**, 165–176.

PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). NONSUSCEPTIBILITY OF PRIMATE CELLS TO TAURA SYNDROME VIRUS. *EMERG. INFECT. DIS.*, **10**, 2106–2112.

POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). PRODUCTION AND USE OF ANTIBODIES FOR THE DETECTION OF THE TAURA SYNDROME VIRUS IN PENAEID SHRIMP. *DIS. AQUAT. ORG.*, **37**, 99–106.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). HIGH HEALTH SHRIMP SYSTEMS: SEED SUPPLY – THEORY AND PRACTICE. *IN: SWIMMING THROUGH TROUBLED WATER, PROCEEDINGS OF THE SPECIAL SESSION ON SHRIMP FARMING, AQUACULTURE '95, BROWDY C.L. & HOPKINS J.S., EDS. SAN DIEGO, CALIFORNIA, 1–4 FEBRUARY 1995. WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, LOUISIANA, USA, 40–52.*

ROBALINO J., BROWDY C.L., PRIOR S., METZ A., PARNELL P., GROSS P. & WARR G. (2004). INDUCTION OF ANTIVIRAL IMMUNITY BY DOUBLE-STRANDED RNA IN A MARINE INVERTEBRATE. *J. VIROL.* **78**, 10442–10448.

ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). NUCLEOTIDE SEQUENCE OF 3'-END OF THE GENOME OF TAURA SYNDROME VIRUS OF SHRIMP SUGGESTS THAT IT IS RELATED TO INSECT PICORNAVIRUSES. *ARCH. VIROL.*, **146**, 941–952.

ROSENBERRY B. (2004). *WORLD SHRIMP FARMING 2004. NUMBER 17, PUBLISHED BY SHRIMP NEWS INTERNATIONAL, SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA, 276 PP.*

SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). EXPERIMENTAL INFECTION OF *PENAEUS MONODON* WITH TAURA SYNDROME VIRUS (TSV). *DIS. AQUAT. ORG.*, **67**, 1–8.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.-R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A CRITICAL REVIEW OF SUSCEPTIBILITY OF CRUSTACEANS TO TAURA SYNDROME, YELLOWHEAD DISEASE AND WHITE SPOT DISEASE AND IMPLICATION OF INCLUSION OF THESE DISEASES IN EUROPEAN LEGISLATION. *AQUACULTURE*, **291**, 1–17.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TAURA SYNDROME VIRUS ISOLATES COLLECTED BETWEEN 1993 AND 2004 AND VIRULENCE COMPARISON BETWEEN TWO ISOLATES REPRESENTING DIFFERENT GENETIC VARIANTS. *VIRUS RESEARCH*, **112**, 69–76.

TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). QUANTITATION OF TAURA SYNDROME VIRUS BY REAL-TIME RT-PCR WITH A TAQMAN ASSAY. *J. VIROL. METHODS*, **115**, 109–114.

TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). TAURA SYNDROME IN PACIFIC WHITE SHRIMP *PENAEUS VANNAMEI* CULTURED IN TAIWAN. *DIS. AQUAT. ORG.*, **38**, 159–161.

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). SEABIRDS AS POTENTIAL VECTORS OF PENAEID SHRIMP VIRUSES AND THE DEVELOPMENT OF A SURROGATE LABORATORY MODEL UTILIZING DOMESTIC CHICKENS. *AQUACULTURE*, **241**, 31–46.

WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390** (2), 324–329.

Anexo 19 (cont.)

WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A LABORATORY CHALLENGE METHOD FOR ESTIMATING TAURA SYNDROME VIRUS RESISTANCE IN SELECTED LINES OF PACIFIC WHITE SHRIMP *PENAEUS VANNAMEI*. *J. WORLD AQUACULT. SOC.*, **33**, 341–348.

WYBAN J.A. (1992). SELECTIVE BREEDING OF SPECIFIC PATHOGEN-FREE (SPF) SHRIMP FOR HIGH HEALTH AND INCREASED GROWTH. *IN: DISEASES OF CULTURED PENAEID SHRIMP IN ASIA AND THE UNITED STATES*, FULKS W. & MAIN K.L., EDS. THE OCEANIC INSTITUTE, HONOLULU, HAWAII, USA, 257–268.

WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV CHALLENGES ADVANCE SELECTIVE BREEDING IN PACIFIC WHITE SHRIMP. *GLOBAL AQUACULTURE ADVOCATE*, **7**, 40–41.

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). OUTBREAKS OF TAURA SYNDROME IN PACIFIC WHITE SHRIMP *PENAEUS VANNAMEI* CULTURED IN TAIWAN. *FISH PATHOL.*, **32**, 21–24.

ZARIN-HERZBERG M. & ASCENCIO F. (2001). TAURA SYNDROME IN MEXICO: FOLLOW-UP STUDY IN SHRIMP FARMS OF SINALOA. *AQUACULTURE*, **193**, 1–9.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for Taura syndrome
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).
Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Taura syndrome

CHAPTER 2.2.8.

INFECTION WITH YELLOW HEAD VIRUS

1. Scope

For the purpose of this chapter, yellow head disease (YHD) is considered to be infection with yellow head virus **genotype 1 (YHV1)**.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

Yellow head virus genotype 1 (**YHV1**) is one of six known genotypes in the yellow head complex of viruses and is the only known agent of YHD. Gill-associated virus (GAV) is designated as genotype 2. GAV and four other known genotypes in the complex (genotypes 3–6) occur commonly in healthy *Penaeus monodon* in East Africa, Asia and Australia and are rarely or never associated with disease (Walker *et al.*, 2001, Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). YHV and other genotypes in the yellow head complex are classified by the International Committee on Taxonomy of Viruses as a single species (Gill-associated virus) in the genus *Okavirus*, family *Roniviridae*, order *Nidovirales* (Cowley *et al.*, 2012). There is evidence of genetic recombination between genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

YHV forms enveloped, rod-shaped particles (40–5060 nm × 150–180200 nm) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Envelopes are studded with prominent peplomers projecting approximately 11 nm from the surface. Nucleocapsids appear as rods (diameter 20–30 nm) and possess a helical symmetry with a periodicity of 5–7 nm. Virions comprise three structural proteins (nucleoprotein p20–24 and envelope glycoproteins gp64 and gp116) and a ~26 kb positive-sense single-stranded RNA genome.

2.1.2. Survival outside the host

YHV remains viable in aerated seawater for up to 72 hours (Flegel *et al.*, 1995b).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

YHV can be inactivated by heating at 60°C for 15 minutes (Flegel *et al.*, 1995b). Little information is available on other inactivation methods but the virus appears to be susceptible to treatment with chlorine at 30 parts per million (0.03 mg ml⁻¹) (Flegel *et al.*, 1997).

2.1.4. Life cycle

High multiplicity YHV infections in cell culture have not been reported. Infection at a multiplicity of infection of 0.001 in primary cultures of lymphoid organ cells has indicated that maximum viral titres are obtained 4 days post-infection (Assavalapsakul *et al.*, 2003). Clinical signs of YHD occur in *P. monodon* within 7–10 days of exposure. YHV replicates in the cytoplasm of infected cells in which long filamentous pre-nucleocapsids are abundant and virions bud into cytoplasmic vesicles in densely packed paracrystalline arrays for egress at the cytoplasmic membrane (Chantanachookin *et al.*, 1993).

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

YHD outbreaks have been reported only in the black tiger prawn (*P. monodon*) and the white Pacific shrimp (*P. vannamei*) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Senapin *et al.*, 2010). The Pacific blue prawn (*P. stylirostris*), the daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), and the Jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*) also fulfil the criteria required for listing a species susceptible to infection with YHV1 according to Article 1.5 of *Aquatic Animal Health Code*. Natural infections have also been detected in the kuruma prawn (*P. japonicus*), white banana prawn (*P. merguensis*), Pacific blue prawn (*P. stylirostris*), white prawn (*P. setiferus*), red endeavour prawn (*Metapenaeus ensis*), mysid shrimp (*Palaemon styliferus*) and krill (*Acetes* sp.). Other species of penaeid and palaemonid shrimp and prawns and krill that have been reported to be susceptible to experimental infection include: brown tiger prawn (*P. esculentus*), brown prawn (*P. aztecus*); pink prawn, hopper and brown-spotted prawn (*P. duorarum*), greentail prawn (*Metapenaeus bennettiae*), Sunda river prawn (*Macrobrachium sintangense*), barred estuarine shrimp (*Palaemon serrifer*), the paste prawn (*Acetes* sp.) and the daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) (Ma *et al.*, 2009). There are variations in the susceptibility of different species to disease. Laboratory trials have shown that YHV can cause high mortality in *P. monodon*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *M. sintangense*, *P. styliferus* and *P. serrifer* (Lightner *et al.*, 1998; Longyant *et al.*, 2005; 2006; Ma *et al.*, 2009). A survey of 16 crab species collected from the vicinity of shrimp farms in Thailand detected no evidence of either natural infection or experimental susceptibility (Longyant *et al.*, 2006). A critical review of susceptibility of crustaceans to yellow head disease and implications of inclusion in European legislation has been conducted (Stentiford *et al.*, 2009). GAV has been detected in *P. monodon* and *P. esculentus* (Walker *et al.*, 2001). To date, infections by other genotypes in the YHV complex have been detected only in *P. monodon* (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). *Metapenaeus brevicornis* and *P. aztecus* also fulfil some of the criteria required for listing as susceptible but evidence was lacking to either confirm the identity of the pathogen under study as YHV1, to demonstrate a natural route of infection, or to definitively confirm an 'infected' status.

2.2.2. Susceptible stages of the host

Penaeus monodon are susceptible to YHV infection beyond PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Experimental infections with GAV indicate that larger (~20 g) *P. japonicus* are less susceptible to disease than smaller (~6–13 g) shrimp of the same species (Spann *et al.*, 2000).

2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

Viruses in yellow head complex genotypes 2–6 are only known to occur commonly (prevalence up to 100%) in healthy *P. monodon*, which appears to be the natural host (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a; 2009). In contrast, YHV (genotype 1) infections are usually detected only when disease is evident and whilst they do not occur commonly in healthy *P. monodon*, infections have been detected in healthy wild populations of *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). During YHD outbreaks in aquaculture ponds, the YHV infection prevalence can be assumed to be high. Natural YHV infections have been detected in *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, and *P. styliferus* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b), but there is little information available on the natural prevalence. Viruses in yellow head complex genotypes 2–6 are only known to occur commonly (prevalence up to 100%) in healthy *P. monodon*, which appears to be the natural host (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a; 2009).

2.2.4. Target organs and infected tissue

YHV targets tissues of ectodermal and mesodermal origin including lymphoid organ, haemocytes, haematopoietic tissue, gill lamellae and spongy connective tissue of the subcutis, gut, antennal gland, gonads, nerve tracts and ganglia (Chantanachookin *et al.*, 1993; Lightner, 1996).

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

GAV persists as a chronic infection for at least 50 days in *P. esculentus* that survive experimental challenge (Spann *et al.*, 2003). The high prevalence of subclinical or chronic infection often found in healthy *P. monodon* infected with GAV (genotype 2) and genotypes 3–6 from postlarval stages onward suggests that these infections can persist for life (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). There is also evidence that YHV (genotype 1) can persist in survivors of experimental infection (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

2.2.6. Vectors

There are no known vectors of YHV.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

Infection susceptibility and long-term persistence indicate the potential for a wide range of wild penaeid and palaemonid shrimp to act as carriers.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

YHV infection can be transmitted horizontally by injection, ingestion of infected tissue, immersion in sea water containing tissue extracts filtered to be free of bacteria, or by co-habitation of naive shrimp with infected shrimp (Flegel *et al.*, 1995b; Lightner, 1996). Infection of shrimp has also been established by injection of extracts of paste prawns (*Acetes* sp.) collected from infected ponds (Flegel *et al.*, 1995a). For GAV, vertical transmission of infection to progeny has been shown to occur from both male and female parents, possibly by surface contamination or infection of tissue surrounding fertilised eggs (Cowley *et al.*, 2002). The dynamics of how YHV infection spreads within aquaculture ponds have not been studied. However, the rapid accumulation of mortalities during disease outbreaks suggests that horizontal transmission occurs very effectively.

2.3.2. Prevalence

The infection prevalence of yellow head complex viruses in healthy *P. monodon* (as detected by nested polymerase chain reaction [PCR]) can be high (50–100%) in farmed and wild populations in Australia, Asia and East Africa as well as in *L. vannamei* farmed in Mexico (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Cowley *et al.*, 2004; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). The prevalence of individual genotypes varies according to the geographical origin of the shrimp. In contrast, except in situations of disease outbreaks in aquaculture ponds, the prevalence of YHV (genotype 1) is more commonly low (<1%) in healthy wild or farmed *P. monodon* (pers. comm.). The use of detection methods less sensitive than nested PCR (e.g. histology, immunoblot, dot-blot, *in-situ* hybridisation), is likely in most cases to result in the real infection prevalence amongst populations of shrimp being underestimated.

2.3.3. Geographical distribution

YHD has been reported in Chinese Taipei, Indonesia, Malaysia, the Philippines, Sri Lanka, Thailand and Vietnam (Walker *et al.*, 2001). GAV and other genotypes in the yellow head complex have been detected in healthy *P. monodon* from Australia, Chinese Taipei, India, Indonesia, Malaysia, Mozambique, the Philippines, Thailand and Vietnam (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). YHV has also been detected in *P. vannamei* cultured in Mexico (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortality and morbidity

With *P. monodon* being farmed in ponds, disease caused by YHV (genotype 1) can cause up to 100% mortality within 3–5 days of the first appearance of clinical signs (Chantanachookin *et al.*, 1993). GAV (genotype 2) has also been associated with morbidity and up to 80% mortality in ponds of *P. monodon* farmed in Australia. Whilst mortalities can easily be induced by experimental exposure of *P. monodon* to YHV or GAV, bioassays have identified YHV to be far more virulent (~10⁶-fold by lethal dose [LD₅₀] 50% end-point analysis) (Oanh *et al.*, 2011). Genotypes 3, 4, 5 and 6 have not yet been associated with disease (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

2.3.5. Environmental factors

Elevated virus infection levels accompanied by disease can be precipitated by physiological stress induced by sudden changes in pH or dissolved oxygen levels, or other environmental factors (Flegel *et al.*, 1997). The much higher virulence of YHV compared to GAV and other genotypes appears to ensure that the infection threshold required to cause disease is reached far more easily.

Anexo 20 (cont.)**2.4. Control and prevention****2.4.1. Vaccination**

No effective vaccination methods have been developed.

2.4.2. Chemotherapy

No effective commercial anti-viral product is yet available.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. Resistance breeding

Not reported.

2.4.5. Restocking with resistant species

All marine shrimp species farmed commercially appear to be susceptible to YHV.

2.4.6. Blocking agents

Injection of shrimp with double-stranded (ds) RNA homologous to ORF1a/1b gene regions of YHV or GAV (thus targeting the genome length viral RNA) can inhibit viral replication and prevent mortalities following experimental challenge. The antiviral action of the dsRNA appears to involve the RNA interference (RNAi) pathway ([Tirasophon *et al.*, 2007](#)).

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Not reported.

2.4.8. General husbandry practices

Specific pathogen free (SPF) or PCR-negative seedstock and biosecure water and culture systems may be used to reduce the risk of disease.

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

For diagnosis during a disease outbreak, moribund shrimp collected from pond edges are the preferred source of material for examination. Apparently normal shrimp should also be collected from the same ponds. For surveillance for evidence of infection in populations of apparently healthy shrimp, life stages from mysis onwards (mysis, postlarvae [PL], juveniles or adults) can provide tissue sources useful for testing.

3.2. Preservation of samples for submission

Moribund shrimp (or tissue from moribund shrimp) should be snap-frozen on-site in a dry ice/alcohol slurry and preserved frozen in dry ice, liquid nitrogen or in a -80°C freezer. Freezing at or above -20°C is unsuitable.

Tissue samples for PCR screening should be preserved in a minimum 3-fold excess of 90% analytical/reagent-grade (absolute) ethanol. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. Commercial RNA preservatives (e.g. RNAlater) may also be used.

Tissue samples for histology should be preserved in Davidson's fixative. Formalin (10%) in seawater may be a useful alternative.

Tissues for electron microscopy should be sampled from live shrimp.

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

For detecting YHV infection in large populations of shrimp, pooling of tissue samples is acceptable for screening or surveillance of batches of mysis to PL from a hatchery tank or batches of juvenile shrimp in a pond. For PCR analysis, pool size should be determined by tissue mass that can be processed without compromise in a single test. The total numbers of shrimp sampled, either as a single pool or as multiple smaller pools, are selected based on the infection prevalence expected and the required confidence limits of detection. Typically in populations comprising more than a 100,000 shrimp, if the prevalence of infection exceeds 5%, a total of 60 individuals tested in appropriate pool sizes will be required to detect YHV at a 95% confidence limit. However, definitive detection may be compromised if the YHV loads in the infected shrimp are very low or if tests less sensitive than two-step PCR or real-time PCR are employed. See also Chapter 2.2.0.

3.4. Best organs or tissues

In moribund shrimp suspected to be infected with YHV, lymphoid organ and gill are the most suitable sample tissues. For screening or surveillance of juvenile or adult shrimp that appear grossly normal, lymphoid organ is preferred. Gills or haemolymph can be used for non-sacrificial sampling.

3.5. Samples/tissues that are not suitable

Not determined.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Shrimp from late PL stages onwards can be infected experimentally with YHV. In cultured shrimp, infection can result in mass mortality occurring, usually in early to late juvenile stages. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax caused by the underlying yellow hepatopancreas, which may be exceptionally soft when compared with the brown hepatopancreas of a healthy shrimp. In many cases, the total loss of a pond crop occurs within a few days of the first appearance of shrimp showing gross signs of YHD (Chantanachookin *et al.*, 1993). Cessation of feeding, congregation of moribund shrimp at pond edges and a generally bleached appearance are always seen in YHD outbreaks. However, these disease features are not particularly distinctive for YHD, and in the absence of other more pathognomonic gross signs are not reliable even for preliminary diagnosis of YHD. Gross signs of GAV disease include swimming near the surface and at the pond edges, cessation of feeding, a reddening of body and appendages, and pink to yellow discoloration of the gills (Spann *et al.*, 1997). However, these signs can occur commonly in response to various stressors and thus are not considered pathognomonic for GAV disease. Shrimp chronically infected with YHV or GAV display normal appearance and behaviour.

4.1.2. Behavioural changes

Exceptionally high feeding activity followed by an abrupt cessation of feeding may occur within 2–4 days of the appearance of gross clinical signs of disease and mortality. Moribund shrimp may congregate at pond edges near the surface (Chantanachookin *et al.*, 1993).

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

See Section 4.1.

4.2.2. Clinical chemistry

None described.

Anexo 20 (cont.)**4.2.3. Microscopic pathology**

Fix the cephalothorax tissues of moribund shrimp suspected to be affected by YHD in Davidson's fixative, prepare tissue sections and stain with Meyer's haematoxylin and eosin (H&E) using standard histological procedures (Lightner, 1996). Examine tissues of ectodermal and mesodermal origin by light microscopy for the presence of moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions approximately 2 µm in diameter or smaller (Chantanachookin *et al.*, 1993). Tissues of the lymphoid organ, stomach subcuticulum and gills are particularly informative.

4.2.4. Wet mounts

Fix whole shrimp or gill filaments overnight in Davidson's fixative (Lightner, 1996). After fixation, wash some gill filaments thoroughly with tap water to remove the fixative and stain with H&E (Lightner, 1996). After staining and dehydration, when the tissue is in xylene, place a gill filament on a microscope slide in a drop of xylene and, using a fine pair of needles (a stereo microscope is helpful), break off several secondary filaments. Replace the main filament in xylene where it can be stored indefinitely in a sealed vial as a permanent reference. Being careful not to let the xylene dry, tease apart the secondary filaments and remove any large fragments or particles that would thicken the mount unnecessarily. Add a drop of mounting fluid and a cover-slip and use light pressure to flatten the mount as much as possible. This procedure may also be used with thin layers of subcuticular tissue. Examine under a light microscope using a ×40 objective lens. For samples from YHD-affected shrimp, moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions (approximately 2 µm in diameter or smaller) will be observed (Flegel *et al.*, 1997). Evidence of such pathology should be used to support results from haemolymph smears (see below) in making a presumptive diagnosis of YHD. As for the fixed tissues and gill filaments preserved in xylene, these whole-mount slides can be preserved as a permanent record.

If rapid results are required, the fixation step can be shortened to only 2 hours by replacing the acetic acid component of Davidson's fixative with a 50% dilution of concentrated HCl. For good fixation, this fixative should not be stored for more than a few days before use. After fixation, wash thoroughly to remove the fixative and check that the pH has returned to near neutral before staining. Do not fix for longer periods or above 25°C as this may result in excessive tissue damage that will make it difficult or impossible to identify specific pathology.

4.2.5. Smears

For moribund shrimp affected by YHD, haemolymph smears are not useful because haemocytes are usually depleted in the advanced stages of disease. In cases of suspected YHD where moribund shrimp have been sampled from a pond, haemolymph should be collected from grossly normal shrimp from the same pond. Draw the haemolymph into a syringe containing two volumes of either 25% formalin or Davidson's fixative modified by replacing the acetic acid component with either water or formalin. Mix thoroughly, ignore clots in the syringe, place a drop on a microscope slide, smear and then air-dry before staining with H&E or other standard blood smear stains. Dehydrate, add mounting fluid and a cover-slip. Examine under a light microscope using a ×40 objective lens. For YHD-affected shrimp, some smears will show moderate to high numbers of haemocytes with karyorrhectic or pyknotic nuclei. It is important that there is no evidence of concomitant bacterial infection in slides of haemocytes displaying such nuclei, as bacterial infections may cause similar changes in haemocytes. When making a presumptive diagnosis of YHD, the results from haemolymph smears should be considered in conjunction with the results from rapid-stained whole mounts (see above) or stained tissue sections.

4.2.5. Electron microscopy/cytopathology

For transmission electron microscopy (TEM), the most suitable tissues of shrimp suspected to be infected with YHV infection are lymphoid organ and gills. For screening or surveillance of grossly normal shrimp, the most suitable tissue is lymphoid organ.

Stun live shrimp by immersion in iced water until just immobilised or kill by injection of fixative. Quickly dissect and remove small portions of target tissue (no larger than a few mm in diameter) and fix in at least 10 volumes of 6% glutaraldehyde held at 4°C and buffered with sodium cacodylate (Na[CH₃]₂AsO₂·3H₂O) solution (8.6 g Na cacodylate, 10 g NaCl, distilled water to make 100 ml, adjusted to pH 7 with 0.2 N HCl) or phosphate solution (0.6 g NaH₂PO₄·H₂O, 1.5 g Na₂HPO₄, 1 g NaCl, 0.5 g sucrose, distilled water to make 100 ml, adjusted to pH 7 with 0.2 N HCl). Fix for at least 24 h prior to processing. For long-term storage in fixative at 4°C, reduce glutaraldehyde to 0.5–1.0%. Processing involves post-fixation with 1% osmium tetroxide, dehydration, embedding, sectioning and staining with uranyl acetate and lead citrate according to standard TEM reagents and methods (Lightner, 1996).

In the cytoplasm of cells infected with YHV, both nucleocapsid precursors and complete enveloped virions are observed. Nucleocapsid precursors appear as long filaments approximately 15 nm in diameter that can vary markedly in length (80–450 nm) and that can sometimes be packed densely in paracrystalline arrays. Virions appear as rod-shaped, enveloped particles 40–5060 nm × 150–180200 nm with rounded ends and prominent projections (8–11 nm) extending from the surface. In the cell cytoplasm, virions are commonly seen to be localised or packed densely within intracellular vesicles. Virions may also be seen budding at the cytoplasmic membrane and in interstitial spaces. GAV virions and nucleocapsids are indistinguishable from YHV by TEM.

Lymphoid organ spheroids are commonly observed in healthy *P. monodon* chronically infected with YHV or GAV and lymphoid organ necrosis often accompanies disease (Spann *et al.*, 1997). However, spheroid formation and structural degeneration of lymphoid organ tissue also result from infection by other shrimp viruses (Lightner, 1996).

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

Although primary shrimp cell culture methods are available, they are not recommended to isolate and identify YHV as a routine diagnostic method because of the high risk of them becoming contaminated with adventitious agents. No continuous cell lines suitable for YHV culture are yet available.

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Reagents and protocols for detecting YHV proteins with antibodies have been published (Loh *et al.* 1998; Lu *et al.* 1994). Virions purified from haemolymph of experimentally infected shrimp have been used to produce antiserum in New Zealand white rabbits. From this antiserum, immunoglobulin (IgG) was purified using protein-G-linked columns and cross-reacting normal shrimp antigens were removed by adsorption to acetone-dried, ground shrimp muscle tissue and haemolymph. To detect YHV proteins by Western blotting, dilute 0.1 ml haemolymph collected from a live shrimp in an equal volume of citrate buffer and either run immediately or store at –80°C until used. Clarify 200 µl of the sample at 8000 **g** for 5 minutes and then pellet virions from the clarified supernatant by ultracentrifugation at 140,000 **g** for 5 minutes. Resuspend pellets in 100 µl 2 × loading buffer (2.5 ml 0.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 4 ml 10% sodium dodecyl sulphate [SDS], 2 ml glycerol, 1 µl β-mercaptoethanol, 0.5 ml deionised distilled water) and heat at 95°C for 5 minutes. Load 10 µl sample onto a 5% SDS-polyacrylamide gel and electrophorese at 200 V. Blot the gel onto a 0.1 mm pore size nitrocellulose membrane in blotting buffer (3.03 g Tris-base, 14.4 g glycine, 200 ml methanol per litre) at 100 V for 1 hour. Rinse the membrane with phosphate buffered saline (PBS pH 7.4), block in 5% skim milk (in PBS) for 1 hour, and rinse with PBS for 5 minutes. Soak the membrane in a 1/1000 dilution of the anti-YHV antibody (IgG) for 1 hour, rinse three times with PBS for 5 minutes, and then soak for 1 hour in a 1/2500 dilution of goat anti-rabbit IgG-horseradish-peroxidase (HRP) conjugate. Rinse membrane three times with PBS for 5 minutes and then soak in HRP substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, until blue-purple colour develops. Stop the reaction by soaking the membrane in distilled water. All incubations should be carried out at 25°C ± 2°C. Use a purified viral preparation as a positive control to identify positions of the YHV 116 kDa, 64 kDa and 20 kDa structural proteins. The Western blot YHV detection sensitivity is approximately 0.4 ng YHV protein (≈ 10⁶ virions).

Anexo 20 (cont.)

4.3.1.2.3. Molecular techniques

4.3.1.2.3.1 Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Three RT-PCR protocols are described. The first is a 1-step RT-PCR adapted from Wongteerasupaya *et al.* (1997) that can be used to detect YHV in shrimp affected by YHD. This protocol will detect YHV (highly virulent genotype first detected in Thailand in association with YHD) but not GAV or any of the other three genotypes currently recognised. The second is a more sensitive multiplex nested RT-PCR protocol adapted from Cowley *et al.* (2004). It can be used to differentiate YHV from GAV in diseased shrimp or for screening healthy carriers. This test will not detect all six known genotypes and genotype 3 may generate a PCR product indistinguishable in size from that generated with GAV (genotype 2). The test is available in a suitably modified form from a commercial source (YHV/GAV IQ2000, GeneReach Biotechnology Corp., Chinese Taipei). However, this kit is not currently listed as having completed the OIE's formal process for validating and certifying commercial tests (a list of certified test kits and manufacturers is available on the OIE website: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>). The third is a sensitive multiplex RT-nested PCR protocol described by Wijegoonawardane *et al.* (2008b). This test can be used for screening healthy shrimp for any of the six genotypes of the yellow head complex of viruses (including YHV and GAV), but will not discriminate between genotypes. Assignment of genotype can be achieved by nucleotide sequence analysis of the RT-PCR product.

Sample preparation: For juvenile or adult shrimp, lymphoid organ, gill tissue or haemolymph may be used to prepare total RNA. Fresh tissue is preferred. Lymphoid organ and gill tissue preserved in 95% analytical-grade ethanol or RNAlater (various manufacturers), or stored frozen at -70°C are also suitable for total RNA preparation. Disrupt 10–20 mg lymphoid organ or gill tissue or 50 μl haemolymph in 500 μl Trizol™ reagent and extract total RNA according to the product manual. Resuspend RNA in 25 μl water treated with DEPC (diethyl-pyrocabonate)-, heat at 55°C for 10 minutes, cool on ice and use immediately or store at -70°C until required. Ideally, a 1/200 dilution (i.e. 2.5 μl RNA in 500 μl DEPC-treated water) should be prepared, and UV absorbances at A260nm and A280 nm (a UV spectrophotometer is required) should be determined to quantify and check the quality of the RNA (ratio approximately 2:1). RNA yield will vary depending on the type and freshness of tissues, quality of the preservative used, and the length of time tissue has been preserved. However, RNA yields from fresh tissues would be expected to vary from 0.2 to 2.0 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ and about half these amounts from alcohol-preserved tissues.

From a nursery tank or hatchery tank containing 100,000 PL or more, sample approximately 1000 PL from each of 5 different points. Pool the samples in a basin, gently swirl the water and then select samples of live PL that collect at the centre of the basin. Choose numbers of PL to be pooled and tested according to the assumed or infection prevalence. Homogenise tissue samples in an appropriate volume of Trizol™ reagent and extract RNA according to the product manual. Based on the standard Trizol™ extraction procedure, tissue masses equivalent to 25–30 \times PL5, 15 \times PL10 and 5 \times PL15 are accommodated and produce high quality total RNA free of protein contamination.

For each set of RNA samples to be tested, DEPC-treated water and extracts known to contain YHV RNA and/or GAV RNA (as appropriate to the test) should be included as negative and positive controls, respectively.

Protocol 1: RT-PCR for specific detection of YHV in diseased shrimp

To synthesise cDNA, mix 2 μl RNA in 20 μl PCR buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl) containing 2.5 U of M-MLV (Moloney murine leukaemia virus) reverse transcriptase, 1.0 U ribonuclease inhibitor, 0.75 μM antisense primer 144R, 1 mM each of dATP, dTTP, dCTP, and dGTP, and 5 mM MgCl_2 , and incubate at 42°C for 15 minutes. Incubate the mixture at 100°C for 5 minutes to inactivate the reverse transcriptase and allow the mixture to cool to 5°C . Add PCR mixture (10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl) containing 2.5 U *Taq* DNA polymerase, 2 mM MgCl_2 and 0.75 μM of sense primer 10F to give a final volume of 100 μl . Unless the instrument is fitted with a heated lid, overlay the tubes with 100 μl of mineral oil and conduct PCR amplification for 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, and finishing at 72°C for 10 minutes. Alongside a suitable DNA ladder, apply a 20 μl aliquot of the PCR to a 2% agarose/TAE (Tris-acetate-EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid]) gel containing 0.5 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$ ethidium bromide and following electrophoresis, detect the 135 bp DNA band expected for YHV using a UV transilluminator.

⁴ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

The sensitivity of the PCR is approximately 0.01 pg of purified YHV RNA ($\approx 10^3$ genomes).

PCR primer sequences:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'

144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

Protocol 2: Nested RT-PCR for differential detection of YHV and GAV in healthy or diseased shrimp

For cDNA synthesis, 2 μ l RNA (ideally 1.0 μ g total RNA, if quantified), 0.7 μ l 50 pmol μ l⁻¹ primer GY5 and DEPC-treated water are added to 6 μ l total, the mixture, incubated at 70°C for 10 minutes and chilled on ice. Add 2 μ l Superscript II buffer \times 5 (250 mM Tris/HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 μ l 100 mM DTT and 0.5 μ l 10 mM dNTP stock mixture (i.e. 10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP) and mix gently. Preheat to 42°C for 2 minutes, add 0.5 μ l 200 U μ l⁻¹ reverse transcriptase and incubate at 42°C for 1 hour. Heat the reaction at 70°C for 10 minutes, chill on ice and spin briefly in a microcentrifuge to collect the contents of the tube. For the first PCR step, prepare a 50 μ l reaction mixture containing 1 \times *Taq* buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl₂, 35 pmol of each primer GY1 and GY4, 200 μ M each of dATP, dTTP, dCTP and dGTP and 2.5 U *Taq* polymerase in a 0.5 ml thin-walled tube. Overlay the reaction mixture with 50 μ l liquid paraffin, heat at 85°C for 2–3 minutes and then add 1 μ l cDNA. Conduct PCR amplification using 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 66°C for 30 seconds, and 72°C for 45 seconds, followed by final extension at 72°C for 7 minutes. For the second PCR step, prepare a 50 μ l reaction mixture containing 2 μ l of the first step PCR product, 1 \times *Taq* buffer (above), 1.5 mM MgCl₂, 35 pmol of each primer GY2, Y3 and G6, 200 μ M each of dATP, dTTP, dCTP and dGTP and 2.5 U *Taq* polymerase in a 0.5 ml thin-walled tube and overlay with liquid paraffin. Conduct PCR using amplification conditions as described above. Apply a 10 μ l aliquot of the PCR to 2% agarose/TAE gels containing 0.5 μ g ml⁻¹ ethidium bromide alongside a suitable DNA ladder and detect using a UV transilluminator.

If the viral load is sufficiently high, a 794 bp DNA will be amplified from either GAV or YHV in the first PCR step. In the second PCR step, a 277 bp product indicates detection of YHV and a 406 bp product indicates detection of GAV. The presence of both 406 bp and 277 bp products indicates a dual infection with GAV and YHV. The detection sensitivity of the second-step PCR is \sim 1000-fold greater than the first-step PCR and GAV or YHV RNA can be detected to a limit of 10 fg lymphoid organ total RNA.

The sequences of RT-PCR primers generic for GAV and YHV (GY) or specific for GAV (G) or YHV (Y) are as follows:

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: Due to reported problems with primer specificity for some emerging strains, all PCR products generated using protocol 2 should be sequenced to confirm the virus genotype.

Protocol 3: Nested RT-PCR for detection of all currently known genotypes in the yellow head complex (including YHV and GAV)

For cDNA synthesis, mix 2 μ l RNA (ideally 1.0 μ g total RNA, if quantified), 50 ng random hexamer primers and 1.0 μ l 10 mM dNTP and make up to a total volume of 14 μ l in sterile DEPC-treated water, incubate at 65°C for 5 minutes and chill on ice. Add 4.0 μ l Superscript III buffer \times 5, 1.0 μ l 100 mM DTT, 1.0 μ l 40 U μ l⁻¹ RNaseOUT™ (Invitrogen) and 1.0 μ l 200 U μ l⁻¹ reverse transcriptase and mix gently. Incubate at 25°C for 5 minutes and then at 42°C for 55 minutes, stop the reaction by heating at 70°C for 15 minutes, chill on ice and spin briefly in a microcentrifuge to collect the contents of the tube. For the first PCR step, add 1 μ l cDNA to a total 25 μ l reaction mixture containing 1 \times *Taq* buffer (10 mM Tris/HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 μ l 25 mM MgCl₂, 0.35 μ l primer mix containing 25 pmol μ l⁻¹ of each primer pool (see below) YC-F1ab and YC-R1ab, 0.5 μ l 10 mM dNTP mix and 0.25 μ l 5 U μ l⁻¹ *Taq* DNA polymerase. Conduct PCR amplification using denaturation at 95°C for 1 minute followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 40 seconds, followed by a final extension at 72°C for 7 minutes.

Anexo 20 (cont.)

For the second PCR step, use 1 µl of the first PCR product in the reaction mixture as prepared above but substituting primer pools YC-F2ab and YC-R2ab. Conduct PCR amplification using denaturation at 95°C for 1 minute followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, followed by a final extension at 72°C for 7 minutes. Apply an 8 µl aliquot of the PCR to 2% agarose/TAE gels containing 0.5 µg ml⁻¹ ethidium bromide alongside a suitable DNA ladder and detect using a UV transilluminator.

If the viral load is sufficiently high, a 358 bp DNA is amplified in the first PCR step. The second (nested) PCR step amplifies a 146 bp product. The detection of these products indicates detection of one of the six genotypes in the yellow head complex. Further assignment of genotype (if required) is possible by nucleotide sequence analysis of either PCR product followed by comparison with sequences of the known genotypes by multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. The detection sensitivity limits of the first PCR step and nested PCR step are 2,500 and 2.5 RNA templates, respectively.

PCR primer sequences (each primer comprises a pool of equal quantities of two related oligonucleotide sequences):

YC-F1ab pool:	5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3' 5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'
YC-R1ab pool:	5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3' 5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'
YC-F2ab pool:	5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3' 5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'
YC-R2ab pool:	5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3' 5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'
Mixed base codes:	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. *In-situ* hybridisation

The protocol of Tang *et al.* (2002) described is suitable for detecting YHV or GAV (Tang & Lightner, 1999). To preserve viral RNA accessibility, fix tissues sampled from live shrimp in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RF-fixative) (Hasson *et al.*, 1997). To achieve good tissue preservation whilst also preserving RNA accessibility, normal Davidson's fixative can be used as long as the fixation time is limited to 24 hours (maximum of 48 hours). Process the fixed tissue using standard histological methods and prepare 4 µm thick sections on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA). Prior to hybridisation, incubate sections at 65°C for 45 minutes, remove paraffin with Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA), and rehydrate through a reducing ethanol concentration series to water. Digest sections with proteinase K (100 µg ml⁻¹, in 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) for 15 minutes at 37°C, followed by post-fixation in 0.4% formaldehyde for 5 minutes. Rinse in 2 × SSC (standard saline citrate), then pre-hybridise with 500 µl pre-hybridisation solution (4 × SSC, 50% formamide, 1 × Denhardt's, 0.25 mg ml⁻¹ yeast RNA, 0.5 mg ml⁻¹ sheared salmon sperm DNA, 5% dextran sulphate) at 42°C for 30 minutes. For hybridisation, overlay the sections with 250 µl hybridisation solution containing a digoxigenin-labelled DNA probe (20–40 ng ml⁻¹) at 42°C overnight. The next day, wash the sections as follows: 2 × SSC once for 30 minutes at room temperature; 1 × SSC twice for 5 minutes at 37°C; 0.5 × SSC twice for 5 minutes at 37°C. Incubate the sections with sheep anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate (Roche) at 37°C for 30 minutes. Wash with 0.1 M Tris/HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl twice for 10 minutes at room temperature and rinse with 0.1 M Tris/HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl. Incubate with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate in the dark for 1–2 h for colour development. Counterstain with Bismarck Brown Y (0.5%), dehydrate through a series of ethanol and Hemo-De, add Permount (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA) and cover with a cover-slip. YHV-infected cells give a blue to purple-black colour against the brown counter stain. Include positive controls of YHV-infected tissue and negative controls of uninfected shrimp tissue. The digoxigenin-labelled DNA probe can be prepared by PCR labelling using the following primers:

YHV1051F:	5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'
YHV1051R:	5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4.3.1.2.3 Agent purification

A YHV purification method based on density gradient ultracentrifugation is described (Wongteersupaya *et al.* 1995). Approximately 250 healthy juvenile *P. monodon* shrimp (approximately 10 g) should ideally be used as a source of virus for purification. After acclimatising for several days in 1500 litre tanks (approximately 80 shrimp/tank) at a salinity of 3.5 parts per thousand (mg ml^{-1}), inoculate each shrimp intramuscularly with 100 μl of a 1/100 gill extract suspension prepared from YHV-infected shrimp. At 2 days post-infection, harvest moribund shrimp showing typical signs of YHD. Use a syringe to draw haemolymph from the sinuses at the base of the walking legs and mix carefully on ice with the same volume of lobster haemolymph medium (LHM) (486 mM NaCl, 15 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.5 mM Na_2HPO_4 , 8.1 mM MgSO_4 , 36 mM NaHCO_3 , 0.05% dextrose in Minimal Eagle's Medium, adjusted pH 7.6 with 1 N NaOH). Centrifuge the mixture at 480 **g** for 30 minutes at 4°C to remove cellular debris. Ultracentrifuge the supernatant at 100,000 **g** for 1 hour at 4°C. Discard the supernatant and gently resuspend the pellet overnight at 4°C in 1 ml LHM. Layer this suspension over a continuous gradient of 20–40% Urografin and ultracentrifuge at 100,000 **g** for 1 hour at 4°C. After centrifugation, collect the viral band by using a Pasteur pipette and dilute with NTE buffer (0.02 M EDTA, 0.2 M NaCl, 0.2 M Tris/HCl [pH 7.4]) to a final volume of 12 ml. Ultracentrifuge the suspension at 100,000 **g** for 1 hour at 4°C and resuspend the pellet (purified virus) in 100 μl TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA [pH 7.4]) and store in 20 μl aliquots at -80°C until required.

4.3.1.2.4 Bioassay

The bioassay procedure is based on that described by Spann *et al.* (1997), but similar procedures have been described by several other authors (Lu *et al.*, 1994). The bioassay should be conducted in susceptible shrimp (see Section 2.2 above) ideally that have been certified as SPF and have been obtained from a biosecure breeding facility. Alternatively, susceptible wild or farmed shrimp to be used for bioassay should be screened by nested RT-PCR using RNA extracted from haemolymph to confirm the absence of pre-existing chronic infections with YHV, GAV or related viruses. Throughout the procedure, shrimp should be maintained under optimal conditions for survival of the species in laboratory tank systems.

Collect moribund shrimp from a YHD-affected ponds or shrimp suspected of being carriers of infection and maintain at 4°C or on ice. Remove and discard the tail and appendages. If necessary, the whole shrimp or the retained cephalothorax may be snap-frozen and stored at -80°C or in liquid nitrogen until required. Thaw stored samples rapidly in a 37°C water bath within two snap-seal plastic bags and then maintain at 4°C or on ice during all procedures. Remove the carapace and calciferous mouth-parts. Suspend the remaining tissues in six volumes of TN buffer (0.02 M Tris/HCl, pH 7.4, 0.4 M NaCl) and homogenise in a tissue grinder to form a smooth suspension. Clarify the homogenate at 1300 **g** for 20 minutes at 4°C. Remove the supernatant fluid below the lipid layer and pass through a 0.45 μm filter. Maintain the filtrate at 4°C for immediate use or snap-freeze and store in aliquots at -80°C or in liquid nitrogen. Thaw the filtrate rapidly at 37°C and maintain on ice prior to use.

Inject at least 12 juvenile (1–5 g) shrimp of a known susceptible species (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*), with 5 μl of filtrate per gram body weight into the second abdominal segment using a 26-gauge needle. Inject two equivalent groups of at least 12 shrimp with TN buffer and a filtered tissue extract prepared from uninfected shrimp. One additional group of at least 12 shrimp should be injected last with a known and calibrated positive control inoculum from shrimp infected with YHV or GAV (as required). Maintain each group of shrimp in a separate covered tank with a separate water supply for the duration of the bioassay. Ensure no inadvertent transfer of water between tanks by good laboratory practice. Observe the shrimp and record mortalities for at least 21 days or until the test and positive control groups reach 100% mortality. Collect at least one moribund shrimp from each of the four groups for examination by histology, TEM, *in situ* nucleic acid hybridisation, and PCR or Western-blot analysis to confirm the presence of YHV or GAV (as required) in the sample (refer to the Sections above for test procedures).

NOTE: shrimp to be tested that are suspected of being carriers of low level chronic infections may produce an inoculum containing a very low dose of virus. In bioassay, such an inoculum may not necessarily cause mortalities, gross signs of disease or histology characteristic of a lethal infection. In this event, molecular tests (PCR or ISH) or TEM must be applied to the bioassay shrimp.

Anexo 20 (cont.)

4.3.2. Serological methods

Not applicable.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of YHD are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	c	c	c	d
Bioassay	d	d	d	d	c	b
Direct LM	d	d	d	d	a	d
Histopathology	d	d	c	c	a	d
Transmission EM	d	d	c	c	d	b
Antibody-based assays	d	d	c	c	a	b
DNA probes – <i>in situ</i>	d	d	c	c	b	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	a	a	a	a	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with yellow head virus

Nested RT-PCR (Section 4.3.1.2.3.1; Protocol 3) followed by confirmatory sequencing of the amplified PCR product is the prescribed method for declaring freedom. Two-step PCR negative results are required. The very rare case when a two-step PCR positive result cannot be confirmed by sequencing is also considered to be a negative result. **As genetic recombination between genotypes can occur, the detection of any genotype is considered to be evidence of the presence of YHD.**

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

A suspect case of **YHD YHV genotype 1** is defined as a disease outbreak in marine shrimp with rapidly accumulating mortalities (up to 100%) in the early to late juvenile stages, which may be preceded by cessation of feeding and congregation of shrimp at pond edges. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax caused by the underlying yellow hepatopancreas. Histological examination of fixed lymphoid organ tissues should reveal moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions (approximately 2 µm in diameter or smaller).

7.2. Definition of confirmed case

YHD may be confirmed by the detection of high levels of disseminated infection in tissues of ectodermal and mesodermal origin by *in situ* hybridisation in conjunction with the detection of amplified products of the prescribed size using discriminatory RT-PCR assays and sequencing, as described in Section 4.3 of this chapter. As low-level chronic infections with yellow head complex viruses are common in some regions, detection of the presence of virus is not, in itself, evidence of aetiology.

8. References

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 PENAID SHRIMP SAMPLES FOR VIROLOGICAL ASSAY USING cDNA PROBES. *J. VIROL. METHODS*, **66**, 227–236.

Anexo 20 (cont.)

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). SUSCEPTIBILITY OF THE POSTLARVAL STAGES OF BLACK TIGER SHRIMP (*PENAEUS MONODON*) TO YELLOW-HEAD BACULOVIRUS (YBV). *IN: DISEASES IN ASIAN AQUACULTURE II*, SHARIFF M., SUBASINGHE R.P. & ARTHUR J.R., EDS. ASIAN FISHERIES SOCIETY, MANILA, THE PHILIPPINES, P. 6.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996). HANDBOOK OF PATHOLOGY AND DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR DISEASES OF PENAEID SHRIMP. WORLD AQUACULTURE SOCIETY, BATON ROUGE, USA.

LIGHTNER D.V., HASSON, K.W., WHITE, B.L. & REDMAN R.M. (1998). EXPERIMENTAL INFECTION OF WESTERN HEMISPHERE PENAEID SHRIMP WITH ASIAN WHITE SPOT SYNDROME VIRUS AND ASIAN YELLOW HEAD VIRUS. *J. AQUAT. ANIM. HEALTH*, **10**, 271–281.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. JR, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). RECENT DEVELOPMENTS IN IMMUNOLOGICALLY-BASED AND CELL CULTURE PROTOCOLS FOR THE SPECIFIC DETECTION OF SHRIMP VIRAL PATHOGENS. *IN: ADVANCES IN SHRIMP BIOTECHNOLOGY*, FLEGEL T.W., ED. NATIONAL CENTER FOR GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, BANGKOK, THAILAND, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAVISUTHANGKURA 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., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). DIFFERENCES IN THE SUSCEPTIBILITY OF PALAEMONID SHRIMP SPECIES TO YELLOW HEAD VIRUS (YHV) INFECTION. *DIS. AQUAT. ORG.*, **64**, 5–12.

LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). INFECTION OF THE YELLOW HEAD BACULO-LIKE VIRUS (YBV) IN TWO SPECIES OF PENAEID SHRIMP *PENAEUS STYLIROSTRIS* (STIMPSON) AND *PENAEUS VANNAMEI* (BOONE). *J. FISH DIS.*, **17**, 649–656.

MA H., OVERSTREET R.M. & JOVONOVICH J.A. (2009). DAGGERBLADE GRASS SHRIMP (*PALAEMONETES PUGIO*): A RESERVOIR HOST FOR YELLOW-HEAD VIRUS (YHV). *J. INVERT. PATHOL.* **101**, 112–118.

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. INTERNAT.N* **17**, 101–112.

SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIRATANA S. & FLEGEL T.W. (2010). IMPACT OF YELLOW HEAD VIRUS OUTBREAKS IN THE WHITELEG SHRIMP, *PENAEUS VANNAMEI* (BOONE), IN THAILAND. *J. FISH DIS.*, **33** (5), 421–430.

SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A YELLOW-HEAD-LIKE VIRUS FROM *PENAEUS MONODON* CULTURED IN AUSTRALIA. *DIS. AQUAT. ORG.*, **31**, 169–179.

SPANN K.M. DONALDSON R.A. COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). DIFFERENCES IN SUSCEPTIBILITY OF SOME PENAEID PRAWN SPECIES TO GILL-ASSOCIATED VIRUS (GAV) INFECTION. *DIS. AQUAT. ORG.*, **42**, 221–225.

SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003). DETECTION OF GILL-ASSOCIATED VIRUS (GAV) BY *IN SITU* HYBRIDISATION DURING ACUTE AND CHRONIC INFECTIONS IN *PENAEUS MONODON* AND *PENAEUS ESCULENTUS* SHRIMP. *DIS. AQUAT. ORG.*, **56**, 1–10.

STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A CRITICAL REVIEW OF SUSCEPTIBILITY OF CRUSTACEANS TO TAURA SYNDROME, YELLOWHEAD DISEASE AND WHITE SPOT DISEASE AND IMPLICATIONS OF INCLUSION OF THESE DISEASES IN EUROPEAN LEGISLATION. *AQUACULTURE*, **291**, 1–17.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A YELLOW HEAD VIRUS GENE PROBE: NUCLEOTIDE SEQUENCE AND APPLICATION FOR *IN SITU* HYBRIDIZATION. *DIS. AQUAT. ORG.*, **35**, 165–173.

TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *IN SITU* DETECTION OF AUSTRALIAN GILL-ASSOCIATED VIRUS WITH A YELLOW HEAD VIRUS GENE PROBE. *AQUACULTURE*, **205**, 1–5.

TIRASOPHON W., YODMUANG S., CHINNIRUNYONG 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., PHETCHAMPAI, N., COWLEY, J.A., GUDKOV, N. & WALKER P.J. (2009). HOMOLOGOUS GENETIC RECOMBINATION IN THE YELLOW HEAD COMPLEX OF NIDOVIRUSES INFECTING *PENAEUS MONODON SHRIMP*. *VIROLOGY* DOI: 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: There is an OIE Reference Laboratory for Yellow head disease
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).
Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Yellow head disease

CHAPTER 2.4.7.

INFECTION WITH *PERKINSUS OLSENI***1. Scope**

For the purpose of this chapter, infection with *Perkinsus olseni* is considered to be infection with *P. olseni*. *Perkinsus atlanticus* is considered to be a synonym.

2. Disease information

...

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Perkinsus olseni has an extremely wide host range. Known hosts include the clams *Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tridacna maxima*, *T. crocea*, *Protothaca jedgeensis* and *Pitar rostrata* (Goggin & Lester, 1995; Villalba *et al.*, 2004; Cremonte *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2006; Sheppard & Phillips, 2008); oysters ~~*Crassostrea gigas*~~, ~~*Crassostrea*~~ *C. ariakensis*, and *C. sikamea* (Villalba *et al.*, 2004); pearl oysters *Pinctada margaritifera*, *P. martensii*, and *P. fucata* (Goggin & Lester, 1995; Sanil *et al.*, 2010); abalone *Haliotis rubra*, *H. laevigata*, *H. scalaris*, and *H. cyclobates* (Goggin & Lester, 1995). Other bivalve and gastropod species might be susceptible to this parasite, especially in the known geographical range. Members of the families Arcidae, Malleidae, Isognomonidae, Chamidae and Veneridae are particularly susceptible, and their selective sampling may reveal the presence of *P. olseni* when only light infections occur in other families in the same habitat.

...

8. References

...

GOGGIN C.L. & LESTER R.J.G. (1995). *PERKINSUS*, A PROTISTAN PARASITE OF ABALONE IN AUSTRALIA: A REVIEW. *AUST. J. MAR. FRESHWATER RES.*, **46**, 639–646.

...

SANIL N.K., VIJAYAN K.K., KRIPA V. & MOHAMED K.S. (2010). OCCURRENCE OF THE PROTOZOAN PARASITE, *PERKINSUS OLSENI* IN THE WILD AND FARMED PEARL OYSTER, *PINCTADA FUCATA* (GOULD) FROM THE SOUTHEAST COAST OF INDIA. *AQUACULTURE*, **299**, 8–14.

...

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for Infection with *Perkinsus olseni* (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with *Perkinsus olseni*

CAPÍTULO 1.1.

NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES Y APORTACIÓN DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Artículo 1.1.1.

A efectos del *Código acuático* y de conformidad con los Artículos 5, 9 y 10 de los Estatutos orgánicos de la OIE, todos los Países miembros reconocen a la Sede el derecho de comunicarse directamente con la *Autoridad competente* de su o sus territorios.

Cualquier *notificación* o información enviada por la OIE a una *Autoridad competente* se considerará enviada al Estado al que ésta pertenece y cualquier *notificación* o información enviada a la OIE por una *Autoridad competente* se considerará enviada por el Estado al que ésta pertenece.

Artículo 1.1.2.

- 1) Los Países miembros pondrán a disposición de los demás Países miembros, por mediación de la OIE, la información necesaria para impedir la propagación de *enfermedades* de los *animales acuáticos* importantes y de sus *agentes patógenos* y para facilitar su control a nivel mundial.
- 2) Con dicho fin, los Países miembros aplicarán lo dispuesto en los Artículos 1.1.3. y 1.1.4.
- 3) Para que la información transmitida a la OIE sea clara y concisa, los Países miembros deberán atenerse con la mayor exactitud posible al modelo oficial de declaración de *enfermedades* de la OIE.
- 4) La detección del *agente patógeno* de una *enfermedad de la lista de la OIE* en un *animal acuático* deberá notificarse incluso en ausencia de signos clínicos. Considerando que los conocimientos científicos sobre la relación entre *agentes patógenos* y la *enfermedad* clínica están en constante evolución y que la presencia de un agente infeccioso no implica necesariamente la presencia clínica de una *enfermedad*, los Países miembros velarán por que sus informes se atengan al espíritu y objeto del punto 1 arriba citado.
- 5) Además de las *notificaciones* enviadas en aplicación de los Artículos 1.1.3. y 1.1.4., los Países miembros deberán proporcionar información sobre las medidas adoptadas para prevenir la propagación de las *enfermedades*; esa información podrá incluir medidas de *cuarentena* y restricciones al movimiento de *animales acuáticos*, *productos de animales acuáticos*, *productos biológicos* y objetos diversos que, por su índole, pudieran ser responsables de la transmisión de *enfermedades*. En el caso de *enfermedades* transmitidas por vectores, se deberán indicar también las medidas adoptadas para controlarlos.

Artículo 1.1.3.

Las *Autoridades competentes*, bajo la responsabilidad del Delegado, deberán enviar a la Sede:

- 1) de acuerdo con las debidas disposiciones de los capítulos específicos de *enfermedades*, una *notificación* a través del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHIS) o por fax o correo electrónico en el plazo de 24 horas, de:
 - a) la aparición por primera vez de una *enfermedad de la lista de la OIE* en un país, una *zona* o un *compartimento*;
 - b) la reaparición de una *enfermedad de la lista de la OIE* en un país, una *zona* o un *compartimento* después de haberse declarado en el informe final que se había extinguido el *brote*;

Anexo 22 (cont.)

- c) la aparición por primera vez de cualquier cepa nueva de un *agente patógeno* de una *enfermedad de la lista de la OIE* en un país, una *zona* o un *compartimento*;
 - d) el cambio repentino e inesperado de la distribución o el aumento de la incidencia, la virulencia, la morbilidad o la mortalidad causadas por el *agente patógeno* de una *enfermedad de la lista de la OIE* que prevalece en un país, una *zona* o un *compartimento*;
 - e) la aparición por primera vez de una *enfermedad de la lista de la OIE* en una nueva especie hospedadora. Para decidir si un hallazgo justifica una *notificación* inmediata (en el plazo de 24 horas), los Países miembros deberán guiarse por el afán de respetar las obligaciones definidas en los Capítulos 5.1. y 5.2. (en particular en el Artículo 5.1.1.) para notificar los cambios que pueden tener repercusiones en el *comercio internacional*;
- 2) informes semanales consecutivos a la *notificación* enviada en aplicación del punto 1 anterior para suministrar información adicional sobre la evolución del episodio que justificó la *notificación*; estos informes deberán seguir enviándose hasta que se haya erradicado la *enfermedad* o la situación se haya tornado suficientemente estable, momento a partir del cual el País miembro cumplirá con sus obligaciones con la OIE enviando los informes semestrales mencionados en el punto 3; en cualquier caso, deberá enviarse un informe final sobre cada episodio notificado;
 - 3) informes semestrales sobre la ausencia o la presencia y la evolución de *enfermedades de la lista de la OIE*, así como sobre hallazgos relativos a otras *enfermedades* que revisten interés epidemiológico para los demás Países miembros;
 - 4) informes anuales relativos a cualquier información importante para los demás Países miembros.

Artículo 1.1.4.

Las *Autoridades competentes*, bajo la responsabilidad del Delegado, deberán enviar a la *Sede*:

- 1) una *notificación* a través de WAHIS o por fax o correo electrónico cuando se haya detectado una *enfermedad emergente* en un país, una *zona* o un *compartimento*;
- 2) informes periódicos tras la *notificación* de una *enfermedad emergente descrita en el punto 1*; los informes deberán seguir enviándose ~~hasta que~~:
 - a) el tiempo necesario para tener la certeza razonable de que:
 - ~~ib)~~ se haya erradicado la *enfermedad*, o
 - ie) la situación se haya tornado ~~suficientemente~~ estable, o
 - b) hasta que se disponga de información científica suficiente para determinar si la *enfermedad* reúne los criterios de inscripción en la lista.

Artículo 1.1.5.

- 1) La *Autoridad competente* de un país en el que está ubicada una *zona infectada* o un *compartimento infectado* avisará a la *Sede* tan pronto como dicha *zona* o dicho *compartimento* quede libre de la *enfermedad*.
- 2) Una *zona infectada* o un *compartimento infectado* por una *enfermedad* determinada podrá considerarse libre de la misma cuando se haya demostrado la ausencia de enfermedad de conformidad con las recomendaciones del Capítulo 1.4. y con las recomendaciones pertinentes descritas en los capítulos específicos de enfermedad en las secciones 8 a 11. ~~haya transcurrido, después de la declaración del último caso, un período de tiempo superior al período de infecciosidad indicado en el Código acuático y se hayan adoptado todas las medidas de profilaxis y las medidas zoonosanitarias en los animales acuáticos adecuadas para prevenir su reaparición o su propagación. La descripción detallada de estas medidas figura en los diferentes capítulos de enfermedades del Código acuático.~~
- 3) Podrá considerarse que un País miembro está de nuevo libre de una *enfermedad* determinada cuando reúna las debidas condiciones previstas en el *Código acuático*.

Anexo 22 (cont.)

- 4) La *Autoridad competente* de un País miembro que establezca una o varias *zonas libres* o un o varios *compartimentos libres* deberá notificarlo a la *Sede* facilitando los datos necesarios, entre los cuales deberán figurar los criterios sobre los que se basa el establecimiento del estatus libre y las condiciones para mantenerlo e indicando con claridad la ubicación de las *zonas* o los *compartimentos* en un mapa del territorio del País miembro.

Artículo 1.1.6.

- 1) Aunque los Países miembros sólo tendrán la obligación de notificar las *enfermedades de la lista de la OIE* y las *enfermedades emergentes*, se les invita a informar a la OIE de cualesquiera otros episodios zoonosarios significativos en los *animales acuáticos*.
- 2) La *Sede* deberá comunicar a las *Autoridades competentes* por correo electrónico o a través de la base de datos del Sistema mundial de información zoonosaria (WAHID) cuantas *notificaciones* reciba en aplicación de los Artículos 1.1.2. a 1.1.5., así como cualquier otra información pertinente.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 1.2.

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

Artículo 1.2.1.

Introducción

El presente capítulo describe los criterios para la ~~inscripción~~ inclusión de las *enfermedades de los animales acuáticos*. ~~Capítulo 1.3.~~

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

Para las *enfermedades* de la lista de la OIE de acuerdo con el Artículo 1.2.2., los capítulos correspondientes de ~~enfermedad del Código Acuático~~ ayudan a los Países Miembros en la armonización en materia de detección, prevención y control de enfermedades y proporciona las normas aplicables para garantizar el *comercio internacional* ~~inocuo~~ seguro de los *animales acuáticos* y de sus productos.

Los principios para la selección de las pruebas de diagnóstico se describen en Capítulo 1.1.2 del Manual Acuático.

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

Artículo 1.2.2.

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

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

No.	Criterios para la inscripción	Notas explicativas
A. Consecuencias		
1. <u>O</u>	<u>b.</u>	
	Se ha demostrado que la <i>enfermedad</i> tiene pérdidas significativas de producción a nivel nacional o multinacional (zonas o regiones) <u>un impacto significativo en la sanidad de los animales acuáticos en un país o una zona teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción y la mortalidad.</u>	Se ha establecido un patrón general según el cual la enfermedad provocará pérdidas en las especies susceptibles, y la morbilidad y la mortalidad están relacionadas básicamente con el agente infeccioso y no con factores relativos a la gestión o el medio ambiente. (La morbilidad incluye, por ejemplo, pérdida de producción por falta de desove.) Las repercusiones económicas directas de la enfermedad están relacionadas con su morbilidad, mortalidad y efectos en la calidad de producto.

Anexo 23 (cont.)

2.0	c.0	Se ha demostrado o las pruebas científicas indican que es probable que la <i>enfermedad</i> puede causar una morbilidad o mortalidad importantes <u>tener un impacto significativo en la sanidad de las poblaciones</u> naturales de <i>animales acuáticos</i> <u>teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción, la mortalidad y las amenazas ecológicas.</u>	Las poblaciones naturales de animales acuáticos pueden ser poblaciones que se capturan con fines comerciales (pesquerías naturales) y representan, por lo tanto, desde el punto de vista económico, un capital. Este capital también puede ser ecológico o medioambiental (por ejemplo, si los animales acuáticos que componen la población pertenecen a una especie potencialmente amenazada por la enfermedad).
Y			
3.4.	a.0	El agente infeccioso constituye un peligro para la salud pública. <u>Se ha demostrado la transmisión natural de la enfermedad al ser humano, y la infección humana se asocia con consecuencias graves.</u>	
Y B. Propagación			
4.	-	Se ha demostrado la etiología infecciosa de la enfermedad.	-
5.	0	Se ha establecido una estrecha relación entre un agente infeccioso y la enfermedad pero se desconoce aún la etiología.	Al igual que las enfermedades cuya etiología infecciosa ha sido demostrada, las enfermedades infecciosas de etiología desconocida pueden tener consecuencias peligrosas. Mientras se recolectan datos sobre la presencia de la enfermedad, se deben realizar investigaciones a fin de dilucidar la etiología de la enfermedad y los resultados deben darse a conocer en un período de tiempo razonable.
No.		Criterios para la inscripción	Notas explicativas
Y B. Propagación			
6.1.	Y	Probabilidad de <u>Se ha demostrado la</u> propagación internacional, <u>del agente</u> (a través de <i>animales acuáticos</i> vivos, sus productos o fomites).	El comercio internacional de especies de animales acuáticos susceptibles a la enfermedad está ya establecido o tiene probabilidades de establecerse, siendo probable la introducción y radicación de la enfermedad por el comercio internacional.
Y			
7.2.	Y	Varios países o zonas pueden ser declarados libres de la enfermedad, de conformidad con los principios generales de vigilancia descritos en el <u>Al menos un país ha demostrado la ausencia efectiva o eminente de enfermedad en poblaciones de animales acuáticos susceptibles</u> , basándose en las <u>disposiciones de los Capítulos 1.4. y 1.5.</u>	Los países libres o las zonas libres de enfermedad podrían ser protegidos. La inscripción en la lista de enfermedades presentes en todo el mundo o muy extendidas imposibilitaría la notificación, no obstante, los países que aplican un programa de control pueden proponer la inscripción de estas enfermedades en la lista, siempre que hayan emprendido una evaluación científica para respaldar su solicitud. La protección de los reproductores contra las enfermedades extendidas, o la protección de las últimas zonas libres existentes contra una enfermedad muy extendida serían ejemplos.

Y—C. Diagnóstico		
<u>Y</u>		
<u>8.3.</u>	Existe un método de detección <u>y diagnóstico fiable y se dispone de una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras enfermedades.</u>	Debe existir una prueba de diagnóstico asequible y que, preferentemente, haya sido sometida a un proceso de normalización y validación con muestras de terreno (véase el <i>Manual acuático</i>), o existe una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras patologías.

— Texto suprimido.

CAPÍTULO 9.2.

**INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA CABEZA AMARILLA
GENOTIPO 1**

Artículo 9.2.1.

A efectos del *Código acuático*, la infección por el virus de la cabeza amarilla es la *infección* debida al genotipo 1 del virus de la cabeza amarilla. Este virus pertenece a una especie del género *Okavirus* clasificada en la familia de los Ronivíridos y en el orden de los *Nidovirales*.

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

Artículo 9.2.2.

Ámbito de aplicación

Las recomendaciones de este capítulo se aplican a las siguientes especies: *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei*, *Penaeus stylirostris*, *Palaemonetes pugio* and *Metapenaeus affinis*, langostino jumbo (~~*Penaeus monodon*~~), langostino jumbo pardo (*P. esculentus*) y camarón kuruma (*P. japonicus*). Estas recomendaciones se aplican también a todas las demás *especies susceptibles* mencionadas en el *Manual Acuático* que sean objeto de *comercio internacional*.

— Texto suprimido.

CHAPTER 2.2.X.

ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE

1. Scope

For the purpose of this chapter, acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), also known as early mortality syndrome (EMS), is considered to be infection with unique strains of *Vibrio parahaemolyticus*, namely AHPND-causing *V. parahaemolyticus* (VP_{AHPND}).

The disease has two distinct phases:

- i) An acute phase characterised by acute progressive, massive degeneration of the hepatopancreas (HP) tubules from medial to dorsal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach in the absence of bacterial cells (FAO, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).
- ii) The terminal stage is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (FAO, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

2. Disease information**2.1. Agent factors****2.1.1. Aetiological agent, agent isolates**

AHPND has a bacterial aetiology (Tran, 2013a; 2013b; Zhang *et al.*, 2012). It is caused by specific virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*, namely VP_{AHPND}, which contains one or more extrachromosomal plasmids, including a unique, previously unreported, large, plasmid with a size of ~70 kbp (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014). This plasmid has been designated pVPA3-1, and its size may vary slightly. Removal (or “curing”) of pVA1 abolishes the AHPND-causing ability of the virulent strain of *V. parahaemolyticus*. A pVA1-cured strain fails to induce the massive sloughing of cells in the hepatopancreatic tubules that is a primary histopathological characteristic of disease (Lee *et al.*, 2015).

VP_{AHPND} expresses a deadly plasmid-encoded toxin (Pir^{vp}), which is homologous to the Pir (*Photorhabdus* insect-related) binary toxin. The toxin is formed from two subunits, PirA^{vp} and PirB^{vp}, but unlike other Pir binary toxins, *V. parahaemolyticus* PirB (PirB^{vp}, a 50.1 kDa protein) alone is capable of inducing AHPND histopathology in the hepatopancreatic tubules, while PirA^{vp} (a 12.7 kDa protein) causes only minor histological changes (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Sirikharin *et al.*, 2015).

Within a population of AHPND-causing bacteria, natural deletion of the Pir^{vp} region may occur in a few individuals (Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences/transposase that flank the pir toxin operon, and although different strains exhibit different levels of stability, when the deletion occurs, it means that a virulent strain of *V. parahaemolyticus* will lose its ability to induce AHPND. However, if the pir toxin sequence is used as a target for detection, then a colony that has this deletion will produce a negative result even though the colony was derived from an isolate of virulent bacteria.

The plasmid pVA1 also carries a cluster of genes related to conjugative transfer, which means that this plasmid is potentially able to transfer to other bacteria. So far, however, there have been no published reports that any bacteria other than *V. parahaemolyticus* carry pVA1. The pVA1 plasmid also carries the *pndA* gene, which is associated with a post-segregational killing (psk) system. For a bacterium that

Anexo 25 (cont.)

harbours a plasmid with the psk system (PSK⁺), only progeny that inherit the PSK⁺ plasmid will be viable. Progeny that do not inherit the PSK⁺ plasmid will die because the stable *pndA* mRNA will be translated to PndA toxin that will kill the bacterium. The presence of a psk system on a plasmid thus ensures that the plasmid is inherited during bacterial replication. The pVA1 plasmid will therefore be passed on to subsequent generations of VP_{AHPND} producing PirA^{VP} and PirB^{VP}. Hence, when PirA^{VP} is present there is little or no histopathology. When PirB^{VP} is present, its larger size of 50.1 kDa is adequate to produce an enzyme that denudes the hepatopancreatic tubules (Lee *et al.*, 2015).

2.1.2. Survival outside the host (i.e. in the natural environment)

Not known.

2.1.3. Stability of the agent

Not known.

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species (common and Latin names)

Penaeus vannamei (white leg or Pacific white shrimp); *P. monodon* (black tiger prawn) and *P. chinensis* (fleshy prawn).

2.2.2. Susceptible stages of the host

In the acute phase, this disease is characterised by a massive acute progressive degeneration of the HP tubules from medial to dorsal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach in the absence of bacterial cells (FAO, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

In the terminal phase of ANDHP, is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (FAO, 2013; Leño & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

2.2.3. Species or sub-population predilection (probability of detection)

Not applicable.

2.2.4. Target organs and infected tissue

Gut-associated tissues and organs.

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

See Section 2.1.4 Life cycle.

2.2.6. Vectors

None are known.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

None are known (except in South-East Asia, some molluscs and certain polychaetes).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Mortalities are expected within 30 days of stocking shrimp ponds with postlarvae (PL) or juveniles (from 15 mg to ~1 g in weight) (Nunan *et al.*, 2014; Leaño & Mohan, 2013; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

With laboratory infections, mortality can be induced within 12 hours of exposure to strains of VP_{AHPND} by the *per os* route if the coated feed contains 10⁸ CFU (colony-forming units) per gram of inoculum (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

Alternatively mortalities can be induced is with a bath challenge, provided that the challenge bath begins with 10⁸ CFU per gram of inoculum (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

2.3.2. Prevalence

Nunan *et al.*, 2014, Soto-Rodriguez *et al.*, 2015, and Tran *et al.*, 2013b found a near 100% prevalence in pond-reared stocks in South-East Asia and in Mexico after 2013.

2.3.3. Geographical distribution

The disease has been introduced into south-east China (People's Rep. of), Vietnam, Malaysia, Thailand and Mexico. In other countries in the East and South-East Asia regions, and neighbouring Mexico, farms may have been exposed to the toxin-producing strains of *V. parahaemolyticus* (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2012).

2.3.4. Mortality and morbidity

Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; and Tran *et al.*, 2013b found a near 100% mortality and morbidity prevalence in pond-reared stocks in South-East Asia and in Mexico.

2.3.5. Environmental factors (e.g. temperature, salinity, season, etc.)

Water sources with low salinity (below ~5 to ~10 ppt) seem to reduce the prevalence of the disease. Although AHPND can be found year round in South-East Asia, the hot and dry season from April to July seems to be the peak. Bad feed management, algal bloom or crash are also factors that may lead to AHPND in endemic areas.

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

Not applicable.

2.4.2. Chemotherapy

Not useful.

2.4.3. Immunostimulation

Not useful.

2.4.4. Resistance breeding

An AHPND line with some resistance to the disease has been developed in Mexico and in Ecuador. This was accomplished through mass selection over 10 years for growth and survival, rather than for SPF (specific-pathogen free) stock development (Lightner, unpublished data).

2.4.5. Restocking with resistant species

None available.

2.4.6. Blocking agents

None available.

Anexo 25 (cont.)**2.4.7. Disinfection of eggs and larvae**

None known.

2.4.8. General husbandry practices

None known.

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 4.1.1) should be selected for AHPND detection. It is assumed that adults (broodstock) can carry toxin-bearing strains (especially PirB^{VP}) of *V. parahaemolyticus* (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). Therefore, broodstock without clinical signs may also be selected for testing, but only for testing for the presence of PirB^{VP} toxin.

3.2. Preservation of samples for submission

Carefully selected shrimp samples can be submitted to a variety of laboratories for diagnosis of AHPND. The samples can be submitted in 90% ethanol for polymerase chain reaction (PCR) detection, or preserved in Davison's AFA fixative for routine histopathology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Leañó & Mohan, 2013; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

3.3. Pooling of samples

For molecular testing, samples of shrimp cephalothoracies can be selected (pooled when less than 0.5 g).

Samples, especially PL or specimens up to 0.5 g can be pooled. Larger shrimp should not be pooled and should be processed individually (Lightner, unpublished data).

3.4. Best organs or tissues

Gut-associated tissues and organs, such as hepatopancreas, stomach, the midgut, the hindgut, and faeces of selected shrimp for samples. Valuable broodstock may be worth saving, and from these only faeces should be collected.

3.5. Samples/tissues that are not appropriate (i.e. when it is never possible to detect)

Samples other than gut-associated tissues and organs are not appropriate (FAO, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

4. Diagnostic methods**4.1. Field diagnostic methods****4.1.1. Gross signs**

The clinical signs could be used for presumptive diagnosis, which can be further confirmed by histopathology observed at the animal level include a pale to white HP due to pigment loss in the connective tissue capsule, significant atrophy of the HP, soft shells and guts with discontinuous contents or no contents, black spots or streaks sometimes visible within the HP, soft HP which does not squash easily between the thumb and forefinger, and the onset of clinical signs and mortality starting as early as 10 days post-stocking (NACA, 2012; 2014).

4.1.2. Behavioural changes

Not applicable.

4.2. Clinical methods**4.2.1. Clinical chemistry**

None are known.

4.2.2. Microscopic pathology

An acute phase characterised by an acute, massive progressive degeneration of the HP tubules from medial to dorsal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach in the absence of bacterial cells (FAO, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

The terminal phase is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (FAO, 2013; Leaño & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

4.2.3. Wet mounts

Not applicable.

4.2.4. Smears

Not applicable.

4.2.5. Fixed sections (for ISH):

In-situ hybridisation is a useful technique provided it is done properly. The result of an ISH test will be apparent as a Bismarck Brown stained material will remain. This will be used to distinguish ANHPD tissues from those tissues which are not affected.

4.2.6. Electron microscopy/cytopathology

None reported to date (February 2015).

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

See Section 2.2.2.

4.3.1.1.1. Wet mounts

Not applicable.

4.3.1.1.2. Smears

Not applicable.

4.3.1.1.3. Fixed sections

Not applicable.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

On marine or blood agar, the strains of VP_{AHPND} are capable of swarming (Han *et al.*, 2015). Hence, it is possible to isolate PirB^{VP} toxin-producing forms of *V. parahaemolyticus* on standard media used for isolation of bacteria from diseased shrimp or other samples, especially because PirB^{VP} produces a more potent toxin than PirA^{VP} (Lee *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). The identity of the *V. parahaemolyticus* may be confirmed by use of a PCR method to detect lecithin dependent haemolysin gene (Taniguchi *et al.*, 1985) and their probable ability to cause AHPND by PCR methods described in section 4.3.1.2.3. This must be followed by bioassay to confirm ability to cause AHPND.

Anexo 25 (cont.)

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

No methods are available.

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

None is available to date (February 2015).

4.3.1.2.3. Molecular techniques

4.3.1.2.3.1. PCR protocols for detection of AHPND causing bacteria from cultures or infected shrimp

Although the AP1 and AP2 methods are not recommended for detection of VP_{AHPND}, they are included here because they may find utility in studying the environmental prevalence and distribution of bacterial isolates carrying pVA1 plasmid variants that lack the PirA^{VP} and PirB^{VP} genes, would not cause AHPND and would give negative results with the methods recommended here for VP_{AHPND} detection.

Methods for detection of isolates of VP_{AHPND} by PCR have been developed. The most successful methods target the unique genes for AHPND toxin PirA^{VP} (12.7 kDa) and/or PirB^{VP} (50.1 kDa) that together cause sloughing of shrimp hepatopancreatic cells. These toxin genes have been found as episomal elements in all AHPND isolates so far sequenced (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Kondo *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014) and GenBank Accession number KM067908. Two earlier, preliminary PCR detection methods (AP1 and AP2) that targeted the plasmid carrying the toxin genes (Yang *et al.*, 2014) were announced on the internet at the website of the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA) in December 2013 (Flegel & Lo, 2014) but were later abandoned because of 3% false positive results from non-AHPND bacteria that carried the plasmid without the toxin genes.

To overcome the problem of false positive results, methods have been developed that target the AHPND toxin genes. The first such method (AP3) was announced in June 2014 and targeted the 12.7 kDa *pirA^{VP}* gene (Sirikharin *et al.*, 2014). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing with 104 AHPND-causing and non-pathogenic bacteria (including other *Vibrio* and non-*Vibrio* species) that had previously been confirmed by bioassay (Kwai *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015). A subsequent publication using 9 AHPND-causing and 11 non-pathogenic isolates of *V. parahaemolyticus* from Mexico (Soto-Rodriguez *et al.*, 2015) reported that the AP3 method gave the highest positive (90%) and negative (100%) predictive values of five PCR methods tested, including one commercial method.

The AP3 method and four other more recently published methods that target the AHPND *pirA^{VP}* gene (the Pir^{VP}A method and the VpPirA-284) and *pirB^{VP}* (Pir^{VP}B method and the VpPirB-392) are one-step PCR methods of relatively low sensitivity when used for detection of AHPND-causing bacteria at carrier levels or in environmental samples such as sediments and biofilms. For such samples, a preliminary enrichment step is recommended since experience has shown that these PCR methods are not sensitive enough to detect low numbers of bacterial cells at carrier levels and that adaptation to a nested PCR protocol was not successful due to the occurrence of non-specific amplicons.

An additional two-tube nested PCR method called AP4 has been devised and found to give 100% positive predictive value for AHPND-causing bacteria using the same 104 bacterial isolates used to validate AP3 above (announcement at www.enaca.org and manuscript in preparation). This method does not give rise to non-specific amplicons and has a minimum sensitivity for 1 fg of DNA extracted from AHPND-causing bacteria, allowing it to be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

4.3.1.2.3.1.1 Enrichment of samples prior to DNA extraction

Preliminary enrichment cultures for detection of AHPND-causing bacteria at carrier levels or in environmental samples may be carried out in any suitable medium (e.g. tryptic-*soy* broth) or alkaline peptone water containing 2.5% NaCl supplement) incubated for 4 hours at around 30°C with shaking. After this, let any debris settle, remove the cloudy supernatant for centrifugation to pellet the bacteria it contains and discard the supernatant solution. Extract DNA from the bacterial pellet.

4.3.1.2.3.1.2 Agent purification

The causative agent of AHPND may be isolated in pure culture from diseased shrimp, carrier shrimp or environmental samples using standard microbiological media used for isolation of *Vibrio* species from such sources (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013a; 2013b). Isolation of pure cultures must be followed by PCR analysis and/or bioassays to confirm the ability to cause AHPND.

AP1 (AHPND Primer set 1)

AP1F: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3'

AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'

AP1 Amplicon sequence 700 bp (Lee *et al.*, 2015).

AP2 (AHPND Primer set 2)

AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3'

AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'

AP2 Amplicon sequence 700 bp (Lee *et al.*, 2015).

4.3.1.2.3.1.3 DNA extraction

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the stomach or hepatopancreatic tissue of a putatively infected shrimp, from cultures of purified bacterial isolates or from bacterial pellets from enrichment cultures (see above). The amount of template DNA in a 25 µl PCR reaction volume should be in the range of 0.01–1 ng of DNA when extracted from bacterial isolates (i.e. directly from a purified culture) and in the range of 10–100 ng of total DNA when extracted from shrimp tissues or from a bacterial pellet from an enrichment culture.

4.3.1.2.3.1.4 PCR primers for one-step PCR detection of AHPND bacteria

Five one-step PCR methods called AP3, Pir^{VP}A, Pir^{VP}B, VpPirA and VpPirB have been developed (see above) for detection of VP_{AHPND}. The AP3, Pir^{VP}A and VpPirA methods target the *pirA^{VP}* gene while the Pir^{VP}B and VpPirB methods target the *pirB^{VP}* gene. These primers are listed in Table 4.1 together with the size of their expected amplicons.

Table 4.1. PCR primers for one-step PCR detection of VP_{AHPND}

Method name	Primers	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP3	AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'	<i>pirA^{VP}</i>	333	Sirikharin <i>et al.</i> , 2014 Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
Pir ^{VP} A	Pir ^{VP} A F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-G-3' Pir ^{VP} A R: 5'-TTA-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-G-3'	<i>pirA^{VP}</i>	336	Lee <i>et al.</i> , 2015
Pir ^{VP} B	Pir ^{VP} B F: 5'-GAG-CCA-GAT-ATT-GAA-AAC-ATT-TGG-3' Pir ^{VP} B R: 5'-CCA-CGC-AGC-GAG-TTC-TGT-AAT-GTA-3'	<i>pirB^{VP}</i>	438	Lee <i>et al.</i> , 2015,
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'	<i>pirA^{VP}</i>	284	KM067908 Han <i>et al.</i> , 2015
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'	<i>pirB^{VP}</i>	392	KM067908 Han <i>et al.</i> , 2015

Note that the primer sequences and amplicons for the two methods that target the *pirA^{VP}* gene differ slightly.

4.3.1.2.3.1.5 PCR primers for nested PCR for detection of AHPND bacteria

A two-tube, nested PCR method called AP4 has been devised and found to give 100% positive predictive value for AHPND-causing bacteria using the same 104 bacterial isolates used to validate AP3 above (www.enaca.org) (Sritunyalucksana *et al.*, 2015). Nonspecific amplicons do not arise from this method and it has a minimum sensitivity for 1 fg of DNA

Anexo 25 (cont.)

extracted from AHPND-causing bacteria, allowing it to be used directly with tissue and environmental samples that may have low levels of AHPND bacteria. The target sequence consists of a chimeric DNA fragment comprising the full *pirA^{VP}* gene sequence plus the 12 bp linker plus the full succeeding *pirB^{VP}* gene sequence for a total of 1269 bp. The first-step and second-step PCR primers are listed in Table 4.2 below. The primers were designed from the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014). The expected amplicons are 1269 bp for the outer primers AP4-F1 and AP4-R1 and 230 bp for the inner primers AP4-F2 and AP4-R2. At high concentrations of target DNA, additional bands for amplicons may occur as the product of residual primer AP4-F1 working with AP4-R2 (357 bp) or AP4-F2 with AP4-R1 (1142 bp) in the nested step.

Table 4.2. Primers for the AP4, two-step PCR method for detection of AHPND-causing bacteria

Method name	Primers	Expected amplicon size	Reference
AP4 Step 1	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'	1269	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
AP4 Step 2	AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3' AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'	230	

Note that the AP4-F1 primer sequence is equal to that of AP3-F.

4.3.1.2.3.1.6 Protocol for the AP3, 1-step PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* 2014. The PCR reaction mixture consists of 10x PCR mix (Invitrogen⁵) 2.5 µl, 50 mM MgCl₂, 0.7 µl, 10 mM dNTPs, 0.4 µl, 10 µM AP3-F1, 0.5 µl, 10 µM AP3-R1, 0.5 µl, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹, Invitrogen) and 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 5 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and hold at 4°C.

4.3.1.2.3.1.7 Protocol for the VpPirA-284 1-step PCR method

Perform PCR with PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). This consists of a 3-minute step at 94°C to denature DNA prior to the primers binding and activation of the Taq DNA polymerase, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Prepare a 25 µl PCR reaction with a PuReTaq ready-to-go PCR bead. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA.

4.3.1.2.3.1.8 Protocol for the Pir^{VP}B 1-step PCR method

PCR consists of an initial preheating stage of 5 minutes at 94°C, followed by 25–30 cycles of 30 seconds denaturation at 94°C, 30 seconds annealing at 60°C and 60 seconds extension at 72°C, and a final 10 minutes extension at 72°C. The amplified PCR products are analysed in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualised under ultraviolet transillumination. AHPND positive samples give a positive band at 336 bp and 400 bp with the PirA^{VP} and PirB^{VP} primer sets, respectively. No band is produced by non-AHPND samples (Lee *et al.*, 2015).

4.3.1.2.3.1.9 Protocol for the VpPirB-392 1-step PCR method

The protocol for this method is the same as that for the VpPirA-284 method above

⁵ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

4.3.1.2.3.1.10 Protocol for the AP4 nested PCR method

This protocol follows the method described by Sritnyalucksana *et al.*, 2015. The first PCR reaction mixture consists of 10x PCR mix (Invitrogen) 2.5 µl, 50 mM MgCl₂, 1.5 µl, 10 mM dNTPs, 0.5 µl, 10 µM AP4-F1, 0.5 µl, 10 µM AP4-R1, 0.5 µl, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹, Invitrogen) and 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 10x PCR mix (Invitrogen) 2.5 µl, 50 mM MgCl₂, 1.5 µl, 10 mM dNTPs, 0.5 µl, 10 µM AP4-F2, 0.375 µl, 10 µM AP4-R2, 0.375 µl, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹, Invitrogen) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

4.3.1.2.3.1.11 Controls for all PCR methods

The following controls should be included in all AHPND PCR assays: a) DNA template extracted from a known negative sample, such as specific-pathogen-free shrimp tissues; b) DNA template from a known positive sample, including AHPND-affected shrimp tissue, or DNA from a VP_{AHPND} bacteria culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a none-template control, i.e. adding nuclease-free water as the template.

4.3.1.2.3.1.12 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, load 5–10 µl of the PCR reaction mix onto a 1.5% agarose gel (containing 0.5 µg ml⁻¹ ethidium bromide). Look for the expected amplicons appropriate for the PCR method used (Tables 4.1 and 4.2).

4.3.2. Serological methods

Not applicable.

5. Rating of tests against purpose of use

As an example, the methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of AHPND are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category A or B have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PL	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	b	c	b	a
Bioassay	d	d	b	d	b	b
Direct LM	d	d	d	c	c	c
Histopathology	d	c	a	c	a	a
Transmission EM	d	d	d	d	d	a
PCR	d	b	a	a	a	a
Sequence	d	d	a	a	a	a

PL = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction.

Anexo 25 (cont.)**6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from AHPND**

Two years of freedom from AHPND is adequate to declare freedom from the acute hepatopancreatic necrosis disease (VP_{AHPND}) (Leaño & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

7. Corroborative diagnostic criteria**7.1. Definition of suspect case**

AHPND shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

Histopathology indicative of AHPND

or

Detection of VP_{AHPND}

or

Mortality associated with clinical signs of AHPND.

7.2. Definition of confirmed case

AHPND is considered to be confirmed if the following criteria are met:

Detection of VP_{AHPND}

and

Histopathology indicative of AHPND

or

Mortality associated with clinical signs of AHPND

or

Positive results by bioassay.

8. References

DE SCHRYVER P., DEFOIRDT T. & SORGELOOS P. (2013). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.*, **10** (4), e1003919. doi: 10.1371/journal.ppat.1003919.

FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), 2013. Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome, Italy, 54 pp.

FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.

GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRIGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft Genome Sequence of *Vibrio parahaemolyticus* Strain M0605, Which Causes Severe Mortalities of Shrimps in Mexico. *Genome Announcements*. 2.

GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-Quality Draft Genomes of Two *Vibrio parahaemolyticus* Strains Aid in Understanding Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimps in Mexico. *Genome Announcements*. 2.

HAN J.E., TANG F.F.J., LIGHTNER D.V. & TRAN L. (2015). *Photorhabdus* insect related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.

JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>

JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.

KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft Genome Sequences of Six Strains of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Shrimp in Thailand. *Genome Announcements*, **2**.

KWAI L., ENG H.U., SIEW W., SH M.Y., WEI Y.W & KOEN P.Y. (2014). An AP1, 2 & 3 PCR positive non-*Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology. The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture.

LEAÑO E.M. & MOHAN C. V. (2013). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*, July/August 2013, 38–39.

LEE C.-T., CHEN I.-T., YANG Y.-T., KO T.-P., HUANG Y.-T., HUANG J.-Y., HUANG M.-F., LIN S.-J., CHEN C.-Y., LIN S.-S., LIGHTNER D.V., WANG H.-C., WANG A.H.-J., WANG H.-C., HOR L.-I. & LO C.-F. (2015). *Vibrio parahaemolyticus*: an opportunistic marine pathogen becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. Submitted

LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.

NACA (2012). Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9–10 August 2012. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.

NACA (2014). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.

NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., FLEGEL T., MAVICHAK R. & PROESPRAWONG P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
Source: http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., THANH D.C., MAVICHAK R., PROESPRAWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, *Pir*-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*. In press.

SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of culture shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1–11.

SRITUNYALUCKSANA K., DANGTIP S., SANGUANRUT P., SIRIKHARIN R., THITAMADEE S., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). A two-tube, nested PCR detection method for AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030, Bangkok.

Anexo 25 (cont.)

TANIGUCHI H., OHTA H., OGAWA M. & MIZUGUCHI Y. (1985). Cloning and expression of *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.*, **162**, 510–515.

TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPACK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease 1 (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014a). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, Vol. 10, Number 2, March/April 2014.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014b). *Tilapia* could enhance water conditions, help control EMS in shrimp ponds. *Global Aquaculture Advocate*, January/February, 26–28.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R., LIGHTNER D.V. & FITZSIMMONS K. (2013a). EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *Global Aquaculture Advocate*, July/August 2013, 16–18.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013b). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 45–55.

YANG Y.-T., CHEN I.-T., LEE C.-T., CHEN C.-Y., LIN S.-S., HOR L.-I., TSENG T.-C., HUANG Y.-T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.-C., LO C.-F. (2014). Draft Genome Sequences of Four Strains of *Vibrio parahaemolyticus*, Three of Which Cause Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Shrimp in China and Thailand. *Genome Announcements*. 2.

ZHANG B.-C., LIU F., BIAN H.-H., LIU J., PAN L.-Q., HUANG J. (2012). Isolation, identification, and pathogenicity analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from *Litopenaeus vannamei*. *Prog. Fishery Sci.*, **33**, 56–62. (in Chinese with English abstract and figure illustrations)

*

* *



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

Original: inglés

Enero de 2015

INFORME DE LA REUNIÓN DEL GRUPO AD HOC DE LA OIE SOBRE NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES ANIMALES Y AGENTES PATÓGENOS

París, 6-8 de enero de 2015

El Grupo *ad hoc* de la OIE sobre notificación de enfermedades animales y agentes patógenos se reunió en la Sede de la OIE del 6 al 8 de enero de 2015.

La lista de los miembros del Grupo y del resto de participantes figura en el Anexo I. La reunión fue presidida por la Dra. Toni Tana y el Dr. Allan Sheridan fue el encargado de redactar el informe.

El Dr. Alex Thiermann, Asesor del Director General y Presidente de la Comisión del Código Sanitario para los Animales Terrestres, dio la bienvenida a los participantes en nombre del Dr. Bernard Vallat, Director General de la OIE, y les agradeció que hubieran aceptado la invitación de la OIE. El Dr. Alex Thiermann recordó a los participantes la importancia que tenía este Grupo, que reúne a varios expertos de diferentes regiones, para el trabajo de la OIE, y reiteró que el Grupo tenía un mandato único y fundamental. El objetivo era revisar los criterios para inscribir una enfermedad en la lista de la OIE, teniendo en cuenta todas las enfermedades y no sólo aquellas específicas que se hubieran considerado importantes en un momento dado. También hizo hincapié en que una enfermedad que formaba parte de la lista no era más importante que otras enfermedades, pero sí los criterios que la definían como enfermedad, basados en sus características epidemiológicas, lo que exigía que la información fuese difundida rápidamente para facilitar los esfuerzos de control por parte de los Servicios Veterinarios. También se invitó al Grupo a que considerara contemplar la posibilidad de brindar una mayor claridad y disciplina en cuanto a la manera de declarar las enfermedades emergentes y el momento en que el envío de los informes dejaba de ser necesario. Las conclusiones de este Grupo deberían de ayudar a la OIE a encontrar la manera de animar a los Países Miembros a mejorar el nivel y la calidad en cuanto a la notificación de enfermedades y declaración de eventos.

La Dra. Paula Cáceres, Jefa del Departamento de información y análisis de la sanidad animal mundial, presentó los objetivos de la reunión: examinar y evaluar los criterios contemplados en los *Códigos Terrestre y Acuático* para la inclusión de enfermedades, infecciones e infestaciones en la lista de la OIE. Se pidió al Grupo evaluar la necesidad de perfilar la definición de las obligaciones de notificación de las enfermedades emergentes de los Países Miembros. También se pidió al Grupo que apoyara a la OIE a la hora de considerar suprimir la notificación, en el informe anual, de las enfermedades que no figuran en la lista de la OIE y, basándose en el Capítulo 1.1 modificado y adoptado por la Asamblea Mundial de la OIE de mayo de 2014, reemplazarla por la información sobre enfermedades emergentes declaradas endémicas. La Dra. Cáceres discutió también con el Grupo en el segundo día y clarificó la descripción del papel y responsabilidades de los miembros expertos presentada por el Dr. Thiermann. El objetivo de un miembro experto de un Grupo *ad hoc* nombrado por la OIE es trabajar para fomentar la misión de la OIE, aportando su experiencia y concienciación regional única a la tarea entre manos sin abogar por una posición que contravenga la de la OIE.

El Grupo revisó y aceptó su mandato, que figura en el Anexo II.

Anexo 26 (cont.)

El Grupo aprobó el temario propuesto, que figura en el Anexo III.

El Dr. Vallat, Director General, se sumó a la reunión en el segundo día para apoyar las actividades del Grupo y recordó que la OIE organizaba dichos Grupos periódicamente para revisar las normas existentes y mejorarlas basándose en la información científica más reciente. Hizo hincapié en que una de las principales misiones de la OIE era promover la transparencia de la situación sanitaria animal a nivel mundial mediante las normas y mecanismos de notificación apropiados. Explicó que el sistema para la notificación de enfermedades se había ido construyendo y modernizando con los años, con una demanda creciente de colecta y comunicación de datos. Insistió en que el trabajo de la OIE para desarrollar las capacidades con los Países Miembros a través de la red de puntos focales pretendía facilitar la notificación de enfermedades y mejorar la calidad de la información. También puso de relieve la importancia de los recientes cambios en la definición y obligaciones para las enfermedades emergentes debido al número y la importancia cada vez mayor de estas enfermedades.

Asimismo, el Dr. Vallat recordó al Grupo que uno de los principales objetivos debería ser, en beneficio de los Miembros, simplificar los criterios para la inscripción de las enfermedades. El Dr. Vallat hizo hincapié en que la OIE seguía trabajando en la modernización del sistema de notificación WAHIS a fin de mejorar el sistema de cartografía, la visualización del estatus oficial, la extracción y análisis de la información recopilada, y de incluir la información sobre el genotipo recopilada de la red de Laboratorios de Referencia y la información relacionada con la resistencia a los agentes antimicrobianos. Añadió también que tres departamentos, el Departamento científico y técnico, el Departamento de comercio internacional y el Departamento de información y análisis de la sanidad animal mundial, estaban trabajando en la armonización de las definiciones entre los Códigos Terrestre y Acuático y el procedimiento de notificación de WAHIS.

Lo que se pretende es que las tres Comisiones Especializadas involucradas puedan debatir sobre este informe durante sus reuniones en febrero de 2015. La lista de observadores de las tres Comisiones cuyo trabajo está directamente vinculado con este Grupo ad hoc figura en el Anexo I, así como otros participantes que asistieron a la reunión.

El Grupo designó un Presidente y un relator y debatieron brevemente sobre su papel y responsabilidades. El Grupo convino que era imprescindible recordar que los criterios de inscripción de enfermedades no debían ser considerados de manera aislada unos de otros o de otros elementos de los Capítulos 1.1 y 1.2 de los Códigos de la OIE, *Código Sanitario para los Animales Terrestres (Código Terrestre)* y *Código Sanitario para los Animales Acuáticos (Código Acuático)*. Además, el Grupo observó que el propósito de la inscripción y notificación de enfermedades estaba subordinado al mandato global de sanidad animal de la OIE.

Después de la reunión, las modificaciones propuestas para los capítulos fueron compiladas y figuran en los siguientes Anexos:

Código Terrestre, Capítulo 1.1 Anexo IV

Código Acuático, Capítulo 1.1 Anexo V

Código Terrestre, Capítulo 1.2 Anexo VI

Código Acuático, Capítulo 1.2 Anexo VII (con las modificaciones propuestas)

Código Acuático, Capítulo 1.2 Anexo VIII (con las modificaciones propuestas aceptadas)

El Capítulo 1.3 del *Código Acuático* es equivalente al Artículo 1.2.3. del *Código Terrestre*. Contiene la lista de las enfermedades contempladas en el *Código Acuático*.

1. Examinar y evaluar los criterios de inscripción de enfermedades de los Códigos Terrestre y Acuático

Capítulo 1.2

El Grupo debatió sobre la necesidad de definir claramente, en beneficio de los Miembros, los criterios de inscripción de enfermedades planteados en el Capítulo 1.2. del *Código Terrestre* y el Capítulo 1.3 del *Código Acuático*.

Anexo 26 (cont.)

El Grupo examinó cada artículo de los capítulos relacionados con los criterios de inscripción de enfermedades de los animales terrestres y acuáticos. El Grupo observó que había algunas diferencias entre los Capítulos de ambos Códigos, sin embargo, y según las peticiones anteriores de algunos Países Miembros, el Grupo buscó la manera de armonizar los criterios de inscripción de enfermedades de los animales terrestres y acuáticos siempre que fuese posible.

Además, el Grupo observó que los títulos de los dos capítulos y la primera línea de introducción eran diferentes, pero transmitían la misma información. Por esa razón, el Grupo solicitó a las Comisiones de los Códigos evaluar si estos aspectos de los Capítulos podían ser armonizados.

El Grupo igualmente debatió sobre la necesidad de especificidad cuando un Grupo *ad hoc* era designado para considerar si una enfermedad, infección o infestación se proponía para la inscripción bajo estos criterios. El Grupo informó al representante de la Comisión del Código que los criterios podían ser aplicados a una enfermedad o a una cepa específica. El Grupo convino que era esencial que los Grupos *ad hoc* supieran con claridad si debían considerar una enfermedad o una cepa específica en su mandato.

Código Terrestre: Artículo 1.2.1.

El Grupo acordó que la finalidad de la inscripción era facilitar la notificación de y hacia los Países Miembros y permitirles tomar acciones coordinadas (siempre que fuera posible) y apropiadas para prevenir la propagación de enfermedades hasta donde fuera posible mediante el control ejercido por las Autoridades Veterinarias sobre animales y productos derivados. El Grupo convino que esto debía plantearse claramente en el primer párrafo de este artículo y recomendó también la inserción del término 'oportuno' para destacar la importancia de comunicar la información lo suficientemente pronto para que los demás Miembros puedan tomar medidas eficaces.

El Grupo acordó que la función del *Código Terrestre* de proporcionar normas para el control de enfermedades y el comercio seguro de los animales y de sus productos era importante y debía ser mencionada. Esto ya había sido implementado en el *Código Acuático* y la inserción de esta formulación en el segundo párrafo de la introducción fue recomendada por el Grupo.

El Grupo convino que los detalles sobre el mecanismo de notificación figuraban en el Capítulo 1.1 y que no había ningún beneficio en replantearlos.

Además, el Grupo acordó que ayudaría a los Miembros el poder tener una referencia en esta sección a los principios para la selección de una prueba de diagnóstico adecuada. Esto se discutió cuando se contempló el punto C. 8 del Artículo 1.2.2. del *Código Acuático*.

Código Acuático: Artículo 1.2.1.

La misma lógica para la modificación del artículo en el *Código Terrestre* fue considerada como apropiada en este caso.

Código Terrestre: Artículo 1.2.2

Punto 1. El Grupo fue informado de que dos aspectos de este artículo habían suscitado comentarios por parte de los Miembros – 'propagación internacional' y 'demostrado'. Después de haber debatido sobre la cuestión, el Grupo convino en que el término 'propagación internacional' era suficientemente claro y no requería modificación alguna. El Grupo también acordó que el término 'demostrado' tenía un significado científico claro en el contexto del *Código Terrestre* y que no debía ser considerado como un término legal.

Punto 2. El Grupo fue asesorado por la Comisión del Código y acordó que el término 'demostrado la ausencia efectiva' incorporaría la ausencia histórica de la enfermedad según lo dispuesto en el Artículo 1.4.6. del *Código Terrestre*. La Comisión del Código asesoró y el Grupo convino que la 'ausencia eminente' sería aplicada a los países con programas de control, con la erradicación como punto final en una fase avanzada. Además, el Grupo asesorado por la Comisión del Código acordó que la categorización 'riesgo insignificante' de ciertos países respecto de la EEB sería equivalente a 'ausencia' para este Artículo. El Grupo recomendó simplificar la formulación relativa a las disposiciones de vigilancia del *Código Terrestre*, como se ha hecho en el *Código Acuático*.

Anexo 26 (cont.)

Punto 3. a. El Grupo acordó mantener este criterio tal como está escrito.

Punto 3.b. El Grupo fue informado de los comentarios de los Miembros que indicaban una falta de coherencia en la comprensión de los términos ‘morbilidad o mortalidad significativas’. Algunos Miembros deseaban la cuantificación de la incidencia y otros pedían una definición específica del término ‘morbilidad’ tal como se aplica al *Código Terrestre*. El Grupo examinó si una definición del término o una reestructuración de su significado dentro del artículo era la mejor manera de aportar claridad. Después de un amplio debate y la revisión de un proyecto de definición, el Grupo acordó que la simplificación del enunciado de mayor nivel y la especificación de los criterios que debían utilizarse en el artículo sería más útil. Se propuso utilizar el término ‘repercusión significativa en la sanidad’ acompañado por un mecanismo que permitiera su evaluación.

El Grupo también comentó la importancia de los resultados serológicos positivos en relación con los criterios de inscripción. Un resultado serológico positivo, o título, en un animal evidencia la exposición previa a un agente (microorganismo, proteína, etc.) que conduce a una respuesta inmunológica. Sin embargo, la exposición a un agente infeccioso puede, o no, resultar en una enfermedad en un individuo. El Grupo acordó que los resultados serológicos positivos en ausencia de signos clínicos no debían ser considerados signos de enfermedad o morbilidad, ni tampoco evidencia de ‘repercusión significativa en la sanidad’.

Durante estas discusiones, el Grupo consideró también si había necesidad de criterios adicionales. Una de las sugerencias fue permitir la reinscripción de una enfermedad que había sido retirada de la lista, pero para la que las medidas de control se mantenían en numerosos países. El Grupo examinó esta propuesta y no apoyó la sugerencia. Los países están autorizados a implementar medidas en el ámbito de la salud de los animales bajo las reglas de la OMC para las enfermedades que no están inscritas si proporcionan una evaluación de riesgos y las medidas son lo menos restrictivas para el comercio que lo necesario para proteger el estatus de ese país. En la Sesión General se toma la decisión de suprimir de la lista una enfermedad que no cumple con los criterios de inscripción. Sin embargo, las enfermedades suprimidas de la lista pueden ser inscritas nuevamente si su comportamiento cambia de tal manera que posteriormente cumplen los criterios de inscripción, por lo que el Grupo no encontró ningún beneficio que justificara la inclusión de esta propuesta.

La Comisión del Código aconsejó que el uso del término ‘zona’ en este artículo incluyera *zona de contención* definida para controlar la enfermedad.

Punto 3.c. El Grupo adaptó la redacción de este punto con la del punto 3.b. Además, el Grupo acordó cambiar el término ‘poblaciones de animales silvestres’ por ‘*fauna silvestre*’. El término ‘*fauna silvestre*’ está definido en el *Código Terrestre* e incluye otras categorías de fauna silvestre de valor económico previamente excluidas, en particular los *animales silvestres cautivos*. El Grupo consideró también este aspecto en relación con el requisito equivalente en el *Código Acuático* (punto A. 2. del Artículo 1.2.2) y acordó que la adición del término ‘amenazas ecológicas’ era de gran valor aquí también.

Punto 4. El Grupo aceptó mantener este criterio tal como está escrito.

Reorganización del Artículo 1.2.2: El Grupo consideró que era más fácil para los Miembros aplicar los criterios si las opciones ‘o’ estaban al final de la sección. Para adaptarse a la sugerencia, se movió el punto 4 anterior del Artículo 1.2.2. al punto 3 del Artículo 1.2.2.

Código Acuático: Artículo 1.2.2.

El Grupo examinó la razón de tener notas explicativas en vista de los recientes cambios propuestos al *Código Acuático*, y acordó incorporar la información pertinente en los criterios de evaluación. Además, se señaló que la supresión de las notas explicativas hacía que el cuadro ya no fuese necesario y el Grupo recomendó a la Comisión del Código utilizar en este Artículo el mismo formato del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*.

El Grupo acordó además que el segundo párrafo del Artículo 1.2.2. que describía en detalle cómo aplicar el criterio era innecesario y que la primera frase del artículo debía utilizar la formulación de la primera frase en la sección equivalente del *Código Terrestre*.

Anexo 26 (cont.)

No. A. 1. Este artículo corresponde al punto 3. b del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*. El Grupo acordó que el nuevo artículo en el *Código Terrestre* era más amplio y que debería ser propuesto para su uso en este artículo del *Código Acuático*. El Grupo también aceptó que la nota explicativa que hacía referencia a la morbilidad era susceptible de crear confusión y que ya no era necesaria.

No. A. 2. Este artículo corresponde al punto 3. c. del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*. El Grupo adaptó la redacción de este punto con la del punto A.1 del Artículo 1.2.2. El Grupo decidió después de la revisión de las notas explicativas que considerar los aspectos ecológicos de las repercusiones de la enfermedad era de un gran valor dado el amplio mandato de la OIE. Como el término ‘ecológico’ también engloba los factores medioambientales, el Grupo no consideró apropiado añadir ‘medioambiental’ como ocurría anteriormente en la nota explicativa. La nota explicativa fue considerada innecesaria dado los cambios en el artículo.

No. A. 3. Este artículo corresponde al punto 3. a. del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*. El Grupo observó que este artículo no incorporaba el concepto de gravedad de las consecuencias, que el Grupo consideraba importante. El Grupo examinó el uso del artículo correspondiente en el *Código Terrestre* y recomendó utilizar la misma formulación en el *Código Acuático*.

No. B. 4. Este artículo no tiene equivalencia en el *Código Terrestre*. El Grupo convino que este artículo ya no era necesario ya que la definición de ‘enfermedad’ en el glosario del *Código Acuático* especificaba una etiología infecciosa.

No. B. 5. Este artículo no tiene equivalencia en el *Código Terrestre*. El Grupo convino que este Artículo no era apropiado ya que una enfermedad con una etiología infecciosa sospechosa sería notificada como una enfermedad emergente (como se define en el glosario del *Código Acuático*).

No. B. 6. Este artículo corresponde al punto 1 del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*. El Grupo indicó cuando debatió sobre este punto que, en vista de la supresión, por parte de la Comisión del Código, del artículo sobre las enfermedades emergentes en este capítulo, la formulación actual ya no era apropiada. El Grupo acordó que el uso de la misma formulación utilizada en el *Código Terrestre* sería apropiado y que la información en la nota no era necesaria.

No. B. 7. Este artículo corresponde al punto 2 del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*. El uso del término ‘zona’ en este contexto fue explicado como abarcando los cuerpos de agua en un país, así como aquellos compartidos por varios países. El Grupo convino en que la Autoridad Competente de al menos un país tendría que proponer ‘libre’, ya que el término ‘varios países’ no está definido, y si un solo país está libre, entonces este estatus es digno de protección. El Grupo también comentó que el requisito mínimo en el *Código Terrestre* era la condición importante. Si un país podía ser libre, otros podrían tomar medidas para lograr ese mismo estatus y ser alentados a hacerlo. Por estas razones, el Grupo acordó armonizar el texto con el que se utilizó en el punto 2 del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre* y eliminar el texto explicativo.

No. C. 8. Este artículo corresponde al punto 4 del Artículo 1.2.2. del *Código Terrestre*. El Grupo examinó los términos ‘fiable y asequible’ en relación con las pruebas de diagnóstico. El término ‘fiable’ se utiliza a menudo en relación a la eficacia de las pruebas de laboratorio. El Grupo acordó que este término podría ser utilizado aquí con alguna información sobre los criterios que se pueden aplicar al seleccionar una prueba. El Grupo examinó las notas explicativas de este artículo y acordó que el capítulo correspondiente del *Manual Acuático*, Capítulo 1.1.2, debía proporcionar esa información para ser aplicada por los Miembros. Se acordó además que este estaría mejor situado en la Introducción, bajo el Artículo 1.2.1. Como consecuencia de estos cambios, se explicó que la formulación del artículo equivalente en el *Código Terrestre*, que incluye la especificación de la necesidad de definir el término caso en la nota explicativa, sería conveniente para el *Código Acuático* también. La nota explicativa fue suprimida.

Reorganización de los puntos del Artículo 1.2.2 del *Código Acuático*: Por la misma razón que fue necesaria la reorganización de estos puntos en el Código Terrestre, y por una cuestión de armonización, se llevó a cabo la reorganización del Artículo 1.2.2 revisado, como se muestra en el Anexo VII (con marcas de revisión) y en el Anexo VIII (versión limpia con todos los cambios propuestos aceptados).

Anexo 26 (cont.)Código Terrestre: Artículo 1.2.3.

Aunque no se aportaron cambios al texto, el Grupo convino que era conveniente pedir a la Comisión del Código que considerara la división del Artículo 1.2.3. del *Código Terrestre*, que incluye todas las enfermedades que figuran actualmente en el *Código Terrestre*, en un capítulo aparte. Esto se ha hecho en el *Código Acuático*. El contenido del Capítulo 1.3 es la lista de enfermedades. El Grupo consideró que podría haber ventajas en este enfoque, ya que un cambio propuesto a la lista de enfermedades del *Código Terrestre* afectaría sólo a la lista sin tener que abrir los criterios para una revisión innecesaria.

2. Evaluar la necesidad de perfilar la definición de las obligaciones de notificación de las enfermedades emergentes de los Países Miembros

El Grupo solicitó que se precisara lo que la OIE estaba buscando al poner este ítem en el temario. La Dra. Cáceres presentó la situación actual relacionada con la *notificación de las enfermedades emergentes*, y un diagrama que describía el Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS). Se informó al Grupo de que, una vez que se declaraba endémica o estable una *enfermedad emergente*, ya no era necesario que el país proporcionase más información a la OIE sobre la enfermedad. ¿Es necesario modificar el punto 1.1.4 del *Código Terrestre* para facilitar la notificación continua de información sobre estas enfermedades?

El Grupo examinó las disposiciones del Artículo 1.1.4 del *Código Terrestre* relativas a la *notificación de las enfermedades emergentes*. El Grupo acordó que la frase en el punto 2 del Artículo 1.1.4. 'descrita en el punto 1', era innecesaria y con pocas referencias. El Grupo propuso su supresión.

Se sugirió que en el punto 2 del Artículo 1.1.4. se podría definir un período específico durante el cual se pediría a los países seguir enviando informes. Eso sería interrumpido si se proponía la inscripción de la enfermedad o si la enfermedad se volvía suficientemente estable. El Grupo examinó este punto en relación con el beneficio que se podría obtener con los informes adicionales. El Grupo acordó que los criterios existentes para la notificación garantizaban que la situación en un país estaba claramente descrita para otros Miembros. Además, los criterios existentes permitían volver a la notificación de la enfermedad siempre que se dieran las condiciones adecuadas, por lo que no era necesario definir un período específico. La conclusión del debate fue, sin embargo, que era necesario que la información fuese fiable hasta que una enfermedad fuese suficientemente estable, o hubiese sido erradicada. El Grupo acordó incorporar la frase "el tiempo necesario para tener la certeza razonable de que" en la primera oración del punto 2 del Artículo 1.1.4. por tal motivo y modificar la puntuación de los puntos a., b. y c. para aclarar que la notificación debía continuar hasta que la enfermedad hubiese sido erradicada o se volviese suficientemente estable en el país, o hasta que hubiese sido evaluada para su inscripción en la lista. El Grupo convino que determinar si una enfermedad era emergente y si cumplía uno de los dos primeros de estos criterios para interrumpir la notificación era responsabilidad del Delegado del País Miembro.

El Grupo consideró si el sistema WAHIS/WAHID facilitaba la notificación en línea con los requisitos de los Artículos 1.1.3 y 1.1.6. del *Código Terrestre*. Después de la discusión, se acordó que el sistema actual no ayudaba a los países a suministrar los datos que se exigían en el punto 4 del Artículo 1.1.3. Además, el nivel de detalle requerido en WAHIS no se reflejaba en los requisitos de notificación obligatorios del Artículo 1.1.3.

El Grupo recomendó que la OIE considerase la designación de un Grupo *ad hoc* para perfeccionar WAHIS y el Artículo 1.1.3. del *Código Terrestre* a fin de definir claramente el nivel de datos obligatorio que se esperaba en los informes por parte de los Miembros. El Grupo acordó que este Grupo *ad hoc* también debía considerar modificaciones en el sistema WAHIS para facilitar la notificación de manera apropiada. Esto debía incluir la facilitación de la notificación de las enfermedades no inscritas (incluyendo las que se hayan retirado de la lista) como lo estipula el Artículo 1.1.6 que los Miembros consideren que sería de utilidad para los otros Miembros y también debía ser coherente con las obligaciones de los Miembros en virtud del Artículo 1.1.4.

3. En caso de cambios propuestos significativos en los criterios, analizar y comentar los resultados de los últimos Grupos ad hoc sobre algunas enfermedades emergentes (por ejemplo, DEP, MERS, Schmallerberg)

El Grupo analizó los nuevos criterios propuestos para la inscripción de las enfermedades y convino en que los cambios que recomendaba pretendían aclarar los criterios ya existentes. Como no hubo grandes modificaciones propuestas, no se solicitó al Grupo, bajo su mandato, revisar los informes sobre enfermedades emergentes como DEP, MERS y Schmallerberg.

4. Analizar las nuevas enfermedades emergentes como la enfermedad del Ébola y las consecuencias para el envío de información sanitaria

La Dra. Marija Popovic, Comisionada del Departamento de información y análisis de la sanidad animal mundial, dio una breve reseña sobre la evolución de la notificación voluntaria de las enfermedades de la fauna silvestre no inscritas en la lista de la OIE utilizando el cuestionario de hoja de cálculo y, más tarde, la plataforma WAHIS–Wild. La Dra. Popovic señaló que la enfermedad del Ébola se clasificaba en la enfermedad “infección por filovirus” y esto incluía el virus de Marburgo. La notificación fue desarrollada para ofrecer a los Países Miembros un sistema de alerta temprana debido a que las enfermedades involucradas tenían repercusiones en la sanidad del ganado, la salud humana, la conservación de la fauna silvestre, la biodiversidad y la integridad medioambiental.

La Dra. Popovic comentó que, hasta el momento, no se habían recibido datos cuantitativos sobre la enfermedad del Ébola por parte de ningún País Miembro. La OIE hizo el seguimiento de una información que no tenía carácter oficial en el último trimestre de 2014 con respecto a cerdos domésticos afectados por la enfermedad del Ébola, pero el País Miembro respectivo comunicó que la información era incorrecta.

El Grupo evaluó de manera crítica las consecuencias de la notificación en cuanto a las nuevas enfermedades emergentes por parte de los Miembros. Con respecto a la enfermedad del Ébola, como se especifica en el mandato, el Grupo acordó que no era competente para evaluar la enfermedad (infección por filovirus). El Grupo consideró entonces si la inscripción sería de valor para los Miembros si se pudiera considerar que la enfermedad del Ébola cumple con los criterios de inscripción modificados.

El Grupo reconoció que la enfermedad del Ébola era una enfermedad importante por sus repercusiones potenciales en la salud humana. Sin embargo, debía ser considerada en el marco del Artículo 1.2.1 teniendo en mente su inscripción en la lista. Si la inscripción y la consiguiente notificación obligatoria de información de una determinada enfermedad facilitaban la adopción de medidas apropiadas por parte de los Miembros para prevenir la propagación transfronteriza de esa enfermedad, entonces la inscripción era coherente con la misión de la OIE. El Grupo convino que para la enfermedad del Ébola resultaba difícil imaginar cómo la inscripción permitiría lograr ese resultado. El Grupo reconoció que esta situación ilustraba lo importante que era no aplicar los criterios de inscripción a una enfermedad sin tener en cuenta el contexto general de la misión de la OIE en materia de notificación oficial, especialmente en lo contemplado en el Artículo 1.2.1. revisado. Los Países Miembros en los que la enfermedad del Ébola estaba presente pueden, sin embargo, proporcionar informes ya que la enfermedad podía ser considerada como una enfermedad emergente o la notificación voluntaria podía ser contemplada en el Artículo 1.1.6 como un evento importante en la sanidad animal. El Grupo estuvo de acuerdo en que se debía alentar a los Países Miembros a notificar la presencia de la enfermedad del Ébola.

5. Considerar la supresión, en el informe anual, de la notificación de enfermedades que no figuran en la lista de la OIE (Artículo 1.1.3 punto 4) y considerar reemplazarla por la información sobre las enfermedades emergentes declaradas endémicas (Artículo 1.1.4).

El Grupo comentó el punto 4 del Artículo 1.1.3 del *Código Terrestre* relativo a la notificación de enfermedades, infecciones e infestaciones, y suministro de información epidemiológica relacionada especialmente con el informe anual.

La Dra. Cáceres informó brevemente al Grupo sobre el contenido actual del informe anual.

El Grupo debatió sobre las enfermedades que no están inscritas en la lista de la OIE y que figuran en el informe anual. El Grupo convino en que la información que se solicitaba en el informe anual sobre las enfermedades que no están inscritas en la lista de la OIE no estaba contemplada en el punto 4 del Artículo 1.1.3. La discusión llevó a considerar la utilidad de esta información para los Miembros, basándose en lo enunciado por los asesores de la OIE presentes que estimaban que los informes rara vez eran consultados por los Miembros. El Grupo acordó que ya no era apropiado incluir estas enfermedades en WAHIS y sugirió que el formulario WAHIS fuese modificado para reflejar esto.

Anexo 26 (cont.)

El Grupo acordó que el sistema WAHIS de recopilación de información sobre las enfermedades debía ser flexible, facilitando la entrada de información en el formulario de notificación que los Miembros consideren de utilidad para otros Miembros, y reiteró que este no era el caso en la actualidad. El Grupo acordó que permitir la entrada de texto libre en un cuadro "otros comentarios" podría también animar a los Países Miembros a proporcionar información de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 1.1.6. El Grupo tomó en cuenta la sugerencia de que la OIE debería alentar a los Miembros a proporcionar datos sobre las enfermedades emergentes, dando acceso a un área específica en el sitio web de la OIE, donde se encuentra la lista de las enfermedades emergentes. Sin estar contemplado en su mandato, el Grupo examinó este punto y consideró que su utilidad podía ser evaluada por el Grupo *ad hoc* propuesto para el sistema WAHIS, si era designado por la OIE.

El Grupo acordó que la recopilación oficial de datos debía centrarse en las enfermedades inscritas en la lista de la OIE y en las *enfermedades emergentes*. Se reiteraron las recomendaciones anteriores del Grupo sobre la designación de un Grupo *ad hoc* para examinar los sistemas WAHIS y WAHID.

6. Otras cuestiones

El Grupo examinó las definiciones de *enfermedad emergente* en los *Códigos Terrestre y Acuático*. El Grupo convino que, si bien era mejor para los Miembros contar con definiciones coherentes, no disponía de antecedentes suficientes para considerar si había razones que justificaran las diferencias en las definiciones. El Grupo sugirió que ambas Comisiones del Código trabajaran conjuntamente para evaluar si era posible y de qué forma se podía armonizar la definición de 'enfermedad emergente' en los dos Códigos.

7. Finalización y adopción del proyecto de informe

El Grupo finalizó y adoptó el proyecto de informe.

.../Anexos

Anexo 26 (cont.)

Anexo I

GRUPO AD HOC SOBRE NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES ANIMALES Y AGENTES PATÓGENOS**París, 6-8 de enero de 2015****Lista de participantes****MIEMBROS****Dr. Alexandre Fediaevsky**

Jefe adjunto de la Oficina de Sanidad Animal
 Direction générale de l'Alimentation
 Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de
 la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement
 du Territoire
 251 rue de Vaugirard
 75732 Paris Cedex 15
 FRANCE
 Tel: +33 1 49 55 84 57
 Fax : +33 1 49 55 51 06
 Email:
 alexandre.fediaevsky@agriculture.gouv.fr

Dr. Akemi Kamakawa

Punto focal para la notificación de
 enfermedades animales
 Director adjunto
 Animal Health Division
 Food Safety and Consumer Affairs Bureau
 Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
 (MAFF)
 1-2-1 Kasumigaseki Chiyoda-ku
 Tokyo 100-8950
 JAPAN
 Tel.: +81 3 3502 8295
 Email: akemi_kamakawa@nm.maff.go.jp

Dr. Mounir Khayli

Servicio de epidemiología y seguimiento
 sanitario
 Office National de Sécurité Sanitaire des
 Produits Alimentaires
 B.P. 6472
 Rabat-Instituts
 MOROCCO
 Tel: +212 0537 77 50 25
 Fax: +212 0537 68 20 49
 Email: mounir.khayli@onssa.gov.ma
 mounir.khayli@gmail.com

Dra. Patricia Lagarmilla

Asesora técnica de la Dirección General de los
 Servicios Ganaderos (DGSG)
 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
 Unidad de Epidemiología
 Constituyente 1476
 Piso 2
 Montevideo CP 11200
 URUGUAY
 Tel: +598 99 819 105
 Email: plagarmilla@mgap.gub.uy

Dr. Wycliffe Murekefu

Punto focal para la notificación de enfermedades
 animales
 Assistant Director of Veterinary Services
 Veterinary Services
 Ministry of Livestock Development
 Private bag 00625
 Kangemi
 KENYA
 Tel: +254 722 895983
 Email: wmurekefu@yahoo.com

Dr. Alexander Panin

FGU The All-Russian State Centre for
 Quality and Standardisation of Veterinary Drugs and
 Feed (VGNKI)
 OIE Collaborating Centre
 5 Zvenigorodskoye Shosse
 123022 Moscow
 RUSSIA
 Tel.: +7-095 253.14.91
 Fax: +7-095 253.14.91
 E-mail: vgnki@vgnki.ru

Dr. Francisco Javier Reviriego Gordejo

Jefe de Sector
 Health & Consumers Directorate-General
 DG SANCO/D1
 European Commission
 Rue Froissart 101-3/72
 1040 Brussels
 BELGIUM
 Tel.: +32-2 298 47 99
 Fax : +32-2 295 31 44
 Email:
 francisco.reviriego-gordejo@ec.europa.eu

Dr. Allan Sheridan

Australian Government Department of
 Agriculture
 GPO Box 858
 Canberra ACT 2601
 AUSTRALIA
 Tel.: +61 2 6272 5291
 Fax: +61 2 6272 3359
 Email: allan.sheridan@agriculture.gov.au

Dra. Toni Tana

Asesor sénior en vigilancia animal
 Ministry for Primary Industries
 PO Box 2526
 Wellington 6120
 NEW ZEALAND
 Tel: +64 4 894 0540
 Fax: +64-4-8940736
 Email: toni.tana@mpi.govt.nz

OBSERVADORES

Dr. Etienne Bonbon, Vicepresidente de la
 Comisión de Normas Sanitarias para los
 Animales Terrestres (Comisión del Código
 Terrestre)
 Conseiller scientifique
 European External Action Service (EEAS)
 12 Avenue d'Eylau
 75116 Paris
 FRANCE
 Tel: +33 (0)144053168
 Fax: +33 (0)144053179
 Email: etienne.bonbon@eeas.europa.eu

Dr. Franck Berthe, Presidente de la Comisión
 de Normas Sanitarias para los Animales
 Acuáticos (Comisión para los Animales
 Acuáticos)
 Senior Scientific Officer
 Animal Health and Animal Welfare unit
 European Food Safety Authority
 Head Animal Health and Plan Health
 Via Carlo Magno 1
 Parma
 ITALY
 Tel: +39 0521 036 870
 Fax: +39 0521 036 970
 Email: franck.berthe@efsa.europa.eu

Prof. Thomas C. Mettenleiter, Miembro de la
 Comisión científica para las enfermedades de
 los animales, SCAD (Comisión Científica)
 Federal Research Institute for Animal Health
 Friedrich-Loeffler-Institute
 Südufer 10
 17493 Greifswald
 Insel Riems
 GERMANY
 Tel: +493835171102
 Fax: +4938351 71151
 Email: thomas.mettenleiter@fli.bund.de

Anexo 26 (cont.)

Anexo I (cont.)

SEDE DE LA OIE

Dr. Bernard Vallat

Director General
12 rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Tel : 33 - (0)1 44 15 18 88
Fax: 33 - (0)1 42 67 09 87
E-mail: oie@oie.int

Dra. Elisabeth Erlacher-Vindel

Jefa adjunta de Departamento
Departamento científico y técnico
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: e.erlacher-vindel@oie.int

Dr. Gregorio José Torres Penalver

Comisionado
Departamento científico y técnico
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: g.torres@oie.int

Dra. Paula Cáceres

Jefa de Departamento
Departamento de información y análisis de la
sanidad animal mundial
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: p.caceres@oie.int

Dr. Neo Mapitse

Jefe adjunto de Departamento
Departamento de información y análisis de la
sanidad animal mundial
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: n.mapitse@oie.int

Dra. Marija Popovic

Comisionada
Departamento de información y análisis de la
sanidad animal mundial
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: m.popovic@oie.int

Dr. Alex Thiermann

Asesor del DG y Presidente de la Comisión del
Código Sanitario para los Animales Terrestres
Dirección General
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: a.thiermann@oie.int

Dra. Gillian Mylrea

Jefa adjunta de Departamento
Departamento de comercio internacional
12, rue de Prony
75017 Paris
FRANCE
Email: g.mylrea@oie.int

Anexo 26 (cont.)

Anexo II

GRUPO AD HOC SOBRE NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES ANIMALES Y AGENTES PATÓGENOS

París, 6-8 de enero de 2015

Mandato

Se ruega al Grupo *ad hoc*:

- 1) Sobre la base del Capítulo 1.2 del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* y del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* de la OIE, que asista a la OIE en los siguientes puntos:
 - a) Examinar y evaluar los criterios para la inscripción de enfermedades, infecciones e infestaciones en la lista de la OIE.
 - b) Evaluar la necesidad de perfilar la definición de las obligaciones de notificación de los Países Miembros para las enfermedades emergentes y la modificación de las obligaciones de notificación cuando una enfermedad emergente se vuelve endémica.
 - c) En caso de cambios propuestos significativos en los criterios, analizar y comentar los resultados de los últimos Grupos *ad hoc* sobre algunas enfermedades emergentes (por ejemplo, DEP, MERS, Schmallenberg).
 - d) Analizar las nuevas enfermedades emergentes como la enfermedad del Ébola y las consecuencias para el envío de información sanitaria.
- 2) Sobre la base del Capítulo 1.1 modificado y adoptado durante la Asamblea Mundial de la OIE de mayo de 2014, asistir a la OIE en el siguiente punto:
 - a) Considerar la supresión, en el informe anual, de la notificación de enfermedades que no figuran en la lista de la OIE (Artículo 1.1.3 punto 4) y considerar reemplazarla por la información sobre las enfermedades emergentes declaradas endémicas (Artículo 1.1.4).
- 3) Otras cuestiones

Anexo 26 (cont.)

Anexo III

GRUPO AD HOC SOBRE NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES ANIMALES Y AGENTES PATÓGENOS

París, 6-8 de enero de 2015

Temario

1. Bienvenida
 2. Designación del presidente y del relator
 3. Mandato para la reunión del Grupo *ad hoc*
 - 3.1. Examinar y evaluar los criterios para la inscripción de enfermedades, infecciones e infestaciones en la lista de la OIE.
 - 3.2. Evaluar la necesidad de perfilar la definición de las obligaciones de notificación de los Países Miembros para las enfermedades emergentes y la modificación de las obligaciones de notificación cuando una enfermedad emergente se vuelve endémica.
 - 3.3. En caso de cambios propuestos significativos en los criterios, analizar y comentar los resultados de los últimos Grupos *ad hoc* sobre algunas enfermedades emergentes (por ejemplo, DEP, MERS, Schmallenberg).
 - 3.4. Analizar las nuevas enfermedades emergentes como la enfermedad del Ébola y las consecuencias para la notificación de información sanitaria.
 - 3.5. Considerar la supresión, en el informe anual, de la notificación de enfermedades que no figuran en la lista de la OIE (Artículo 1.1.3 punto 4) y considerar reemplazarla por la información sobre las enfermedades emergentes declaradas endémicas (Artículo 1.1.4).
 4. Otras cuestiones
 5. Finalización y adopción del proyecto de informe
-

CAPÍTULO 1.1.

NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES, INFECCIONES E INFESTACIONES, Y PRESENTACIÓN DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Artículo 1.1.1.

A efectos del *Código terrestre* y de conformidad con los Artículos 5, 9 y 10 de los Estatutos Orgánicos de la OIE, todos los Países miembros reconocen a la Sede el derecho de comunicarse directamente con la *Autoridad veterinaria* de su o de sus territorios.

Cualquier *notificación* o cualquier información enviada por la OIE a la *Autoridad veterinaria* se considerará enviada al Estado al que pertenezca la misma y cualquier *notificación* o cualquier información enviada a la OIE por la *Autoridad veterinaria* se considerará enviada por el Estado al que pertenezca la misma.

Artículo 1.1.2.

- 1) Los Países miembros pondrán a disposición de los demás Países miembros, por mediación de la OIE, la información necesaria para detener la propagación de las *enfermedades* animales importantes y de sus agentes etiológicos y permitir un mejor control de dichas *enfermedades* a nivel mundial.
- 2) Para ello, los Países miembros aplicarán lo dispuesto en los Artículos 1.1.3. y 1.1.4.
- 3) Para que la información transmitida a la OIE sea clara y concisa, los Países miembros deberán atenerse con la mayor exactitud posible al modelo oficial de declaración de *enfermedades* de la OIE.
- 4) Deberá declararse la detección del agente etiológico de una *enfermedad de la lista de la OIE* en un *animal* incluso en ausencia de signos clínicos. Considerando que los conocimientos científicos sobre la relación entre las *enfermedades* y sus agentes etiológicos están en constante evolución y que la presencia de un agente etiológico no implica necesariamente la presencia de una *enfermedad*, los Países miembros velarán por que sus informes se atengan al espíritu y objeto del punto 1 arriba citado.
- 5) Además de las *notificaciones* enviadas en aplicación de los Artículos 1.1.3. y 1.1.4., los Países miembros proporcionarán información sobre las medidas adoptadas para prevenir la propagación de *enfermedades*, *infecciones* e *infestaciones*. Esa información podrá versar sobre las medidas de cuarentena y restricciones en materia de circulación de *animales*, productos de origen animal, productos biológicos y objetos que, por su índole, pudieran ser responsables de la transmisión de aquellas. En el caso de *enfermedades* transmitidas por *vectores*, se indicarán también las medidas adoptadas para controlarlos.

Artículo 1.1.3.

Las *Autoridades veterinarias* deberán enviar, bajo la responsabilidad del Delegado, a la Sede:

- 1) de acuerdo con las debidas disposiciones de los capítulos específicos de *enfermedades*, una *notificación* a través del Sistema mundial de información zoonosanitaria, o por fax o correo electrónico, en el plazo de 24 horas, de:
 - a) la aparición por primera vez de una *enfermedad*, *infección* o *infestación* de la lista de la OIE en un país, una *zona* o un *compartimento*;
 - b) la reaparición de una *enfermedad*, *infección* o *infestación* de la lista de la OIE en un país, una *zona* o un *compartimento* después de haberse declarado en el informe final que se había extinguido el *brote*;
 - c) la aparición por primera vez de cualquier cepa nueva de un agente patógeno de una *enfermedad*, *infección* o *infestación* de la lista de la OIE en un país, una *zona* o un *compartimento*;

Anexo 26 (cont.)Anexo IV (cont.)

- d) el cambio repentino e inesperado de la distribución o el aumento de la incidencia, la virulencia, la morbilidad o la mortalidad causadas por el agente etiológico de una *enfermedad, infección o infestación de la lista de la OIE* presente en un país, una *zona* o un *compartimento*;
 - e) la aparición de una *enfermedad, infección o infestación de la lista de la OIE* en una especie hospedadora inusual.
- 2) informes semanales consecutivos a la *notificación* enviada en aplicación del punto 1 anterior, para suministrar información adicional sobre la evolución del episodio que justificó la *notificación*; estos informes deberán seguir enviándose hasta que se haya erradicado la *enfermedad, infección o infestación* o la situación se haya tornado suficientemente estable, momento a partir del cual el país cumplirá sus obligaciones con la OIE enviando los informes semestrales mencionados en el punto 3; en cualquier caso, deberá enviarse un informe final sobre cada episodio notificado;
 - 3) informes semestrales sobre la ausencia o la presencia y la evolución de las *enfermedades, infecciones o infestaciones de la lista de la OIE*, e información que, desde el punto de vista epidemiológico, sea importante para los demás Países miembros;
 - 4) informes anuales relativos a cualquier información importante para los demás Países miembros.

Artículo 1.1.4.

Las *Autoridades veterinarias*, bajo la responsabilidad del Delegado, deberán enviar a la Sede:

- 1) una *notificación* a través de WAHIS o por fax o correo electrónico cuando se haya detectado una enfermedad emergente en un país, una *zona* o un *compartimento*;
- 2) informes periódicos tras la *notificación* de una *enfermedad emergente*. ~~descrita en el punto 1; los informes deberán seguir enviándose hasta que:~~ Los informes deberán seguir enviándose hasta el tiempo necesario para tener la certeza razonable de que:
 - a) se haya erradicado la *enfermedad, infección o infestación*, o
 - b) la situación se haya tornado suficientemente estable,
o hasta que
 - c) se disponga de información científica suficiente para determinar si la enfermedad reúne los criterios de inscripción en la lista.

Artículo 1.1.5.

- 1) La *Autoridad veterinaria* de un país en el que esté ubicada una *zona infectada* avisará a la Sede tan pronto como dicha *zona* quede liberada de la *enfermedad, infección o infestación*.
- 2) Una *zona infectada* por una *enfermedad, infección e infestación* determinada podrá considerarse liberada de la misma cuando haya transcurrido, después de la declaración del último caso, un período de tiempo superior al *período de infecciosidad* indicado en el *Código terrestre* y se hayan adoptado todas las medidas de profilaxis y las medidas zoonosanitarias adecuadas para prevenir su reaparición o su propagación. La descripción detallada de estas medidas figura en los diferentes capítulos del volumen II del *Código terrestre*.
- 3) Podrá considerarse que un País miembro está de nuevo libre de una *enfermedad, infección e infestación* determinada cuando reúna las debidas condiciones previstas en el *Código terrestre*.
- 4) La *Autoridad veterinaria* de un País miembro que establezca una o varias *zonas libres* deberá notificarlo a la Sede, facilitando los datos necesarios, entre los cuales deberán figurar los criterios sobre los que se basa el establecimiento del estatus de *zona libre* y las condiciones para mantenerlo, e indicando con claridad la ubicación de las *zonas* en un mapa del territorio del País miembro.

Anexo 26 (cont.)

Anexo IV (cont.)

Artículo 1.1.6.

- 1) Aunque los Países miembros sólo tendrán la obligación de notificar las *enfermedades, infecciones o infestaciones de la lista de la OIE* y las *enfermedades emergentes*, se les invita a informar a la OIE de cualesquiera otros episodios zoonosarios significativos.
 - 2) La *Sede* deberá comunicar a las *Autoridades veterinarias* por correo electrónico o a través de la base de datos del Sistema mundial de información zoonosaria (WAHID) cuantas *notificaciones* reciba en aplicación de los Artículos 1.1.2. a 1.1.5., así como cualquier otra información pertinente.
-

Anexo 26 (cont.)Anexo V

CAPÍTULO 1.1.

**NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES
Y APORTACIÓN DE DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Artículo 1.1.1.

A efectos del *Código acuático* y de conformidad con los Artículos 5, 9 y 10 de los Estatutos orgánicos de la OIE, todos los Países miembros reconocen a la Sede el derecho de comunicarse directamente con la *Autoridad competente* de su o sus territorios.

Cualquier *notificación* o información enviada por la OIE a una *Autoridad competente* se considerará enviada al Estado al que ésta pertenece y cualquier *notificación* o información enviada a la OIE por una *Autoridad competente* se considerará enviada por el Estado al que ésta pertenece.

Artículo 1.1.2.

- 1) Los Países miembros pondrán a disposición de los demás Países miembros, por mediación de la OIE, la información necesaria para impedir la propagación de *enfermedades* de los *animales acuáticos* importantes y de sus *agentes patógenos* y para facilitar su control a nivel mundial.
- 2) Con dicho fin, los Países miembros aplicarán lo dispuesto en los Artículos 1.1.3. y 1.1.4.
- 3) Para que la información transmitida a la OIE sea clara y concisa, los Países miembros deberán atenerse con la mayor exactitud posible al modelo oficial de declaración de *enfermedades* de la OIE.
- 4) La detección del *agente patógeno* de una *enfermedad de la lista de la OIE* en un *animal acuático* deberá notificarse incluso en ausencia de signos clínicos. Considerando que los conocimientos científicos sobre la relación entre *agentes patógenos* y la *enfermedad* clínica están en constante evolución y que la presencia de un agente infeccioso no implica necesariamente la presencia clínica de una *enfermedad*, los Países miembros velarán por que sus informes se atengan al espíritu y objeto del punto 1 arriba citado.
- 5) Además de las *notificaciones* enviadas en aplicación de los Artículos 1.1.3. y 1.1.4., los Países miembros deberán proporcionar información sobre las medidas adoptadas para prevenir la propagación de las *enfermedades*; esa información podrá incluir medidas de *cuarentena* y restricciones al movimiento de *animales acuáticos*, *productos de animales acuáticos*, *productos biológicos* y objetos diversos que, por su índole, pudieran ser responsables de la transmisión de *enfermedades*. En el caso de *enfermedades* transmitidas por vectores, se deberán indicar también las medidas adoptadas para controlarlos.

Artículo 1.1.3.

Las *Autoridades competentes*, bajo la responsabilidad del Delegado, deberán enviar a la Sede:

- 1) de acuerdo con las debidas disposiciones de los capítulos específicos de enfermedades, una notificación a través del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHIS) o por fax o correo electrónico en el plazo de 24 horas, de:
 - a) la aparición por primera vez de una enfermedad de la lista de la OIE en un país, una zona o un compartimento;
 - b) la reaparición de una enfermedad de la lista de la OIE en un país, una zona o un compartimento después de haberse declarado en el informe final que se había extinguido el brote;
 - c) la aparición por primera vez de cualquier cepa nueva de un agente patógeno de una enfermedad de la lista de la OIE en un país, una zona o un compartimento;

Anexo 26 (cont.)Anexo V (cont.)

- d) el cambio repentino e inesperado de la distribución o el aumento de la incidencia, la virulencia, la morbilidad o la mortalidad causadas por el agente patógeno de una enfermedad de la lista de la OIE que prevalece en un país, una zona o un compartimento;
- e) la aparición por primera vez de una enfermedad de la lista de la OIE en una nueva especie hospedadora.

Para decidir si un hallazgo justifica una notificación inmediata (en el plazo de 24 horas), los Países miembros deberán guiarse por el afán de respetar las obligaciones definidas en los Capítulos 5.1. y 5.2. (en particular en el Artículo 5.1.1.) para notificar los cambios que pueden tener repercusiones en el comercio internacional;

- 2) informes semanales consecutivos a la notificación enviada en aplicación del punto 1 anterior para suministrar información adicional sobre la evolución del episodio que justificó la notificación; estos informes deberán seguir enviándose hasta que se haya erradicado la enfermedad o la situación se haya tornado suficientemente estable, momento a partir del cual el País miembro cumplirá con sus obligaciones con la OIE enviando los informes semestrales mencionados en el punto 3; en cualquier caso, deberá enviarse un informe final sobre cada episodio notificado;
- 3) informes semestrales sobre la ausencia o la presencia y la evolución de enfermedades de la lista de la OIE, así como sobre hallazgos relativos a otras enfermedades que revisten interés epidemiológico para los demás Países miembros;
- 4) informes anuales relativos a cualquier información importante para los demás Países miembros.

Artículo 1.1.4.

Las *Autoridades veterinarias*, bajo la responsabilidad del Delegado, deberán enviar a la *Sede*:

- 1) una notificación a través de WAHIS o por fax o correo electrónico cuando se haya detectado una enfermedad emergente en un país, una zona o un compartimento;
- 2) informes periódicos tras la *notificación* de una *enfermedad emergente*. ~~descrita en el punto 1; los informes deberán seguir enviándose hasta que:~~ Los informes deberán seguir enviándose hasta el tiempo necesario para tener la certeza razonable de que:
 - a) se haya erradicado la *enfermedad, infección o infestación*, o
 - b) la situación se haya tornado suficientemente estable,
o hasta que
 - c) se disponga de información científica suficiente para determinar si la enfermedad reúne los criterios de inscripción en la lista.

Artículo 1.1.5.

- 1) La *Autoridad competente* de un país en el que está ubicada una zona infectada o un compartimento infectado avisará a la *Sede* tan pronto como dicha zona o dicho compartimento quede libre de la enfermedad.
- 2) Una zona infectada o un compartimento infectado por una enfermedad determinada podrá considerarse libre de la misma cuando haya transcurrido, después de la declaración del último caso, un período de tiempo superior al período de infecciosidad indicado en el *Código acuático* y se hayan adoptado todas las medidas de profilaxis y las medidas zoonosanitarias en los animales acuáticos adecuadas para prevenir su reaparición o su propagación. La descripción detallada de estas medidas figura en los diferentes capítulos de enfermedades del *Código acuático*.
- 3) Podrá considerarse que un País miembro está de nuevo libre de una enfermedad determinada cuando reúna las debidas condiciones previstas en el *Código acuático*.
- 4) La *Autoridad competente* de un País miembro que establezca una o varias zonas libres o un o varios compartimentos libres deberá notificarlo a la *Sede* facilitando los datos necesarios, entre los cuales deberán figurar los criterios sobre los que se basa el establecimiento del estatus libre y las condiciones para mantenerlo e indicando con claridad la ubicación de las zonas o los compartimentos en un mapa del territorio del País miembro.

Anexo 26 (cont.)

Anexo V (cont.)

Artículo 1.1.6.

- 1) Aunque los Países miembros sólo tendrán la obligación de notificar las enfermedades de la lista de la OIE y las enfermedades emergentes, se les invita a informar a la OIE de cualesquiera otros episodios zoonosarios significativos en los animales acuáticos.
 - 2) La Sede deberá comunicar a las Autoridades competentes por correo electrónico o a través de la base de datos del Sistema mundial de información zoonosaria (WAHID) cuantas notificaciones reciba en aplicación de los Artículos 1.1.2. a 1.1.5., así como cualquier otra información pertinente.
-

Anexo 26Anexo VI

CAPÍTULO 1.2.

**CRITERIOS DE INSCRIPCIÓN DE ENFERMEDADES,
INFECCIONES E INFESTACIONES
EN LA LISTA DE LA OIE**

Artículo 1.2.1.

Introducción

~~La finalidad del presente capítulo es describir los criterios para la inscripción de~~ Este capítulo describe los criterios para la inscripción de *enfermedades, infecciones e infestaciones* en la lista de la OIE.

El objetivo de la inscripción es apoyar ~~los esfuerzos de los~~ a los Países miembros proporcionándoles la información necesaria para que puedan tomar las medidas apropiadas en la prevención de la propagación transfronteriza de *enfermedades animales, zoonosis incluidas*. Esto se logra gracias a una notificación transparente, oportuna y coherente.

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

Los requisitos de *notificación* figuran en el Capítulo 1.1. ~~las notificaciones deberán presentarse mediante WAHIS o, si no es posible, por fax o correo electrónico en la forma contemplada en el Artículo 1.1.3.~~

Los principios para la selección de las pruebas de diagnóstico se describen en Capítulo 1.1.5 del Manual Terrestre.

Artículo 1.2.2.

Los criterios para inscribir una *enfermedad, infección o infestación* en la lista de la OIE son los siguientes:

1) Se haya demostrado la propagación internacional del agente (a través de *animales vivos* o sus productos, *vectores* o fomites).

Y

2) Al menos un país ha demostrado la ausencia efectiva o eminente de *enfermedad, infección o infestación* en poblaciones de *animales susceptibles*, ~~con base a las disposiciones relativas a la vigilancia zoonosaria del Código terrestre, especialmente las contempladas en el~~ con base en el Capítulo 1.4..

Y

3) Existe un método de detección y diagnóstico fiable y se dispone de una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras enfermedades, infecciones o infestaciones.

Y

~~3.~~ 3.

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

O

b) Se ha demostrado que la *enfermedad* ~~morbilidad o mortalidad significativas en~~ tiene repercusiones importantes en la sanidad de los animales domésticos en un país o zona teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción y la mortalidad.

Anexo 26 (cont.)

Anexo VI (cont.)

O

- c) Se ha demostrado o las pruebas científicas indican que la *enfermedad* puede tener ~~morbilidad o mortalidad significativas en las poblaciones de animales silvestres~~ repercusiones importantes en la sanidad de la fauna silvestre teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción, la mortalidad y las amenazas ecológicas.

∕

4. ~~Existe un método de detección y diagnóstico fiable y se dispone de una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras enfermedades, infecciones o infestaciones.~~

Artículo 1.2.3.

Están inscritas en la lista de la OIE las *enfermedades, infecciones e infestaciones* enumeradas a continuación.

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

- 1) En la categoría de *enfermedades, infecciones e infestaciones* comunes a varias especies están inscritas las siguientes:

- Carbunco bacteridiano
- Lengua azul
- Brucelosis (*Brucella abortus*)
- Brucelosis (*Brucella melitensis*)
- Brucelosis (*Brucella suis*)
- Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo
- Enfermedad hemorrágica epizootica
- Encefalomiелitis equina (del Este)
- Fiebre aftosa
- Cowdriosis
- Infección por el virus de la enfermedad de Aujeszky
- Infección por *Echinococcus granulosus*
- Infección por *Echinococcus multilocularis*
- Infección por el virus de la rabia
- Infección por el virus de la fiebre del Valle del Rift
- Infección por el virus de la peste bovina
- Infección por *Trichinella* spp.
- Encefalitis japonesa
- Miasis por *Cochliomyia hominivorax*
- Miasis por *Chrysomya bezziana*
- Paratuberculosis
- Fiebre Q
- Surra (*Trypanosoma evansi*)
- Tularemia.
- Fiebre del Nilo Occidental

Anexo 26 (cont.)

Anexo VI (cont.)

- 2) En la categoría de las *enfermedades e infecciones* de los bovinos están inscritas las siguientes:
- Anaplasmosis bovina
 - Babesiosis bovina
 - Campilobacteriosis genital bovina
 - Encefalopatía espongiiforme bovina
 - Tuberculosis bovina
 - Diarrea viral bovina
 - Leucosis bovina enzoótica
 - Septicemia hemorrágica
 - Rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis pustular infecciosa
 - Infección por *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (Perineumonía contagiosa bovina)
 - Dermatitis nodular contagiosa
 - Teileriosis
 - Tricomosis
 - Tripanosomosis (transmitida por tsetse)
- 3) En la categoría de las *enfermedades e infecciones* de los ovinos/caprinos están inscritas las siguientes:
- Artritis/encefalitis caprina
 - Agalaxia contagiosa
 - Pleuroneumonía contagiosa caprina
 - Infección por *Chlamydia abortus* (Aborto enzoótico de las ovejas o clamidiosis ovina)
 - Infección por el virus de la peste de pequeños rumiantes
 - Maedi-visna
 - Enfermedad de Nairobi
 - Epididimitis ovina (*Brucella ovis*)
 - Salmonelosis (*S. abortusovis*)
 - Prurigo lumbar
 - Viruela ovina y viruela caprina
- 4) En la categoría de las *enfermedades e infecciones* de los équidos están inscritas las siguientes:
- Metritis contagiosa equina
 - Durina
 - Encefalomiелitis equina (del Oeste)
 - Anemia infecciosa equina
 - Gripe equina
 - Piroplasmosis equina
 - Muermo
 - Infección por el virus de la peste equina
 - Infección por el herpesvirus equino 1 (HVE-1)
 - Infección por el virus de la arteritis equina
 - Encefalomiелitis equina venezolana

Anexo 26 (cont.)Anexo VI (cont.)

- 5) En la categoría de las *enfermedades e infecciones* de los suidos están inscritas las siguientes:
- Peste porcina africana
 - Infección por el virus de la peste porcina clásica
 - Encefalomielitis por virus Nipah
 - Cisticercosis porcina
 - Síndrome disgenésico y respiratorio porcino
 - Gastroenteritis transmisible
- 6) En la categoría de las *enfermedades e infecciones* de las aves están inscritas las siguientes:
- Clamidiosis aviar
 - Bronquitis infecciosa aviar
 - Laringotraqueítis infecciosa aviar
 - Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*)
 - Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma synoviae*)
 - Hepatitis viral del pato
 - Tifosis aviar
 - Infección por virus de influenza aviar
 - Infección por virus de influenza de tipo A de alta patogenicidad en aves que no sean aves de corral incluyendo aves silvestres
 - Infección por virus de enfermedad de Newcastle
 - Bursitis infecciosa (enfermedad de Gumboro)
 - Pulorosis
 - Rinotraqueítis del pavo
- 7) En la categoría de las *enfermedades e infecciones* de los lagomorfos están inscritas las siguientes:
- Mixomatosis
 - Enfermedad hemorrágica del conejo
- 8) En la categoría de las *enfermedades, infecciones e infestaciones* de las abejas están inscritas las siguientes:
- Infección de las abejas melíferas por *Melissococcus plutonius* (Loque europea)
 - Infección de las abejas melíferas por *Paenibacillus larvae* (Loque americana)
 - Infestación de las abejas melíferas por *Acarapis woodi*
 - Infestación de las abejas melíferas por *Tropilaelaps* spp.
 - Infestación de las abejas melíferas por *Varroa* spp. (Varroosis)
 - Infestación por *Aethinatumida* (Escarabajo de las colmenas).
- 9) En la categoría de otras *enfermedades e infecciones* están inscritas las siguientes:
- Viruela del camello
 - Leishmaniosis

CÓDIGO ACUÁTICO

CAPÍTULO 1.2.

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

Artículo 1.2.1.

Introducción

El presente capítulo describe los criterios para la inscripción de las *enfermedades* del Capítulo 1.3..

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

Para las *enfermedades* de la lista de la OIE de acuerdo con el Artículo 1.2.2., los capítulos correspondientes de ~~enfermedades del Código Acuático~~ ayuda a los Países Miembros en la armonización en materia de detección, prevención y control de enfermedades y proporciona las normas aplicables para garantizar el comercio internacional inocuo de los animales acuáticos y de sus productos.

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

Los principios para la selección de las pruebas de diagnóstico se describen en Capítulo 1.1.2 del *Manual Acuático*.

Artículo 1.2.2.

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

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

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

Anexo 26 (cont.)

Anexo VII (cont.)

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

Anexo 26 (cont.)Anexo VIII

CÓDIGO ACUÁTICO

CAPÍTULO 1.2.

CRITERIOS DE INSCRIPCIÓN DE ENFERMEDADES
EN LA LISTA DE LA OIE

Artículo 1.2.1.

Introducción

El presente capítulo describe los criterios para la inscripción de las *enfermedades* del Capítulo 1.3.

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

Para las *enfermedades* de la lista de la OIE de acuerdo con el Artículo 1.2.2., los capítulos correspondientes de *enfermedades* ayudan a los Países Miembros en la armonización en materia de detección, prevención y control de *enfermedades* y proporciona las normas aplicables para garantizar el *comercio internacional* inocuo de los *animales acuáticos* y de sus productos.

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

Los principios para la selección de las pruebas de diagnóstico se describen en Capítulo 1.1.2 del *Manual Acuático*.

Artículo 1.2.2.

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

- 1) Se haya demostrado la propagación internacional del agente (a través de animales acuáticos vivos o sus productos o fomites).

Y

- 2) Al menos un país ha demostrado la ausencia efectiva o eminente de enfermedad en poblaciones de animales acuáticos susceptibles, con base en las disposiciones relativas a la vigilancia contempladas en los Capítulos 1.4. y 1.5.

Y

- 3) Existe un método de detección y diagnóstico fiable y se dispone de una definición precisa de los casos que permite identificarlos claramente y distinguirlos de otras enfermedades.

Y

4)

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

O

- b) Se ha demostrado que la enfermedad tiene repercusiones importantes en la sanidad de los animales acuáticos en un país o una zona teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción y la mortalidad.

Anexo 26 (cont.)Anexo VIII (cont.)

O

- c) Se ha demostrado o pruebas científicas indican que la enfermedad puede tener repercusiones importantes en la sanidad de las poblaciones naturales de animales acuáticos teniendo en cuenta la frecuencia y la gravedad de los signos clínicos, incluyendo las pérdidas directas de producción, la mortalidad y las amenazas ecológicas.
-



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

Anexo 27

Original: Inglés
Febrero de 2015

INFORME DE LA PRIMERA REUNIÓN DEL GRUPO *AD HOC* DE LA OIE SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE CRUSTÁCEOS A LA INFECCIÓN POR ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OIE

París (Francia), 10-12 de febrero de 2015

El grupo *ad hoc* de la OIE sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE (grupo *ad hoc*) se reunió en la sede de la OIE del 10 al 12 de febrero de 2015. El Dr. Grant Stentiford presidió la reunión.

1. Bienvenida e introducción

Los miembros del grupo *ad hoc* y los otros participantes de la reunión figuran en el Anexo I y el orden del día aprobado, en el Anexo II.

En nombre del Dr. Bernard Vallat, director general de la OIE, jefe del Departamento de comercio internacional, el Dr. Derek Belton, dio la bienvenida a los miembros y les agradeció el haber aceptado trabajar con la OIE en este tema tan importante.

2. Objetivos de la reunión

En la edición de 2014 del *Código acuático*, se integró el Capítulo 1.5. “Criterios de inscripción de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico”, cuyo objetivo es brindar los criterios que determinan cuáles especies hospedadoras deberían inscribirse como susceptibles en cada capítulo específico de enfermedades del *Código acuático*. Estos criterios se irán aplicando progresivamente a cada capítulo específico de enfermedades del *Código acuático*. Asimismo, se incluirá información en el capítulo específico de enfermedad del *Manual Acuático* en el caso de aquellas especies que presenten algunos indicios de susceptibilidad, pero que sean insuficientes para demostrar la susceptibilidad según el enfoque descrito en el Artículo 1.5.3.

El grupo *ad hoc* evaluará las pruebas científicas y se transmitirán las evaluaciones para comentario a los Países Miembros antes de efectuar cualquier cambio en la lista de especies susceptibles en el Artículo X.X.2. de los capítulos específicos de enfermedades de crustáceos del *Manual Acuático* y del *Código Acuático*.

Por consiguiente, los objetivos de la reunión fueron los siguientes:

- 1) Considerar los elementos generales del enfoque conformado por tres etapas para precisar la susceptibilidad de determinados taxones a infección por agentes patógenos de crustáceos de la lista.
- 2) Determinar las pruebas específicas exigidas para cumplir con la etapa 2 (identificación del agente patógeno) y la etapa 3 (determinación de la infección) para el virus de la cabeza amarilla, genotipo 1 (en lo sucesivo, virus de la cabeza amarilla 1).
- 3) Aplicar criterios específicos definidos en la etapa 2 a la literatura gris y revisada por pares disponible y relacionada con el virus de la cabeza amarilla 1, a fin de determinar la susceptibilidad conforme con el Capítulo 1.5. del *Código acuático*.
- 4) Clasificar pruebas relacionadas con la susceptibilidad de taxones de hospedadores específicos al virus de la cabeza amarilla 1 en el Grupo 1 (en la lista del *Código acuático*), el Grupo 2 (en la lista del *Manual Acuático*), o el Grupo 3 (otro, por ejemplo, el vector mecánico).
- 5) Remitir los resultados de análisis anteriores antes de la reunión de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos de marzo de 2015.

3. Mandato

La versión final del mandato adoptado figura en el Anexo III.

Anexo 27 (cont.)

4. Discusión sobre los documentos de trabajo y otros documentos pertinentes

Antes de la reunión, se transmitió al grupo *ad hoc* la opinión de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre la susceptibilidad de animales acuáticos a agentes patógenos de la lista de la Directiva CE 2006/88 (EFSA, 2008). Asimismo, se proporcionó (Stentiford *et al.*, 2009) una ponencia revisada por pares resultante de este trabajo y centrada en la aplicación de los criterios descritos por el EFSA a la susceptibilidad de hospedadores a las siguientes enfermedades de crustáceos: la enfermedad de las manchas blancas, el síndrome de Taura y la enfermedad de la cabeza amarilla.

El grupo *ad hoc* consideró adecuado el enfoque de tres etapas descrito en el Artículo 1.5.3. (siempre que existiesen los correspondientes datos de apoyo) para considerar un hospedador como “susceptible” a “infección” por el virus de la cabeza amarilla 1.

El grupo propuso abordar los siguientes puntos específicos relativos a algunos artículos del Capítulo 1.5.:

Artículo 1.5.4. En referencia a las enfermedades de los crustáceos, el grupo *ad hoc* se mostró de acuerdo con que la inyección de un agente infeccioso pueda considerarse una vía invasiva experimental sin que imite una vía natural de infección. Esto último contrasta con el análisis anterior sobre la susceptibilidad de hospedadores crustáceos a agentes patógenos llevado a cabo por el EFSA en 2008, el cual consideró que la inyección imita potencialmente una vía natural de infección en los crustáceos.

Artículo 1.5.4. En referencia a las consideraciones sobre los “factores ambientales” asociados a la vía de transmisión/las vías naturales, el grupo estimó pertinente la inclusión si se tomaban en cuenta los indicios notificados en estudios específicos (por ejemplo, ¿la temperatura a la que se realizó un determinado estudio de exposición imitó las condiciones naturales deseadas para el hospedador/agente patógeno?).

Artículo 1.5.5. En referencia a la utilización del Título 7 del capítulo correspondiente del *Manual Acuático* como un recurso para “identificar” el agente patógeno en cuestión, el grupo estimó primordial modificar el Título 7 para integrar un diagnóstico molecular idóneo (PCR) y elementos de información filogenéticos. En la mayoría de los casos, esto debería traducirse en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de una secuenciación del amplicón, mientras que, en otros, bastarían los ensayos mediante PCR de agentes patógenos de taxonomía específica. Al no proporcionar esta información de manera consistente en el Título 7, resulta difícil determinar la taxonomía del agente patógeno en estudio con respecto al agente patógeno de referencia en la lista.

Artículo 1.5.6. En referencia a los criterios A a D, el Grupo discutió y se mostró de acuerdo con un conjunto de elementos descriptivos para cada criterio en relación con el virus de la cabeza amarilla 1. Estas descripciones toman en cuenta las investigaciones llevadas a cabo anteriormente por el EFSA (2008) y Stentiford *et al.* (2009) sobre la susceptibilidad al virus de la cabeza amarilla 1. Así, las descripciones para evaluar la susceptibilidad al virus de la cabeza amarilla 1 conforme con el Capítulo 1.5. del *Código acuático* son las siguientes:

A: Replicación	B: Viabilidad / Infecciosidad	C: Patología /Signos clínicos	D: Localización
Presencia de cuerpos de inclusión característicos; manifestación positiva de cuerpos de inclusión mediante ISH (hibridación in situ) o IFAT (inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos) Presencia de viriones en cuerpos de inclusión detectados por MET Demostración del incremento del número de copias en el tiempo con RT-qPCR Pasaje seriado de un individuo a otro individuo libre de patógeno específico (SPF) de la misma especie*	Inoculación única a un SPF (agente patógeno diana) de cualquier especie hospedadora susceptible y confirmación de la identificación del agente patógeno**	Presencia de cuerpos de inclusión característicos, y núcleos cariorreóctivos y picnóticos en tejidos diana e infiltración hemocítica y/o signos clínicos***	Hemocitos, corazón, nervios periféricos, ojo, órgano linfoide y senos, tejido conjuntivo****

Nota explicativa: *Para demostrar el fenómeno de replicación a través de este enfoque, se requieren indicios para pases múltiples en hospedadores diana confirmados libres de patógenos de la misma especie y su evaluación. **Para demostrar la viabilidad o infecciosidad del agente patógeno diana en el hospedador bajo evaluación, se requiere un pase único en cualquier hospedador SPF susceptible reconocido. ***Los signos clínicos típicos del virus de la cabeza amarilla 1 podrían proporcionar indicios para cumplir los criterios cuando no se disponga de indicios histopatológicos. Sin embargo, es posible que los signos clínicos contenidos en el capítulo del *Manual* no se manifiesten de la misma manera en todos los taxones de hospedadores y que no sean específicos para infección por el virus de la cabeza amarilla 1. ****Órgano linfoide ausente en la mayoría de los taxones de hospedadores no peneidos.

Artículo 1.5.5. En referencia a la identificación específica del virus de la cabeza amarilla 1, el grupo observó que, en la literatura actual, existían varias incongruencias entre el Capítulo 9.2. del *Código acuático* (infección por el virus de la cabeza amarilla) y el Capítulo 2.2.8. del *Manual Acuático* (enfermedad de la cabeza amarilla). Dado que solo la infección por la enfermedad de la cabeza amarilla (genotipo 1) del complejo de virus de la cabeza amarilla (es decir, incluido el VAB, etc.) figura en la lista de la OIE, se recomendó que se modificasen los capítulos del *Código* y del *Manual* para esclarecer este punto. Con esta finalidad, y con la de definir la susceptibilidad de hospedadores al agente patógeno de la lista (virus de la cabeza amarilla 1), se estudiaron publicaciones para brindar indicios específicos de que el agente patógeno bajo estudio era efectivamente el virus de la cabeza amarilla (genotipo 1) y no (potencialmente) otros virus del complejo. Se observó que esta definición no podía hacerse cuando existían pocas pruebas para cumplir con los requisitos de la etapa 2 del enfoque (véanse los artículos 1.5.3. y 1.5.5.). En dichos casos, y cuando no puedan identificarse otros estudios para cubrir este vacío de pruebas, no se propondrá un taxón de hospedador para inclusión en el *Código acuático* (Grupo 1).

Artículo 1.5.7. En referencia a los resultados de la evaluación de cada taxón de hospedador, aquellos hospedadores para los que se haya confirmado la identificación del agente (Artículo 1.5.5.), y cuando se proporcionen pruebas para cumplir con el criterio A, o al menos dos de los criterios B, C y D del Artículo 1.5.63. (véase cuadro más arriba), los hospedadores podrán clasificarse en el Grupo 1 (para inclusión en el *Código*). Este resultado se ve consolidado en cierto modo cuando las infecciones son naturales y no experimentales (Artículo 1.5.4.). Cuando no se reúnan los indicios necesarios para satisfacer algunos de esos criterios contenidos en el Artículo 1.5.6. (véase cuadro más arriba) y/o cuando la identificación del agente patógeno no baste para confirmar el virus de la cabeza amarilla 1 (Artículo 1.5.5.), o bien cuando una infección se haya atribuido únicamente a procedimientos experimentales invasivos, los hospedadores podrán clasificarse en el Grupo 2 (para inclusión en el *Manual Acuático*).

En todos los demás casos en los que no pudieron corroborarse de manera concluyente, los indicios de “infección” (por ejemplo, cuando solo se proporcionaron pruebas por PCR para demostrar la presencia del agente patógeno), los hospedadores se clasificaron en un tercer grupo, el Grupo 3, cuyos hospedadores podrían comprender aquellos taxones a incluirse en la lista del Artículo 2.2.6. del capítulo del *Manual Acuático* con el título “Vector”.

Al evaluar la susceptibilidad de hospedadores acuáticos al virus de la cabeza amarilla 1, el grupo *ad hoc* tomó en consideración el espectro taxonómico en el que se hallan los hospedadores susceptibles. Este enfoque podría servir para informar mejor sobre los riesgos que supone la importación de hospedadores potencialmente susceptibles. Se dispone de pruebas de susceptibilidad al virus de la cabeza amarilla 1 de solo dos familias (*Penaeidae* y *Palaemonidae*) del suborden de los decápodos (*Dendrobranchiata*). Se probó (aunque sin demostrar) la susceptibilidad en otras familias (incluidos los Braquiuros, específicamente los cangrejos) del suborden *Pleocyemata*. La comprensión de la propagación taxonómica entre una variedad de hospedadores constituye un concepto nuevo para tratar la susceptibilidad que, sin duda, resaltarán la diversidad de las estrategias de virulencia de los agentes patógenos (incluso las de peces y moluscos) contenidas en el *Código acuático* y el *Manual Acuático*. Un análisis de riesgos basado en el espectro taxonómico debería llevarse a cabo cuando no existan indicios específicos sobre la susceptibilidad de un taxón hospedador determinado al virus de la cabeza amarilla 1 (u otras enfermedades de crustáceos de la lista).

5. Resultado de los análisis

El grupo *ad hoc* recomendó mantener en la lista *Penaeus monodon* como una especie susceptible a infección por el virus de la cabeza amarilla 1. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios previstos figura a continuación.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado de manera natural (Wijegoonawardane et al., 2008 and Boonyaratpalin et al., 1993) de acuerdo al Artículo 1.5.4. El Grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 2

Se ha confirmado la identidad del agente patogénico (Wijegoonawardane et al., 2008) de acuerdo al Artículo 1.5.5. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

Existen indicios de *infección por el agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa (Wijegoonawardane et al., 2008; Boonyaratpalin et al., 1993; Longyant et al., 2006) de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Anexo 27 (cont.)

Asimismo,

El grupo *ad hoc* recomendó incluir en la lista *Penaeus stylirostris* como una especie susceptible a la infección por el virus de la cabeza amarilla 1. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios figura a continuación.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado de manera natural (Songsuk et al., 2011) y por procedimientos experimentales (Lightner et al., 1998) que imitan vías naturales de *infección* de acuerdo al Artículo 1.5.4. El Grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 2

Se ha confirmado la identidad del *agente patogénico* ((Songsuk et al., 2011) de acuerdo al Artículo 1.5.5. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

Existen indicios de *infección por el agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa (Lightner et al., 1998; Songsuk et al., 2011) de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

El grupo *ad hoc* recomendó incluir en la lista *Penaeus stylirostris* como una especie susceptible a la infección por el virus de la cabeza amarilla 1. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios figura más abajo.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado La transmisión se ha logrado de manera natural (Castro-Longoria et al., 2008) de acuerdo al Artículo 1.5.4. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 2

Se ha confirmado la identidad del *agente patogénico* (Castro-Longoria et al., 2008) de acuerdo al Artículo 1.5.5. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

Existen indicios de *infección por el agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa (Lu et al., 1994; Castro-Longoria et al., 2008) de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

El grupo *ad hoc* recomendó incluir en la lista *Metapenaeus affinis* como una especie susceptible a infección por el virus de la cabeza amarilla 1. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios figura más abajo.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado por procedimientos experimentales que imitan vías naturales de *infección* (Longyant et al., 2006) de acuerdo al Artículo 1.5.4. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 2

Se ha confirmado la identidad del *agente patogénico* (Longyant et al., 2006) de acuerdo al Artículo 1.5.5. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

Existen indicios de *infección por el agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa (Longyant et al., 2006) de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

El grupo *ad hoc* recomendó incluir en la lista *Palaemonetes pugio* como una especie susceptible a la infección por el virus de la cabeza amarilla 1. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios figura más abajo.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado por procedimientos experimentales que imitan vías naturales de *infección* (Ma *et al.*, 2009) de acuerdo al Artículo 1.5.4. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 2

Se ha confirmado la identidad del *agente patogénico* (Ma *et al.*, 2009) de acuerdo al Artículo 1.5.5. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

Existen indicios de *infección por el agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa (Ma *et al.*, 2009) de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

Asimismo;

El grupo *ad hoc* recomendó remover *Penaeus esculentus* como una especie susceptible a la infección por el virus de la cabeza amarilla 1 por ser insuficientes los indicios que comprueben la susceptibilidad según el enfoque descrito en el Artículo 1.5.3. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios figura más abajo.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado solo por procesos invasivos experimentales que no imitan vías naturales de *infección* de acuerdo al Artículo 1.5.4. Más aun, la literatura solo se refiere a estudios que emplean el genotipo 2 (VAB), de manera que no se puede confirmar la susceptibilidad a infección por el virus de la cabeza amarilla 1 de la lista (Spann *et al.* 2000, 2003). El grupo *ad hoc* consideró que no se cumplía con este criterio.

Y etapa 2

No se ha confirmado la identidad del *agente patogénico* de acuerdo al Artículo 1.5.5. De manera específica, los estudios han demostrado de manera insuficiente la utilización del agente virus de la cabeza amarilla 1 (Spann *et al.*, 2000, 2003). El grupo *ad hoc* consideró que no se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

No existen suficientes indicios de *infección por el agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. De manera específica, se observaron signos clínicos no específicos, pero la patología interna no fue característica (Spann *et al.*, 2003). El grupo *ad hoc* consideró que no se cumplía con este criterio.

El grupo *ad hoc* recomendó remover *Penaeus japonicus* como una especie susceptible a la infección por el virus de la cabeza amarilla 1 por ser insuficientes los indicios que comprueben la susceptibilidad, según el enfoque descrito en el Artículo 1.5.3. La evaluación llevada a cabo por el grupo *ad hoc* de acuerdo a los criterios figura más abajo.

Etapa 1

La transmisión se ha logrado de manera natural para la *infección* (Wang *et al.*, 1996) de acuerdo al Artículo 1.5.4. El grupo consideró que se cumplía con este criterio.

Anexo 27 (cont.)

Y etapa 2

No se ha confirmado la identidad del *agente patogénico* (Wang *et al.*, 1996) de acuerdo al Artículo 1.5.5. De manera específica, las muestras de animales objeto de muestreo procedentes del brote bajo estudio se coinfectaron por el VSNB y no presentaron signos clínicos típicos del virus de la cabeza amarilla 1. Además, no se notificó ninguna tipificación del virus de la cabeza amarilla 1 de acuerdo al Título 7 del capítulo correspondiente del *Manual* (Wang *et al.*, 1996). El grupo *ad hoc* consideró que no se cumplía con este criterio.

Y etapa 3

Existen indicios de infección por el *agente patogénico* en la especie hospedadora sospechosa (Wang *et al.*, 2009), de acuerdo a los criterios A a D del Artículo 1.5.6. De manera específica, aunque se notificó la MET, los autores no confirmaron que se causó la infección por el virus de la cabeza amarilla 1 (Wang *et al.*, 2009). El grupo *ad hoc* consideró que se cumplía con este criterio.

6. Revisión y finalización del informe de la reunión

El grupo *ad hoc* se sirvió de una base de datos de investigaciones e informes referentes a la enfermedad de la cabeza amarilla (virus de la cabeza amarilla 1, VAB y otros genotipos conocidos) (Dr. Stentiford, Cefas). Asimismo, exploró la base de datos de resúmenes del Centro de Biociencia Agrícola (CAB por sus siglas en inglés) (periodo comprendido entre 1968 y 2015) (servidor EBSCO) usando los términos de búsqueda “virus de la enfermedad de la cabeza amarilla” (n=386) y “baculovirus amarillo” (n=30). Puesto que la literatura anterior a 2009 se había revisado (Stentiford *et al.*, 2009), se limitó la búsqueda al periodo comprendido entre 2008 y 2015 con las palabras clave “enfermedad de la cabeza amarilla” (n=115). Se identificaron más de 700 artículos de la base de datos al usar estas palabras clave. La selección inicial de los artículos se basó en la pertinencia de los títulos para los fines del mandato del grupo (susceptibilidad del hospedador). Posteriormente, se evaluaron los títulos seleccionados con el fin de determinar la vía de transmisión de la infección, confirmar el genotipo del agente patógeno y establecer la presencia de un virus reproductor viable en el hospedador. Una vez reunida una cantidad suficiente de artículos que permitiesen evaluar que una especie hospedadora era susceptible, se finalizó la búsqueda de otras referencias sobre esa especie hospedadora crustácea. Se amplió la búsqueda usando los operadores booleanos “Y” y “O” y otras bases de datos como Google Scholar y PubMed. Entre los términos clave figuraban “virus de la cabeza amarilla y Mosquito” (n=2), “virus de la cabeza amarilla y chinensis” (n=0) y “virus de la cabeza amarilla e indicus” (n=1). Asimismo, se realizaron algunas “retrobúsquedas” sobre artículos pertinentes. Se descargaron aproximadamente 40 artículos durante la revisión preliminar, y en total se citaron 18 artículos. No pudo accederse a tres ponencias y dos artículos revisados por pares seleccionados inicialmente.

7. Resumen

En resumen, cinco taxones de hospedadores crustáceos cumplieron los criterios exigidos para ser incluidos en la lista de especies susceptibles a infección por el virus de la cabeza amarilla 1 conforme con el Artículo 1.5. del *Código Sanitario para los Animales Acuáticos*. Los hospedadores de este Grupo 1 fueron los siguientes: *Penaeus monodon*, *Penaeus vannamei*, *Penaeus stylirostris*, *Palaemonetes pugio* y *Metapenaeus affinis*. Además, nueve taxones adicionales de hospedadores crustáceos cumplieron algunos de los criterios exigidos para ser incluidos en la lista de especies susceptibles pero se careció de indicios ya sea para confirmar la identidad del agente patógeno bajo estudio como virus de la cabeza amarilla 1, para demostrar una vía natural de infección, o bien para confirmar definitivamente un estado “infectado”. Estos hospedadores pertenecientes al Grupo 2 fueron los siguientes: *Macrobrachium sintangense*, *Metapenaeus brevicornis*, *Palaemon serrifer*, *Palaemon styliferus*, *Penaeus aztecus*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus merguensis* y *Penaeus setiferus*. Por último, numerosos taxones se clasificaron en un tercer grupo cuando la viabilidad del virus dentro del hospedador no se demostró o cuando su estado de vector mecánico no pudo descartarse. Análisis detallados de los indicios relativos a los hospedadores de los Grupos 1, 2 y 3 figuran en el Anexo IV.

Cuadro 2. Susceptibilidad de las especies al virus de la cabeza amarilla Genotipo 1.

Especies	Estado general
<i>Metapenaeus affinis</i>	1
<i>Palaemonetes pugio</i>	1
<i>Penaeus monodon</i>	1
<i>Penaeus stylirostris</i>	1
<i>Penaeus vannamei</i>	1
<i>Macrobrachium sintangense</i>	2
<i>Metapenaeus brevicornis</i>	2
<i>Palaemon serrifer</i>	2
<i>Palaemon styliferus</i>	2
<i>Penaeus aztecus</i>	2
<i>Penaeus duorarum</i>	2
<i>Penaeus japonicus</i>	2
<i>Penaeus merguensis</i>	2
<i>Penaeus setiferus</i>	2
Especie Acetes	3
<i>Callinectes sapidus</i>	3
<i>Chelonibia patula</i>	3
<i>Ergasilus manicatus</i>	3
<i>Fundulus grandis</i>	3
<i>Metapenaeus bennettiae</i>	3
<i>Metapenaeus ensis</i>	3
<i>Octolasmis muelleri</i>	3
<i>Penaeus esculentus</i>	3

Anexo 27 (cont.)**8. Próxima reunión**

La fecha de la próxima reunión se confirmará tras la reunión de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos en marzo de 2015.

9. Referencias

Boonyaratpalin S., Supamataya K., Kasornchandra J., Direkbusarakom S., Ekpanithanpong U., Chantanachookin C. (1993). - Non-occluded baculo-like virus the causative agent of yellowhead disease in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Pathology*, 28, 103-109

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.

Flegel, T.W., (1997). - Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microb. Biol.* 13, 433–442

Flegel, T.W., Fegan, D.F., Sriurairatana, S., (1995). - Environmental control of infectious diseases in Thailand. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture II*. Asian Fisheries Society, Manila, The Phillippines, pp. 65–79.

Lightner, D.V., Hasson, K.W., White, B.L., Redman, R.M., (1998). - Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with asian white spot syndrome virus and asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health* 10, 271–281.

Longyant, S., Sattaman, S., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W., Sithigorngul, P., (2006). - Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture* 257, 83–91.

Longyant, S., Sithigorngul, P., Chaivisuthangkura, P., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, W., Menasveta, P., (2005). - Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.* 64, 5–12.

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

Ma, H., Overstreet, R. M., & Jovonovich, J. A. (2009). - Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow-head virus (YHV). *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 112–8. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2009.04.002>

Overstreet, R. M., Jovonovich, J., & Ma, H. (2009). - Parasitic crustaceans as vectors of viruses, with an emphasis on three penaeid viruses. *Integrative and Comparative Biology*, 49(2), 127–41. <http://doi.org/10.1093/icb/49.2.127>

Songsuk, A., Limsuwan, C., Chuchird, N., Laisuthisan, K., Somsiri, T., Baoprasertkul, P., Senapin, S. (2011). - Yellow head virus outbreaks in intensive freshwater culture of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Thailand and its experimental infection at different salinity levels. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, 35(1), 29–40.

Spann K.M., Donaldson R.A., Cowley J.A., Walker P.J. (2000). - Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42, 221-225

Spann, K.M., McCulloch, R.J., Cowley, J.A., East, I.J. and Walker, P.J. 2003. - Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections of *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56, 1-10.

Stentiford, G. D., Bonami, J.-R., & Alday-Sanz, V. (2009). - A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, 291(1-2), 1–17. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.042>

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.

Wang C.S., Tang K.F.J., Chen S.N. (1996). Yellow head disease-like infection in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in taiwan. *Fish Pathology* 31: 177-182.

Wijegoonawardane P.K.M., Cowley J.A., Phan T., Hodgson R.A.J., Nielsen L., Kiatpathomchai W. & Walker P.J. (2008). - Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology* 380, 213–225.

... / Anexos

**INFORME DE LA REUNIÓN DEL GRUPO AD HOC DE LA OIE SOBRE
LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE CRUSTÁCEOS A LA INFECCIÓN
POR ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OIE**

París, 10–12 de febrero de 2015

Lista de participantes

MIEMBROS DEL GRUPO AD HOC

Dr. Grant D. Stentiford (presidente)

Director - European Union Reference
Laboratory for Crustacean Diseases
Pathology and Molecular Systematics Team
Centre for Environment, Fisheries and
Aquaculture Science (CEFAS)
Weymouth Laboratory
Weymouth
Dorset DT4 8UB
REINO UNIDO
Tel.: +44(0)1305 206722
grant.stentiford@cefasc.co.uk

Dr. Mark Crane

Senior Principal Research Scientist
Research Group Leader | AAHL Fish
Diseases Laboratory
CSIRO Australian Animal Health
Laboratory
5 Portarlington Road Geelong VIC 3220
Private Bag 24 Geelong VIC 3220
AUSTRALIA
Tel.: +61 3 5227 5118
Mobil: +61 3 0408 439 372
mark.crane@csiro.au

Dr. Jorge Cuéllar-Anjel

Director - Shrimp Pathology and
Research Department
Camaronera de Coclé S.A. -
CAMACO
Apartado 0201-049, Aguadulce,
REPÚBLICA DE PANAMÁ
Tel.: +507 997-6334/2577/0737
Mobil: +507 6949-1976
jocuan@gmail.com

Dra. Sophie St-Hilaire

Department of Health Management
Atlantic Veterinary College
University of Prince Edward Island,
Charlottetown, PEI
CANADÁ
Tel.: +902 620-5190
ssthilaire@upe.ca

Dr. Temdoug Somsiri

Inland Aquatic Animal Health Research
Institute
Bangkok
TAILANDIA
tsi_f@yahoo.com

OTRO PARTICIPANTE

Dr. Franck Berthe
Presidente de la Comisión de Normas Sanitarias
para los Animales Acuáticos de la OIE
Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
Head of Animal Health Plant Health
Via Carlo Magno 1, Parma
ITALIA
Tel.: + 39 052 1 036 870
Fax: + 39 052 1 036 0870
franck.berthe@efsa.europa.eu

SEDE DE LA OIE

Dr. Derek Belton

Jefe
Departamento de comercio internacional
de la OIE
d.belton@oie.int

Dr. Tomasz Grudnik

Comisionado
Departamento de comercio internacional de la OIE
t.grudnik@oie.int

REUNIÓN DEL GRUPO AD HOC DE LA OIE SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE CRUSTÁCEOS A LA INFECCIÓN POR ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OIE

París, 10–12 de febrero de 2015

Orden del día

- 1) Bienvenida e introducción
 - 2) Objetivos de la reunión
 - 3) Mandato
 - 4) Discusión sobre los documentos de trabajo y otros documentos pertinentes
 - 5) Resultado de los análisis
 - 6) Revisión y finalización del informe de la reunión
 - 7) Resumen
 - 8) Próxima reunión
-

GRUPO AD HOC DE LA OIE SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE CRUSTÁCEOS A LA INFECCIÓN POR ENFERMEDADES DE LA LISTA DE LA OIE

Mandato

Contexto

En la edición 2014 del *Código Acuático* se introdujo un nuevo Capítulo 1.5. “Criterios de inscripción de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico” cuyo objetivo es brindar los criterios que determinan las especies hospedadoras que deberían inscribirse como susceptibles en el Artículo X.X.2. de cada capítulo específico de enfermedades del *Código acuático*. Estos criterios se aplicarán progresivamente a cada capítulo específico de enfermedades del *Código acuático*.

Dichas evaluaciones correrán a cargo de grupos *ad hoc* s y se transmitirán para comentario a los Países Miembro antes de efectuar cualquier cambio a la lista de especies susceptibles en el Artículo X.X.2. de los capítulos de enfermedades específicas del *Código Acuático*.

En el caso de aquellas especies que presenten indicios de susceptibilidad, pero que sean insuficientes para demostrar la susceptibilidad según el enfoque descrito en el Artículo 1.5.3., la información se incluirá en el capítulo específico de enfermedad del *Manual Acuático*.

Finalidad

El grupo *ad hoc* sobre la susceptibilidad de las especies de crustáceos a la infección por enfermedades de la lista de la OIE asumirá esta tarea para las enfermedades de los crustáceos de la lista de la OIE.

Mandato

- 1) Tomar en consideración las pruebas requeridas para cumplir con los criterios del Capítulo 1.5.
- 2) Revisar la literatura pertinente que documenta la susceptibilidad de las especies.
- 3) Proponer especies susceptibles para las enfermedades de la lista de la OIE a partir del Artículo 1.5.7.
- 4) Proponer especies susceptibles para las enfermedades de la lista de la OIE a partir del Artículo 1.5.8.

Resultados esperados del grupo *ad hoc*

- 1) Elaborar una lista de especies susceptibles para su inclusión en los artículos pertinentes en los capítulos de enfermedades específicas de los crustáceos en el *Código Acuático* y el *Manual Acuático*, empezando por la enfermedad de la cabeza amarilla, y, si los plazos lo permiten, otras enfermedades de los crustáceos de la lista.
- 2) Preparar un proyecto de informe para consideración de la Comisión de Normas Sanitarias para los Animales Acuáticos en su reunión del marzo de 2015.

Evidencia de susceptibilidad de las especies hospedadoras a la infección por el virus de la cabeza amarilla acorde con el Capítulo 1.5. Criterios de inscripción de especies susceptibles de infección por un agente patógeno específico.

Gen	Especies	Vía de transmisión	Id. patógeno	A	B	C	D	Referencia	Resultado	Estado general
<i>Acetes</i>	<i>sp.</i>	N	sospechoso	no	sí	no	no	Flegel <i>et al.</i> , 1995	3	3
<i>Callinectes</i>	<i>sapidus</i>	EN	confirmado	no	no	no	sí	Ma <i>et al.</i> , 2009	3	3
<i>Chelonibia</i>	<i>patula</i>	EN	confirmado	no	no	no	no	Overstreet <i>et al.</i> , 2009	3	3
<i>Ergasilus</i>	<i>manicatus</i>	EN	confirmado	no	no	no	no	Overstreet <i>et al.</i> , 2009	3	3
<i>Fundulus</i>	<i>grandis</i>	EN	confirmado	no	no	no	no	Overstreet <i>et al.</i> , 2009	3	3
<i>Metapenaeus</i>	<i>bennettiae</i>	EI	confirmado					Walker <i>et al.</i> , 2001	3	3
<i>Macrobrachium</i>	<i>sintangense</i>	EI	confirmado	sí	no	no	no	Longyant <i>et al.</i> , 2005	2	2
<i>Metapenaeus</i>	<i>affinis</i>	EN	confirmado	sí	no	sí	sí	Longyant <i>et al.</i> , 2006	1	1
<i>Metapenaeus</i>	<i>brevicornis</i>	EI	confirmado	sí	no	sí	sí	Longyant <i>et al.</i> , 2006	2	2
<i>Metapenaeus</i>	<i>ensis</i>	EI	sospechoso	no	no	no	no	Chantanchookin <i>et al.</i> , 1993	3	3
<i>Octolasmis</i>	<i>muelleri</i>	EN	confirmado	no	no	no	no	Overstreet <i>et al.</i> , 2009	3	3
<i>Palaemon</i>	<i>serrifer</i>	EI	confirmado	sí	no	no	no	Longyant <i>et al.</i> , 2005	2	2
<i>Palaemon</i>	<i>styliferus</i>	N	sospechoso	sí	sí	sí	sí	Flegel, 1997	2	2
		EI	confirmado	sí	no	no	no	Longyant <i>et al.</i> , 2005	2	
<i>Palaemonetes</i>	<i>pugio</i>	EN	confirmado	sí	no	sí	sí	Ma <i>et al.</i> , 2009	1	1
<i>Penaeus</i>	<i>aztecus</i>	EN	sospechoso	sí	no	sí	sí	Lightner <i>et al.</i> , 1998	2	2
<i>Penaeus</i>	<i>duorarum</i>	EN	sospechoso	sí	no	sí	sí	Lightner <i>et al.</i> , 1998	2	2
<i>Penaeus</i>	<i>esculentus</i>	N	confirmado	no	no	no	no	Walker <i>et al.</i> , 2001	3	3
		EI	sospechoso	no	no	sí	no	Spann <i>et al.</i> , 2000	3	
		EI	confirmado	no	no	sí	sí	Spann <i>et al.</i> , 2003	3	

Anexo 27 (cont.)

Anexo IV (cont.)

Gen	Especies	Vía de transmisión	Id. patógeno	A	B	C	D	Referencia	Resultado	Estado general
<i>Penaeus</i>	<i>japonius</i>	N	sospechoso	sí	no	sí	sí	Wang <i>et al.</i> , 1996	2	2
<i>Penaeus</i>	<i>merguiensis</i>	N	sospechoso	no	sí	sí	sí	Flegel 1997	2	2
		EI	sospechoso	no	no	no	no	Chantanchookin <i>et al.</i> , 1993	3	
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	N	confirmado	no	no	sí	sí	Wijegoonawardane <i>et al.</i> , 2008	1	1
		N	sospechoso	sí	no	sí	sí	Boonyaratpalin <i>et al.</i> , 1993	2	
		EI	sospechoso	no	sí	sí	no	Longyant <i>et al.</i> , 2006	2	
<i>Penaeus</i>	<i>setiferus</i>	EN	sospechoso	sí	no	sí	sí	Lightner <i>et al.</i> , 1998	2	2
<i>Penaeus</i>	<i>stylirostris</i>	N	confirmado	no	sí	sí	sí	R Castro-Longoria <i>et al.</i> , 2008	1	1
		EI	sospechoso	sí	no	sí	sí	Lu <i>et al.</i> , 1994	2	
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	N	confirmado	no	sí	sí	sí	Songsuk <i>et al.</i> , 2011	1	1
		EN	sospechoso	sí	no	sí	sí	Lightner <i>et al.</i> , 1998	2	

Vía de transmisión: Natural (N), Experimental No-invasiva (EN), Experimental Invasiva (EI).

PLAN DE TRABAJO DE LA COMISIÓN PARA LOS ANIMALES ACUÁTICOS 2015–2016

Código Acuático

	Tarea	Marzo de 2015	Sesión General de mayo de 2015	Septiembre de 2015
1	Guía del usuario	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
2	Glosario	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
3	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
4	Capítulo 1.2. Criterios para la inscripción de las enfermedades de los animales acuáticos en la lista de la OIE	Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y circulación para comentario de los Países Miembros		Revisión de los comentarios de los Países Miembros
5	Revisión del Título 4 para mejorar la directrices sobre el control de la enfermedad	Desarrollo de un plan en función de las recomendaciones de la Conferencia mundial de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos		Acuerdo sobre prioridades en el Título 4
6	Capítulo 4.3. – Recomendaciones generales sobre la desinfección			Revisión del proyecto de capítulo desarrollado por el grupo <i>ad hoc</i> y circulación para comentario
7	Capítulo 4.X. – Recomendaciones para la desinfección de la superficie de huevos de salmónidos	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
8	Capítulo 4.7. – Control de peligros asociados a los alimentos de los animales acuáticos	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
9	Capítulo 6.5. – Análisis de riesgo a la resistencia a los agentes antimicrobianos como consecuencia de su uso en los animales acuáticos (nuevo)	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
10	Lista de especies susceptibles en los capítulos específicos de enfermedad	Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y propuesta de modificaciones del Capítulo 9.2.2.		Revisión de los comentarios de los Países Miembros
11	Necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	Si se adopta, elaboración de un nuevo capítulo

Anexo 28 (cont.)

Manual Acuático

	Tarea	Marzo de 2015	Sesión General de mayo de 2015	Septiembre de 2015
12	Capítulos de enfermedades específicas de los crustáceos Necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, síndrome de Taura, hepatopancreatitis necrotizante, enfermedad de la cabeza amarilla	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
13	Infección por <i>Perkinsus olseni</i>	Revisión de los comentarios de los Países Miembros	Propuesto para adopción	
14	Capítulo 1.1.3. – Métodos de desinfección de los establecimientos de acuicultura	Supresión si se adopta el nuevo Capítulo 4.X. del Código	Supresión si se adopta el nuevo Capítulo 4.X. del Código	
15	Lista de especies susceptibles en los capítulos específicos de enfermedad	Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y modificaciones en la sección 2.2.1. del Capítulo 2.2.8. sobre la enfermedad de la cabeza amarilla a cargo del autor		Revisión y circulación para comentario de los Países Miembros
16	Capítulo sobre la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND)	Revisión del informe del grupo <i>ad hoc</i> y desarrollo y circulación de un proyecto de capítulo para comentario de los Países Miembros		Revisión para comentario de los Países Miembros
17	Rendimiento de las pruebas	Revisión en curso		
18	Secciones sobre la estabilidad del agente (vinculado con la desinfección)	Revisión en curso		

Otros asuntos

	Tarea	Marzo de 2015	Sesión General de mayo de 2015	Septiembre de 2015
19	Conferencia mundial de la OIE sobre la sanidad de los animales acuáticos	Debate sobre la recomendación de la conferencia de revisar el plan de trabajo	Presentación DE la recomendación de la conferencia	Debate sobre la recomendación de la conferencia para establecer un plan de trabajo
20	Trematodos zoonóticos portados por los peces			Comentarios de los Países Miembros

© **Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2015**

El presente documento fue preparado por especialistas a solicitud de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Excepto en el caso de su adopción por la Asamblea Mundial de Delegados, lo expresado refleja únicamente las opiniones de dichos especialistas.

Todas las publicaciones de la OIE están protegidas por un Copyright internacional. Se pueden copiar, reproducir, traducir, adaptar o publicar extractos en publicaciones periódicas, documentos, libros o medios electrónicos y en cualquier otro medio destinado al público, con intención informativa, didáctica o comercial, siempre y cuando se obtenga previamente una autorización escrita por parte de la OIE.

Las designaciones y nombres utilizados y la presentación de los datos que figuran en esta publicación no constituyen de ningún modo el reflejo de cualquier opinión por parte de la OIE sobre el estatuto legal de los países, territorios, ciudades o zonas ni de sus autoridades, fronteras o límites territoriales.

La responsabilidad de las opiniones profesadas en los artículos firmados incumbe exclusivamente a sus autores. La mención de empresas particulares o de productos manufacturados, sean o no patentados, no implica de ningún modo que estos se beneficien del apoyo o de la recomendación de la OIE, en comparación con otros similares que no hayan sido mencionados.