

CAPÍTULO 2.4.9

INFECCIÓN POR HERPESVIRUS DE LOS OSTREIDOS 1

1. Ámbito de aplicación

A efectos de este capítulo, la infección por herpesvirus de los ostreidos 1 (HVOs-1) se considera que es una infección vírica causada por HVOs-1 que afecta principalmente a la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*.

En todo el capítulo se utiliza el término HVOs-1 para definir una especie de virus. El virus descrito por Davison *et al.* (2005) corresponde a una cepa o "aislado" concreto obtenido a partir de larvas de ostra del Pacífico infectadas en Francia en 1995. Dado que esta cepa fue la primera que se describió (mediante una secuenciación completa del genoma), puede tomarse como tipo de referencia. Otras cepas, como la HVOs-1 var y la HVOs-1 μ Var, han sido también identificadas y estudiadas. En este contexto, HVOs-1 hace referencia a todas las cepas aisladas del virus y al virus descrito por Davison *et al.* (2005) definido como tipo de referencia. Puede haber diferencias de virulencia entre las distintas cepas de HVOs-1.

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

El HVOs-1 es el agente etiológico de una enfermedad vírica contagiosa de la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, que afecta también a otras especies de bivalvos.

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Se han purificado partículas de HVOs-1 a partir de larvas de *C. gigas* de Francia (Le Deuff & Renault, 1999) y, mediante microscopía electrónica de transmisión, se observó que tenían una envoltura icosaédrica con un núcleo electrodensito y un diámetro de aproximadamente 120 nm. La localización intranuclear de las partículas víricas, su tamaño y su ultraestructura son característicos de los miembros de *Herpesvirales*.

La estructura y la secuencia genómicas, así como la morfología de la cápside (Davison *et al.*, 2005) se han estudiado con mayor detalle para determinar la situación filogenética del HVOs-1 en relación con los virus herpes de los vertebrados. Se secuenció todo el ADN del virus (GenBank, número de acceso AY509253) y, estructuralmente, las cápsides de HVOs-1 parecen ser similares a las de otros virus herpes que se han estudiado (Davison *et al.*, 2005). El virus se clasificó con la denominación de *Ostreid herpesvirus 1* (HVOs-1) como primera especie conocida de la familia *Malacoherpesviridae* (Davison *et al.*, 2009).

Se ha identificado una variante del HVOs-1 (HVOs-1var) en Francia (Arzul *et al.*, 2001b) en *C. gigas*, *Ruditapes philippinarum* y *Pecten maximus*. Friedman *et al.* (2005) y Moss *et al.* (2007) describieron también diferencias en las secuencias del HVOs-1 procedente de California y de Asia, respectivamente. Moss *et al.* (2007) sugirieron que existen al menos dos cepas en Japón, una en Corea del Sur y dos en China (la República Popular de). Una de las cepas de China y Corea del Sur tenía una secuencia similar a la cepa de HVOs-1 de California descrita por Friedman *et al.* (2005), y la otra cepa de China era similar al HVOs-1 de Francia.

Más recientemente, las reacciones en cadena de polimerasa (PCR) con el empleo de los conjuntos de cebadores IA1-IA2 y C2-C6 han permitido la detección de una variante (HVOs-1 μ var) asociada a episodios de mortalidad elevada descritos en Europa desde 2008 (Segarra *et al.*, 2010). Esta cepa de HVOs-1 se designó como HVOs-1 μ var.

El agente etiológico está representado por todas las cepas del herpesvirus de los ostreidos 1 (Arzul *et al.*, 2001b; Davison *et al.*, 2005, Moss *et al.*, 2007, Segarra *et al.*, 2010).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

No se conoce el tiempo de supervivencia máximo fuera del hospedador.

Schikorski *et al.* (2011a; 2011b) presentaron datos sobre la detección mediante PCR en tiempo real del ADN de HVOs-1 μ var en agua de mar tras experimentos de cohabitación. El número de copias del ADN del virus en el agua en las primeras 48 horas siguientes a la inyección del virus en larvas alcanzó 1×10^5 ml⁻¹, y llegó a un máximo de 1×10^6 ml⁻¹ tras la infección de ostras en cohabitación. La cantidad de virus infecciosa no se conoce.

2.1.3. Estabilidad del agente

La falta de cultivos celulares para el HVOs-1 ha hecho que no se hayan llevado a cabo estudios *in vitro* sobre la estabilidad del virus respecto a la infectividad. Como alternativa, se inoculó en agua de mar el ADN vírico extraído y se detectaron 10 pg μ l⁻¹ durante 16, 9 y 1 día a 4, 11 y 20°C respectivamente, y en un segundo experimento, se detectaron 100 pg μ l⁻¹ después de 51 días a cada temperatura.

El periodo de tiempo más largo para la detección de ADN en el HVOs-1 liberado a partir de larvas maceradas e inoculado en agua de mar fue de 22 días a 4°C y de 12 días a 20°C (Vigneron *et al.*, 2004). Sin embargo, la relación entre la detección del ADN en la PCR y la infectividad del virus no se conoce. Como regla general, la supervivencia de muchos virus de animales acuáticos fuera del hospedador es máxima a temperaturas más bajas.

2.1.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida es directo, de hospedador a hospedador (Le Deuff *et al.*, 1994; Schikorski *et al.*, 2011a; 2011b).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Ostra del Pacífico, *C. gigas*, ostra portuguesa, *C. angulata*, ostra de Suminoe, *C. ariakensis*, ostra europea, *O. edulis*, almeja de Manila, *R. philippinarum*, *R. decussates*, péctenes, *P. maximus* (Arzul *et al.*, 2001a; 2001b; Renault *et al.*, 2000).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

La infección por HVOs-1 causa mortalidad en las larvas y los juveniles de varias especies de bivalvos. El virus puede identificarse en bivalvos adultos, la mayor parte de las veces sin que haya mortalidad.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

Crassostrea gigas, *O. edulis*, *R. philippinarum*, *R. decussates* y *P. maximus* sufren infecciones naturales. Las fases iniciales, incluida larvas y juveniles, parecen ser más susceptibles a la infección. El virus se detecta con mayor facilidad en animales moribundos en comparación con los sanos.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Las lesiones asociadas a la infección en los juveniles se observan principalmente en tejidos conjuntivos de todos los órganos (manto, branquias, glándula digestiva, palpos labiales, etc.) en los que las células de tipo fibroblástico muestran unos núcleos agrandados con cromatina perinuclear (Arzul *et al.*, 2002; Lipart & Renault, 2002; Renault *et al.*, 1995; Schikorsky *et al.*, 2011a).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Se ha demostrado que las ostras aparentemente sanas, incluidos los individuos adultos, muestran una PCR positiva para HVOs-1 (Arzul *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2007, Sauvage *et al.*, 2009). Pépin *et al.* (2008) observaron que el número de copias de ADN mg⁻¹ era elevado (hasta 10⁷) en las ostras procedentes de poblaciones con mortalidades anormales, y era bajo (número más bajo detectado 10¹) en poblaciones sin mortalidades anormales. La determinación de los niveles de ADN vírico en las ostras, mediante PCR cuantitativa (qPCR) podría ser un medio de diferenciar entre portadores mecánicos del virus y un nivel bajo de infección.

Dado que el virus (ADN, proteína o partículas) se ha detectado en tejidos de ostras adultas, incluido el tejido gonadal (Arzul *et al.*, 2002, Lipart & Renault, 2002), los individuos adultos pueden ser un origen de la infección para las larvas, en especial si los animales progenitores están en situación de estrés, por ejemplo por una temperatura elevada (Le Deuff *et al.*, 1996). Sin embargo, lo que no está claro es si se produce una verdadera transmisión vertical (transmisión por los gametos) o si la transmisión es horizontal (Barbosa-Solomieu *et al.*, 2005).

2.2.6. Vectores

No son necesarios vectores: el ciclo de vida es directo.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Hay varias especies de bivalvos que pueden actuar como portadores sanos (véase el Apartado 2.2.3).

Recientemente se ha detectado ADN de HVOs-1 μ var en Francia en el mejillón común, *Mytilus edulis*, y en *Donax trunculus* (Renault, comunicación personal). Sin embargo, en estos casos, no se sabe todavía si estas especies de bivalvos son susceptibles, resistentes o pueden actuar como vectores.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Se ha detectado el ADN de HVOs-1 mediante PCR en tiempo real en el agua de alrededor de ostras del Pacífico enfermas (Sauvage *et al.*, 2009) y la enfermedad puede ser transmitida experimentalmente a través del agua (Schikorski *et al.*, 2011a). Este es, presumiblemente, el principal modo natural de transmisión del HVOs-1.

El primer estudio publicado fue el de Le Deuff *et al.* (1994), que describieron una transmisión rápida del virus desde un extracto de larvas enfermas a larvas axénicas de *C. gigas*. Se demostró la transmisión entre especies, desde larvas axénicas de *C. gigas* infectadas a larvas axénicas de *C. rivularis* y *Ostrea edulis* en condiciones experimentales (Arzul *et al.*, 2001b). Se comprobó que una suspensión de HVOs-1 procedente de *R. philippinarum* infectaba a larvas axénicas de *C. gigas*, y que una suspensión del virus procedente de *C. gigas* infectaba a las larvas axénicas de *C. angulata* (Arzul *et al.*, 2001b).

La transmisión experimental de HVOs-1 μ var ha sido descrita por Schikorski *et al.* (2011a; 2011b). La enfermedad puede ser transmitida a las larvas a 22°C tras la inyección intramuscular de un extracto de ostras con infección natural, y también mediante la cohabitación de ostras inyectadas con ostras sanas. Con el empleo de qPCR, se demostró que el virus entra en la glándula digestiva y en el sistema hemolinfático, tras lo cual el virus se disemina a otros órganos.

2.3.2. Prevalencia

Las tasas de mortalidad descritas varían considerablemente en distintos lugares y países, y dependen de la edad de las poblaciones afectadas. Para comprender mejor la implicación del HVOs-1 en los brotes epidémicos de mortalidad de larvas de *C. gigas* que se describen de forma regular de forma natural y en precriaderos en Francia, se obtuvieron muestras anualmente a través de la Red Nacional Francesa de Vigilancia de la Salud de los Moluscos, entre 1997 y 2006 (García *et al.*, 2011). Se llevaron a cabo análisis mediante PCR para la detección del HVOs-1. El ADN del virus se detectó con frecuencia en muestras obtenidas durante los brotes de mortalidad, y la frecuencia de detección del HVOs-1 osciló entre el 9% y el 65%, según el año. Los datos obtenidos mostraron también una especial estacionalidad y una topografía de la mortalidad de las larvas de ostras asociada a la detección del HVOs-1. En condiciones de campo, los brotes epidémicos de mortalidad aparecían en verano, preferentemente en entornos resguardados. La mayoría se producían en forma de focos puntuales, mientras que en los precriaderos eran rápidos y masivos.

Más recientemente se han presentado notificaciones de un aumento de la mortalidad (del 40% al 100%) en el período de 2008–2011 en Europa, que han afectado a ostras del Pacífico. Estos aumentos de la mortalidad se asociaron al surgimiento de la cepa HVOs-1 μ var. Se detectó la cepa HVOs-1 μ var en la mayor parte de las muestras estudiadas.

2.3.3. Distribución geográfica

Europa (Francia, Irlanda, Italia, Holanda, España, Reino Unido), Australia, China (República Popular de), Corea, Japón, Marruecos, México, Nueva Zelanda y Estados Unidos de América.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La infección producida por todas las cepas es con frecuencia mortal para las larvas y juveniles de *C. gigas*. La muerte suele producirse 1 semana después de la infección, durante el período anual de mayor temperatura del agua, o poco después (Friedman *et al.*, 2005; García *et al.*, 2011; Renault *et al.*, 1994b).

Las larvas infectadas muestran una disminución de la actividad de alimentarse y nadar, y la mortalidad puede alcanzar un 100% en unos pocos días.

2.3.5. Factores ambientales

La mortalidad asociada a la detección del HVOs-1 es más frecuente durante el verano, lo cual podría sugerir una relación entre la temperatura del agua de mar y la infección por HVOs-1. La temperatura influye en la detección del HVOs-1 y en la expresión del virus, tal como se ha demostrado en larvas de *Crassostrea gigas* (Le Deuff *et al.*, 1996) y se sospecha claramente que es así en larvas de *C. gigas* (Burge *et al.*, 2007; Friedman *et al.*, 2005; Renault *et al.*, 1995; Sauvage *et al.*, 2009). Parece difícil definir de manera precisa un umbral de temperatura relativo a la expresión o la aparición de mortalidad por HVOs-1. En la literatura científica, según el lugar, el umbral de temperatura ha sido diferente: 22°C a 25°C en la costa Oeste de los Estados Unidos (Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2007) y 18 a 20°C en Francia (Samain *et al.*, 2007; Soletchnik *et al.*, 1999;). Las temperaturas elevadas del agua de mar parecen ser uno de los posibles factores inductores de la infección por HVOs-1.

Además, las condiciones causantes de estrés, y en especial las técnicas de crianza, parecen favorecer la infección por HVOs-1. En Francia, durante el verano, se producen muchos traslados de ostras y ello podría amplificar también la transmisión del HVOs-1.

Los brotes epidémicos de mortalidad de las larvas asociados a la detección del HVOs-1 han presentado generalmente una distribución moteada en condiciones de campo. Este patrón concreto podría explicarse en parte por la naturaleza del virus. Los virus herpes tienen envoltura y ello hace suponer que tienen una resistencia débil a su entorno. En consecuencia, su transmisión se produce generalmente por contactos directos. Estos datos sugieren que cuando el HVOs-1 es excretado por las ostras, puede infectar principalmente a otras ostras situadas en la proximidad. La probable diseminación limitada del OsVH-1 en el agua de mar podría explicar en parte la observación de la distribución moteada de la mortalidad, en vez de una distribución uniforme como se observa en los precriaderos. En los precriaderos, las ostras son cultivadas en densidades elevadas, están muy próximas entre sí y a menudo se va renovando secuencialmente el agua de mar.

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

Ninguna

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Ninguno

2.4.3. Inmunoestimulación

Ninguna

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Según indican datos recientes, se ha demostrado que pueden obtenerse familias de ostras del Pacífico resistentes o con tolerancia al HVOs-1 (Sauvage *et al.*, 2009).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Ninguna

2.4.6. Agentes bloqueantes

Ninguno

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Ninguna

2.4.8. Prácticas generales de manejo

La bioseguridad puede aplicarse con éxito en instalaciones confinadas y controladas, como viveros y precriaderos, con objeto de proteger las instalaciones y el entorno de las mismas de la introducción del virus.

Al tratarse de un herpesvirus, cabe suponer que el HVOs-1 es frágil fuera de sus hospedadores. La temperatura elevada, las sustancias químicas o la luz solar (UV) pueden destruir su cubierta de contenido lipídico. Sin embargo, se ha demostrado que cada especie individual de virus herpes puede tener una

estabilidad diferente frente al tratamiento de inactivación y que las sales inorgánicas como Na_2SO_4 presentes en el agua de mar pueden estabilizar los virus herpes (Wallis & Melnick, 1965).

En condiciones de cría controladas (vivero/precriadero de moluscos), los brotes epidémicos de HVOs-1 pueden controlarse, pues, mediante una cuarentena y medidas de higiene como la inactivación del virus mediante el uso de tratamientos adaptados, como la irradiación ultravioleta del agua de recirculación y las tecnologías de filtración del agua. Sin embargo, es necesario tener presente que la reducción de la carga vírica depende del título inicial y de la capacidad de reducción del virus que tengan las técnicas utilizadas para la inactivación. Si hubiera una concentración inicial de 1 millón de virus por litro y el método de inactivación utilizado permitiera la activación de 100.000 virus por litro, continuaría habiendo numerosas partículas infecciosas en el producto tratado.

Las otras moribundas o muertas deben ser destruidas siempre que sea posible. El equipo utilizado en una zona infectada no debe ser enviado y utilizado en una zona no afectada sin una limpieza y desinfección adecuadas.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Deben obtenerse muestras de individuos vivos o moribundos.

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Para la histología, el mejor conservante es el AFA de Davidson, pero también es aceptable el uso de formol tamponado al 10% o el de otros fijadores estándar de histología. Para los análisis de PCR, las muestras deben conservarse en etanol al 95%-100% o guardarse congeladas (-80°C).

3.3. Combinación de varias muestras

La combinación de larvas pequeñas es aceptable para los análisis de PCR/PCR en tiempo real. Sin embargo, no se ha evaluado el efecto de combinar muestras sobre la sensibilidad de la PCR/PCR en tiempo real.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Para la histología, se utiliza un corte de tejido de 5 μm de grosor a través de la masa visceral, que incluya glándula digestiva, branquia y manto. Para la PCR, lo mejor es utilizar tejido del manto.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos gonadales pueden no ser fiables para los análisis de PCR debido a la presencia de inhibidores.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Las infecciones producidas por HVOs-1 causan una enfermedad aguda. Es probable que los animales mueran en el plazo de unos pocos días tras presentar signos clínicos de la enfermedad. Los signos clínicos pueden ser bivalvos muertos o moribundos, pero dichos signos no son específicos de la infección por HVOs-1.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los hospedadores infectados pueden mostrar una lentitud en el cierre de las valvas cuando se les perturba, pero estas alteraciones del comportamiento no son específicas de la infección por HVOs-1.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los signos clínicos pueden ser bivalvos muertos o moribundos, pero dichos signos no son específicos de la infección por HVOs-1.

4.2.2. Bioquímica clínica

Ninguna

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Véase el Apartado 4.2.6. Cortes fijados

4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicable

4.2.5. Frotis

No aplicable

4.2.6. Cortes fijados

Las manifestaciones más uniformes de la infección por HVOs-1 son las alteraciones nucleares, incluidas las de hipertrofia, marginación nuclear y picnosis. Las lesiones asociadas a la infección en las larvas se observan principalmente en los tejidos conjuntivos en los que las células fibroblásticas muestran un aumento de tamaño de los núcleos con cromatina perinuclear. Se han descrito también núcleos muy condensados (característica propia de la apoptosis) en otras células que se interpretaron como hemocitos. Estas anomalías celulares no se asocian a una infiltración hemocitaria masiva.

El examen histológico del animal no es de por sí suficiente para identificar un virus herpes. Aunque las inclusiones de Cowdry tipo A (inclusiones intranucleares eosinófilas con cromatina perinuclear) son características de muchas infecciones por virus herpes, no constituyen una característica diagnóstica de las infecciones por virus herpes de las ostras (Arzul *et al.*, 2002). Las inclusiones de Cowdry tipo A no se han descrito nunca tras el examen histológico de ostras del Pacífico infectadas en Francia (Renault *et al.*, 1994a; 1994b). Además, no se observaron cuerpos de inclusión intranucleares, aunque sí hubo otras alteraciones celulares/nucleares, de manera asociada a las infecciones por HVOs-1 en ostras en México (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010) o Estados Unidos (California) (Friedman *et al.*, 2005).

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Véase el Apartado 4.3.1.1.4.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No aplicable

4.3.1.1.2. Frotis

No aplicable

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Muestras a obtener: ostras vivas o moribundas.

Procedimiento técnico: deben fijarse cortes de tejido que incluyan manto, glándula digestiva, branquias y músculo aductor durante 24 horas en fijadores de formaldehído al 10% como AFA de Davidson u otro fijador apropiado, seguido de un procesado normal para histología en parafina y

tinción con hematoxilina y eosina. Las observaciones se realizan a aumentos crecientes de hasta $\times 400$.

Controles positivos: se recomiendan y pueden obtenerse del Laboratorio de Genética y Anatomopatología (Ifremer, La Tremblade, Francia). Los controles positivos son cortes de tejido de cualquier molusco infectado por el HVOs-1.

Niveles de validación:

- *Especificidad y sensibilidad:* la especificidad es muy baja y la sensibilidad es buena para las infecciones de intensidad moderada a alta, pero es baja para las infecciones de intensidad baja.
- *Método de referencia:* ninguno

Interpretación de los resultados:

- Un resultado positivo es la presencia de anomalías celulares en los cortes de tejido: células de tipo fibroblástico que muestran núcleos agrandados con cromatina perinuclear. Se describen también núcleos muy condensados en otras células que se interpretan como hemocitos. Estas anomalías celulares no se asocian a una infiltración hemocítica masiva.
- En especies hospedadoras susceptibles, dentro del ámbito de distribución conocido del HVOs-1, un resultado positivo es un dato a favor del diagnóstico provisional de infección por HVOs-1, pero debe ser confirmado mediante PCR específica para la especie, hibridación *in-situ* (ISH) y/o secuenciación de ADN.

Disponibilidad de pruebas comerciales: no hay pruebas comerciales disponibles.

4.3.1.1.4. Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica de transmisión puede utilizarse para confirmar la presencia de partículas víricas en los animales infectados.

Las muestras de tejido (con contenido de tejido conjuntivo como el del manto) para el examen mediante microscopía electrónica deben fijarse con glutaraldehído al 2,5%(vol/vol) en tampón de cacodilato 0,1 M y debe post fijarse en tetróxido de osmio al 1% (peso/vol), lavarse en tampón de cacodilato 0,1 M (3 \times 10 minutos), deshidratarse en una serie gradual de etanol (70%, 1 \times 10 minutos; 95%, 2 \times 15 minutos; 100%, 3 \times 20 minutos), lavarse en óxido de propileno (2 \times 15 minutos), prefiltrarse en óxido de propileno al 50%/resina Epon al 50% (1 hora), infiltrarse en resina Epon al 100% (1 hora) y luego incluirse en resina Epon.

La replicación del HVOs-1 tiene lugar principalmente en células de tipo fibroblástico de todos los tejidos conjuntivos especialmente los del manto, palpos labiales, branquias y glándula digestiva (Renault *et al.*, 1994b; 1995). La virogénesis se inicia en el núcleo de las células infectadas en donde se observan cápsides y nucleocápsides. A continuación, las partículas víricas atraviesan la membrana nuclear para pasar al citoplasma y se liberan partículas con envoltura en la superficie de la célula. Las cápsides intranucleares y citoplasmáticas aparecen en distintos tipos morfológicos, incluidas las cápsides electrotransparentes, las cápsides con contenido de un núcleo interior toroidal y las cápsides con contenido de un núcleo interior en forma de ladrillo.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Hasta la fecha, los intentos de cultivar el virus en líneas celulares de vertebrados e invertebrados y en cultivos celulares primarios de bivalvos han sido infructuosos.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

Se han desarrollado anticuerpos específicos (Arzul *et al.*, 2002). Sin embargo, en la actualidad no están disponibles para fines diagnósticos.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

En la actualidad existen varios métodos de PCR diferentes para la detección de HVOs-1, así como métodos en tiempo real (Martenot *et al.*, 2010; Pépin *et al.*, 2008).

Inicialmente se desarrolló un protocolo para la cuantificación del HVOs-1 en ostras del Pacífico, basado en una PCR en tiempo real Sybr[®]Green (Pépin *et al.*, 2008). Martenot *et al.* (2010) desarrollaron un protocolo alternativo basado en la química TaqMan[®]. Los límites de cuantificación

eran de 1000 y 18 UG mg⁻¹ de tejidos para el método basado en Sybr[®]Green y el método TaqMan[®], respectivamente, y el segundo de estos protocolos tiene un límite de detección de 6 UG mg⁻¹ de tejidos. Al comparar los dos protocolos con el empleo de muestras de ADN obtenidas de 210 larvas, el índice kappa (0,41) indicó una concordancia moderada entre los protocolos, según las medidas de Landis y Koch. Todas las muestras que eran positivas según el protocolo de referencia lo fueron también con el protocolo alternativo. De las 76 muestras que fueron negativas con el protocolo de referencia, 49 fueron positivas con el protocolo alternativo. Aunque estos resultados pueden sugerir que el protocolo alternativo puede ser más sensible que el de referencia, es necesaria una validación formal.

Se desarrolló también un análisis de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección del ADN de HVOs-1 (Ren *et al.*, 2010). Se diseñó un conjunto de cuatro cebadores, basados en la secuencia de la subunidad de ATPasa del gen de la terminasa de empaquetado de ADN del HVOs-1. Esta técnica de LAMP puede usarse tanto en el laboratorio como en granjas.

Muestras a obtener: moluscos vivos o moribundos. Se obtienen larvas (100–200 mg), larvas pequeñas (100–200 mg) o fragmentos de tejido de 2–3 mm² extirpados asépticamente del manto, y se colocan en tubos de 1,5 ml, se conservan en alcohol de 95° o se guardan congelados (–80°C). Los instrumentos de disección deben pasarse por la llama entre una muestra y otra para evitar la contaminación cruzada.

4.3.1.2.3.1. Análisis de PCR convencionales

Se han utilizado con éxito análisis de PCR convencionales para la detección del ADN del HVOs-1 en bivalvos y se han diseñado pares de cebadores diferentes (véase la revisión del tema de Batista *et al.*, 2007).

Se diseñaron dos pares de cebadores (A3/A4 y A5/A6) que se utilizaron para detectar el ADN vírico en larvas de ostras del Pacífico mediante una PCR anidada (Renault *et al.*, 2000a). La especificidad de estos pares de cebadores se evaluó con el empleo de ADN de *C. gigas* así como ADN procedente de herpesvirus de vertebrados; se detectaron de forma ordinaria 500 fg de ADN del virus extraído de partículas purificadas. El análisis de PCR en un solo paso con el par de cebadores A3/A4 no solo permitió la amplificación del ADN de HVOs-1 sino también la detección de una variante de este virus (HVOs-1var) en larvas de *C. gigas* y *R. philippinarum* (Arzul *et al.*, 2001c).

Posteriormente se diseñaron otros cebadores incluidos los C2/C6. La combinación de los pares de cebadores A3/A4 y A5/A6 permitió una amplificación de PCR inferior a la de C2/C6 (21,4% frente a 32,4%) cuando se analizaron las mismas muestras de larvas (Renault & Arzul, 2001). El par de cebadores C2/C6 permitió sistemáticamente la detección de 1 fg de ADN vírico purificado (Renault *et al.*, 2004). Se ha descrito un límite de detección de 10 fg del ADN vírico purificado para los dos pares de cebadores C13/C5 y Gp3/Gp4 (Vigneron *et al.*, 2004). Una cantidad de tan solo 1 pg y 10 pg permitió amplificar de manera detectable un producto específico con los pares de cebadores C9/C10 y HVOsDPFor/HVOsDPRev, respectivamente (Webb *et al.*, 2007).

Aunque la especificidad de la PCR ha sido evaluada para algunos de los pares de cebadores utilizados para detectar el ADN del virus (véase más arriba), no se ha hecho así para todos los pares de cebadores diseñados. Además, las condiciones de amplificación que se han utilizado en los análisis de PCR con el empleo de diferentes pares de cebadores se han basado en las condiciones optimizadas para A3/A4 y A5/A6 (Renault *et al.*, 2000a). Batista *et al.* (2007) han propuesto un esquema de procedimiento experimental para la detección del ADN de HVOs-1 mediante PCR convencional.

4.3.1.2.3.2. Análisis de PCR específico para HVOs-1 Sybr[®]Green (Pepin *et al.*, 2008)

Se colocan 50 mg de larvas/tejido de manto en 50 µl de agua doblemente destilada, utilizando un émbolo desechable. Los tejidos chafados se diluyen seis veces y se esclarecen a 10.000 g durante 5 minutos. Se tratan 100 µl del sobrenadante recuperado, utilizando un kit de ADN de tejido comercial (QIAGEN – QIAMP tissue mini kit[®]) según el protocolo indicado por el fabricante. La elución final del ADN se realiza con 100 µl del tampón TE. El ADN se conserva a –20°C. Antes de los experimentos de PCR, pueden medirse las concentraciones de ADN a partir de la absorbancia a 260 nm. Según la concentración total de ADN medida en las muestras, se diluyen para obtener 20 ng de ADN total por reacción de PCR.

Pueden usarse tres conjuntos de cebadores dirigidos a tres regiones del ADN vírico: ORF4, ORF88 y ORF99. Los pares de cebadores B4/B3 (Arzul *et al.*, 2001a; ORF99 que codifica una proteína BIR) y C9/C10 (Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004; ORF4) se diseñaron anteriormente para una sola PCR, mientras que el par de cebadores Gp4/Gp7 (ORF88 que codifica una proteína de

membrana de clase I) se evaluó para la PCR en tiempo real. Los pares de cebadores B4/B3, C9/C10 y Gp4/Gp7 produjeron productos de PCR de 207, 197 y 85 pb, respectivamente.

B4: 5'-ACT-GGG-ATC-CGA-CTG-ACA-AC-3'

B3: 5'-GTG-GAG-GTG-GCT-GTT-GAA-AT-3'

C9: 5'-GAG-GGA-AAT-TTG-CGA-GAG-AA-3'

C10: 5'-ATC-ACC-GGC-AGA-CGT-AGG-3'

Gp4: 5'-GGC-GTC-CAA-ACT-CGA-TTA-AA-3'

Gp7: 5'-TTA-CAC-CTT-TGC-CGG-TGA-AT-3'

El par de cebadores C9/C10 produjo unos parámetros fiables para la PCR en tiempo real con ADN del HVOs-1, al igual que el par de cebadores B3/B4, que muestra unos parámetros muy similares, con un valor de E ligeramente inferior (96,3%). El par de cebadores Gp4/Gp7 es menos eficiente ($E = 91,3\%$) y menos sensible (≥ 50 copias μl^{-1}). El par de cebadores C9/C10 parece ser el más sensible y eficiente

También puede utilizarse un par de cebadores adicional DPFor/DPRev que produce un producto de 197 pb (ORF100, ADN polimerasa).

DPFor: 5'-ATT-GAT-GAT-GTG-GAT-AAT-CTG-TG-3'

DPRev: 5'-GGT-AAA-TAC-CAT-TGG-TCT-TGT-TCC-3'

Es importante un análisis dirigido a un ADN de HVOs-1 diferente para definir de manera más precisa las cepas víricas aisladas. Aunque el ORF4 es un candidato interesante para describir la diversidad, puesto que se ha descrito ya un polimorfismo vírico en esta área, el ORF100 (ADN polimerasa) parece ser menos polimorfo.

Todas las reacciones de amplificación se realizan en un volumen total de 25 μl con bandejas de 96 micropocillos. Cada pocillo (25 μl) contiene 5 μl de la dilución de ADN extraído (muestra) o de ADN genómico de HVOs-1 (control positivo), 12,5 μl de Brilliant® SYBR® Green I PCR Master Mix o FullVelocity® Master Mix (Stratagene), 2,5 μl de cada cebador diluido (concentración final 200 nM) y 2,5 μl de agua destilada. Las condiciones de ciclo térmico son las siguientes: 1 ciclo de preincubación a 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 30 segundos (15 segundos con FullVelocity® Master Mix), 60°C durante 45 segundos (30 segundos con FullVelocity® Master Mix) y 72°C durante 45 segundos con Brilliant® Master Mix; y análisis de la curva de temperatura de fusión a 95°C durante 60 segundos, 60°C durante 30 segundos y 95°C durante 30 segundos. El análisis de PCR en tiempo real debe realizarse por triplicado con 5 μl de diluciones de la muestra como plantilla de ADN o un control de ADN vírico.

La cuantificación absoluta de las copias de ADN de HVOs-1 (copias μl^{-1}) se lleva a cabo comparando los valores de CT obtenidos con la curva estándar, utilizando el programa informático Thermocycler. Cada experimento incluye un control de ADN positivo (ADN genómico de HVOs-1 para la cuantificación absoluta) y controles sin contenido (NTC, control sin plantilla consistente en agua estéril desionizada). La eficiencia de la PCR (E) se calcula a partir de curvas estándar como el porcentaje de las moléculas de plantilla que se dobla durante cada ciclo ($[10^{-1/\text{pendiente}} - 1] \times 100$), con la exigencia de que se encuentre en el intervalo del 95%–105% y de que el coeficiente de determinación (R^2) sea $>0,98$. Para permitir la detección de productos inespecíficos, se aplica un protocolo de disociación (curva de fusión) tras los ciclos de amplificación. Se registra la temperatura a la que se genera fluorescencia en SYBR®Green mediante la disociación del amplicón de doble hebra.

Se consideró la sensibilidad para detectar sistemáticamente 4 copias de ADN μl^{-1} . Se estimó el intervalo dinámico para la PCR en tiempo real a partir de varios análisis de curva estándar y se obtuvo una relación lineal entre el número de copias la plantilla de ADN viral introducido y el valor de CT para diluciones de más de 5 log 10. Se podía cuantificar el número de copias de ADN de HVOs-1 de al menos de 10 a 5×10^6 copias μl^{-1} .

3.1.2.3.3. Análisis de PCR específico para HVOs-1 con TaqMan® (Martenot et al, 2010)

La diana fue la región B del genoma del HVOs-1, que codifica un presunto inhibidor de la apoptosis (Arzul *et al.*, 2001b). Se diseñaron pares de cebadores y dos sondas TaqMan® para detectar simultáneamente el gen diana y un control interno (CI). El CI fue una secuencia sintetizada que contenía en cada extremo los cebadores directo HVOs1BF (5'-GTC-GCA-TCT-TTG-GAT-TTA-ACA-A-3') e inverso B4 (5'-ACT-GGG-ATC-CGA-CTG-ACA-AC-3'). El cebador B4 utilizado para la PCR de TaqMan fue el mismo que publicaron Pepin *et al.* (2008).

La amplificación de la región diana y el CI se realizaron con el empleo de los cebadores directos HVOs1BF y B4. Las sondas B (5'-TGC-CCC-TGT-CAT-CTT-GAG-GTA-TAG-ACA-ATC-3') y del CI (5'-ATC-GGG-GGG-GGG-GGT-TTT-TTT-TTT-ATC-G-3') se marcaron en el extremo 5' con los colorantes informadores fluorescentes TxR y FAM, respectivamente, y el extremo 3' con un desactivador apropiado (BHQI o BHQII).

La mezcla de reacción contenía 12,5 µl de la premezcla de ExTaq[®] 2× Takara[®] (Lonza, Verviers, Bélgica), 0,5 µl de cada cebador (20 µM), 0,5 µl de sondas TaqMan[®] (10 µM) y 9 µl de agua. Se añadieron 2 µl de muestra de ADN a 23 µl de la mezcla de reacción. La amplificación se realizó en dos fases, en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95°C durante 10 segundos, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos. La cuantificación del virus se llevó a cabo mediante la comparación con valores de curvas estándar.

4.3.1.2.3.4. Hibridación *in situ* específica para HVOs-1

El procedimiento de hibridación *in-situ* (ISH) descrito aquí utiliza una sonda de ADN marcada con digoxigenina (DIG) para detectar el HVOs-1 en tejido incluido en parafina y fijado con formol (Arzul *et al.*, 2002; Lipart & Renault 2002). Este análisis puede detectar cepas genéricas y emergentes.

Deben fijarse cortes de tejido que incluyan en manto, glándula digestiva, branquias y músculo aductor durante 24 horas en AFA de Davidson u otro fijador apropiado, y deben procesarse con los procedimientos estándar para el examen histológico.

Se utilizan cortes de 7 µm de grosor en preparaciones con silane-prepTM que se descieran en xileno (2 × 5 minutos), se tratan con etanol absoluto (2 × 5 minutos) y se secan al aire a temperatura ambiente (15 minutos). A continuación se permeabilizan los cortes con proteinasa K (100 µg ml⁻¹ en agua destilada) durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. La proteólisis se interrumpe mediante un solo lavado de 3 minutos en tampón de Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M (pH 7,5) a temperatura ambiente. Los cortes se deshidratan en etanol de 95° durante 1 minuto, etanol absoluto durante 1 minuto y se secan al aire (15 minutos).

Se realiza un paso de prehibridación con un tampón de prehibridación (formamida al 50%, dextrano sulfato al 10%, 4 × SSC [Na₃citrato 0,06 M, NaCl 0,6 M, pH 7], 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura y Denhart al 10%) durante 30 minutos a 42°C en cámara húmeda. La solución tampón de prehibridación se sustituye por 100 µl de solución tampón de hibridación que contiene 50 µl de sonda marcada con digoxigenina (5 ng µl⁻¹) y 50 µl de tampón de hibridación (formamida al 50%, dextrano sulfato al 10%, 4× SSC, 250 µg ml⁻¹ de ARNt de levadura y Denhart al 10%). Se cubren las preparaciones con cubreobjetos de plástico (Polylabo, Francia). Las sondas marcadas con DIG se sintetizan a partir de ADN genómico de HVOs-1 (100 pg por reacción) mediante la incorporación de digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Alemania) durante la PCR convencional. Se utiliza el par de cebadores C1/C6:

C1: 5'- TTC-CCC-TCG-AGG-TAG-CTT-TT -3'

C6: 5'- GTG-CAC-GGC-TTA-CCA-TTT-TT -3'

El ADN diana y la sonda marcada con digoxigenina se desnaturalizan a 95°C durante 5 minutos y la hibridación se lleva cabo durante una noche a 42°C en cámara húmeda.

Tras la hibridación, se retiran cuidadosamente los cubreobjetos y se lavan las preparaciones durante 10 minutos en 1 × SSC (BSA al 0,2%) a 42°C. Se detectó la sonda unida de forma específica con el empleo de un anticuerpo IgG de ratón conjugado con peroxidasa para la digoxigenina (Boehringer Mannheim, Alemania) a una dilución de 1:250 en 1 × PBS (1 hora a temperatura ambiente). Se retiró el anticuerpo conjugado con peroxidasa no unido mediante seis lavados en 1 × PBS (5 minutos). Se diluyó tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) en 1 × PBS (0,7 mg ml⁻¹). Se añadió la solución de color a los cortes de tejido (500 µl) y se realizó una incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos. La reacción se interrumpió con dos lavados con 1 × PBS. Las preparaciones se tñeron durante 20 segundos en Unna Blue (RAL, Francia) seguido de una deshidratación con etanol y un montaje en Eukitt utilizando un paso por xileno.

La tinción intracelular de color marrón oscuro específica es indicativa de la presencia de ADN vírico.

Se han analizado 30 individuos adultos de ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas*, utilizando tres técnicas diferentes: PCR, ISH e inmunohistoquímica, para la detección del HVOs-1 en individuos asintomáticos (Arzul *et al.*, 2002). La PCR y la ISH permitieron la detección del ADN del virus herpes en las ostras en

el 93,3% y 86,6%, respectivamente, de las ostras analizadas, mientras que los anticuerpos policlonales permitieron la detección de proteínas víricas en el 76,6% de las ostras adultas analizadas.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

El HVOs-1 puede purificarse a partir de animales infectados con el empleo de una técnica desarrollada anteriormente (Le Deuff & Renault, 1999)

4.3.2. Métodos serológicos

Ninguno aplicable

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

En el caso de que se observe cromatina perinuclear mediante histología, debe usarse como mínimo microscopía electrónica para identificar cualquier partícula de tipo vírico presente y mostrar su localización dentro de las células. Los virus observados al ME deben describirse, por ejemplo como de tipo virus herpes, mientras se realizan otros análisis para obtener nuevos datos que permitan la identificación del virus. Dado que virus herpes diferentes son morfológicamente similares, un virus solamente debe describirse como HVOs-1 si se ha demostrado su identidad con este último mediante el empleo de cebadores o sondas específicas para el HVOs-1.

Para el HVOs- 1, la presencia de proteínas víricas intracelulares, ARN mensajero específico del HVOs-1, proteínas no estructurales y una MET que muestre viriones en el interior de las células constituyen datos indicativos de una replicación, pero la detección de la presencia del virus mediante la PCR sola no tiene este valor. Dado que muchas ostras moribundas/muertas procedentes de poblaciones con mortalidades anormales tenían un número elevado de copias de ADN vírico, es posible que en algunos casos se puedan extrapolar estos datos para inferir que el HVOs-1 se ha replicado en los animales (de especies hospedadoras conocidas o nuevas) con estos niveles elevados de ADN vírico. Sin embargo, es necesaria una evaluación y validación rigurosa antes de poder usar estos datos de esta forma.

Puede ser posible demostrar la viabilidad mediante un bioanálisis de pase a un hospedador susceptible con animales de control apropiados. La detección de la mortalidad o de alteraciones características asociadas a la detección del virus es una consideración importante en la evaluación, pero no es un dato concluyente que indique la susceptibilidad del hospedador. La localización anatómica del patógeno es importante también para descartar una posible contaminación pasiva del hospedador. Esta información puede obtenerse mediante técnicas como la MET, la inmunohistoquímica o la hibridación *in situ*.

A título de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia, la detección y el diagnóstico de la infección por HVOs-1 se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a =el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c= el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin.

Tabla 5.1. Métodos de vigilancia dirigida y diagnóstico

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	d	c	d
Bioanálisis	d	d	d	c	c
Histopatología	d	d	d	b	d
ME de transmisión	d	d	d	c	b
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	c	c
Sondas de ADN- <i>in situ</i>	c	c	c	c	b

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
PCR	a	a	a	a	b
PCR en tiempo real	a	a	a	a	b
Secuenciación	d	d	d	d	a

ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de polimerasa.

6. Prueba/s recomendada/s para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por HVOs-1

La prueba recomendada para la vigilancia dirigida es la PCR en tiempo real con ácidos nucleicos extraídos de muestras de bivalvos.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de infección por HVOs-1 es un resultado positivo mediante PCR o PCR en tiempo real.

7.2. Definición de caso confirmado

- i) En caso de mortalidad de especies susceptibles en un país, zona o compartimento en el que se haya detectado anteriormente HVOs-1, un caso confirmado de infección por HVOs-1 es un resultado positivo en uno de los siguientes métodos, PCR, PCR en tiempo real o ISH.
- ii) En otros casos, un caso confirmado es un resultado positivo de PCR o PCR en tiempo real dirigida a áreas diferentes del genoma vírico y confirmada mediante secuenciación de varios productos de PCR

8. Bibliografía

ARZUL I., NICOLAS J.-L., DAVISON A.J. & RENAULT T. (2001a). French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*, **290**, 342–349.

ARZUL I., RENAULT T., LIPART C. & DAVISON A.J. (2001b) Evidence for inter species transmission of oyster herpesvirus in marines bivalves. *J. Gen. Virol.*, **82**, 865–870.

ARZUL I., RENAULT T., THÉBAULT A. & GÉRARD A. (2002). Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.*, **84**, 151–160.

BARBOSA-SOLOMIEU V., DÉGREMONT L., VÁZQUEZ-JUÁREZ R., ASCENCIO-VALLE F., BOUDRY P. & RENAULT T. (2005). Ostreid herpesvirus 1 (HVOs-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Res.*, **107**, 47–56.

BARBOSA-SOLOMIEU V., MIOSSEC L., VÁZQUEZ-JUÁREZ R., ASCENCIO-VALLE F. & RENAULT T. (2004). Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and *in situ* hybridisation. *J. Virol. Methods*, **119**, 65–72.

BATISTA F.M., ARZUL I., PEPIN J.F., RUANO F., FREIDMAN C., BOUDRY P. & RENAULT T. (2007) Detection of ostreid herpesvirus-1 DNA in bivalve molluscs: a critical review. *J. Virol. Methods*, **139** (1), 1–11.

BURGE C.A., JUDAH L.R., CONQUEST L.L., GRIFFIN F.J., CHENEY D.P., SUHRBIER A., VADOPALAS B., OLIN P.G., RENAULT T. & FRIEDMAN C.S. (2007). Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: The influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.*, **26**, 163–172.

DAVISON A.J., EBERLE R., EHLERS B., HAYWARD G.S., MCGEOCH D.J., MINSON A.C., PELLETT P.E., ROIZMAN B., STUDDERT M.J. & THIRY E. (2009). The order Herpesvirales. *Arch. Virol.*, **154**, 171–177.

DAVISON A.J., TRUS B.L., CHENG N., STEVEN A.C., WATSON M.S., CUNNINGHAM C., LE DEUFF R.M. & RENAULT T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J. Gen. Virol.*, **86**, 41–53.

FRIEDMAN C.S., ESTES R.M., STOKES N.A., BURGE C.A., HARGOVE J.S., BARBER B.J., ELSTON R.A., BURRESON E.M. & REECE K.S. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Dis. Aquat. Org.*, **63** (1), 33–41.

GARCIA C., THEBAULT A., DEGREMONT L., ARZUL I., MIOSSEC L., ROBERT M., CHOLLET B., FRANÇOIS C., JOLY J.-P., FERRAND S., KERDUDOU N. & RENAULT T. (2011). HVOs-1 detection and relationship with *C. gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Vet. Res.*, **42**, 73–84.

LE DEUFF R.M., NICOLAS J.L., RENAULT T. & COCHENNEC N. (1994) Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 69–72.

LE DEUFF R.-M. & RENAULT T. (1999). Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.*, **80**, 1317–1322.

LE DEUFF R.-M., RENAULT T. & GERARD A. (1996). Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, **24**, 149–157.

LIPART C. & RENAULT T. (2002). Herpes-like virus detection in *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Methods*, **101**, 1–10.

MARTENOT C., ODEN E., TRAVAILLÉ E., MALAS J.P. & HOUSSIN M. (2010). Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Virol. Methods*, **70** (1–2), 86–99.

MOSS J.A., BURRESON E.M., CORDES J.F., DUNGAN C.F., BROWN G.D., WANG A., WU X. & REECE K.S. (2007). Pathogens in *Crassostrea ariakensis* and other Asian oyster species: implications for non-native oyster introduction to Chesapeake Bay. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 207–223.

PÉPIN J. F., RIOU A. & RENAULT T. (2008). Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 269–276.

REN W., RENAULT T., CAI Y. & WANG C. (2010) Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 DNA. *J. Virol. Methods*, **170**, 30–36.

RENAULT T., COCHENNEC N., LE DEUFF R.M. & CHOLLET B. (1994a) Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **14**, 64–66.

RENAULT T., LE DEUFF R.M., COCHENNEC N., CHOLLET B. & MAFFART P. (1995). Herpes-like viruses associated with high mortality levels in larvae and spat of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*: A comparative study, the thermal effects on virus detection in hatchery-reared larvae, reproduction of the disease in axenic larvae. *Vet. Res.*, **26**, 539–543.

RENAULT T., LE DEUFF R.-M., COCHENNEC N. & MAFFART P. (1994b). Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France – comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **145**, 735–742.

RENAULT T., LE DEUFF R.-M., LIPART C. & DELSERT C. (2000). Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Methods*, **88**, 41–50.

SAMAIN J.F., DEGREMONT L., SOLETCHEK P., HAURE J., BÉDIER E., ROPERT M., MOAL J., HUVET A., BACCA H., VAN WORMHOUDT A., DELAPORTE M., COSTIL K., POUVREAU S., LAMBERT C., BOULO V., SOUDANT P., NICOLAS J.L., LE ROUX F., RENAULT T., GAGNAIRE B., GERTET F., BOUTET I., BURGEOT T. & BOUDRY P. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, **268** (1–4), 227–243.

SAUVAGE C., PÉPIN J.F., LAPÈGUE S., BOUDRY P. & RENAULT T. (2009). Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: difference in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus Res.*, **142**, 181–187.

SCHIKORSKI D., FAURY N., PEPIN J.F., SAULNIER D., TOURBIEZ D. & RENAULT T. (2011a). Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Res.*, **155** (1), 28–34.

SCHIKORSKI D., RENAULT T., SAULNIER D., FAURY N., MOREAU P. & PEPIN J.F. (2011b). Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Vet. Res.*, **42**, 1–13.

SEGARRA A., PEPIN J.F., ARZUL I., MORGA B., FAURY N. & RENAULT T. (2010). Detection and description of a particular *Ostreid herpesvirus 1* genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Res.*, **153**, 92–95.

SOLETCHNIK P., LE MOINE O., FAURY N., RAZET D., GEAIRON P. & GOULLETQUER P. (1999). Mortalité de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléon : étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG), *Aquatic Living Resources.*, **12**, 131–143.

VÁSQUE YEOMANS R., GARCÍA-ORTEGA M. & CÁCERES-MARTÍNEZ J. (2010). Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 137–144.

VIGNERON V., SOLLIEC G., MONTANIE H. & RENAULT T. (2004). Detection of ostreid herpes virus 1 (HVOs-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 35–44.

WALLIS C. & MELNICK J. (1965). Thermostabilization and thermosensitization of herpesvirus. *J. Bacteriol.*, **90**, 1632–1637.

WEBB S.C., FIDLER A. & RENAULT T. (2007). Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (HVOs-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, **272**, 126–139.

*
* *