

## HERPESVIROSIS DEL ABALÓN

---

### 1. **Ámbito de aplicación**

A efectos de este capítulo, la ganglioneuritis viral del abalón (GVA) se considera una infección por el herpesvirus del abalón (HVAb).

### 2. **Información sobre la enfermedad**

#### 2.1. **Factores del agente**

El herpesvirus del abalón (HVAb) es el agente etiológico de la ganglioneuritis viral del abalón (GVA), una enfermedad contagiosa de especies de abalón de Australia (Ellard *et al.*, 2009; Hooper *et al.*, 2007) y posiblemente de especies de otros países (Chang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). La comparación entre las secuencias de nucleótidos del HVAb VIC y del Herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (Davidson *et al.*, 2009; Le Deuff & Renault, 1999) pertenecientes a regiones codificantes comunes ha identificado similitudes que oscilan entre el 19% y el 53%, lo cual indica que estos virus presentan un alto grado de similitud de la secuencia (Savin *et al.*, 2010), y se ha asignado provisionalmente a los Malacoherpesviridae como segundo miembro.

Al microscopio electrónico de transmisión, se observa que las partículas del HVAb purificadas (Tan *et al.*, 2008) presentan envoltura y son icosaédricas, con centros electrónicos densos y 100-110 nm de diámetro. La localización intranuclear de las partículas de HVAb, su tamaño y su ultraestructura son característicos de los miembros de la familia Herpesviridae. Mediante centrifugación por gradiente isopícnico (en gradientes de densidad de tartarato de potasio y cloruro de cesio) se observó una densidad de flotación de la partícula vírica de 1,17–1,18 g ml<sup>-1</sup> (Tan *et al.*, 2008).

##### 2.1.1. **El agente patógeno, cepas del agente**

Se han notificado herpesvirus asociados a enfermedad en los abalones en Taipei chino y en Australia. La comparación de las secuencias de nucleótidos del HVAb VIC y del HVAb de Taiwán a nivel de tres regiones comunes permitió identificar similitudes del 92,4%, 96,4% y 96,6%, lo cual indica que estos virus presentan un alto grado de similitud de la secuencia. Recientes análisis de la secuencia del genoma han indicado que en Australia se encuentran distintas variantes genotípicas (Cowley *et al.*, 2011). Todavía no se ha determinado si estos genotipos del HVAb presentan o no variaciones en cuanto a fenotipo y virulencia.

##### 2.1.2. **Supervivencia fuera del hospedador**

En investigación.

##### 2.1.3. **Estabilidad del agente**

En investigación.

##### 2.1.4. **Ciclo de vida**

No es aplicable.

#### 2.2. **Factores del hospedador**

Actualmente, las especies de Australia que se sabe que son susceptibles al GVA son el abalón de labios verdes (*Haliotis laevis*), el abalón de labios negros (*H. rubra*) e híbridos de estas dos especies. No se han documentado signos clínicos compatibles con la GVA en otras especies de moluscos de zonas donde se sospecha que la GVA es enzoótica. En Taipei chino, se ha notificado una ganglioneuritis asociada a una infección viral por un virus afín al herpes y altas mortalidades en la especie de abalón *H. diversicolor supertexta*. Esta enfermedad se notificó solo para *H. diversicolor supertexta*, mientras que ejemplares de abalón japonés (*H. discus*) cohabitantes permanecieron normales (Chang *et al.*, 2005).

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Abulón de labios verdes– *Haliotis laevis*

Abulón de labios negros– *H. rubra*

Híbrido (labios verdes × labios negros) – *H. laevis* × *H. rubra*

Abulón diversicolor o abulón de Taiwán - *H. diversicolor*

### 2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todas las edades.

### 2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No se dispone de datos.

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

La principal lesión histopatológica identificada en abulones afectados por la GVA es una ganglioneuritis: inflamación confinada al tejido neural. Pueden estar afectados los ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, así como la comisura cerebroidea y nervios periféricos asociados (Hooper *et al.*, 2007).

### 2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No se dispone de datos.

### 2.2.6. Vectores

No se dispone de datos.

### 2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

No se dispone de datos.

## 2.3. Patrón de la enfermedad

Los brotes de GVA en poblaciones australianas de abalón tanto de piscifactoría como salvajes se asocian a la rápida aparición de altas mortalidades (de hasta el 90%) en todas las edades (Corbeil *et al.*, 2010). De forma similar, en Taipei chino, durante la epizootia en abulón de piscifactoría (la temperatura del agua era de entre 16°C y 19°C), tanto abulones adultos como juveniles sufrieron la enfermedad, con mortalidades acumuladas del 70-80%. Se observó que en un estanque podían morir todos los abulones en un plazo de 3 días tras el inicio de los signos clínicos (Chang *et al.*, 2005). Se observó un patrón de enfermedad similar en infecciones experimentales (Chang *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2009).

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

Se ha demostrado la transmisión horizontal experimentalmente (Chang *et al.*, 2005; Crane *et al.*, 2009) mediante:

1. exposición de abulones sanos a agua que contenía abulones enfermos en el mismo tanque de agua sin contacto directo entre abulones enfermos y sanos;
2. introducción de abulones sanos en agua que previamente había contenido abulones enfermos; e
3. inyección intramuscular de abulones sanos con un homogenado de tejido filtrado procedente de abulones enfermos.

En todos los casos, se observó un 100% de mortalidad con un periodo pre-clínico de 1-2 días tras la exposición, y después empezó la mortalidad hasta alcanzar el 100% en un plazo de 2-5 días tras la infección.

### 2.3.2. Prevalencia

En Australia, y de forma similar en Taipei chino, se asoció un brote de GVA a un rápido aumento de la mortalidad (de hasta el 90% o más). Los abulones afectados que presentan signos clínicos (por ejemplo, rizado del pie) probablemente mueran en un plazo de 1 día tras la aparición de los mismos. Se observa ganglioneuritis en cortes de tejido neural mediante microscopía óptica y se confirma la presencia del HVAb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) y/o la hibridación *in situ* (Crane *et al.*,

2009). Utilizando estos métodos ha habido muy pocos falsos positivos ni falsos negativos. La prevalencia exacta de la GVA en abalón salvaje de aguas australianas se desconoce.

### **2.3.3. Distribución geográfica**

Australia (Victoria y Tasmania), y Taipei chino.

### **2.3.4. Mortalidad y morbilidad**

En epizootias de piscifactorías de Australia la mortalidad acumulada en todos los grupos de edad puede llegar a ser superior al 90%. En pruebas experimentales, puede tener lugar un 100% de mortalidad en un plazo de 5 días tras la exposición. La mayoría de abulones que presentan signos macroscópicos probablemente mueran en un plazo de 1-2 días.

### **2.3.5. Factores ambientales**

En Australia, el primer brote de GVA tuvo lugar en una piscifactoría durante el verano de 2005/2006 y posteriormente pareció propagarse a poblaciones salvajes, que experimentaron mortalidad a lo largo de todo el año siguiente, es decir, durante todas las estaciones. Todas las infecciones experimentales llevadas a cabo hasta hoy se han realizado en el intervalo de temperaturas de entre los 15°C y los 18°C. En Taipei chino, durante la epizootia notificada, la temperatura del agua fue de 16-19°C, y se realizaron infecciones experimentales a 17-20°C. Todavía no se sabe cómo afecta la temperatura a la replicación del virus y a la aparición de la enfermedad. Los posibles efectos de los cambios en otros factores ambientales, como la salinidad o el oxígeno disuelto, se desconocen.

## **2.4. Control y prevención**

En ausencia de tratamientos antivíricos eficaces, se recomienda implementar altos niveles de bioseguridad en el interior de las piscifactorías y en cualquier instalación donde se mantengan animales vivos, así como restricciones a los desplazamientos regionales. Tras un brote en una piscifactoría, la destrucción de la población afectada, la desinfección del agua y el equipo y la aplicación de procedimientos de descanso de la instalación parecen ser eficaces para prevenir la reinfección. Pueden utilizarse abulones centinela para comprobar el estado de las instalaciones previamente infectadas antes de volver a hablarlas.

### **2.4.1. Vacunación**

No se dispone de vacunas.

### **2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas**

No se dispone de datos.

### **2.4.3. Inmunoestimulación**

No se dispone de datos.

### **2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia**

No se dispone de datos.

### **2.4.5. Repoblación con especies resistentes**

No se dispone de datos.

### **2.4.6. Agentes bloqueantes**

No se dispone de datos.

### **2.4.7. Desinfección de huevos y larvas**

No se dispone de datos.

### **2.4.8. Prácticas generales de manejo**

Hasta ahora, los datos experimentales indican que el HVAb es muy virulento. No se han identificado las prácticas que podrían implementarse para reducir la gravedad de la enfermedad. Por otra parte, es interesante destacar que, contrariamente a lo que ocurre en Victoria, no se ha notificado enfermedad

clínica en poblaciones de abulones salvajes de Tasmania. Los brotes de enfermedad en plantas de procesado de Tasmania sugieren que los factores estresantes pueden influir en la expresión de la infección subclínica.

### **3. Obtención de muestras**

#### **3.1. Elección de ejemplares**

En el momento en que se observan los primeros signos de aumento del número de abulones que parecen estar débiles o que se comportan de forma anómala, o cuando se observan apariciones repentinas de mortalidades inexplicadas, deben obtenerse muestras de individuos vivos moribundos. Si no se dispone de abulones moribundos ni que acaben de morir, deben obtenerse muestras de abulones totalmente normales de todas las partes de la piscifactoría, y que representen todos los grupos de edad.

#### **3.2. Conservación de las muestras para su envío**

Deben obtenerse muestras para el examen mediante: i) histología, que deberán fijarse en formalina al 10% en agua de mar filtrada; ii) microscopía electrónica (fijadas en glutaraldehído al 2,5% en agua de mar filtrada); iii) PCR (fijadas en conservante para PCR, como etanol al 95%). Si no se dispone de fijadores, las muestras deben mantenerse refrigeradas (sobre hielo) y transportarse al laboratorio en un plazo de 24 horas. Como alternativa, las muestras pueden enviarse congeladas. En cuanto a las muestras congeladas, no son adecuadas para la histología ni la microscopía electrónica pero pueden analizarse mediante PCR.

#### **3.3. Combinación de varias muestras**

Deben obtenerse tejidos de abulones moribundos o que acaben de morir, según el grupo de edad y el estanque/piscifactoría/zona geográfica en la que se encuentren. Para poder comparar entre varias pruebas, no se debe trabajar con muestras combinadas.

#### **3.4. Órganos y tejidos de elección**

El tejido neural que incluya los ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal.

#### **3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados**

Hasta ahora, no se han detectado lesiones de forma constante en tejidos no neurales.

### **4. Métodos de diagnóstico**

#### **4.1. Métodos de diagnóstico de campo**

##### **4.1.1. Signos clínicos**

En Australia, los brotes de GVA tanto en abalón de piscifactoría como salvaje se han asociado a altas mortalidades (de hasta el 90% en piscifactoría). Clínicamente, el abalón puede presentar uno o más de los siguientes signos: elevación cóncava periférica irregular del pie; hinchazón y protusión de las partes bucales; eversión de la rádula; movimiento muy escaso del músculo del pie; excesiva producción de moco; ausencia de la destacada extensión del pie observada en el reflejo de erguido cuando se invierten abulones sanos dejándolos apoyados sobre el dorso; y reducción de la adherencia podal al sustrato. En Tasmania, abulones afectados por la GVA en plantas de procesado presentaron un “pie duro” o tetania, excesiva producción de moco, desovado anómalo e “hinchazón” (Ellard *et al.*, 2009). Estas instalaciones también experimentaron morbilidades y mortalidades muy inferiores a las observadas en piscifactorías o abulones salvajes de Victoria. Se han observado signos similares en una epizootia de enfermedad en abulones de Taipei chino (Chang *et al.*, 2005).

##### **4.1.2. Alteraciones del comportamiento**

La GVA normalmente es una enfermedad aguda, por la cual los abulones mueren en un plazo de 1-2 días tras la aparición de los signos macroscópicos de la misma. Abulones salvajes mantenidos vivos en cautividad en instalaciones de Tasmania han presentado un inicio más lento de los signos clínicos y de la mortalidad. Abulones salvajes capturados en Tasmania han dado positivo a la GVA mediante la qPCR sin presentar signos clínicos manifiestos ni histológicos.

## 4.2. Métodos clínicos

### 4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los abulones que se adhieren de forma laxa al sustrato debido a debilidad o a anomalías en el músculo del pie deben escogerse como muestra. Si esta anatomopatología macroscópica está causada por la GVA, es probable que estos animales mueran en un plazo de 1-2 días.

### 4.2.2. Bioquímica clínica

No se dispone de datos.

### 4.2.3. Anatomopatología microscópica

Los abulones afectados por GVA presentan inflamación (aumento de la infiltración por hemocitos) y una necrosis que se confina al tejido neural (ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, ramas del nervio podal y nervios periféricos), según se observa en cortes histológicos de tejido neural teñidos con hematoxilina y eosina y examinados mediante microscopía óptica (Ellard *et al.*, 2009; Hooper *et al.*, 2007).

### 4.2.4. Preparaciones húmedas

No aplicables.

### 4.2.5. Frotis

No aplicables.

### 4.2.6. Cortes fijados

La hibridación *in situ* localiza células infectadas por el HVAb dentro del tejido neural que, en el examen histológico, presenta ganglioneuritis caracterizada por una alteración inflamatoria con aumento de la celularidad, involucrando principalmente hemocitos y células gliales, y necrosis celular en los nervios afectados (Mohammad *et al.*, 2011).

### 4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

Puede utilizarse microscopía electrónica de transmisión para confirmar la presencia de partículas víricas en ganglios infectados. Las partículas del HVAb son icosaédricas y tienen centros electrónicos densos y un diámetro de 100-110 nm. La ubicación intranuclear de las partículas y su ultraestructura son características de los miembros de la familia Herpesviridae (Tan *et al.*, 2008).

## 4.3. Métodos de detección e identificación del agente

### 4.3.1. Métodos directos de detección

Los métodos directos de detección desarrollados hasta ahora para la detección e identificación del HVAb son los microscópicos (examen de cortes de tejido para las lesiones típicas, y microscopía electrónica para la detección de partículas de herpesvirus), la PCR convencional y en tiempo real, y la hibridación *in situ* (ISH).

#### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

El tejido neural (ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, ramas del nervio podal y nervios periféricos), es la diana principal y deben tomarse muestras del mismo y fijarse (empleando formalina al 10%), procesarse con los procedimientos estándar, y teñirse con hematoxilina y eosina para el examen histológico.

Las muestras de tejido (que contengan ganglio pleuropodal) para el examen mediante microscopía electrónica deben fijarse utilizando glutaraldehído al 2,5% (v/v) y paraformaldehído al 2-4% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M y post-fijarse en tetróxido de osmio al 1% (p/v), lavarse en agua de ósmosis inversa (3 x 5 minutos), deshidratarse en una serie de graduación progresiva de etanol de grado analítico (al 70%, durante toda la noche a 4°C; al 95%, 20 minutos; al 100%, 3 x 20 minutos), infiltrarse en resina de Spurr al 100% (durante toda la noche) y a continuación incluirse en resina de Spurr.

4.3.1.1.1. *Preparaciones húmedas*

No es aplicable.

4.3.1.1.2. *Frotis*

No es aplicable.

4.3.1.1.3. *Cortes fijados*

El tejido neural (ganglios cerebroideo, pleuropodal y bucal, ramas del nervio podal y nervios periféricos), es la diana principal y el examen de cortes histológicos pone de manifiesto una ganglioneuritis – aumento de la celularidad involucrando principalmente hemocitos y células gliales, y necrosis celular.

**4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente**

El HVAb se identifica empleando métodos que detectan específicamente el ácido nucleico del HVAb (PCR, secuenciación, qPCR e hibridación *in situ*).

4.3.1.2.1. *Cultivo celular/medios artificiales*

Hasta ahora, los intentos de cultivar el virus en líneas celulares, tanto de vertebrados como de invertebrados, no han funcionado.

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

No es aplicable.

4.3.1.2.3. *Técnicas moleculares*

Deben fijarse muestras de tejido neural para PCR, tanto convencional como en tiempo real, en conservante (etanol de grado reactivo al 80%; glicerol al 19,75%;  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,25%) o, como alternativa, en etanol al 95%.

El ganglio pleuropodal y/o las cuerdas nerviosas del pie se separan del tejido fijado y se introducen en tubos de 2,0 ml para la extracción del ADN. Se extrae ácido nucleico de tejidos de abalón infectado por el HVAb y de tejidos de abalón no infectado (unos 20 mg de músculo y tejido neural) empleando un kit comercial, como por ejemplo el mini kit QIAamp DNA (QIAGEN) u otro equivalente, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ácido nucleico, fijado a minicolumnas, se eluye y se resuspende en un volumen final de tampón de 100  $\mu$ l ( $\sim 100$  ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>), que viene con el kit. En el caso de grandes cantidades de muestras, una opción alternativa es la de digerir los tejidos según el protocolo correspondiente del mini kit QIAamp® DNA (QIAGEN) y extraer el ácido nucleico empleando el kit de aislamiento de ARN MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (que extrae el total del ácido nucleico de las muestras) y un AB MagMAX Express-96 Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems)<sup>1</sup>.

*qPCR (TaqMan)*

Tras la validación de la qPCR dirigida al ORF49 (Corbeil *et al.*, 2010), el descubrimiento de variantes genotípicas en Australia no reconocidas por esta prueba precisó de otras qPCR para el desarrollo basado en regiones más conservadas del genoma vírico. Se han utilizado mucho la qPCR dirigida al ORF66 y la dirigida al ORF77 (véase la Tabla 4.1) en estudios de enfermedades y, aunque no se ha llevado a cabo una validación formal, se han detectado de forma sensible y genérica todas las variantes del HVAb identificadas hasta ahora, incluida la cepa de Taipei chino.

---

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

**Tabla 4.1.** Secuencias de ácido nucleico de los cebadores y sondas empleados en las qPCR de detección del HVAb

<b>Cebadores ORF66 (300 nM)</b>	<b>Secuencia</b>
HVAb ORF66F1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'
HVAb ORF66R1	5'-CAA-GGC-TGC-TAT-GCG-TAT-GA-3'
<b>Sonda ORF66 (100 nM)</b>	
HVAb 66Prb1	5'- <b>6FAM</b> -TGG-CCG-TCG-AGA-TGT-CCA-TG- <b>TAMRA</b> -3'
<b>Cebadores ORF77 (300 nM)</b>	
HVAb ORF77F1	5'-CAA-CCA-CTT-GTT-CGG-GTT-CT-3'
HVAb ORF77R1	5'-CAG-GGT-GAT-TAA-TGC-GGA-GT-3'
<b>Sonda ORF77 (100 nM)</b>	
HVAb 77Prb1	5'- <b>6FAM</b> -TCC-GTA-CGC-GGG-ATC-TTC-GT- <b>TAMRA</b> -3'
<b>Cebadores del gen del ARNr de 18S (100nM)</b>	
18SF1	5'-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AGG-AA-3'
18SR1	5'- GCT-GGA-ATT-ACC-GCG-GCT-3'
<b>Sonda del gen del ARNr de 18S (100nM)</b>	5'- <b>6VIC</b> -TGC-TGG-CAC-CAG-ACT-TGC-CCT-C- <b>TAMRA</b> -3'

En los análisis mediante qPCR de ADN extraído, las reacciones contienen 12,5 µl de mezcla madre TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2×) y 2 µl (~100 ng µl<sup>-1</sup>) de muestra de ADN extraído, y la mezcla de reacción se completa hasta los 25 µl empleando agua desionizada tras haber añadido cebadores y sondas a las concentraciones correspondientes (véase la Tabla 4.1). Se utilizan las siguientes condiciones de ciclado: 95°C durante 59 segundos seguidos de 45 ciclos de 95°C durante 3 segundos y 60°C durante 30 segundos.

Las qPCR ejecutadas con los cebadores ORF66 y/o ORF77 se multiplexan con qPCR en la que se emplean cebadores y sondas específicos del gen del ARN ribosómico de la subunidad 18S (Applied Biosystems) y se utilizan para validar el procedimiento de extracción del ácido nucleico y la ausencia de inhibidores de la PCR (véase la Tabla 4.1).

Todas las muestras (incluidos controles positivos y negativos) se analizan por duplicado o triplicado. Los resultados de una qPCR TaqMan se expresan en forma de curvas de amplificación características generadas por software. Las curvas de amplificación de los controles positivo y negativo (sin molde) deben compararse con la muestra problema. Se considerará que una muestra se encuentra por encima del nivel analítico de fondo cuando el cambio en la señal de fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) en los colorantes FAM o VIC, respecto a la de ROX (tinción de referencia interna) supere el valor umbral que está fijado en el extremo superior del intervalo lineal de los puntos de amplificación (normalmente 0,1, pero puede depender de distintos factores, como el equipamiento, los reactivos o la especie hospedadora). Los resultados de una prueba TaqMan también pueden expresarse, como a menudo ocurre, en forma de valores ciclo umbral ( $C_T$ ). El ciclo umbral ( $C_T$ ) se define como el número de ciclo al cual se detecta un aumento de la fluorescencia por encima del valor de fondo estadísticamente significativo.

En el momento en que acaba la qPCR TaqMan, la presencia de ADN del HVAb se pone de manifiesto por la presencia de amplicones específicos, identificados por curvas de amplificación características generadas por software y valores de ciclo umbral ( $C_T$ ). Los controles sin molde no deben presentar indicios de amplicones específicos.

Si la prueba se considera válida, los resultados de los pocillos de la muestra problema pueden interpretarse aplicando los siguientes criterios:

- Los resultados positivos se definen como la presencia de amplicones específicos expresados como amplificación característica.

- Los resultados negativos se definen como la ausencia de amplicones específicos expresados por una curva de amplificación característica.

Además de un control sin molde, los controles negativos deben incluir ácido nucleico extraído de abulones que se sepa que no están infectados, con el fin de determinar que estos no dan ningún valor de  $C_T$ .

Los controles positivos pueden incluir ácido nucleico extraído de abulones que se sepa que están infectados y/o ADN de un plásmido estándar (Corbeil *et al.*, 2010).

#### PCR convencional

Para la detección de HVAb en muestras de tejido también puede utilizarse la PCR convencional. Se extrae ácido nucleico como se ha descrito arriba. Se ha observado que la PCR de detección del HVAb1617 genera amplicones de distintas longitudes (522 pb a 588 pb) en función de la cepa de HVAb. Así, puede ser útil para estudios epidemiológicos y para confirmar resultados positivos en la qPCR. Las secuencias de cebadores se detallan a continuación.

Cebador	Secuencia
HVAb-16	5'-GGC-TCG-TTC-GGT-CGT-AGA-ATG-3'
HVAb-17	5'-TCA-GCG-TGT-ACA-GAT-CCA-TGT-C-3'

Las condiciones de ciclado son las siguientes: un ciclo de 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos/52°C durante 30 segundos/74°C durante 45 segundos, seguidos de un ciclo a 72°C durante 7 minutos, y a continuación mantenimiento a 4°C.

#### Hibridación in-situ

La hibridación *in situ* (ISH) aquí descrita emplea una sonda de ADN marcado con digoxigenina (DIG) para detectar HVAb en cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE).

#### Reactivos

Citrato salino estándar (SSC) 20× pH7 (se guarda a temperatura ambiente)

175,32 g litro<sup>-1</sup> NaCl  
88,23 g litro<sup>-1</sup> Citrato de sodio

Solución de Denhardt 100× (se guarda a -20°C)

2 g (100 ml)<sup>-1</sup> Albúmina de suero bovino (Fracción V)  
2 g (100 ml)<sup>-1</sup> Ficoll 400  
2 g (100 ml)<sup>-1</sup> Polivinilpirrolidona

Tampón de hibridación (se guarda a -20°C)

25 ml Formamida  
10 ml SSC 20×  
2,5 ml Solución de Denhardt 100×  
10 ml Sulfato de dextrano al 50% en agua destilada  
500 µl ADN de esperma de arenque a 10 mg ml<sup>-1</sup>  
Se preparan hasta 50 ml con agua MilliQ

Solución salina tamponada con Tris (TBS) 10× (se guarda a temperatura ambiente)

23,6 g litro<sup>-1</sup> Tris base  
127 g litro<sup>-1</sup> Tris/HCl  
87,66 g litro<sup>-1</sup> NaCl

#### Preparación de sondas marcadas con DIG

Se lleva a cabo una PCR con ADN purificado de HVAb o una muestra que se sepa que contiene HVAb empleando un kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche Cat. No. 11 636 090 910) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores a utilizar son los siguientes:

Denominación del cebador	Secuencia del cebador	Tamaño del amplicón (sonda)
AbHV_ORF66f1	5'-TCC-CGG-ACA-CCA-GTA-AGA-AC-3'	
AbHV_ORF66r2	5'-GCC-GGT-CTT-TGA-AGG-ATC-TA-3'	848bp

Se aplica el siguiente perfil de termociclado: 95°C durante 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 57°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos. Se termina la PCR con una elongación final a 72°C durante 10 minutos

#### *Preparación de los cortes*

- i) Se realizan cortes de un espesor de 3 µm de tejido incluido en parafina, se colocan sobre portas Superfrost plus (Menzel Catalogue No. SF41296SP) y se dejan secar.
- ii) Se calientan los cortes a 65°C durante 30 minutos y se desparafinan en dos fases de xileno.
- iii) Se rehidratan poniendo los portas en etanol absoluto durante 2 minutos y después en etanol al 90% durante 2 minutos, en etanol al 70% durante 2 minutos y a continuación en agua destilada.
- iv) Se ponen los portas en HCl 0,2 N durante 20 minutos y se enjuagan en agua destilada durante 5-10 minutos.
- v) Se aplican 50–100 µl de proteinasa K a una concentración de 100 µg ml<sup>-1</sup> en solución salina tamponada con Tris (TBS; Tris 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 7.5) y se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- vi) Se enjuagan con glicina al 0,2% durante 2 minutos.
- vii) Se lavan en agua corriente durante 10 minutos.
- viii) Se deshidrata la muestra en etanol al 70% durante 2 minutos y a continuación en etanol al 90% durante 2 minutos y en etanol al 100% durante 2 minutos.
- x) Se dejan secar los portas al aire.

#### *Procedimiento de la hibridación*

- i) Se preparan 100 µl de solución de hibridación por cada corte de tejido (SSC 4x, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de arenque a 10 mg ml<sup>-1</sup>, sulfato de dextrano al 10%, formamida al 50%, sonda a unos 5 ng µl<sup>-1</sup>).
- ii) Se calienta la solución de hibridación a 95-100°C durante 5 minutos para desnaturalizar la sonda y se deposita sobre hielo hasta que esté lista para su uso.
- iii) Se aplica suficiente solución de hibridación como para cubrir el corte (unos 50 µl) y se cubre con un cubreobjetos.
- iv) Se calientan los portas a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ácido nucleico de la muestra. Para calentar los portas a 95°C, puede utilizarse un calentador para PCR o bien un bloque de hibridación diseñado para este fin, como el hibridizador Invitrogen SpoT.
- v) Se introducen los portas en una cámara húmeda que se haya precalentado a 37°C y se incuban a 37°C durante toda la noche (12-16 horas).

#### *Procedimientos post-hibridación*

- i) Se retiran los cubreobjetos sumergiendo los portas en SSC 2x a temperatura ambiente.
- ii) Se depositan los portas en una rejilla y se sumergen en SSC 2x a temperatura ambiente.
- iii) Se lavan, con una suave inclinación/agitación, en SSC 0,5 × (precalentado a 37°C) a 37°C durante 15 minutos.
- iv) Se lavan los portas brevemente en tampón TBS a temperatura ambiente.
- v) Se incuban los portas en solución de bloqueo (solución de leche desnatada en polvo al 0,5% en TBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- vi) Se cubren los cortes con 100-200 µl de carnero anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina (Roche Cat. No. 1093274) diluido a 1/100 en solución de bloqueo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.
- vii) Se lavan en tampón TBS tres veces durante 3 minutos cada vez.
- viii) Se equilibran en solución II (Tris 0,1 M, pH 8, NaCl 0,5 M, MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, pH 9 o Tris 0,1 M, pH 8, MgSO<sub>4</sub> 0,05 M, 7H<sub>2</sub>O, pH 9,5) durante 3 minutos a temperatura ambiente.

*Aparición de color*

- i) Se incuban los portas en la oscuridad en NBT/BCIP diluido en solución II (25 µl/ml).
- ii) Se cubren los cortes con la solución de tinción y se deposita un cubreobjetos sobre ellos. Se incuban en la oscuridad durante 3-4 horas en una cámara humidificada, asegurándose de que los portas no se sequen.
- iii) Se realiza un seguimiento de la aparición de color con comprobaciones periódicas de los portas al microscopio óptico.
- iv) Si es necesario, los portas pueden incubarse, en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante toda la noche.
- v) Se detiene la reacción y se retira el cubreobjetos sumergiendo los portas en agua destilada.
- vi) Se lavan los portas en agua corriente durante 5 minutos.
- vii) Se puede aplicar una tinción de contraste a los portas durante 1 minuto con marrón Bismarck al 0,5 % o equivalente.
- viii) Se montan los portas con medio de montaje (DAKO Cat. No. S3023) y un cubreobjetos.

*Interpretación de los resultados*

Una tinción intracelular específica de color azul oscuro-negro es indicativa de la presencia de ADN vírico.

*4.3.1.2.4. Purificación del agente*

No se dispone de datos.

**4.3.2. Métodos serológicos**

No es aplicable.

**5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto**

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la GVA se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

*Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia dirigida y el diagnóstico*

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	PL	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	d	d	d	c
MO directa	d	d	d	d	d	d
Histopatología	d	d	b	b	a	a*
ME de transmisión	d	d	d	d	d	c
Pruebas basadas en anticuerpos	d	d	d	d	d	d

Método	Vigilancia dirigida				Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	d	c	c	d	a*
PCR	d	d	a	a	a	a
PCR y Secuenciación	d	d	d	d	d	a

PL = postlarvas; MO = microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; \*La histopatología se puede confirmar empleando hibridación *in-situ* (ISH).

## 6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por el herpesvirus del abalón

La prueba que se recomienda para la vigilancia dirigida es la qPCR con ácidos nucleicos extraídos de tejido neural de abalón.

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

La presencia de HVAb debe sospecharse si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) Presencia de altas mortalidades (de hasta el 90%) asociadas a signos clínicos de GVA como se describe en este capítulo.
- ii) Histopatología (ganglioneuritis) observada en cortes de tejido neural de una sola muestra de abalón.
- iii) Un resultado positivo mediante la qPCR o la PCR convencional en al menos una muestra de abalón.

### 7.2. Definición de caso confirmado

La presencia de HVAb se considera confirmada si, además de los criterios del apartado 7.1, se cumple uno o más de los siguientes:

- i) Un resultado positivo mediante la qPCR en uno o más abalones cuando también se haya observado una histopatología positiva (7.1.i) y/o una alta mortalidad con signos clínicos compatibles con la GVA (7.1.ii).
- ii) Un resultado positivo mediante la hibridación *in situ* en cortes de tejido neural.
- iii) Un resultado positivo mediante la PCR convencional en cortes de tejido neural seguido de un análisis de la secuencia del amplicón para confirmar la secuencia del ácido nucleico del HVAb.

## 8. Bibliografía

CHANG P.H., KUO S.T., LAI S.H., YANG H.S., TING Y.Y., HSU C.L. & CHEN H.C. (2005). Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Halitotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 23–27.

CORBEIL S., COLLING A., WILLIAMS L.M., WONG F.Y.K., SAVIN K., WARNER S., MURDOCH B., COGAN N.O.I., SAWBRIDGE T.I., FEGAN M., MOHAMMAD I., SUNARTO A., HANDLINGER J., PYECROFT S., DOUGLAS M., CHANG P.H. & CRANE M.ST.J. (2010). Development and validation of a TaqMan® PCR assay for the Australian abalone herpes-like virus. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 1–10.

COWLEY J.A., CORBEIL S., CHEN H., WONG F., MOODY N.J., ELLARD K., FEGAN M., SAVIN K., WARNER S. & CRANE M.ST.J. (2011). Sequence variations amongst abalone herpes-like virus (HVAb) strains provide insights into its origins in Victoria and Tasmania. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.

CRANE M.STJ., CORBEIL S., FEGAN M. & WARNER S. (2009). Aquatic Animal Health Subprogram: Development of molecular diagnostic procedures for the detection and identification of herpes-like virus of abalone (*Haliotis* spp.). ISBN 978 0 643 09835 0. 79 pp.

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.

ELLARD K., PYECROFT S., HANDLINGER J. & ANDREWARTHA R. (2009). Findings of disease investigations following the recent detection of GVA in Tasmania. Proceedings of the Fourth National FRDC Aquatic Animal Health Scientific Conference, Cairns, Australia, 22–24 July 2009.

HOOPER C., HARDY-SMITH P. & HANDLINGER J. (2007). Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aus. Vet. J.*, **85**, 188–193.

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.

MOHAMMAD I.M., WARNER S., KVALHEIM N., CRANE M.STJ. & FEGAN M. (2011) Development of an *in situ* hybridisation assay for the detection and identification of the abalone herpes-like virus. Proceedings of the First FRDC Australasian Scientific Conference on Aquatic Animal Health, Cairns, Australia, 5–8 July 2011.

SAVIN K.W., COCKS B.G., WONG F., SAWBRIDGE T., COGAN N., SAVAGE D. & WARNER S. (2010). A neurotropic herpesvirus infecting the gastropod, abalone, shares ancestry with oyster herpesvirus and a herpesvirus associated with the amphioxus genome. *Virology*, **7**, 308. <http://www.virologyj.com/content/7/1/308>.

TAN J., LANCASTER M., HYATT A., VAN DRIEL R., WONG F. & WARNER S. (2008). Purification of a herpes-like virus from abalone (*Haliotis* spp.) with ganglioneuritis and detection by transmission electron microscopy. *J. Virol. Methods*, **149**, 338–341.

WANG J., GUO Z., FENG J., LIU G., XU L., CHEN B. & PAN J. (2004). Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong Province, China. *J. Shellfish Res.*, **23**, 1163–1168.

\*  
\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Infección por el herpesvirus del abalón (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int)).