



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Detección de agentes virales en ostión Japonés
(*Crassostrea gigas*)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en: Biotecnología)

p r e s e n t a

Valérie Barbosa Solomieu

La Paz, B. C. S.,(Junio-2004)

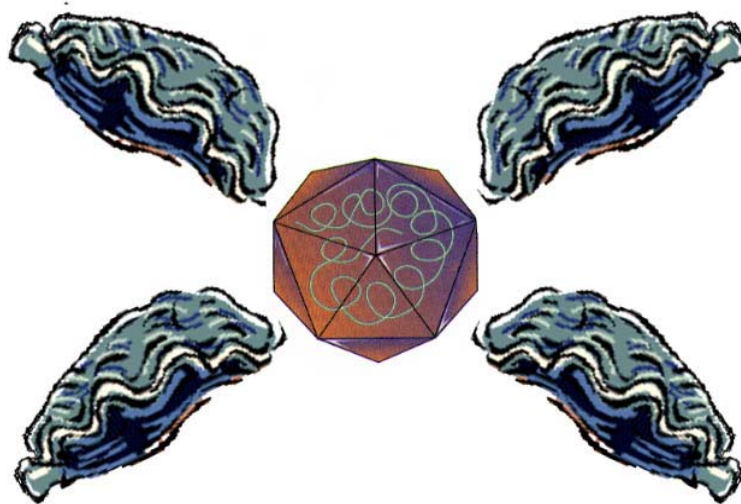


CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado
Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

**DETECCION DE AGENTES VIRALES EN
OSTION JAPONES
(*Crassostrea gigas*)**

T E S I S



Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias
presenta

Valérie Barbosa Solomieu

La Paz, B. C. S. (Junio de 2004)

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 2 de Mes de Junio del 2004, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Detección de agentes virales en ostión Japonés
(Crassostrea gigas)"**

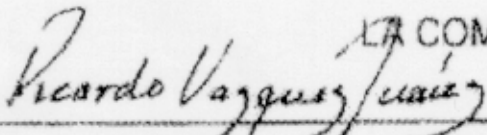
Presentada por la alumna:

Valérie Barbosa Solomieu

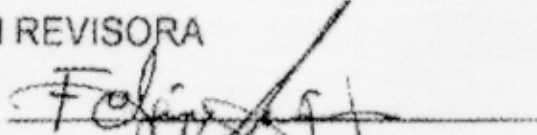
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USC
MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES:
CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

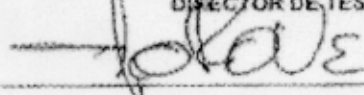
LA COMISION REVISORA



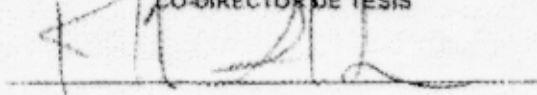
DR. RICARDO VAZQUEZ JUAREZ
DIRECTOR DE TESIS



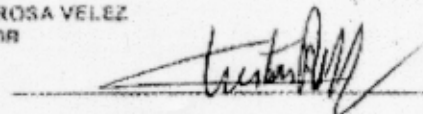
DR. FELIPE ASCENCIO VALLE
CO-DIRECTOR DE TESIS



DR. JORGE DE LA ROSA VELEZ
CO-TUTOR



DR. RALPH ELSTON
CO-TUTOR



DR. TRISTAN RENAULT
CO-TUTOR


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITE TUTORIAL

Dr. Ricardo Vázquez Juárez	(co-director)	CIBNOR, La Paz, Mexico
Dr. Felipe Ascencio Valle	(co-director)	CIBNOR, La Paz, Mexico
Dr. Tristan Renault	(tutor)	IFREMER, La Tremblade, France
Dr. Ralph Elston	(tutor)	AQUATECHNICS, INC., Seattle, USA
Dr. Jorge de la Rosa Vélez	(tutor)	UABC, Ensenada, Mexico

COMISION REVISORA

Dr. Ricardo Vázquez Juárez	CIBNOR
Dr. Felipe Ascencio Valle	CIBNOR
Dr. Tristan Renault	IFREMER, France
Dr. Ralph Elston	AQUATECHNICS, INC., USA
Dr. Jorge de la Rosa Vélez	UABC

JURADO

Dr. Ricardo Vázquez Juárez	CIBNOR
Dr. Felipe Ascencio Valle	CIBNOR
Dr. Ralph Elston	AQUATECHNICS, INC.
Dr. Humberto Villarreal Colmenares	CIBNOR
Dr. Dariel Tovar Ramírez	CIBNOR
Suplente	
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra	CIBNOR

PROLOGO Y DEDICATORIA

A mi madre, por estar siempre presente, a pesar de las distancias y los océanos...

A mi padre, con quién habría querido compartir estos momentos y muchos más.

A mis abuelos, quienes nunca han dejado de apoyarme, con todo mi cariño.

A mi hermano y su esposa, parte de nuestra pequeña y dispersa familia.

*A todos aquellos que estuvieron a lo largo de este camino
para iluminarlo con una sonrisa o una mano tendida.*

A quienes llenaron de magia y de alegría estos años.

*A quienes sabían que los sueños no están ahí para cumplirse
sino para enseñarnos el camino hacia algo más grande aún.*

*A la suerte que tengo de poder dedicarme a esto
Que me hace tan feliz...*

*A la dicha de haber llegado al final de este viaje
donde se abre el horizonte y comienza otro camino...*

A lo impalpable e imprescindible.

Le debo una canción

A lo imposible

A la mujer,

A la estrella

Al sueño que nos lanza

Les debo una canción indescriptible

Como una vela inflamada

En vientos de esperanza...

Silvio Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, quisiera expresar mi agradecimiento a todos aquellos que en un principio hicieron posible mi entrada al programa de Doctorado del CIBNOR : a la dirección de estudios de Posgrado, a los miembros de la comisión presente durante mi entrevista, a los compañeros que me asesoraron, al CONACYT por la beca que me otorgó durante estos largos años... Al Dr. Guy Nonnotte de la y al Pr. Patrick Jégo que ayudaron para los trámites sin los cuales no habría obtenido esa beca.

Gracias, por supuesto, al Dr. Ricardo Vazquez, sin el cual jamás habría dirigido mis pasos hacia La Paz. Ciertas coincidencias de la vida resultan muy afortunadas y me alegro de contar con su amistad y su confianza. Gracias al Dr. Felipe Ascencio, quien aceptó ser mi co-director sin conocerme y quien ha estado presente en momentos clave, a su manera.

Gracias al Dr. Ralph Elston, por haberme enseñado un poquito de lo mucho que sabe sobre patología de moluscos. Al Dr. Jorge de la Rosa por su disponibilidad y sus palabras de aliento.

Al Dr. Tristan Renault quisiera dedicarle unas líneas con especial gratitud, cariño y admiración. Le agradezco haberme permitido compartir su espacio, su tiempo, su entusiasmo, su sencillez y su increíble capacidad de trabajo. Por dos inolvidables años de aprendizaje, por haberme ayudado a darle un rumbo nuevo a mi proyecto y por tantas y tantas risas...

Mil gracias al Dr. Trevor Williams y al M.C. José Manuel Mazón Suástegui, por su desinteresada ayuda para la revisión de ciertas secciones de esta tesis. A la M.C. Olimpia Chong por su fantástico trabajo de edición en un tiempo récord y su buenísima vibra.

Gracias a la Dra. Norma Hernández, por sus clases de Ingeniería Genética y su asesoría en asuntos de biología molecular. A ella y a Arturo Sierra por haberme abierto las puertas.

A todas las personas de la Unidad del CIB de Guaymas que tan lindo recibimiento me dieron. A Philippe Danigo y Carlos Reyes por su apoyo para el muestreo en Laguna San Ignacio. A todos los productores de Sonora que me echaron la mano...

Mil gracias a todos aquellos que en el CIB me ayudaron con su tiempo, su experiencia, sus contactos, su asesoría técnica: Carmen Rodríguez, Tere y Sofí, de histología, Sandra Morales, Martín Ramírez, a la Chula, Miguel Robles, José Manuel Mazón, Teodoro Reynoso... A la Maestra Reina Romero por haberme dado la oportunidad de dar clases en el Tec, fue una experiencia fantástica. A toda la gente de redes y de informática, de la biblioteca, de la administración...

Gracias tanto al Dr. Sergio Hernández como a la Dra. Castellanos que tanto apoyo me brindaron en la medida de sus posibilidades y de la flexibilidad del reglamento... A toda la banda de Posgrado, a la Lic. Osvelia Ibarra, a pesar de los múltiples regaños, a la Lic. Lety González, a Betty, a Liz, a la Sra. Lupita, a Claudia, a Brenda..., por su paciencia y por tantos ratos de cotorreo. A Horacio Sandoval por su buen humor y sus múltiples operaciones de rescate con mi maquinita, a Manuel Melero por estar siempre dispuesto a ayudar...

A todos mis compañeritos, que me ayudaron a integrarme rápidamente al laboratorio y con los cuales compartimos dos años de chamba, baile, acampadas y cotorreo en la periquera : Peter, Deliecita y Nacho, al Toño (ojalá sigamos colaborando !!!), Vania, Hever, Adrián, José Luis, Susana, Ma Esther, Estrellita, Lili, Meliza, Daniel, Dariel, Angel, Gabriel, Pablo, Florecita, Reina, Edilmar, Carlos Ceceña... Y en mi segunda temporada en el CIB a Barbarita, Deni, Vero, Friedman, Rodolfo, Normita, a todos mis compañeritos de changarro por haberme soportado en este periodo de mucha presión...

A todísima la gente del laboratorio de la Tremblade, que es un lugar muy pequeño y muy especial ! A los doctores Philippe Gouletquer y André Gérard que me permitieron llegar a trabajar allí... A Maeva por su ayuda cuando recién llegué, a Serge por su buenísima compañía en el laboratorio desierto, a Bruno a pesar de su genio, a Florence y Martine por su disponibilidad y eficiencia, a la Dra. Isabel Arzul por haberme facilitado su bibliografía y tantos documentos, y por la tesis que escribió que fue un pilar para mi trabajo, a Nicole por el orden que impuso y por su genial carácter... A Bénédicte y Grégoire con todo cariño. A mis super compañeritos de la maison des stagiaires : Noëlia por supuesto (ánimo con esa tesis, Catalana !), Guénaelle, Nicolas, Niklas, Marc.... A Frede por todo lo que compartimos, al molesto de Jean Luc, a Jean Côme, Jean-Baptiste, Cyrielle, a Mélanie por sus rides al alba, a Jean Pierre por haberme aguantado en su oficina, a Pierre y Laurence por su colaboración, a Jean François Pépin por su especial sentido del humor, a Patrick Soletchnik por su canto y las ramitas de mimosa, a Stéphane Robert por tanta energía, a Joëlle por su indefectible sonrisa, a Daniel, a Tim, Andrea y Lara por los ratos tan chidos en su casita...

A todos los que estuvieron allí, haciendo de cada día algo ensanchante y divertido. En especial a las Tristannettes que tanto me costó dejar : a mi querida hermanita académica Gaëlle (ojala encuentres un camino que te haga feliz), a la güera Beatrice (espero estar en tu examen), a Kasia la super enojona y encantadora Polaca. Pero también a Lionel, el más quejumbroso y gruñón del universo (suerte con esos ostiones post-doctorales !) y a la pequeña Céline a quienes les deseo mucho amor y felicidad... A mis güeritos preferidos, Pascale y Raphaël por todos esos apéros hasta el amanecer...sigan en su vibra y sendero tan particular... A Nolwenn por nuestros relajos Indochinescos repentinos en el laboratorio....

Y para terminar un agradecimiento muy especial para a mis amiguitos del alma.

A Nachito y a Delia. Por haberme recibido en su casa, por haber estado siempre allí, para reír y llorar y compartir las preocupaciones y las alegrías. Espero que las angustias hayan quedado atrás y que que vengan tiempos tranquilos.

Con un chingo de cariño a Pedrito... Sin ti nada habría sido igual.

Tuve mucha suerte de encontrarte !

Voy a extrañarlos muchísimo.

Y las últimas líneas van para Ernesto. Por haberse aparecido en mi vida y seguir ahí. Por toda su ayuda. Por la magia compartida y por todo lo que venga, donde quiera que nos lleven nuestros pasos...

« Aie toujours présent à l'esprit

que la nature n'est pas Dieu,

qu'un homme n'est pas une machine,

qu'une hypothèse n'est pas un fait ;

Et sois assuré

que tu ne m'auras point compris

partout où tu croiras apercevoir

quelque chose

de contraire à ces principes. »

Diderot,

(De l'interprétation de la nature, 1754)

RESUMEN

Las infecciones virales, capaces de provocar mortalidades masivas de peces, camarón y bivalvos, constituyen una amenaza real para la producción acuícola. En los años setenta, enfermedades provocadas por iridovirus condujeron a la eliminación del ostión Portugués (*Crassostrea angulata*) de importantes zonas de cultivo en Europa. De manera más reciente, se han detectado infecciones por virus de tipo herpes en varias especies de moluscos alrededor del mundo. Este tipo de infecciones han sido asociadas con mortalidades elevadas en *Ostrea edulis* y *Crassostrea gigas*.

La purificación del virus herpes de ostreidos (OsHV-1) permitió su caracterización y el desarrollo de diversas técnicas de detección específica entre las cuales destacan dos herramientas moleculares : la PCR y la hibridación *in situ* (HIS). Estos protocolos, si bien han demostrado su eficiencia, no han sido sometidos a un proceso de validación *stricto sensu*. Por tales motivos, se llevaron a cabo varias series de análisis de muestras de colección que contribuyen a la comparación y la evaluación de ambas técnicas. Los resultados obtenidos con tejidos fijados e incluidos en parafina revelaron que la técnica más eficaz para el diagnóstico de OsHV-1 es la PCR con primers que amplifican fragmentos pequeños (<200 pb) de una región repetida del genoma viral. Adicionalmente, se observó que la fijación y el almacenamiento de este tipo de muestras son etapas esenciales que deben ser optimizadas para que la interpretación de los resultados sea posible. Por otra parte, ensayos interlaboratorios demostraron la reproducibilidad de los resultados de la PCR y la necesidad de una mayor estandarización del protocolo de HIS empleado.

Mas allá de su evaluación, estas herramientas moleculares fueron empleadas para explorar dos hipótesis acerca de OsHV-1. En primer lugar, la detección de OsHV-1 en tres generaciones sucesivas de ostión Japonés (adultos reproductores y larvas) proporcionó datos que refuerzan la hipótesis de una transmisión vertical de este virus y sugieren la existencia de un mecanismo de defensa o resistencia contra la infección viral transmitido por las hembras a su progenie. En segundo lugar, la detección de OsHV-1 en una cantidad limitada de muestras de *C. gigas* de México indica que este tipo de infecciones pueden ser ubicuas. Sin embargo, se requieren muestreos y análisis adicionales para confirmar este resultado.

Debido al impacto que tienen tanto iridovirus como birnavirus en peces y moluscos cultivados, se han elaborado métodos de detección por PCR y RT-PCR con primers basados en regiones conservadas. En el caso de los iridovirus, el análisis de muestras de *C. angulata* fijadas e incluidas en parafina por PCR con primers dirigidos hacia el gen de la proteína principal de la cápside (MCP) generó productos de tamaño esperado (de 150 pb a 550 pb). Por otra parte, se diseñaron primers para la detección específica por RT-PCR de un birnavirus aislado del molusco *Telina tenuis* (TV-1). La metodología desarrollada en el presente estudio puede ser utilizada como herramienta para el diagnóstico de TV-1 en muestras de moluscos potencialmente infectados.

PALABRAS CLAVE : ostión, *Crassostrea gigas*, virus, diagnóstico, *Herpesviridae*, PCR, hibridación *in situ*, técnica de detección

ABSTRACT

Viral infections, capable of provoking massive mortality in fish, shrimp and bivalves constitute a real threat for aquacultural production. In the 70s, iridoviral diseases lead to the almost complete elimination of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) from European Atlantic coasts. More recently, herpesviral infections have been detected in various mollusk species around the world. Such infections have been associated with high mortality rates in *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*,

The purification of oyster herpesvirus 1 (OsHV-1) allowed its characterization and the development of various techniques for its specific detection, among which two molecular tools: PCR and *in situ* hybridisation (ISH). Although they have proved to be efficient, these techniques have not undergone a proper validation process. The analysis of a series of reference samples allowed the comparison and evaluation of both techniques. The results obtained with fixed, paraffin-embedded tissues showed that the most efficient technique for the detection of OsHV-1 is PCR with primers that amplify small fragments (<200 pb) of a repeated region of the viral genome. Moreover, it was observed that fixation and storage of this kind of samples are essential steps that ought to be optimized in order for results to be interpretable. An inter-laboratory assay (ring trial) showed the reproducibility of PCR results and the necessity to further standardize the available ISH protocol.

In addition to their evaluation, these molecular techniques were used to further explore two hypothesis concerning OsHV-1. The screening of this virus across three successive generations of Pacific oysters (parental oysters and their progeny) furnished data that seem to strengthen the hypothesis of a vertical transmission and suggest that female oysters may transmit a resistance or defense mechanism against viral infection to their offspring. Concerning the presence of OsHV-1 in other countries, PCR gave positive results in a restricted number of Pacific oyster samples from Mexico. However, further sampling and analysis are required to confirm this result .

Due to the impact that both iridoviruses and birnaviruses have on cultured fish and shellfish, PCR detection procedures by PCR and/or RT-PCR with primers targeting conserved regions have been designed. The screening of fixed, paraffin-embedded samples of *C. angulata* with primers targeting the iridoviral MCP gene yielded products of expected sizes (150 pb up to 550 pb). On the other hand, primers for the specific RT-PCR detection of a birnavirus isolated from the mollusk design of three primers based on the sequence of a particular virus: *Telina tenuis* (TV-1) were designed. The developed procedure may be employed for detecting TV-1 in potentially infected mollusk samples.

KEY WORDS: oyster, *Crassostrea gigas*, virus, diagnosis, *Herpesviridae*, PCR, *in situ* hybridisation, detection method

INDICE

Abreviaciones empleadas para las especies virales	p. 1
Lista de figuras	p. 3
Lista de tablas	p. 6
INTRODUCCION GENERAL: OSTION JAPONES E INFECCIONES VIRALES	p. 7
ORIGEN Y EVOLUCION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION	p. 8
Cultivo del Ostión: desarrollo y amenazas	p. 9
Eventos de mortalidad masiva: origen del proyecto de investigación	p. 12
Evolución del proyecto: estructura y objetivos	p. 13
EL OSTIÓN JAPONÉS : UN MODELO CON IMPORTANCIA ECONOMICA	p. 15
El Ostión Japonés: Presentación	p. 16
1) Taxonomía	p. 16
1.1 Posición taxonómica del osti{on Japonés	p. 16
1.2 ¿ <i>Crassostrea gigas</i> contra <i>Crassostrea angulata</i> ?	p. 18
2) Distribución geográfica y características biológicas	p. 19
2.1 Distribución geográfica y hábitat	p. 19
2.2 Ciclo de vida del ostión	p. 19
El Ostión Japonés: Producción e importancia Económica	p. 21
1) Origen y desarrollo del cultivo del ostión Japonés	p. 21
2) Cultivo de ostión en México y Francia	p. 22
2.1 Origen de la producción de ostión Japonés en México	p. 22
2.2 Cultivo de ostión en Francia	p. 24
ENFERMEDADES INFECCIOSAS QUE AFECTAN AL OSTIÓN JAPONÉS	p. 27
Infecciones por bacterias	p. 28
1) Vibriosis	p. 28
2) Enfermedad del ligamento de la bisagra en ostiones juveniles	p. 28
3) Nocardiosis del osti{on Japonés	p. 29
4) Micro-organismos de tipo Rickettsia y Chlamydia	p. 29
4.1 Microorganismos de tipo <i>Rickettsia</i>	p. 29
4.2 Microorganismos de tipo <i>Chlamydia</i>	p. 30
Infecciones por parásitos	p. 31
1) Enfermedad de la Isla Denman	p. 31
2) Haplosporidiosis	p. 31
3) Infección de los ovocitos por <i>Marteilia</i>	p. 32
4) Miticolasis	p. 32
Infecciones virales	p. 33
1) Infecciones por agentes de tipo iridovirus	p. 33
1.1 Necrosis de las branquias y enfermedad infecciosa de los hemocitos	p. 33
1.2 Enfermedad viral del velo (OVVD)	p. 34
2) Virus de tipo herpes	p.35

ENFOQUE HACIA TRES FAMILIAS DE VIRUS	p. 36
FAMILIA HERPESVIRIDAE	p. 37
Características generales de los virus de tipo herpes	p. 38
1) Morfología y propiedades físico-químicas	p. 38
1.1 Arquitectura	p. 38
1.2 Propiedades físico-químicas	p. 39
2) Características a nivel molecular	p. 39
2.1 Organización de los genomas virales	p. 39
2.2 Contenido en G+C	p. 41
3) Características biológicas como base para su clasificación	p. 41
3.1 Propiedades biológicas comunes	p. 41
3.2 Una clasificación basada en las diferencias biológicas	p. 42
Virus herpes y sus hospederos	p. 44
1) Modos de transmisión	p. 44
1.1 Virus herpes de tortuga	p. 44
1.2 Virus herpes del tumor de Lucke en <i>Rana Pipiens</i>	p. 45
1.3 Virus herpes del pez gato	p. 45
2) El virus dentro de su hospedero	p. 46
2.1 Ciclo de replicación	p. 46
2.2 Latencia y reactivación	p. 51
2.3 Regulación de la apoptosis	p. 53
Virus herpes y Evolución	p. 55
1) Evolución y clasificación	p. 55
2) Variabilidad genética y filogenie de los herpesvirus de vertebrados acuáticos	p. 56
3) Mecanismos de diversificación	p. 57
3.1 Adquisición de secuencias de ADN	p. 57
3.2 Rearreglos	p. 58
3.3 Sustituciones de nucleótidos	p. 59
Virus herpes que infectan a bivalvos	p. 60
1) Primeras descripciones	p. 60
2) Patogenicidad	p. 61
3) Estructura del genoma	p. 61
4) Relación con los otros miembros de la familia	p. 62
FAMILIA IRIDOVIRIDAE	p. 64
Características generales	p. 65
1) Clasificación	p. 65
2) Estructura y contenido del virus	p. 66
3) Organización del genoma y replicación	p. 67
Iridovirus que infectan a peces	p. 68
1) Problemas de clasificación	p. 68
2) <i>Linfocistivirus</i>	p. 69
3) <i>Ranavirus</i>	p. 71
3.1 <i>Virus de la necrosis hematopoiética epizoótica</i> (EHNV)	p. 71
3.2 <i>Ranavirus de Santee Cooper</i> (SCRV)	p. 72

4) <i>Megalocitivirus</i> : un género nuevo	p. 72
4.1 Virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV)	p. 73
4.2 Iridovirus del besugo (RSIV)	p. 74
4.3 Iridovirus de la enfermedad del sueño del mero (GSDIV)	p. 74
Herramientas moleculares para la detección de iridovirus	p. 76
1) Primers basados en secuencias de genes conservados	p. 76
1.1 Gen de la proteína principal de cápside (MCP)	p. 76
1.2 Gen de la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (RNRS)	p. 77
1.3 Gen de la ATPasa	p. 78
2) Otras herramientas específicas	p. 78
FAMILIA BIRNAVIRIDAE	p. 79
Características generales	p. 80
1) Clasificación	p. 80
2) Estructura y contenido viral	p. 81
3) Organización del genoma y replicación	p. 81
4) Virulencia	p. 82
5) Similitud con respecto a otros taxones	p. 82
Acuabirnavirus	p. 83
1) Serogrupos	p. 83
2) Filogenie	p. 83
3) Virus de necrosis infecciosa del páncreas (IPNV)	p. 84
4) Birnavirus marino (MABV)	p. 84
5) Detección de acuabirnavirus por medio de técnicas moleculares	p. 85
ACTIVIDADES DE INVESTIGACION: DISEÑO EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y CONCLUSIONES	p.86
PARTE 1: COMPARACION Y VALIDACION DE TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION DE OsHV-1	p. 87
Introducción	p. 88
Evaluación interlaboratorios de la reproducibilidad de las técnicas	p. 90
1) Materiales y Métodos	p. 90
1.1 Muestras: proveniencia y estatus infeccioso	p. 90
1.2 HIS con revelado directo	p. 92
1.3 Detección de OsHV-1 por PCR	p. 92
2) Resultados	p. 93
2.1 Análisis por PCR	p. 93
2.2 Análisis por HIS	p. 94
3) Discusión	p. 95
Comparación de métodos tradicionales y moleculares de detección de OsHV-1	p. 97
Artículo 1 (publicado):	p. 98
Diagnosis of ostreid herpesvirus1 (OsHV-1) in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and <i>in situ</i> hybridisation	
Conclusión: sobre la validación de técnicas moleculares de detección	p. 107

PARTE 2: APLICACION DE LA PCR PARA DETERMINAR LA TRANSMISION VERTICAL DE OsHV-1 Y SU PRESENCIA EN MEXICO	p. 108
Prevalencia de OsHV-1 en tres generaciones sucesivas de <i>C. gigas</i>: reuniendo información sobre su transmisión vertical	p. 109
Artículo 2 (sometido): Evidence for vertical transmission of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) among three successive generations of Pacific oysters (<i>Crassostrea gigas</i>): Barbosa-Solomieu V., Dégremont L., Boudry P., Vázquez-Juárez R., Ascencio-Valle F., Renault T.	p. 111
¿Está OsHV-1 en ostiones producidos en México?	p. 135
1) Materiales y Métodos	p. 135
1.1 Muestras: proveniencia y conservación	p. 135
1.2 Extracción de ADN : combinando protocolos	p. 136
1.3 Detección de OsHV-1 por PCR	p. 136
2) Resultados	p. 136
3) Discusión	p. 138
Conclusión: Aplicación de herramientas moleculares para la detección de OsHV-1	p. 139
PARTE 3: TECNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE IRIDOVIRUS Y BIRNAVIRUS EN OSTION JAPONES	p. 140
Detección de iridovirus basada en genes conservados	p. 141
1) Materiales y métodos	p. 142
1.1 Material biológico	p. 142
1.2 Detección por PCR de AND de iridovirus	p. 143
2) Resultados	p. 145
2.1 Ensayos prelimiarios con ADN viral	p. 145
2.2 Amplificación con ADN extraído de ostión como templado	p. 146
2.3 Ensayos de amplificación con muestras fijadas e incluidas en parafina	p. 147
3) Discusión	p. 148
Detección de Birnavirus Acuáticos	p. 149
1) Materiales y métodos	p. 150
1.1 Material viral	p. 150
1.2 Extracción de ARN	p. 150
1.3 Protocolos de RT-PCR/PCR anidada	p. 150
2) Resultados	p. 151
3) Discusión	p. 152
Conclusión y Perspectivas	p. 153
CONCLUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS	p. 154
Herramientas moleculares para la detección de virus ¿Cuál es su porvenir?	p. 155
De la detección de virus al control de enfermedades...	p. 156
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	p. 158

ANEXOS		p. 184
Anexo 1	- Presentación del IFREMER, del Laboratorio de Genética y Patología de La Tremblade, del programa MOREST y del REPAMO	p. 185
Anexo 2	- Detección de OsHV-1 por hibridación <i>in situ</i> con revelado directo (Arzul et al., 2002 ; Lipart y Renault, 2002)	p. 188
Anexo 3	- Protocolos de Extracción de ADN	p. 193
	3a- Extracción de ADN de larvas de ostión congeladas	p. 193
	3b- Extracción de ADN de tejidos fijados en Davison	p. 194
	3c- Extracción de ADN de tejidos fijados e incluidos en parafina(1)	p. 195
	3d- Extracción de ADN de tejidos fijados e incluidos en parafina(2)	p. 196
	3e- Soluciones empleadas	p. 198
Anexo 4	- Pares de primers empleados para la detección por PCR de OsHV-1	p. 199
Anexo 5	- Protocolo para la detección de OsHV-1 por PCR sencilla	p. 200
Anexo 6	- Amplificación por PCR de un gen de <i>Crassostrea gigas</i> que codifica para actina	p. 201
Anexo 7	- Localización de algunos primers empleados para la detección de Iridovirus	p. 204
Anexo 8	- Localización de los primers empleados para la amplificación de fragmentos de MABV	p. 205
Anexo 9	- Extracción de ARN de sobrenadantes de cultivo celular	p. 206
Anexo 10	- Condiciones de amplificación de fragmentos de acuabirnavirus	p. 207
	10a- Amplificación por RT-PCR sencilla	p. 207
	10b- Amplificación por PCR anidada	p. 208
Anexo 11	- Protocolo de Clonación	p. 209
Anexo 12	- Artículo 3 : Enfermedades microbianas de pectínidos cultivados en iberoamérica	p. 213
GLOSARIO		p. 234

ABREVIACIONES EMPLEADAS PARA LAS ESPECIES VIRALES

ABREVIACION	NOMBRE(S) DEL VIRUS	FAMILIA
AAV	Dependo-virus adeno-asociado	<i>Parvoviridae</i>
ALIV	Iridovirus de <i>Aplocheilichthys normani</i>	<i>Iridoviridae</i>
BHV-1	Herpesvirus bovino de tipo 1	<i>Herpesviridae</i>
BIV	Iridovirus de Bohle	<i>Iridoviridae</i>
BMV	Virus de mamalitis bovina	<i>Herpesviridae</i>
CCIV	Virus de la carpa común	<i>Iridoviridae</i>
CCV	Virus herpes del pez gato	<i>Herpesviridae</i>
CFV	Iridovirus del pez gato	<i>Iridoviridae</i>
CIV	Iridovirus del pez gato	<i>Iridoviridae</i>
DFV	Virus del barbero rayado	<i>Iridoviridae</i>
DGIV	Virus del gurami enano	<i>Iridoviridae</i>
DXV	Virus X de la drosófila	<i>Birnaviridae</i>
EBV	Virus de Epstein-barr (virus herpes humano 4)	<i>Herpesviridae</i>
ECV	Iridovirus del pez gato europeo	<i>Iridoviridae</i>
EHNV	Virus de necrosis hematopoiética epizoótica	<i>Iridoviridae</i>
EHV-1	Virus herpes de équido 1	<i>Herpesviridae</i>
EHV-2	Virus herpes de équido 2	<i>Herpesviridae</i>
EHV-4	Virus herpes de équido 4	<i>Herpesviridae</i>
EIHV	Virus herpes endoteliotrópico de elefante 8	<i>Herpesviridae</i>
ENV	Virus de necrosis eritroítica	<i>Iridoviridae</i>
ESV	Virus de siluro	<i>Iridoviridae</i>
FV3	Virus de rana 3	<i>Iridoviridae</i>
GFV-1	Virus de pez rojo 1	<i>Iridoviridae</i>
GFV-2	Virus de pez rojo 2	<i>Iridoviridae</i>
GIV	Iridovirus de mero	<i>Iridoviridae</i>
GNV	Virus de necrosis branquial	<i>Iridoviridae</i>
GSDIV	Iridovirus de la enfermedad del sueño del mero	<i>Iridoviridae</i>
GV6	Virus de guppy 6	<i>Iridoviridae</i>
HCMV	Citomegalovirus humano (Virus herpes de humano 5)	<i>Herpesviridae</i>
HHV	Virus herpes de humano	<i>Herpesviridae</i>
HIV	Virus de infección hemocítica	<i>Iridoviridae</i>
HSV-1	Virus herpes simplex 1	<i>Herpesviridae</i>
HSV-2	Virus herpes simplex 2	<i>Herpesviridae</i>
HveA	Virus herpes A	<i>Herpesviridae</i>
HveB	Virus herpes B	<i>Herpesviridae</i>
HveC	Virus herpes C	<i>Herpesviridae</i>
HVS	Virus herpes saimiri	<i>Herpesviridae</i>

IBDV	Virus de la bursitis infecciosa aviar	Birnaviridae
IIV -2	Iridovirus de insecto 1	Iridoviridae
IIV-2	Iridovirus de insecto 2	Iridoviridae
IIV-6	Iridovirus de insecto 6	Iridoviridae
ILTV	Virus de laringotraqueitis infecciosa	Herpesviridae
IPNV	Virus de necrosis pancreática infecciosa	Birnaviridae
ISKNV	Virus de necrosis infecciosa del bazo y del riñón	Iridoviridae
LCDV1	Virus de la linfocistis 1	Iridoviridae
LCDV2	Virus de la linfocistis 2	Iridoviridae
LMBV	Virus de la perca americana	Iridoviridae
MABV	Birnavirus marino	Birnaviridae
MDV	Virus de la enfermedad de Marek	Herpesviridae
MCMV	Citomegalovirus murino	Herpesviridae
MHV4	Virus herpes de múrido 4	Herpesviridae
OsHV-1	Virus herpes de ostreidos 1	Herpesviridae
OVV	Virus de la enfermedad del velo	Iridoviridae
PBCV-1	Virus <i>chlorella 1</i> de <i>Paramecium bursaria</i>	Phycodnaviridae
PrV	Virus de la seudorabia	Herpesviridae
RaHV-1	Virus herpes de ránido 1	Herpesviridae
RaHV-2	Virus herpes de ránido 2	Herpesviridae
RFPV	Virus de la perca	Iridoviridae
RRV	Radinovirus del macaco	Herpesviridae
RSIV	Iridovirus del besugo	Iridoviridae
RTV	Virus de la trucha arcoiris	Iridoviridae
SalHV	Virus herpes de salmónido	Herpesviridae
SBIV	Iridovirus de lubina	Iridoviridae
SCRV	Ranavirus de Santee-cooper	Iridoviridae
SGIV	Virus de mero de Singapur	Iridoviridae
SVV	Virus de varicela de simios	Herpesviridae
TEV	Virus de edema del renacuajo	Iridoviridae
TFV	Virus de la rana tigre	Iridoviridae
VENV	Virus de necrosis eritrocítica	Iridoviridae
VZV	Virus de varicela	Herpesviridae
WSSV	Virus de la mancha blanca	Baculoviridae
WSIV	Virus del esturión blanco	Iridoviridae
YAV	Virus de ascitis del pez limón	Birnaviridae

LISTA DE FIGURAS

NUMERO	NOMBRE DELA FIGURA	PAGINA
Fig. 1	Principales especies cultivadas a nivel mundial, por peso y valía	p. 9
Fig. 2	Ostión japonés, <i>Crassostrea gigas</i>	p. 16
Fig. 3	Arbol filogenético de taxas de bivalvos	p. 17
Fig. 4	Taxonomía del ostión japonés (<i>C. gigas</i>)	p. 17
Fig. 5	Ciclo de vida del ostión japonés	p. 20
Fig. 6	Fechas de introducción de <i>C. gigas</i> en diferentes regiones del mundo	p. 21
Fig. 7	Contribución de cada uno de los principales productores a la producción mundial de ostión japonés (por peso)	p. 22
Fig. 8	Contribución de los demás productores al 0.82% restante de la producción mundial de ostión japonés (por peso)	p. 22
Fig. 9	Localización de las zonas de cultivo de ostión en México	p. 22
Fig. 10	Producción de semilla (<i>C. gigas</i>) en el estado de Sonora en 1988-1999	p. 24
Fig. 11	Evolución de la producción de ostión en Francia durante el siglo 20	p. 25
Fig. 12	Distribución de la producción total de ostión en Francia en el año 2000	p. 25
Fig. 13	Corte histológico a través de una lesión que muestra varios racimos de <i>Nocardia</i> sp. en <i>C. gigas</i>	p. 29
Fig. 14	Célula branquial de <i>C. gigas</i> infectada por un microorganismo de tipo <i>chlamydia</i>	p. 30
Fig. 15	Célula de tejido conectivo vesicular de <i>C. gigas</i> infectada por <i>M. mackini</i>	p. 31
Fig. 16	Ovocitos de <i>C. gigas</i> infectados por <i>M. chungmuensis</i>	p. 32
Fig. 17	Estadios tempranos de desarrollo de <i>M. chungmuensis</i> en las gónadas de <i>C. gigas</i>	p. 32
Fig. 18	Lesiones típicas provocadas por GNV en branquias de <i>C. angulata</i>	p. 33
Fig. 19	Larva de ostión infectada con OVVD	p. 34
Fig. 20	Porción de célula del velo infectada observada por MET	p. 34
Fig. 21	Estructura típica de un herpesvirus	p. 38
Fig. 22	Glicoproteínas de la envoltura de un virus herpes	p. 38
Fig. 23	Ilustraciones simplificadas de la estructura de los genomas de virus herpes	p. 40
Fig. 24	Envoltura de HSV : mecanismos posibles	p. 42
Fig. 25	Representación esquemática del ciclo de replicación de OsHV-1	p. 47
Fig. 26	Replicación del ADN de HSV-1	p. 49
Fig. 27	Nucleocápsides de OsHV-1	p. 50
Fig. 28	Partículas virales envueltas	p. 51

Fig. 29	Partículas virales envueltas al interior de vesículas citoplásmicas	p. 51
Fig. 30	Ciclo viral de miembros de la familia <i>Herpesviridae</i>	p. 52
Fig. 31	Representación del árbol evolucionario de los herpesvirus	p. 55
Fig. 32	Viriones envueltos en posición extracelular en larvas de <i>C. gigas</i> infectadas	p. 60
Fig. 33	Organización del genoma de OsHV-1 y de los cuatro isómeros posibles	p. 61
Fig. 34	Diagrama de las tres regiones (A-B-C) alineadas con el genoma de OsHV-1	p. 62
Fig. 35	Posición hipotética de los herpesvirus de invertebrados en el árbol filogenético de los herpesvirus	p. 63
Fig. 36	Partículas de FV-3	p. 65
Fig. 37	Dendograma de relación de secuencias de las secuencias de (MCP) de miembros de la familia <i>Iridoviridae</i> .	p. 65
Fig. 38	Sección de FV-3	p. 66
Fig. 39	Relaciones filogenéticas entre iridovirus basadas en secuencias proteicas de MCP	p. 69
Fig. 40	Mapa físico simplificado del genoma de LCDV-1	p. 70
Fig. 41	Célula FHM infectada por ECV	p. 71
Fig. 42	RFLP de ADN viral	p. 72
Fig. 43	Organización del genoma de ISKNV (He et al., 2001)	p. 73
Fig. 44	Iridovirus de mero	p. 74
Fig. 45	Virión ingresando a una célula vecina por endocitosis	p. 74
Fig. 46	Posición de los primers y tamaño esperado de los productos de amplificación por PCR	p. 77
Fig. 47	Detección por HIS de ADN viral en tejido de corazón de <i>Scianops ocellata</i>	p. 77
Fig. 48	Partículas de birnavirus	p. 80
Fig. 49	Relaciones filogenéticas dentro de la familia <i>Birnaviridae</i>	p. 80
Fig. 50	Diagrama de una partícula de IPNV	p. 81
Fig. 51	Dendograma basado en secuencias de aminoácidos de genes RdRp de acuabirnavirus	p. 83
Fig. 52	Evaluación de técnicas de detección a diferentes niveles	p. 89
Fig. 53	Localización de los primers empleados para la detección por PCR de OsHV-1 (C_5/C_{13} y C_2/C_6) y para la síntesis de la sonda para HIS (C_1/C_6)	p. 92
Fig. 54	Análisis por PCR de las muestras de referencia usando C_2/C_6 y C_5/C_{13} .	p. 93
Fig. 55	Resultados globales de los análisis por PCR efectuados en cada laboratorio	p. 94
Fig. 56	Resultados de los análisis por HIS efectuados en cada laboratorio	p. 95
Fig. 57	Cruzas efectuadas en el 2001 y el 2002 como parte del programa MOREST	p. 110
Fig. 58	Análisis por PCR de ocho pools de muestras (SP ₁ to SP ₈) con C_{10}/C_9	p. 136
Fig. 59	Análisis por PCR de ocho pools de muestras (SP ₁ to SP ₈) con C_5/C_{13}	p. 137

Fig. 60	Localización de los pares de primers dirigidos hacia regiones conservadas del gen MCP de FV ₃	p. 144
Fig. 61	Productos de PCR generados por MCP ₄ /MCP ₅ , RSIV _{V2} /RSV _{V5} y ATP ₃ /ATP ₄	p. 145
Fig. 62	Productos de PCR obtenidos con MCP ₄ /MCP y varios ADNs virales	p. 145
Fig. 63	Productos de PCR generados por IR ₁ /IR ₂ , IR ₁ /IR ₄ , IR ₃ /IR ₆ , IR ₃ /IR ₄ e IR ₃ /IR ₂ con ADN de EHNV	p. 146
Fig. 64	Productos de amplificación obtenidos con MCP ₄ /MCP ₅ , RSIV _{V2} /RSV _{V5} y ATP ₃ /ATP ₄ y ADN extraído de ostión	p. 146
Fig. 65	Productos de PCR generados por MCP ₄ /MCP ₅ e IR ₃ /IR ₆ con ADN extraído de muestras archivadas	p. 147
Fig. 66	Productos de PCR anidada (IR ₃ /IR ₆)	p. 147
Fig. 67	Productos de PCR generados por MCP ₄ /MCP ₅ e IR ₃ /IR ₆ donde se usa ADN de muestras de ostión Portugués de Setubal.	p. 147
Fig. 68	Productos obtenidos por RT-PCR usando TV ₁ F ₁ /R	p. 151
Fig. 69	Productos de RT-PCR generados por MABVP ₁ /P ₂ y TV ₁ F ₂ /R	p. 151
Fig. 70	Productos de PCR "anidada" obtenidos con MABV P ₃ /P ₄ y TV ₁ F ₂ /R donde se usan productos de amplificación generados por MABV P ₁ /P ₂ y	p. 151

LISTA DE TABLAS

TABLA	TITULO	PAG.
Tabla I	Distribución de las unidades producción, de pesquería y de laboratorios de producción de semilla en los estados productores de ostión	p. 23
Tabla II	Rango de hospedero y origen geográfico de iridovirus que infectan a peces	p. 75
Tabla III	Secuencias de varios pares de primers dirigidos hacia el gen de la MCP	p. 76
Tabla IV	Secuencias de primers dirigidos hacia el gen de la subunidad pequeña de la RNRS de iridovirus	p. 77
Tabla V	Secuencias de primers dirigidos hacia el gen de la ATPasa en iridovirus	p. 78
Tabla VI	Secuencia y temperaturas de alineamiento de los pares de primers empleados para el diagnóstico por PCR de iridovirus	p. 78
Tabla VII	Primers empleados para la detección por RT-PCR (P1-P2) y PCR anidada (P3-P4) de iridovirus	p. 85
Tabla VIII	Estatus infeccioso de los bloques de histología analizados	p. 90
Tabla IX	Referencias y estatus infeccioso de las muestras de semilla recolectadas y analizadas por PCR en el año 2000	p. 91
Tabla X	Referencias y estatus infeccioso de muestras de larvas colectadas y analizadas por PCR en 1997-1999	p. 91
Tabla XI	Resultados del ensayo inter-laboratorios de PCR	p. 93
Tabla XII	Resultados del ensayo inter-laboratorios de HIS	p. 94
Tabla XIII	Pools de extracciones de ADN de muestras recolectadas en Sonora	p.135
Tabla XIV	Productos de amplificación obtenidos con los cuatro pares de primers empleados	p.137
Tabla XV	Muestras empleadas para ensayos de detección de iridovirus	p.142
Tabla XVI	Primers reportados en la literatura y seleccionados para este trabajo	p.143
Tabla XVII	Primers diseñados en base a secuencias conservadas de MCP de iridovirus	p.143
Tabla XVIII	Productos de amplificación obtenidos con diferentes pares de primers dirigidos hacia secuencias conservadas del gen MCP	p.148
Tabla XIX	Secuencias de primers empleados para ensayos de detección de birnavirus	p.150

INTRODUCCIÓN GENERAL:

OSTION JAPONÉS

E

INFECCIONES VIRALES

**ORIGEN Y EVOLUCION
DEL PROYECTO
DE INVESTIGACION**

CULTIVO DE BIVALVOS: DESARROLLO Y AMENAZAS

Algunas actividades acuícolas han sido practicadas por siglos o inclusive milenios (cultivo de carpas en China, de tilapias en el Egipto antiguo, de ostiones en Roma durante la Antigüedad o de mejillones en el siglo XIII en Francia). Sin embargo, la verdadera expansión de las actividades acuícolas empezó hace menos de 40 años, con el inicio de los cultivos intensivos o semi-intensivos de carpas (básicamente en China), camarones (esencialmente en Asia y en Ecuador) y de salmones (principalmente en Noruega). La producción acuícola mundial pasó de alrededor de dos millones de toneladas al inicio de los años 60' a 34.1 millones de toneladas en 1996 (de las cuales 26.4 millones de toneladas son de peces y mariscos), lo cual representa 20% de la producción pesquera global. Durante el periodo 1987-1996, el crecimiento promedio del cultivo de peces y mariscos (en toneladas) fue de 9.5%. Después de Asia, las dos regiones acuícolas de mayor dinamismo son Europa y América Latina. A pesar de que la producción de muchos países está en aumento, sólo unos cuantos alcanzan volúmenes significativos. En 1996, por ejemplo, sólo catorce países accedieron a la categoría de grandes productores con más de 200 000 toneladas de peces y mariscos cultivados.

La FAO (2003) tiene registrada la producción de 35 grupos de especies, de los cuales cuatro son algas y plantas acuáticas. La carpa es la especie más cultivada, con el 44% de la producción acuícola mundial en términos de peso pero sólo 29% en términos valía total. La producción de carpa es poco relevante para el comercio internacional ya que está esencialmente destinada al consumo doméstico en los países donde se le cultiva (China, India y algunos países de Europa del Este). La producción de especies de alta valía (camarón, cangrejo, langostino, trucha, salmón y ostión) es la que ha conocido mayor expansión. Actualmente, sólo un número reducido de especies ocupa un lugar significativo en la producción acuícola mundial (Fig. 1).

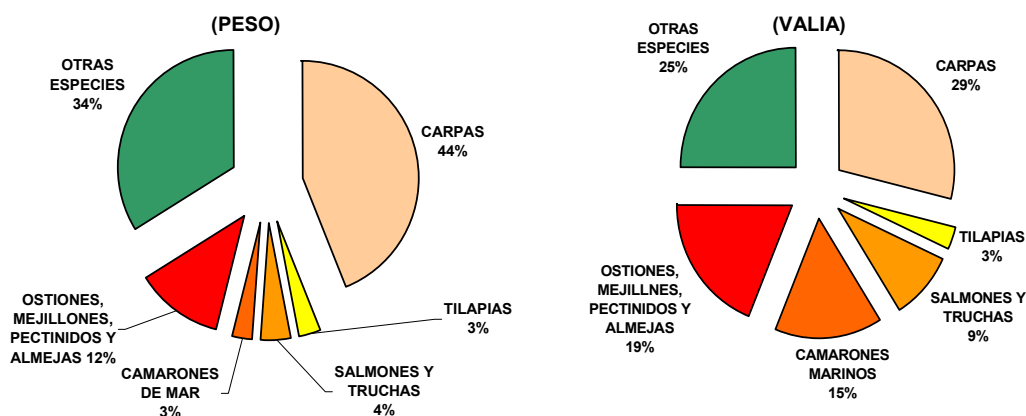


Fig. 1 : Principales especies cultivadas en el mundo, por peso y por valía (Wiefels, 1999)

La mayoría de las especies cultivadas son moluscos bivalvos. En 1997, berberechos, almejas, pectínidos, mejillones y ostiones representaron 20.6 % de la producción acuícola mundial por peso y 16.1 % por valía. La producción de ostión por sí sola totalizó 6.5% de este último rubro (FAO, 1999). En el caso de Francia, dos especies de ostión son cultivadas: el ostión del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y el ostión plano europeo (*Ostrea edulis*) que representan 68% de la producción francesa por peso (FAO, 1996). En el caso de México, se cultivan tres especies a escala comercial: el ostión japonés (*C. gigas*) y el ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*) en el Noroeste y el ostión americano (*Crassostrea virginica*) alrededor del Golfo de México.

El incremento de la producción de bivalvos ha sido favorecido por la acumulación de una gran cantidad de conocimientos y avances tecnológicos. Los aspectos técnicos del cultivo del ostión, por ejemplo, han sido objeto de una extensa literatura científica. Actualmente se tiene dominado el ciclo de vida completo del ostión a través de la reproducción artificial y la producción intensiva de larvas y semilla en laboratorio (Loosanoff y Davis, 1963 ; Devauchelle, 1989) que permiten compensar las deficiencias de la colección natural (Le Borgne, 1989). Recientemente, el desarrollo de técnicas para el transporte de las larvas y la colección de semilla en charolas de cría (Boucharenc y Cadoret, 1989) permitió incrementar aún más la independencia con respecto a los desoves naturales.

Dichas innovaciones tecnológicas, si bien contribuyen a mejorar y acrecentar la producción, generan cierto número de preguntas y problemas. Algunas de las consecuencias indeseables de su aplicación son el confinamiento de las poblaciones de moluscos, la intensificación del transporte de animales a nivel nacional e internacional y una marcada tendencia hacia la monoespecificidad de las áreas de cultivo (Héral, 1986). Todos estos factores favorecen de manera importante la emergencia y la diseminación de enfermedades infecciosas en los cultivos.

Ahora bien, las epizootias constituyen precisamente un riesgo potencial considerable para los cultivos de moluscos, aunque el impacto de los patógenos es variable y depende en gran medida de la edad de los animales. La mayoría de las enfermedades causadas por protozoarios afectan a animales adultos mientras que las enfermedades de etiología viral o bacteriana afectan esencialmente a larvas y juveniles. En el caso particular de las infecciones virales, los reportes fueron escasos antes de los años 70' pero se han multiplicado desde el inicio de los años 80' (Sindermann, 1984 ; Elston, 1997). La vigilancia zoonosológica de las reservas de reproductores es indispensable para reducir los riesgos de mortalidad masiva o compensar las pérdidas en caso de que se produzcan.

Resulta necesario distinguir claramente los patógenos de humanos que son vehiculados por las almejas, como los enterovirus, y aquellos que afectan directa y específicamente a los bivalvos. Algunos virus miembros de las familias *Iridoviridae* y *Herpesviridae* constituyen una amenaza real para los cultivos de ostión. La presencia de partículas de tipo iridovirus fue asociada con mortalidades masivas de adultos de ostión Portugués (*Crassostrea angulata*) (Comps et al., 1976b). La detección de virus de tipo herpes, por su parte, fue relacionada con eventos de mortalidad anormal en larvas y

semilla de *C. gigas* (Hine et al., 1992 ; Nicolas et al., 1992; Renault et al., 1994a y b) y de *O. edulis* (Comps y Cochenec, 1993; Renault et al., 2000a). También se han observado partículas de tipo herpes por microscopía electrónica de transmisión (MET) en *C. virginica* y *O. angasi* adultas (Farley et al., 1972 ; Hine y Thorne, 1997) sin que ningún evento de mortalidad haya sido relacionado con su presencia. Pueden por lo tanto plantearse ciertas dudas en cuanto al prejuicio real que puedan llegar a provocar las infecciones virales en los cultivos comerciales de bivalvos.

Sin embargo, uno de los mayores problemas relacionados con las enfermedades infecciosas de los bivalvos es la escasez de medidas que pueden ser tomadas para proteger a los cultivos de bivalvos. Este tipo de enfermedades sólo pueden ser vigiladas y, en cierta medida, controladas. Una etapa esencial para su manejo es el desarrollo de técnicas de diagnóstico que sean rápidas y sensibles. Tradicionalmente, la detección de patógenos se efectúa por medio de histología y de microscopía electrónica de transmisión, técnicas que requieren de tiempo y que están muy poco adaptadas para la detección de virus. Sin embargo, se ha desarrollado una extensa gama de métodos moleculares de diagnóstico, los cuales permiten llevar a cabo una detección rápida y específica de ciertos patógenos durante eventos de mortalidad. Cabe mencionar que el diagnóstico directo de virus por medio de la observación de efectos citopatógenicos en cultivos celulares se ve imposibilitada por la carencia de líneas celulares de bivalvos. La selección de linajes resistentes así como la transgénesis constituyen vías alternativas en la lucha contra las infecciones virales. No obstante, la definición de criterios de selección requiere de una mayor comprensión de las relaciones virus-hospedero y en particular de los mecanismos de defensa de los bivalvos.

En este contexto, el trabajo de investigación que se llevó a cabo como parte del proyecto doctoral está relacionado a la vez con el desarrollo/la validación de técnicas moleculares de detección de agentes virales y su aplicación al estudio de mecanismos de transmisión/prevalencia. Se esperaban resultados relevantes en términos de investigación básica (validación de técnicas analíticas, detección de diversos agentes virales) y aplicada (herramientas para limitar pérdidas en laboratorios de producción de larvas). Sin embargo, cabe mencionar que los objetivos de este trabajo eran ligeramente distintos cuando se le dio inicio y que sufrió modificaciones significativas por motivos que son expuestos a continuación.

EVENTOS DE MORTALIDAD MASIVA: ORIGEN DEL PROYECTO DE INVESTIGACION

Tal y como se mencionó con anterioridad, el cultivo del ostión japonés es una actividad de importancia económica en México, en donde las técnicas de producción de larvas y semilla han sido totalmente desarrolladas (Mazón-Suastegui, 1996). Esta actividad se vio seriamente afectada por eventos de mortalidad masiva que se produjeron en el Noroeste Mexicano entre Diciembre de 1997 y el año 2001. Pérdidas de hasta 80-100% fueron registradas tanto en larvas como en semilla y adultos. Estos fenómenos provocaron pérdidas económicas considerables a nivel local y regional, agravadas por el hecho de que las unidades de producción generalmente pequeñas no pudieron sobrellevar las pérdidas repetidas de lotes enteros de juveniles y adultos. Los episodios de mortalidad anormal afectan con relativa frecuencia a los cultivadores de ostión pueden ser causados por una variedad de factores (fisiológicos, ambientales...). Varias hipótesis fueron emitidas para explicar las mortalidades que afectaron al Noroeste Mexicano: impacto de los fenómenos El Niño/La Niña, déficit de variabilidad genética, presencia de especies tóxicas de fitoplancton y/o de uno o varios agentes infecciosos (bacterias, parásitos, virus, hongos). Sin embargo, si bien algunos análisis aislados fueron efectuados, ninguna hipótesis había sido explorada de forma metódica en el año 2000.

Bajo tales circunstancias, el proyecto inicial contemplaba llevar a cabo ensayos de detección de agentes virales en ostiones moribundos recolectados en granjas afectadas del Noroeste. La hipótesis de trabajo no era que los agentes virales fueran la causa directa y única de las mortalidades, sino que, por un mecanismo de sinergia entre varios factores, pudieran favorecerlas. Adicionalmente, los ostiones moribundos y debilitados, blanco fácil para los agentes infecciosos, ofrecían una oportunidad única de poder detectar virus específicos, de los cuales se tiene muy poca información. Se efectuaron varios muestreos en los años 2000-2001. Muestras procesadas y sin procesar fueron almacenadas a -80°C en tanto se llevaba a cabo la optimización de las técnicas moleculares de detección. Desafortunadamente, en septiembre del 2001 todo el material biológico almacenado fue perdido debido a una falla del sistema eléctrico provocada por un huracán que afectó a Baja California Sur.

A raíz de este problema, el proyecto doctoral fue modificado pero se conservaron la temática general (infecciones virales del ostión Japonés) y el aspecto "aplicado" de la investigación. Básicamente, el proyecto fue dirigido hacia la detección de OsHV-1 en material biológico archivado en el Laboratorio de Genética y Patología de IFREMER en La Tremblade, Francia. No obstante, una sección entera del proyecto fue dedicada al desarrollo de técnicas moleculares de detección de otros agentes virales potencialmente patógenos para los ostiones. A pesar de que sólo pudo efectuarse el análisis de una cantidad muy limitada de muestras colectadas en México, la transferencia al CIBNOR de las metodologías desarrolladas en IFREMER forma parte de las metas del trabajo. La colaboración entre ambas instituciones podría contribuir a un mayor conocimiento del polimorfismo de los virus de tipo herpes que infectan a bivalvos.

EVOLUCION DEL PROYECTO: ESTRUCTURA Y OBJETIVOS

El LGP de IFREMER La Tremblade ha desarrollado varias técnicas (incluyendo métodos moleculares y de inmunohistoquímica) para la detección de virus de tipo herpes que infectan a bivalvos. La secuenciación completa del genoma del virus herpes de ostreidos 1 (OsHV-1) hizo posible el diseño de varios pares de primers para su detección por PCR (Renault et al., 2000b; Arzul et al., 2001c) y la síntesis de una sonda para su diagnóstico por hibridación *in situ* (HIS) (Renault y Lipart, 1998; Lipart y Renault, 2002). Estos métodos moleculares han permitido detectar virus de tipo herpes no solo en larvas y juveniles de *C. gigas* sino también en larvas de otras especies de bivalvos (Arzul et al., 2001b y c; Renault et al., 2001a y b). A pesar de que ambas técnicas requieren aún de un proceso formal de evaluación y validación, su aplicación en una gran cantidad de análisis ha permitido establecer que son eficientes, sensibles y confiables. En ostiones adultos, se detectaron ADN y proteínas virales en varios tejidos, en particular las gónadas (Arzul et al., 2002). Debido a que los adultos pueden ser portadores asintomáticos, se sospecha que los reproductores puedan transmitirle la infección viral a su descendencia. Sin embargo, la existencia de este tipo de transmisión vertical no ha podido ser establecida con certeza.

En lo que a OsHV-1 se refiere, este trabajo fue conducido con un doble objetivo. El primero era dar los primeros pasos hacia una forma de validación de las técnicas de PCR y de HIS. Un proceso de validación *sensu stricto* es largo, complejo y requiere múltiples enfoques. En el marco de este trabajo sólo se consideraron dos aspectos : la reproductibilidad y la sensibilidad de las técnicas. La primera etapa consistió por lo tanto en una comparación de los resultados obtenidos por varios laboratorios tras el análisis por PCR e HIS de una serie de muestras de referencia. En la segunda etapa, una gran cantidad de muestras preparadas para histología (tejidos fijados e incluidos en parafina) fueron analizados por PCR (con dos pares de primers distintos) y por HIS. Los resultados obtenidos para cada muestra fueron comparados entre sí. Las muestras empleadas habían sido analizadas por histología (y en ciertos casos por MET) en el momento de su colecta (1994). El segundo objetivo de este proyecto era reunir datos susceptibles de reforzar dos hipótesis relacionadas con OsHV-1: su transmisión vertical y su presencia en México. Con este fin se llevaron a cabo ensayos de detección del virus por PCR simple y/o anidada en tres generaciones sucesivas de ostiones. Los estatus infecciosos de los reproductores fueron comparados con los de sus descendientes respectivos para determinar si alguna relación existe entre ellos. Por otra parte, una serie de muestras colectadas en Sonora fueron analizadas por PCR por varios pares de primers para determinar la presencia eventual de OsHV-1.

La mayor parte del proyecto estuvo enfocada hacia la detección de virus de tipo herpes y en especial OsHV-1 debido a que su patogenicidad para el ostión ha sido demostrada y que varios temas relevantes necesitaban ser desarrollados. No obstante, a pesar de que existe poca información acerca de otros agentes virales que infectan a bivalvos y en especial a ostiones, dos otras familias de

virus fueron consideradas la familia *Iridoviridae* y la familia *Birnaviridae*. Ambas han sido relacionadas con enfermedades y/o mortalidades en moluscos. Una revisión de la literatura consagrada a miembros de estas familias que infectan a organismos acuáticos permitió elegir o diseñar protocolos de detección por PCR. Una serie de ensayos preliminares fue llevada a cabo con el fin que los resultados sirvan como base para desarrollos ulteriores.

Los iridovirus parecen haber jugado un papel determinante en la eliminación de *Crassostrea angulata* de importantes regiones de cultivo en Francia, España y Portugal en los años setenta (Comps, 1970; Comps y Duthoit, 1976). En laboratorios de producción de larvas de ostión en Norteamérica, la presencia de iridovirus ha sido asociada con la aparición de una enfermedad (OVVD) que llega a provocar pérdidas importantes (Elston, 1979; Elston y Wilkinson, 1985). Todos estos reportes proporcionan descripciones de los agentes virales involucrados, basadas en observaciones por microscopía electrónica de transmisión. No se dispone de ninguna información sobre las secuencias genéticas de iridovirus de ostión; sin embargo, recientemente se ha acumulado una gran cantidad de secuencias de iridovirus de peces. Varios genes muestran un alto grado de conservación: el gen de la MCP en particular ha sido frecuentemente empleado para análisis filogenéticos. Las secuencias conservadas han sido empleadas para diseñar primers. Una serie de protocolos de detección por PCR se encuentran así disponibles, que podrían permitir la detección de iridovirus de moluscos en muestras archivadas.

En cuanto a la familia *Birnaviridae*, los acuabirnavirus han sido aislados de animales de aguas dulces, salobres y del mar. Los acuabirnavirus comprenden al virus de la Necrosis Pancreatica Infecciosa (IPNV), que es un patógeno importante de salmónidos detectado también en bivalvos y al grupo de los birnavirus marinos (MABV) que han sido asociados con mortalidades elevadas en moluscos (Lo et al., 1988). Un protocolo de RT-PCR para la detección de acuabirnavirus ha sido amplia y exitosamente aplicado en varias especies (Suzuki et al. , 1997b).

Tal y como fue mencionado, sólo pudieron llevarse a cabo una serie de ensayos preliminares en lo que a birnavirus e iridovirus se refiere. Dos objetivos principales fueron establecidos : (1) comprobar el buen funcionamiento de los protocolos de detección basados en primers de la literatura o diseñados *de novo* y (2) aplicar los protocolos funcionales a muestras archivadas con el fin de recopilar información sobre los iridovirus y birnavirus que infectan a moluscos. Los resultados obtenidos constituyen un punto de partida para otros trabajos de investigación.

Las actividades de investigación presentadas en esta tesis fueron desarrolladas durante una estancia de dos años efectuada en el laboratorio de Genética y Patología de Invertebrados Marinos (LGP) de IFREMER en La Tremblade (Charente Maritime, Francia), bajo la dirección del Dr. Tristan Renault. En el Anexo 1 se presenta brevemente al IFREMER y al LGP de La Tremblade con el fin de precisar la integración del tema de tesis a la problemática de este laboratorio.

EL OSTION JAPONES: UN MODELO CON IMPORTANCIA ECONOMICA

Mas allá de sus particularidades biológicas y taxonómicas, *C. gigas* es la especie de ostión más cultivada en el mundo y constituye por lo tanto un modelo con importancia económica. Juega en particular un papel determinante en la producción acuícola tanto en Francia como en México, donde es la única especie de ostión sometida a un cultivo intensivo en canastas o costales. La elección de este modelo para el desarrollo de técnicas de detección de virus se encuentra justificada en la temática del proyecto doctoral original. Uno de los objetivos de dicho proyecto era efectivamente determinar si en ciertos casos los ostiones cultivados en el Noroeste y afectados por eventos de mortalidad masiva de origen desconocido se hallaban infectados por agentes virales. Aunque circunstancias fuera de nuestro control provocaron cambios estructurales en el proyecto, la temática general del mismo (detección de agentes virales) y el modelo biológico fueron conservados.

EL OSTION JAPONES : PRESENTACION

1) TAXONOMIA

1.1 Posición taxonómica del ostión Japonés

El filo *Mollusca* es uno de los más extensos y variados del reino animal. Alrededor del 60% de las 50 000 especies descritas que lo componen viven en el mar. Los moluscos son animales de cuerpo blando protegidos por una concha dura dentro de la cual una capa de tejido llamada manto contiene los órganos internos del animal. Otra característica de este grupo es la existencia de un pie musculoso generalmente empleado para su locomoción. A pesar de que la mayoría de los moluscos comparten este esquema corporal básico, el grupo se caracteriza por una gran diversidad morfológica y de modos de vida.



Fig. 2 : Ostión Japonés, *Crassostrea gigas* (ilustración de la NOAA)

La taxonomía de los moluscos es compleja y ha sido causa de controversia. Los criterios anatómicos constituyen los principales ejes de la clasificación mientras que la distribución geográfica y el hábitat son criterios secundarios. Las características morfológicas (concha, bisagra, estructura de las branquias) (Fig. 2) no pueden ser consideradas como criterios estrictamente objetivos ya que su apreciación puede depender de las técnicas de observación y análisis empleadas. La gran plasticidad fenotípica de estos organismos hace que la determinación a nivel de especie sea más compleja aún (Ranson, 1967). Actualmente, el filo está formado por siete clases: *Aplacophora*, *Monoplacophora*, *Polyplacophora*, *Gastropoda*, *Bivalvia*, *Scaphopoda* y *Cephalopoda*. La clase de los gasterópodos es la más grande (40 000 especies) y diversa (caracoles, babosas de mar, moluscos pulmonados). Existen alrededor de 650 especies de cefalópodos : *Nautilus*, ammonites, pulpos, calamares y sepias. Las clases los polioplacóforos (quitones) y escafópodos (colmillos de mar) combinadas reúnen alrededor de 1000 especies, mientras que la clase primitiva de los Monoplacóforos está formada por 10 especies de un único género, *Neopilina*. En cuanto a los bivalvos o lamelibranquios, cuentan con más de 8000 especies (Boss, 1982).

La clase *Bivalvia* ha sido dividida en seis sub-clases (Newell, 1969): *Palaeotaxodonta*, *Cryptodonta*, *Pteriomorpha* (los ostiones y pectínidos pertenecen a este grupo), *Palaeoheterodonta*, *Heterodonta* y *Anomalodesmata*. Diversos estudios filogenéticos basados en secuencias de ADN ribosomal (Bowman, 1989; Kenchington et al., 1994; Winnepeninckx et al., 1994; Steiner y Müller, 1996; Adamkewicz et al., 1997) han contribuido a establecer sub-divisiones dentro de este filo (Fig. 3).

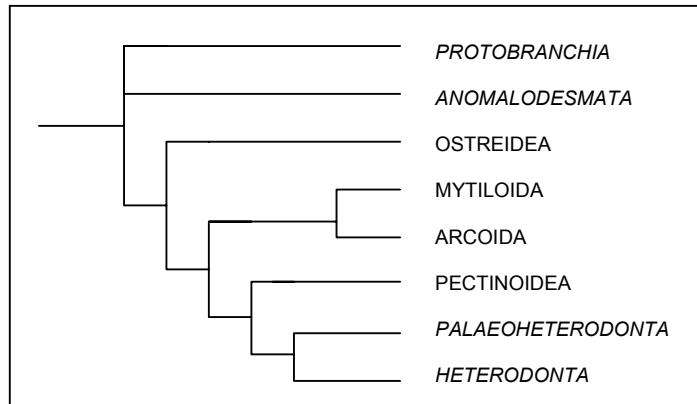


Fig. 3: Arbol filogenético de taxos de bivalvos. Arbol basado en la comparación de secuencias de 506 bp de ADN ribosomal 18s ribosomal pertenecientes a 28 especies de bivalvos (Adamkewicz et al., 1997)

Tal representación es similar a aquella sugerida por Starbogatov (1992), basada en criterios morfológicos. La coherencia de los criterios morfológicos y moleculares refleja la brevedad del periodo durante el cual las clases y subclases de moluscos se diferenciaron, ya que las características morfológicas tienden a evolucionar más lentamente que las características moleculares. La aparición del primer y último molusco (en el Cámbrico y Ordovicio, respectivamente) están separadas por menos de 80 millones de años (Waller, 1998).

El ostión Japonés pertenece al orden *Ostreoida* y a la familia *Ostreidae* (Rafinesque, 1815). La taxonomía de esta especie se encuentra detallada en la Figura 4.

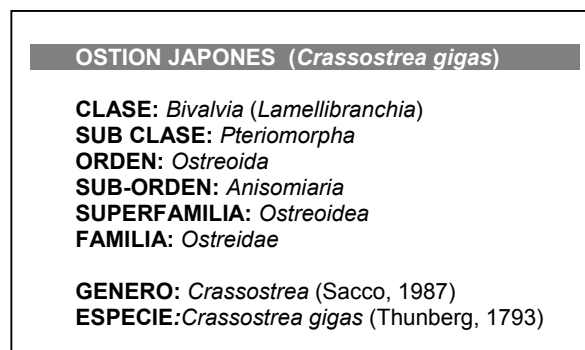


Fig. 4: Taxonomía del ostión Japonés (*C. gigas*)

Al interior de la familia *Ostreidae*, ocho géneros han sido reconocidos: *Ostrea* (Linné, 1758), *Lopha* (Roding, 1798), *Dendostrea* (Swainson, 1835), *Crassostrea* (Sacco, 1897), *Cryptostrea* (Harry, 1985), *Teskeyostrea* (Harry, 1985), *Saccostrea* y *Ostreola*. Siete especies han sido descritas dentro del género *Crassostrea* :

- *Crassostrea chilensis* (Hertlein)
- *Crassostrea columbiensis* (Hanley, 1846)
- *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951), conocida como ostión de placer o de Cortéz
- *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1928), conocida como ostión de mangle
- *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1792), conocida como ostión Americano
- *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), conocida como ostión Portugués
- *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), conocida como ostión Japonés u ostión del Pacífico

A lo largo de este trabajo, la detección de agentes virales fue llevada a cabo tanto en el ostión Japonés como en el ostión Portugués. Tal y como se indica en la próxima sección, la distinción entre ambos taxones no ha podido ser definida de forma clara.

1.2 ¿*Crassostrea gigas* contra *Crassostrea angulata*?

Crassostrea gigas (Thunberg, 1793) y *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) han sido generalmente presentadas como dos entidades taxonómicas separadas. La distinción entre ambas especies fue basada esencialmente en su contrastante distribución geográfica al momento de su descripción. *C. gigas* era nativa de Japón mientras que *C. angulata* se encontraba distribuida en el Sur del continente Europeo, precisamente en las costas de Portugal. Sin embargo, estudios efectuados desde el inicio de los años 70 hasta fechas más recientes insisten en su elevado nivel de homología biológica (Boudry et al., 1998; O'Foighil et al., 1998).

De manera más precisa, no parece existir una barrera reproductiva entre ambas « especies ». Además, los orígenes asiáticos de las poblaciones Europeas de *C. angulata* han sido confirmados (Boudry et al., 1998 ; Huvet et al., 2000). Sin embargo, a pesar de la homogeneidad revelada por los marcadores enzimáticos (Mathers et al., 1974 ; Buroker et al., 1979 ; Mattiucci y Villani, 1983) los marcadores genéticos revelan una diferenciación significativa entre poblaciones de cada taxón.

Para concluir, los ostiones Japonés y Portugués poseen un grado elevado de homología biológica y genética. Menzel (1974) fue el primero en clasificarlas como dos subespecies: *Crassostrea gigas* y *Crassostrea gigas angulata* respectivamente. El hecho de que la clasificación de los moluscos bivalvos sea problemática en sí complica aún más la atribución de una posición taxonómica a cada uno de estos taxones. Se ha sugerido que sean definidos como ecotipos, es decir grupos de individuos de la misma especie y viviendo en un mismo hábitat pero que cuentan con adaptaciones locales que son el resultado de presiones selectivas específicas a cada medio. Un punto de comparación/diferenciación adicional podría ser su contrastante sensibilidad hacia las infecciones por iridovirus. Este tipo de información podría obtenerse por medio de la caracterización inmunológica y genética de cada taxón y de sus híbridos.

En base a estos datos, *C. gigas* y *C. angulata* serán manejados como taxones distintos a lo largo de este documento pero sin que se les atribuya una posición sistemática precisa.

2) DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y CARACTERISTICAS BIOLOGICAS

2.1 Distribución geográfica y hábitat

Los moluscos bivalvos viven en una variedad de ambientes acuáticos: mar, estuarios y agua dulce. La temperatura y la salinidad establecen los límites de su distribución espacial y afectan cada aspecto de su biología. La mayoría de los moluscos marinos viven en un rango de temperaturas que va desde -3°C hasta 44°C (Vernberg y Vernberg, 1972). Dentro de esta gama, la termotolerancia es específica a nivel de especie y al interior de una misma especie, los embriones y las larvas son menos tolerantes que los adultos. Debido a que son eurihalinos, los ostiones colonizan con igual éxito los estuarios y el mar. *C. gigas* se encuentra naturalmente presente en el océano Pacífico, en aguas poco profundas, abrigadas y de baja salinidad (23-28 ups). Su hábitat usual está en las zonas intertidal o infralitoral (pueden llegar hasta profundidades de 15-20 m) y su presencia a lo largo de las costas está ligada a los niveles tróficos elevados de estas zonas (Soletchnik et al., 1993).

Actualmente, la distribución geográfica del ostión Japonés es sumamente extensa, debido a que algunas de sus características biológicas (rápido crecimiento, resistencia a la turbidez y a las variaciones de temperatura) resultaron en su introducción y adaptación exitosa al cultivo en muchos países (Smith et al., 1986, Grizel, 1996). Actualmente, se le produce en Europa (desde 1966) (Grizel y Héral, 1991), Canada (1912), USA (1926), Africa del Sur, Tasmania (1952) (Thomson, 1952 y 1959), Nueva Zelanda (1972) (Smith et al., 1986), México (1972) (Mazón-Suástegui, 1996) y Rusia (1976).

2.2 Ciclo de vida del ostión

El modo de reproducción primitivo de los bivalvos marinos está basado en la fecundación externa. El hermafroditismo es frecuente y puede ser de tipo alternado o sucesivo. *C. gigas* es una especie protándrica secuencial (Amemiya, 1928 ; Coe, 1932 ; Galtsoff, 1961; Gérard et al., 1995). Los sexos son por lo tanto generalmente separados (aunque pueden observarse hermafroditas) y tras una primera temporada reproductiva, en la que los animales producen gametos machos, cambian de sexo cada año, usualmente en invierno (Quayle, 1969). Durante la temporada invernal, la actividad y el volumen de las gónadas es extremadamente reducido. Las células germinales empiezan a desarrollarse de manera activa al final del invierno y el proceso se acelera con el incremento de las temperaturas.

La fecundidad elevada de las hembras (cada una puede llegar a producir varios millones de ovocitos) (Héral, 1986 ; Gérard, 1998), compensa las tasas elevadas de mortalidad de las larvas. El inicio de la gametogénesis está provocado por factores externos: temperatura, niveles tróficos (Deslous-Paoli et al., 1981) y fotoperiodo. El hecho que la gametogénesis se inicie cuando las temperaturas alcanzan 10°C y que la maduración se acelere bajo temperaturas superiores a 15°C, explica que los desoves se produzcan en verano. En zonas frías, donde la especie crece muy lentamente, las gónadas pueden llegar a representar hasta un 7% del peso total en ostiones de 1-2 años de edad, el 60% en ostiones de 2 años de edad y hasta 80% en el caso de animales de tres años. En México se obtienen tallas comerciales de 10-12 cm en un año y la gónada representa alrededor de un 60% del peso total.

El desarrollo embrionario del ostión Japonés ha sido ampliamente estudiado (Gérard et al., 1995). Las divisiones celulares son rápidas y resultan en la formación de un embrión de tipo morula que se transforma en una larva trocófora y, en un lapso de 24 horas, en una larva de tipo D que mide aproximadamente 70 μm . En esta etapa, las larvas poseen una concha (Prodisoconcha I) y un velo, que constituye un órgano de nutrición y locomoción. La forma de la larva evoluciona durante su crecimiento con el desarrollo de una extensión en forma de gancho llamada umbo. Unos días antes del final del estadio larvario, un órgano sensorial aparece: su aspecto (un punto oscuro) justifica que en este punto las larvas sean llamadas «oculadas o con mancha ocular». Cuando la larva alcanza un tamaño de 300-380 μm , se desarrolla un órgano musculado denominado pié, dándole su nombre a este estadio «pediveliger». El crecimiento de este órgano, que le permite a la larva reptar buscando un sustrato adecuado para su fijación caracteriza el final del estadio pelágico. Durante la metamorfosis, se producen otros cambios relevantes tales como el desarrollo del manto que sintetiza la concha definitiva. El proceso de fijación termina con el atrofiamiento del pie y del velo, y el desarrollo de branquias, generándose juveniles morfológicamente similares a los adultos (Fig. 5). En resumen, el estadio larvario dura entre 15 y 28 días bajo temperaturas de 20°C a 26°C (Héral y Deslous-Paoli, 1991). En los laboratorios mexicanos, el periodo de cultivo larval es de 15 a 20 días, a temperaturas de 23 a 28°C (Mazón-Suástegui, 1996).

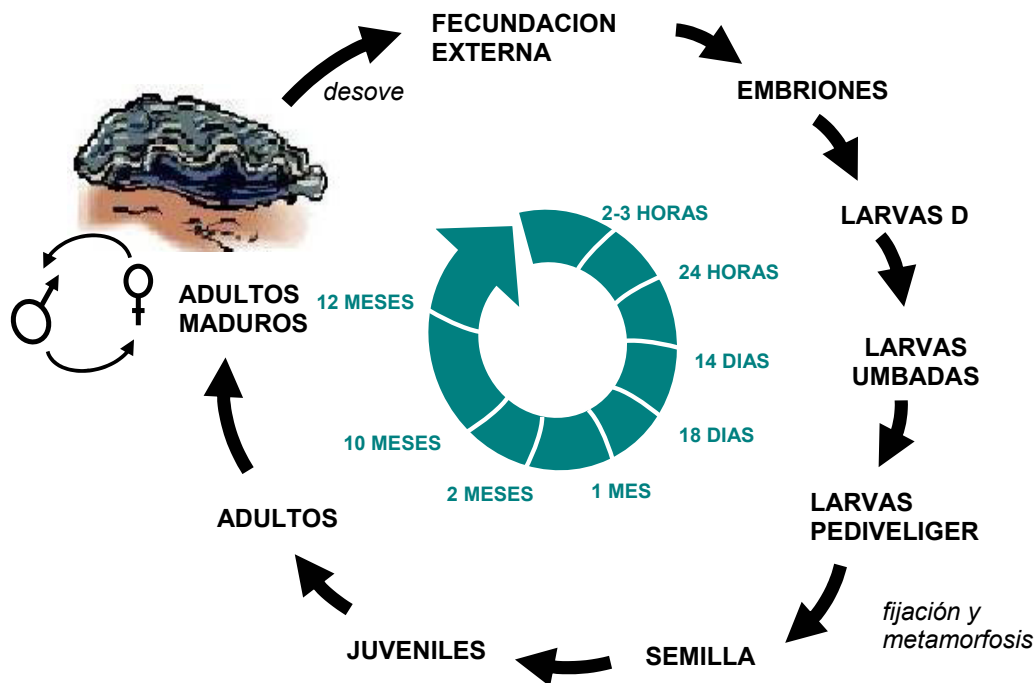


Fig. 5 : Ciclo de vida del ostión Japonés (las «edades» corresponden a ostiones en condiciones de cultivo)

Las larvas pelágicas se hacen cargo de la diseminación geográfica de los bivalvos. Tras la fijación/metamorfosis, los adultos de *C. gigas* viven fijados en sustratos duros. En yacimientos naturales, las densidades pueden alcanzar los 250 individuos/m².

PRODUCCION E IMPORTANCIA A NIVEL ECONOMICO

1) ORIGEN Y DESARROLLO DEL CULTIVO DEL OSTION JAPONES

En ciertas regiones en donde ha sido introducido con éxito (Fig. 6), se han logrado establecer poblaciones silvestres de *C. gigas*. Sin embargo, en la mayoría de los casos la especie está sujeta a un proceso de cultivo. De las casi 30 especies presentes a lo largo de las costas de Japón, esta variedad fue seleccionada por su rápido crecimiento y fácil adaptación al cultivo. Actualmente, *C. gigas* forma parte de las ocho especies que constituyen el sustento de la acuicultura mundial.

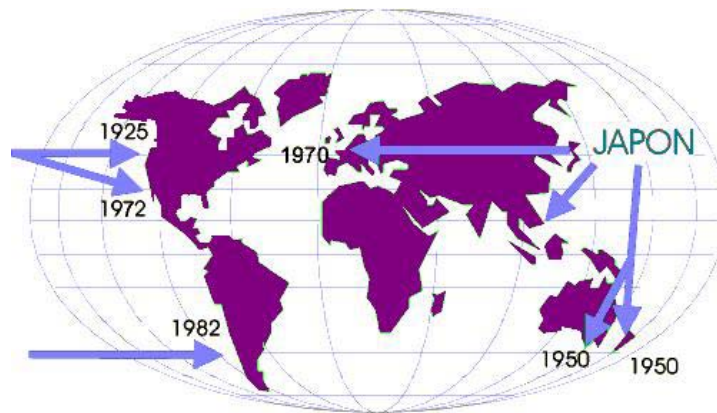


Fig. 6 : Fechas de introducción de *C. gigas* en diferentes regiones del mundo (adaptado de H. Grizel, IFREMER).

El desarrollo de la tecnología de producción fue basado en estudios efectuados por H. Seno y J. Hari. A partir de 1923, estas técnicas fueron aplicadas al cultivo intensivo de la especie en artes suspendidas. Los sistemas de cultivo en profundidad por medio de balsas o líneas (charolas, bolsas, tubos...) permitió a los cultivadores japoneses aprovechar zonas de aguas profundas (Palacios-Fest et al., 1988). El desarrollo de una variedad de materiales plásticos y de sistemas de cultivo tal y como las canastas Nestier, bolsas o mallas permitió el aumento de la producción. La expansión considerable de la producción de ostión en los últimos 60 años también se ha debido al desarrollo de técnicas para la producción de larvas y semilla en laboratorio.

La producción mundial de ostión japonés alcanzó los 4 109 784 de toneladas en el 2001 (FAO, 2003). China es el líder, con 86% de la producción mundial, seguida por Japón (5.7%), Corea (4.3%), Francia (3.1%) y Estados Unidos (0.9%). Los demás países, incluido México, contribuyen sólo con un 0.82% de la producción mundial por peso (Figs. 7 y 8). La producción de especies similares como el ostión americano (*C. virginica*) y el ostión plano (*O. edulis*) son poco significativas en comparación con *C. gigas* (Grizel, 1993).

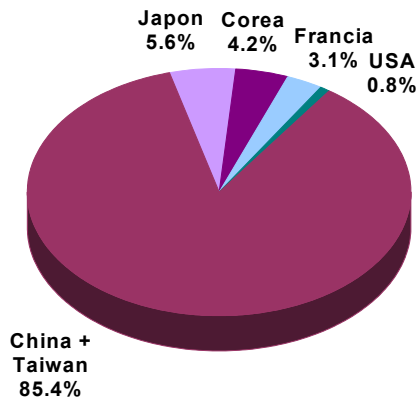


Fig. 7 : Contribución de cada uno de los principales productores a la producción mundial de ostión Japonés (peso) (FAO, 2003)

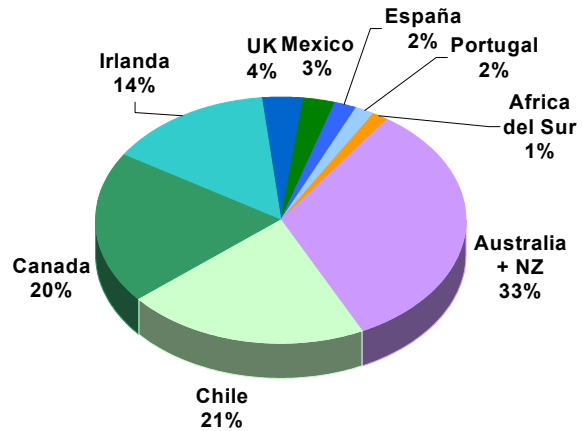


Fig. 8 : Contribución de los demás productores al 0.82% restante de la producción mundial de ostión Japonés (peso) (FAO, 2003)

2) PRODUCCION EN MEXICO Y FRANCIA

2.1 Origen de la producción de ostión Japonés en México

En México se cultivan dos especies nativas (*C. virginica* y *Crassostrea corteziensis*) y una especie introducida (*C. gigas*). El cultivo extensivo y semi intensivo se lleva a cabo en lagunas costeras y esteros con sistemas de fondo (camas y mesas) y suspendidos (líneas, balsas y canastas Nestier). En el área del Golfo de México el cultivo del ostión se concentra básicamente en la laguna de Tamiahua (340 km²) en el estado de Veracruz, cuya producción es la mayor del país. Sin embargo también existen cultivos en el estado de Tabasco (Lagunas Del Carmen, Machona y Mecoacán) y en el estado de Campeche (Laguna Términos). En el Noroeste, la producción de ostión se lleva a cabo en lagunas en los estados de Sonora y Sinaloa, en Bahía de San Quintín y Laguna Manuela en Baja California Norte y en Laguna San Ignacio, Bahía Tortugas, El Coyote, La Bocana, Santo Domingo, Estero San Buto y Estero Rancho Bueno en Baja California Sur (Fig. 9).

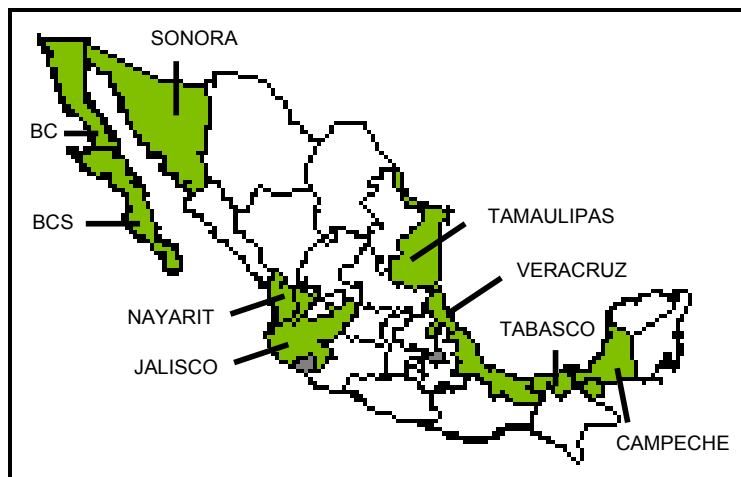


Fig. 9 : Localización de las zonas de cultivo comercial de ostión en México

La semilla de *C. virginica* y *C. corteziensis* es colectada en el medio mientras que la semilla de *C. gigas* es exclusivamente producida en laboratorios como el Centro de Reproducción de Especies Marinas de Bahía Kino, Sonora (Tabla I).

Tabla I: Distribución de unidades de producción comercial, pesquería acuícola y laboratorios de producción de semilla en los estados productores de ostión (Oficinas Federales of SEMARNAP)

ESTADOS	UNIDADES DE PRODUCCION (ACUICULTURA COMERCIAL)	PESQUERIA ACUICULTURAL	LABORATORIOS DE PRODUCCION DE SEMILLA
Baja California	27	-	4
Baja California Sur	10	-	-
Campeche	-	1	-
Jalisco	1	-	-
Nayarit	3	-	-
Sonora	26	-	1
Tabasco	5	-	-
Tamaulipas	-	8	-
Varacruz	-	13	-

El ostión japonés fue introducido por vez primera en México, en el estado de Baja California en 1972-1973 por la Dirección General de Acuicultura de la Universidad Autónoma de Baja California. Los resultados obtenidos indicaron que la especie podía alcanzar una talla comercial de 8 cm tras un periodo de engorda de seis meses en las aguas templado-frías del Pacífico Mexicano (Palacios-Fest et al., 1988). Este primer cultivo experimental fue realizado en la Bahía de San Quintín, B.C., con semilla fijada en conchas adquirida en Estados Unidos. La semilla fue engordada hasta alcanzar la talla comercial en sartas o collares suspendidos a balsas flotantes. Más tarde, el proyecto fue retomado a escala comercial por la SPP «Bahía Falsa» S.C.L. (Palacios-Fest et al., 1988).

La introducción de esta especie a Baja California Sur fue llevada a cabo en 1976, fecha en que Esteban Félix Pico et al. iniciaron la producción experimental de ostiones y otros moluscos en la Bahía de La Paz. Este trabajo era parte de un programa más amplio de estudios básicos desarrollado por la Dirección de Acuicultura cuyo objetivo era determinar el potencial de cultivos marinos en diversas localidades del estado. Cuando el potencial acuícola de la especie fue confirmado, varios proyectos comerciales empezaron a ser desarrollados en cooperativas (los ostiones estaban reservados por ley al sector social de la pesca).

La producción de ostión aumentó de manera significativa en el Noroeste (estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Baja California y Baja California Sur), con proveedores de semilla situados a lo largo de la costa del Pacífico. La producción de semilla fué respaldada por la mejora continua de las técnicas y procesos de reproducción selectiva y mejoramiento genético de los ostiones, resultado de programas destinados a desarrollar el cultivo del ostión. Sin embargo, la producción de semilla se vio afectada por una serie de problemas en los años 90 (Fig. 10).

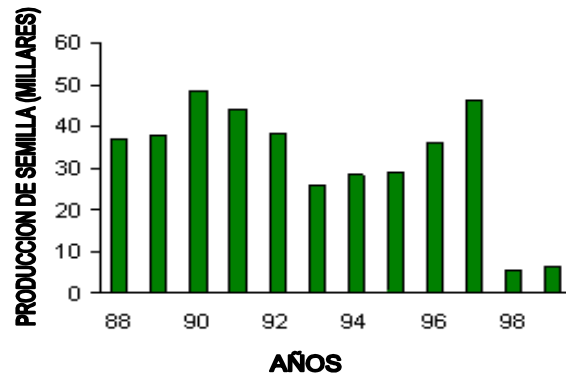


Fig. 10 : Producción de semilla (*C. gigas*) en el estado de Sonora durante el periodo 1988-1999 (Dirección General de Pesquerías y Acuicultura, Gobierno de Sonora)

Actualmente, los laboratorios públicos y privados no efectúan el ciclo completo de producción. Las larvas utilizadas para producir semilla provienen de laboratorios localizados en Estados Unidos. La importación de estos organismos se lleva a cabo frecuentemente sin ningún control sanitario.

2.2 Cultivo de ostión en Francia

2.2.1 Introducción del ostión Japonés en Francia

En Francia, el cultivo del ostión constituye una actividad de gran importancia económica, iniciada en el siglo XVII con la especie nativa *Ostrea edulis*. Los ostiones eran recolectados de yacimientos naturales y engordados durante cuatro a cinco años en pozas o 'claires' situadas a lo largo de la costa Atlántica. La sobre-explotación progresiva del recurso llevó a una escasez del mismo de tal forma que en 1860 se inició la importación de *Crassostrea angulata* de Portugal. No obstante, la verdadera «introducción» de esta especie fue accidental: en 1868, la tripulación de un barco amenazado por una tempestad tiró un cargamento de ostiones *C. angulata* supuestamente muertos en el estuario del río Gironda. Las condiciones ambientales resultaron sumamente favorables a la reproducción de la especie que colonizó rápidamente las costas de Francia del suroeste al río Loira. La producción aumentó notablemente después de 1920, cuando el uso de colectores de semilla empezó a sistematizarse. A pesar de un asentamiento deficiente en los años 30, al inicio de los 60s la producción de *C. angulata*, de casi 85 000 toneladas, era tres veces más elevada que la de *O. edulis*. Sin embargo, las principales áreas de cultivo (las Bahías de Marennes-Oléron y Arcachon) empezaron a verse afectadas por una disminución de las tasas de crecimiento y un incremento de las tasas de mortalidad. Entre 1966 y 1969, un primer episodio de la «enfermedad de branquias» provocó una disminución considerable de las poblaciones de *C. angulata*. Entre 1970 y 1973, otra serie de mortalidades masivas provocadas por la misma enfermedad erradicaron definitivamente al ostión Portugués de las costas Francesas (Fig. 11).

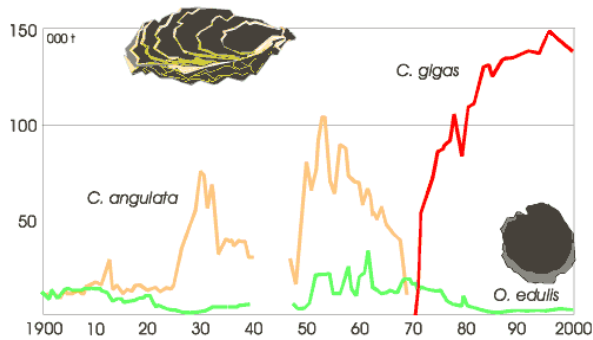


Fig. 11 : Evolución de la producción de ostiones (*C. gigas*, *C. angulata* y *O. edulis*) en Francia durante el siglo XX (IFREMER)

Confrontada con una crisis considerable que afectó a más de 5000 productores lo que ocasionó pérdidas económicas de más de 90 millones de dólares por año, Francia tuvo que importar de Canadá (Columbia Británica) cantidades comerciales de ostión Japonés que fueron plantadas directamente en las principales áreas de producción entre 1971 y 1975.

Adicionalmente, semilla de *C. gigas* fue importada de Japón entre 1971 y 1977 para re-sembrar las zonas de producción (Grizel y Héral, 1991) y constituir “santuarios” de reproductores.

La introducción de *C. gigas* fue tan exitosa que en menos de diez años sobrepasó los récords establecidos por *C. angulata* (y sigue en progreso). Al final de la década de los setenta, la industria del ostión se vió afectada por la emergencia de dos parásitos, *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae* que diezmaron la producción de *O. edulis* en la mayoría de las áreas de cultivo. La producción nunca se restableció: las cosechas de *O. edulis* representan una pequeña fracción (2%) de la producción de *C. gigas*. Afortunadamente, las enfermedades que destruyeron a las poblaciones de *C. angulata* y *O. edulis* no han afectado, hasta ahora, las de *C. gigas* (Figs. 11 y 12).

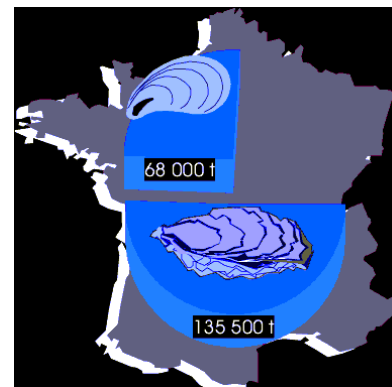


Fig. 12 : Distribución de la producción total de ostiones (270 000 t) en Francia en el año 2000 : 68 000 t de *O. edulis* y 135 000 t de *C. gigas* (IFREMER)

2.2.2 Aprovechamiento y técnicas de cultivo

En Francia, la semilla colectada a lo largo de las costas Atlánticas del suroeste representa cerca de 90% de la producción total de semilla. El estuario del río Gironde y las Bahías de Arcachon y Marennes-Oléron proporcionan suficiente semilla para cubrir la demanda de los productores de todo el país. Tras su colecta, la semilla es transplantada a diversas áreas de cultivo en Bretaña, Normandía y el Mediterráneo. Aunque la semilla puede asentarse en una variedad de sustratos, los colectores más comúnmente utilizados son tubos y discos de PVC lixiviados. Aunque las cantidades puedan variar de forma importante de un año a otro, el reclutamiento es de alrededor de 5 trillones (5×10^{12}) de organismos en la Bahía de Arcachon y el doble en la Bahía de Marennes-Oléron. Recientemente, los criaderos Franceses han empezado a producir semilla libre y larva: la fracción producida por los laboratorios va en aumento y corresponde básicamente a la producción de triploides.

Los tres principales métodos de engorda son el cultivo de fondo, el cultivo en camas y el cultivo en sartas suspendidas. El cultivo de fondo se lleva a cabo en « parques » o « viveros » en la zona intertidal o en aguas profundas : los juveniles (6-10 meses de edad) son sembrados en el fondo previamente endurecido, directamente o tras haber sido colocados en bolsas de malla. En el caso de semilla fijada, se disponen los colectores directamente sobre el fondo. La protección de los parques contra los cangrejos depredadores se lleva a cabo por medio de cercas de malla plástica, de ramitas o de piedras. La preengorda de la semilla dura de uno a dos años. Tras este periodo, los organismos que se hallaban fijados a colectores, se separan, se miden y se vuelven a poner en el fondo por un periodo adicional de 1-2 años. Durante las fases de preengorda y maduración, las densidades utilizadas son de aproximadamente 5 y 7 kg por metro cuadrado, respectivamente. Una tonelada de semilla genera cerca de 20 toneladas de ostiones de talla comercial.

El cultivo en camas es el más común en la costa atlántica. La semilla se introduce en costales ostrícolas que se colocan sobre camas ostrícolas de varilla metálica dispuestas en hileras paralelas en la zona intertidal. A lo largo de su crecimiento (1-3 años) y con el fin de favorecerlo, los ostiones son cambiados a costales con luz de malla mayor mientras que se reduce progresivamente la cantidad de organismos por costal. Las bolsas son volteadas con regularidad para limitar la proliferación de algas y para permitir que la concha de los ostiones adquiera una forma adecuada. Este método asegura un buen crecimiento y calidad de los ostiones, bajos niveles de mortalidad y tiene la ventaja que el acceso a los cultivos es fácil. Sin embargo presenta inconvenientes como las altas densidades de organismos, el fouling y la acumulación de desechos bajo las mesas. Existen reglamentos estrictos que limitan la cantidad de mesas de cultivo e imponen que sean retiradas en invierno para permitir la dispersión de los desechos orgánicos. La cosecha se lleva a cabo desde barcos de fondo plano a marea alta o por tractor a marea baja. Las artes suspendidas se utilizan esencialmente en las lagunas del Mediterráneo, que son poco profundas (10 m) y no están sometidos a los fenómenos de mareas. Los colectores de semilla transportados desde el Atlántico se cuelgan bajo mesas metálicas colocadas sobre el fondo marino. Una parte de la cosecha es comercializada tras 12-18 meses. La otra se fija con cemento sobre barras de madera o cuerdas y se suspende un año más. En el litoral Atlántico, varias compañías preengordan a los ostiones en líneas flotantes.

En zonas de marismas (Bahía de Marennes-Oléron), las ostras suelen colocarse en pozas de marea (claires) para su « afinación ». Dichas pozas son poco profundas y ricas en nutrientes y con una productividad elevada del fitoplancton. Una especie especialmente interesante es la diatomea *Haslea ostrearia* que contiene un pigmento cuya absorción les otorga a las branquias de los ostiones un color verde oscuro atractivo para el consumidor. El enriquecimiento microalgal del agua de las pozas durante las mareas muertas de otoño (cuando las pozas no son reabastecidas por el agua de mar) mejora considerablemente el proceso de engorda (Soletchnik et al., 2001). Los ostiones son vendidos en su mayoría como producto fresco. La producción francesa se destina exclusivamente al mercado interior y más del 50% de las ventas son realizadas en los periodos de navidad y año nuevo.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS QUE AFECTAN AL OSTION JAPONES (*Crassostrea gigas*)

Crassostrea gigas es la especie de ostión más cultivada en el mundo. Su éxito se debe en parte a que no ha sido objeto de epizootias devastadoras como otras especies cultivadas, como *O. edulis* que fué diezmada por la bonamiasis o *C. virginica* víctima de perkinsiosis (*Perkinsus marinus*) y haplosporidiosis (*Haplosporidium nelsonii*). Sin embargo, más de diez enfermedades infecciosas provocadas por virus, bacterias, protozoarios y metazoarios han sido reportadas en *C. gigas*. A pesar de que algunos de estos agentes etiológicos son capaces de afectar a los ostiones en cualquier etapa de su ciclo de desarrollo (larvas, juveniles, adultos), el modo de vida de cada estadio lo expone a problemas particulares.

INFECCIONES POR BACTERIAS

1) VIBRIOSIS

La vibriosis es una enfermedad oportunista que afecta a larvas de varias especies de moluscos bivalvos. Ha sido observada y estudiada en laboratorios de producción de semilla y por lo general está relacionada con un manejo inadecuado de los organismos (Elston, 1993). Sin embargo, *Vibrio tubiashi* ha sido aislado de larvas de bivalvos única y exclusivamente durante epizootias (Hada et al., 1984; Jeffries, 1982; Tubiash et al., 1970). Los organismos afectados nadan cerca del substrato y su velo está fragmentado (Jeffries, 1982). Bajo condiciones experimentales, la enfermedad se desarrolla rápidamente, llegando a eliminar lotes enteros de larvas 48 horas después del inóculo de la bacteria (Elston, 1993). Los vibrios pueden provocar infecciones paleales agudas (*Vibrio sp.*, *Vibrio anguillarum* y otras especies indeterminadas), infecciones extrapaleales crónicas, atrofia visceral (*Vibrio sp.*), daños en el velo asociados con la presencia de toxinas (*Vibrio sp.*, *Vibrio anguillarum*, *V. ordali*, *V. tubiashi*, *V. alginolyticus*) o necrosis bacilar i.e. lesiones en el velo y otros órganos (*Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. tubiashi*, *Vibrio splendidus*) (Elston, 1993).

En cuanto a los juveniles, dos cepas potencialmente patógenas han sido detectadas en lotes afectados mortalidad estival : una cepa de *V. splendidus* similar a la cepa SCB8 (Lacoste et al., 2001) y la cepa *V. splendidus* biovar II (Waechter et al. 2002). De manera experimental, ambas cepas inducen mortalidades en semilla de *C.gigas*. Sin embargo, dichos agentes infecciosos no pueden ser considerados como los agentes etiológicos de mortandades estivales (Le Roux et al., 2002 y 2004).

2) ENFERMEDAD DEL LIGAMENTO DE LA BISAGRA DE OSTIONES JUVENILES

Esta enfermedad es una de las más importantes que afectan a ostiones juveniles y en especial a *C. gigas* en cultivo intensivo (Dungan y Elston 1988). Emerge esporádicamente y ha sido asociada con condiciones sanitarias deficientes (Elston 1984). El agente etiológico forma parte de un grupo de bacterias marinas poco caracterizadas, llamadas *Cytophaga spp.*, responsables de infecciones invasivas en peces (Dungan et al., 1989). El ligamento de los ostiones consiste en una matriz de proteínas acelulares secretadas por el epitelio paleal. Estas bacterias colonizan el área elástica del ligamento y la perforan, lo que provoca lesiones que frecuentemente infectan bacterias del epitelio subyacente. Estas infecciones paleales ocasionan una disminución de la elasticidad del ligamento y, a término, su ablandamiento, gelatinización y liquefacción. El ostión se vuelve entonces incapaz de abrir las válvulas para alimentarse o respirar. La relación observada entre esta enfermedad y la muerte de los organismos indica que las lesiones se vuelven irreversibles cuando un área significativa del ligamento ha sido destruida. Del mismo modo, la infección del epitelio paleal por bacterias oportunistas puede volverse irreversible (Dungan y Elston 1988).

3) NOCARDIOSIS DEL OSTION JAPONES

Esta enfermedad oportunista (Friedman y Hendrick, 1991) se conoce como «bactiremia inflamatoria letal» (Elston et al., 1987) y «necrosis focal» (Sindermann y Rosenfeld, 1967). Es causada por una bacteria actinomiceta del género *Nocardia* y de especie indeterminada (Friedman y Hendrick, 1991). *Nocardia spp.* causa pequeñas lesiones típicas (de color amarillo verdoso, planas o hinchadas) en la superficie del manto y de las branquias. En etapas avanzadas de la enfermedad, así como en animales moribundos, este tipo de lesiones macroscópicas se observa también en el corazón y músculo aductor. Las lesiones consisten en abscesos llenos de bacterias del género *Nocardia*, de hemocitos infiltrantes y de tejido necrótico del hospedero (Elston et al., 1987; Friedman et al., 1991). En ostiones severamente afectados, múltiples focos de infección se forman en el tejido conectivo de diversos órganos: palpos labiales, corazón, músculo aductor, gónadas, órganos digestivos y manto (Fig. 13) (Elston et al., 1987). En estadios terminales, la mayor parte del tejido conectivo puede hallarse infiltrada por los hemocitos.

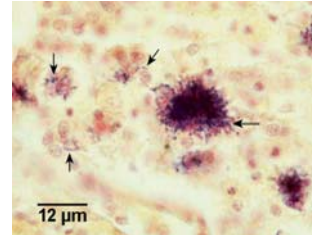


Fig. 13: Corte histológico de una lesión con varios racimos de *Nocardia sp.* (flechas) en *C. gigas* (Bower et al., 1994).

La incidencia de esta enfermedad en una extensa área geográfica sugiere que la bacteria responsable proviene de una fuente ambiental (Elston, 1993) y puede afectar cualquier área de cultivo de *C. gigas*. Las tasas de mortalidad asociadas a la Nocardiosis no han sido evaluadas con exactitud. Sin embargo, su prevalencia elevada en ciertas poblaciones y la severidad de los síntomas en ciertos organismos indican que puede constituir un factor importante de mortalidad (Elston, 1993), especialmente en el caso de mortalidades estivales (Friedman et al., 1991).

4) MICROORGANISMOS DE TIPO RICKETTSIA Y CHLAMYDIA

4.1 Microorganismos de tipo *Rickettsia*

El primer caso de infección por rickettsias en moluscos fue descrito en células epiteliales de túbulos de glándula digestiva de *C. gigas* en Francia (Comps et al., 1977). En 1994, varios organismos de tipo rickettsia fueron reportados en células epiteliales de branquias en ostión (Renault y Cochenec, 1994). Los microorganismos observados eran pleomórficos, con indicios a nivel estructural de la presencia de una pared celular bacteriana, una organización interna de tipo bacteriano y una multiplicación por fisión. Las observaciones morfológicas efectuadas no permitieron llevar a cabo una identificación más precisa. Sin embargo, su detección en un hospedero invertebrado sugirió que podía pertenecer al género *Wolbachia* (Renault y Cochenec, 1994). En 1991, Azevedo y Villalba describieron procariontes asociados al tejido branquial de ostiones japoneses adultos provenientes de un estuario de la costa atlántica de España. No obstante, les resultó difícil incluirlos en el género *Rickettsia* debido a su localización extracelular.

4.2 Microorganismos de tipo *Chlamydia*

En 1995, la detección de un organismo de tipo *chlamydia* en tejidos conectivos de branquia y de manto de *C. gigas* pudo ser asociada con la presencia de lesiones macroscópicas en branquias y con eventos de mortalidad que habían afectado a esta especie en la costas Atlánticas de Francia en 1992-1993 (Renault y Cochenec, 1995). En el hospedero, estos microorganismos provocaron la lisis de las células infectadas, la destrucción de la arquitectura normal de los tejidos de la branquia y del manto y la infiltración hemocítica de las regiones infectadas. Se observaron alteraciones ultraestructurales: fenómenos de vesiculización y lisis de organelos celulares o mitocondrias inflamadas. La intensidad de las lesiones así como la elevada prevalencia de estos microorganismos de tipo *chlamydia* indica que son patógenos potenciales de *C. gigas*.

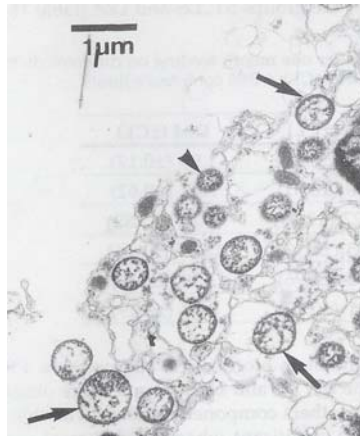


Fig. 14: Célula branquial de *C. gigas* infectada por un organismo de tipo *chlamydia*: cuerpos reticulados (flechas enteras) y cuerpos intermedios condensados (punta de flecha) (barra = 1 μm) (Soletchnik et al., 1998)

Un reporte ulterior confirmó la presencia de microorganismos de tipo *chlamydia* en las branquias y el manto de ostiones japoneses de la bahía de Marennes Oléron (France): dicha infección provocó la degradación de los tejidos afectados (Fig. 14) (Soletchnik et al., 1998). Se ha mencionado que los ostiones infectados podrían tratar de compensar el déficit en superficie branquial utilizable por medio del incremento de la tasa de filtración, manteniendo de esta forma constante su metabolismo basal. No fue posible establecer ninguna relación entre incidencia del patógeno y mortalidad de los animales infectados.

INFECCIONES POR PARASITOS

1) ENFERMEDAD DE LA ISLA DE DENMAN

El agente etiológico de esta enfermedad es el protista *Mikrocytos mackini* (Farley et al., 1988). Uno de los síntomas es la aparición de pústulos de color amarillo-verdoso en la superficie del cuerpo de ostiones de 5-7 años de edad (Quayle, 1961). Pueden formarse también cicatrices de color marrón en la capa de nacre de la concha, en las zonas situadas alrededor de los pústulos, y la glándula digestiva puede adoptar un color café claro. A nivel microscópico, los focos infecciosos se forman en el tejido conectivo vascular (Fig. 4). Los abscesos inflamatorios agudos contienen hemocitos y células infectadas del hospedero así como células del parásito. Progresivamente, tejido necrótico del hospedero se acumula en el centro de cada lesión (Farley et al., 1988). En contadas ocasiones, las lesiones afectan fibras del músculo aductor (Elston, 1993). Aunque se han reportado mortalidades de hasta 53% en una misma temporada, la severidad de los eventos fluctúa año tras año. De manera general, los ostiones de menos de dos años resultan menos afectados que organismos de mayor edad (Quayle, 1961; Bower, 1988).

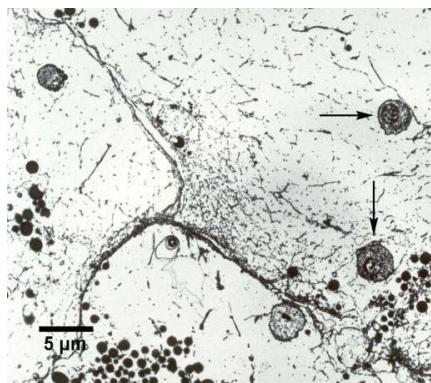


Fig. 15: célula de tejido conectivo de *C. gigas* infectada por *Mikrocytos mackini* (flechas) (Bower et al., 1994)

2) HAPLOSPORIDIOSIS

Casos de haplosporidiosis en *C. gigas* han sido reportados en Norteamérica (costa del Pacífico) (Katkansky y Warner, 1970), Asia del este (Kern, 1976; Friedman et al., 1991) y Europa (costa del Atlántico) (Comps y Pichot, 1991; Renault et al., 2000c). La presencia de plasmodias en el tejido conectivo vascular (y en el caso de juveniles, en el epitelio del corazón) se acompaña de una infiltración hemocítica difusa (Friedman et al., 1991). Los demás estadios del parásito (esporogonias y esporas maduras) han sido detectados en el epitelio del divertículo digestivo. Diversas descripciones morfológicas de estos haplosporidios revelan semejanzas y diferencias. Por su tropismo a nivel de tejido y su tamaño, los parásitos reportados por Friedman et al. (1991) y Kern (1976) se asemejan a *Haplosporidium nelsoni* descrito en *C. virginica*. Por otra parte, los parásitos reportados por Comps y Pichot (1991) y por Katkansky y Warner (1970) presentan similitudes con *Haplosporidium costale*, agente etiológico de la llamada «enfermedad de la costa» de *C. virginica*. A pesar de que estos casos de infección no han sido asociados con mortalidades, Friedman et al. (1991) reportó lesiones microscópicas que en ciertos juveniles pueden llegar a ser significativas e inclusive provocar la muerte de los individuos. En tales casos, la haplosporidiosis puede tener un impacto directo y considerable en la producción de juveniles del ostión Japonés.

3) INFECCION DE OVOCITOS POR MARTEILIA

Marteilioides chungmuensis (Comps et al., 1986) fue en un principio descrito como una amiba (Chun, 1979). Posteriormente fue clasificado como *Paramyxea* en base al mecanismo de formación de sus esporas a partir de una célula madre (Comps et al., 1986 y 1987). Estos microorganismos infectan el citoplasma de ovocitos en ostiones hembra y pueden afectar un área extensa del folículo reproductivo (Figs. 16 y 17) (Matsusato et al., 1977). Los ovocitos infectados pueden ser liberados a través de las branquias o retenidos en el folículo ovariano (Park y Chun, 1989). Esta enfermedad ha sido reportada en Corea (Park y Chun, 1989) y en Japón (Matsusato et al., 1977).

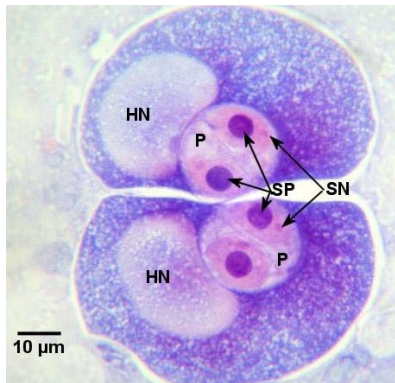


Fig. 16: Ovocito de *C. gigas* infectado por *M. chungmuensis*. P: célula primaria degenerada. SN : esporontes. SP: esporas en desarrollo. HN : núcleo del ovocito (Bower et al., 1994).

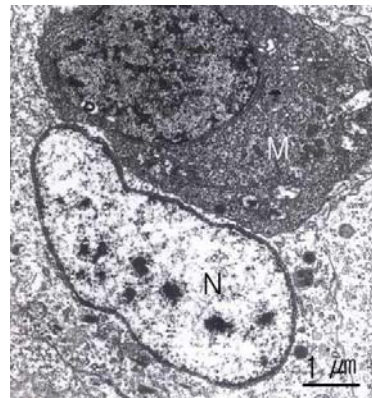


Fig. 17: Estadios tempranos de desarrollo de *M. chungmuensis* (M) adyacente al núcleo (N) de la célula hospedera (ovocito) en la gónada de *C. gigas* (Park, 1989).

4) MITICOLASIS

Myticola orientalis es un copépodo parásito descrito por Wilson (1938) que ha sido detectado en el tracto digestivo de juveniles y adultos de *C. gigas* (Elston, 1993). A proximidad del sitio de fijación del parásito, el epitelio columnar alto del estómago puede volverse cúbico o escamoso y perder los cilios (Sparks, 1962). En ciertos casos, el parásito puede penetrar a través del epitelio. Mori (1935) describió originalmente a *Myticola orientalis* en *C. gigas* del mar interior de Japón pero también ha sido reportado en Estados Unidos y en Francia. Katkansky et al. (1967) reportaron una disminución del índice de condición en ostiones infectados. Sin embargo, no ha podido ser demostrada ninguna disminución en términos de crecimiento de la concha o de supervivencia.

INFECCIONES VIRALES

1) ENFERMEDADES CAUSADAS POR AGENTES DE TIPO IRIDOVIRUS

1.1 Necrosis de branquias y enfermedad infecciosa de los hemocitos

En una revisión, Comps (1988) citó dos virus aparentados a la familia *Iridoviridae* descritos en ostiones adultos. Ambos fueron observados en el ostión Portugués *C. angulata* y uno de ellos también fue asociado con un episodio de enfermedad que afectó a una población de *C. gigas*. Dichos iridovirus fueron designados respectivamente virus de necrosis de las branquias (GNV) y virus de infección hemocítica (HIV). La morfología de ambos virus presentaba características típicas de los iridovirus con una simetría icosaédrica con rotaciones de orden 5, 3 y 2, un diámetro de aproximadamente 380 nm y cápsides trilaminares (Mattern et al., 1974). El origen de las partículas virales estaba en el estroma virogénico cuyo contenido en ADN fue revelado con acridina naranja.



Fig. 18: Lesiones típicas de las branquias provocadas por el GNV en *C. angulata* (in Marteil, 1976)

La enfermedad de las branquias es una epizootia caracterizada por una ulceración progresiva de las branquias y, en menor medida, de los palpos labiales y del manto (Alderman y Gras, 1969). Los primeros síntomas son la aparición de manchas amarillentas y pequeñas perforaciones (Fig. 18), las cuales se extienden y transforman en muescas a lo largo del borde externo de los órganos afectados. La erosión de los tejidos provoca una interrupción de la circulación, lo cual favorece la degeneración de la zona distal de los filamentos branquiales (Arvy y Franc, 1968). Estas lesiones resultan en un adelgazamiento de las ostras y finalmente en su muerte. Esta enfermedad ha sido considerada como uno de los factores que contribuyeron a eliminar al ostión portugués de importantes zonas de cultivo en las costas de Francia (Comps, 1970; Comps y Duthoit, 1976).

La HIVD parece haber afectado también a *C. angulata* en los años setenta pero ningún signo clínico específico pudo ser identificado. El virus tiene una acción sistémica ya que destruye a los hemocitos a todos los niveles del sistema sanguíneo: en los vasos, los senos y en las «lagunas» que se forman en el tejido conectivo. La infección se extiende de este modo a todos los órganos (Comps, 1983). A nivel histológico, se observó una reacción inflamatoria aguda en hemocitos atípicos infectados por el virus. Esta enfermedad fue reportada en *C. gigas* durante un episodio de mortalidad estival en la Bahía de Arcachon en 1977 (Comps et al., 1976a; Comps, 1980; Comps y Bonami, 1977).

1.2 Enfermedad viral del velo (OVVD)

Esta enfermedad ha sido observada de manera exclusiva en laboratorios de producción de larvas de ostión Japonés (Elston, 1979 ; Elston y Wilkinson, 1985). La enfermedad afecta principalmente el epitelio del velo de las larvas. La pérdida de células ciliadas provoca la aparición de lesiones con aspecto de “gotas” en la periferia del velo y resulta en la formación de ampolla características de esta enfermedad (Fig. 19). En cuanto a las células que permanecen en el velo, pueden perder sus cilios. Al acrecentarse la cantidad de células infectadas, las larvas pierden su capacidad para nadar.

Los estudios morfológicos del agente etiológico de la OVVD contribuyeron a su inclusión en la familia *Iridoviridae* ya que las partículas virales presentes en el epitelio infectado, de aproximadamente 228 nm de diámetro, presentaban simetría icosaédrica. Dichas partículas parecían ser generadas por el viroplasma, formando cuerpos de inclusión, primero como partículas sin núcleo y posteriormente como partículas completas. Partículas con cápsides enteras pero carentes de núcleo se desprendían ocasionalmente del viroplasma. Las partículas completas aparecen en las imágenes con un núcleo denso separado de la cápside por una zona menos densa (Fig. 20).

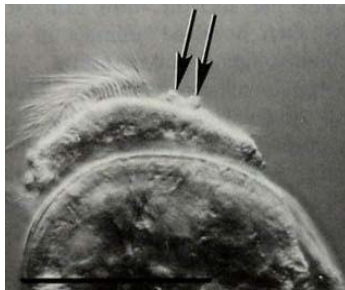


Fig. 19: Larva de ostión infectada por OVVD que muestra células epiteliales en proceso de desprendimiento (flechas) (barra=100 μ m) (Elston y Wilkinson, 1985))

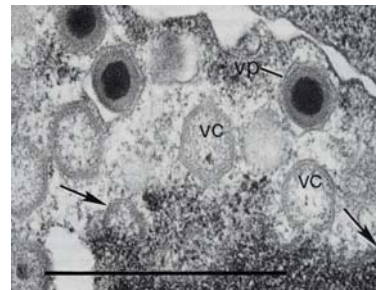


Fig. 20: Porción de una célula de velo infectada. Formación de material para la cápside en la periferia de la inclusión (flechas). Vc: cápside viral vacía. Vp: partícula viral entera. (barra=1 μ m) (Elston y Wilkinson, 1985)

A pesar de que OVVD sólo ha sido detectada en larvas de *C. gigas* producidas en laboratorios norteamericanos (estado de Washington), es posible que se declare tanto en laboratorios como en poblaciones naturales de esta y otras regiones templadas del mundo. OVVD puede provocar mortalidades de hasta 100% en tanques con organismos de más de 10 días de edad y de talla superior a 150 mm. Se desconocen actualmente los factores ambientales capaces de influir sobre el desarrollo de la enfermedad o la susceptibilidad de los organismos.

2) VIRUS DE TIPO HERPES

Existen reportes de infecciones de diversas especies de ostiones causadas por virus de tipo herpes en varias regiones del mundo. Fueron asociadas por primera vez a eventos de mortalidad de ostiones adultos (*C. virginica*) en Estados Unidos a principios de los años 70 (Farley et al., 1972). En 1991, varios brotes de infección por virus de tipo herpes se produjeron en laboratorios de producción de larvas de ostión japonés en Francia (Renault et al., 1994b). Desde 1993, la presencia de este tipo de virus ha sido relacionada con mortalidades esporádicas de semilla de *C. gigas* en diferentes regiones de Francia (Renault et al., 1994 b). Hine et al. (1992) reportaron mortalidades anormales provocadas por un virus de tipo herpes en laboratorios de producción de larvas de *C. gigas* en Nueva Zelanda.

Otras especies de moluscos (ostreidos y no ostreidos) han sido afectados por infecciones por herpesvirus. En Francia, la presencia de este tipo de virus fue asociada con mortandades anormales de semilla y larvas de *O. edulis* (Comps y Cochennec, 1993, Renault et al., 2000a) y reportada en larvas de almejas *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum* y del pectínido *Pecten maximus* (Renault 1998; Renault et al., 2001a y b; Arzul et al., 2001b y c). Partículas virales similares fueron observadas en hemocitos de adultos de *Ostrea angasi* en Australia (Hine y Thorne, 1997) así como en larvas de ostión plano *Tiostrea chilensis* en Nueva Zelanda (Hine et al., 1998). Los herpesvirus que afectan a bivalvos parecen ser ubicuos. Se desconoce sin embargo si se trata de diversos virus que infectan cada uno a un solo hospedero de manera específica o de un único virus con un muy amplio rango de hospederos (Arzul et al., 2001c).

ENFOQUE HACIA
TRES FAMILIAS VIRALES:

HERPESVIRIDAE

IRIDOVIRIDAE

BIRNAVIRIDAE

FAMILIA *HERPESVIRIDAE*

Los miembros de la familia *Herpesviridae* están relacionados con un gran número de enfermedades importantes que afectan tanto a seres humanos como animales. Comprende alrededor de 120 virus que infectan una variedad de organismos vertebrados e invertebrados: peces, anfibios, aves, marsupiales y moluscos bivalvos (Minson et al., 2000; Roizman et al., 1992)

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS VIRUS DE TIPO HERPES

1) MORFOLOGIA Y PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

1.1 Arquitectura

Los viriones tienen estructuras características y complejas y constan de elementos simétricos y asimétricos (Homa y Brown, 1997; Steven y Spear, 1997). De forma esférica, están formados por un núcleo, una cápside, un tegumento y una envoltura. El núcleo consiste en el genoma viral (una molécula de ADN lineal, de doble cadena) empacado dentro de una cápside preformada. El ADN se encuentra empacado en una matriz líquida y cristalina que llena por completo el volumen interno de la cápside (Fig. 21).

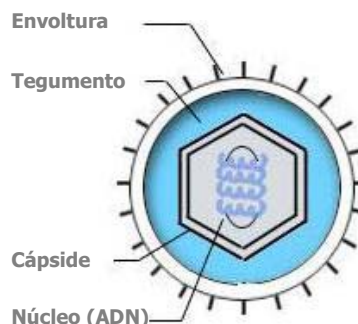


Fig. 21 : Estructura típica de un virus herpes

La **cápside** madura es un icosaedro de 100-110 nm de diámetro. El ensamblaje de la cápside inicia con la condensación de subunidades alrededor de un armazón proteico, formando una pre-cápside cuyos elementos se encuentran débilmente ligados entre sí. El clivaje proteolítico del armazón permite su reorganización para alcanzar la forma característica y definitiva de la cápside.

El **tegumento** es un término someramente definido, introducido por Roizman y Furlong (1974) para designar a las estructuras situadas entre la cápside y la envoltura. Se distribuye de manera asimétrica alrededor de la nucleocápside y su grosor puede variar según la posición del virión en la célula infectada. En ciertos casos, el tegumento de los viriones acumulados en vesículas citoplásmicas es más grueso que el de las partículas acumuladas en el espacio perinuclear (Mc Combs et al., 1971 ; Fong et al., 1973). El tegumento contiene una gran cantidad de proteínas y la concentración de algunas de ellas resulta extremadamente variable.

La **envoltura**, una bicapa lipídica íntimamente asociada con la superficie externa del tegumento, presenta un aspecto trilaminar típico (Epstein, 1962). Deriva de «parches» de la membrana celular, i.e.

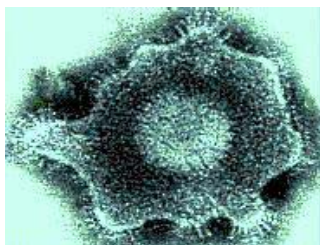


Fig. 22: Glicoproteínas de la envoltura de un virus herpes

zonas alteradas por la inserción de glicoproteínas y de lípidos virales (Morgan et al., 1959; Asher et al., 1969). Dichas glicoproteínas forman "picos" de aproximadamente 8 nm de largo (Fig. 22) (Wildy y Watson, 1963). La cantidad y proporción de cada glicoproteína viral varía en función de los virus. Las partículas envueltas miden entre 120 y 300 nm (Roizman y Batterson, 1985), lo cual depende del grosor del tegumento y de la integridad de la envoltura.

1.2 Propiedades físico-químicas

La masa de un virión de HHV-1 es de aproximadamente 13×10^{-16} g y su ADN representa 10% de este valor. La masa de una cápside llena es de aproximadamente 5×10^{-16} g. La densidad de un virión en CsCl es de 1.22-1.28 g cm⁻³. La estabilidad de los virus herpes es sumamente variable. Sin embargo, suelen ser susceptibles a la desecación y a pH bajo. Solventes de lípidos y detergentes alteran la infectividad de los viriones.

2) CARACTERÍSTICAS A NIVEL MOLECULAR

2.1 Organización de los genomas virales

Los genomas de los virus herpes consisten en una molécula lineal de ADN de doble cadena de 125 hasta más de 240 kpb. Los genomas que han sido examinados suficientemente, muestran una extensión nucleotídica en el extremo 3'. Ninguna proteína terminal ha sido identificada.

La mayoría de los genomas de virus herpes están constituidos por secuencias únicas y repetidas. Las secuencias repetidas (103-104 pb) pueden estar orientadas de manera idéntica (regiones repetidas directamente o en tándem) o en sentidos opuestos (regiones repetidas invertidas). Las regiones únicas y repetidas se organizan de maneras diversas, generando diferentes tipos de estructuras genómicas. En base a la organización de las secuencias repetidas de más de 100 pb, los virus herpes han sido divididos en seis grupos (1-6) (Fig. 23):

Grupo 1: una secuencia larga de uno de los extremos del genoma se encuentra repetida directamente en el extremo opuesto (CCV, EHV-2, HHV-6). El genoma de MCMV tiene una configuración parecida a esta pero las secuencias repetidas son más cortas.

Grupo 2: una secuencia más corta se halla repetida en sentido directo varias veces a ambos extremos del genoma y la cantidad de repeticiones a ambos extremos puede variar (virus herpes de simios, virus herpes Saimiri, virus herpes ateles, HHV-8).

Grupo 3: el genoma tiene en este caso la misma configuración que en el grupo 2 pero las secuencias repetidas a ambos extremos tienen una orientación opuesta (CTHV). La división del genoma en dos regiones únicas (que pueden ser invertidas) flanqueadas por repeticiones en sentidos contrarios genera cuatro isómeros equimolares.

Grupo 4: una secuencia situada en un extremo del genoma está repetida varias veces en tandem en ambos extremos. Otras secuencias internas se hallan repetidas en el mismo sentido (EBV). En este caso, la falta de homología entre las secuencias repetidas internas y terminales impide la inversión de las dos secuencias únicas y por ende la existencia de isómeros.

Grupo 5: dos regiones únicas (U_L = única larga y U_S = única corta) están flanqueadas por dos grupos diferentes de regiones repetidas en sentido inverso (TR_L = terminal repetida larga / IR_L = interna repetida larga y TR_S = terminal repetida corta / IR_S = interna repetida corta). Sólo U_S adopta dos orientaciones distintas: en una población viral, los genomas con cada una de las orientaciones se encuentran presentes en cantidades equimolares (VZV, PrV).

Grupo 6: la organización del genoma es similar a la del grupo 5 pero TR_L/IR_L son más largas y ambas orientaciones de U_L están presentes en cantidades equimolares en el ADN viral (HSV-1, HSV-2, HCMV). Adicionalmente, este tipo de genomas contiene pequeñas secuencias terminales redundantes llamadas secuencias "A" (400 pb en HSV-1) repetidas en sentido directo a ambos extremos y en sentido inverso en el empalme IR_L-IR_S (Wagner y Summers, 1978). A pesar de ser la más compleja, esta estructura fue la primera en ser descrita (Sheldrick y Berthelot, 1975).

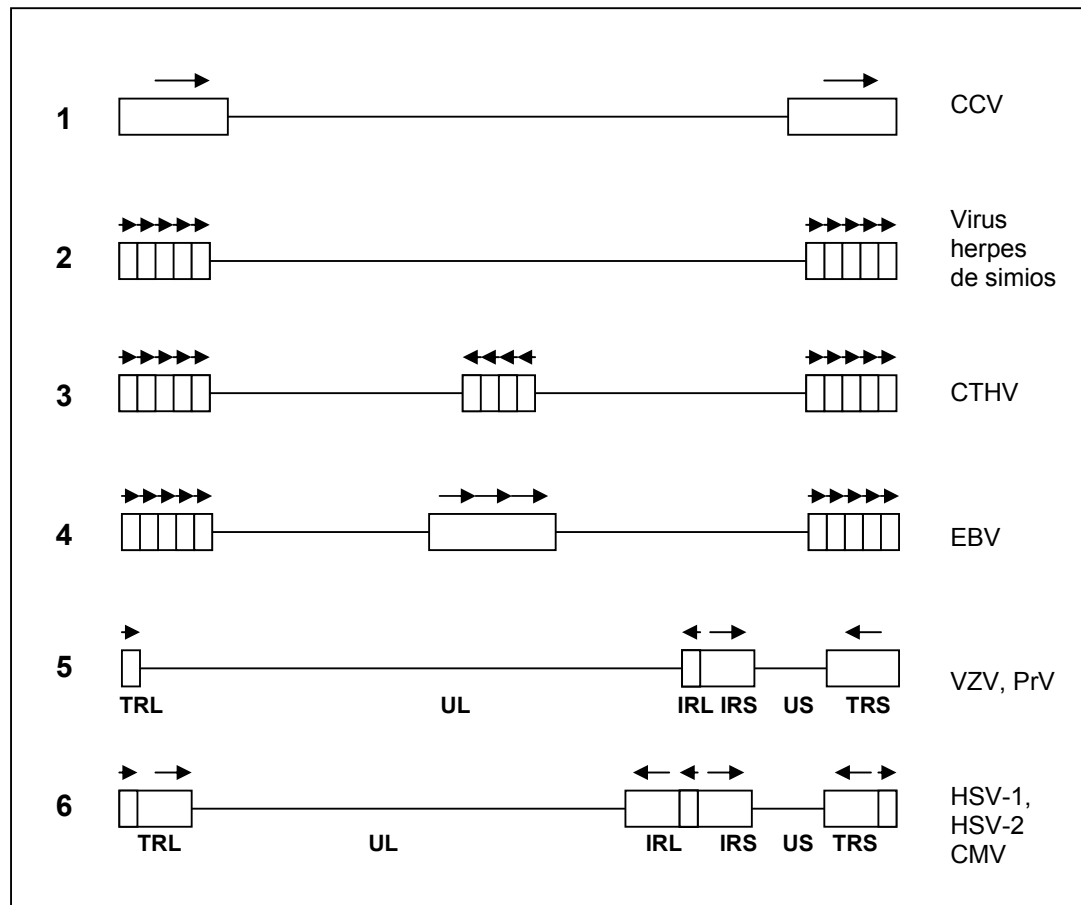


Fig. 23: Ilustraciones simplificadas de estructuras genómicas de virus de tipo herpes. Las regiones únicas y repetidas aparecen como rectángulos continuos y discontinuos respectivamente. La orientación de las secuencias repetidas está indicada por medio de flechas. U_L =única larga, U_S = única corta, TR_S =secuencia terminal repetida corta, TR_L = secuencia terminal repetida larga, IR_S =secuencia interna repetida corta, IR_L =secuencia interna repetida larga.

2.2 Contenido en G+C

El contenido en G+C varía entre 32% y 75% (Roizman et al., 1992). La distribución de las bases en el genoma es variable y no existe ninguna relación general entre linaje viral y composición en bases (Honest, 1984; Davison y McGeoch, 1995). Por ejemplo, en el grupo de los virus herpes $\alpha 2$ se encuentran a la vez virus herpes caninos que tienen 32% en G+C y PrV cuyo contenido en G+C es de 74%. Existen diferencias considerables inclusive dentro de un mismo genoma. De manera general, los elementos repetidos largos tienen mayor proporción en G+C que las regiones únicas. En el caso de HVS, por ejemplo, la proporción en G+C de una región única es de 34% mientras que la de las regiones terminales repetidas es de 71% (Albrecht et al., 1992).

3) PROPIEDADES BIOLÓGICAS COMO BASE PARA SU CLASIFICACION

3.1 Propiedades biológicas comunes

Los virus herpes conocidos poseen cuatro propiedades biológicas en común (Roizman y Sears, 1990):

❶ Presencia de enzimas implicadas en el metabolismo de proteínas y de ácidos nucleicos: una proteasa, una proteína kinasa, una timidina kinasa, una timidilato sintetasa, una dUTPasa, una ribonucleótido reductasa, una ADN polimerasa, una helicasa, una primasa y una terminasa. Sin embargo, la lista exacta de enzimas puede variar de un virus a otro.

❷ La síntesis del ADN viral y el ensamblaje de la cápside se llevan a cabo en el núcleo. La cápside adquiere su envoltura durante su pasaje a través de la membrana nuclear. Los mecanismos subsecuentes relacionados con la envoltura de las partículas no han podido ser establecidos (Fig. 24).

❸ La producción de progenie viral implica la destrucción irreversible de las células infectadas.

❹ Todos los virus herpes conocidos tienen la capacidad para establecer infecciones latentes de por vida en sus hospederos naturales. En células portadoras del virus latente, el genoma viral está presente como una molécula circular y sólo se expresa un pequeño subconjunto de genes.

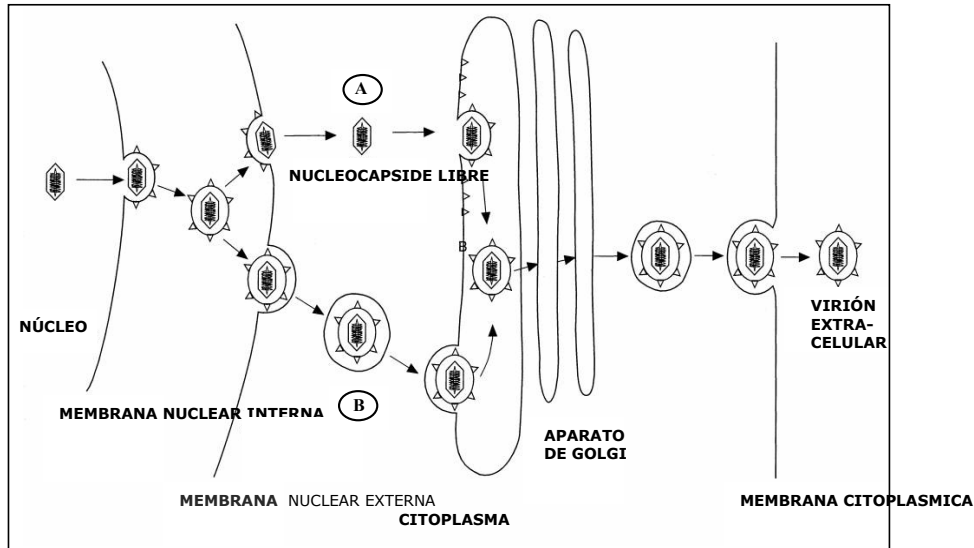


Fig. 24 : Posibles procesos de envoltura de HSV. Las cápsides brotan a través de la membrana nuclear interna, adquiriendo una envoltura. Las etapas subsecuentes son hipotéticas. **A:** la envoltura fusiona con la membrana nuclear externa, desenvolviendo la cápside y liberándola en el citoplasma. La reenvoltura se lleva a cabo durante el pasaje de la cápside en el aparato de Golgi. **B:** El virión brota a través de la membrana nuclear externa y es transportado al exterior de la célula por movimiento vesicular a través del al aparato de Golgi (Williams y Wilkins, 2001)

3.2 Una clasificación basada en las diferencias biológicas

A pesar de la existencia de características comunes, ciertas propiedades biológicas de los virus herpes son sumamente variables. El rango de hospedero natural de un virus herpes, por ejemplo, suele ser muy limitado, tanto que se considera que la mayoría de los virus herpes han evolucionado asociados a una única especie. Sin embargo, fenómenos aislados de transferencia a otras especies pueden producirse en la naturaleza. El rango de tipos celulares susceptibles de ser infectados puede también ser estrecho (HHV-6) o amplio (HSV-1). Aunque en ciertos casos (HHV-4) los receptores de la superficie celular juegan un papel clave, las partículas virales poseen con frecuencia la capacidad de penetrar en una gran variedad de células cuya susceptibilidad se ve determinada por factores intracelulares (HHV-5). Del mismo modo que las infecciones productivas, las infecciones latentes pueden establecerse en diferentes tipos celulares: neuronas en el caso de HSV-1, linfocitos B en el caso de EBV. Otras características variables son la velocidad de la multiplicación viral (baja en el caso de HCMV, alta en el caso de HSV-1, HSV-2, PrV) y los síntomas clínicos provocados por la infección. Las vías de transmisión natural van desde la propagación por aerosoles, altamente contagiosa (HHV-3), hasta el contacto íntimo oral (HHV-4) o sexual (HHV-2). No existe ningún reporte de transmisión por vectores.

En base a estas propiedades biológicas, el grupo de trabajo especializado en virus herpes del Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV) ha clasificado a los miembros de la familia *Herpesviridae* en tres sub-familias: *Alpha-*, *Beta-* y *Gammapherpesvirinae*. Escasos géneros han podido ser definidos a partir de la homología de secuencias de ADN, de similitudes en la organización de los genomas y de la conservación y parentela de proteínas virales importantes (Roizman et al., 1992 y 1995).

3.2.1 *Alphaherpesvirinae*

Los miembros de esta subfamilia cuentan con un amplio rango de hospederos, ya que infectan tanto a humanos (HSV-1 y -2) como a bovinos (BMV), suidos (PrV) y équidos (EHV-1). Aunque la gama de tipos celulares que estos virus son capaces de infectar en condiciones experimentales es variable, su propagación en cultivos celulares es generalmente rápida. Entre los principales efectos citopatogénicos se encuentra la formación de sincitios y la aparición de inclusiones eosinofílicas en el núcleo de células infectadas (cuerpos de Lipshütz o Cowdry de tipo A). En sus hospederos naturales, los miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* son neurotrópicos y las infecciones latentes se establecen en ganglios sensoriales (Roizman et al., 1992). Esta subfamilia incluye cuatro géneros: el género *Simplexvirus* o virus herpes α 1 (HSV-1 y -2), el género *Varicellovirus* o virus herpes α 2 (VZV), los virus herpes α 3 (MDV) y los virus herpes α 4 (responsables de laringotraqueitis infecciosa).

3.2.2 *Betaherpesvirinae*

Dos características no exclusivas de los miembros de esta subfamilia son (1) un rango de hospedero sumamente restringido y (2) un ciclo reproductivo largo. Infecciones experimentales *in vitro* han permitido caracterizar los efectos citopáticos de estos virus en las células infectadas como el incremento de su tamaño (citomegalia) antes de la lisis o la formación de inclusiones eosinofílicas en sus núcleos. Las infecciones latentes se establecen en glándulas secretorias, linfocitos y monocitos (Roizman et al., 1992). La subfamilia está formada por tres géneros: *Citomegalovirus* (HCMV), *Muromegalovirus* (MCMV) (ambos son virus herpes β 1) y *Roseolovirus* (HHV-6) (virus herpes β 2).

3.2.3 *Gammapherpesvirinae*

Experimentalmente, el rango de hospedero de estos virus está limitado a la familia u orden del hospedero natural, en el cual provocan enfermedades linfoproliferativas. Los miembros de esta subfamilia son específicos de linfocitos B o T y la latencia se establece frecuentemente en tejidos linfoides. *In vitro*, todos los miembros de la subfamilia *Gammapherpesvirinae* se replican en células linfoblastoides mientras que algunos desarrollan infecciones líticas en células epitelioides o fibroblásticas. En los linfocitos, las infecciones en etapas pre-líticas o líticas no resultan en la producción de progenie infecciosa. Esta subfamilia incluye dos géneros: los *linfocriptovirus* o virus herpes γ 1 (EBV) y los *rhadinovirus* o virus herpes γ 2 (virus herpes Saimiri).

VIRUS HERPES Y SUS HOSPEDEROS

1) MODOS DE TRANSMISION

A pesar de su gran variedad, los modos de transmisión de los virus herpes tienen ciertas características comunes. Por el hecho de ser envueltos, los virus herpes son frágiles y no pueden permanecer por largos periodos en el medio ambiente. Además, su transmisión requiere un contacto directo entre los hospederos (no existe ningún reservorio o vector conocido). La fragilidad y las dificultades de transmisión de estos virus están compensadas por su capacidad para establecer infecciones latentes en sus hospederos. Durante la latencia el virus no se replica; su genoma puede integrarse en el de la célula hospedera o mantenerse en el núcleo como una molécula circular o episoma. Bajo ciertas condiciones (factores estresantes o estimulantes) los virus latentes emprenden un nuevo ciclo productivo, iniciando un proceso de recurrencia o reactivación. Deben por lo tanto distinguirse claramente la primo-infección, resultado de la primera exposición de un individuo receptivo al virus y la recurrencia de la enfermedad, que corresponde a una reactivación de la infección viral. Dicha reactivación puede ser sintomática o asintomática (producción y liberación de partículas virales sin signos clínicos de enfermedad).

A pesar de que existen diversos modos de transmisión, esta sección trata exclusivamente de virus que infectan a vertebrados e invertebrados acuáticos. En las granjas acuícolas, la transmisión vertical constituye un problema central ya que permite la propagación de enfermedades virales aun cuando se toman grandes precauciones para evitar la contaminación de las larvas y de la semilla por medio del agua de cultivo (De Kinkelin et al., 1985). Durante el desove, los reproductores infectados pueden excretar partículas virales que al mantenerse en la superficie de los huevos o introducirse en ellos infectan a la progenie. La transmisión horizontal por contacto directo entre animales, a través del agua o de otros vectores vivos o inertes ha sido ampliamente demostrada por medio de ensayos experimentales.

1.1 Virus herpes de tortuga

Los virus herpes han sido asociados a varias enfermedades en tortugas marinas, entre las cuales la enfermedad de «pulmón, ojo y tráquea» (LETD) y la fibropapilomatosis (FP). Los virus herpes de quelónidos tienen una estabilidad muy elevada en agua de mar (se ha demostrado que aún después de cinco días de incubación siguen siendo infecciosos), lo cual favorece su transmisión horizontal (Curry et al., 2000). La FP, que se caracteriza por la aparición de fibropapilomas múltiples, sobre todo a nivel epitelial pero en ocasiones también a nivel visceral (Herbst, 1994), afecta de manera importante a poblaciones de tortugas verdes *Chelonia mydas* y de tortuga cabezona *Caretta caretta*. La similitud de algunas secuencias virales aisladas de muestras de tejido (branquias, hocico e hígado) de pez limpiador *Thalassoma duperrey* con secuencias del virus asociado a la FP (Lu et al., 2000) indica que este pez podría intervenir en la transmisión del agente etiológico de la FP.

1.2 Virus herpes del tumor de Lucke en *Rana pipiens*

Ciertas poblaciones silvestres de rana leopardo *Rana pipiens* de América del Norte se ven frecuentemente afectadas por adenocarcinomas cuyo agente etiológico es un virus herpes, RaHV-1 (Davison et al., 1999). En el medio natural, la transmisión del virus parece llevarse a cabo al momento del desove y estar ligada a la contaminación del agua por virus excretados en los orines de las ranas (Rafferty, 1964; Granoff y Darlington, 1969). Sin embargo Mizell y Zambarnard (1965) indican que la infección de los ovocitos puede producirse antes de su emisión, en los ovarios, o durante su pasaje a través de los oviductos. La transmisión vertical fue evidenciada por la observación que la exposición de ovocitos a extractos de tumor de Lucke durante la ovulación induce la aparición de tumores en ranas de corta edad (Tweedell, 1969). La detección de virus herpes del tumor de Lucke en el líquido ascítico de las ranas refuerza esta hipótesis (Naegele y Granoff, 1972). Al parecer, en hembras afectadas por un tumor ascítico, los ovocitos se están inmersos en el líquido infectado por el virus durante varios días, lo que constituye una situación ideal para que los gametos queden infectados.

1.3 Virus herpes del pez gato

Fijan (1968) aisló por primera vez a CCV a partir de peces gato (*Ictalurus punctatus*) cultivados. Este virus provoca infecciones subagudas hemorrágicas y sistémicas extremadamente contagiosas. Esta enfermedad ocurre únicamente durante los periodos más calurosos del año, afectando a animales de menos de cuatro meses de edad y lo que provoca hasta 100% de mortalidad en ciertos casos. La transmisión horizontal de CCV fue claramente demostrada al mantener organismos sensibles en contacto con peces afectados por una infección productiva o únicamente colocarlos en el agua donde animales infectados habían sido mantenidos (Wolf, 1973). Las infecciones experimentales pueden ser efectuadas por inyección intramuscular o intraperitoneal, por frotamiento de las branquias con material infectado, por suministro de comida infectada o por inmersión del pez en una suspensión viral (Wolf, 1973). La hipótesis de la transmisión vertical de CCV es coherente con la detección regular de virus en la progenie de ciertas poblaciones de reproductores. Se ha demostrado que CCV es capaz de adherirse a los espermatozoides únicamente en volúmenes de agua reducidos (Nusbaun y Grizzle, 1987). Por ende, CCV puede adherirse a los espermatozoides antes de que estos sean emitidos: los gametos constituyen de esta manera una fuente de infección para los ovocitos (Nusbaun y Grizzle, 1987). Se ha detectado ADN viral en adultos asintomáticos (Wise et al., 1988) y las cruces de reproductores “sanos” han generado progenie infectada a pesar de que los huevos se han mantenido lejos de todas las fuentes potenciales de infección (adultos infectados o agua de mar contaminada) (Wise et al., 1988). Todos estos resultados confirman la hipótesis de una transmisión vertical.

2) EL VIRUS DENTRO DE SU HOSPEDERO

2.1 Ciclo de replicación

Bajo condiciones favorables, una producción intensa de partículas virales en la célula hospedera conduce a la citólisis. Antes de que la célula sea destruida, el volumen de los nucleolos aumenta mientras se desplazan poco a poco en dirección de la membrana nuclear. Se desarrollan excrescencias en el núcleo, la cromatina se margina (Scott et al., 1953; Kaplan y Ben Porat, 1959) hasta que, finalmente, el retículo endoplásmico y la membrana celular se alteran. Todos estos fenómenos desembocan en la muerte de la célula. Sin embargo, en condiciones desfavorables, el ciclo viral puede ser abortivo: la replicación viral produce en este caso partículas virales incompletas, carentes de envoltura o de nucleolo- en ciertos casos, sólo hay producción de ARN mensajeros. HSV-1 es el miembro más estudiado de la familia *Herpesviridae*, por lo cual su ciclo de replicación ha servido como modelo para entender los ciclos de los demás (Fig. 25).

2.1.1 *Entrada del virus en la célula hospedera*

La replicación viral inicia con la adhesión de las partículas virales a receptores celulares específicos. A pesar de que los receptores celulares no han sido totalmente identificados, su presencia determina la especificidad de cada virus para infectar a uno o varios tipos celulares dentro de un rango limitado. El enganche covalente entre los receptores de la célula hospedera y la superficie del virión hace posible la entrada del virus. La adsorción del virus a la superficie celular es seguida por la fusión de las membranas del virus y del hospedero. La entrada del virus es por lo tanto el resultado de una serie de interacciones entre el virus y la futura célula hospedera.

Once glicoproteínas de envoltura han sido identificadas en HSV-1. La glicoproteína C está involucrada en la adsorción de partículas virales a la superficie celular a través de su adhesión a residuos heparano sulfato que pertenecen a proteoglicanos de la superficie celular (Spear, 1993). La glicoproteína D juega un papel central en la entrada de las partículas virales debido a que se adhiere de manera específica a un receptor celular durante la fusión de las membranas viral y celular (Johnson et al., 1990). Varios receptores celulares a gD han sido identificados. Algunos de estos receptores pertenecen a la familia de receptores TNF (Tumor Necrosis Factor) tal como el mediador de la entrada del virus herpes A (HveA). Otros son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como los que median la entrada de HveB y HveC. Otras glicoproteínas esenciales como gB y el heterodímero gH-gL están involucrados con la fusión de las membranas de la célula y del virus. (Fuller y Lee, 1992; Spear, 1993; Turner et al., 1998). La glicoproteína D de PrV parece adherirse al receptor del virus porcino HveC (Milne et al., 2001).

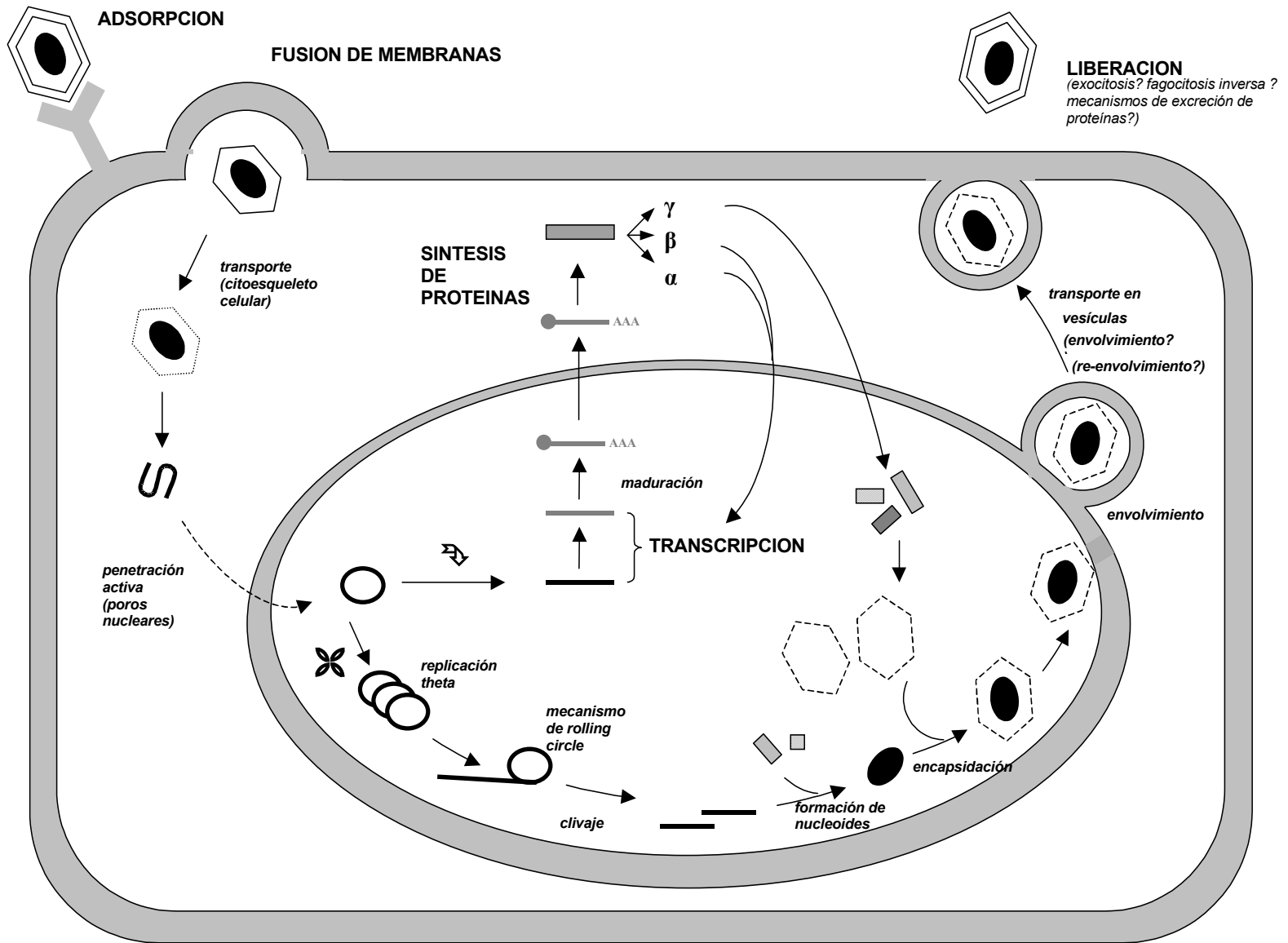


Fig. 25: Representación esquemática del ciclo replicativo de HSV-1

Algunos receptores celulares juegan un papel en la entrada de varios virus. Por ejemplo, la proteína CD4 es un receptor reconocido por HHV-7 (Frenkel et al., 1990; Black et al., 1993) y por HIV. Esto tiende a provocar una interacción competitiva entre ambos virus, por lo menos *in vitro* (Lusso et al., 1994). Las glicoproteínas situadas en la superficie de la envoltura viral juegan un papel esencial en la entrada del virus. Algunas son altamente conservadas a través de la familia *Herpesviridae* y/o entre los miembros de las subfamilias. Otros son específicos de una especie de virus. Los receptores celulares relacionados con la entrada de virus a menudo intervienen en mecanismos de la respuesta inmune, de proliferación celular o de apoptosis.

La entrada del virus se lleva a cabo por medio de la fusión de membranas (Morgan et al., 1968) más que a través de la fagocitosis. La envoltura viral fusiona con la membrana celular, liberando la nucleocápside en el citoplasma. Una vez en el citoplasma, las nucleocápsides son dirigidas hacia los poros nucleares. Su transporte puede involucrar al citoesqueleto celular como en el caso del sistema celular infectado por un adenovirus (Dales y Chardonneret, 1973). El ADN viral penetra de manera activa dentro del núcleo (Batterson et al., 1983).

2.1.2 Síntesis virales

La transcripción del ADN viral se lleva a cabo en el núcleo celular mientras que los procesos traduccionales son efectuados en los ribosomas i.e. en el citoplasma. La transcripción implica a la ARN polimerasa II celular (Constanzo et al., 1977) así como a factores virales (Wagner, 1985). La maduración postranscripcional permite agregarles a los mensajeros una CAP y, en la mayoría de los casos, una cola poliadenilada (Bachenheimer y Roizman, 1972; Silverstein et al., 1976). Durante la fase temprana de la infección, algunos ARNm sufren un proceso de metilación (Bartkoski y Roizman, 1976). Aunque pocos mensajeros de HSV-1 son procesados mediante el mecanismo de corte y empalme (Hall et al., 1982; Wagner, 1985) este ocurre con mayor frecuencia en infecciones por HCMV y EBV. En el caso de EBV este proceso afecta principalmente a los genes expresados durante la fase latente (Kieff y Liebowitz, 1990).

Los genes virales son expresados siguiendo una cascada ordenada y las proteínas sintetizadas están clasificadas en cinco grupos: α , β_1 , β_2 , γ_1 , y γ_2 (Roizman y Batterson, 1985). Cronológicamente, los genes α se expresan en primer lugar. HSV-1 expresa cinco genes: la síntesis de los cinco polipéptidos correspondientes alcanza un valor pico dos a cuatro horas después de la infección y disminuye posteriormente. Estos polipéptidos α tienen una función de regulación puesto que activan a los genes β (Honess y Roizman, 1974; Preston, 1979). En cuanto a HSV-1 se refiere, la síntesis de los polipéptidos β_1 y β_2 alcanza su máximo nivel cinco a siete horas después del inicio del proceso infeccioso. Algunos están involucrados en la síntesis de ADN viral, otros inhiben la expresión de genes virales α o celulares. Alternativamente, ciertos genes β activan la expresión de genes virales γ (Kit y Dubbs, 1963; Keir, 1968; Honess y Roizman, 1974 y 1975; Purifoy y Powell, 1976; Powell y Purifoy, 1977).

Los genes tardíos γ están divididos en dos grupos. La expresión de los genes γ_1 es totalmente independiente de la replicación del ADN viral, mientras que los genes γ_2 requieren una replicación previa del ADN viral. La mayoría de los genes γ codifica proteínas estructurales y glicoproteínas. (representan 50% de todos los genes conocidos de HSV-1). Las proteínas γ también aseguran la protección del ADN viral en las partículas neo-formadas. Finalmente, cuando los viriones infectan una célula hospedera, ciertas proteínas γ contribuyen a la fusión de sus membranas, a la penetración del ADN viral en el núcleo, a la inhibición de genes celulares y a la activación de genes α (Fenwick et al., 1979; Post et al., 1981, Batterson y Roizman, 1983; Batterson et al., 1983).

2.1.3 Replicación del ADN viral

Los genomas de virus herpes están formados por ADN lineal. Poco después de la entrada del virus a la célula hospedera, la fusión de ambos extremos genera una molécula monomérica de ADN circular (Jacob et al., 1979; Jongeneel y Bachenheimer, 1981). La síntesis del ADN se lleva a cabo a partir de varios orígenes de replicación poco tiempo después del inicio de la infección viral. En el caso de HSV-1, la replicación del ADN inicia tres horas después de la infección y concluye seis a nueve horas después (Roizman et al., 1965; Ponce de Leon et al., 1977). Las primeras moléculas de ADN son sintetizadas según un modelo de replicación teta (mecanismo de tipo Cairns) que no induce la formación de concatémeros. Posteriormente, la replicación prosigue según un mecanismo de círculo rodante (Severini et al., 1996; Zhang y McKnight, 1993). En el caso de HSV-1 la detección tanto de moléculas de ADN circular como de concatémeros lineales confirman esta hipótesis (Ben-Porat y Tokazewski, 1977; Jacob y Roizman, 1977). Los ADNs concatémicos son clivados en genomas lineales maduros antes de o durante el ensamblaje de partículas virales (Fig. 26).

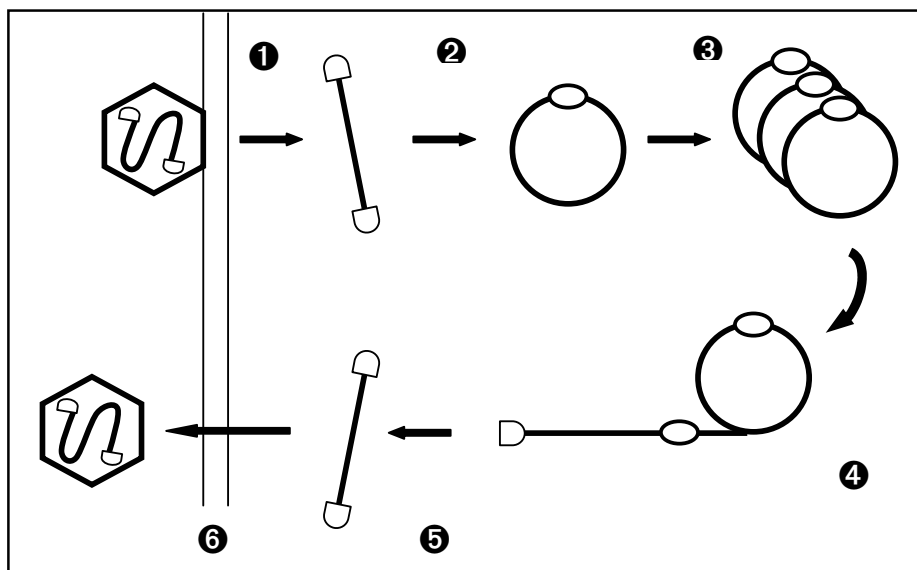


Fig. 26: Replicación del ADN de HSV-1. ❶ Entrada del ADN viral a la célula ❷ Circularización ❸ Replicación teta ❹ Replicación según el mecanismo de círculo rodante ❺ Clivaje ❻ Empaque y liberación (Umene, 1998).

2.1.4 Ensamblaje y liberación de las partículas virales

Las partículas virales son ensambladas en el núcleo de las células infectadas. Las cápsides son los primeros elementos que se forman y se acumulan en el núcleo. Las cápsides inmaduras contienen un almacén de proteínas (core) que son eliminadas por proteólisis durante la maduración.

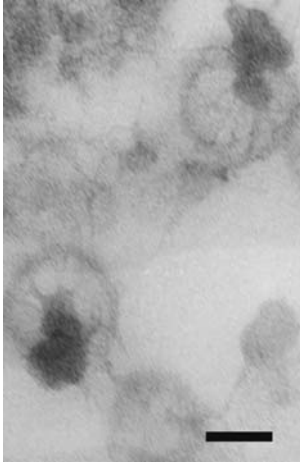


Fig. 27: nucleocápsides de OshV-1
(barra = 50 nm)

Aunque el proceso de maduración no ha sido enteramente dilucidado, su inicio corresponde a la asociación de los genomas lineales clivados con algunas proteínas (Ladin et al., 1980). El empaquetamiento de las nucleocápsides así formadas se produce por medio de su fijación a fibras proteicas localizadas dentro de las cápsides (Furlong et al., 1972; Heine et al., 1974; Nazerian, 1974). El contacto de las nucleocápsides con la cara interna de la membrana nuclear se produce en zonas particulares («parches») de la bicapa lipídica modificadas por la inserción de glicoproteínas virales. Sólo las cápsides asociadas al ADN viral poseen los péptidos de superficie necesarios para la adhesión a estos parches (Fig. 27) (Roizman y Furlong, 1974; Vlazny et al., 1982).

Tras haberse adherido a la membrana nuclear interna, las cápsides adquieren una envoltura y se acumulan en el espacio perinuclear. Las etapas subsecuentes de la morfogénesis del virión envuelto son inciertas y existen varios modelos para explicar el proceso de envolvimiento. Algunos autores consideran que esta etapa se lleva a cabo únicamente en la membrana interna del núcleo mientras que otros sugieren que las cápsides adquieren su envoltura definitiva en el citoplasma. La observación de cápsides en proceso de envolvimiento/desenvolvimiento en contacto con estructuras particulares de las membranas citoplásmicas interpretadas como parches refuerzan esta hipótesis. Otra posibilidad es que las partículas envueltas en el espacio perinuclear sean desenvueltas por fusión con la membrana nuclear externa. Las cápsides serían nuevamente envueltas en el aparato de Golgi o en algún compartimiento post-Golgi. (Stackpole, 1969). Los datos actualmente disponibles no permiten confirmar ninguna de estas hipótesis (Figs. 24, 25 y 28).

En el citoplasma, las partículas virales se hallan generalmente localizadas en el interior de vesículas delimitadas por una membrana trilaminar en la cual se hallan insertadas glicoproteínas virales (Fig. 29) (Huang y Wagner, 1964; Darlington y Moss, 1969). Dichas vesículas podrían formarse en el retículo endoplásmico o en el aparato de Golgi. Según ciertos autores, la liberación de los viriones se produce por exocitosis o fagocitosis invertida (Schwartz y Roizman, 1969). Otros sugieren que el virus es liberado por un mecanismo similar a la secreción de proteínas solubles (Johnson y Spear, 1982 y 1983).

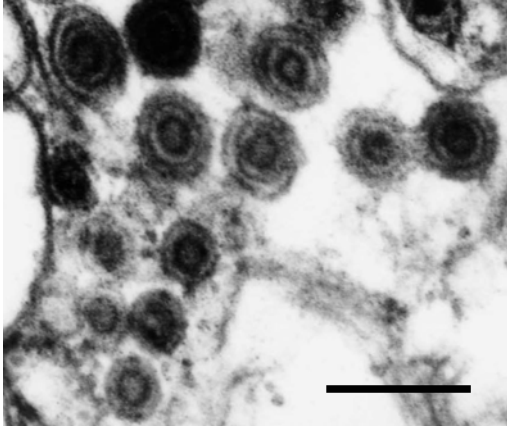


Fig. 28 Partículas virales envueltas (barra = 200 nm)

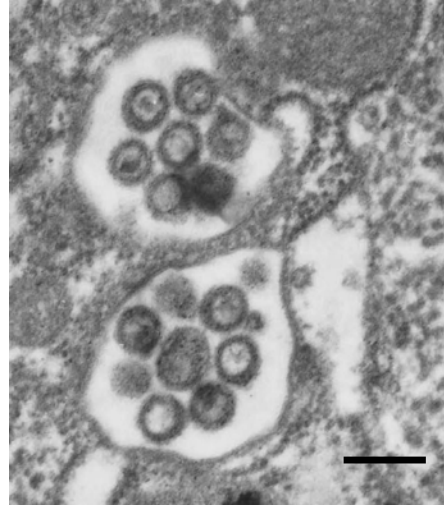


Fig. 29 Partículas virales al interior de vesículas citoplásmicas (barra = 200nm)

2.2 Latencia y reactivación

La capacidad para establecer infecciones latentes durante toda la vida de sus hospederos naturales es una característica esencial de los miembros de la familia *Herpesviridae*. Durante la infección primaria, la multiplicación viral y la diseminación en el organismo se ve contenida por el sistema inmune. Sin embargo, la eliminación de los virus herpes no es completa, ya que persisten en estado latente en zonas que varían de una especie a otra. La latencia de los *Alphaherpesvirinae* como HSV, VZV o PrV se establece en gangliones de nervios sensitivos, la de los *Gamaherpesvirinae* como EBV y HHV-8 en tejidos linfoides o en linfocitos B. En cuanto a los *Betaherpevirinae*, los datos son menos precisos. HCMV ha sido asociado con células mononucleadas de la sangre periférica (Stanier et al., 1989 y 1992; Taylor-Wiedeman et al., 1991 y 1994; Soderberg-Naucler et al., 1997) y con precursores de líneas celulares de granulocitos-macrófagos (Minton et al., 1994; Kondo et al., 1994 y 1996; Mendelson et al., 1996; Hahn et al., 1998). Las células precursoras de los monocitos y de la médula constituyen sitios de latencia potenciales para HHV-6 (Kondo et al., 1991; Luppi et al., 1999).

Los virus herpes que infectan a vertebrados marinos también son capaces de persistir en sus hospedero después de la infección primaria. ADN de CCV y anticuerpos anti-CCV han sido detectados en peces adultos asintomáticos, lo que sugiere la existencia de un fenómeno de latencia (Amend y McDowell, 1984; Wise et al., 1985). La detección por PCR de ADN de CCV en sangre y diversos tejidos de peces que sobrevivieron a una infección experimental (infección primaria) confirman esta hipótesis (Gray et al., 1999). Estos datos también indican que la latencia puede establecerse en una amplia gama de tipos celulares, inclusive en linfocitos, hipótesis reforzada por la presencia de ADN viral en leucocitos de sangre periférica de peces asintomáticos (Gray et al., 1999). Adicionalmente, ensayos de detección utilizando pares de primers dirigidos hacia las regiones terminales repetidas de los genomas virales permitieron mostrar que el ADN viral detectado en organismos infectados de forma latente puede hallarse en forma circular o concatémica (Gray et al., 1999).

La latencia puede ser definida como la presencia de ADN viral en el núcleo de la célula sin que haya replicación viral. El genoma viral puede integrarse al genoma celular o persistir en forma circular en el núcleo (García-Blanco y Cullen, 1991). El genoma viral se expresa parcialmente en la célula hospedera por medio de la síntesis de proteínas virales (VZV), RNAs virales de latencia (HSV) o de ambos tipos de moléculas (Epstein-Barr virus). La expresión intracelular de tales proteínas o RNAs no interfiere con la supervivencia de la célula. Los mecanismos moleculares que corresponden a la latencia son complejos y específicos de cada especie viral. Sin embargo, el establecimiento y el mantenimiento de la latencia dependen también de la acción de proteínas celulares. Cada especie viral encuentra dentro de un organismo células permisivas y no permisivas. Las permisivas dejan que se lleve a cabo la replicación viral mientras que las no permisivas son capaces de evitar su propia muerte frenando las síntesis virales sin destruir el genoma viral. La latencia tiene grandes ventajas para el virus puesto que le permite evadir la respuesta inmune y el efecto de sustancias antivirales. Además, transforma a la célula infectada en reservorio, lo cual posibilita la reactivación en cualquier momento. La latencia le permite al virus asegurar su perpetuidad (Lycke, 1985).

La reactivación es esencial para el mantenimiento del virus en la especie hospedera. Bajo el efecto de ciertos estímulos, los virus latentes pueden continuar su ciclo de replicación (ciclo productivo) o iniciar un ciclo abortivo (Fig. 30):

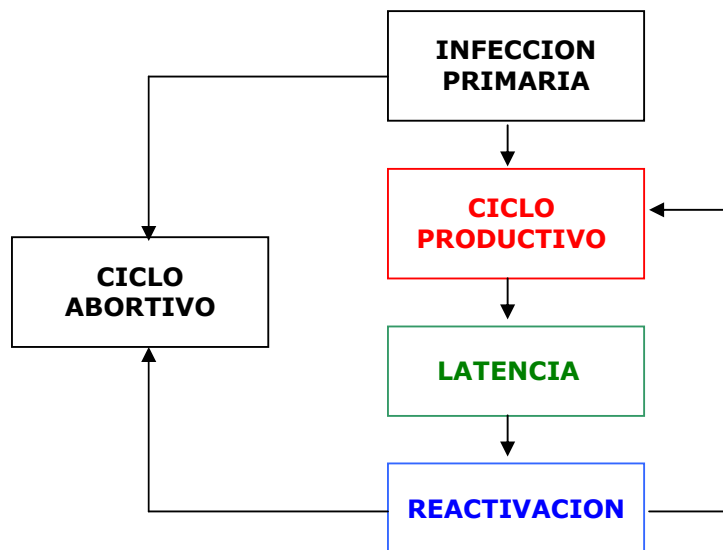


Fig. 30: ciclo viral de los miembros de la familia *Herpesviridae* (Renault et al., 1997)

Múltiples factores pueden provocar la reactivación viral y los mecanismos celulares y moleculares subyacentes son sólo parcialmente conocidos. La inmunidad celular resulta esencial para el control de las infecciones por virus herpes. Por ende, cualquier circunstancia que la debilite resulta favorable a la reactivación viral o por lo menos a la expresión clínica de dicha reactivación. La reactivación de VZV, por ejemplo, puede resultar del debilitamiento de la respuesta inmune provocado por la edad. En un individuo sin deficiencia inmune, la reactivación de HSV puede ser provocada por factores locales (UV, traumatismo) o generales (fiebre, estrés, hormonas). El embarazo puede conducir a la

reactivación del CMV en humanos. La reactivación consiste generalmente en una excreción periférica de virus y puede ser acompañada de manifestaciones visibles (VZV, HSV) o pasar desapercibidas (EBV, HCMV, HHV-6). Si el sistema inmune se encuentra severamente debilitado, la reactivación puede conducir a una viremia i.e. a la diseminación de la infección con serias complicaciones infecciosas o tumorales (virus herpes y linfortróficos).

2.3 Regulación de la apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada que permite destruir células indeseables durante el proceso normal de desarrollo de un organismo constituye también un mecanismo de defensa contra las infecciones virales (Vaux et al., 1994; Razvi y Welsh, 1995). La apoptosis se caracteriza por una hinchazón de las células, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN celular, brotes de la membrana citoplásmica y la degradación del contenido celular en cuerpos apoptóticos envueltos susceptibles de ser ingeridos por los fagocitos. La apoptosis constituye un mecanismo antiviral eficiente ya que la muerte de cierto número de células limita la propagación viral (Williams, 1994).

Algunos virus son capaces de modular la maquinaria de la célula para permanecer en ella (Cohen, 1998 ; Feldmann, 1995). Los virus herpes, por ejemplo, tienen la capacidad de inducir o inhibir la apoptosis. Kieff y Shenk (1998) indican que la inducción de la apoptosis de estos virus les brinda la posibilidad de establecer un equilibrio a largo plazo con el sistema inmune del hospedero. A pesar de que el sacrificio de cierta cantidad de partículas virales y de linfocitos restringe la infección viral, se establece un equilibrio que le permite al virus perpetuar su existencia en el organismo hospedero. Por otro lado, la inhibición de los procesos apoptóticos les permite a los virus herpes establecer infecciones productivas en células permisivas.

2.3.1 Inducción

Este fenómeno ha sido observado en varias infecciones por virus herpes. La infección por HSV-1 de células epiteliales subyacentes de la córnea ha sido asociada con la inducción de apoptosis en keratocitos de conejo (Wilson et al., 1997). La capacidad de HSV-2 para provocar apoptosis en monocitos humanos ha sido demostrada *in vitro* (Mastino et al., 1997). BHV-1 induce este fenómeno en células sanguíneas mononucleadas (Hanon et al., 1996). Los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* comparten esta capacidad. HHV-7, por ejemplo, es capaz de provocar *in vitro* la muerte de linfocitos T CD4+ por lisis necrótica (infección productiva) y por apoptosis (infección no productiva o células no infectadas) (Secchiero et al., 1997). Resultados similares fueron obtenidos con HHV-6 (Inoue et al., 1997). El MCV parece provocar apoptosis en células hematopoiéticas de la médula por medio de la vía del ligando Fas/Fas (Mori et al., 1997). En cuanto a EBV, Tanner y Alfieri (1999) mostraron que la glicoproteína gp350, que es el principal ligando involucrado en la adherencia del virus a células blanco, actúa como inmunomodador, activando la apoptosis de linfocitos T. Adicionalmente, la proteína de latencia LMP-1 activa la apoptosis inducida por TNF α en células epiteliales del intestino (Kawanishi, 2000).

2.3.2 Inhibición

Existen virus capaces de inhibir la apoptosis en cada una de las tres subfamilias. HSV-1 puede inhibir la apoptosis en neuroblastomas (Chou y Roizman, 1992) así como en fibroblastos del epitelio humano (Chou et al., 1994a). Adicionalmente, los LATs sintetizados por HSV-1 durante la latencia inhiben la apoptosis de las neuronas, lo cual favorece la supervivencia de las células en las el virus está establecido (Perng et al., 2000). HCMV sintetiza dos proteínas (IE1 y IE2) capaces de bloquear la apoptosis a través de varios mecanismos (Zhu et al., 1995). Por un lado, inhiben la apoptosis por medio de la activación de la ruta $TNF\alpha$. Por otra, regulan la expresión de las proteínas celulares involucradas en la regulación y mediación de procesos apoptóticos (Mocarski, 1996). Participan por ejemplo en la transcripción de ciertas subunidades del factor $NK-\kappa B$ que tiene una actividad antiapoptótica (Yurochko et al., 1995). Finalmente, los miembros de la subfamilia *Gamaherpesvirinae* pueden inhibir la apoptosis o transformar las células (Derfuss et al., 1998; Kraft et al., 1998; Spender et al., 1999; Van Dyk et al., 1999). El gen BHRF-1 del EBV es un homólogo viral del gen celular Bcl-2, un protooncógeno que codifica una proteína con propiedades antiapoptóticas, característica que comparte el producto de BHRF-1 (Henderson et al., 1993; Kawanishi, 1997). *In vitro*, una proteína de membrana de EBV llamada LMP-1 induce la immortalización de linfocitos B por medio de la inhibición del gen supresor de tumores p53 (Okan et al., 1995). Virus del género *Rhadinovirus* como HHV-8, RRV (Alexander et al., 2000; Searles et al., 1999), el virus herpes Saimiri, EHV-2 (Hu et al., 1997) y BHV-4 (Wang et al., 1997) también codifican proteínas involucradas en la activación de la apoptosis vía la inhibición de la caspasa 8.

VIRUS HERPES Y EVOLUCION

1) EVOLUCION Y CLASIFICACION

Los miembros de la familia *Herpesviridae* han sido repartidos en tres subfamilias en base a sus características biológicas. Dicha clasificación, sencilla y adecuada, ha sido ratificada por el ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus). No obstante, parece incompleta (Roizman y Baines, 1991) debido a que hace intervenir las relaciones evolucionarias que existen entre los virus y que han sido establecidas basándose en datos objetivos:

- ❶ la conservación de genes y grupos de genes (DNA polimerasa; glicoproteínas B, C y H, proteínas de fijación sobre el ADNss, proteínas de cápside principales) y la organización de los genomas;
- ❷ la organización de secuencias terminales involucradas en el empaque del genoma viral;
- ❸ la presencia y la distribución de nucleótidos susceptibles de ser metilados.

De manera fortuita, la clasificación de la mayoría de los virus de tipo herpes coincide con estos datos (Fig. 31). Sin embargo, existen dos excepciones : HHV-6 y los virus de aves (MDV y virus del guajolote).

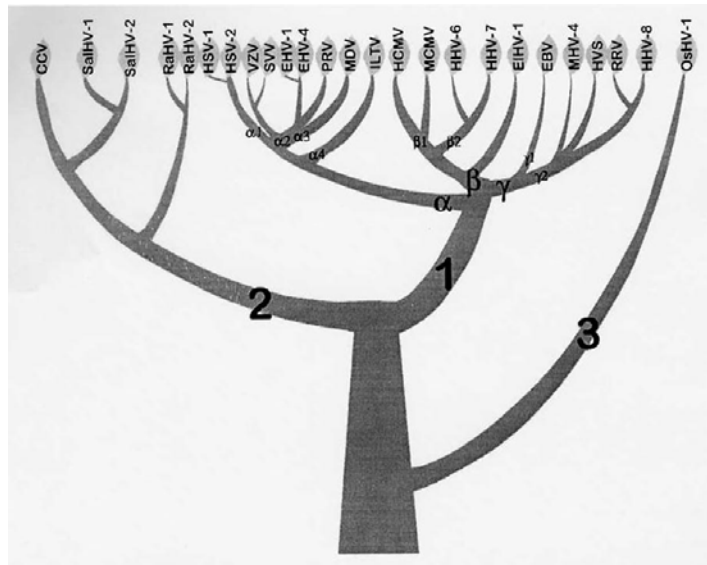


Fig. 31: Representación del árbol evolutivo de los virus herpes. Están representadas tres ramas principales (1, 2, 3). La rama 1 se divide en tres subfamilias (α , β , γ) y luego se subdivide en géneros. CCV: virus del pez gato, SalHV-1: virus herpes de salmónido 1, SalHV-2: virus herpes de salmónido 2, RaHV-1: virus herpes de ránido 1, RaHV-2: virus herpes de ránido 2, HSV-1: virus herpes simplex 1, HSV-2: virus herpes simplex 2, VZV: virus de varicela-zoster, SVV: virus de varicela de simio, EHV-1: virus herpes de équido 1, EHV-4: : virus herpes de équido 4, PRV: virus de seudorabia, MDV: virus de la enfermedad de Marek, ILTV: virus de laringotraqueitis infecciosa, HCMV: citomegalovirus humano (virus herpes de humano 5), HHV-6: virus herpes de humano 6, HHV-7: virus herpes de humano 7, EHV-1: virus herpes endoteliotrópico de elefante, EBV: virus de Epstein-Barr (virus herpes de humano 4), MHV-4: virus herpes de murinos 68, HVS: virus herpes Saimiri, RRV: radinovirus de macacos, HHV-8: virus herpes de humano 8; OsHV-1: virus herpes de ostreidos 1 (Davison A.J., 2002).

HHV-6 comparte una gran cantidad de propiedades biológicas con los *Gamaherpesvirinae*, como el hecho que diversas líneas celulares linfoblastoides resultan permisivas a su infección. No obstante, HHV-6 ha sido incluido en la subfamilia *Betaherpesvirinae* debido a la colinearidad de sus genes con los del HCMV. Los virus de aves, tal y como los *Gamaherpesvirinae*, son linfotróficos pero la conservación y la colinearidad de sus genes explican su clasificación dentro de los *Alphaherpesvirinae* (Buckmaster et al., 1988). Del mismo modo, la clasificación de MDV fue basada en la presencia de genes conservados colineales a los de VZV (Buckmaster et al., 1988) a pesar de que dichos genes no son expresados durante la latencia ni en células transformadas (Sugaya et al., 1990). Se ha sugerido que las relaciones evolucionarias de genes responsables de propiedades biológicas relevantes podrían constituir un criterio de clasificación más adaptado que la organización y la evolución de genes conservados dentro de una familia. Sin embargo, tales genes no han podido ser identificados de forma exhaustiva.

2) VARIABILIDAD GENETICA Y FILOGENIE DE VIRUS HERPES DE VERTEBRADOS ACUATICOS

Los virus herpes que infectan a peces, reptiles y anfibios fueron, en un principio, incluidos en la familia de los *Herpesviridae* en base a criterios morfológicos. Actualmente, ciertos genomas de virus herpes han sido parcial o totalmente secuenciados, como el genoma del virus de pez gato (CCV) (Davison, 1992) y el del virus herpes de ostreidos 1 (OsHV-1) (AJ Davison, no publicado). Otras secuencias parciales pertenecen a virus de salmónidos (SalHV-1 y -2) (Bernard y Mercier, 1993; Davison, 1998), un virus de anfibio (RaHV-1) (AJ Davison, unpublished) y tres de tortuga (Quackenbush et al., 1998). La comparación de secuencias peptídicas derivadas de los genomas de CCV y de virus herpes de mamíferos revelan muy poca homología. Sin embargo, el genoma de CCV codifica enzimas específicas de virus herpes de mamífero, como la DNA polimerasa, la dUTPase y la timidina kinasa. Tales genes son ubicuos y podrían haber sido adquiridos de forma independiente por los virus herpes de mamíferos y de peces. Por otra parte, las enzimas de CCV no presentan mayor semejanza con sus homólogos en otros virus herpes que con los de otros organismos.

Estos datos pueden ser interpretados de dos formas distintas. El CCV y los virus herpes de mamíferos podrían tener ancestros distintos y haber adquirido morfologías similares por convergencia. Sin embargo, podrían tener un ancestro único y haber empezado a divergir hace aproximadamente 4000 millones de años. Adicionalmente, a pesar la poca conservación de las secuencias peptídicas de proteínas estructurales, se ha demostrado al existencia de analogías estructurales y funcionales. Las estructuras tridimensionales de las cápsides de CCV y de HSV-1 presentan, por ejemplo, grandes similitudes.

3) MECANISMOS DE DIVERSIFICACION

Los virus herpes se diversificaron por medio de tres mecanismos: (a) adquisición de secuencias celulares o virales, (b) reorganización del ADN que incluye procesos de duplicación que generan secuencias repetidas en tándem o repetidas-invertida y (c) sustituciones de nucleótidos (Davison y McGeoch, 1995; Umene y Sakaoka, 1999).

3.1 Adquisición de secuencias de ADN

Se admite la hipótesis que los virus herpes son descendientes de un ancestro común que habría adquirido una variedad de secuencias de ADN a partir de células hospederas o de otros virus. La comparación de secuencias de ADN de virus herpes reveló la conservación de aproximadamente cuarenta genes susceptibles de pertenecer al hipotético ancestro común. Varias secuencias de proteínas deducidas de algunos de estos genes conservados muestran una homología significativa con proteínas celulares como la ADN helicasa, la ADN polimerasa, la deoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa), la dihidrofolato reductasa, la proteína kinasa, la ribonucleótido reductasa, la timidina kinasa, la timidilato sintetasa y la uracil-DNA glicosilasa (Davison y McGeoch, 1995).

Otras secuencias de proteínas deducidas de secuencias de ADN de virus herpes presentan un grado elevado de homología con proteínas celulares reguladoras de la replicación celular (ciclina, Bcl-2, receptor de proteína G). Este tipo de proteínas contribuyen ciertamente a la patogénesis viral y a la transformación celular. La expresión ectópica de ciclina del virus herpes Saimiri (HVS) y de HHV-8 impiden la interrupción del ciclo en G1 y estimulan la progresión del mismo, lo cual indica su participación en un mecanismo de alteración del ciclo celular (Cesarman et al., 1996; Nicholas et al., 1992). Este proceso de alteración provocado por ciclina viral está probablemente relacionado con las propiedades replicativas y transformantes de los virus mencionados. La familia de proteínas Bcl-2 interviene en la modulación de la apoptosis, capacidad que comparten proteínas homólogas a Bcl-2 codificadas por EBV, HVS y HHV-8 (Cheng et al., 1997). El receptor acoplado a la proteína G codificado por HHV-8 estimula las vías de señalización que están asociadas con la proliferación celular y que conducen a la transformación y la angiogénesis (Bais et al., 1998).

Las proteínas del sistema inmune como los inhibidores de la síntesis de citocinas (CSIF, interleucina 10) y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I presentan homología de secuencia con productos de genes de virus herpes. La secuencia proteica de CSIF, un inhibidor de la síntesis de citocinas, presenta similitudes con BCRF₁, producto codificado por EBV. BCRF₁ posee la misma actividad que CSIF, lo cual sugiere que BCRF₁ podría constituir un sistema de protección viral contra el sistema inmune del hospedero (Hsu et al., 1990). El homólogo del MHC clase I codificado por HCMV impide la maduración de las moléculas celulares de clase I por medio de la secuestro de la β 2-microglobulina endógena que hace imposible el reconocimiento de la célula infectada por las células T citotóxicas (Browne et al., 1990). La expresión de este homólogo viral inhibe de esta forma la intervención de las células natural-killer (Reyburn et al., 1997).

HHV-6 tiene un gen homólogo al gen *rep* de los AAV (virus adeno-asociado que es un dependo-virus de la familia *Parvoviridae*) (Thomson et al., 1991). Este gen fue probablemente adquirido a partir de AAV por un proceso de recombinación no homóloga en el que las formas replicativas de AAV se integran al ADN de la célula hospedera. El gen *rep* de AAV codifica una proteína de enlace al ADN con propiedades de helicasa involucrada en la iniciación de la replicación del ADN de AAV y en la regulación de la expresión de genes en las células infectadas. El gen homólogo presente en HHV-6 contribuye tanto a la replicación del ADN del parvovirus como a la modulación de la expresión de genes (Thomson et al., 1994). A pesar de que proporcionan posibilidades adicionales para la síntesis de ADN, la función exacta de los genes de HHV-6 sigue siendo incierta. Finalmente, secuencias similares a secuencias teloméricas en humanos han sido identificadas a los extremos de virus herpes linfotróficos como MDV (Kishi et al., 1991) o EHV-2 (Thomson et al., 1994; Gompels y Macaulay, 1995; Secchiero et al., 1995; Mirandola et al., 1997).

La captura de nuevas secuencias de ADN provoca la delección de otras secuencias de ADN existentes debido a que el tamaño del genoma es limitado.

3.2 Rearreglos

La recombinación del ADN es responsable de la reorganización de los genomas de virus herpes y por ende de su diversificación. Las diferencias considerables que existen en la disposición de los genes de virus herpes (e.g. HSV-1/PrV; VZV/EBV; CCV/SalHV-1) indican que la reorganización es un fenómeno que se produce a gran escala en este tipo de virus.

La mayor parte del genoma de PrV muestra una gran colinearidad con el genoma de HSV-1, excepto una región del fragmento largo único (U_L) que se haya en sentido opuesto al que tiene en otros *Alphaherpesvirinae* (Davison y Wilkie, 1983). Al menos 18 genes de SalHV-1 presentan homologías de secuencia con genes de CCV (secuencias de aminoácidos) pero el orden de los genes es diferente: la reorganización parece haber afectado cinco grupos de secuencias de la región U_L (Davison, 1998). Los genes conservados en VZV y en EBV están localizados en los fragmentos U_L de ambos genomas, en tres regiones principales donde hay colinearidad de los genes conservados (Davison y Taylor, 1987). No obstante, la reorganización que afectó a cada una de estas tres regiones es diferente, lo cual indica que reorganizaciones de gran amplitud afectaron a la región U_L de uno de los linajes virales.

Eventos de recombinación pueden generar secuencias repetidas (tándem o invertidas) en los genomas de virus herpes (Davison y McGeoch, 1995; Umene y Sakaoka, 1999). Por ejemplo, en la región U_S de HSV-1 se encuentran, dispuestos en tándem, cinco genes (U_{S4} , U_{S5} , U_{S6} , U_{S7} y U_{S8}) que codifican cinco glicoproteínas (gG, gJ, gD, gI y gE respectivamente). Genes homólogos han sido observados en otros miembros de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Dentro de grupos de genes como U_{S4} , U_{S6} y U_{S7} , las secuencias de aminoácidos más conservadas están localizadas en una misma región que contiene varios residuos de cisteína (McGeoch, 1990). Debido a que la talla del genoma

está limitada, la repetición de una secuencia de ADN está generalmente acompañada por la delección de otra secuencia. Los eventos de recombinación de ADN que generan secuencias repetidas se producen independientemente de los linajes de virus herpes.

3.3 Sustituciones de nucleótidos

Durante el proceso de diversificación, las sustituciones de nucleótidos se han ido acumulando en los genomas de los virus herpes. Las relaciones materializadas por el árbol filogenético de los virus herpes que infectan a diversas especies se asemejan a las relaciones que existen entre las especies hospederas. Por tales motivos, Mc Geoch et al. (1995) indicaron que al menos algunas especies de virus herpes son el resultado de un proceso de coespeciación con sus hospederos, lo cual significa que la evolución de los virus herpes se encuentra asociada a la evolución de los hospederos. La capacidad que tienen los virus herpes para persistir en sus hospederos a través de la latencia explica en parte la existencia de este proceso de coevolución (Mayo y Pringle, 1998). En base a esta hipótesis, se estima que la tasa de cambios nucleotídicos en virus herpes es de 1×10^{-7} /nucleótido/año y 2.7×10^{-9} /nucleótido/año para sustituciones sinónimas y no sinónimas respectivamente. Sin embargo, la distribución de las mutaciones puntuales en el genoma no es homogénea. Los dinucleótidos CG están considerados como puntos calientes para mutaciones en el genoma humano. En vertebrados, las citosinas metiladas tienden a ser reemplazadas por T durante el proceso evolutivo, ya que cuando se produce una desaminación accidental, una C no metilada genera una U, que es reconocida y reparada. En cambio, una C metilada genera una T que no es reconocida ni reparada. Usualmente, las secuencias CG de regiones promotoras de genes expresados no están metiladas ya que este tipo de secuencias codifican proteínas indispensables para la vida celular y la metilación puede bloquear la expresión génica. Las CGs no metiladas persisten durante el proceso evolutivo mientras que las CGs metiladas tienden a desaparecer, reemplazadas por TG.

La metilación afecta básicamente el C situado antes de G, por lo tanto GC persiste más que CG durante la evolución y puede servir como referencia. El ratio CG/GC que es de aproximadamente 1 en la zona que precede al gen y al inicio del este (CGs estables), es de apenas 0.1 al interior del gen (donde las C metiladas vuelven a los CGs inestables a lo largo del proceso evolutivo). El déficit en GCs observado en virus herpes indica que durante su evolución los virus de ADN existieron en un entorno celular en el que la metilación de las citosinas del ADN era un fenómeno activo. El estudio de las frecuencias de los dinucleótidos pone en evidencia la existencia de particularidades y diferencias entre virus herpes (Honest et al., 1989; Karlin et al., 1994). Las secuencias de virus linfotróficos (EBV y HVS), por ejemplo, son deficientes en dinucleótidos CG (Honest et al., 1989). Este déficit en CGs puede ser atribuido a su persistencia como episomas metilados durante la fase de latencia en linfocitos (Honest et al., 1989).

VIRUS HERPES QUE INFECTAN A BIVALVOS

1) PRIMERAS DESCRIPCIONES

Infecciones por virus de tipo herpes han sido reportadas en diferentes regiones del mundo y en varias especies de moluscos. El primer reporte con el que se cuenta es una descripción de partículas de tipo herpes en ostiones americanos (*C. virginica*) adultos (Farley et al., 1972). En 1991, virus aparentados a la familia *Herpesviridae* fueron asociados a eventos anormales de mortalidad que afectaron a larvas de *C. gigas* en laboratorios de Francia (Nicolas et al., 1992) y Nueva Zelanda (Hine et al., 1992). A partir de 1991, mortalidades estivales esporádicas fueron observadas en diferentes centros de producción en Francia y relacionadas con la presencia de un virus herpes (Renault et al., 1994a; Renault y Arzul, 2001). Del mismo modo, ciertos eventos de mortalidad anormal reportados en semilla de *O. edulis* y *C. gigas* en Francia a partir de 1992 fueron asociados con la detección de partículas virales de este tipo (Comps y Cochenec, 1993; Renault et al., 1994b; Renault et al., 2000b). Infecciones por virus de tipo herpes fueron observadas en adultos de *O. angasi* en Australia (Hine y Thorne, 1997), en larvas de *Tiostrea chilensis* de Nueva Zelanda (Hine et al., 1998) y en larvas de *O. edulis*, *Pecten maximus*, *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum* (Renault et al., 2001a y b; Arzul et al., 2001b y c). Por lo tanto, este o estos virus herpes, aunque presentan similitudes en términos de morfología y localización celular (Fig. 32), son capaces de infectar a especies diferentes, de ostreidos y de no ostreidos (Renault, 1998; Renault et al., 2001a y b; Arzul et al., 2001a, b y c).



Fig. 32: Viriones envueltos en posición extracelular en una larva de *C. gigas* infectada. Se pueden observar fibrillas entre el nucleóide y la cápside.

2) PATOGENICIDAD Y TRANSMISION

La patogenicidad del virus en estadios larvarios de *C. gigas* fue determinada por transmisión experimental a larvas axénicas (Le Deuff et al., 1994 y 1996). Estudios experimentales adicionales mostraron que podían ser transmitidos de larvas infectadas de *O. edulis* y de *R. philippinarum* a larvas axénicas de *C. gigas* (Le Deuff et al., 1994 y 1996 ; Arzul et al., 2001a). Seis a diez días después de la inoculación, las larvas infectadas dejaron de nadar. Análisis por MET mostraron lesiones típicas y la presencia de viriones intra celulares (Le Deuff et al., 1994 y 1996) es decir de un proceso infeccioso real. Controles negativos validaron los resultados obtenidos.

Hasta ahora, las tentativas para reproducir los síntomas de manera experimental en semilla y adultos no han sido exitosas. Los primeros datos experimentales indican que resulta posible transmitir el virus a semilla de *C. gigas*, en experimentos de cohabitación con larvas infectadas. La tasa de mortalidad de la semilla retada mantenida bajo condiciones estresantes se elevó a 40% mientras que la mortalidad de la semilla control fue de 20% (Renault et al., 1997). Sin embargo, al ser eliminados los factores estresantes, no se produjo ninguna mortalidad significativa (Arzul, 1998).

3) ESTRUCTURA DEL GENOMA

La purificación de partículas virales (OshV-1) a partir de larvas infectadas de *C. gigas* y la extracción de ADN viral a partir de los viriones purificados (Le Deuff y Renault, 1999) permitieron estimar el tamaño total del genoma a 207 439 pb. El genoma ha sido enteramente secuenciado (Genbank AY509253) y analizado (A.J. Davison, Medical Research Council, Glasgow, Reino Unido). La estructura general del genoma es: TR_L - U_L - IR_L - X - IR_S - U_S - TR_S. (Fig. 33).

El ADN viral está organizado en dos fragmentos únicos: U_L (167 843 pb) y U_S (3370 pb) flanqueados por secuencias idénticas repetidas e invertidas. U_L está flanqueada por dos fragmentos de 7584 pb, uno de ellos localizado en el extremo terminal (TR_L) y el otro en el extremo interno (IR_L). De manera similar, TR_S e IR_S (9774 pb) flanquean U_S mientras que una secuencia llamada X (1510 pb) está situada entre IR_L e IR_S. Una estructura genómica similar resultó de procesos evolutivos independientes en ciertos virus de vertebrados (HSV-1 y HCMV).

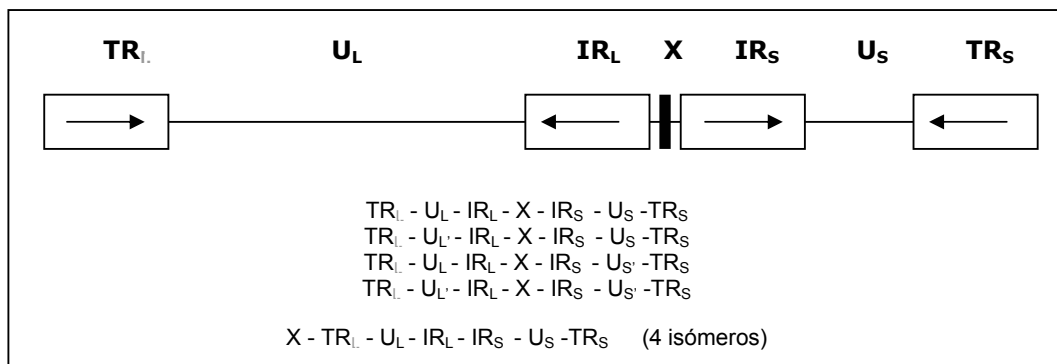


Fig. 33 : Organización del genoma de OshV-1 y de los cuatro posibles isómeros

La estructura genómica propuesta $TR_L - U_L - IR_L - X - IR_S - U_S - TR_S$ es la más comúnmente presente en los virus. Sin embargo, los segmentos únicos largo y corto (U_L y U_S) pueden sufrir una inversión (U_L' y U_S') generando cuatro isómeros que se encuentran representados en proporciones equimolares (Fig. 33). Adicionalmente, pequeñas cantidades de moléculas carecen de la secuencia X o poseen una secuencia X adicional en el extremo izquierdo del genoma viral. En la medida en que los genomas de virus herpes son encapsidados en forma de concatmeros, esta fracción de ADN viral atípico puede resultar de un clivaje de los concatmeros en la zona de empalme X- TR_S en lugar la zona usual TR_L - TR_S . Esta es una característica que comparten los genomas de virus de vertebrados que cuentan con una estructura similar.

La información de secuencia obtenida permitió diseñar primers dirigidos hacia tres regiones llamadas A, B y C (Fig. 34). La región A codifica una proteína de función desconocida (Renault et al., 2000b), la región B un inhibidor de apoptosis putativo (Arzul et al., 2001b) y la región C dos proteínas de función desconocida. Debido a que se encuentra localizada en una zona repetida-invertida, la región C está presente en dos copias en el genoma de OsHV-1 (Arzul et al., 2001b). El protocolo de HIS está basado en la producción de una sonda marcada con digoxigenina (896 pb) sintetizada por PCR a partir de la región C (Renault y Lipart, 1998; Lipart y Renault, 2001)

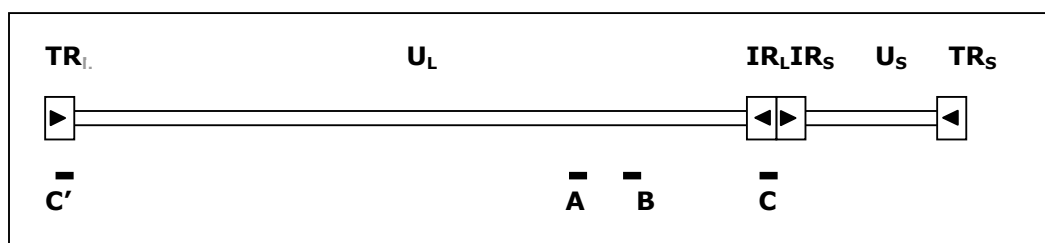


Fig. 34 : Diagrama de las tres regiones (A, B,C) alineadas con el genoma de 206 kpb de OsHV-1

4) RELACION CON OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA

La información de secuencia demuestra que OsHV-1 no está estrechamente relacionado con los virus herpes que infectan a vertebrados, inclusive aquellos que infectan a peces. La comparación de secuencias de aminoácidos no permitió identificar ninguna proteína homóloga a las de otros virus herpes. Varias proteínas de OsHV-1, como la ADN polimerasa, tienen cierta homología con proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Sin embargo, dicha homología no es mayor en el caso de proteínas de otros virus herpes. En tal contexto, los análisis filogenéticos no son de gran utilidad para determinar si OsHV-1 y los virus herpes de vertebrados tienen un ancestro común. No obstante, la presencia de un gen que codifica la subunidad ATPasa de la terminasa constituye un índice genético en favor de esta hipótesis. Este gen (o genes homólogos) está presente en todos los virus herpes y exclusivamente en estos microorganismos exceptuando a ciertos bacteriófagos como T4. Los genes de T4 y de OsHV-1 no sufren ningún proceso de corte y empalme, los genes de virus herpes de mamíferos y peces contienen un intrón y los genes de virus herpes de peces y anfibios dos intrones.

Los estudios evolucionarios de virus herpes de vertebrados sugieren que existió un ancestro viral común y que los virus herpes evolucionaron por procesos de sustitución, delección, inserción de nucleótidos y recombinación que resultaron en la duplicación, divergencia y/o captura de genes del hospedero así como en reorganizaciones de los genomas (Mc Geoch 1992; Davison y Mc Geoch 1995). Los datos disponibles refuerzan la hipótesis que los virus herpes de mamíferos y aves por un lado, de peces y de anfibios por otro lado y de invertebrados forman los tres principales linajes de virus herpes. OsHV-1 podría haber establecido un linaje separado hace aproximadamente un millar de años y los virus de peces hace 400 millones de años (Fig. 35).

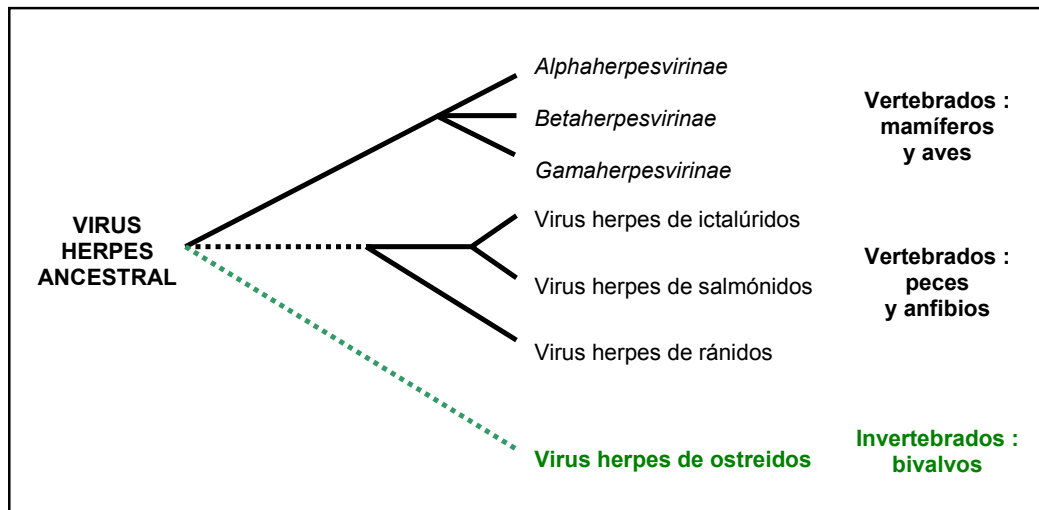


Fig. 35: Ubicación hipotética de los virus herpes de invertebrados en el árbol filogenético de los virus herpes (A.J. Davison, comunicación personal)

Actualmente, OsHV-1 es el único representante de lo que podría constituir un amplio grupo de virus herpes de invertebrados. Datos recientes indican que OsHV-1 es capaz de infectar a varias especies de bivalvos, lo cual es muy diferente de lo observado en virus herpes de vertebrados, usualmente confinados a una sola especie en la naturaleza. Es posible que el virus parental se encuentre todavía en su hospedero natural.

Se sospecha que una larga coevolución entre un ancestro bivalvo y un ancestro viral puedan explicar la detección de virus de tipo herpes en especies hospederas pertenecientes a diferentes géneros y con diversos modos de vida y biotopos. En el campo, los ostiones se fijan sobre sustratos duros mientras que las almejas prefieren sustratos más blandos. Sin embargo, ambas especies son producidas juntas en los laboratorios y esta proximidad puede facilitar la transmisión viral. Los virus herpes de bivalvos, al igual que los virus herpes de vertebrados, pueden permanecer confinados a una sola especie de hospedero en el campo pero las condiciones de cultivo intensivo pueden favorecer la transmisión a nuevas especies hospederas. Debido a que los bivalvos se han diferenciado y especializado, los virus herpes podrían haber empleado sistemas conservados en los hospederos para penetrar en sus hospederos y establecer la infección (Arzul et al., 2001a).

FAMILIA *IRIDOVIRIDAE*

CARACTERISTICAS GENERALES

Los iridovirus han sido aislados únicamente a partir de animales poecilotérmicos, tanto vertebrados como invertebrados, generalmente asociados con hábitats húmedos o acuáticos incluido el ambiente marino (Fig. 36). Las especies de iridovirus presentan una gran variedad de rango de hospederos y de virulencia. Todas son sensibles sin embargo a la desecación y al calor. En la mayoría de los casos, no se conocen con exactitud los mecanismos de transmisión mas no parece haber intervención de vectores.

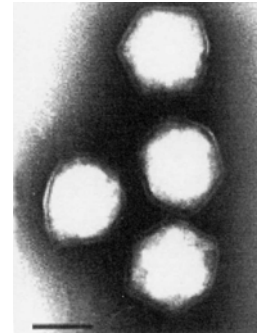


Fig. 36: Partículas de FV3
(barra = 500 nm)
(J. Becnel *in* Williams et al., 2000)

1) CLASIFICACION

La familia Iridoviridae está formada por cuatro géneros: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus* y *Linfocistivirus* (Fig. 37) que son serológicamente distintos. En el género *Iridovirus*, el grupo principal está constituido por especies relacionadas desde el punto de vista serológico, mientras que las demás especies tienen escasa relación serológica entre ellas. Varios virus aislados de peces tienen una relación serológica con el virus de rana 3 (FV3, género *Ranavirus*). Los análisis de secuencias de aminoácidos correspondientes al gen de la MCP respaldan el concepto de la existencia de tres géneros al interior de la familia. No se dispone de información de secuencia de especies del género *Chloriridovirus*.

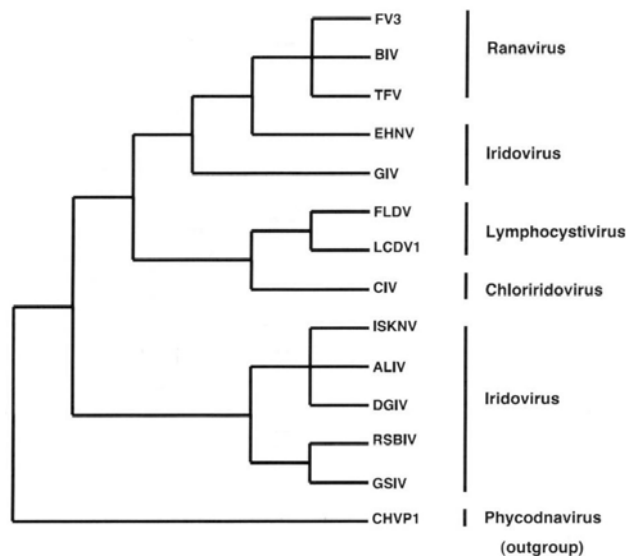


Fig. 37: Dendograma de relación de las secuencias de MCP de iridovirus representativos. FV3 : virus de rana 3, BIV : iridovirus de Bohle, TFV : virus de rana tigre, EHN : virus de la necrosis hematopoiética infecciosa, GIV : iridovirus de mero, FLDV : virus de la linfocistis de solla , LCDV1, virus de la linfocistis 1, CIV : iridovirus de pez gato, ISKNV : virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón, ALIV : iridovirus de *A. tigrinum*, DGIV : iridovirus del gurami enano, RSBIV : iridovirus del besugo, GSIV : iridovirus de la enfermedad del sueño del mero, el virus de *Paramecium bursaria chlorella* (CHVBP1, un ficodnavirus) fué incluido como grupo externo (Tan et al. 2004)

2) ESTRUCTURA Y CONTENIDO DEL VIRUS

Usualmente, el diámetro de las partículas icosaédricas es de 120-200 nm pero puede alcanzar 350 nm.

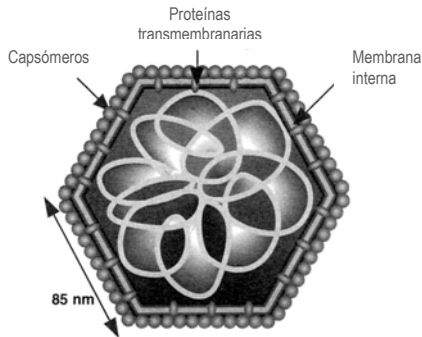


Fig. 38: Sección de FV-3 (Darcy and Devauchelle, 1987; Darcy-Tripier et al., 1984)

El núcleo es un largo filamento de nucleoproteínas enrollado y está rodeado por una membrana lipídica que contiene partículas transmembranarias cuya función no ha sido determinada. Las partículas sin envoltura contienen de 5-17% de lípidos, esencialmente fosfolípidos: la composición de la fracción lipídica indica que los lípidos son producidos *de novo*. Los virus de vertebrados poseen una envoltura externa derivada de su pasaje a través de la membrana de la célula hospedera. Dicha envoltura no parece ser esencial para su infectividad (Fig. 38).

El núcleo contiene una molécula de ADN de doble cadena de 140 a 303 kbp. El virus iridescente de invertebrados 1 (IIV-1) cuenta con un componente genético adicional, una molécula libre de ADN de 10.8 kbp. El ADN constituye 12-16% del peso total de una partícula y el contenido en GC varía de 28 a 54%. Aunque el ADN de varios iridovirus de vertebrados está altamente metilado, este fenómeno no ha sido detectado en ninguna especie de los géneros *Iridovirus* o *Chloriridovirus*. El genoma de varios virus ha sido enteramente secuenciado: el virus de la linfocistis 1 (LCDV-1) (No. Acc. Genbank NC_001824), el virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón (ISKNV) (NC_003494), el virus de la rana tigre (TFV) (NC_003407), el iridovirus de invertebrado 6 (IIV-6) (NC_003038) y el virus de *Ambystoma tigrinum stebbensi* (ATV) (AY_150217).

La estructura de los iridovirus es compleja y puede implicar hasta 36 polipéptidos diferentes. La MCP es una proteína de alrededor de 50 kDa que representa 40-45 % de la partícula viral. Las secuencias de amino-ácidos de las MCPs proteínas del virión miden entre 459 residuos en LCDV-1 y 472 en IIV-22. La secuencia de la MCP está siendo empleada cada vez más para la clasificación de los iridovirus, ya que contiene variaciones de bases estables que permiten diferenciar aislados virales relativamente cercanos. Las secuencias de MCP de iridovirus comparten cierto grado de homología con secuencias proteicas del virus de la fiebre del cerdo africano (ASFV) de la familia *Asfarviridae*, del virus de *Paramecium bursaria Chlorella* 1 (familia *Ficodnaviridae*) y varios miembros de las familias *Ascoviridae* (Stasiak et al., 2003) y *Polidnaviridae* (Federici and Bigot, 2003).

Se han detectado diversas actividades enzimáticas en los viriones, que corresponden a una proteína kinasa, una nucleótido fosfohidrolasa, una ribonucleasa, dos deoxiribonucleasas y una fosfatasa. El análisis de secuencias nucleotídicas ha permitido identificar una subunidad de una ARN polimerasa que utiliza ADN como templado, proteínas de dedo zinc, una helicasa, una GTP fosfohidrolasa y una timidina quinasa.

3) ORGANIZACION DEL GENOMA Y REPLICACION

El virus de rana 3 (FV3) originalmente aislado de un tumor renal de una rana leopardo (*Rana pipiens*) (Granoff et al., 1966) es uno de los iridovirus más extensamente estudiado a nivel molecular.

El genoma de FV3 posee permutaciones circulares y extremos redundantes (Goorha and Murti, 1982) y el contenido en G+C es de 55% (Houts et al., 1970 ; Smith and McAuslan, 1969). A pesar de que la organización de sus marcos abiertos de lectura (ORFs) es relativamente compacta, ciertas regiones no parecen codificar proteínas virales. La mayoría de estas regiones no codificantes son cortas y contienen secuencias reguladoras de tipo TAAT y CAAT situadas antes y después de los ORFs (Tan et al., 2004). Estas características son similares a las del genoma de TFV (He et al., 2002). Tan et al. (2004) reportaron no haber detectado intrones e identificaron 98 marcos abiertos de lectura putativos. Ochenta y cuatro de estos poseen homólogos en otros iridovirus que infectan a vertebrados menores [TFV (81 ORFs), LCDV1 (41 ORFs), ISKNV (23 ORFs)] e insectos [CIV (31 ORFs)]. Dieciocho son comunes a FV3, TFV, LCDV1, ISKNV y CIV. Estos autores también indican que una característica del ADN genómico de FV3 es la existencia de un microsatélite constituido por 34 dinucleótidos CA repetidos en tandem. Este es el primer reporte de este tipo de secuencias en un virus que infecta animales. El significado biológico de este descubrimiento aún debe ser determinado. El genoma de FV3 también cuenta con múltiples secuencias repetidas en tandem o invertidas y con simetrías binarias presentes en iridovirus, ascovirus, geminivirus, asfavirus (ASFV) y herpesvirus (EBV).

La estrategia replicativa de los iridovirus es diferente de la de otros virus de ADN. La replicación de FV3 consta de dos etapas, que se llevan a cabo tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula hospedera (Goorha, 1982). La primera etapa de la síntesis de ADN es nuclear y genera moléculas de ADN del tamaño del genoma. Posteriormente, el ADN es exportado al citoplasma en donde una segunda etapa de síntesis de ADN genera moléculas concatémicas (Goorha, 1982, Goorha et al., 1978).

El ADN de FV3 tiene uno de los más altos niveles de metilación conocidos, ya que todas las citosinas internas de la secuencia tetranucleotídica CCGG están metiladas (Willis y Granoff, 1980). FV3 ha sido objeto de muchos estudios relacionados con la expresión sumamente ordenada y estrictamente coordinada de sus genes tempranos (inmediatos y demorados) y tardíos (Elliot y Kelly, 1980 ; Willis et al., 1977). La ARN polimerasa II que interviene en la síntesis del ARNm de FV3 es incapaz de transcribir ADN metilado (Goorha, 1981) : una proteína trans-activadora ha sido implicada en la transcripción del templado viral metilado (Spangler and Essani, 1994, Thompson et al., 1986 ; Willis and Granoff, 1985).

El procesamiento del ADN concatémico en ADN maduro parece llevarse a cabo durante su empaquetamiento, según un mecanismo « de cabeza llena » que resulta en genomas con permutaciones circular y extremos redundantes.

IRIDOVIRUS QUE INFECTAN A PECES

Durante las dos últimas décadas, se ha incrementado la cantidad de iridovirus aislados de diversas especies acuáticas con importancia económica. Estos iridovirus causan en particular enfermedades sistémicas serias en peces silvestres y de cultivo. Han sido asociados en ciertos casos a mortalidades de hasta 100% en alevines y 30% en peces adultos. En base a criterios histopatológicos, los iridovirus de peces han sido clasificados en dos grupos: virus de necrosis eritrocítica (VENV) y virus que infectan células epiteliales (Sudthongkong et al., 2002b).

1) PROBLEMAS DE CLASIFICACION

Tres géneros de la familia *Iridoviridae* infectan a vertebrados (peces, anfibios y reptiles) : los géneros *Ranavirus*, *Linfocystivirus* y el recientemente crado género *Megalocitivirus*. Diversos iridovirus de peces habían sido previamente asignados al género *Ranavirus* como especies oficiales o tentativas (Hyatt et al., 2000). El séptimo reporte del ICTV (Van Regenmortel et al., 1999) reconocía la existencia de dos especies tentativas en el género : los *virus de necrosis hematopoiética epizoótica* (EHNV) incluyendo al virus de la trucha arcoiris (RTV) y al virus de la perca (RFPV) y los *Ranavirus de Santee-Cooper* (SCRV) que incluyen al virus de la perca americana (LMBV), al virus del barbero rayado (DFV) y al virus de guppy 6 (GV6). Sin embargo, se habían identificado a otros iridovirus de pez muy similares a FV3, especie tipo del género *Ranavirus*, como el virus del siluro (ESV) y el virus del pez gato (ECV) (Marsh et al., 2002). El más reciente reporte del ICTV (*in press*) ha aportado modificaciones a la clasificación previamente establecida, las cuales se encuentran descritas con detalle en las secciones consagradas a cada género.

De manera general existe cierta incertidumbre en cuanto a la asignación o no asignación de varios virus que infectan a peces dentro de la familia *Iridoviridae*. Hyatt et al. (2000) sugirió que la posición taxonómica de al menos dos grupos de iridovirus de vertebrados requería trabajos de investigación adicionales: los virus eritrocíticos (identificados en las células sanguíneas) y los virus que provocan hipertrofia celular en el bazo, los riñones, el tejido conectivo del cráneo y el endocardio. Este grupo incluía a ISKNV (virus de necrosis infecciosa del bazo y del riñón), RSIV (iridovirus del besugo), SBIV (iridovirus de la lubina), GIV (iridovirus del mero) y ALIV (iridovirus de *Aplocheilichthys normani*). Los análisis de secuencia indicaban que miembros de este grupo de iridovirus poseían mayor homología entre sí que con otros iridovirus de vertebrados, lo cual indicaba que podían constituir un nuevo género dentro de la familia *Iridoviridae*, llamado de forma tentativa « iridovirus de hipertrofia celular » (He et al., 2001; Weng et al., 2002).

Sudthongkong et al. (2002b) reportaron que los aislados de “iridovirus tropicales” tienen marcadas diferencias con respecto a miembros de los géneros *Ranavirus* y *Linfocistivirus*. Estos iridovirus tropicales (ALIV, SBIV, RSIV, GSDIV y DGIV) tienen propiedades histopatológicas particulares ya que forman cuerpos de inclusión en las células de los tejidos infectados (bazo, tejidos hematopoiéticos del riñón y del tracto digestivo). Adicionalmente, los árboles filogenéticos basados en las secuencias de amino-ácidos de la ATPasa y de la MCP habían mostrado que los iridovirus tropicales no pertenecían ni al género *Linfocistivirus* ni al género *Ranavirus* (patógeno para los peces) ni al género *Iridovirus* (Fig. 39). Estos virus han sido finalmente incluidos en el nuevo género *Megalocitivirus*.

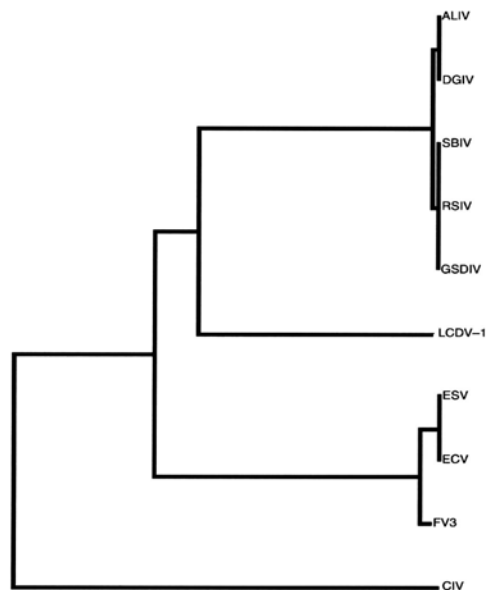


Fig. 39: relaciones filogenéticas entre varios iridovirus en base a la secuencia de aminoácidos de MCP (Sudthongkong et al., 2002)

2) LINFOCISTIVIRUS

La linfocistis fue la primera enfermedad viral descrita en peces (Wissenberg, 1965) y ha sido estudiada por más de un siglo. Su agente etiológico fue descubierto por microscopía electrónica (Walker, 1962) y llamado virus de la linfocistis (LCDV). A pesar de que la linfocistis ha sido reportada en más de cien especies de peces marinos y de agua dulce en todo el mundo (Chinchar and Mao, 2000), la especie reconocida LCDV-1 sólo se ha reportado en sillas y platijas mientras que la especie tentativa LCDV-2 ha sido detectada en limandas.

Después de la infección, LCDV causa una hipertrofia masiva y la encapsidación de las células del hospedero en una matriz hialina extracelular. El tamaño de las células puede incrementarse hasta 10^5 veces y su diámetro alcanzar dos milímetros, lo cual genera nódulos diseminados sobre las aletas y la piel. Cuando llegan a producirse lesiones oculares (Dukes and Lawler, 1975) e infecciones de órganos internos (Russell, 1974; Wolf, 1988), las mortalidades son mucho más elevadas. La proliferación viral y el crecimiento de las células pueden durar de 5 días a 9 meses, lo cual depende de la temperatura. Las etapas subsecuentes son una degeneración celular rápida y la liberación de las partículas virales. Usualmente no hay una respuesta inflamatoria, las infecciones se limitan a sí mismas y desaparecen de manera espontánea. A pesar de que el proceso de diseminación viral no ha sido totalmente esclarecido, la transmisión parece realizarse por contacto (el virus entra principalmente por las branquias) y ser facilitada por factores estresantes (e.g. densidad poblacional elevada, traumas externos, malnutrición, contaminación del agua) (Grinwis et al., 1995). La incidencia de la enfermedad también resulta más elevada en presencia de ciertos ectoparásitos de peces.

LCDV-1 es la especie-tipo del género. Su genoma (102 kpb) ha sido totalmente caracterizado por clonación molecular, mapeo físico (Darai et al., 1983 y 1985) y secuenciación (Tidona y Darai, 1997a) (Fig. 40). Debido a que no puede ser propagado de manera eficaz en cultivos celulares, la secuenciación completa del genoma de LCDV-1 constituye un paso esencial hacia la comprensión de los mecanismos subyacentes de infección, replicación y patogénesis viral.

Hasta ahora, 195 marcos de lectura potenciales han sido analizados. Ciertos genes putativos presentando niveles elevados de homología con proteínas caracterizadas en otras especies han sido identificadas (Tidona y Darai, 1997b). Los genes que codifican para proteínas involucradas en la replicación viral y la modificación del ADN incluyen una ADN polimerasa (DPOL), una endonucleasa específica de estructura, un factor de empaquetamiento del ADN (DPAC) y enzimas que forman parte de un sistema de modificación-restricción viral (DMET) que podría ser responsable de la metilación del ADN viral.

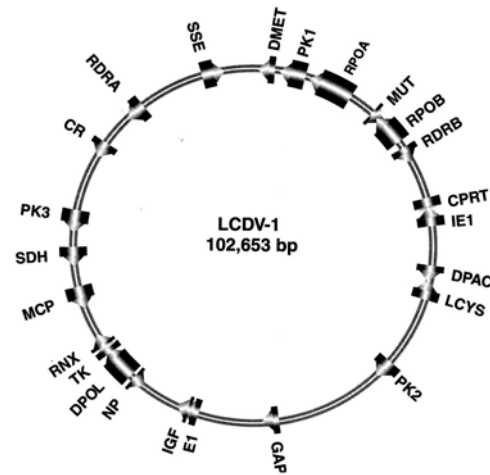


Fig. 40 : mapa físico simplificado del genoma de LCDV-1. Las flechas representan los genes putativos (Tidona y Darai, 1997b)

Las ARN polimerasas con templado de ADN son esenciales para los virus de ADN. EL genoma de LCDV-1 posee dos marcos de lectura codificando las subunidades grandes de la ARN polimerasa viral (RPOA y RPOB) (Müller et al., 1995, Tidona y Darai, 1997b). Sólo se ha identificado una enzima involucrada en el procesamiento del ARN, una ribonucleasa putativa (RNX) (Tidona y Darai, 1997b).

EL genoma de LCDV-1 también codifica para varios factores de virulencia presentes en otros virus de ADN. Por ejemplo, el alto grado de homología que existe entre el IGF (Fig. 40) y una variedad de insulinas y factores de crecimiento de tipo insulina indica que IGF podría ser responsable de las propiedades hipertróficas de las células infectadas. Al igual que ciertos poxvirus, el genoma de LCDV-1 codifica un homólogo de receptor para un tumor necrosis factor (CR). Una proteína soluble homóloga a un receptor para citoquinas podría intervenir en un proceso de inhibición competitiva de la transducción de señal mediada por citoquinas. Este tipo de procesos les permitiría a las células aberrantes infectadas no ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune del hospedero por un largo periodo de tiempo (Tidona y Darai, 1997a). Finalmente, la presencia de un gen que codifica para una toxina viral (localizada entre SSE y DMET) contribuye a explicar que una solución de proteínas virales aisladas a partir de viriones causen hepatitis letal en ratones poco después de su inoculación por vía intravenosa o intraperitoneal (Aubertin et al., 1977; Lorbacher de Ruiz et al., 1986).

Como en otros miembros de la familia Iridoviridae, el principal componente de la estructura del virión icosaédrico de LCDV1 es la proteína de cápside principal (MCP, *major capsid protein*) (Schnitzler y Darai, 1993).

3) RANAVIRUS

El virus de Rana 3 (FV-3) es la especie tipo del género *Ranavirus* y varios virus han sido finalmente identificados como aislados de FV-3. En 1996, Williams había propuesto incluir dentro de este género a BIV y a los virus de peces EHNV indicando que trabajos comparativos adicionales eran necesarios.

Los ranavirus pueden causar hipertrofia en células de varios órganos y tejidos como el hígado, el epitelio vascular y la lámina propia, a pesar de que pueden no causar síntomas visibles en ciertos hospederos. Hyatt et al. (2000) caracterizaron 30 iridovirus colectados en Australia, el sureste de Asia, América del Norte, América del Sur y Europa (Fig. 41). Sus resultados confirmaron que el género *Ranavirus* abarcaba virus de peces, anfibios y reptiles (Mao et al., 1997) pero indicaron que ni DFV ni GV6 formaban parte de éste. Sugirieron que los ranavirus de peces incluían a EHNV, ESV, ECV y GV. Debido a que RTV y RFPV pertenecen a la población de EHNV (Mao et al., 1997), estos aislados deben ser designados como EHNV.

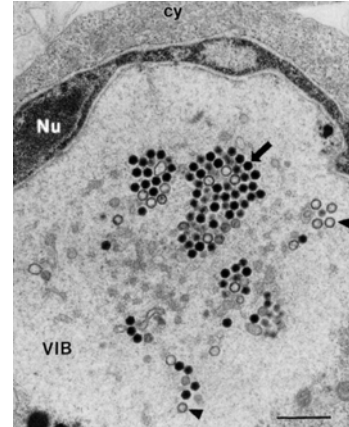


Fig. 41: célula FHM infectada con ECV. Nu: núcleo, VIB: cuerpo de inclusión, cy: citoplasma, flecha: grupos de nucleocápsides, punta de flecha: inucleocápsides incompletas (Hyatt et al., 2000).

En su octavo reporte, el ICTV ha aceptado la asignación de cinco virus (tres de los cuales infectan a peces) como especies del género *Ranavirus*: *iridovirus de Bohle*, *virus de Ambystoma tigrinum*, *virus de la necrosis hematopoiética epizoótica*, *ranavirus de Santee Cooper* y *virus del pez gato europeo*. Estas especies se distinguen por varios criterios: perfiles similares de RFLP (más de 70% de bandas comunes), perfiles distintivos de proteínas (SDS-PAGE), más de 95% de similitud/identidad entre secuencias de genes clave (proteína principal de cápside, ATPasa, etc.) y un rango característico de especies susceptibles. El iridovirus de mero de Singapur ha sido incluido como especie tentativa.

3.1 *Virus de la necrosis hematopoiética epizoótica (EHNV)*

EHNV fue aislado por primera vez de *Perca fluviatilis* y *Oncorhynchus mykiss* en Australia (Langdon et al., 1986; Williams et al., 2000). Virus estrechamente relacionados fueron aislados durante brotes de enfermedad en siluros en Alemania (Ahne et al., 1989) y peces gato en Italia (Bovo et al., 1993) y en Francia (Pozet et al., 1992). Los síntomas clínicos fueron similares en cada brote (Hedrick et al., 1992): oscurecimiento de la pigmentación de los peces infectados, nado errático, apatía, anorexia y ataxia. Macroscópicamente, la infección se manifiesta por hemorragias petequiales (piel y órganos internos) así como por lesiones que pueden llegar a causar una necrosis focal o generalizada del tejido hematopoiético del bazo, del hígado y del riñón. La muerte es provocada por la destrucción generalizada del tejido hematopoiético del bazo y del riñón. Los peces adultos que sobreviven al episodio pueden convertirse en portadores sanos i.e. reservorios virales (Ahne et al., 1990; Langdon, 1989). Los virus de tipo EHNV se replican en varias líneas celulares de peces entre 15 y 28°C, provocando la formación de cuerpos de inclusión y la lisis de las células infectadas. La liberación de los virus se produce por brote (Ahne et al., 1998).

3.2 *Ranavirus de Santee-Cooper (SCRV)*

De Julio a Septiembre de 1995, aproximadamente 1000 percas americanas adultas murieron en la reserva de Santee-Cooper en Carolina del Sur (U.S.A.) (Plumb et al., 1996). Antes de morir, los peces afectados habían perdido el sentido del equilibrio y flotaban en la superficie del agua. Los peces infectados no presentaban ninguna lesión interna o externa a excepción de la hinchazón de la vejiga natatoria y una coloración rojiza de la glándula de gas. Al no haber evidencia la presencia de patógenos (bacterias, parásitos u hongos) o de una causa ambiental, la posibilidad de una etiología viral fue evocada. La inoculación de cultivos celulares de fathead minnow (FHM) con homogenados de vejiga natatoria resultó en efectos citopáticos. El análisis por MET reveló la presencia de partículas virales de tipo iridovirus de 132-145 nm de diámetro. En pruebas experimentales, LMBV causó enfermedad en juveniles de perca americana al ser inyectado o inoculado por inmersión mientras que los adultos no mostraron ningún signo clínico (Plumb et al., 1999). La lubina estriada resultó ser menos susceptible a la enfermedad ; la mojarra de agallas azules y la carpa de hierba mostraron gran resistencia (Plumb and Zilberg, 1999). La caracterización molecular del virus (Mao et al., 1999) mostró que a pesar de sus marcadas diferencias con FV3, LMBV pertenece al género *Ranavirus*. LMBV parece estar estrechamente relacionado con otros dos iridovirus, el virus de guppy (GIV) y el virus de barbero rayado (DFV): podría tratarse de tres cepas diferentes o aislados de una nueva especie de ranavirus. De acuerdo a las directivas para la nomenclatura del ICTV, esta especie ha sido designada como SCRV en relación con el lugar de su primer aislamiento en América del Norte (Table VI).

Un iridovirus que había sido aislado en 1991 de percas americanas del Lago Weir, Florida, USA (Francis-Floyd, 1992) fue posteriormente aislado de nuevo a partir de percas aparentemente sanas de los Lagos Weir y Holly. Los iridovirus del Lago Weir y de la reserva de Santee-Cooper fueron comparados desde un punto de vista genético, revelando secuencias parciales de ADN y perfiles de RFLP idénticos (Fig. 42) (Grizzle et al., 2002).

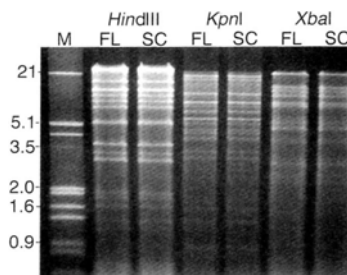


Fig. 42 : análisis por RFLP de ADN viral. SC: virus aislado de la reserva de Santee-Cooper FL: virus aislado del Lago Weir. M: marcador de peso molecular (Grizzle et al., 2002)

4) MEGALOCITIVIRUS : UN GENERO NUEVO

En base a su morfología, propiedades replicativas y citopatológicas y secuencias peptídicas y nucleotídicas, varios autores habían propuesto incluir a ciertos iridovirus (RSIV, ISKNV, SBIV, GIV y ALIV) en un grupo nuevo llamado « iridovirus de hipertrofia celular » (He et al., 2001, Weng et al., 2002). En su octavo reporte (*in press*), el ICTV ha reconocido la existencia de un quinto género dentro de la familia *Iridoviridae*, el género *Megalocitivirus*. Este cuenta con una única especie reconocida, el ISKNV y múltiples virus similares aislados de más de 20 especies de peces de mar y de agua dulce : RSIV, ALIV, GSDIV, DGIV y TGIV.

Los megalocitivirus se distinguen de los ranavirus y linfocitivirus por sus efectos citopatológicos (i.e. células de gran tamaño con cuerpos de inclusión, lo cual explica el nombre del género) y por sus las secuencias nucleotídicas de genes esenciales (ATPasa y MCP). Los megalocitivirus comparten más de 94% de identidad de secuencia en estos genes en tanto que la identidad de secuencia con ranavirus y linfocitivirus es inferior a 50%. En base a análisis de secuencia y estudios serológicos, todos los megalocitivirus aislados hasta la fecha parecen ser cepas de una misma especie viral.

4.1 Virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (ISKNV)

ISKNV fue elegido como la especie tipo del género *Megalocitivirus* debido a que fué el primer virus del género cuyo genoma fue enteramente secuenciado y reportado en la literatura. ISKNV es responsable de una enfermedad que provoca mortalidades elevadas de *Siniperca chuatsi* en China. En este país, se reportaron múltiples brotes de ISKN entre 1994 y 1999 (Wu et al., 1997; He et al., 1998; Zhang y Li, 1999; Fang et al., 2000). A nivel histopatológico, ISKNV provoca hipertrofia celular en el bazo, el riñón y el tejido conectivo del cráneo y el endocardio. Los viriones (partículas icosaédricas de 150 nm) se acumulan en el citoplasma de células infectadas y dilatadas (Weng et al., 1998).

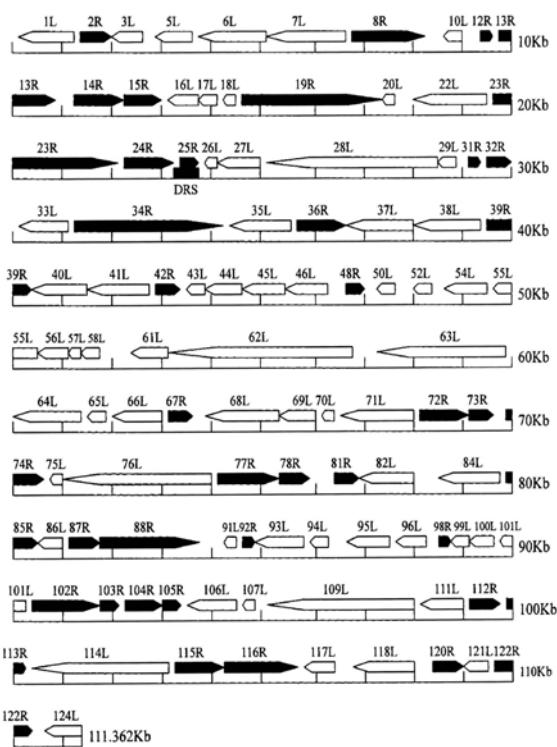


Fig. 43: Organización del genoma de ISKNV. Flechas: marcos de lectura. (He et al., 2001)

El genoma de ISKNV ha sido caracterizado por mapeo físico (Deng et al., 2001b) y secuenciación (He et al., 2001) (Fig. 43). 35 de los 124 productos potenciales presentaron homología con proteínas caracterizadas en otras especies, incluyendo enzimas y proteínas estructurales involucradas en la replicación viral, la modificación de proteínas y las interacciones virus-hospedero. Algunas enzimas participan en la replicación y el procesamiento del ADN, su transcripción o el metabolismo de los nucleótidos (ADN polimerasa_(19R), citosina ADN metil-transferasa_(46L), helicasa_(63L), ARN polimerasa DNA-dependiente_(28L, 34R), enzima de capping de ARNm_(64L)). La proteína codificada por el gen MCP_(6L) tiene un alto grado de homología con MCPs de virus de las familias *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* y *Asfarviridae* (Mao et al., 1996).

4.2 Iridovirus del besugo (RSIV)

RSIV infecta una variedad de peces marinos cultivados, incluyendo al besugo (*Pagrus major*), el yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), la lubina (*Lateolabrax spp.*) y *Oplegnathus fasciatus* (Inouye et al., 1992; Nakajima et al., 1998). Los peces infectados se vuelven letárgicos y dan señales de anemia severa, petequia de las branquias y dilatación del bazo. Se observaron células dilatadas en el bazo, el riñón, el corazón, el hígado y las branquias. En *Pagrus major*, esta enfermedad ha sido asociada con la presencia de viriones hexagonales no envueltos (200-240 nm) en el citoplasma y los leucocitos de los peces infectados y puede provocar mortalidades de 20-60% (Inouye et al., 1992). Actualmente, las secuencias nucleotídicas de una serie de genes de RSIV se encuentran disponibles: la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa (No. Acc. Genbank: AB018418), la proteína principal de cápside (AB080362), la ATPasa (AB007367) y la ADN polimerasa (AB007366) entre otros.

4.3 Iridovirus de la enfermedad del sueño del mero (GSDIV)

Brotos de la enfermedad del sueño del mero fueron reportados por primera vez en *Epinephelus tauvina* en 1994, en Singapur (Chua et al., 1994), resultando en pérdidas económicas significativas. En 1998 se presentó otro brote, que duró varias semanas, afectó tanto a juveniles como adultos de la misma especie y provocó mortalidades de más de 90%.

Análisis ultra estructurales revelaron la forma hexagonal (Fig. 44) y la estructura icosaédrica de los viriones (Qin et al., 2001). Su aspecto trilaminar corresponde a la presencia de la envoltura lipoproteica externa, de la cápside interna y de la membrana lipídica subyacente (Cuillel et al., 1979; Heppell y Berthiaume, 1992). Los procesos de infección, amplificación, ensamblaje y maduración han sido descritos (Qin et al., 2001). Tras su entrada por endocitosis, el virus es incluido en vacuolas citoplásmicas (Fig. 45). Una vez terminado el proceso de autoensamblaje en la matriz viral citoplásmica, las nucleocápsides maduras forman arreglos seudocristalinos o se mantienen dispersas en el citoplasma. Los viriones son liberados por lisis celular o por brote a partir de las membranas citoplásmicas. Basándose en propiedades morfológicas, bioquímicas y genéticas, Qin et al. (2001) habían incluido al GSDIV en el género *Ranavirus*.

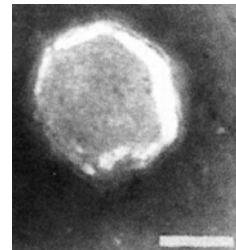


Fig. 44: Iridovirus de mero (GIV) (barra = 100 nm) (Qin et al., 2001)

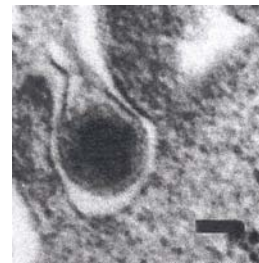


Fig. 45: Entrada por endocitosis del virus en una célula hospedera (barra = 100nm) (Qin et al., 2001).

Tabla II: Rango de hospedero y origen geográfico de iridovirus de peces (adaptado de Hyatt et al., 2000). **LYMPHOCYSITIS DISEASE VIRUS**: género. **LCDV1**: especie tipo del género. **FLDV**: especie reconocida por el ICTV. LCDV2: especie tentativa.

VIRUS GENERO		HOSPEDERO		
Abreviación	Virus	Nombre común	Nombre científico	Origen geográfico
VIRUS DE LA LINFOCISTIS				
LCDV1	Virus de la linfocistis 1			
LCDV1	<i>Virus de la linfocistis 1</i>	Solla y platija (especies no identificadas)	<i>Platichrys spp.</i> <i>Pleuronectes spp.</i>	Alemania
FLDV	<i>Virus de la linfocistis de la solla</i>			
LCDV2	Virus de la linfocistis 2	Limanda (especies no identificadas)	<i>Limanda spp.</i>	Alemania
	Virus de la linfocistis de la limanda			
RANAVIRUS				
EHN	Virus de la necrosis hematopoyética	Perca Trucha arcoiris Bacalao del Atlántico	<i>Perca fluviatilis</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> <i>Gadus morhua</i>	Australia Australia Dinamarca
SCRV	Ranavirus de Santee Cooper			
LMBV	<i>Largemouth bass iridovirus</i>	Perca	<i>Micropterus salmonides</i>	América del Norte
GV6	<i>Guppy fish virus 6</i>	Guppy	<i>Poecilia reticulata</i>	América del Norte (importación del sureste de Asia)
DFV	<i>Doctor fish virus</i>	Barbero rayado	<i>Labroides dimidiatus</i>	
ECV	Pez gato europeo			
ECV	<i>Virus del pez gato europeo</i>	Pez gato	<i>Ictalurus melas</i>	Francia
ESV	<i>Virus del siluro europeo</i>	Siluro	<i>Silurus glanis</i>	Alemania
SGIV	Iridovirus del mero de Singapur	Mero	<i>Epinephelus sp.</i>	Singapur
MEGALOCITIVIRUS				
ISKNV	Virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón			
ISKNV	<i>Virus de la necrosis infecciosa del bazo y del riñón</i>	Pez mandarín	<i>Siniperca chuatsi</i>	China
RSIV	<i>Iridovirus del besugo</i>	Besugo	<i>Pagrus major</i>	Japón
SBIV	<i>Iridovirus de la lubina</i>	Lubina	<i>Lateolabrax sp.</i>	Japón
GSDIV	<i>Iridovirus de la enfermedad del sueño del mero</i>	Mero	<i>Epinephelus malabaricus</i> <i>Epinephelus tauvina</i>	Singapur
ALIV	<i>Iridovirus de A. normani</i>		<i>Aplocheilichthys normani</i>	
DGIV	<i>Iridovirus del gurami enano</i>	Gurami enano	<i>Colisa lalia</i>	Australia (importados de Singapur)
TGIV	<i>Iridovirus del mero de Taiwan</i>	Mero	<i>Epinephelus spp.</i>	(sureste de Asia)
IRIDOVIRUS NO CLASIFICADOS				
WSIV	Iridovirus del esturión	Esturión blanco	<i>Acipenser transmontanus</i>	USA
ENV	Virus de la necrosis eritrocítica	Eperlano arcoiris Trucha Salmón Arenque del Atlántico Alosa	<i>Osmerus mordax</i> <i>S. fontinalis</i> <i>S. salar</i> <i>Clupea harengus</i> <i>Alosa pseudoharengus</i>	USA

HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE IRIDOVIRUS

Williams (1993) mostró que la infección asintomática de larvas de mosca negra por el iridovirus de insecto 22 podía ser detectada por PCR con primers dirigidos hacia el gen de la MCP. Posteriormente, la PCR fue empleada para detectar iridovirus de peces. Un protocolo basado en primers dirigidos hacia un ORF desconocido del genoma de EHNV permitió amplificar ADN de EHNV aislado de perca, trucha arco-iris, guppy y barbero rayado mientras que el ADN de LCDV no fue amplificado (Gould et al., 1995; Hedrick and McDowell, 1995). Primers específicos dirigidos hacia genes de FV3 hicieron posible la detección por PCR de iridovirus de besugo, de jurel dentón y de pez limón (Oda et al., 1993; Tamai et al., 1997) y se diseñó también un protocolo basado en HIS (Tamai et al., 1997). Recientemente fueron desarrollados protocolos de detección por PCR con primers dirigidos hacia regiones conservadas.

1) PRIMERS BASADOS EN SECUENCIAS DE GENES CONSERVADOS

1.1 Gen de la Proteína Principal de Cápside (MCP)

Mao et al. (1996 y1997) compararon las secuencias peptídicas de 10 iridovirus de vertebrados (entre los cuales 6 de peces: ESV, ECV, RFPV, RTV, DFV y GV6). Elevados porcentajes de identidad a nivel de la MCP los llevaron a diseñar primers dirigidos hacia diversas zonas de este gen en FV₃ (especie tipo) (Tabla III). Los pares de primers P₁/P₂ y P₄/P₅ permitieron amplificar fragmentos de talla esperada a partir del ADN de los seis virus pisinós mencionados. Posteriormente, células FHM fueron infectadas con FV₃, DFV y ESV. La RT-PCR generó un producto único a partir de las células infectadas y no hubo amplificación a partir de las células control. La PCR constituye una técnica confiable que podría sustituir a la microscopía electrónica para el diagnóstico de iridovirus en peces.

Tabla III: Secuencias de varios pares de primers dirigidos hacia el gen de la MCP

PRIMER	SEUENCIA (5'-3')	AUORES
P1	ATG TCT TCT GTA GCA GGT TCA	Mao et al., 1997
P2	TTA NAA GAT NGG RAA NCC CAT	
P4	GAC TTG GCC ZCT TZT GAC	
P5	GTC TCT GGA GAA GAA GAA	
MCP-irido1	GGA AGC TTA TGT CTG CGA TCT CAG GTG CG	
MCP-irido2	GGG AAT TCG TAC GGC AGA GAC ACG GT	Sudthongkong et al., 2002b
MCP-irido3	GGA AGC TTC CTC CAT CAC GTC CAG CAA G	
MCP-irido4	GGG AAT TCG ACC TCA CGC TCC TCA CTT G	
MCP-irido5	GGA AGC TTC AAG TGA GGA GCG TGA	
MCP-irido6	GGG AAT TCA CAG GAT AGG GAA GCC	

Usando los primers P4 y P5, Qin et al. (2003) lograron amplificar un producto de 500 pb a partir de ADN extraído de células infectadas por GIV. Controles positivos y negativos adecuados (ADN de FV-3 y células de mero sin infectar, respectivamente), permitieron validar estos resultados.

Sudthongkong et al (2002), al comprobar que primers dirigidos hacia el gen de la MCP de FV-3 no permitían amplificar ADN de SBIV por PCR, diseñaron tres pares de primers específicos basados en la secuencia del gen de la MCP de SBIV.

1.2 Gen de la pequeña subunidad de la ribonucleótido reductasa

Oshima et al. (1996) escogieron tres genes, cuya presencia es común en virus de ADN, como blancos para amplificación por PCR: el gen de la timidina kinasa (Hurby et al., 1983), el de la ADN polimerasa (Martins et al., 1994) y el de la ribonucleótido reductasa (Bournnell et al., 1991; Goebel et al., 1990; McGeoch et al., 1988). El análisis de las de secuencias peptídicas y nucleotídicas presentes en las bases de datos demostró la poca conservación de los dos primeros genes y la gran conservación del último. A partir de cuatro regiones homólogas del gen de la ribonucleótido reductasa (RNRS), dos pares de primers degenerados fueron diseñados. El producto de mayor tamaño fue clonado y secuenciado. Esta información de secuencia permitió el diseño de un par de primers específicos (Tabla IV).

Posteriormente, cinco primers fueron diseñados a partir de la secuencia de la RNRS de RSIV (Fig. 46) (Oshima et al., 1998). El par de primers V₂/V₅ que amplifica un producto de 187 pb fue seleccionado para estudios ulteriores. La sensibilidad de la PCR resultó similar a la de otros sistemas de detección previamente reportados (Cassinotti et al., 1993, Nishizawa et al., 1994).

La infección experimental por RSIV de juveniles de besugo permitió establecer que es posible detectar al virus por PCR antes de que aparezcan los primeros síntomas de enfermedad.

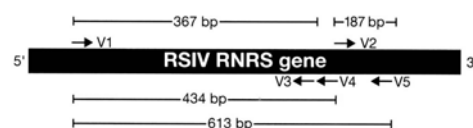


Fig. 46: Posición de los primers y tamaños esperados de los productos de amplificación por PCR (Oshima et al., 1998)

Table IV: Secuencias de primers dirigidos hacia el gen de la pequeña subunidad de la RNRS de iridovirus

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	BLANCO	AUTORES
RSIV (dir)	GCA TGT ATG CTG TTT AGA CA	RSIV RNRS	Oshima et al., 1996
RSIV (rev)	AGC ATC AAG CAG GCG ATC TG		
V1 (dir)	CAC GTG TTG GCT TTC TTC GC	RSIV RNRS	Oshima et al., 1998
V2 (dir)	GCA TGT ATG CTG TTT AGA CA		
V3 (rev)	GCA TGA GAG AAC GCT CCT TC		
V4 (rev)	AGA CAG GCA AAG TCA CAG TG		
V5 (rev)	GAG CAT CAA GCA GGC GAT CT		
RNRF1	GAG GAG GTG GAT CTT AGT AC	ISKNV RNRS	Deng et al., 2000
RNRR1	GCA TAA CCC AGA GCA TCA AG		

Otros pares de primers fueron diseñados y empleados con éxito para la detección de iridovirus en *Siniperca chuatsi* (Deng et al., 2000) y *Scianops ocellata* (Weng et al., 2002).

Con el fin de determinar el tropismo del virus, Weng et al. (2002) utilizaron el producto de amplificación por PCR de 704 pb marcado con digoxigenina como sonda en ensayos de detección por HIS. Los autores comprobaron que la especificidad de la sonda que se hibridó exclusivamente al ADN viral en células infectadas. Las células infectadas fueron más numerosas en el bazo y el riñón a pesar de estar presentes en otros tejidos (corazón, branquia, hígado, cerebro, intestino y estómago) (Fig. 47).

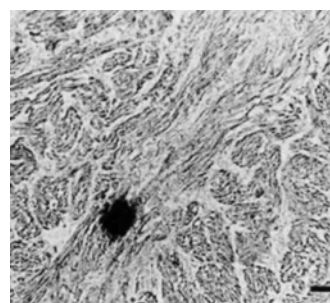


Fig. 47: Detección por HIS de ADN viral en tejido de corazón de *S. ocellata*. Las células infectadas generan señales de hibridación fuerte (barra = 20 µm) (Weng et al., 2002)

1.3 Gen de la ATPasa

A pesar de que la función de la ATPasa viral no ha sido definida, parece estar relacionada con la replicación de genes virales (Tapiovaraa et al., 1998). Se diseñaron tres pares de primers dirigidos hacia el gen de la ATPasa basados en la secuencia conocida de este gen en RSIV y en secuencias nucleotídicas parciales del gen de la ATPasa de SBIV (Tabla V) (Sudthongkong et al., 2002b). Se llevaron a cabo pruebas con varios ADNs virales. Productos de 709 bp, 1042 bp y 521 bp fueron obtenidos con ADN de SBIV, RSIV, GSDIV y ALIV. En el caso de DGIV, primers específicos tuvieron que ser diseñados para poder obtener productos de amplificación.

Tabla V: Secuencias de primers dirigidos hacia el gen de la ATPasa en iridovirus.

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	AUTORES
P3-IRB5	GTA CCG GGC TTG ATG ATG ACG T	Sudthongkong et al., 2002b
P4-IRB5	CCT TGT GTC GTG TCT GGC CGA G	
IRB5RATP5	ACC TGC AGC AAA CTG ATT ACG GTG GCC TCC	
IRB5R-ATP3	GGG GAT CCG TGC GTA TTC GTC ATT GTG C	
IR-FW0223	CCC CGG GGG CAA CAT ACC AAA GCA GAC	
IR-RV0223	GGG GAA TTC ATC GTC CTT GCG CTC ATG GTG	

2) OTRAS HERRAMIENTAS ESPECIFICAS

Mao et al. (1999) desarrollaron un protocolo de detección específica de LMBV por PCR. Los primers fueron diseñados para amplificar una porción del genoma de LMBV distinta de la secuencia de DFV y de GIV. Este método permitió amplificar un fragmento de ADN de 248 pb a partir de 30 virus precedentemente aislados e identificados como LMBV por medio de otras técnicas. No se obtuvo ningún producto a partir del ADN de otros ranavirus ni de RSIV lo cual indica la especificidad del método. Este protocolo incrementa la posibilidad de detectar infecciones subclínicas de LMBV.

Con el fin de evitar resultados erróneos, Sudthongkong et al. (2002a) diseñaron un protocolo de diagnóstico por PCR multiblancos con cuatro pares de primers específicos para iridovirus. Los cuatro pares de primers amplificaron fragmentos de ADN viral de 412 bp (P₁ IRB₅/P₂ IRB₅), 709 bp (P₃ IRB₅/P₄ IRB₅), 467 bp (P₁ IRB₆/P₂ IRB₆) y 797 bp (P₃ IRB₆/P₄ IRB₆) a partir de cinco aislados de iridovirus: ALIV, DGIV, SBIV, GSIV y RSIV (Table X). Los resultados obtenidos revelan la homogeneidad genética que existe entre los cinco aislados de virus.

Table VI: Secuencia y temperatura de alineamiento de los pares de primers empleados para el diagnóstico multiblancos de iridovirus por PCR (Sudthongkong et al., 2002a).

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	BLANCO	AUTORES
P1 IRB5	GGC GGT AGC TCA GGA CCG G		Sudthongkong et al., 2002a
P2 IRB 5	TGT GTT TCA TTT ATT GTT GTT GCG C		
P3 IRB5	GTA CCG GGC TTG ATG ATG ACG T	Gen de la ATPasa	
P4 IRB5	CCT TGT GTC GTG TCT GGC CGA G		
P1 IRB5	AAG GCT GTT GGA TTT TGA GAG GTG	Gen de la ADN polimerasa	
P2 IRB 5	GTA AAC TTC CTT GAT GTG TGC GTA G		
P3 IRB5	CCA TCG TCA AGC AGT GTA GGC GG		
P4 IRB5	CAG GAA AGT AGT GAG GGC AGA AGC		

FAMILIA *BIRNAVIRIDAE*

CARACTERISTICAS GENERALES

Los birnavirus son virus sin envoltura cuyo material genético consiste en ARN de doble cadena (dsARN) y segmentado (Fig. 48).

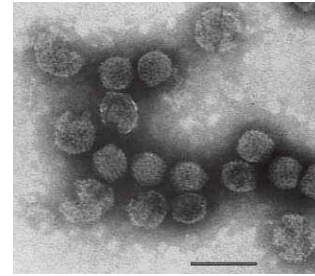


Fig. 48: Partículas de birnavirus (barra = 100 nm)

1) CLASIFICACION

La familia *Birnaviridae* consta de tres géneros: *Aquabirnavirus* (especie tipo: virus de la necrosis pancreática infecciosa, IPNV), *Avibirnavirus* (especie tipo: virus de la bursitis infecciosa, IBDV) y *Entombirnavirus* (especie tipo: virus X de la drosófila, DXV) (Fig. 49).

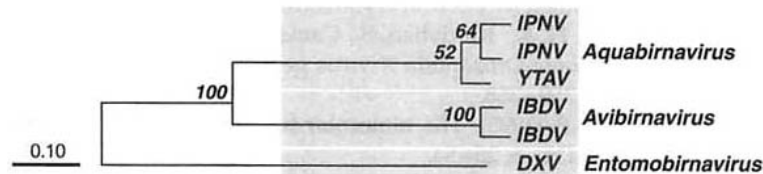


Fig. 49: Relaciones filogenéticas entre miembros de la familia *Birnaviridae*. Arbol basado en una secuencia de 306 amino-ácidos conservados de VP2. IPNV: Virus de la necrosis pancreática infecciosa, YTAV: virus de la ascitis del pez limón, IBDV: virus de la bursitis infecciosa, DXV: virus X de la drosófila.

IPNV: Este virus provoca necrosis pancreática y hemorragias. Aunque sus hospederos naturales son los peces salmónidos, ha sido aislado de moluscos bivalvos y de otros peces marinos y de agua dulce. IPNV es ubicuo y su transmisión es tanto horizontal como vertical. No se ha identificado ningún vector pero el virus es liberado en el medio a través de las heces y la orina de los organismos infectados. IPNV puede provocar epizootias que resultan en mortalidades elevadas de alevines y juveniles de salmónidos cultivados.

IBDV: Este virus se encuentra distribuido en todo el mundo. Sus hospederos naturales son los pollos y los pavos, pero también ha sido aislado de patos y otras aves domésticas. IBDV se replica en la bursa de Fabricio y mata a linfocitos B en desarrollo, provocando una inmunodeficiencia severa (formación de complejos inmunes, depleción del complemento, anomalías de coagulación). En aves de 3-6 semanas, la proporción de animales enfermos puede alcanzar 100% y la tasa de mortalidad 20-30%. Este virus es altamente contagioso (transmisión fecal-oral, no hay vector conocido) y de gran importancia en la industria de las aves. Dos serotipos (1, 2), definidos por medio de neutralización cruzada, reúnen, respectivamente, cepas patógenas y no patógenas para el pollo.

DXV: Las poblaciones de *Drosophila melanogaster* constituyen el hospedero natural de DXV, pero este virus también ha sido aislado de poblaciones de *Culicoides spp.* Su transmisión horizontal no involucra ningún vector conocido y se desconoce su distribución geográfica exacta.

2) ESTRUCTURA Y CONTENIDO VIRAL

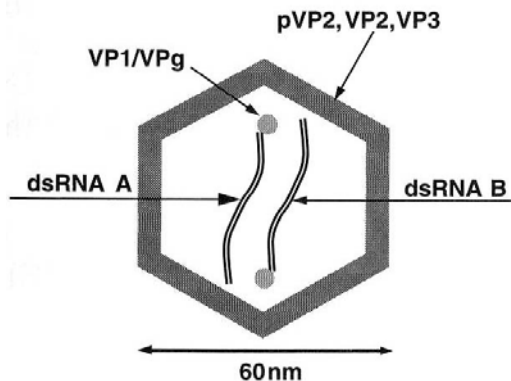


Fig. 51: Diagrama de una partícula de IPNV

Los viriones miden aproximadamente 60 nm de diámetro, son icosaédricos y carecen de envoltura. Contienen dos fragmentos diferentes (A, B) de ARN de doble cadena que representan 9-10% del peso de la partícula (Fig. 51). El segmento A mide entre 2962 pb (IPNV) y 3360 pb (DXV) mientras que el segmento B, más corto, mide de 2715 pb (IBDV aislado UK661) hasta 2922 pb (IBDV cepa QC-2).

Los viriones contienen también cinco polipéptidos: VP₁ (ARN polimerasa ARN-dependiente), VPg (5' proteína enlazada al genoma); pre VP₂ y VP₂ (polipéptidos de la cápside y antígenos específicos de tipo) y VP₃ (proteína interna de cápside y antígeno específico de grupo)

3) ORGANIZACION DEL GENOMA Y REPLICACION

La organización genómica del segmento A es similar en los tres géneros. En el caso de IPNV, el segmento A contiene dos marcos de lectura: ORF₁ que codifica una proteína de 17 kDa (VP₅) y ORF₂ que codifica una poliproteína de 106 kDa localizada en un marco de lectura traslapado. La secuencia de la poliproteína es : NH₂-VP₂-NS-VP₃-COOH. Sufre modificaciones cotraduccionales y es clivada en la zona de empalme VP₂/NS y NS/VP₃ por NS (proteínasa asociada a VP₄). VP₂ (54 kDa) y VP₃ (29-31 kDa) son los principales polipéptidos estructurales. El ORF₁ que codifica VP₅ se encuentra parcialmente traslapado por el extremo 5' del ORF de la poliproteína, pero se trata de un marco de lectura distinto. La VP₅ de IPNV fue recientemente identificada como una proteína antiapoptótica (Hong et al., 2002). El fragmento B codifica la VP₁ (90 kDa) que es una ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp).

RdRp es una proteína esencial para la replicación de los virus de ARN. Todos los virus de ARN de doble cadena necesitan contar, al interior de la célula hospedera, con una polimerasa que puedan activar para darle inicio a su ciclo de replicación. Además de su actividad como RdRp, VP₁ podría tener otras funciones y catalizar la reacción de guanilación que permite iniciar la síntesis de ARN viral (Dobos, 1993) o circularizar los segmentos de ARN de doble cadena (Muller and Nitschke, 1987). Salvo en el caso en que se encuentra presente dentro del virión como en el caso de la proteína VP₁ de 90 kDa, la RdRp viral se liga a los extremos 5' de los segmentos A y B a través de un enlace fosfodiéster entre un grupo guanina y un grupo serina, formando una proteína enlazada al genoma llamada VPg (Clavert et al., 1991; Kibenge and Dhama, 1997). IBDV también forma complejos con la proteína de cápside VP₃, lo cual facilita el proceso de encapsidación (Lombardo et al., 1999).

Un ciclo de replicación se lleva a cabo en 18-22 horas en el caso del IPNV, y en 6-8 horas en el caso de IBDV. Cuando el virus penetra en la célula hospedera, RdRp se activa y produce, a partir de cada uno de los segmentos de ARN genómico de doble cadena (14S), dos moléculas de ARNm (24S) del tamaño del genoma. Estos mensajeros carecen de cola poli A y de CAP pero la proteína VPg está ligada a sus extremos 5'. Se han identificado intermediarios replicativos en células infectadas. La transcripción del ARN se lleva a cabo por medio de un mecanismo semiconservativo y no hay información sobre la síntesis de la hebra negativa de ARN. Ambos mensajeros pueden ser detectados en células infectadas de tres a cuatro horas después de la infección y son sintetizados en las mismas proporciones relativas a lo largo del ciclo (dos veces más moléculas A que moléculas B). Polipéptidos específicos del virus pueden ser detectados de 4-5 horas después del inicio de la infección y están presentes en las mismas proporciones hasta el fin del ciclo replicativo sin que hayan fenómenos de síntesis « tempranas » o « tardías ». Las partículas virales se ensamblan y acumulan en el citoplasma (VP₄ de IBDV se acumula también en el núcleo). Se desconoce el mecanismo exacto de liberación de los virus.

4) VIRULENCIA

Existía la hipótesis que la virulencia de los birnavirus estaba determinada por la proteína de cápside VP₂ (Eterradossi et al., 1998). A pesar de que se han identificado mutaciones específicas en las proteínas de cápside de IBDV virulentos, ninguna ha podido ser relacionada con un incremento de la virulencia. Islam et al. (2001) reportaron la virulencia elevada de siete cepas de IBDV filogenéticamente distintas (segmento B) de cepas clásicas virulentas, atenuadas y avirulentas. Sin embargo, no se ha demostrado que cambios en la secuencia peptídica de RdRp sean responsables de la virulencia. Dado que RdRp juega un papel importante en la replicación del genoma viral, la actividad de la polimerasa viral influye sobre la cinética de replicación. Una mutación de la polimerasa puede, por lo tanto, afectar el potencial patogénico de un virus (Zhang and Suzuki, 2003).

5) SIMILITUDES CON RESPECTO A OTROS TAXONES

Los birnavirus no presentan ninguna homología de secuencia con miembros de otros taxones. La proteína codificada por el segmento A no tiene ninguna similitud antigénica o de secuencia con ninguna otra familia viral. La RdRp codificada por el segmento B presenta cierta similitud con otras RdRps virales. Las RdRps de birnavirus poseen una región hidrófila muy básica en la región carboxil proximal de la proteína. En esta región, algunos aminoácidos conservados ocupan posiciones similares a las que tienen en otras RdRps, en particular en RdRps de virus de ARN de doble cadena (reovirus). Sin embargo, estas homologías no permiten establecer ningún parentesco filogenético.

Recientemente se propuso que varios virus detectados de manera reciente en niños y diversas especies animales fueran reunidos en un nuevo género llamado *Picobirnavirus*. Estos virus difieren de los birnavirus por su tamaño (30-40 nm de diámetro) y su simetría icosaédrica con un número de triangulación T=3. Su genoma consiste de ARN de doble cadena bi o trisegmentado con fragmentos de 2.6 y 1.9 kpb en un caso y de 2.9, 2.4 y 0.9 kpb en el otro.

ACUABIRNAVIRUS

Los acuabirnavirus han sido aislados de una variedad de animales marinos, de agua dulce y de aguas salobres. Las especies que pertenecen a este género infectan únicamente a peces, moluscos y crustáceos. El carácter ubicuo de estos virus aunado al hecho que en ciertos casos no están asociados a ninguna enfermedad hacen que su nomenclatura sea problemática. Dos especies han sido reconocidas por el ICTV : IPNV con cuatro cepas (Jasper, serotipo Sp, DRT y N1) y el virus de ascitis del pez limón (YTAV) (Leong et al., 2001).

1) SEROGRUPOS

Los birnavirus acuáticos han sido divididos en dos serogrupos cuya reactividad cruzada es nula en pruebas de neutralización y limitada en pruebas por inmunofluorescencia. El serogrupo A reúne a la mayoría de los más de 200 acuabirnavirus conocidos. Se les ha dividido en nueve serotipos (A₁-A₉) en base a pruebas recíprocas de neutralización cruzada. Todas las cepas arquetipo fueron aisladas de América del Norte o Europa en donde se les asoció con la enfermedad de necrosis pancreática en salmónidos, excepto los serotipos A₄ y A₅ de la cepa Hecht aislados de *Esox lucius* (Ahne, 1978) y de *Tellina tenuis* (Underwood et al., 1977) respectivamente. El análisis de las secuencias de un extenso número de aislados de IPNV permitió identificar una región variable (aminoácidos 183-335) que abarca dos segmentos hidrofílicos hipervariables. El serogrupo B consiste en un serotipo único con menos de 10 aislados provenientes de peces e invertebrados marinos en Europa (Leong et al., 2001).

2) FILOGENIE

La comparación de secuencias de RdRp de cinco cepas de birnavirus marinos (Y-6, YT-01A, AY-98, H1 y NC1), cuatro cepas de IPNV de serotipo A₁ (AM-98, Jasper, WB y DRT) y una de IPNV de serotipo A₂

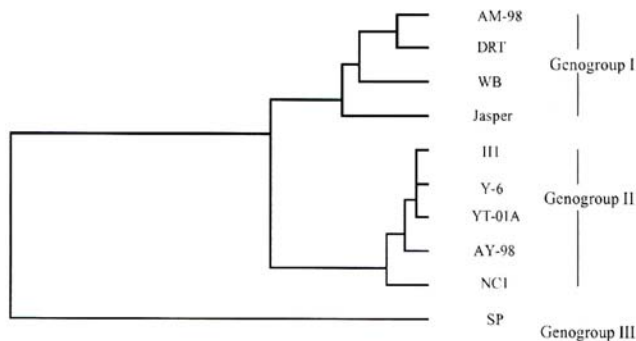


Fig. 52: Dendrograma basado en secuencias de amino-ácidos de genes RdRp de acuabirnavirus (UPGMA) (Zhang y Suzuki, 2003).

(SP) condujo a la construcción de un árbol filogenético (Fig. 52). Las cepas de IPNV de serotipos A₁ y A₂ pertenecen a dos genogrupos diferentes (I y III). Blake et al. (2001) habían obtenido un resultado similar al dividir 28 cepas de IPNV en seis genogrupos en base a las secuencias peptídicas de la región que codifica VP₂. Las cepas de serotipos A₁ y A₂ habían sido integradas en los genogrupos 1 y 5 respectivamente.

MABV e IPNV pertenecen también a genogrupos distintos (Zhang y Suzuki, 2003). Por su amplio rango de hospederos, se ha propuesto a MABV como prototipo de la familia *Birnaviridae*. La cepa SP de IPNV, por su parte, constituye una excepción evolutiva dentro del grupo de los acuabirnavirus.

3) VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA DEL PANCREAS (IPNV)

Los aislamientos de IPNV se llevaron a cabo exclusivamente durante epizootias en truchas (*Salvalinus fontinalis*) de cultivo. Sin embargo, se determinó rápidamente su implicación en enfermedades de una variedad de salmónidos incluyendo miembros del género *Salmo*, *Salvalinus* y *Oncorhynchus*. En organismos jóvenes de estas especies, causa gastroenteritis aguda y la destrucción del páncreas. También es responsable de nefritis en anguillas japonesas (*Anguilla japonica*), de la “enfermedad de la primavera” en menhaden (*Brevoortia tyrannus*) y de ascitis y hemorragia craneal en pez limón (*Seriola quinqueradiata*). En lenguados (*Scophthalmus maximus*) se ha asociado la presencia de un birnavirus con necrosis hematopoiética que da como resultado altas mortalidades por necrosis renal. Los adultos infectados se vuelven portadores sanos por el resto de sus vidas.

En cuanto a moluscos, la patogenicidad de IPNV en *Pecten maximus* ha sido demostrada (Mortensen et al., 1992). Se ha reportado que el mejillón azul y varias especies de ostión detectadas en áreas de salmicultura son portadores de este virus (Rivas et al., 1993). Agentes similares fueron detectados en *Ostrea edulis* y *Tellina tenuis*. Todos estos virus aislados de moluscos no presentaron ninguna reacción de neutralización cruzada con el IPNV patógeno para peces. Sin embargo, pruebas con anticuerpos con fluorescencia específica dieron resultados positivos lo cual indica que estos virus tienen una relación antigénica con IPNV en la que intervienen posiblemente proteínas internas como la ribonúcleo-proteína (Hill 1976, Hill y Alderman 1977, Farley 1978). Aunque en el medio natural la infección de moluscos no se acompaña de signos clínicos, infecciones experimentales de *O. edulis* y *C. gigas* indican que algunos aislados pueden provocar efectos patológicos moderados (infiltración hemocítica y necrosis del tejido conectivo de la glándula digestiva). Sin embargo estas infecciones no se acompañan de ningún fenómeno de mortalidad. Actualmente, los trabajos efectuados no establecen con claridad el impacto de los birnavirus en moluscos.

4) BIRNAVIRUS MARINO (MABV)

Los birnavirus han sido detectados en bivalvos en Europa (Hill, 1976) y Taiwan (Lo et al., 1988). Durante un episodio de mortalidad elevada, Suzuki et al. (1998a) aislaron un virus de ostiones cultivados en el Mar de Uma (Japón) y lo llamaron tentativamente “birnavirus marino”. Los birnavirus marinos (MABV) han sido definidos como un grupo dentro del género *Aquabirnavirus*. A pesar de que MABV e IPNV presentan similitudes difieren a nivel de la secuencia nucleotídica de la región VP₂/NS del segmento A (Hosono et al., 1996). El grupo de los MABV reúne al virus de ascitis del pez limón (YAV) aislado por primera vez durante episodios de mortalidad de *S. quinqueradiata* en Japón (Sorimachi and Hara, 1985) y virus similares aislados de varias especies de peces marinos (Bonami et al., 1983; Schultz et al., 1984; Hedrick et al., 1986; Novoa et al., 1993; Novoa y Figueras, 1996).

MABV también ha sido asociado con eventos de mortalidad en almejas (Lo et al., 1988). A pesar de que la patogenicidad de ciertas cepas parece débil, factores estresantes (desove, contaminación por metales pesados o cambios de temperatura) pueden aumentar la susceptibilidad del hospedero y por

ende resultar en mortalidades. Tal fenómeno fue observado en *Meretrix lusoria*, (Chou et al, 1994b and 1998), *Sinovacura constricta* (Suzuki et al., 1998b) y *Pinctada fucata* (Suzuki et al., 1998a). MABV podría ser un patógeno oportunista que infecta de manera persistente a organismos marinos y volverse patógeno bajo condiciones estresantes (Suzuki and Nojima, 1999; Kitamura et al., 2000).

No obstante, Hill (1982) reportó que el MABV aislado a partir de almejas puede ser patógeno en truchas mientras que Suzuki et al. (1997a y 1998b) evidenciaron similitudes entre los aislados de moluscos y de peces por medio de pruebas serológicas y genómicas. Esto indica que el rango de hospedero de MABV podría ser extremadamente amplio (Suzuki y Nojima., 1999). Aunado a esto, el aislamiento de MABV de una variedad de moluscos marinos aparentemente sanos (Hill, 1982, Suzuki y Nojima, 1999) y a partir de muestras ambientales (Rivas et al., 1993) indica que los moluscos son susceptibles de actuar como reservorio para este virus y transmitirlo a peces en cultivo.

5) DETECCIÓN DE ACUABIRNAVIRUS POR MEDIO DE TECNICAS MOLECULARES

Lopez-Lastra et al. (1994) y Blake et al. (1995) reportaron que el método de PCR permite la detección directa de IPNV a partir de tejidos. Dado que los birnavirus poseen ARN de doble cadena, es preciso proceder a su desnaturalización y su transcripción reversa para poder amplificar el ADNc. Todas estas etapas reducen la eficiencia de la amplificación con respecto a un templado de ARN de cadena sencilla o de ADN. Con el fin de incrementar la sensibilidad del método de detección, Suzuki et al. (1997b) desarrollaron un protocolo de PCR anidada (Table XII). El par de primers para RT-PCR fué desarrollado a partir de secuencias de IPNV (Heppell et al., 1992) mientras que el par de primers para PCR anidada fue diseñado a partir de una secuencia de MABV (Hosono et al. 1996). Los límites de detección en cuanto a viriones purificados en RT-PCR fue de 1 pg de genoma viral, el mismo que en caso de IPNV (Lopez-Lastra et al., 1994). Sin embargo, cuando se combinó la PCR anidada, 1 fg de virus resultó suficiente. Por medio de ensayos con material genético de otros virus y de bacterias la especificidad del método pudo ser establecida.

Table XII: Primers empleados para RT-PCR (P1-P2) y PCR anidada (P3-P4) (Suzuki et al., 1997b)

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	ORIENTACION	TAMAÑO DEL PRODUCTO (bp)	POSICION
P1	AGA GAT CAC TGA CTT CAC AAG TGA C	Sentido	359	1403-1761 (cepa Jasper, segmento A)
P2	TGT GCA CCA CAG GAA AGA TGA CTC	Antisentido		
P3	CAA CAC TCT TCC CCA TG	Sentido	168	74-241 (cepa Y-6, región VP2/NS, segmento A)
P4	AGA ACC TCC CAG TGT CT	Antisentido		

Este protocolo ha sido ampliamente utilizado para la detección de MABV en peces marinos (Suzuki et al., 1997b), moluscos silvestres (pectínidos, ostión de piedra, ostión Japonés, mejillón azul, abalón Japonés, berberecho, almeja, almeja Japonesa, entre otras) (Suzuki and Nojima, 1999), moluscos cultivados (*P. fucata*) (Kitamura et al., 2000) y zooplancton (Kitamura et al., 2003).

ACTIVIDADES DE INVESTIGACION:

**DISEÑO EXPERIMENTAL,
RESULTADOS,
Y
CONCLUSIONES**

1ª PARTE

COMPARACION Y VALIDACION DE TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION DE OsHV-1

EVALUACION DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LAS TECNICAS

COMPARACION A GRAN ESCALA DE TECNICAS DE DETECCION TRADICIONALES Y MOLECULARES

INTRODUCCIÓN

Una de las mayores dificultades en el estudio de herpesvirus que infectan a moluscos bivalvos reside en la imposibilidad de cultivarlos *in vitro*. Actualmente no se encuentra disponible ninguna línea celular de molusco y diversas tentativas de propagación del virus de ostreidos 1 (OsHV-1) en líneas celulares heterólogas de pez, insecto y mamífero han fracasado (Le Deuff, 1995; Deniau, 2000). Por lo tanto resulta imposible realizar un diagnóstico directo de este tipo de virus por medio de la observación de efectos citopatogénicos en cultivos celulares. La detección específica de anticuerpos antivirales tampoco es realizable debido a que el sistema inmune de los bivalvos carece de linfocitos y de moléculas de tipo inmunoglobulinas. Por tales motivos, el diagnóstico de OsHV-1 ha sido tradicionalmente efectuado por histología y microscopía electrónica de transmisión (MET). Recientemente sin embargo, se ha desarrollado una gama de técnicas moleculares para su detección específica: PCR anidada (Renault et al., 2000a), PCR sencilla (Renault y Lipart, 1998 ; Arzul et al., 2001b y c) dirigida hacia diversas regiones del genoma (Arzul, 2001) e hibridación *in situ* (HIS) (Lipart and Renault, 2002). Uno de los objetivos de este proyecto es llevar a cabo las primeras etapas de comparación y evaluación de las técnicas moleculares previamente desarrolladas. Este trabajo constituye sólo una pequeña parte de un proceso de validación mucho más largo y complejo. El esquema experimental que fue adoptado está ilustrado por la Fig. 53.

La primera parte de este trabajo está relacionada con la evaluación de la reproducibilidad de las técnicas moleculares de detección a través del análisis interlaboratorios de una serie de muestras congeladas o fijadas e incluidas en parafina (Fig. 23). Las muestras y las técnicas empleadas así como los resultados obtenidos y una discusión preliminar son presentados. La segunda parte corresponde al análisis por PCR e HIS de un gran número de bloques histológicos que corresponden a muestras de ostión colectadas en 1994. Los resultados obtenidos a través de esta serie de análisis moleculares nos permitieron (1) comparar la sensibilidad de ambas técnicas y (2) evaluar la coherencia entre el diagnóstico generado por el análisis histológico y por los métodos moleculares. La información obtenida fue empleada para elaborar un primer artículo publicado en el Journal of Virological Methods (Artículo 1).

COMPARACION Y EVALUACION DE TECNICAS DE DETECCION: ESQUEMA EXPERIMENTAL

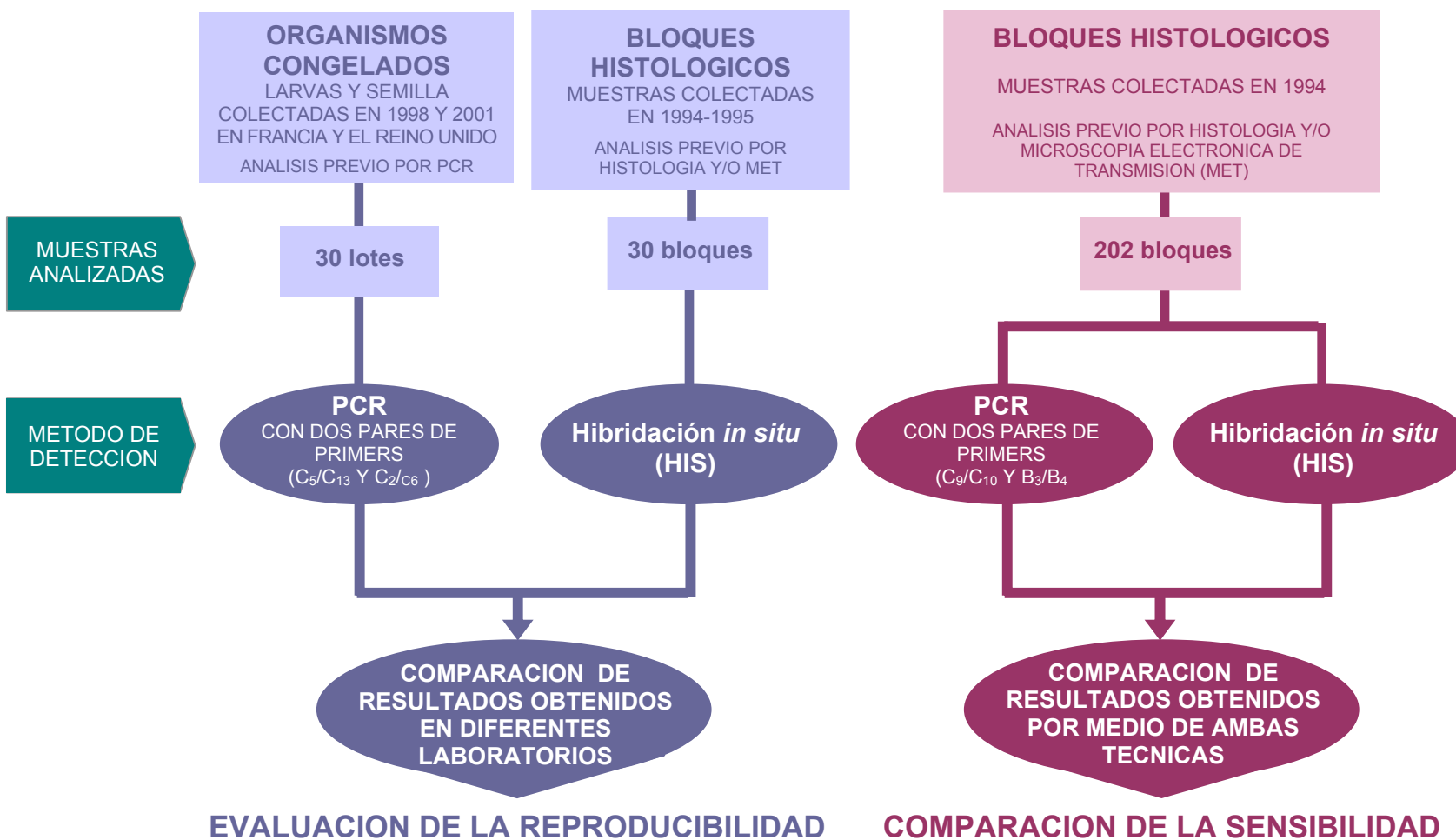


Fig. 52: Evaluación de las técnicas a varios niveles

EVALUACION INTERLABORATORIOS DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LAS TECNICAS

La reproducibilidad de un método de detección se determina por medio de la comparación de resultados obtenidos por varios laboratorios al efectuar un análisis idéntico (protocolo, reactivos, controles). Una evaluación inicial de la reproducibilidad de la PCR (sencilla y anidada) y de la HIS fue llevada a cabo por medio de dos ensayos que involucraron a cuatro laboratorios Europeos de Francia (el LGP de IFREMER, La Tremblade), España, el Reino Unido e Irlanda. El LGP (designado laboratorio A) seleccionó 60 muestras “de referencia” que habían sido previamente analizadas: 30 sobrenadantes de larvas y semilla y 30 bloques histológicos. Cada laboratorio recibió un lote completo de muestras (sobrenadantes y bloques) que fueron analizadas por PCR e HIS respectivamente para detectar OshV-1. Este trabajo es parte de un proyecto Europeo llamado VINO (contrato FAIR-CT98-4334). Por razones de confidencialidad, la identidad de los participantes no ha sido indicada y los tres laboratorios Europeos que participaron en el ensayo han sido designados B, C y D en la sección dedicada a los resultados.

1) MATERIALES Y METODOS

1.1 Muestras: proveniencia y estatus infeccioso

1.1.1 Bloques de parafina

A lo largo de 1994 y 1995, una gran cantidad de muestras fueron colectadas en granjas del litoral Atlántico de Francia y procesadas para ser analizadas por métodos clásicos de histología. En ciertos casos, la presencia de una serie de lesiones y anomalías características (Renault et al., 1994 a y b; Renault et al., 1995) generaron la sospecha de una infección por un virus herpes. Una serie de 30 bloques archivados en el LGP de IFREMER La Tremblade fue seleccionada y analizada de nuevo por PCR antes de ser enviada a los demás participantes del ensayo (Tabla VIII).

Tabla VIII: Estatus infeccioso de las muestras analizadas. El número de referencia indica: el año de colecta (1994 o 1995) así como el número del lote y de cada organismo del lote. La columna «Estatus» indica si se habían detectado lesiones en los tejidos por medio de análisis histológico (sospecha de una infección por virus herpes) en el momento de la colecta y observación de las muestras (1994 o 1995).

MUESTRA	ESTATUS	REFERENCIA	MUESTRA	ESTATUS	REFERENCIA	MUESTRA	ESTATUS	REFERENCIAS
VB1	-	95 54-30	VB12	+	94 278-13	VB22	+	94 250-4
VB2	-	95 54-28	VB13	+	94 278-11	VB23	+	94 248-15
VB3	-	95 54-26	VB14	+	94 278-10	VB24	+	94 248-13
VB4	-	95 54-20	VB15	+	94 278-8	VB25	+	94 248-7
VB5	-	95 54 18	VB16	+	94 278-7	VB26	+	94 248-5
VB6	-	95 54 14	VB17	+	94 250-23	VB27	+	94 248 1
VB8	-	95 54 12	VB18	+	94-250-19	VB28	+	94 215-11
VB9	-	95 54 11	VB19	+	94-250-18	VB29	+	94 215-10
VB10	-	95 54-8	VB20	+	94-250-17	VB30	+	94 215-9
VB11	-	95 54-7	VB21	+	94-250-13	VB31	+	94 215-6

1.1.2 Sobrenadantes de semilla homogeneizada

En el año 2000, muestras de semilla provenientes de varias localidades del departamento de Charente Maritime, Francia, fueron procesadas (extracción de ADN) y analizadas por PCR para detectar a OsHV-1. La información generada por estos análisis (Tabla IX) permitió seleccionar una serie de muestras almacenadas a -20°C . Dichas muestras fueron analizadas de nuevo por PCR con dos pares de primers: alícuotas de las 15 muestras finalmente seleccionadas fueron enviadas a cada laboratorio.

Tabla IX: Referencias y estatus infeccioso las muestras de semilla colectadas y analizadas por PCR en el año 2000. **74/1** : muestra seleccionada para el ensayo inter-laboratorios. +/- : presencia/ausencia de ADN viral revelado por análisis por PCR

MUESTRA	ESTATUS	LOTE	MUESTRA	ESTATUS	LOTE
74/1	+	01/074	113/5	+	01/113
78/1	+	01/078	115/4	+	01/115
78/5	+		116/3	+	01/116
93/5	+	01/093	117/3	+	01/117
98/6	+	01/098	117/4	+	
99/4	+	01/099	175/1	+	01/175
99/5	+		317/1	-	01/317
105/3	+	01/105	317/2	-	
105/4	+		317/3	-	
106/1	+		01/106	317/4	
113/3	+	01/113	317/5	-	

1.1.3 Sobrenadantes de larvas homogeneizadas

Muestras de larvas fueron colectadas y analizadas por PCR en 1997-1999 (Tabla X). 21 muestras fueron nuevamente analizadas por PCR con dos pares de primers. En base a los resultados obtenidos, 15 muestras positivas o negativas fueron seleccionadas y alícuotadas para el ensayo.

Tabla X: Referencias y estatus infeccioso de muestras de larvas colectadas y analizadas por PCR en 1997-1999. Todas las muestras son *C. gigas* excepto las larvas PAL que son de *R. decussatus*. **SAT 1**: muestra seleccionada para el ensayo. +/- : estatus infeccioso positivo o negativo revelado por el análisis por PCR.

MUESTRA	ORIGEN	FECHA DE MUESTREO	ESTATUS	EDAD (DIAS)	MUESTRA	ORIGEN	FECHA DE MUESTREO	ESTATUS	EDAD (DIAS)	
SAT1	NORMANDIA (FRANCIA) (laboratorio)	16/09/98	+	7-8	PAL1	NORMANDIA (FRANCIA) (laboratorio)	25/09/98	-	3	
SAT6		+	PAL2		-					
SAT7		15/09/98	+		PAL3		26/09/98	-	4	
SAT8		+	PAL4		-					
SAT9		27/08/98	++		PAL6		27/09/98	-	5	
SAT10	++		PAL8	28/09/98	-		6			
P10	VENDEE (laboratorio)	05/99	+	10	PAL10		29/09/98	+	7	
P11			+		PAL12		30/09/98	+	8	
T1-T5	INGLATERRA (laboratorio)	12/97-06/98	-	10						

1.2 Hibridación *in situ* (HIS) con revelado directo

Las sondas para la HIS fueron producidas por PCR usando ADN genómico viral como templado, el par de primers C₁/C₆ y nucleótidos marcados con digoxigenina según protocolos previamente reportados (Arzul et al., 2002 ; Lipart y Renault, 2002). El protocolo detallado de cada una de las etapas (síntesis de la sonda, preparación de los cortes, prehibridación, hibridación, revelado y contra-coloración) se encuentra en el Anexo 2.

1.3 Detección de OsHV-1 por PCR

1.3.1 Pares de primers

Los pares de primers empleados están dirigidos hacia la región C del genoma viral: C₅/C₁₃ (producto de amplificación de 744 bp) y C₂/C₆ (producto de amplificación de 689 bp) (Fig. 53).

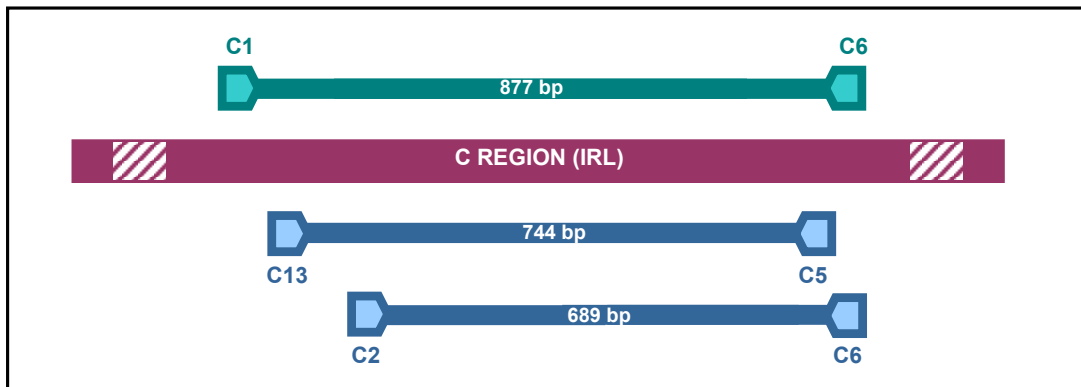


Fig. 53: Localización de los primers empleados para la detección por PCR de OsHV-1 (C₅/C₁₃ y C₂/C₆) y para la síntesis de la sonda para HIS (C₁/C₆). El tamaño de los productos esperados está indicado en pares de bases

1.3.2 Condiciones de la PCR

El protocolo detallado de las reacciones de PCR (coctel de reacción y condiciones de amplificación) están descritas en el Anexo 4. En cada reacción de PCR se incluyeron un control negativo inicial, controles negativos cada ocho-diez muestras y un control positivo final. En los controles negativos, el templado de ADN fue sustituido por agua ultrapura (SIGMA), en los controles positivos el templado fue ADN de OsHV-1 purificado a partir de larvas (*C. gigas*) infectadas (Le Deuff and Renault, 1999).

Ocho microlitros de cada producto de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) y visualizados por medio de un transiluminador de luz ultravioleta (302 nm). El tamaño de los productos de amplificación fue determinado por comparación con un marcador de talla molecular.

2) RESULTADOS

2.1 Análisis por PCR

El laboratorio A analizó todas las muestras de referencia antes de seleccionar las que serían enviadas a las demás instituciones. De las 16 muestras que habían sido controladas como negativas, 14 dieron un resultado negativo por PCR con ambos pares de primers. De las 27 muestras referenciadas como positivas, 18 dieron resultados positivos con ambos pares de primers, cinco dieron resultados negativos con ambos pares de primers y cuatro dieron un resultado negativo con C₂/C₆ y un resultado positivo con C₅/C₁₃. Una lustración de los resultados obtenidos se encuentra en la Fig. 54.

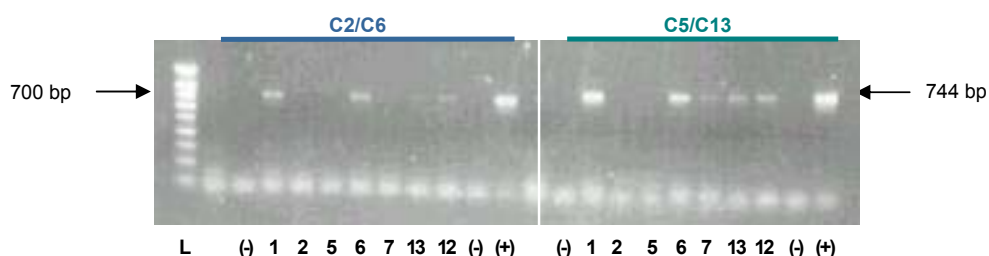


Fig. 54: análisis por PCR de muestras de larvas y semilla con los pares de primers C₂/C₆ y C₅/C₁₃. Carriles 1, 2, 5, 6, 7 : muestras de larvas. Carriles 78/1, 74/1 : muestras de semilla. N: control negativo. P: control positivo. L: escalera de 100 pb (Eurogentec)

Finalmente, 11 muestras negativas y 19 muestras positivas que dieron resultados respectivamente negativos y positivos por PCR con ambos pares de primers fueron enviados a los participantes B, C y D. Los resultados obtenidos por cada institución de encuentran en la Tabla XI.

Tabla XI: Resultados del ensayo con PCR

Referencia	N°	Estatus	PCR							
			C2/C6				C5/C13			
			A	B	C	D	A	B	C	D
317/1	1	-	-	-	+	-	-	-	+	-
317/2	2	-	-	-	-	-	-	-	+	-
317/3	3	-	-	-	+	-	-	-	-	-
317/4	4	-	-	-	-	-	-	-	+	-
317/5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T1	6	-	-	-	-	-	-	-	+	-
T2	7	-	-	-	+?	-	-	-	+	-
T3	8	-	-	-	+	-	-	-	+	-
T4	9	-	-	-	+	-	-	-	+	-
T5	10	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PAL2	11	-	-	-	-?	-	-	-	+	-
74/1	12	+	+	+	+	+	+	+	-	-
93/5	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
98/6	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99/4	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+
99/5	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
105/4	17	+	+	+	+	+	+	+	-	+
106/1	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
115/4	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116/3	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
117/3	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAL6	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAL8	23	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAL10	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PAL12	25	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAT9	26	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAT10	27	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SAT1	28	+	+	-	-	-	+	-	-	-
SAT6	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAT7	30	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Los resultados del análisis de las 19 muestras positivas efectuado en cada uno de los cuatro laboratorios muestran gran homogeneidad. En cuanto al análisis de las muestras negativas, los resultados de los participantes A, B y D son homogéneos. Sin embargo, los resultados del laboratorio C son sumamente discordantes ya que sólo 2 de ellas (18%) dieron un resultado negativo por PCR. (Fig. 55)

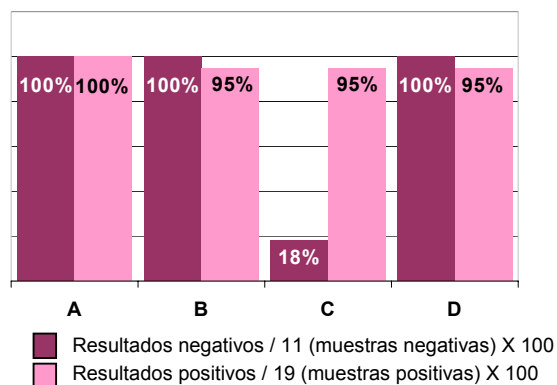


Fig. 55 : Resultados globales del análisis por PCR efectuado en cada laboratorio

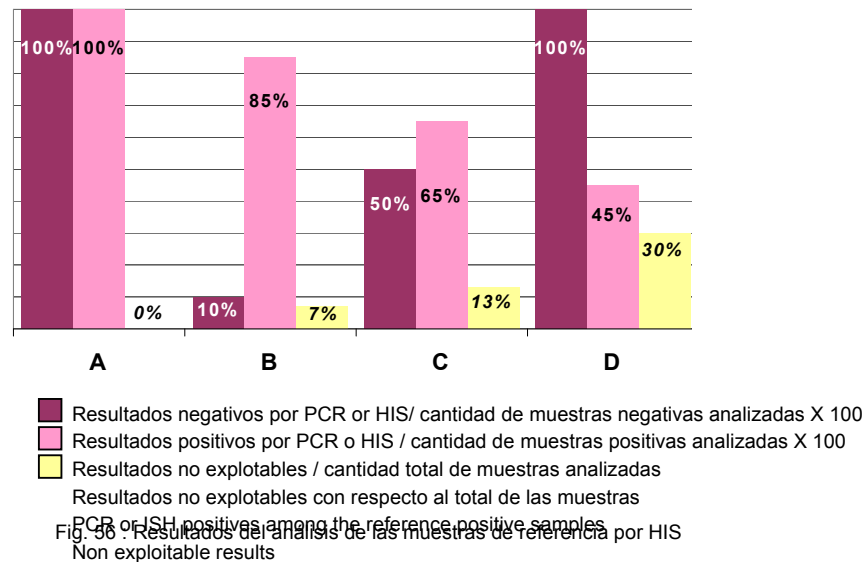
2.2 Análisis por HIS

El estatus de los bloques de histología de referencia fue verificado por el laboratorio A por medio de un análisis preliminar por PCR con dos pares de primers que amplifican regiones pequeñas del genoma de OsHV-1: C₉/C₁₀ y B₃/B₄ (resultados no mostrados). Los diez bloques que fueron seleccionados como muestras negativas dieron resultados negativos por PCR con ambos pares de primers y por HIS. Los 20 bloques seleccionados como muestras positivas dieron resultados positivos por PCR con C₉/C₁₀ (14 muestras), o con B₃/B₄ (4 muestras) o con ambos pares de primers (2 muestras) y por HIS. Los resultados del ensayo por HIS están en la Tabla XII.

Tabla XII: Resultados del ensayo interlaboratorios por HIS. NE: resultado no explotable

SAMPLE	STATUS	ISH			
		A	B	C	D
VB1	-	-	?	-	-
VB2	-	-	+	-	-
VB3	-	-	+	-	-
VB4	-	-	+	-	-
VB5	-	-	+	-	-
VB6	-	-	+	+	-
VB7	-	-	ND	ND	-
VB8	-	-	-	+	-
VB9	-	-	+	+	-
VB10	-	-	+	?	-
VB11	+	+	+	+	-
VB12	+	+	+	+	-
VB13	+	+	+	+	+
VB14	+	+	+	+	+
VB15	+	+	+	?	+
VB16	+	+	+	-	+
VB17	+	+	+	+	+
VB18	+	+	+	+	+
VB19	+	+	+	+	+
VB20	+	+	+	-	+
VB21	+	+	+	-	+
VB22	+	+	+	+	ND
VB23	+	+	+	?	ND
VB24	+	+	+	+	ND
VB25	+	+	+	-	ND
VB26	+	+	+	+	ND
VB27	+	+	-	+	ND
VB28	+	+	-	-	ND
VB29	+	+	+	+	ND
VB30	+	+	-	+	ND

Los resultados obtenidos por los cuatro laboratorios son muy heterogéneos tanto en el caso de las muestras negativas como en el de las muestras positivas (Fig. 56). Los resultados del laboratorio D fueron satisfactorios en lo que a muestras negativas se refiere. Sin embargo, los resultados de 45% de las muestras positivas no pudieron ser explotados, lo cual resultó en un porcentaje muy bajo de detección viral en las muestras positivas de referencia. En cuanto a los resultados obtenidos por los laboratorios B y C, son globalmente inconsistentes con respecto al estatus infeccioso de las muestras de referencia.



3) DISCUSION

La técnica de PCR ha sido ampliamente utilizada para la detección de ADN de OsHV-1 en larvas, semilla y adultos de ostión y de otros bivalvos (Renault, 1998; Renault et al., 2000a y b; Arzul et al., 2002) y ha demostrado su eficacia en diversos tipos de muestras (frescas, fijadas y congeladas). La especificidad del protocolo de PCR utilizado fue comprobada con anterioridad y se mostró que no hay generación de falsos positivos (Renault et al., 2000b; Arzul et al. 2002). La sensibilidad de la PCR, es, por definición, muy elevada, ya que varios millones de copias del fragmento blanco pueden ser obtenidos. En el caso particular de este protocolo, la cantidad mínima de templado viral necesaria para producir de forma sistemática una cantidad de producto suficiente para ser visualizada en geles de agarosa es de 10 fg con el par de primers C₂/C₆ pero pueden ser necesarios hasta 500 fg en el caso de otros pares de primers (Arzul, 2001). La sensibilidad de cada técnica constituye una ventaja pero implica posibilidades elevadas de que se declaren problemas de contaminación. Tales problemas son probablemente responsables de los resultados positivos obtenidos por el laboratorio C al analizar muestras de referencia negativas. Exceptuando estos datos discordantes, los resultados del ensayo por PCR muestran la reproducibilidad de esta técnica .

Se ha comprobado que el diagnóstico de OsHV-1 por PCR o HIS puede generar resultados muy diferentes de los que se obtienen por análisis histológico (Barbosa-Solomieu et al., 2004). Esta discordancia se debe, por un lado, al hecho que las lesiones y anomalías asociadas a la infección por virus de tipo herpes pueden ser causadas por otros agentes y por otro, al hecho que las infecciones por virus herpes pueden ser asintomáticas (latencia o bajos niveles de replicación). Sin embargo, en este caso preciso, el análisis de las muestras referencia por PCR con dos pares de primers e HIS (resultados no mostrados) confirmaron las sospechas de infección por virus herpes basadas en los análisis histológicos efectuados en 1994-1995. El estatus infeccioso de los bloques seleccionados fue por tanto determinado por la combinación de tres técnicas (histología, PCR e HIS). Resulta así probable que la discordancia de los resultados del ensayo interlaboratorios tenga su origen en una mala definición del estatus de las muestras seleccionadas como muestras de referencia.

Por tales motivos, la obtención de “falsos positivos” en el análisis de muestras negativas necesita ser discutido. La HIS es menos sensible que la PCR para la detección de OsHV-1 en muestras de archivo fijadas e incluidas en parafina. Varios factores contribuyen a una menor sensibilidad de la HIS con respecto a la PCR: ausencia de un proceso de amplificación, detección en una sección de tejido única y fuerte degradación del ADN. Este último factor vuelve la hibridación de la sonda de HIS de 877 pb más improbable que la de los primers para PCR de 20 pb. La digestión del tejido constituye una etapa esencial: de ser insuficiente, puede afectar la accesibilidad del ADN viral e impedir la hibridación de la sonda. Sin embargo, si bien múltiples factores permiten explicar la obtención de « falsos negativos » el origen de los « falsos positivos » resulta más difícil de determinar. En este caso, la existencia de problemas técnicos parece ser la causa de la heterogeneidad de los resultados.

Comparado con la PCR, el protocolo de HIS es más largo y complejo. La multiplicidad de las etapas (síntesis de la sonda por PCR, preparación de los cortes, prehibridación e hibridación, revelado, contracoloración) incrementa los riesgos de contaminación o de fracaso de las reacciones. La inclusión sistemática de controles positivos y negativos debe permitir descartar los resultados no explotables. En este caso, a pesar de haber sido ampliamente utilizado anteriormente (Renault and Lipart, 1998) el protocolo de HIS parece requerir mayor estandarización antes de que ensayos para determinar su reproducibilidad puedan ser llevados a cabo satisfactoriamente.

Este trabajo, que fue llevado a cabo como parte del proyecto Europeo VINO, constituye el primer reporte de un ensayo interlaboratorios de evaluación de la reproducibilidad de la HIS como método de diagnóstico de infecciones virales en bivalvos. El análisis de los resultados obtenidos indica que los ensayos deberán ser repetidos. Sin embargo se requiere una estandarización previa y completa del protocolo empleado (técnicas, equipo, reactivos, etc.) para que los resultados obtenidos sean interpretables.

COMPARACION DE METODOS TRADICIONALES Y MOLECULARES DE DETECCION DE OsHV-1

En muchos laboratorios la mayoría de las muestras archivadas/de referencia está constituida por bloques histológicos, es decir tejidos u organismos fijados e incluidos en parafina. Tal y como ha sido mencionado con anterioridad, los análisis histológicos presentan cierta inadecuación para el diagnóstico de virus. Debido a la carencia de líneas celulares de moluscos, esta técnica, asociada con la microscopía electrónica, ha sido durante años la única herramienta para detectar virus en bivalvos. Actualmente, los métodos moleculares permiten detectar de manera sensible y específica a varios patógenos de bivalvos, entre los cuales OsHV-1. Por lo tanto, se ha vuelto posible efectuar el diagnóstico retrospectivo de muestras archivadas, lo cual podría generar información sobre la evolución de la prevalencia de los virus, por ejemplo. Sin embargo, es preciso determinar previamente si en este tipo de muestras el ADN sigue siendo detectable por PCR o HIS y cual de las dos técnicas es la más adecuada.

Con este fin, se seleccionaron 200 bloques histológicos de muestras colectadas y procesadas en 1994 y archivadas desde entonces. Estas muestras habían sido analizadas por métodos clásicos de histología (coloración con hematoxilina-eosina) y, en algunos casos, por MET para determinar la presencia de virus de tipo herpes. En base a estos análisis, los lotes de muestras habían sido clasificados en tres categorías: prevalencia viral elevada, prevalencia viral moderada y animales aparentemente sanos. Con el fin de poder efectuar posteriormente comparaciones y análisis estadísticos, se seleccionaron lotes de muestras que permitieran disponer de alrededor de 60 bloques en cada categoría. Todos los bloques fueron analizados tanto por HIS como por PCR. Debido a la degradación del ADN provocada por la fijación, la inclusión en parafina y el almacenamiento de las muestras por varios años a temperatura ambiente, la PCR fue llevada a cabo con dos pares de primers que generan fragmentos pequeños (< 200 pb) : C₉/C₁₀ y B₃/B₄.

La detección de OsHV-1 pudo ser efectuada con el material empleado. En el caso de la PCR, el par de primers C₉/C₁₀ resultó el más eficiente. A pesar de que la PCR tiene mayor sensibilidad que la HIS, ambas técnicas son complementarias ya que la HIS brinda información sobre la localización de los focos infecciosos. Ambas técnicas revelaron una prevalencia viral elevada en lotes de muestras de animales asintomáticos: los métodos moleculares permiten detectar ADN viral aún cuando la infección viral no provoca ningún signo clínico visible (replicación muy débil o fase de latencia).

Estos resultados fueron incluidos en un artículo publicado en el Journal of Virological Methods presentado a continuación.

ARTICULO 1

(Journal of Virological Methods, 119 (2): 65-72)

Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and *in situ* hybridisation

Barbosa-Solomieu V.^{1,2}, Miossec L.¹, Vázquez-Juárez R.², Ascencio-Valle F.²,
Renault T.^{1*}

¹ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade, France.

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Marine Pathology Unit, 23000, La Paz, B.C.S., Mexico.

* Corresponding author : T. Renault. IFREMER, LGP, 17390 La Tremblade. Tel : 33 5 46 36 98 36. Fax : 33 5 46 36 37 51. E-mail : trenault@ifremer.fr

SOBRE LA VALIDACION DE TECNICAS DETECCION (CONCLUSION)

La validación de una técnica analítica es un proceso largo y complejo que ha sido definido de manera estricta por los organismos nacionales e internacionales a cargo del control de la calidad. *Sensu stricto*, la validación de un método analítico consiste en la medición de características de desempeño como la certeza, la precisión, la especificidad, la linealidad, los límites de detección y de cuantificación, las variaciones intralaboratorio (robustez) y las variaciones interlaboratorios. En el caso particular del diagnóstico de enfermedades contagiosas, el OIE indica que la validación es « *la evaluación de un análisis con el propósito de determinar que tan adecuado es para un propósito específico* ». El OIE ha desarrollado principios básicos para la validación de métodos indirectos de detección (ELISA) y tiene contemplada la adaptación de estos principios para la validación de la PCR como método directo de detección. El proceso de validación de los métodos de diagnóstico molecular ha sido dividido en cinco etapas: (1) estudios de la viabilidad, (2) desarrollo y estandarización, (3) determinación de las características de desempeño (sensibilidad del diagnóstico, especificidad, repetibilidad y reproducibilidad), (4) control de la validez de los parámetros de desempeño del método y (5) mantenimiento y mejoración de los criterios de validación.

Los métodos moleculares desarrollados en el LGP para la detección de OsHV-1 no han sido sometidos a un proceso formal de la validación aunque varios parámetros indicados por el OIE hayan sido verificados (límite de detección, controles negativos y positivos, evaluación de los termocicladores, optimización de condiciones de reacción, etc.). Nuestro objetivo no era sin embargo iniciar un proceso formal de validación de los protocolos de PCR e HIS. Este trabajo formaba parte de las tareas definidas dentro del proyecto Europeo VINO (contrato FAIR-PL98-4334: « Diagnóstico de virus herpes de ostra: desarrollo y validación de herramientas moleculares, inmunológicos y celulares »). Los ensayos interlaboratorios mostraron la reproducibilidad del protocolo de PCR y la necesidad de estandarizar el protocolo de HIS. Adicionalmente, el análisis de una gran cantidad de muestras de referencia nos dio la oportunidad de obtener información sobre la sensibilidad y la complementariedad de las técnicas tradicionales y moleculares de detección.

Los resultados obtenidos indican que las técnicas moleculares permiten efectuar un análisis retrospectivo de muestras archivadas (organismos congelados o bloques de histología). En el caso de material fijado e incluido en parafina, la PCR con un par de primers que amplifica un fragmento pequeño (<200 bp) de una región repetida del genoma fue confirmada como la técnica más adaptada para la detección del virus. A pesar de ser menos sensible, HIS proporciona información complementaria y significativa. Las condiciones de procesamiento y almacenamiento de las muestras resulta tan importante como la misma técnica para el éxito de la detección del virus. Ambas etapas deben ser consideradas como parámetros relevantes cuando se analizan muestras archivadas y deberían ser incluidos en cualquier proceso de validación subsecuente.

2ª PARTE

APLICACION DE LA PCR PARA EXPLORAR LA HIPOTESIS DE LA TRANSMISION VERTICAL DE OshV-1 Y DE SU PRESENCIA EN OSTIONES CULTIVADOS EN MEXICO

**TRANSMISION VERTICAL DE OSHV-1:
REUNIENDO PRUEBAS (¿?)**

**¿ESTA OSHV-1 PRESENTE EN MEXICO?
UN PRIMER PASO...**

PREVALENCIA DE OsHV-1 EN TRES GENERACIONES SUCESIVAS DE *C. gigas* REUNIENDO INFORMACIÓN SOBRE SU TRANSMISIÓN VERTICAL

Mortalidades estivales anormales en *C. gigas* fueron reportadas por primera vez en 1940 en Japón (Koganezawa, 1975) y afectaron a cultivos en Estados Unidos en los años 50 (Glude, 1975). En Francia, fenómenos similares acompañaron la introducción de la especie a principios de los 70s (Maurer y Comps, 1986). Estos eventos de mortalidad estival afectan tanto a adultos (Glude, 1975) como a semilla (Cheney et al., 2000) y podrían resultar de la combinación de múltiples parámetros. La supervivencia de los ostiones en cultivo depende de una gama de factores: medio ambiente, métodos de cultivo, patrimonio genético, condición fisiológica de los animales y presencia de agentes infecciosos. Con el fin de adquirir una mayor comprensión este tipo de fenómenos, un programa multidisciplinario llamado MOREST (2000-2005) ha sido desarrollado por el IFREMER. Los principales ejes de este programa están relacionados con fisiología, inmunología, patología, ecotoxicología y genética.

Varios estudios han mostrado que las mortalidades que afectan a la semilla podrían tener bases genéticas. Se han iniciado programas de selección para generar stocks de ostiones resistentes a los eventos de mortalidad estival (Beattie et al., 1980; Beattie, 1984; Pajot et al., 1998, Hershberger et al., 1984). Además, se ha demostrado que la supervivencia es heredable (Ernande et al., 2000; Ernande, 2001). Por lo tanto, el proyecto de genética que forma parte de MOREST tiene como objetivo determinar las bases genéticas de la supervivencia de la semilla y establecer si dicha supervivencia puede ser seleccionada y mejorada a través de varias generaciones de ostiones.

En el año 2001 inició la producción de 72 familias biparentales de ostión Japonés. Después de la etapa de crecimiento en laboratorio, se evaluaron las tasas de supervivencia de la semilla en el campo. De acuerdo a los valores promedio de este parámetro se seleccionaron dos grupos de seis familias que se destacaron por su «buen» o «mal» desempeño zootécnico. Algunos miembros de cada una de estas familias fueron utilizados como reproductores en el 2002 para producir una segunda generación. Se obtuvieron 24 familias de larvas consanguíneas y 24 familias de larvas no consanguíneas que fueron sometidas al mismo proceso que sus predecesoras. En el 2001 y el 2002 se colectaron muestras de larvas que fueron almacenadas de inmediato a -80°C . En cuanto a los reproductores, fueron fijados en Davison y almacenados a 4°C con el fin de ser analizados para detectar OsHV-1 (Fig. 57). Técnicamente, se modificó un protocolo existente de extracción de ADN que hizo posible la amplificación por PCR de fragmentos de más de 200 pb a partir de material fijado. Los resultados no permitieron establecer una relación clara entre desempeño zootécnico y estatus infeccioso. No obstante, el análisis de tres generaciones sucesivas de ostiones permitió reforzar la hipótesis de una transmisión vertical de OsHV-1 y sugerir la existencia de una transmisión materna de un mecanismo de protección o defensa contra las infecciones virales. Esta parte del trabajo fue reportada en un artículo sometido a "Virus Research" (c.f. Artículo 2).

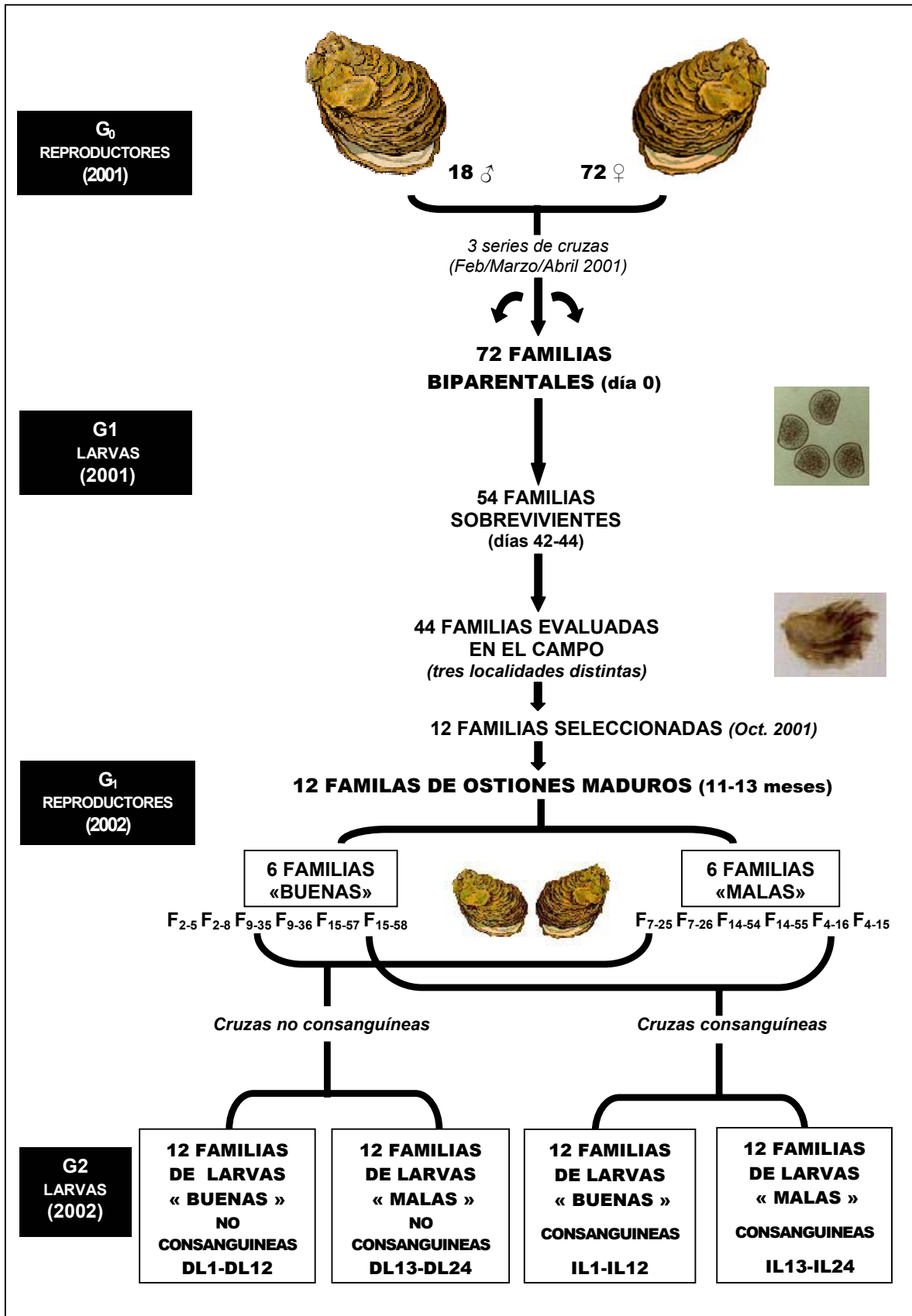


Fig. 57: Cruzas efectuadas en el 2001 y el 2002 como parte del programa MOREST

Artículo 2

(sometido a Virus Research)

**Evidence for vertical transmission of Ostreid herpesvirus 1
(OsHV-1) among three successive generations of Pacific oysters
(*Crassostrea gigas*)**

Barbosa-Solomieu, V.^{1,2}, Dégremon, L.¹, Vázquez-Juárez, R.², Ascencio-Valle, F.², Boudry,
P.¹, Renault, T.^{1*}

¹ Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Laboratoire de Génétique et Pathologie (LGP), 17390 La Tremblade, France.

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Marine Pathology Unit, 23000, La Paz, B.C.S., Mexico.

* Corresponding author: T. Renault. IFREMER, LGP, 17390 La Tremblade. Tel: 33 5 46 36 98 36. Fax: 33 5 46 36 37 51. E-mail: trenault@ifremer.fr

SUMMARY

Oyster herpesvirus 1 (OsHV-1) has been associated with mortality of larvae and spat in several bivalve species, among them the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Previous results suggested that vertical transmission of this herpesvirus was likely to take place during spawning, through the release of infected fibroblast-like cells from mature gonads. In order to test this hypothesis, three successive generations of *C. gigas* (G0 and G1 parental oysters, G1 and G2 larvae) were screened for OsHV-1 by PCR. Viral detection was achieved in two-day old larvae, indicating that infection may take place at very early stages. Moreover, the infective status of the parents appeared to have an influence on both the infection and the survival rates of the progeny. Crosses involving an OsHV-1 infected male and a non-infected female resulted in hatching and larval survival rates statistically lower than those observed in the other types of cross. Although our results strengthen the evidence for vertical transmission, it was not possible to predict the outcome of a particular type of cross. Indeed, detection of viral DNA in parental oysters did not correspond systematically to productive infection or result in successful transmission to the progeny. Predictability might be improved by the use of optimal storage procedures and the development of quantitative detection tools.

KEY WORDS: herpesvirus, oyster, *Crassostrea gigas*, vertical transmission, polymerase chain reaction, viral detection

INTRODUCTION

Since 1972, several herpes-like virus infections have been reported among different bivalve species around the world. Viral detection was often associated with high mortality rates in the spat and larvae of farmed bivalves, including Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) (Hine et al., 1992; Nicolas et al., 1992; Renault et al., 1994 a y b), European flat oyster (*Ostrea edulis*) (Comps and Cochennec, 1993; Renault et al., 2000a) and *Tiostrea chilensis* (Hine et al., 1998). Herpes-like viruses have also been observed in clams (Renault 1998; Renault and Arzul, 2001; Renault et al., 2001a y b) and scallops (Arzul et al., 2001b; Arzul et al., 2002) larvae. As for adult bivalves, herpes-like viral particles have been reported in eastern oysters (*Crassostrea virginica*) (Farley et al., 1972) and in flat oysters (*Ostrea angasi*) (Hine and Thorne, 1997). Characterization of the genome and nucleocapsid structures of the virus infecting *C. gigas* led to it to being included in the *Herpesviridae* family as an unassigned member and named Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) or Pacific oyster herpesvirus (Minson et al., 2000; Arzul et al., 2002; Davison, 2002). The association of OsHV-1 with larval and spat mortalities among economically relevant shellfish species lead to the development of specific and sensitive diagnostic methods, including PCR, *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (Le Deuff 1995; Renault and Lipart, 1998; Renault et al., 2000b, Arzul et al 2001; Lipart and Renault, 2002). Screening of larvae from parental oysters from different French locations showed that parental origin exerted an influence on the occurrence of herpesviral infections, suggesting possible vertical transmission of the virus (Le Deuff et al., 1996). Furthermore, the persistence of OsHV-1 in asymptomatic adults has been demonstrated by detection of viral DNA and proteins in several tissues, including gonad connective tissues of male and female oysters (Arzul et al., 2002). It was suggested that infected fibroblast-like cells could be released from mature gonads during spawning, constituting an early source of virus contamination for oyster embryos (Arzul et al., 2002).

The aim of the present study was to explore further the hypothesis of vertical transmission of OsHV-1 in *C. gigas* through the screening of two successive generations of hatchery-reared larvae and their respective parents. Viral detection was performed by PCR, which has been described as a technique of choice for detecting OsHV-1 in larvae and adults (Renault et al., 2000b; Arzul et al., 2002). The PCR procedure used was previously found to be specific, since the OsHV-1 primers failed to amplify DNA from human, fish and frog herpesviruses as well as DNA from oysters (Renault et al., 2000b., Arzul et al., 2002). Nevertheless, this technique still had to be tested with larvae at very early stages of development. In addition, a novel protocol employed for the extraction of DNA from fixed adult animals made PCR amplification of large viral fragments possible.

MATERIAL AND METHODS

Oyster samples: origin and collection

In 2001, IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea) initiated a multidisciplinary study called MOREST (2001-2005), aimed at investigating summer mortality events in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Consequently, different hypotheses related to these phenomena are being tested in several research laboratories. As part of this program, 72 bi-parental families were produced in 2001 in the IFREMER laboratory at La Tremblade (Charente Maritime, France) (Fig. 1). Following a nested design (Ernande et al., 2003), three sets of crosses between 6 male oysters and 24 female oysters (G_0 parents) were performed, resulting in 72 bi-parental families named F_{1-1} through F_{18-72} (G_1 larvae). Each sire (X) was mated with four different dams (Y_1 to Y_4), producing one half-sib family and four full-sib families (F_{XY1} to F_{XY4}). After stripping, the ninety G_0 parental oysters were fixed in Davidson's fixative and stored at 4°C for further analysis.

G_1 larvae were reared from day 0 to day 16 in the IFREMER hatchery at La Tremblade under common conditions. Each family was placed in an isolated stand-alone cylindro-conical tank (30L) supplied with filtered (10 μm and 1 μm) seawater (25°C) renewed three times each week. Larvae were fed an adequate cocktail of micro-algae (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros pumilum*, *Pavlova lutheri* and *Tetraselmis suecica*) and their densities were readjusted at day 2 (10 larvae ml^{-1}) and day 7 (5 larvae ml^{-1}). On day 16, pediveliger larvae were transferred to setting tanks holding 150 μm trays with crushed oyster shell prior to nursing and rearing until juvenile stage. Twelve families were finally selected according to zootechnical criteria and maintained until 2002 for new crosses.

In 2002, oysters from the 12 above-mentioned families were used for two series of crosses resulting in 48 families of G_2 larvae (Fig. 1). Half of the families consisted of outbred larvae and the other half of inbred larvae (Figs. 2 and 3). Concerning the latter, half of the batches corresponded with inbred animals, issued from the crossing of full siblings. The other half resulted from the crossing of half-siblings (i.e. animals sharing a common grandfather but having different grandmothers). Each cross involved a different number of oysters to ensure an optimal ovocyte/spermatozoid ratio (1/200). Outbred families comprised larvae issued half from male oysters (family A) crossed with female oysters (family B) and half from female oysters (family A) crossed with male oysters (family B). The mean number of G_1 parental oysters employed to produce an outbred family was 107 (52 males and 55 females). In contrast, inbred larvae were produced from male oysters from a single family (family A) crossed with female oysters from another family (family A or A') (Fig. 1). Only 57 G_1 parental oysters (27 males and 30 females) were involved in the production of each inbred family. At the end of the crosses, 12 batches of 30 stripped G_1 parental oysters were separately fixed in Davidson's fixative and stored at 4°C.

During the hatchery-rearing periods in 2001 and 2002, larval samples were collected at days 2 and/or day 7 and/or day 14. Sample collection was carried out only in the batches where enough larvae had been obtained. Therefore, batches affected either by low fertilization/ development rates or by high mortality rates were not represented. All the collected samples were immediately stored at -80°C . Some of them could not be analyzed because less than 50 mg of biological material were available.

The crossing scheme employed was not initially designed for investigation of vertical transmission of OsHV-1. However, the experimental device provided us with two successive generations of genetically homogenous larval families of known origins.

Parameters recorded during the larval stage

The hatching rate was determined as the ratio between the number of D larvae present at day 2 post-fertilization and the number of oocytes involved in each cross. Every 48 or 72 hours, larvae were collected by sieving. Densities were estimated by counting larvae in three samples per batch. In each batch, larval survival corresponds to the ratio between the number of larvae at days 16 and 2. Mean mortality rates were defined as the ratio between the number of families of a particular type that died during the rearing period and the total number of families of the same type produced.

DNA extraction

Frozen material

Fifty milligrams of frozen larvae were weighed in a 1.5 ml microfuge tube and ground in 50 μl of double distilled water with a single-use tissue homogenizer (Renault et al., 2000b). Ground larval samples were vortexed and denatured in a boiling water bath for 10 min, followed by quick chilling in ice. Samples were mixed again and centrifuged at 6000 g for 5 min. Supernatants were recovered, immediately diluted 10-fold in double distilled water and frozen at -20°C .

Fixed material

Animals had been fixed in Davidson's fixative and stored at 4°C . Each animal was cut by hand transversally into sections less than 1 mm thick (400-450 mg) using a microtome blade. Each section was put into a UV-decontaminated 2 ml microfuge tube. One ml of 70% ethanol was added prior to vortexing (30 seconds). Tubes were then agitated horizontally (30 min). After centrifugation (9500 g, 4°C , 15 min) the supernatant was discarded and the procedure was repeated twice, once with 95% ethanol and once with absolute ethanol. Pellets were then dried in an incubator at 55°C for 1 hour prior to overnight digestion with $200\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ proteinase K in 500 μl of 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5% Tween 20 buffer at the same temperature. Samples underwent a brief centrifugation (6000 g, 1 min) before being denatured at 95°C for 10 min in a hot water bath and centrifuged (9500 g, 15 min). Supernatants were recovered in UV-treated 1.5 ml microfuge tubes and immediately stored at -20°C .

PCR analysis

Larval samples were screened by nested PCR using C_5 (5' ccgtgacttctatgggtatgtcag 3') / C_{13} (5' cctcgaggtagcttttgtcaag 3') as external primers and C_2 (5' ctctttaccatgaagataccacc 3') / C_4 (5' gcagttgtggataactcgagattg 3') as internal primers (expected products of 800 bp and 353 bp, respectively) (Arzul et al., 2001). Parental oysters (G_0 and G_1) were analyzed by one-round PCR using the primer pair C_5/C_{13} . Parental oysters from the first generation (G_0) were also analyzed with primer pair C_{10} (5' atcaccggcagacgtagg 3') / C_{11} (5' gagggaaatttgcgagagag 3') (expected product of 196 bp).

The 50 μ L PCR reactions were performed using 2.5 U of Goldstar Taq DNA Polymerase (Eurogentec, Belgium), 0.05 mM of each dNTP, 100 ng of each primer, 2.5 mM $MgCl_2$ and 1 μ L of extracted DNA. All reactions were carried out in a Crocodile III thermal cycler (Appligene Oncor, France). Cycling conditions were similar for all primer pairs: after heating the samples for 2 min at 94°C, 35 cycles were carried out followed by a final elongation step for 5 min at 72°C. Each of the 35 cycles consisted of a DNA melting step at 94°C for 1 min, a primer annealing step for 1 min at 50°C and a primer elongation step at 72°C for 1 min. Eight μ l of each PCR product underwent electrophoresis on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 μ g ml^{-1}). The size of the DNA products was determined relative to those of molecular mass markers. Reference OshV-1 DNA purified from infected *C. gigas* larvae (Le Deuff and Renault, 1999) constituted the positive control. The negative control was deionized water. Negative controls were included at every eighth sample during each PCR experiment. The presence of potential PCR inhibitors was investigated using an internal standard DNA molecule (100 fg) previously generated by PCR (Arzul et al., 2002). All PCR analyses were performed as blind tests.

RE analysis of PCR products

Without further purification, all PCR products of the expected size (including PCR positive controls) underwent restriction enzyme analysis with two different restriction endonucleases. Enzyme selection was based on analysis of the sequences of each of the expected PCR products (Fig. 1). The restriction sites of only one of the enzymes was present in each product. For one-round and nested PCR products, the cutting enzyme was *Hinf*I and the non-cutting enzyme was *Eco*RI. Each 20 μ l digestion reaction contained 2 μ l of the appropriate 10X buffer, 0.2 μ l of 10 mg ml^{-1} acetylated BSA solution, 0.5 μ l of the restriction enzyme (10U ml^{-1}) (Promega Corporation) and 10 μ l of the PCR product to be analyzed. Reactions were incubated for 2 h at 37°C. Digestion products were separated by electrophoresis in ethidium bromide-stained (0.5 mg ml^{-1}) 2% agarose gels and visualized as described before. The size of the digestion products was determined relative to those of a 100 bp molecular mass marker ladder (Promega).

Statistical analysis

Hatching rate and larval survival were arcsine $\sqrt{}$ transformed prior to analysis. The infectious status of the G₀ parental oysters (males, females and both parents) on the hatching rate and the larval survival rate of the 72 G₁ families produced in 2001 were tested by ANOVA, using the GLM procedure in the SAS[®] software package (SAS Institute Inc., 1989).

RESULTS

Samples (oysters or larval batches) that gave positive/negative results by PCR were referred to as infected/non-infected organisms. All the negative control reactions gave negative results whereas positive control reactions as well as reactions involving the internal standard gave positive results (results not shown). Restriction enzyme analysis of all the PCR products of expected size resulted in the expected restriction patterns (results not shown).

G₀ parental oysters and their progeny (G₁ larvae)

The global infection rate among the 90 G₀ parental oysters appeared to be 42% with primer pair C₁₀/C₁₁. Male and female oysters showed different infection rates of 33% and 44%, respectively.

A total of 92 samples of G₁ larvae produced in 2001 was screened by nested PCR. Some families were sampled at two or three different dates. Others were missing either because they had died during the nursery stage or because the amount of material was not sufficient to be sampled or analyzed. Therefore, 52 different G₁ families out of the 72 produced were actually analyzed and 23.5% gave positive results by PCR (Table I). Forty-five different families were sampled at day 2, showing 13% of viral prevalence, and 18 families were sampled at day 7 showing an infection rate of 33% (Table I).

G₁ families were classified, taking into account the infective status of one of the G₀ parental oysters (Fig. 4). Families issued from a positive male show a lower infection rate than families issued from an uninfected male (14% against 28%). An opposite pattern of the viral prevalence appears in families issued from positive/negative females (infection rates of 38% and 11% respectively). The highest mortality rate was reported for the families issued from positive males (46%) and the lowest for families issued from a negative male or a positive female (17% and 19%, respectively) (Fig. 4).

Among the 72 crosses performed, 36% involved two negative parents, 14% two positive parents, 19% a positive male and a negative female and 31% a negative male and a positive female (Fig. 5). These proportions were similar among the 52 crosses for which the progeny were screened for OsHV-1 (Fig. 5). The two highest infection rates concerned larvae issued from crosses between two positive parents

(33%) or between a negative male and a positive female (39%) (Fig. 6). In contrast, no crossing of a positive male with a negative female resulted in positive larvae. As for crosses involving two negative parents, the resulting progeny showed an intermediate infection rate of 16% (Fig. 5).

G₁ parental oysters

The global measured infection rate of the twelve families of *G₁* parental oysters was low (9.2%) (Table II). This rate varied greatly among families, from 0% (*F*₁₅₋₅₇, *F*₇₋₂₆, *F*₁₄₋₅₄, *F*₄₋₁₆) to 43% (*F*₇₋₂₅).

G₂ larvae

As for the second generation of larvae produced in 2002 (*G₂*), 37 samples of inbred larvae and 44 samples of outbred larvae were collected, representing 24 and 23 different families, respectively. Viral prevalence among inbred families appeared to be 16.7%, lower than the 56.5% rate observed among outbred families. Results from this second generation (*G₂*) also showed a greater viral infection rate among samples collected at day 7 (87%) than at day 2 (50%).

Zootechnical parameters and infective status

The mean hatching and survival rates among the 72 *G₁* families produced in 2001 were 41% and 31%, respectively, but these parameters varied greatly among families (Table I). Among the 15 crosses characterized by hatching rates below 5%, 13 resulted in null larval survival rates. The values of both parameters were analyzed taking into account the infective status of one or both *G₀* parental oysters. Crosses involving non-infected male oysters resulted in a mean hatching rate of 46% and a larval survival rate of 35%, statistically higher than hatching rate (32%) (*F* = 4.83; *p* = 0.0313) and larval survival (25%) (*F* = 5.95; *p* = 0.0172) associated with infected males (Fig. 4). The mean values of these parameters associated with the infective status of female parental oysters (Fig. 4) did not show significant differences (*F* = 0.09; *p* = 0.41 and *F* = 2.40; *p* = 0.13 for hatching rate and larval survival respectively). As for the families issued from the four different types of *G₀* cross, their mean hatching rates ranged from 25% to 46% (Fig. 6), but no significant difference was observed between the four types of cross (*F* = 2.25; *p* = 0.09). As for larval survival rates, a significant difference was found between the four types of cross (*F* = 3.96; *p* = 0.0116): the crosses involving an infected male and a non-infected female resulted in a larval survival rate (17%) consistently lower than the others (38% to 46%) (Fig. 6).

DISCUSSION

The hypothesis that OsHV-1 is transmitted vertically was strengthened through results obtained in this study. Families produced during a single series of crosses show contrasting infection status (Table I). This result suggests the lack of a common environmental source of viral contamination, such as the rearing water or food supply. The source could be the parents themselves, particularly as detection of OsHV-1 as early as two days post-fecundation indicates that infection takes place during this process or shortly thereafter (Table I). The higher infection rate observed among samples collected at day 7 could be the result of an effective horizontal transmission (Table I). However, it is equally possible that viral infection, which is widespread as early as day two, becomes more easily detectable at day 7 because it has had a longer time to develop. In this respect, the global infection rate of G₁ larvae (23.5%) may constitute an underestimation, since a number of families could only be sampled at day 2, either because they died afterwards or because larvae were too scarce to be collected (Tab. III). The contrasting infection rates observed between G₂ inbred and outbred larvae (16.7% versus 56.5%) that stemmed from the same G₁ parents (infection rate of 66.7%) indicates that the greater number and genetic diversity of the parental oysters involved in outbred larvae production were favorable to viral infection of the progeny (Fig. 2).

The infective status of parental oysters seems to be related to the infective status of their progeny. Indeed, each of the four possible types of cross performed in 2001 resulted in contrasting larval infection rates ranging from 0% to 39% (G₁ larvae) (Fig. 6). Families of G₁ larvae issued from infected G₀ females were more frequently infected than families issued from non-infected females (infection rates of 38% and 11%, respectively). Infected males gave rise to a lower proportion of infected families (14%) than non-infected males (28%). However, the families issued from infected males were affected by the highest mortality rate at larval stages (46%), greatly reducing the number of samples. In the end, only 54% of the crosses involving infected G₀ males were analyzed, against 80% of the crosses involving G₀ non-infected males. Results concerning the former may be considered all the more underestimated as a number of batches affected by mortality may have been infected by OsHV-1. This assumption seems strengthened by the fact that crosses involving an infected male resulted in hatching rates and larval survival rates statistically inferior to those obtained with non-infected males. As for the types of cross, only those involving an infected male and a negative female resulted in a larval survival rate statistically lower than the rates related to other types of cross. It is conceivable that infected females are able to transmit to their offspring some kind of protection or resistance against OsHV-1 infection. Such a phenomenon could also account for the lower mortality rates (despite higher infection rates) observed among larvae issued from crosses involving infected females and uninfected males as compared with crosses between uninfected females and infected males. Among aquatic organisms, transmissibility of viral resistance has only been established in fish (Dorson, 1983; Hanada and Ushiyama, 1985; Okamoto et al., 1987). However, increasing evidence of immunological priming in invertebrates has been gathered recently (Moret and Siva-Jothy, 2003), and it appears that both general and specific immunity can be transmitted across generations (Huang and Song, 1999; Moret

and Schmid-Hempel, 2001; Little, 2003), thus endowing the offspring of pathogen-exposed parents with improved immunity (Little and Kraaijeveld, 2004).

It appeared impossible to predict the infectious status of the larvae generated by each type of cross in spite of the consistency between the data obtained and the hypothesis of vertical transmission. Failure to detect OsHV-1 among parents does not systematically correspond to generation of uninfected larvae, whereas infected parents do not always produce infected larvae. Similar observations were made concerning infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) and barfin flounder necrosis virus infections (Dorson et al., 1985; Bootland et al., 1991; Watanabe et al., 2000). Several factors are likely to reduce predictability. It is likely that viral prevalence was somehow underestimated not only among larvae, as mentioned earlier, but also among parental oysters. The infection rate of adult oysters of both generations (G_0 : 42% and G_1 : 9.2%) appeared indeed to be lower than the 76% infection rate reported previously among *C. gigas* adults (Arzul et al., 2002). Such a discrepancy is likely to find its source both in the number of samples analyzed (30 animals in the cited work against 450 in our study) and in the processing conditions. In the previous work, brief storage at -20°C shortly after collection and shortly before analysis was more favorable to conservation and detection of viral DNA than our 12 or 24 month storage in fixative at 4°C . The quality of DNA isolated from fixed tissues depends both on the fixative employed and the length of the storage period (Hamazaki et al., 1993; O'Leary et al., 1994; Renault et al., 2000c). Davidson's fixative was used in the present study because it is the fixative of choice for marine mollusks. Material for retrospective diagnosis of OsHV-1 is consequently likely to correspond most frequently to Davidson's fixed animals. It has been shown that formaldehyde fixation of tissues is accompanied by DNA fragmentation and DNA-histone cross-linking, which generate difficulties for the amplification of large target regions (Pääbo 1990; Hamazaki et al., 1993; Vachot and Monnerot, 1996). The procedure we applied for DNA extraction gave results that are consistent with these observations in the case of G_0 parental oysters stored for 24 months. As expected, the procedure yielded material suitable for PCR amplification of small fragments less than 200 bp. However, although viral fragments as large as 800 bp could be amplified from G_1 parental oysters for which the storage period was shorter (12 months), the probability of detecting OsHV-1 in our fixed samples may be lower than in freshly frozen samples. Another factor that may have some influence on viral prevalence among adults is their geographical origin, although its impact remains unclear. Contradictory data suggest that the percentage of infected adults can be expected to differ in accordance with their geographical origin (Renault et al., 1995; Le Deuff et al., 1996) and report comparable infection rates above 70% in batches of adult oysters from different locations (Arzul 2001).

Detection of OsHV-1 in a parental oyster does not systematically correspond to a successful viral transmission. Infected animals may not all suffer from infectious foci in the gonad. Detection may also be achieved during viral latency (i.e. when infected animals are not contagious) (Sissons et al., 2002). Indeed, the exact mechanism of persistence of OsHV-1 (whether it is real latency or a low level of replication) has not been fully elucidated, but recent results suggest that it may be accompanied by protein production (Arzul et al., 2002). In any case, individuals are likely to vary in their sensitivity to

reactivation mechanisms such as physiological stress. A possible relationship between susceptibility to stress and diseases has been pointed out in fish (Gratzek and Reinert, 1984; Chevassus and Dorson, 1990; Steinhagen et al., 1998), and both factors are liable to vary from one oyster or family of oysters to the other, as well as between male and female oysters. Such variability could account for the important inter-individual variations of the intensity of OsHV-1 infection (Arzul et al., 2002). Stress has been shown to inhibit a number of immune functions in molluscs (Malham et al., 2003), providing certain pathogens with a transient opportunity to develop (Lacoste et al., 2002). Particularly, stressful conditions have proved to provoke the reactivation of OsHV-1 in infected asymptomatic oyster seed (Renault et al., 1997). They are suspected to play an identical part in infected asymptomatic parental oysters during spawning (Arzul et al 2002). Similar observations were made in fish (Drolet et al., 1995; Péducasse et al., 1999) and shrimp (Lo et al., 1997), to such an extent that it has been advised to perform viral screening in brooders after spawning has taken place, in order to increase its efficiency (Lo et al., 1997; Hsu et al., 1999; Peng et al., 2001). It is possible that sex-dependent variations in the efficiency of viral release exist caused by differences in infection intensity and/or localization, as has been observed in other aquatic organisms (Kitamura et al., 1981; Nusbaum and Grizzle, 1987; Lo et al., 1997) or in the physiological impact of the stress of spawning. The impact of this parameter appears all the more difficult to determine as oysters are protandrous sequential hermaphrodites that may be subject to sex reversal (Fretter and Graham, 1964).

Success of parental transmission is also likely to vary according to the characteristics of newly formed larvae. Susceptible hosts are not exposed to the same risks of infection nor do they experience the same probability of being infected as the result of particular modes of transmission (Smith et al., 2000). Oyster larvae could thus be all equally susceptible to initial infection yet differ in their capacity to limit the infection, as has been observed in fish (Wiegertjes et al., 1990). Variations of this type could account for the contrasting outcomes of infection of larval batches by OsHV-1, as has been suggested in the case of WSSV infections of *Penaeus monodon*. (Tsai et al., 1999; Peng et al., 2001; Withyachumnarnkul et al., 2001).

Demonstration of vertical transmission of aquatic viruses has highlights a hazard for other marine organisms. Indeed, this may become a statistical problem when facilities are limited to a restricted number of crosses (Dobos and Torchy, 1985). Thus, under laboratory conditions, vertical transmission has a low probability of being observed and appears to be unpredictable (Bootland et al., 1991). Equivocal results may arise from the existence of other sources of viral contamination, such as offspring-released particles (Lo et al., 1997; Tsai et al., 1999), an inadequate choice of organs to be analyzed (Bootland et al., 1991) or lack of sensitivity of the detection techniques (Melville and Griffiths, 1999). The latter is particularly relevant in the case of viruses able to establish latent or low productivity infections : small amounts of virus in spawners may escape detection (Nishizawa et al., 1996). Besides, as was mentioned earlier, difficulties in interpretation arise since a negative assay does not guarantee that an organism is not infected with the virus, whereas a positive assay indicates

only that the organisms are infected at some point, not that a productive infection is occurring or that transmission will take place (Watanabe et al., 2000).

In conclusion, our results strengthen the hypothesis that vertical transmission of OsHV-1 occurs, yet they do not allow us to be conclusive or to predict the issue from each type of cross. Although demonstration of this phenomenon presents specific difficulties, it has been achieved in a number of invertebrates (Lo et al., 1997; Tsai et al., 1999), and the selection of uninfected brooders has proved to reduce markedly the chances of viral outbreaks in the progeny (Satoh et al., 1999). More conclusive data concerning OsHV-1 could be obtained by application of a crossing scheme comprising equal proportions of each type of cross. However, the probability of detecting viral infections in parental oysters is maximized by fixing and analyzing animals after spawning. Therefore, batch selection could only be performed after fecundation, which renders this kind of experiment technically and logistically more complicated. The application of quantitative PCR would enable discrimination between productive and non-productive infections. Finally, the exploration of the genetic origins of resistance/susceptibility to OsHV-1 could lead to the selection of virus-resistant strains. From another viewpoint, the apparent relationship between the infective status of the parental oysters may be of interest for hatchery production of larvae. Screening for OsHV-1 prior to fecundation may facilitate avoidance of infected males, which generate poor performance in terms of hatching success and progeny survival in larval stage. An a-posteriori screening may help to decide whether to keep or discard certain batches of larvae at early stages of the production process.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to P. Gouletquer for allowing the development of this work at the laboratory of Genetics and Pathology of IFREMER in La Tremblade (France) and to J-F. Samain who coordinates the MOREST programme. This research was partly supported by a grant from the POITOU-CHARENTES region and by a grant from the CONACYT (National Council for Science and Technology of Mexico). The Direction of Postgraduate Studies of the CIBNOR (Northwest Biological Research Center, La Paz, Mexico) is acknowledged for authorising and supporting the development of this work as part of a PhD project in the LGP of IFREMER. We thank A. Davison for a critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Arzul, I., 2001. Herpèsvirus infectant les bivalves marins: détection, génome et transmission. PhD dissertation, Université de Montpellier II.
- Arzul, I., Nicolas, J.L., Davison, A.J. and Renault, T., 2001c. French scallops: a new host for ostreid herpesvirus 1. *Virology*, 290(2): 342-349.
- Arzul, I., Renault, T. and Lipart, C., 2001a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves : demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Org.*, 46:1-6.
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C. and Davison, A.J., 2001b. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.*, 82:865-870.
- Arzul, I., Renault, T., Thebault, A. and Gerard, A., 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.*, 84(1-2):151-160.
- Bootland, L.M., Dobos, P. and Stevenson, R.M.W., 1991. The IPNV carrier state and demonstration of vertical transmission in experimentally infected brook trout. *Dis. Aquat. Org.*, 10:13-21.
- Chevassus, B. and Dorson, M., 1990. Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture*, 85:83-107.
- Comps, M. and Cochenec, N., 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 62:201-203.
- Dahl, H., Fjaertoft, G., Norsted, T., Wang, F.Z., Mousavi-Jazi, M. and Linde, A., 1999. Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J. Infect. Dis.*, 180(6):2035-2038.
- Davison, A.J., 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.*, 86(1-2):69-88.
- Dorson, M., 1983. Infectious pancreatic necrosis of salmonids: overview of current problems. In: Anderson, D., Dorson, M., Dubourget, P. (eds) *Antigens of Fish Pathogens*. Collection Fondation Marcel Mérieux, Lyon, p 7-31.
- Dorson, M. and Torchy, C., 1985. Experimental transmission of infectious pancreatic necrosis virus via the sexual products. In: Ellis AE (ed) *Fish and Shellfish Pathology*. Academic Press, London, p 251-260.
- Drolet, B.S., Chiou, P.P., Heidel J. and Leong J.A.C., 1995. Detection of truncated virus particles in a persistent RNA virus infection in-vivo. *J. Virol.*, 69(4):2140-2147.
- Ernande, B., Clobert J., McCombie, H. and Boudry, P., 2003. Genetic polymorphism and trade-offs in the early life-history strategy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795): a quantitative genetic study. *J. Evol. Biol.*, 16:399-414.
- Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic J.R.G. and Foster, W.S., 1972. Oyster herpes-type virus. *Science*, 178:759-760.
- Fretter, V. and Graham, A., 1964. Reproduction-Hermaphroditism of the bivalvia. In Wilbur KM and Yonge, C.M. (eds) *Physiology of Mollusca*. Academic Press, London, p 129-131.
- Gratzek J.B. and Reinert, R., 1984. Physiological responses of experimental fish to stressful conditions. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 65: 187-193.

- Hanada, H. and Ushiyama, M., 1985. Heritability of tolerance for infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (in Japanese). *Bull. Shizuoka Prefect. Fish Exp. Stn.*, 20:51-57.
- Hamazaki, S., Koshihara, M., Habuchi, T., Takahashi, R. and Sugiyama, T., 1993. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. *Pathol. Res. Pract.*, 189:553-557.
- Hine PM. and Thorne ET., 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871): an ultrastructural study. *Dis. Aquat. Org.*, 29:189-196.
- Hine PM., Wesney, B. and Hay BE., 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.*, 12(2):135-142.
- Hsu, H.C., Lo, C.F., Lin, S.C., Liu, K.F., Peng, S.E., Chang, Y.S., Chen, L.L., Liu, W.J. and Kou, G.H., 1999. Studies on effective PCR screening strategies for white spot syndrome virus (WSSV) detection in *Penaeus monodon* brooders. *Dis. Aquat. Org.*, 39:13-19.
- Huang, C.C. and Song, Y.L., 1999. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Comp. Immunol.*, 23:545-552.
- Keith, I.R., Paterson, W.D., Airdrie, D. and Boston, L.D., 1992. Defence mechanisms of the American lobster (*Homarus americanus*): Vaccination provided protection against gaffkemia infections in laboratory and field trials. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:109-119.
- Kimura, T., Yoshimizu, M., Tanaka, M. and Sannohe, H., 1981. Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou-I*. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, 15:143-147.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Gélébart, F., Cueff, A. and Poulet, S.A., 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26:1-9.
- Le Deuff, R.M., 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. PhD dissertation, Université de Bordeaux II.
- Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T. and Cochennec, N., 1994. Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 14(2):69-72.
- Le Deuff, R.M., Renault, T. and 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.
- Le Deuff, R.M. and 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.
- Little, T.J., 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.*, 13(6):489-492.
- Little, T.J. and Kraaijeveld, A.R., 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.*, 19(2):58-60.
- Lo, C.M., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu K.F., Chiu, Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H. and Kou, G.H., 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, 30:53-72.

- Malham, S.K., Lacoste, A., Gelebart, F., Cueff, A. and Poulet, S.A., 2003. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. J. Exp. Zoolog. Part A Comp. Exp. Biol., 295(2):136-144.
- Minson, A.C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R.C., Fleckstein, B., McGeoch, D.J., Pellet, P.E., Roizman, B. and Studdert, D.M.J., 2000. Family *Herpesviridae*. In: Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, USA, p 203-225.
- Moret, Y. and Schmid-Hempel, P., 2001. Immune defense in bumble-bee offspring. Nature, 414:506.
- Moret, Y. and Siva-Jothy, M.T., 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 270(1532):2475-2480.
- Nicolas, J.L., Comps, M. and Cochenec, N., 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 12(1):11-13.
- Nishizawa, T., Muroga, K. and Arimoto, M., 1996. Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack *Pseudocaranx dentex* selected as spawners. J. Aquat. Anim. Health, 8:332-334.
- Nusbaum K.E. and Grizzle, J.M., 1987. Adherence of Channel catfish virus to sperm and leukocytes. Aquaculture, 65:1-5.
- Okamoto, N., Tayama, T., Kawanobe, M., Fujiki, N., Yasuda Y. and Sano, T., 1993. Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. Aquaculture, 117:71-76.
- O'Leary, J.J., Browne, G., Landers, R.J., Crowley, M., Bailey Healey, I., Street, J.T., Pollock, A.M., Murphy, J., Johnson, M.I., Lewis, F.A., Mohamdee, O., Cullinane, C. and Doyle, T., 1994. The importance of fixation procedures on DNA template and its suitability for solution-phase polymerase chain reaction and PCR *in-situ* hybridization. Histochem. J., 26:337-346.
- Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S., Nakamura, K., Coimbra, M.R.M., and Akutsu Tand Okamoto, N., 2001. Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Mol. Genet. Genomics, 265:23-31.
- Péducasse, S., Castric, J., Thiéry, R., Jeffroy, J., Le Ven, A. and Baudin-Laurencin, F., 1999. Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea-bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. Dis. Aquat. Org., 36:11-20.
- Peng, S.E., Lo, C.F., Lin SC., Chen LL., Chang, Y.S., Liu K.F., Su, M.S. and Kou, G.H., 2001. Performance of WSSV-infected and WSSV-negative *Penaeus monodon* post-larvae in culture ponds. Dis. Aquat. Org., 46:165-172.
- Renault, T., 1998. Infections herpétiques chez les invertébrés: détection de virus de type herpès chez les mollusques bivalves marins. Virol., 2(5):401-403.
- Renault, T., Cochenec, N., Le Deuff, R.M. and Chollet, B., 1994b. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., 14(2):64-66.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N. and Maffart, P., 1994a. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France. Comparative study. Revue Médicale Vétérinaire, 145(10) :735-742.

- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Chollet, B. and 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(5-6):539-543.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C., Chollet, B. and Haffner, P., 1997. Programme herpèsvirus: synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade-Mars 1996/Février 1997. Note IFREMER.
- Renault, T. and Lipart, C., 1998. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. In: *Aquaculture and Water: fish culture, shellfish culture and water usage*. European Aquaculture Society, Special Publication No.26. Compiled by Grizel, H., Kestemont, P. Oostende, Belgium, p 235-236.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochenec, N. and Gérard, A., 2000b. Concomitant herpes-like virus infections among hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Org.*, 42:173-183.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C. and Delsert, C. 2000a. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Meth.*, 88: 41-50.
- Renault, T., Stokes, N.A., Chollet, B., Cochenec, N., Berthe, F., Gerard, A. and Burreson, E.M., 2000c. Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Org.*, 42(3):207-14.
- Renault, T. and Arzul, I., 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish Dis.*, 24:161-167.
- Rousseau, T., Douvier, S., Reynaud, I., Laurent, N., Bour, J.B., Durand, C., Spagnolo, G. and Sagot, P., 2000. Severe fetal cytomegalic inclusion disease after documented maternal reactivation of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Prenat. Diagn.*, 20(4):333-336.
- SAS Institute Inc (1989) SAS/STAT[®] User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 2, Cary, NC : SAS Institute Inc.
- Satoh, J., Mushiake, K., Mori, K., Arimoto, M., Imaizumi, K., Nishizawa, T. and Muroga K., 1999. Occurrence of PAV (penaeid acute viremia) in seed production of kuruma prawn. *Fish Pathol.*, 34:33-38.
- Sissons, J.G.P., Bain, M. and Wills, M.R., 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Inf.*, 44:73-77.
- Smith, G., Bebak, J. and McAllister, P.E., 2000. Experimental infectious pancreatic necrosis infections: propagative or point-source epidemic? *Prev. Vet. Med.*, 47:221-241.
- Steinhagen, D., Hespe, K., Ellmer, B. and Korting, W., 1998. *Goussia carpelli* (Protozoa: Coccidia) infection in stressed and immunosuppressed common carp *Cyprinus carpio*. *Dis. Aquat. Org.*, 34(3):199-204.
- Stewart, J.E. and Zwicker, B.M., 1974. Comparison of various vaccines for inducing resistance in the lobster *Homarus americanus* to the bacterial infection, gaffkemia. *J. Fish. Res. Board Can.*, 31:1887-1892.

- Tsai, M.F., Kou, G.H., Liu, H.C., Liu K.F., Chang, C.F., Peng, S.E., Hsu, H.C., Wang, C.H., and Lo, C.F., 1999. Long-term presence of white-spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, 38:107-114 .
- Vachot, A.M. and Monnerot, M., 1996. Extraction, amplification and sequencing of DNA from formaldehyde-fixed specimens. *Ancient Biomolecules*, 1:3-16.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T. and Muroga K., 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.*, 42:83-89.
- Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M., 2000. Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, 41:219-223.
- Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K. and Muiswinkel, W.B., 1990. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Dev. Comp. Immunol.*, 20(6):365-381.
- Withyachumnarnkul, B., Boonsaeng, V., Choomsoong, R., Flegel, T.W., Muangsin, S. and Nash, G.L., 2003. Seasonal variation in white spot syndrome virus-positive samples in broodstock and post-larvae of *Penaeus monodon* in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, 53:167-171.
- Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T. and Muroga K., 2002. A time-course study of the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 13:391-403.
- Yow, M.D., Williamson, D.W., Leeds, L.J., Thompson, P., Woodward, R.M., Walmus, B.F., Lester, J.W., Six, H.R. and Griffiths, P.D., 1988. Epidemiologic characteristics of cytomegalovirus infection in mothers and their infants. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 158(5):1189-1195.

Table I: Results of OsHV-1 screening among the 72 families produced in 2001 (G₁)

SET	FAMILY		HATCHING RATE	LARVAL SURVIVAL RATE (D2-D16)	INFECTIVE STATUS DAY 2	INFECTIVE STATUS DAY 7	INFECTIVE STATUS DAY 14
I	F1-1		0.85	0.42	-	+	NA
I	F1-2	†	0.82	0.51	-	-	NA
I	F1-3		0.38	0.54	-	-	NA
I	F1-4		0.55	0.36	-	NA	NA
I	F2-5		0.60	0.86	-	+	NA
I	F2-6		0.99	0.45	-	+	NA
I	F2-7		0.05	0.61	NA	NA	NA
I	F2-8		0.84	0.37	+	NA	NA
I	F3-9		0.16	0.30	NA	NA	NA
I	F3-10	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
I	F3-11	†	0.03	0.00	NA	-	NA
I	F3-12		0.31	0.23	-	NA	NA
I	F4-13	†	0.02	0.00	NA	NA	NA
I	F4-14	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
I	F4-15		0.06	0.52	NA	-	NA
I	F4-16		0.37	0.47	-	NA	NA
I	F5-17		0.13	0.16	NA	NA	NA
I	F5-18	†	0.02	0.00	NA	NA	NA
I	F5-19	†	1.00	0.05	-	-	NA
I	F5-20		0.71	0.25	-	+	NA
I	F6-21		0.40	0.36	-	NA	NA
I	F6-22	†	0.02	0.00	NA	NA	NA
I	F6-23	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
I	F6-24	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
II	F7-25		0.40	0.33	-	+	NA
II	F7-26		0.19	0.32	+	NA	NA
II	F7-27		0.35	0.45	-	-	NA
II	F7-28		0.67	0.32	-	NA	NA
II	F8-29		0.64	0.69	-	-	NA
II	F8-30	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
II	F8-31		0.06	0.43	NA	NA	NA
II	F8-32		0.21	0.38	-	NA	NA
II	F9-33		0.18	0.28	-	NA	NA
II	F9-34		0.35	0.53	-	NA	NA
II	F9-35		0.33	0.26	-	NA	NA
II	F9-36		0.99	0.46	-	NA	NA
II	F10-37		0.03	0.21	NA	-	NA
II	F10-38		0.30	0.12	NA	-	NA
II	F10-39		0.40	0.25	-	NA	NA
II	F10-40		0.18	0.44	-	NA	NA
II	F11-41		0.12	0.42	NA	NA	-
II	F11-42		0.13	0.36	NA	NA	NA
II	F11-43		0.18	0.33	-	NA	NA
II	F11-44	†	0.01	0.00	NA	NA	NA
II	F12-45		0.35	0.22	-	NA	NA
II	F12-46		0.08	0.39	NA	NA	NA
II	F12-47		0.02	0.15	NA	NA	NA
II	F12-48		0.15	0.22	NA	NA	NA
III	F13-49	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
III	F13-50		0.60	0.19	-	NA	NA
III	F13-51		0.80	0.27	-	NA	NA
III	F13-52		0.83	0.35	-	NA	NA
III	F14-53	†	0.00	0.00	NA	NA	NA
III	F14-54		0.74	0.44	-	NA	NA
III	F14-55		0.39	0.66	-	NA	NA
III	F14-56	†	0.01	0.00	NA	NA	NA
III	F15-57		0.18	0.33	NA	NA	NA
III	F15-58		0.84	0.82	-	NA	NA
III	F15-59		0.49	0.33	-	NA	NA
III	F15-60		1.00	0.71	-	-	NA
III	F16-61		0.89	0.21	-	NA	NA
III	F16-62		0.82	0.35	-	NA	NA
III	F16-63	†	0.34	0.07	+	NA	NA
III	F16-64	†	0.78	0.09	NA	NA	-
III	F17-65		0.80	0.69	-	+	NA
III	F17-66	†	0.88	0.00	-	NA	-
III	F17-67		0.63	0.50	+	NA	NA
III	F17-68		1.00	0.39	-	NA	NA
III	F18-69		0.81	0.54	-	-	NA
III	F18-70		0.59	0.58	+	-	NA
III	F18-71		0.74	0.51	+	NA	NA
III	F18-72		0.68	0.50	-	NA	NA
	MV / TN		0.410	0.313	45	18	3
	TOT POS				6	6	0

TOT POS: total number of families that gave a positive result by PCR. MV/TN: mean value/total number of analyzed samples. I: set performed on 5th February. II: on 5th March. III: on 18th April. † : family which died during the larval stage (day 0 to day 23). +: positive result by one-round PCR and/or nested PCR. - negative result by both techniques. NA: not analyzed, corresponding to non-collected or non-analyzable samples

Table II : OsHV-1 detection among the twelve families of G₁ parental oysters

F₂₋₅: G₁ family issued from G₀ male 2 and G₀ female 5. Positive oysters: number of oysters that gave a positive result by one-round PCR. Infection rate: number of positive oysters/total number of analyzed oysters i.e. 30.

FAMILY	POSITIVE OYSTERS	INFECTION RATE (%)
F 2-5	4	13
F 2-8	1	3
F 9-35	1	3
F 9-36	4	13
F 15-57	0	0
F 15-58	4	13
F 7-25	13	43
F 7-26	0	0
F 14-54	0	0
F 14-55	3	10
F 4-16	0	0
F 4-15	3	10
POSITIVE	33	9.2

FIGURES

- **Fig. 1.** General crossing scheme. FEMS: female oysters.
- **Fig. 2.** Crosses performed for the production of G₂ inbred larvae. IL₂: inbred larvae, lot 2, issued from the crossing of male oysters from the F₂₋₅ family and female oysters from the F₂₋₈ family. F₂₋₅: G₁ family issued from G₀ male 2 and G₀ female 5. *IL*: larvae issued from the crossing of full siblings. *IL*: larvae issued from the crossing of half-siblings.
- **Fig. 3.** Crosses performed for the production of G₂ outbred larvae. DL₁ : outbred larvae, lot 1. DL₁ is an equal mixture of larvae issued from the separate crosses of F₂₋₅ male oysters and F₉₋₃₅ female oysters and of F₂₋₅ female oysters and F₉₋₃₅ male oysters. F₂₋₅: G₁ family issued from G₀ male 2 and G₀ female 5.
- **Fig. 4.** Infection rate, hatching rate, larval survival rate and mortality rate of the progeny (G₁ larvae) of G₀ parental oysters classified following their sex and infective status M/F: male/female parental oyster. M+/F+: male/female oyster that gave a positive result by PCR. M-/F-: male /female oyster that gave a negative result by PCR.
- **Fig. 5.** Relative proportions of the total number of G₁ families issued from each type of cross and of the 52 G₁ families screened for OsHV-1. M+/F+: male/female parental oyster that gave a positive result by one-round PCR with primer pair(s) C₅/C₁₃ and/or C₁₀/C₁₁. M-/F-: male/female parental oyster that gave a negative result by PCR with both primer pairs. 19%: percentage of the 72 G₁ families that was issued from the crossing of a positive male and a negative female. (15%): percentage of the 52 analyzed G₁ families that was issued from the crossing of a positive male and a negative female
- **Fig. 6.** M+/F+: male/female oyster that gave a positive result by PCR. M-/F- : male /female oyster that gave a negative result by PCR. M+ X F-: cross between a positive male oyster and a negative female

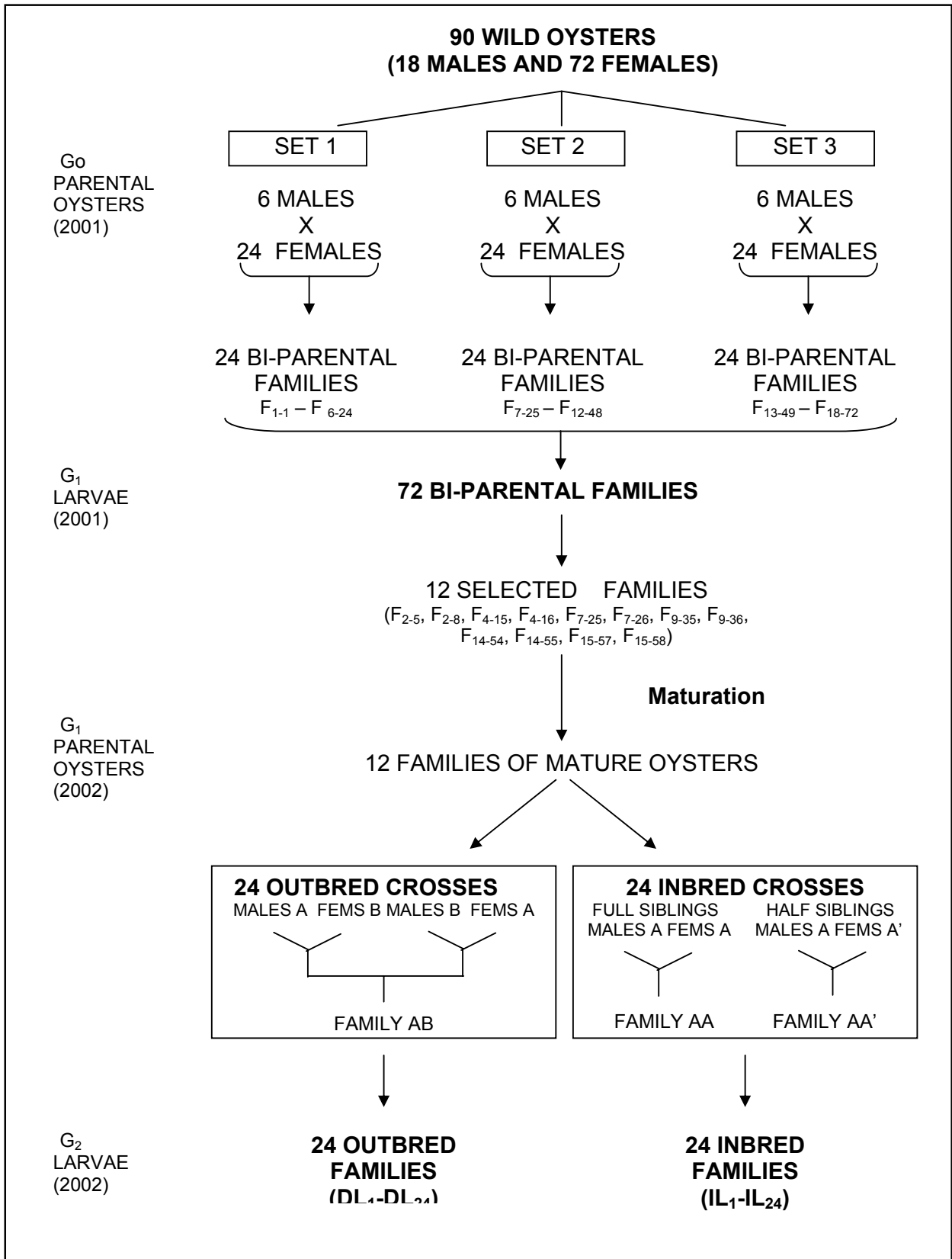


Fig. 1

♀	F ₂₋₅	F ₂₋₈	F ₉₋₃₅	F ₉₋₃₆	F ₁₅₋₅₇	F ₁₅₋₅₈	F ₄₋₁₅	F ₄₋₁₆	F ₇₋₂₅	F ₇₋₂₆	F ₁₄₋₅₄	F ₁₄₋₅₅
♂												
F ₂₋₅	<i>IL</i> ₁	<i>IL</i> ₂										
F ₂₋₈	<i>IL</i> ₃	<i>IL</i> ₄										
F ₉₋₃₅			<i>IL</i> ₅	<i>IL</i> ₆								
F ₉₋₃₆			<i>IL</i> ₇	<i>IL</i> ₈								
F ₁₅₋₅₇					<i>IL</i> ₉	<i>IL</i> ₁₀						
F ₁₅₋₅₈					<i>IL</i> ₁₁	<i>IL</i> ₁₂						
F ₄₋₁₅							<i>IL</i> ₁₃	<i>IL</i> ₁₄				
F ₄₋₁₆							<i>IL</i> ₁₅	<i>IL</i> ₁₆				
F ₇₋₂₅									<i>IL</i> ₁₇	<i>IL</i> ₁₈		
F ₇₋₂₆									<i>IL</i> ₁₉	<i>IL</i> ₂₀		
F ₁₄₋₅₄											<i>IL</i> ₂₁	<i>IL</i> ₂₂
F ₁₄₋₅₅											<i>IL</i> ₂₃	<i>IL</i> ₂₄

Fig. 2

	F ₉₋₃₅	F ₉₋₃₆	F ₁₅₋₅₇	F ₁₅₋₅₈	F ₇₋₂₅	F ₇₋₂₆	F ₁₄₋₅₄	F ₁₄₋₅₅
F ₂₋₅	DL ₁	DL ₂	DL ₅	DL ₆				
F ₂₋₈	DL ₃	DL ₄	DL ₇	DL ₈				
F ₉₋₃₅			DL ₉	DL ₁₀				
F ₉₋₃₆			DL ₁₁	DL ₁₂				
F ₄₋₁₅					DL ₁₃	DL ₁₄	DL ₁₇	DL ₁₈
F ₄₋₁₆					DL ₁₅	DL ₁₆	DL ₁₉	DL ₂₀
F ₇₋₂₅							DL ₂₁	DL ₂₂
F ₇₋₂₆							DL ₂₃	DL ₂₄

Fig. 3

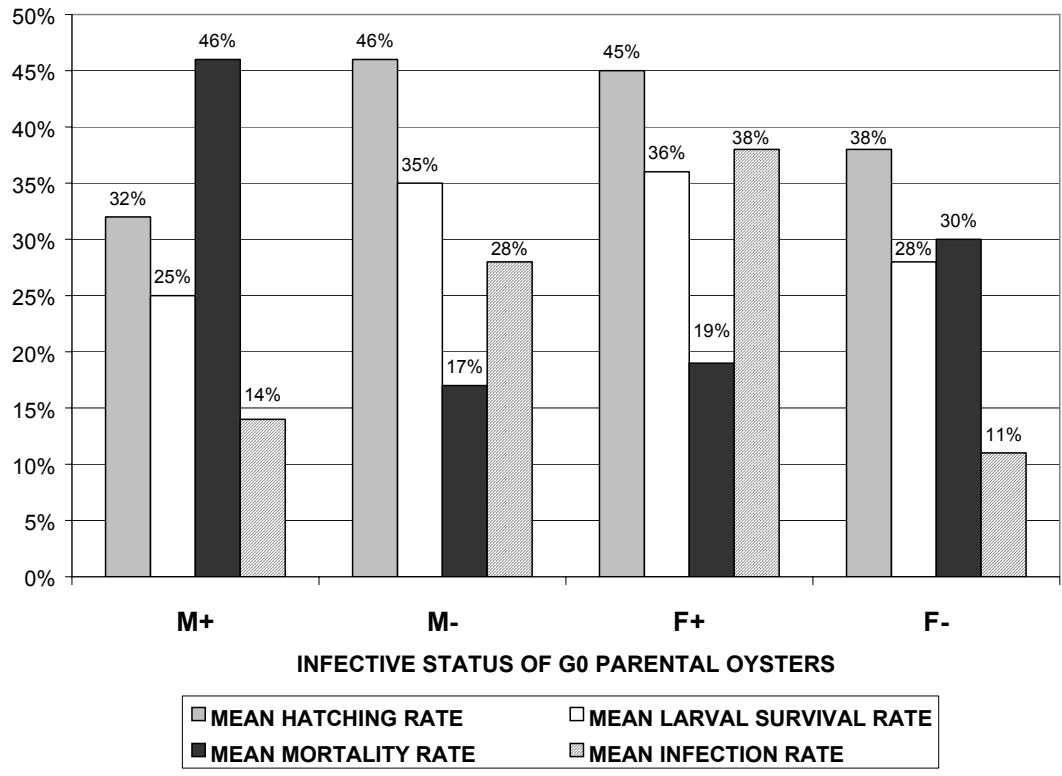


Fig. 4

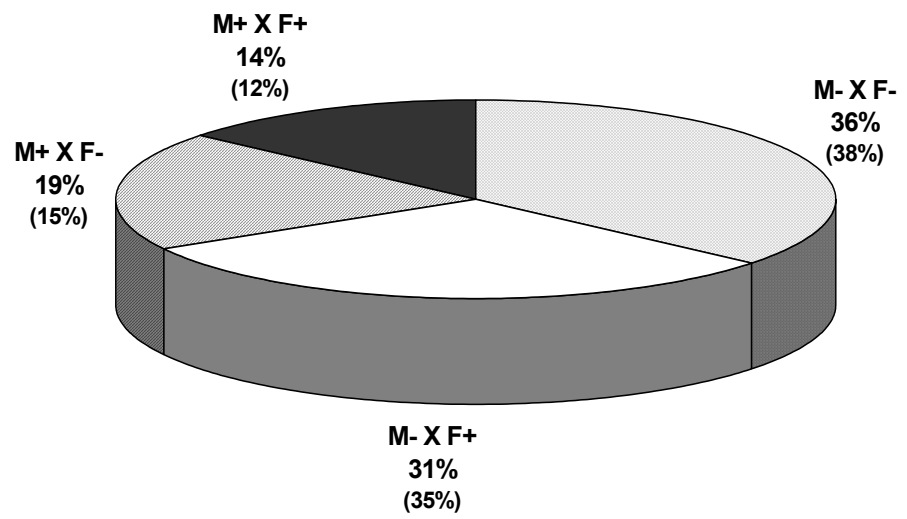


Fig. 5

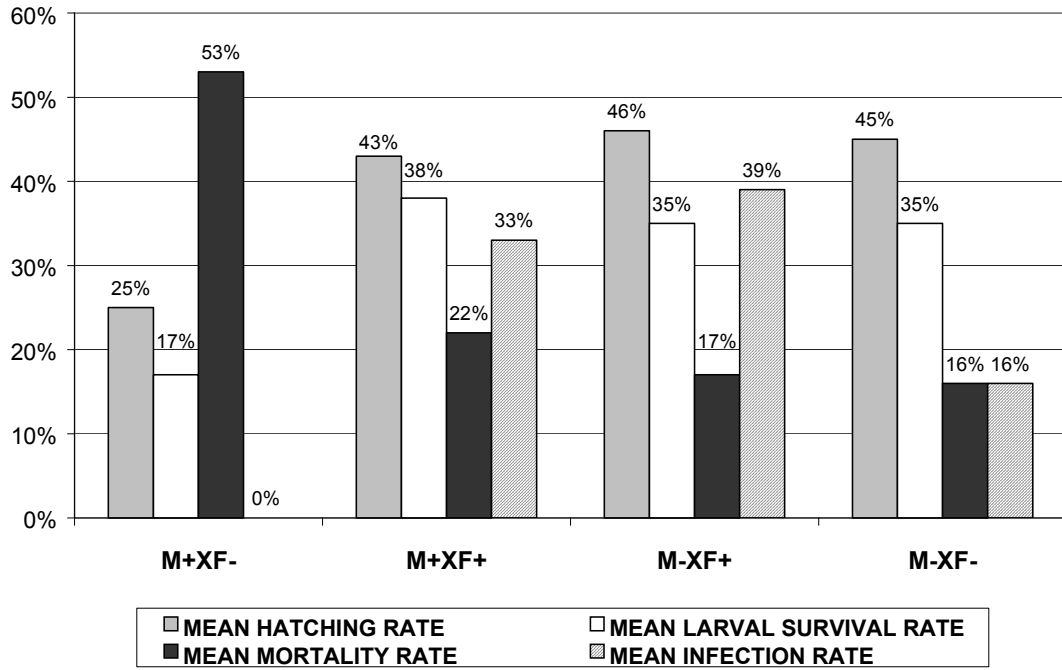


Fig. 6

¿ESTA OsHV-1 PRESENTE EN OSTIONES CULTIVADOS EN MEXICO? PRIMEROS PASOS...

La cuestión de la presencia de agentes virales en ostión Japonés cultivado en el Noroeste Mexicano constituía un tema esencial del proyecto doctoral original. A pesar de la pérdida de muestras potencialmente infectadas y las modificaciones que tuvieron que ser efectuadas, esta cuestión no fue totalmente eliminada. No hubo tiempo suficiente para realizar muestreos formales y estadísticamente significativos, ni los análisis correspondientes, por lo cual este tema de investigación tendrá que ser abordado en futuros proyectos. No obstante, una serie de muestras colectadas en Sonora durante episodios de mortalidad anormal fue proporcionada por la Dra. Reina Castro Longoria de la Universidad de Sonora. Dichas muestras, que habían sido archivadas en fijador y transvasadas a etanol antes de ser transportadas a La Paz fueron procesadas (extracción de ADN) y analizadas por PCR empleando protocolos previamente probados. Los resultados presentados en este documento constituyen datos preliminares debido a que los productos de amplificación que fueron obtenidos están en proceso de secuenciación y análisis. Sin embargo, fueron incluidos en este documento como un testimonio de la implicación de la institución (CIBNOR) en la resolución de problemas locales y regionales y del deseo del autor de dar un primer paso en la utilización de métodos moleculares para el diagnóstico de virus en bivalvos producidos en México.

1) MATERIALES Y METODOS

1.1 Muestras: proveniencia y condiciones de almacenamiento

Las 81 muestras de ostión (*C. gigas*) fueron colectadas en Sonora de Mayo a Julio de 1998. Los organismos adultos fueron fijados en formol y partidos a la mitad. Una mitad fue incluida en parafina mientras que la otra fue almacenada a temperatura ambiente. En Noviembre del 2003, estas muestras fueron transvasadas a etanol y transportadas a La Paz en donde fueron almacenadas a 4°C antes de ser procesadas. El ADN extraído fue almacenado a -20°C. En Abril del 2004, se prepararon pools de cinco muestras al hazard (Tabla XIII). Los 18 grupos obtenidos (SP₁-SP₁₈) fueron enseguida purificados y utilizados para ensayos de detección de OsHV-1 por PCR.

Tabla XIII: pools de extracciones de AND de muestras colectadas en Sonora. Las referencias alfanuméricas de la columna MUESTRAS indican la fecha del muestreo (A: 18/5, B: 28/5, C: 11/6, D: 30/6, E:11/7, F:28/7) y el número del organismo

POOL	MUESTRAS	POOL	MUESTRAS
SP ₁	B18, C17, C18, C22, C28	SP ₉	D16, D19, D21, E21, F25
SP ₂	A20, A25, C16, C27, E18	SP ₁₀	A24, A28, B19, F22, F23
SP ₃	A22, A27, B24, B28, C24	SP ₁₁	D14, D15, E17, E25, F16
SP ₄	A21, C19, C25, C30, E22	SP ₁₂	A24, B22, B20, F15, F24
SP ₅	B16, C21, C26, C29, E20	SP ₁₃	B30, E26, F14, F18, F21
SP ₆	B26, B27, C20, C23, D22	SP ₁₄	B23, B25, E23, E24, D20
SP ₇	A16, A18, A26, B17, F17	SP ₁₅	D18, D23, E20, E19, F13
SP ₈	A19, A23, B21, B29, E16	SP ₁₆	A17, D17, D24, E14, E15, F19

1.2 Extracción de ADN: combinando protocolos

La extracción de ADN a partir de estas muestras fue efectuada por medio de la combinación de dos protocolos previamente probados y descritos en los anexos 3b y 3d (el peso promedio de las secciones de tejido fue de 240 mg). Los sobrenadantes recuperados al término del primer proceso de extracción (Anexo 3b) fueron purificados con un kit comercial (Clean-Up Wizard kit, Promega Corporation). 300 μL de cada uno de los 16 pools fueron mezclados con 1 mL de resina y procesados según las instrucciones del proveedor (Anexo 3d, 2a parte). El ADN eluido fue almacenado a -20°C hasta el momento de los análisis por PCR.

1.3 Detección de OsHV-1 por PCR

Se efectuaron ensayos de detección de OsHV-1 por PCR con cuatro pares de primers dirigidos hacia diferentes regiones del genoma de OsHV-1: C_{10}/C_9 , C_5/C_{13} , GP_2/GP_1 y B_4/B_3 (Anexo 4). Las condiciones de PCR fueron descritas con anterioridad (Anexo 5). Doce microlitros de cada producto de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) y visualizados por medio de un transiluminador de UV (302 nm). El tamaño de los productos de amplificación fue determinado por medio de un marcador de peso moelcular.

2) RESULTADOS

La PCR con los pares C_{10}/C_9 y C_5/C_{13} generó productos de amplificación detectables en varias muestras. Con el primero se obtuvieron productos de tres tamaños distintos: 450 pb, 180 pb y 200 pb que era el tamaño esperado (control positivo no mostrado) (Fig. 58).

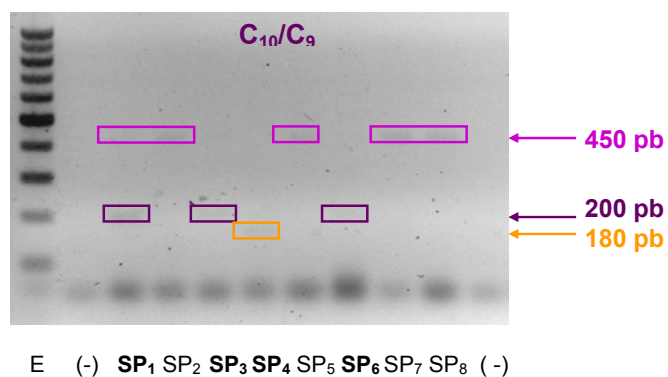


Fig. 58 : Análisis por PCR de ocho pools de muestras (SP1-SP8)
E: escalera, (-) : control negativo (control positivo a 200 pb no mostrado)

Los productos obtenidos con este par de primers y las muestras SP₁, SP₃, SP₄ y SP₆ fueron clonados. En cuanto al segundo par de primers, productos de un tamaño diferente al esperado (450 pb en vez de 700 pb) fueron obtenidos con SP₁, SP₂ y SP₅ (Fig. 59).

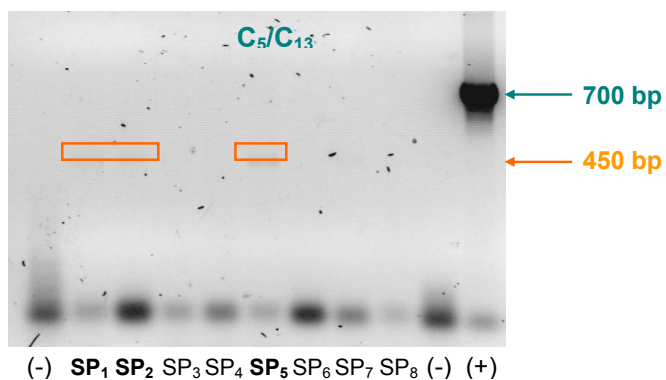


Fig. 59 : Análisis por PCR de ocho pools de muestras (SP1-SP8)
(-) : control negativo, (+) : control positivo (escalera no mostrada)

Estos productos así como los productos obtenidos con los otros dos pares de primers fueron clonados y serán secuenciados próximamente para confirmar su identidad. Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla XIV.

Tabla XIV : Productos de amplificación obtenidos con los cuatro pares de primers empleados

PAR DE PRIMERS	TALLA DEL PRODUCTO ESPERADO	POOLS DE MUESTRAS	TALLA DE LOS PRODUCTOS
C ₁₀ /C ₉	196 bp	SP1	200 bp / 450 bp
		SP3	200 bp
		SP4	180 bp
		SP6	200 bp/ 500 bp
C ₅ /C ₁₃	700 bp	SP1	450 bp
		SP2	450 bp
		SP5	450 bp
B ₄ /B ₃	207 bp	SP8	300 bp
GP ₁ /GP ₂	550 bp	SP6	650 bp

3) DISCUSION

Se ha demostrado previamente que la detección de OsHV-1 por medio de técnicas moleculares puede ser efetuada en muestras archivadas congeladas, fijadas o incluidas en parafina. Sin embargo, tanto el periodo de fijación como las condiciones de almacenamiento tienen un impacto considerable en la conservación del ADN y por ende en la probabilidad de amplificar fragmentos de ADN viral.

En este caso, las muestras analizadas habían sido almacenadas durante varios años y a temperatura ambiente en Davison. Las elevadas temperaturas de la región de Sonora aunadas a las condiciones de transporte antes y después de la etapa de extracción de ADN contribuyeron probablemente a una intensa degradación del ADN de estas muestras. Se tomó la decisión de combinar dos protocolos previamente probados para maximisar las probabilidades de extraer un material genético susceptible de ser amplificado por PCR. A pesar de que resulto posible detectar ADN viral a partir de muestras almacenadas en malas condiciones, las bandas observadas son muy poco intensas por lo cual resulta difícil interpretar los resultados. Esto demuestra una vez más que las condiciones de fijación y almacenamiento tienen que ser optimizadas para que los análisis sean explotables.

Había sido demostrado que primers dirigidos hacia una región repetida del genoma viral (región C del genoma de OsHV-1) son más eficaces para amplificar material degradado como el que se obtiene a partir de muestras fijadas y archivadas. De hecho, sólo se obtuvieron productos de tamaño esperado con el par de primers C₉/C₁₀. Es preciso esperar los resultados de secuenciación para confirmar o descartar la hipótesis de la presencia de un virus herpes similar a OsHV-1 en las muestras provenientes de México. No obstante, el hecho que productos de amplificación hayan sido obtenidos con varios pares de primers dirigidos hacia regiones distintas parece reforzar esta hipótesis.

Claramente, se requieren muestreos y ensayos suplementarios para determinar si OsHV-1 o algún variante está presente en ostiones cultivados en México y si los virus herpes están tan propagados en esta región como lo están en las costas Atlánticas.

En el Noroeste Mexicano no se procede a la colección de semilla a partir del medio natural. Todas las larvas y semilla empleadas para el cultivo comercial del ostión Japonés proviene de laboratorios de producción localizados dentro y fuera del país. Este material biológico constituye por lo tanto una fuente potencial de contaminación y sería recomendable que se efectuaran análisis de detección de patógenos en los laboratorios que abastecen a los productores de la región. Actualmente, la legislación no hace obligatoria la verificación del estatus sanitario de las larvas o de la semilla antes de su diseminación en el campo. Los trabajos de investigación destinados a identificar a microorganismos potencialmente patógenos para los ostiones constituyen una base indispensable para la instauración de controles obligatorios de la semilla o de los adultos antes de su transporte y/o diseminación.

CONCLUSION: SOBRE LA APLICACION DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE OsHV-1

Las herramientas moleculares previamente desarrolladas demostraron la presencia de virus herpes en seis especies de bivalvos: *C. gigas*, *C. angulata*, *R. philippinarum*, *R. decussatus* y *P. maximus*. Se obtuvieron resultados positivos en larvas producidas en laboratorios en Francia, el Reino Unido y España (Arzul, 2001), los cuales indican que las infecciones por virus herpes en bivalvos tienen una amplia distribución. Estas técnicas permitieron además estudiar la variabilidad de tres regiones del genoma de OsHV-1. Una de estas regiones (C) presentó un polimorfismo elevado, caracterizado por una delección de 2.8 kbp. Se ha identificado a un variante (OsHV-1var) cuyo genoma presenta dicha delección y variabilidad adicional en las regiones TR_L y IR_L. No se ha detectado ningún polimorfismo específico de especie, lo cual indica que OsHV-1 o un ancestro de OsHV-1 ha coevolucionado con sus hospederos bivalvos por millones de años. Finalmente, la detección tanto de ADN como de proteínas virales en adultos asintomáticos muestra que OsHV-1, al igual que otros miembros de la familia *Herpesviridae* es capaz de persistir en su hospedero después de la infección primaria con una síntesis proteica limitada. La presencia de virus en las gónadas (Arzul et al. 2002), aunada a datos previos (Le Deuff et al., 1994) parecía reforzar la hipótesis de la existencia de un mecanismo de transmisión vertical de OsHV-1.

Estas herramientas han mostrado ser eficaces para detectar virus en larvas, juveniles y adultos y ha permitido sacar cierto número de conclusiones sobre el origen, la latencia, la patogenicidad, la transmisibilidad, el polimorfismo y la evolución de OsHV-1. El trabajo de investigación desarrollado tenía dos objetivos principales. En primer lugar, retar las hipótesis (1) de una relación entre la sensibilidad/resistencia al fenómeno de mortalidad estival y la sensibilidad/resistencia a la infección por virus herpes y (2) de una transmisión vertical del virus. La primera hipótesis fue eliminada gracias a los resultados obtenidos. La segunda no pudo ser completamente demostrada a pesar de que una parte de los resultados van en ese sentido. No obstante, la información obtenida sugiere la existencia de una transmisión materna de algún tipo de mecanismo de defensa o de resistencia a las infecciones por virus herpes, tal y como ha sido observado en otros invertebrados (Huang y Song, 1999 ; Moret y Schmid-Hempel 2001 ; Little 2003). Esta nueva hipótesis necesita ser explorada.

En segundo lugar, la demostración previa del polimorfismo genético de OsHV-1, de su amplio rango de hospedero y de su presencia en muestras de otros países ha generado preguntas: ¿existen uno o varios virus?, ¿cuál es el hospedero inicial?, etc. En este proyecto sólo se analizó una pequeña cantidad de muestras colectadas en México. A pesar de que su confirmación esté pendiente, los resultados parecen indicar que OsHV-1 o un variante podría estar presente en las muestras analizadas. Muestreos y análisis adicionales podrían permitir confirmar su presencia y, a más largo plazo, determinar eventuales variaciones de secuencia con respecto al genoma de OsHV-1.

3ª PARTE

TECNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE IRIDOVIRUS Y BIRNAVIRUS QUE INFECTAN AL OSTION JAPONES: ENSAYOS PRELIMINARES

**SECUENCIAS CONSERVADAS PARA LA
DETECCION DE IRIDOVIRUS**

**DETECCION DE BIRNAVIRUS POR PCR:
PRIMERS GENERICOS Y ESPECIFICOS**

DETECCION DE IRIDOVIRUS BASADA EN GENES CONSERVADOS

Miembros de la familia *Iridoviridae* son responsables de enfermedades graves y mortalidades en peces (EHNV, RSIV, ISKNV). Además, han sido asociados a eventos de mortalidad masiva que erradicaron al ostión Portugués *Crassostrea angulata* de las costas Europeas del Atlántico en los años 70 (Comps, 1970; Comps y Duthoit, 1976; Comps, 1983) y a enfermedades serias de larvas y semilla de ostión (Elston, 1979; Elston and Wilkinson, 1985). Sin embargo, no existe información de secuencia sobre los iridovirus que infectan de manera específica a invertebrados y por ende a moluscos. Sólo se cuenta con información de secuencia de iridovirus que infectan a peces y anfibios, es decir a vertebrados acuáticos. La comparación de las secuencias disponibles ha permitido identificar varias regiones conservadas que corresponden a genes esenciales (MCP, ATPasa, etc.). En base a estos datos se han desarrollado protocolos de detección por medio de técnicas moleculares. Para este trabajo se seleccionaron varios pares de primers reportados en la literatura y se diseñaron otros en base a regiones conservadas del gen de la MCP. Su eficacia fue comprobada por medio de ensayos con ADN de iridovirus como templado.

Uno de los mayores obstáculos para el desarrollo de este trabajo fue la carencia de controles positivos de moluscos, es decir, de ADN de iridovirus de moluscos o de tejido de molusco infectado sin lugar a dudas por un iridovirus. Los pares de primers empleados fueron diseñados en base a secuencias de iridovirus de peces. Por lo tanto, si bien era posible que estos primers generaran productos de amplificación con ADN de iridovirus de molusco como templado, resultaba probable que no tuvieran la misma talla que en el caso de iridovirus de peces. Para sobrellevar esta dificultad metodológica, se tenía contemplado utilizar muestras de *C. angulata* infectadas por iridovirus colectadas y procesadas en los años 70 (bloques histológicos). Desafortunadamente, este material biológico resultó inexplorable.

1) MATERIALES Y METODOS

1.1 Material biológico

Se emplearon varios ADNs virales para verificar la amplificación de fragmentos de tamaño esperado con los primers elegidos. En una segunda etapa, se efectuaron ensayos de detección con ADN extraído a partir de bloques histológicos o de organismos frescos (samples stored at -20°C).

1.1.1 Muestras virales

Las muestras virales consistieron en ADN de EHNV proporcionado por el Dr. Michel Brémont (INRA, Jouy-en-Josas, Francia) y en sobrenadantes de cultivos celulares infectados por ECV, ESV y FV3 proporcionados por la Dra. Sandra Essbauer (Universidad de Munich, Alemania). Todas estas muestras, almacenadas -20°C , fueron empleadas directamente como templados para las reacciones de PCR.

1.1.2 Muestras de ostión

1.1.2.1 Bloques de histología (tejidos fijados e incluidos en parafina)

En los años 70, grandes cantidades de muestras de ostión fueron colectadas en Francia, en granjas donde el ostión Portugués (*C. angulata*) estaba siendo afectado por mortalidades masivas. Tras ser colectadas, estas muestras fueron fijadas en Bouin e incluidas en parafina antes de ser analizadas por métodos clásicos de histología (Comps, 1983). Algunas muestras también fueron procesadas para análisis por microscopía electrónica de transmisión. Estos bloques de histología, que habían sido almacenados a temperatura ambiente, fueron recientemente desparafinados, reincluidos y re-examinados (B. Chollet, comunicación personal). En base a las observaciones realizadas, seis bloques fueron seleccionados: en una de estas muestras (IV₁), la presencia de iridovirus había sido confirmada por MET. Cinco muestras adicionales fueron escogidas, que consistieron en *C. angulata* afectada por anomalías de branquias y recolectada en Setubal (Portugal). Estos organismos fueron fijados en Davison antes de ser incluidos en parafina y almacenados a 4°C (Table XV).

Table XV : Muestras empleadas par ensayos de detección de iridovirus

MUESTRA	ORIGEN	OBSERVACIONES	FIJADOR	ALMACENAMIENTO
IV ₁		Iridovirus observados por MET		
IV ₂	Francia	Infiltración de los tejidos conectivos		
IV ₃		Inclusiones	Bouin	Temperatura ambiente
IV ₄	(Marennes-	intracitoplasmáticas		
IV ₅	Oléron)	Sospecha de infección por iridovirus		
IV ₆				
IV ₇				
IV ₈	Portugal			
IV ₉			Davison	4°C
IV ₁₀	(Setubal)			
IV ₁₁				

1.1.2.2 ADN de ostión (muestras congeladas)

Se llevaron a cabo ensayos de amplificación utilizando ADN de *C. gigas* recolectadas en Gravelines, Francia (muestras GRA₂-GRA₈) y *C. angulata* recolectadas en Marruecos (muestras TAH₁-TAH₇). Todos los ostiones estaban aparentemente sanos cuando fueron recolectados. El ADN había sido prealablemente extraído siguiendo un protocolo clásico (fenol/cloroformo) y almacenado a -20°C.

1.2 Detección por PCR de ADN de iridovirus

1.2.1 Extracción de ADN de muestras fijadas e incluidas en parafina

Se llevó a cabo una primera serie de extracciones de ADN de tejidos fijados e incluidos en parafina siguiendo un protocolo previamente utilizado (Anexo 4c). Posteriormente, se empleó un protocolo ligeramente modificado, adaptado de Longy et al. (1997) quienes incluyen la utilización de un kit comercial (Wizard DNA Clean-Up System, Promega Corporation) para purificar el sobrenadante que contiene el ADN (Anexo 4d).

1.2.2 Pares de primers

Todos los primers empleados están dirigidos hacia secuencias conservadas de iridovirus: algunos habían sido reportados en la literatura mientras que otros fueron diseñados en el laboratorio (Tablas XVI y XVII)

Tabla XVI : Primers reportados en la literatura y seleccionados para este trabajo

PRIMER	GEN BLANCO	SECUENCIA (5'→3')	REFERENCIA
MCP₁ MCP₂ MCP₄ MCP₅	MCP	ATG TCT TCT GTA GCA GGT TCA TTA NAA GAT NGG RAA NCC CAT GAC TTG GCC ZCT TZT GAC GTC TCT GGA GAA GAA GAA	Mao et al., 1997
ATP₃ ATP₄	ATPasa	GTA CGG GGC TTG ATG ATG ACG T CCT TGT GTC GTG TCT GGC CGA G	Sudthongkong et al., 2002
RNRS_{v2} RNRS_{v5}	Ribonucleótido reductasa	GCA TGT ATG CTG TTT AGA CA GAG CAT CAA GCA GGC GAT CT	Oshima et al., 1998

Tabla XVII: Primers diseñados en base a regiones conservadas del gen de la MCP

PRIMER	SECUENCIA
IR₁	AGA ACG TCA CAC ACC CTT CC
IR₂	ACG AAA ACA CCA CAA GGC TC
IR₃	AAA CCA GCT GGG AGA CAA TG
IR₄	TAC TAT GCC ACC TCC ATC CC
IR₆	ATA GGC AAC ACC AGC GAT CT

En el caso de los primers dirigidos hacia la MCP, se efectuaron PCRs sencillas con diversas combinaciones: MCP₁/MCP₂, MCP₄/MCP₅, IR₁/IR₂, IR₁/IR₄, IR₃/IR₂, IR₃/IR₄ e IR₃/IR₆. También fueron realizadas PCRs anidadas con MCP₄/MCP₅ e IR₃/IR₆. La ubicación de los pares de primers empleados está indicada en la figura 60.

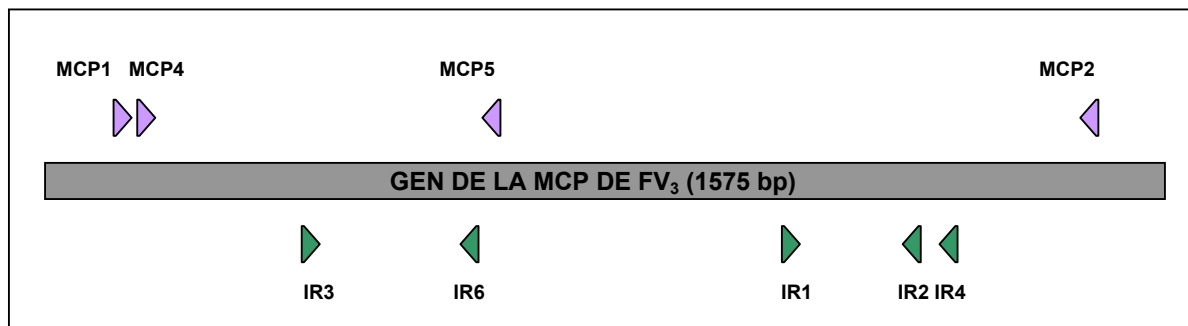


Fig. 60: localización de los pares de primers dirigidos hacia regiones conservadas del gen de la MCP en el caso de FV3 (No. Acceso Genbank : U36913)

1.2.3 Condiciones de amplificación y electroforesis

Las condiciones de amplificación están presentadas en detalle en el anexo 8. Cada uno de los 30 ciclos de PCR consistió en una etapa de desnaturalización (1 min, 94°C), una etapa de alineamiento (90s, 50°C) y una etapa de extensión (1 min, 72°C). Los 30 ciclos fueron precedidos de una etapa de desnaturalización inicial (5min, 94°C) y seguidos por una etapa de extensión final (5 min, 72°C).

1.2.4 Electroforesis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron depositados en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹) y observados por medio de un transiluminador con luz ultravioleta (302 nm). En cada pozo de depositaron 10 µl de muestra y 2 µl de buffer de carga. Una escalera de peso molecular (100 pb) fue empleada para determinar el tamaño de los productos obtenidos.

2) RESULTADOS

2.1 Ensayos preliminares con ADN viral

Los primeros ensayos preliminares fueron realizados con ADN de EHNV aislado de perca y tres pares de primers reportados en la literatura: MCP₄/MCP₅, RNRS_{V2}/RNRS_{V5} y ATP₃/ATP₄. Se obtuvo un producto de tamaño esperado (550 pb) únicamente con MCP₄/MCP₅. El tamaño de los productos obtenidos con RNRS_{V2}/RNRS_{V5} (950 pb y 700 pb) fue mayor al esperado mientras que ATP₃/ATP₄ generó seis productos de tamaños variados (100 bp-1100 pb) pero ninguno del tamaño esperado (750 pb) (Fig. 61).

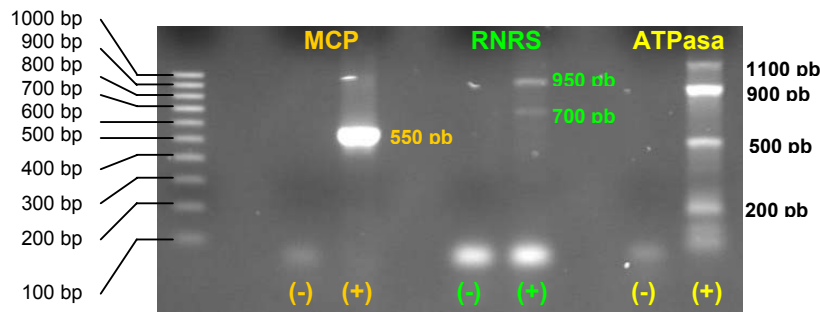


Fig. 61: productos de PCR generados por MCP₄/MCP₅, RSIV₂/RSV₅ y ATP₃/ATP₄ con ADN de EHNV

El par de primers MCP₄/MCP₅ fue probado con otros ADNs virales. Se obtuvieron productos de tamaño idéntico con cada uno de los ADNs virales templado (Fig. 62)

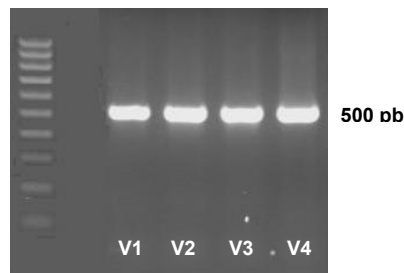


Fig. 62: productos de PCR obtenidos con MCP₄/MCP₅ y diversos ADNs virales
V1: ECV, V2: ESV, V3: FV3, V4: EHNV

Los pares de primers diseñados en el laboratorio fueron probados con ADN de EHNV, generando productos de talla esperada (Fig. 63).

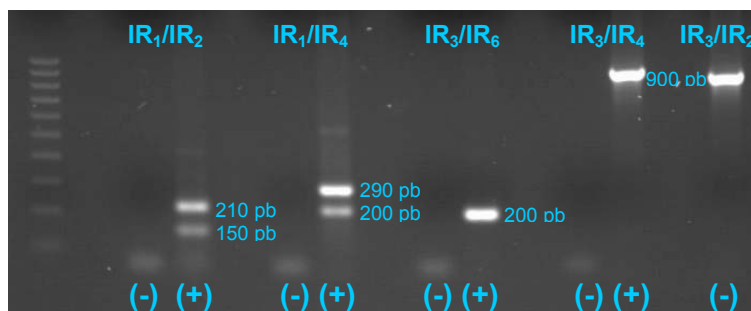


Fig. 63 : Productos de PCR generados por IR₁/IR₂, IR₁/IR₄, IR₃/IR₆, IR₃/IR₄ e IR₃/IR₂ con ADN de EHNV

2.2 Amplificación con ADN extraído de ostión como templado

Ensayos de amplificación fueron efectuados con seis pares de primers (IR₁/IR₄, IR₃/IR₆, MCP₁/MCP₂, MCP₄/MCP₅, RNRSV₂/RNRSV₅ y ATP₃/ATP₄) de *C. gigas* y *C. angulata* con ADN de EHNV. Se obtuvieron productos específicos e inespecíficos (Fig. 64).

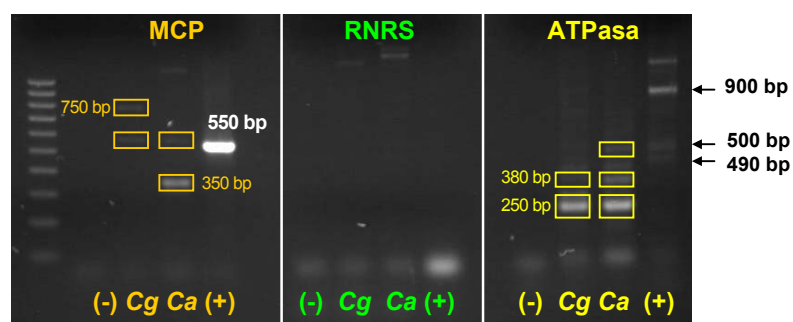


Fig. 64 : Productos de amplificación obtenidos con MCP₄/MCP₅, RSIV_{v2}/RSV_{v5} y ATP₃/ATP₄ y ADN extraído de ostión como templado (Cg: *Crassostrea gigas*, Ca: *Crassostrea angulata*)

En el caso de MCP₄/MCP₅, productos de tamaño idéntico (580 pb), ligeramente más grandes que el producto de 550 pb esperado fueron obtenidos con el ADN extraído tanto de *C. gigas* como de *C. angulata*. Además de este producto común, un producto de 750 pb fue obtenido con ADN de *C. gigas* mientras que dos productos (350 pb y >1000 pb) fueron obtenidos con el ADN extraído de *C. angulata*. Ensayos suplementarios con muestras de ADN extraídas de *C. gigas* y *C. angulata* fueron realizados para determinar si existían diferencias sistemáticas en los patrones de bandeo observados. Los productos de 750 pb y 550 pb fueron observados en casi todas las muestras mientras que las bandas más pequeñas (300-350 pb) aparecieron sólo en algunas muestras independientemente del taxón.

2.3 Ensayos de amplificación con ADN extraído de tejidos fijados e incluidos en parafina

2.3.1 Bloques histológicos de los años 70

Los primeros ensayos realizados con muestras fijadas e incluidas en parafina en los años 70 no generaron ningún producto visible a pesar de que se emplearon pares de primers que amplifican fragmentos pequeños (< 200 bb). Después de que se extrajo ADN de los bloques archivados con un protocolo modificado (Anexo 3c) se llevaron a cabo nuevos ensayos con dos pares de primers previamente probados: MCP₄/MCP₅ e IR₃/IR₆ (productos esperados de 550 pb y 190 pb). La inclusión de controles adecuados indicó la ausencia de inhibidores de PCR (resultados no mostrados). Las Figs. 65 y 66 proporcionan un ejemplo de los resultados obtenidos.

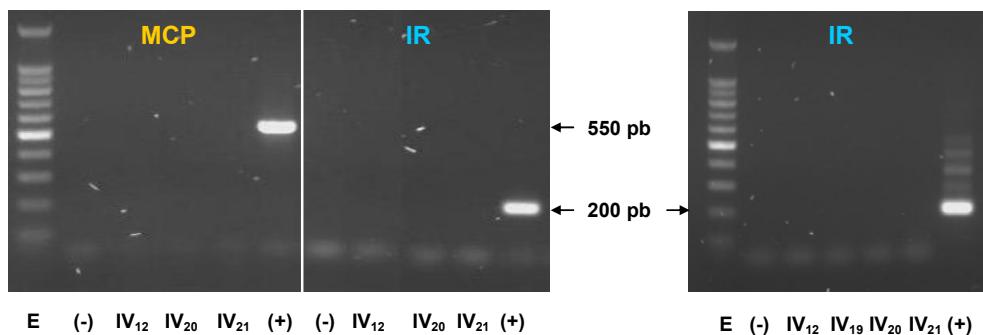


Fig. 65 : productos de PCR generados por MCP₄/MCP₅ e IR₃/IR₆ con ADN de muestras de archivo como templado

Fig. 66 : Productos de PCR anidada obtenidos con IR₃/IR₆

2.3.2 Muestras recientes

En el caso de los bloques más recientes (muestras de Setubal), el par de primers IR₁/IR₂ generó fragmentos pequeños (alrededor de 120 pb) en tres muestras. Ensayos adicionales con otros pares de primers (IR₁/IR₄ e IR₃/IR₆) no generaron productos de amplificación. Se llevaron a cabo extracciones de ADN con el protocolo modificado antes de proceder a nuevos ensayos.

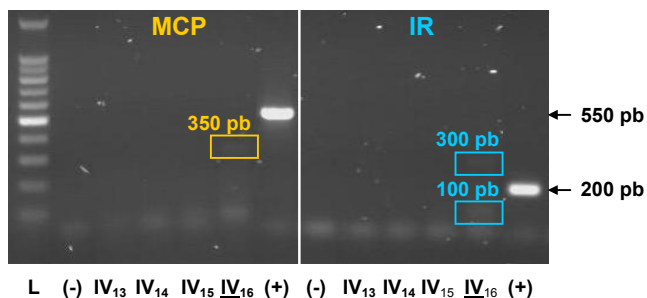


Fig. 67 : productos de PCR generados por MCP₄/MCP₅ e IR₃/IR₆ con ADN de muestras de Setubal.

En un caso (IR₁₆), se obtuvieron productos de tallas inesperadas (Fig. 67). Por lo tanto, el ADN inicial así como varios productos de PCR fueron amplificados o re-amplificados por PCR sencilla o anidada. Los resultados obtenidos están resumidos en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII: Productos de amplificación obtenidos con la muestra IV16 y varios pares de primers dirigidos hacia secuencias conservadas del gen de la MCP. PCR1: PCR sencilla. PCR2: PCR anidada. NP: cantidad de productos de amplificación obtenidos. (pb): tamaño, en pares de bases, del o de los producto(s) de amplificación.

PCR SENCILLA				PCR ANIDADA						
PAR DE PRIMERS	MUESTRA NP (pb)		EHNV NP (pb)		PAR DE PRIMERS (PCR ₁)	PAR DE PRIMERS (PCR ₂)	MUESTRA NP (pb)		(EHNV) NP (pb)	
MCP ₁ / MCP ₂	-	-	1	1450	MCP ₁ / MCP ₂	MCP ₁ / MCP ₂	-	-	1	1450
MCP ₄ / MCP ₅	3	350	1	550		MCP ₄ / MCP ₅	-	-	5	550
MCP ₁ / MCP ₅	1	210	1	550		IR ₁ / IR ₄	1	200	8	250
MCP ₄ / MCP ₂	-	-	1	1250						200
MCP ₁ / IR ₆	1	200	1	490		IR ₃ / IR ₆	-	-	3	190
IR ₃ / IR ₆	2	300	1	200						
IR ₃ / IR ₂	1	300	1	700	MCP ₁ / MCP ₄	IR ₃ / IR ₆	-	-	5	200
IR ₁ / IR ₂	1	100	1	120						
IR ₁ / IR ₄	1	120	1	150	IR ₁ / IR ₄	IR ₁ / IR ₂	2	420	2	500
IR ₁ / MCP ₂	-	-	-	-				110		210

3) DISCUSION

Las primeras PCRs realizadas con ADN extraído de muestras fijadas e incluidas en parafina siguiendo el mismo protocolo que había sido previamente empleado no permitió obtener productos de amplificación ni con las muestras de los años 70 ni con las muestras más recientes de Setubal. El protocolo modificado permitió mejorar los resultados en el caso de las muestras de Setubal.

Tomando en cuenta que pudo amplificarse ADN de virus herpes en muestras fijadas e incluidas en parafina que habían sido almacenadas por más de treinta años (resultados no mostrados), varias hipótesis pueden ser formuladas para explicar la falta de éxito de nuestros ensayos. El fijador que fue empleado (Bouin) es inadecuado para la conservación del ADN, ya que contiene ácido pícrico. Las condiciones de fijación, aunadas a un almacenamiento a temperatura ambiente por muchos años pueden explicar la discordancia entre nuestros resultados y resultados positivos reportados en la literatura con muestras del mismo tipo pero más recientes (Longy et al., 1997). Es preciso recordar que la detección por PCR de ADN de OsHV-1 fue lograda con primers dirigidos hacia una región repetida del genoma de este virus, lo cual incrementa de manera significativa las probabilidades de amplificación a partir de material archivado (Barbosa-Solomieu et al., 2004). Tal no era el caso de los primers dirigidos hacia el gen de la MCP.

Tal y como fue mencionado antes, una de las mayores dificultades de esta parte del trabajo fue la carencia de controles positivos, es decir, de tejidos de moluscos de referencia indudablemente infectados por iridovirus o ADN de iridovirus de molusco. Por lo tanto, el tamaño de los productos a obtener era desconocido y no fue posible determinar si los productos obtenidos fueron resultado de una amplificación específica o inespecífica. La secuenciación de los productos está siendo realizada y debería permitir un análisis más preciso y concluyente de los datos reunidos.

DETECCION DE BIRNAVIRUS ACUATICOS

Virus de la familia *Birnaviridae* han sido aislado de varias especies de invertebrados marinos (Hill, 1976; Bovo et al., 1984; Lo et al., 1988; Mortensen et al., 1990; Suzuki et al., 1998a y b). Se ha mostrado que los birnavirus aislados tanto de almeja como de ostiones son bioquímica y serológicamente diferentes de los principales serotipos de birnavirus acuáticos (Hill, 1976; Underwood et al., 1977). Los birnavirus acuáticos han sido por lo tanto divididos en dos serogrupos. Los serotipos de IPNV constituyen el serogrupo I mientras que el serogrupo II está constituido por virus que infectan a moluscos y algunos virus aislados de peces (Hill, 1982; Olesen et al., 1988). Sin embargo, debido a que un birnavirus del serogrupo II fue aislado de un salmónido (Ahne et al., 1989), que partículas de IPNV han sido aisladas de invertebrados marinos y que agentes de tipo IPNV aislados de moluscos son capaces de inducir síntomas típicos de la necrosis pancreática en alevines de trucha arcoiris (Hill, 1982), se ha sugerido que los dos serogrupos podrían no ser estrictamente específicos de peces y moluscos respectivamente (Mortensen et al., 1992).

Aunque se hayan aislado birnavirus de moluscos afectados por mortalidades anormales (Mortensen et al., 1990; Kitamura et al., 2000), no se sabe con certeza si los birnavirus actúan sistemáticamente como patógenos para los moluscos bivalvos. La mayor parte de los agentes de tipo IPNV aislados de invertebrados parecen no ser patógenos para su hospedero (Cutrin et al., 2000). Sin embargo, Hill y Alderman (1977) reportaron signos clínicos moderados en ostiones infectados por virus aislados de la almeja *Tellina tenuis* y del ostión plano *O. edulis*. De manera más reciente, Chou et al. (1998) sugirió que un birnavirus moderadamente patógeno como CV-TS-1 pueda causar mortalidades elevadas en almejas (*Meretrix lusoria*) cuando se encuentra asociado con el estrés de la contaminación por metales pesados. De forma similar, Kitamura et al. (2000) indican que la patogenicidad de MABV que infecta de forma persistente u ostras perleras podría ser activada por factores estresantes como la operación quirúrgica que se efectúa para introducir el nucleus artificial de perla. Sugieren que MABV constituye un patógeno oportunista de las ostras perleras que actúan como reservorio para este virus.

A pesar de que su patogenicidad en moluscos es incierta, varias herramientas de detección e identificación de birnavirus acuáticos han sido desarrolladas. La detección de birnavirus en moluscos tiene gran relevancia ya que estos agentes pueden ser nocivos tanto para el organismo hospedero como para otras especies con importancia económica (salmones, etc.). Este trabajo ha sido enfocado hacia la detección por RT-PCR de birnavirus potencialmente perjudiciales para los ostiones. Dos protocolos fueron probados: un método de detección por RT-PCR/PCR anidada previamente descrito (basado en regiones conservadas de birnavirus) y un protocolo de RT-PCR con primers específicos diseñados en base a la secuencia de un birnavirus aislado de *T. tenuis*. (B. Delmas, comunicación personal). Sólo pudieron efectuarse ensayos preliminares. El método presentado, aunque amplificó con éxito material viral tiene que ser optimizado y probado con tejidos de molusco infectado.

1) MATERIALES Y METODOS

1.1 Material viral

El material viral fue amablemente proporcionado por el Dr. Bernard Delmas (INRA, Jouy en Josas, Francia). Este material consistió en sobrenadantes de cultivos celulares BF-2 infectados por IPNV y TV-1. Los cultivos fueron inoculados con sobrenadantes de otros cultivos celulares infectados con suspensiones virales. El aislado original de TV1 fue proporcionado por Brian Hill (Weymouth) y el IPNV fue aislado en 1975 por Monique Bearzotti (INRA) a partir de peces cultivados en el departamento Francés de Côtes d'Armor.

Los sobrenadantes empleados fueron almacenados a -70°C antes de ser analizados.

1.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN fue efectuada utilizando un protocolo clásico (extracción por cloroformo/alcool isoamílico) (Anexo X). Se obtuvieron concentraciones de ARN de $30\text{-}90\ \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.3 Protocolos de RT-PCR/PCR anidada

Tres pares de primers fueron empleados para la RT-PCR: MABVP₁/MABVP₂, TV₁F₁/TV₁R y TV₁F₂/TV₁R (Tabla XIX). El kit comercial Access RT-PCR Introductory System (Promega Corporation) fue utilizado para preparar las reacciones de RT-PCR. Varias temperaturas de alineamiento y de cantidad de ciclos fueron probados. El protocolo detallado y las condiciones de amplificación están descritas en el Anexo 10a.

Tabla XIX: secuencias de los primers empleados para ensayos de detección de birnavirus

PRIMER	SECUENCIA (5' → 3')	SENTIDO
MABVP ₁	TGA GAT CAC AGA CTT CTC AAG TGA CC	sentido
MABVP ₂	GAG TCA TCA TAC CTG TAG TGC ACA	anti-sentido
MABVP ₃	CAA CAC TCT TCC CAT G	sentido
MABVP ₄	AGA CAC TGG GAG GTT CT	anti-sentido
TV ₁ F ₁	TGG GCT CAA CTC AAT TGT CA	sentido
TV ₁ F ₂	GTC AAA ACG GTG GAC CTA GC	sentido
TV ₁ R	GAT ACT CGG ACA ACG GGA AA	anti-sentido

Los productos de RT-PCR (1 μL) fueron empleados para ensayos de PCR anidada con el par de primers MABVP₃/MABVP₄ (Tabla XIX). Las condiciones de amplificación (coctel de reacción y condiciones de amplificación) están descritas en el Anexo 10b. Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio ($0.5\ \mu\text{g mL}^{-1}$): 12 μL de muestra mezclados con 2 μL de buffer de carga fueron depositados en cada carril. Una escalera de 100 pb permitió determinar el tamaño de cada producto.

2) RESULTADOS

Tal y como se esperaba en base a la información de secuencia, no se obtuvo ningún producto de amplificación usando ADNc de IPNV como templado. En cuanto a TV1, se obtuvieron productos de amplificación de talla esperada con los dos pares de primers diseñados en el laboratorio: TV₁F₁/TV₁R y TV₁F₂/TV₁R. La RT-PCR no generó productos visibles con MABVP₁/MABVP₂ (Figs. 68 y 69).

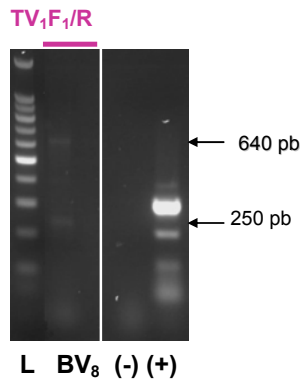


Fig. 68 : Productos obtenidos por RT-PCR con TV₁F₁/R

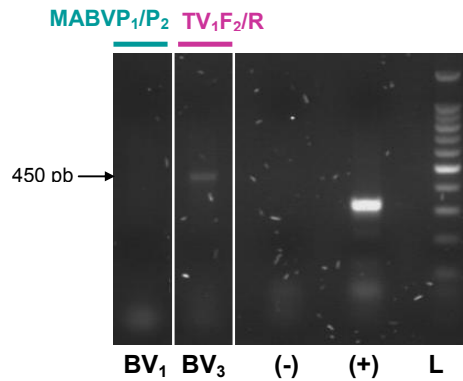


Fig. 69 : Productos de RT-PCR obtenidos por RT-PCR con MABVP₁/P₂ y TV₁F₂/R

Los productos obtenidos por RT-PCR con MABVP₁/P₂ y TV₁F₁/R fueron empleados como templados para PCR anidada con MABVP₃/P₄ y TV₁F₂/R respectivamente. La PCR anidada con TV₁F₂/R generó un producto de talla esperada (450 pb) (Fig. 70).

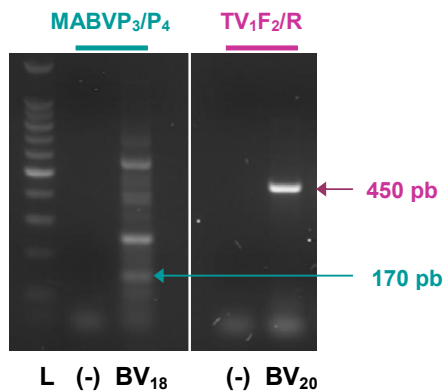


Fig. 70 : Productos de PCR de segunda vuelta obtenidos con MABV P₃/P₄ y TV₁F₂/R sobre productos de RT-PCR generados por MABV P₁/P₂ and TV₁F₁/R

El par de primers MABVP₃/P₄ generó múltiples productos de amplificación de una variedad de tallas: 700 pb, 550 pb, 450 pb, 400 pb... (Fig. 69). Uno de estos productos fue de talla esperada (170 pb) (Fig. 71).

3) DISCUSION

Varios birnavirus marinos ha sido aislados tanto de peces marinos (Bonami et al., 1983; Sorimachi y Hara, 1985; Novoa y Figueras, 1996; Novoa et al., 1993) como de moluscos (Chou et al., 1998; Kitamura et al., 2000). Serológicamente, los virus aislados han sido agrupados en base a los resultados de pruebas de neutralización recíproca con antisueros policlonales e inmunoensayos con anticuerpos monoclonales (Blake et al., 1995). Además, la información de secuencia obtenida sobre el genoma bisegmentado de estos virus ha permitido el desarrollo de ensayos de RT-PCR para identificar cepas específicas de birnavirus acuáticos (Rimstad et al., 1990).

En una primera etapa, este trabajo fue enfocado a la utilización de un protocolo previamente desarrollado de RT-PCR y PCR anidada (Suzuki et al., 1997b). Este protocolo en dos etapas utiliza dos pares de primers basados respectivamente en secuencias conservadas de IPNV y de MABV. Tras haber sido empleadas con éxito para la detección de MABV en peces, moluscos y zooplancton, aparecieron como una herramienta poderosa para la detección de birnavirus patógenos o potencialmente patógenos en moluscos. Sin embargo, la comparación de las secuencias nucleotídicas de birnavirus aislados de moluscos y de los birnavirus marinos reveló una ausencia total de homología confirmando así la necesidad de desarrollar herramientas de detección más específicas. Por lo tanto, se diseñaron primers específicos en base a la secuencia disponible de TV-1.

Estos primers fueron probados bajo diversas condiciones de reacción para comprobar la obtención de productos de tallas esperadas al ser utilizados con plantados de ARN/ADNc adecuados. En cuanto a los múltiples productos inesperados generados por la PCR anidada con MABVP3/P4, resultan sin ninguna duda de una amplificación inespecífica.

A pesar de que la secuenciación de los productos obtenidos no ha sido completada, los resultados preliminares indican que el protocolo de RT-PCR presentado puede ser empleado con éxito para detectar a TV-1 en tejidos de ostión. Desafortunadamente, las restricciones de tiempo no permitieron efectuar ensayos de detección en moluscos. Estos resultados sólo pueden ser considerados como un punto de partida para otros trabajos, incluyendo ensayos de detección en organismos potencialmente infectados, determinación de la sensibilidad, la especificidad y la reproductibilidad de la técnica, etc.

CONCLUSION Y PERSPECTIVAS

Los primeros trabajos de desarrollo de métodos de detección de virus en moluscos fueron consagrados a los virus patógenos para humanos cuya presencia rinde el consumo de moluscos peligroso o inclusive letal. Este tipo de investigación forma por ende parte de una política de sanidad humana. Este trabajo fue, al contrario, enfocado hacia los virus patógenos para los propios moluscos. Este tipo de virus puede afectar a los organismos infectados de diversas formas: provocando o contribuyendo a su muerte, interfiriendo en su crecimiento o provocándoles lesiones que los vuelven impropios para la comercialización. En cualquier caso, las pérdidas económicas asociadas a este tipo de infecciones pueden ser considerables.

Sin embargo, a pesar de su impacto económico, existe escasa información acerca de virus que infectan a moluscos. Resulta difícil detectarlos en adultos, ya que los signos clínicos de enfermedad se observan sólo en animales moribundos o ya muertos. Las técnicas de manejo de los cultivos hacen que el tiempo transcurrido entre la observación de los síntomas y la recolección de las muestras pueda bastar para que no quede rastro de la infección viral. En este aspecto, los virus herpes capaces de establecer infecciones latentes en sus hospederos pueden ser detectados con mayor facilidad que otros agentes virales. Otra dificultad reside en la necesidad de propagar los virus aislados en líneas celulares heterólogas. Aunque la propagación resulta exitosa en ciertos casos, existe el riesgo de alterar la patogenicidad de los virus lo cual puede sesgar ensayos ulteriores.

No obstante se han detectado infecciones por virus de las familias *Iridoviridae*, *Birnaviridae* y/o *Herpesviridae* en ostiones y otras especies de moluscos. La identificación de secuencias conservadas puede permitir iniciar ensayos de detección cuando no se cuenta con información específica acerca del virus de interés. Este tipo de enfoques ha sido adoptado en varios casos con resultados positivos. Sin embargo, puede resultar inadecuado en el caso de virus de moluscos/invertebrados que pueden presentar grandes diferencias de secuencia con respecto a virus de vertebrados. El caso de OsHV-1 es bastante ilustrativo. Resulta imposible amplificarlo por PCR con primers degenerados (o sustituidos con deoxinosina) dirigidos hacia regiones conservadas del gen de la ADN polimerasa de virus herpes (Van Devanter et al., 1996; Ehlers et al., 1999) debido a la existencia de importantes divergencias su secuencia nucleotídica (resultados no mostrados). De manera similar, las secuencias de los MABV y de los birnavirus aislados de moluscos no presentan la menor similitud. Por tales motivos, el método elegido para desarrollar métodos de detección en iridovirus en ostiones no es infallible. La carencia de controles positivos (iridovirus de moluscos) no permite sin embargo adoptar otros enfoques. La secuenciación de los productos obtenidos proporcionará una primera evaluación de la pertinencia de la metodología aplicada.

Los resultados obtenidos, a pesar de ser preliminares, proporcionan herramientas que pueden ser empleadas para el análisis de organismos potencialmente infectados.

CONCLUSION GENERAL

Y

PERSPECTIVAS

HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA DETECCION DE VIRUS: ¿CUAL ES SU PORVENIR?

Tradicionalmente, la detección de virus era realizada por medio de una combinación de análisis histológicos y de microscopía electrónica. Los primeros permiten detectar lesiones típicas, la segunda describir la morfología de los viriones y las diversas etapas del ciclo viral. En el caso particular de los virus de bivalvos, la carencia de líneas celulares homólogas (y por ende la imposibilidad de propagarlos) constituye un obstáculo considerable y justifica la limitada información que se tiene de ellos.

Los métodos moleculares para la detección de virus constituyen un avance significativo en los estudios virales ya que una gran cantidad de análisis pueden ser efectuados en poco tiempo, confirmando o denegando la presencia de material genético de un virus específico (cepa, familia...). Además, las técnicas de detección *in situ* permiten localizar los focos infecciosos mientras que la técnicas cuantitativas permiten, por ejemplo discriminar infecciones latentes y activas.

No obstante, la información de secuencia abre también otro tipo de perspectivas. La comparación de secuencias, por ejemplo, está contribuyendo cada día más a la clasificación de aislados virales como especies o cepas, a la consolidación de taxas previamente definidas (familias, géneros) y a una serie de estudios evolucionarios. La identificación precisa de una gran cantidad de aislados virales podría contribuir a una mayor comprensión de los mecanismos de introducción y expansión de las enfermedades virales. Adicionalmente, el análisis de las diferencias genéticas entre aislados virales podría permitir entender hasta qué punto éstas diferencias (y no factores ambientales o diferencias en la especie hospedera) influyen en el impacto de los episodios infecciosos (que a pesar de ser provocados por un « mismo » virus pueden ser asintomáticos o causar mortalidades).

Por otra parte, la comparación y el alineamiento de secuencias permite identificar genes que codifican productos de función conocida. Estos pueden constituir blancos interesantes para el desarrollo de sustancias anti-virales o ser expresados en vectores para estudiar su efecto en líneas celulares heterólogas o en otro tipo de células, como hemocitos de ostión. Otras técnicas moleculares como los miniarreglos y la hibridación sustractiva pueden conducir a la identificación de genes del hospedero cuya expresión está provocada o incrementada por la infección viral.

El interés de este tipo de trabajos es doble. En primer lugar, pueden proporcionarnos elementos para una mayor comprensión de los mecanismos de defensa de los bivalvos o de los mecanismos en los que se basan la transmisión vertical de las infecciones virales o de fenómenos de defensa/resistencia. Adicionalmente, la identificación de genes de «resistencia» o «protección» puede servir de base para seleccionar líneas/familias de ostiones resistentes a infecciones virales y/o a otras enfermedades infecciosas. Esta perspectiva es de gran interés debido a que el control de enfermedades en organismos cultivados en el medio natural abierto es excesivamente complicado.

DE LA DETECCIÓN DE VIRUS AL CONTROL DE ENFERMEDADES...

Tal y como ha sido mencionado, el cultivo de ostión se lleva a cabo en el medio natural es decir en un ambiente abierto que escapa a todo control. Por lo tanto, los métodos tradicionales de manejo de enfermedades como el uso de antibióticos son inaplicables. Además, el sistema inmune de los moluscos es inadecuado para el desarrollo de vacunas, lo cual complica aún más la tarea de controlar la propagación de agentes infecciosos.

Por otro lado, si consideramos el caso particular de las infecciones virales conocidas en el ostión, su impacto e animales adultos puede ser devastador (iridovirus) o limitado (infecciones por herpesvirus repandidas y asintomáticas) o depender de la presencia de factores de estrés para ser nocivo (birnavirus). Tomando en cuenta esta información, pueden surgir dudas en cuanto a la utilidad no sólo de validar las técnicas moleculares para la detección de OsHV-1 sino de desarrollar técnicas adicionales (PCR cuantitativa, etc.). Del mismo modo puede cuestionarse la relevancia para el sector productivo de la detección y caracterización de otros agentes virales. Parece indispensable cuestionar las posibles aplicaciones y perspectivas del trabajo llevado a cabo tomando en cuenta el hecho que una de las misiones del CIBNOR es la resolución de problemáticas locales y regionales.

En primer lugar, a pesar de que las condiciones ambientales son incontrolables, la transferencia de animales sí puede ser controlada y requiere de un manejo cuidadoso. Existe una gran cantidad de ejemplos históricos del impacto desastroso que pueden tener las transferencias no controladas de organismos salvajes o cultivados. Debido a que se alimentan por filtración, los moluscos tienen, más que otros animales, grandes probabilidades de albergar o haber acumulado patógenos que pueden no tener gran impacto en animales “habitados” pero ser devastadores en especies (ostiones, otros moluscos u otros) o poblaciones ingenuas. Los ostiones del Pacífico introducidos de Japón en los años 60-70 parecen haber constituido la fuente original de iridovirus que se propagaron en aquella época diezmando los cultivos de *C. angulata*. El parásito *Bonamia ostreae* que podría haber sido introducido desde California (USA) a Europa por medio de ostiones planos en 1979 constituye otro ejemplo. Del mismo modo, moluscos introducidos en una región pueden no resistir la infección por patógenos desconocidos presentes en el medio. Tal es el caso de varios lotes de *Ostrea edulis* transportados de Noruega a la cuenca de Thau (Francia) en donde no sobrevivieron a las infección por los parásitos *Marteilia refringens* y *Bonamia ostreae* abundantes en esa zona. El manejo de las transferencias de animales requiere la existencia de una lista exhaustiva de patógenos potencialmente nuisibles que sean obligatoriamente diagnosticados antes de transportar a los animales. Tomando en cuenta la escasa información que se tiene sobre virus de ostiones y de bivalvos en general, se requiere de un gran esfuerzo de investigación (patogenicidad, prevalencia, transmisibilidad, ciclo infeccioso, etc.) para contribuir a la prevención de la propagación de enfermedades.

De manera casi contraria, la determinación precisa de la distribución de los diversos virus patógenos (para lo cual las herramientas moleculares de detección pueden ser sumamente útiles) es deseable para asegurarse de no limitar de manera excesiva el transporte de organismos. Este tipo de información puede permitir determinar si los diferentes virus detectados se encuentran ampliamente distribuidos en varios continentes (y no es necesario limitar las transferencias de organismos infectados) o si existe aún una posibilidad de limitar su expansión. Según los lineamientos actualmente establecidos por el OIE (oficio internacional de epizootias), los patógenos que deben ser declarados y sometidos a reglamentación son únicamente aquellos cuya distribución geográfica es limitada-lo cual no puede ser establecido con certeza si no se cuenta con técnicas que permitan una diferenciación precisa de los aislados virales incriminados (Marsh et al., 2002).

Sin embargo, más allá de la preservación de regiones indemnes de patógenos, conocer la presencia y/o la prevalencia de algunos de ellos puede ser útil. En el caso de infecciones de ostiones por virus de tipo herpes, por ejemplo, la información de la que se dispone puede contribuir a limitar las pérdidas en los cultivos. Se ha preconizado que ciertas etapas estresantes del cultivo no sean realizadas cuando la temperatura aumenta, lo que debilita la condición fisiológica y el sistema inmune de los ostiones y favorece, por el contrario, la propagación de los virus.

Los laboratorios de producción son, por otra parte, medios que pueden ser controlados y en los cuales la detección de virus puede resultar provechosa. Conocer la evolución de un episodio infeccioso puede permitir limitar las pérdidas económicas por medio de la optimización de las condiciones de producción para minimizar la proliferación/la transmisión viral o de la temprana eliminación de lotes severamente afectados. A pesar de que la transmisión vertical de OsHV-1 no pudo ser demostrada con claridad se estableció que el desempeño zootécnico de la progenie de reproductores machos infectados es muy bajo, por lo cual es preferible no utilizarlos. El desarrollo de métodos cuantitativos de detección permitirá refinar el análisis de los riesgos de transmisión y la evaluación de la prevalencia tanto en larvas como en adultos.

En conclusión, el desarrollo sostenible de las actividades acuiculturales requiere de una vigilancia zoonosanitaria cuidadosa. Los organismos transportados y las aguas de lastre constituyen herramientas particularmente eficaces para la diseminación de patógenos y se requiere tanto de información precisa sobre las enfermedades infecciosas como de métodos de detección confiables y rápidos para llevar a cabo un monitoreo eficiente. Existen múltiples ejemplos del impacto considerable que pueden llegar a tener los virus sobre la producción acuícola (WSSV en camarón, GNDV en ostiones...). Este trabajo de investigación realizado en el LGP de IFREMER como parte de un proyecto a largo plazo contribuye a la validación preliminar y el desarrollo de métodos moleculares para la detección de agentes virales en moluscos. El análisis retrospectivo de muestras archivadas ofrece la posibilidad de adquirir una mayor comprensión de episodios de mortalidad pasados, de la evolución de la prevalencia viral en determinadas regiones y de la distribución/el polimorfismo de agentes virales en todo el mundo. En cuanto las técnicas hayan sido completamente validadas, podrán ser integradas en programas de vigilancia de sanidad de moluscos.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS**

- Adamkewicz S.L., Harasewych M.G., Blake J., Saudek D. and Bult C.J. 1997. A molecular phylogeny of the bivalve molluscs. *Mol. Biol. Evol.* 14(6):619-629.
- Ahne W. 1978. Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. Virol.* 58(1):65-9.
- Ahne W., Ogawa M. and Schlotfeldt H.J. 1990. Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish (*Silurus glanis*). *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 37(3):187-190.
- Ahne W., Schlotfeldt H.J. and Thomsen I. 1989. Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 36(5):333-336.
- Ahne W., Bearzotti M., Bremont M. and Essbauer S. 1998. Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic hematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med.* 45:373-383.
- Albrecht J.C., Nicholas J., Biller D., Cameron K.R., Biesinger B., Newman C., Wittman S., Craxton M.A., Coleman H., Fleckenstein B. and Honess R.W. 1992. Primary structure of the herpes saimiri genome. *J. Virol.* 66: 5047-5058.
- Alderman D.J. and Gras P. 1969. Gill disease of Portuguese oysters. *Nature.* 224:616-617.
- Alexander F.E., Jarrett R.F., Lawrence D., Armstrong A.A., Freeland J., Gokhale D.A., Kane E., Taylor G.M., Wright D.H. and Cartwright R.A. 2000. Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *Brit. J. Cancer.* 82(5):1117-1121.
- Amemiya, I. 1928. Ecological studies of Japanese oysters, with special reference to the salinity of their habitats. *Journal of College of Agriculture, University of Tokyo.* 9:333.
- Amend D.F. and McDowell T. 1984. Comparison of various procedures to detect neutralizing antibody to the channel catfish virus in California brood channel catfish. *Progr. Fish Culturist.* 46: 6-12.
- Arzul I. 1998. Infection à virus de type herpès chez les bivalves : transmission expérimentale et induction de l'infection. Thèse pour le diplôme d'état de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, pp 116.
- Arzul I. 2001. Herpèsvirus infectant les bivalves marins : détection, génome et transmission. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Montpellier II (France). pp 297.
- Arzul I. and Renault T. 2002. Herpèsvirus et bivalves marins. *Virologie* 6 : 169-174.
- Arzul I., Renault T. and Lipart C. 2001a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves : demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aq. Org.* 46 (1):1-6.
- Arzul I., Nicolas J.L., Davison A.J. and Renault T., 2001b. French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virol.* 290(2):342-9.
- Arzul I., Renault T., Lipart C. and Davison A.J. 2001c. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *J. Gen. Virol.* 82 : 865-870.
- Arzul I., Renault T., Thebault A. and Gérard A. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.* 84(1-2):151-60.
- Asher Y., Heller M. and Becker Y. 1969. Incorporation of lipids into herpes simplex virus particles. *J. Gen. Virol.* 4: 65-76.
- Aubertin A.M., Anton M., Bingen A., Elharrar M. and Kirn A. 1977. Solubilized viral proteins produce fatal hepatitis in mice. *Nature.* 265:456-457.
- Avry y Franc 1968

- Azevedo C. and Villalba A., 1991. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 58(1):75-81.
- Bachenheimer S.L. and Roizman B. 1972. Ribonucleic acid synthesis in cells infected with herpes simplex virus. VI. Polyadenylic sequences in viral messenger ribonucleic acid. *J. Virol.* 10: 875-879.
- Bais C., Santomaso B., Coso O., Arvanitakis L., Raaka E.G., Gutkind J.S., Asch A.S., Cesarman E., Gershengorn M.C., Mesri E.A. and Gerhengorn M.C. 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature*, 391(6662):86-89.
- Barbosa-Solomieu V., Miossec L., Vázquez-Juárez R., Ascencio-Valle F. and Renault T. 2004. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *J. Vir. Meth.* 119(2): 65-72.
- Bartkoski M.J. and Roizman B. 1976. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus . XIII. Differences in the methylation patterns of viral RNA during the productive cycle. *J. Virol.* 20: 583-588.
- Batterson W. and Roizman B. 1983. Characterization of herpes-simplex virion-associated factors responsible for the induction of alpha genes. *J. Virol.* 46: 371-377.
- Batterson W., Furlong D. and Roizman B. 1983. Molecular genetics of herpes simplex virus. VII. Further characterization of a ts-mutant defective in release of viral DNA and in other stages of viral reproductive cycle. *J. Virol.* 45: 397-407.
- Beattie J.H. 1984. Effects of growth and mortality differentials on production among selected stocks of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Shell. Res.* 5: 49.
- Beattie J.H., Chew K.K. and Hershberger W.K. 1980. Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Roc. Nat. Shell. Ass.* 70:184-189.
- Ben Porat T. and Tokazewski S. 1977. Replication of herpesvirus DNA. II. Sedimentation characteristics of newly synthesized DNA. *Virol.* 79: 292-301.
- Bernard J. and Mercier A. 1993. Sequence of two EcoRI fragments from salmonis herpesvirus 2 and comparison with ictalurid herpesvirus 1. *Archives of Virology*, 132:437-442.
- Black J.B., Inoue N., Kite-Powell K., Zaki S. and Pellett P.E. 1993. Frequent isolation of human herpesvirus 7 from saliva. *Vir. Res.* 29(1): 91-98.
- Blake S., Ma J.Y., Caporale D.A., Jairath S. and Nicholson B.L. 2001. Phylogenetic relationships of aquatic birnaviruses based on deduced amino acid sequences of genome segment A cDNA. *Dis. Aquat. Organ.* 45(2):89-102.
- Blake S.L., Scill W.B., McAllister P.E., Lee M.K., Singer J.T. and Nicholoso B.L. 1995. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33:835-839.
- Bonami J.R., Cousserans F., Weppe M. and Hill B.J. 1983. Mortalities in hatchery-reared sea bass fry associated with a birnavirus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 3:41.
- Boss K.J. 1982. Mollusca. In: *Synopsis and classification of living organisms*, Vol 1 (ed SP Parker), pp 945-1166. McGraw-Hill, New-York.
- Boucharenc V. and Cadoret J.P. 1989. Deux saisons de télécapture de l'huître plate. *Aqua Revue.* 27: 37-41.

- Boudry P., Heuretbase S., Chollet B., Cornette F. and Gérard A., 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) revealed by mtDNA RFLP analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 226:279-291.
- Bournsnel M., Shaw K., Yanez R.J., Vinuela E. and Dixon L. 1991. The sequences of the ribonucleotide reductase genes from African swine fever virus show considerable homology with those of the orthopoxvirus, vaccinia virus. Virol. 184(1):411-6.
- Bovo G., Comuzi M., De Mas S., Ceschia G., Giorgetti G., Giacometti P. and Capellozza E. 1993. Isolamento di un agente virale irido-like da pesce gatto (*Ictarus melas*) d'allevamento. Boll. Soc. It. Patol. Ittica. 11:3-10.
- Bower S.M. 1988. Circumvention of mortalities caused by Denman Island disease during mariculture of *Crassostrea gigas*. In: Fisher, W.S., (ed.) Disease processes in marine bivalves. American Fisheries Society Special Publication 18, Washington, DC., pp. 246-258.
- Bowman B.H., 1989. Non-clocklike evolution in the ribosomal RNAs of bivalve molluscs. Dissertation, University of California at Berkeley.
- Browne H., Smith G., Beck S. and Minson T. 1990. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and b2 microglobulin. Nature. 347:770-772.
- Buckmaster A.E., Scott S.D., Sanderson M.J., Bournsnel M.E., Ross N.L. and Binns M.M. 1988. Gene sequence and mapping data from Mareck's disease virus and herpesvirus of turkeys: implications for herpesvirus classification. J. Gen. Virol. 69(8):2033-2042.
- Buroker N.E., Hershberger W.K., Chew K.K. 1979. Population genetics of the family *Ostreidae*. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. Mar Biol 54: 157-169.
- Cadoret J.P., Debón R., Cornudella L., Lardans V., Morvan A., Roch P. and Boulo V. 1999. Transient expression assays with the proximal promoters of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. FEBS Lett. 460(1):81-5.
- Cassinotti P., Weutz M. and Siegl G. 1993. Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. J. Med. Virol. 40:228-234.
- Cesarman E., Nador R.G., Bai F., Bohenzky R.A., Russo J.J., Moore P.S., Chang Y. and Knowles D.M. 1996. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. J. Virol. 70(11):8218-8223.
- Cheney D.P., MacDonald B.F. and Elston R.A. 2000. Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) revealed by micro-satellite-based percentage analysis of multifactorial crosses. Aquacult. 204:283-296.
- Cheng E.H.Y., Nicholas J., Bellows D.S., Hayward G.S., Guo H.G., Reitz M.S. and Hardwick J.M. 1997. A Bcl2-homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.. 94:690-694.
- Chinchar G. and Mao J. 2000. Molecular diagnosis of iridovirus infections in cold-blooded animals. Sem. Av. Exotic Pet Med. 9(1):27-35.
- Chou J. and Roizman B. 1992. The gamma 1(34.5) gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.. 89(8):3266-3270.
- Chou HY, Li HJ. and Lo CF. 1994b. Pathogenicity of a birnavirus to hard clam (*Meretrix lusoria*) and effect of temperature stress on its virulence. Fish Pathol. 29(3):171-175.

- Chou H.Y., Chang S.J., Lee H.Y. and Chiou Y.C. 1998. Preliminary evidence for the effect of heavy metal cations on the susceptibility of hard clam (*Meretrix lusoria*) to clam birnavirus infection. *Fish Pathol.* 33:213-219.
- Chou J., Poon AP., Johnson J. and Roizman B. 1994a. Differential response of human cells to deletions and stop codons in the gamma(1)34.5 gene of herpes simplex virus. *J. Virol.* 68(12):8304-8311.
- Christie E.K., Harvarstein L.S., Djupvik H.O., Ness S. and Enderson C. 1988. Characterization of a new serotype of infectious pancreatic necrosis virus isolated from atlantic salmon. *Arch. Virol.* 103:167-177.
- Chua F.H.C., Ng M.L., Ng K.L. Loo J.J. and Wee J.Y. 1994. Investigation of outbreaks of a novel disease, "Sleepy Grouper Disease" affecting the brown-spotted grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.* 33:201-206.
- Chun S.K. 1979. Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). *Bull. Korean Fish. Soc.* 12(4):281-285.
- Clavert J.G., Nagy E., Soler M. and Dobos P. 1991. Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 72:2563-2567.
- Coe, W.R., 1932. Sexual phases in the American oyster (*Ostrea virginica*). *Biol. Bull.*, 63 : 419-441
- Cohen JJ. 1998. Apoptosis: physiologic cell death. *J. Lab. Clin. Med.* 124(6):761-765.
- Comps M. 1970. La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristique et évolution des altérations, processus de cicatrisation. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 34(1):23-44.
- Comps, M. 1980. Les infections virales associées aux épizooties des huîtres du genre *Crassostrea* CIEM, Réunion spéciale sur les maladies des poissons, crustacés et coquillages d'importance commerciale. Copenhague, 1980.
- Comps M. 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse pour obtenir le grade de Docteur d'Etat de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc. pp 128.
- Comps M. 1988. Epizootic disease of oysters associated with viral infections. In: Fisher, W.S. (ed.) *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Am. Fish. Soc. Special publication Bethesda, MD. 18: 23-37.
- Comps M. and Bonami J.R. 1977. Infection virale associée a des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Th. C.R. Acad. Sci. D. Sci. Nat. 285:1139-1140.
- Comps M. and Cochenne N. 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *J. Inv. Pathol.*, 62:201-203.
- Comps M. and Duthoit J.L. 1976. Virus infection associated with gill disease of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *C.R. Acad. Sci. D Sci. Nat.* 283(14):1595-1596.
- Comps M. and Pichot Y. 1991. Fine spore structure of a haplosporidian parasitizing *Crassostrea gigas*: taxonomic implications. *Dis. Aquat. Organ.* 11: 73-77.
- Comps M. Bonami J.R. and Vago C. 1977. Mise en évidence d'une infection rickettsienne chez les huîtres. *C.R. Acad. Sci. D.* 285(4):426-429.
- Comps M., Park M.S. and Desportes I. 1986. Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n.g., n. sp. parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* Th. *Protistologica.* 22(3): 279-285.

- Comps M., Park M.S. and Desportes I. 1987. Fine structure of *Marteilioides chungmuensis* n.g., n. sp. parasite of the oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquacult.* 67:264-265.
- Comps M., Bonami J.R., Vago C. and Campillo A. 1976. Une virose de l'huitre portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *C.R. Acad. Sci. D.* 282: 1991-1993.
- Comps M., Bonami J.R., Vago C. and Razet D. 1976. La mise en évidence d'une infection virale chez l'huitre portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974. *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches Marit.* 256: 13-15.
- Constanzo F., Campadelli-Fiume G., Foa-Thomas L. and Cassai E. 1977. Evidence that the herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase II. *J. Virol.* 21:996-1001.
- Cuillet M., Tripier F., Braunwald J., Jacrot B. 1979. A low resolution structure of frog virus 3. *Virol.* 99: 277-285.
- Curry S.S., Brown D.R., Gaskin J.M., Jacobson J.R., Erhart L.M., Blahak S., Herbst L.H. and Klein P.A. 2000. Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater. *J. Wild. Dis.* 36(4):792-797.
- Cutrin J.M., Oliveira J.G., Barja J.L. and Dopazo C.P. 2000. Diversity of infectious pancreatic necrosis virus strains isolated from fish, shellfish, and other reservoirs in Northwestern Spain. *Appl Environ Microbiol.* 66(2):839-43.
- Dales S. and Chardonneret Y. 1973. Early events in the interaction of adenovirus with HeLa Cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. *Virol.* 56: 465-483.
- Darai G., Delius H., Clarke J., Apfel H., Schnitzler P. and Flügel R.M. 1985. Molecular cloning and physical mapping of the genome of fish lymphocystis disease virus. *Virol.* 146:292-301.
- Darai G., Anders K., Koch H.G., Delius H., Gelderblom H., Samalecos C. and Flügel R.M. 1983. Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumors of pleuronectes. *Virol.* 126:466-479.
- Darcy F. and Devauchelle G. 1987. Animal virus structure. Nermut M.V. and Steven A.C., eds. Amsterdam: Elsevier.
- Darcy-Tripier F., Nermut M. V., Braunwald J. and Williams L. D. 1984. The organization of Frog virus 3 as revealed by freeze-etching. *Virol.* 138:287-299.
- Darlington RW. and Moss LH. 1969. The envelope of herpesvirus. *Prog. Med. Virol.*, 11, 16-45.
- Davison A.J. 1992. Channel catfish virus : a new type of herpesvirus. *Virol.*, 186:9-14.
- Davison A.J. 1998. The genome of salmonid herpesvirus 1. *J. Virol.* 72(3):1974-1982.
- Davison A.J., 2002. Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 86:69-88.
- Davison A.J. and Mc Geoch D.J., 1995. *Herpesviridae*. In: Molecular basis of virus evolution, (ed A.J. Gibbs, C.H. Calisher and Garcia-Arenal F.), pp 290-309. Cambridge University Press, Cambridge.
- Davison A.J. and Taylor P. 1987. Genetic relations between varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus. *J. Gen. Virol.*, 68:1067-1079.
- Davison A.J. and Wilkie N.M. 1983. Either orientation of the L segment of the Herpes simplex virus genome may participate in the production of viable intratypic recombinants. *J. Gen. Virol.* 64(1):247-250.

- Davison A.J., Sauerbier W., Dolan A., Addison C. and McKinnell R.G. 1999. Genomic studies of the Lucke tumor herpesvirus (RaHV-1). *J. Cancer Res. Clin. Onc.* 125(3-4):232-238.
- De Kinkelin P., Michel C.H. and Ghittino P. 1985. Virus et viroses. In: Précis de Pathologie des Poissons (ed INRA-OIE), pp 65-94. Lavoisier, Paris.
- Deng M., He J.G., Weng S.P., Zeng Z. and Long Q.X. 2001b. Molecular cloning and physical mapping of the genome of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *Chin. J. Virol.* [Abstract in English]. 17: 273-276.
- Deng M., He J.G., Weng S.P., Zeng K., Zeng Z. and Long Q.X. 2001a. Purification and genomic analysis of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from mandarin fish. *J. Fish. China.* [Abstract in English]. 25:238-343.
- Deng M., He J.G., Zuo T., Weng S.P., Zeng K. and Lu L. 2000. Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from *Siniperca chuatsi* :development of a PCR detection method and the new evidence of iridovirus. *Chin. J. Virol.* 6:365-369. [Abstract in English].
- Deniau S. 2000. Essais de propagation *in vitro* de virus de type herpès infectant les mollusques bivalves marins et contribution à l'étude des interactions hôte-virus. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole pratique des Hautes Etudes, Science de la Vie et de la Terre, pp 189.
- Derfuss T., Fickenscher H., Kraft M.S., Henning G., Lengenfelder D., Fleckenstein B. and Meini E. 1998. Antiapoptotic activity of the herpesvirus saimiri-encoded Bcl-2 homolog: stabilization of mitochondria and inhibition of caspase-3-like activity. *J. Virol.* 72(7):5897-5904.
- Deslous-Paoli J.M., Héral M., Berthome J.P., Razet D. and Garnier J. 1981. Reproduction naturelle de *Crassostrea gigas* Thunberg dans le bassin de Marennes-Oléron en 1979 et 1981: aspects biochimiques et énergétiques. *Rev. Travx. Ins. Peches Marit.* 45(4) 319-327.
- Devauchelle N. 1989. La reproduction des mollusques bivalves en éclosion. *Haliotis.* 19 :315-324.
- Dobos P. 1993. *In vitro* guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virol.* 193 :403-413.
- Dopazo C.P., Hetrick F.M. and Samal S.K. 1994. Use of cloned cDNA probes for diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus infections. *J. Fish Dis.* 17:1-16.
- Dukes T.W. and Lawler A.R. 1975. The ocular lesions of naturally occurring lymphocystis in fish. *Can. J. Comp. Med.* 39:406-410.
- Dungan C. and Elston R.A. 1988. Histopathological and ultrastructural characteristics of bacterial destruction of the hinge ligaments of cultured juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquacult.* 72:1-14.
- Dungan C., Elston R.A. and Schiewe M. 1989. Evidence for colonization and destruction of hinge ligaments in cultured Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) by cytophaga-like bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 55(5):1128-1135.
- Ehlers B., Borchers K., Grund C., Frolich K., Ludwig H. and Buhk H.J. 1999. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes.* 18(3):211-20.
- Elliot R.M. and Kelly D.C. 1980. Frog virus 3 replication: induction and intracellular distribution of polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 33:28-51.
- Elston R.A. 1979. Virus-like particles associated with lesions in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *J. Inv. Pathol.*, 33:71-74.

- Elston R.A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. J. World Maricult. Soc. 15:284-300.
- Elston R.A. 1993. Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Ann. Rev. Fish. Dis. 259-276.
- Elston R.A. 1997. Special Topic Review: bivalve mollusc viruses. W. J. Microbiol. Biotechnol. 13:393-403.
- Elston R.A. and Wilkinson M.T. 1985. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). Aquacult. 48: 189-210.
- Elston R.A., Beattie J.H., Friedman C.S., Hedrick R.P. and Kent M.L. 1987. Pathology and significance of fatal inflammatory bacteraemia in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thünberg. J. Fish Dis. 10:121-132.
- Epstein M.A. 1962. Observations on the fine structure of mature herpes simplex virus and on the composition of its nucleoid. J. Exp. Med. 115:1-12.
- Emande B. 2001. Développement, plasticité phénotypique et évolution. Thèse de Doctorat de l'Université de La Rochelle, France.
- Emande B., Boudry P., Hurtebise S., Haure J. and Martin J.L. 2000. Genetic basis of growth, survival and their plasticity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Actes du colloque 'AQUA 2000'. Nice, 2-6 mai 2000.
- Etteradossi N., Arnauld D., Toquin D. and Rivallan G. 1998. Critical amino-acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. Arch. Virol. 143:1627-1636.
- Fang Q., Ai T.S., Zou G.P., Yu Y.Z., Liu J.X. and Wang Y.P. 2000. Study of the *Siniperca chuatsi* viral pathogen and its infectious characteristics in fish cells. Virol. Sinica [in Chinese] 15:297-301.
- F.A.O. 2003. Aquaculture production, quantities and values. Fishstat Plus. <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp#Download>.
- F.A.O. 1996. List of animal species used in Aquaculture. FAO Fisheries Circular No. 914 FIRI/C914.
- F.A.O. 1999. Statistiques de la production de l'aquaculture. Circulaire sur les pêches N° 815, Révision 11, pp 203.
- Farley C.A. 1978. Viruses and viruslike lesions in marine molluscs. Mar. Fish. Rev. 40(10):18-20.
- Farley C.A., Wolf P.H. and Elston R.A. 1988. A long-term study of « microcell » disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (G.N.) and two new species, *Mikrocytos mackini* (Sp. N) and *Mikrocytos roughleyi* (Sp. N.). Fish Bull. 86(3) : 581-593.
- Farley C.A., Banfield W.G., Kasnic J.R.G. and Foster W.S. 1972. Oyster herpes-type virus. Science, 178:759-760.
- Federici B.A. and Bigot Y. 2003. Origin and evolution of polydnviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. J. Insect Physiol. 49:419-432.
- Feldmann G. 1995. L'apoptose ou mort cellulaire programmée. Anat. Pathol. 15(2):92-109.
- Fenwick M., Morse L.S. and Roizman B. 1979. Anatomy of herpes simplex virus DNA. XI. Apparent clustering of functions effecting rapid inhibition of host DNA and protein synthesis. J. Virol. 29:825-827.
- Fijan N. 1968. Progress report on acute mortality of channel catfish fingerlings caused by a virus. Bull. Off. Int. Epizooties. 69(7):1167-1168.

- Fong C.K.Y., Tenser R.B., Hsiung G.D. and Gross P.A. 1973. Ultrastructural studies of the envelopment and release of guinea pig herpes-like virus in cultured cells. *Viol.* 52:468-477.
- Francis-Floyd R., 1992. Comparative hematology for largemouth bass (*Micropterus salmonides*) and black crappie (*Pomoxis nigromaculatus*) from Lake Weir, Lake Holy, and Newman's Lake. Final Report. Florida Freshwater Game and Fish Commission, Tallahassee, FL.
- Frenkel N., Schirmer E.C., Wyatt L.S., Katsafanas G., Roffman E., Danovich R.M. and June C.H. 1990. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* 87(2):748-752.
- Friedman C.S. and Hendrick R.R. 1991. Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. *J. Invert. Pathol.* 57:109-120.
- Friedman C.S., Beattie J.H., Elston R.A. and Hedrick R.P. 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquacult.* 94:1-15.
- Fuller A.O. and Lee W.C. 1992. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol.* 66(8):5002-5012.
- Furlong D., Swift H. and Roizman B. 1972. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J. Virol.* 10:1071-1074.
- Galtsoff P.S., 1961. Physiology of reproduction in molluscs. *Am. Zool.* 1:273-289.
- Garcia-Blanco M.A. and Cullen B.R. 1991. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science*, 254:815-820.
- Gérard A. 1998. Avancées récentes sur la reproduction des huîtres. *Pisciculture Francaise.* 134:71-76
- Gérard A., Naciri-Graven Y., Boudry P., Launay S., Heurtebise S., Ledu C. and Phélipot P. 1995. Contrôle de la gamétogenèse des huîtres creuses et plates. Relations "reproduction" et "génétique". *In : La reproduction naturelle et contrôlée des bivalves cultivés en France. Rapport de groupe de travail. Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER*, pp 99-112.
- Glude J.B. 1975. A summary report of Pacific coast oyster mortality investigations 1965-1972. *Proc. 3rd U.S. Japan Meet. Aquac., Tokyo, Oct. 15-16 1974. In Spec. Publ. Fish. Agency, Jap. Gouv. & Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab. Nigata., Jap.* 1-28.
- Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslow J.P. and Paloetti E. 1990. *Viol.* 179:247-266.
- Gompels U.A. and Macaulay H.A. 1995. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J. Gen. Virol.* 76(2):451-458.
- Goorha R. 1981. Frog virus 3 requires RNA polymerase II for its replication. *J. Virol.* 37: 496-499.
- Goorha R. 1982. Frog virus 3 DNA repliation occurs in two stages. *J. Virol.* 43:519-528.
- Goorha R. and Murti K.G. 1982. The genome of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 248-262.
- Goorha R. Murti G., Granoff A. and Tirey R. 1978. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3: VIII. The nucleus is a site of frog virus 3 DNA and RNA synthesis. *Virology.* 84:32-50.
- Gould A.R., Hyatt A.D., Hengstberger S.H., Whittington R.J. and Coupar B.E.H. 1995. A polymerase chain reaction (PCR) to detect epizootic hematopoietic necrosis virus and Bohle iridovirus. *Dis. Aquat. Organ.* 22:211-215.

- Granoff A. and Darlington R.W. 1969. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. VIII. Electron microscopic evidence for the presence of herpesvirus in the urine of a Lucke tumor-bearing frog. *Virology*. 38:197-200.
- Granoff A., Came P.E. and Breeze D.C. 1966. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. *Virology*. 29: 133-148.
- Gray W.L., Williams R.J., Jordan R.L. and Griffin B.R. 1999. Detection of channel catfish virus DNA in latently infected catfish. *J. Gen. Virol.* 80(7):1817-1822.
- Grinwis G.C.M., Wester P.W., Kamstra A., Van de Brandhof E.F.J., Van dijk J.E., Leewis R.J., Vaal M.A., Vethaak A.D. and Vos J.G. 1995. Laboratory maintenance, topographical anatomy and histology of flounder, *Platichthys flesus*. National Institute of Public Health and Environmental protection, Bilthoven, Hetherlands (Rapp. No. 732402 001)
- Grizel H. 1993. World bivalve culture. *W. Aquacult.* 24(2):18-23.
- Grizel H. 1996. Quelques exemples d'introductions et de transferts de mollusques. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15 (2), 401-408.
- Grizel H. and M. Héral, 1991. Introduction into France of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Const. Int. Explor. Mer.*, 47:399-403.
- Grizzle J.M., Altinok I., Fraser W.A. and Francis-Floyd R. 2002. First isolation of largemouth bass virus. *Dis. Aquat. Organ.* 50:233-235.
- Hada H.S., West P.A., Lee J.V., Stemmler J. and Colwell R.R. 1984. *Vibrio tubiashi* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34(1):1-4.
- Hahn G., Jores R. and Mocarski E.S. 1998. Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 95(7):3937-3942.
- Hall LM., Draper KG., Frink RJ., Costa RH. and Wagner EK. 1982. Herpes simplex virus mRNA species mapping in EcoRI fragment I. *J. Virol.* 43:594-607.
- Hanon E., Vanderplasschen A., Lyaku S., Keil G., Denis M. and Pastoret PP 1996. Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 70(6):4116-4120.
- He J.G., Weng S.P., Huang Z.J. and Zeng K. 1998. Identification of outbreak and infectious diseases pathogen of *Siniperca chuatsi*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* [Abstract in English]. 5:74-77.
- He J.G., Deng M., Weng S.P., Li Z., Zhou S.Y., Long Q.X., Wang X.Z. and Chan S.M. 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*. 291:126-139.
- He J.G., Lu L., Deng M., He H.H., Weng S.P., Wang X.H., Zhou S.Y., Long Q.X., Wang X.Z. and Chan S.M. 2002. Sequence analysis of the complete genome of an iridovirus isolated from the tiger frog. *Virology*. 292:185-197.
- Hedrick R.P. and McDowell T.S. 1995. Properties of iridoviruses from ornamental fish. *Vet. Res.* 26:423-427.
- Hedrick P.R., Eaton W.D., Fryer L.J., Groberg W.G. and Bonnyaratapalin S. 1986. Characteristics of a birnavirus isolated from cultured sand goby *Onyeleotris marmoratus*. *Dis. Aquat. Organ.* 1:219-225.
- Hedrick R.P., McDowell T.S., Ahne W., Torhy C. and Kinkelin P.D.E. 1992. Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Organ.* 13:203-209.

- Heine J.W., Honess R.W., Cassai E. and Roizman B. 1974. Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type I strains. *J. Virol.* 14:640-651.
- Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G. and Rickinson A. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* 90(18):8479-8483
- Heppell J. and Berthiaume L. 1992. Ultrastructure of lymphocystis disease virus (LDV) as compared to frog virus 3 (FV3) and chilo iridescent virus (CIV): effects of enzymatic digestions and detergent degradations. *Arch Virol.* 125(1-4):215-26.
- Heppell J., Berthiaume L., Tarrab E., Lecomte J. and Arella M. 1992. Evidence of genomic variations between infectious pancreatic necrosis virus strains determined by restriction fragment profiles. *J. Gen. Virol.* 73:2863-2870.
- Héral M. 1986. L'ostréiculture française traditionnelle. *In: Aquaculture. Vol 1 (ed G Barnabé), pp 345-390.* Lavoisier, Paris.
- Héral M. and Deslous-Paoli J.M. 1991. Oyster culture in European countries. *In: Estuarine and Marine bivalve mollusk culture. (ed. Menzel W.), CRC Press, Boca Raton, pp 153-190.*
- Herbst LH. 1994. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Ann. Rev. Fish Dis.* 4:389-425.
- Hershberger W.K., Perdue J.A. and Beattie J.H. 1984. Genetic selection and systematic breeding in Pacific oyster culture. *Aquacult.* 39:237-245.
- Hill B.J. 1976. Mollusc viruses: their occurrence, culture and relationships. In "Proceedings of the first international colloquium on invertebrate pathology" pp 25-29.
- Hill B.J. 1982. Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In: Roberts R.J. (ed) *Microbial diseases of fish.* Academic press, London, pp 91-114.
- Hill B.J. and Alderman D.J. 1977. Observations on the experimental infection of *Ostrea edulis* with two molluscan viruses. *Haliotis.* 8: 297-299.
- Hill B.J., Way K. and Alderman D.J. 1986. IPN-like birnaviruses in oysters: infection or contamination. *Eur. Aquicult. Soc. Spec. Publ.* 9, 297.
- Hine P.M. and Thorne E.T. 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi* (Sowerby, 1871): an ultrastructural study. *Dis. Aquat. Organ.* 29: 189-196.
- Hine P.M., Wesley B. and Besant P. 1998. Replication of a herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis. Aquat. Organ.* 32:161-171.
- Hine P.M., Wesley B. and Hay B.E. 1992. Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Organ.* 12(2): 135-142.
- Homa F.L. and Brown J.C. 1997. Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev. Med. Virol.* 7:107-122.
- Honess R.W. 1984. Herpes simplex and "the herpes complex": diverse observations and a unifying hypothesis. *J. Gen. Virol.* 65:2077-2107.
- Honess R.W. and Roizman B. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14:8-19.
- Honess R.W. and Roizman B. 1975. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis : sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* 72:1276-1280.

- Honess R.W., Gompels U.A., Barrell B.G., Craxton M., Cameron K.R., Staden R., Chang Y.N. and Hayward G.S. 1989. Deviations from expected frequencies of CpG dinucleotides in herpesvirus DNAs may be diagnostic of differences in the states of their latent genomes. *J. Gen. Virol.* 70(4):837-855.
- Hong J.R., Gong H.Y. and Wu J.L.H. 2002. IPNV VP5, a novel anti-apoptosis gene of the Bcl-2 family, regulates Mcl-1 and viral protein expression. *Virol.* 295(2):217-229.
- Hosono N., Suzuki S. and Kusuda R. 1996. Genogrouping of birnaviruses isolated from marine fish: a comparison of VP2/NS junction regions on genome segment. *A. J. Fish Dis.* 19:295-302.
- Houts G.E., Gravell M. and Darlington R.W. 1970. Base composition and molecular weight of DNA from a frog polyhedral cytoplasmic deoxyribovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135 :232-236.
- Hsu D-H., de Waal Malefyt R., Fiorentino D.F., Dang M-N., Vieira P., deVries J., Spits H., Mosmann T.R. and Moore K.W. 1990. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science.* 250:830-832.
- Hu S., Vincenz C., Buller M. and Dixit VM. 1997. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272(15):9621-9624.
- Huang C.C. and Song Y.L. 1999. Maternal transmission of immunity to white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev Comp Immunol.* 23(7-8):545-52.
- Huang A.S. and Wagner R.R. 1964. Penetration of herpes simplex virus into human epidermoid cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116:863-869.
- Hurby D.E., Maki R.A., Miller D.B. and Ball L.A. 1983. Fine structure analysis and nucleotide sequence of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 3411-3415.
- Huvet A., Boudry P., Ohresser M., Delsert C. and Bonhomme F. 2000. Variable microsatellites in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Anim. Genet.* 31(1):71-2.
- Hyatt A.D., Gould A.R., Zupanovic Z., Cunningham A.A., Hengstberger S., Whittington R.J., Kattenbelt J. and Coupar B.E.H. 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.* 145:301-331.
- Inoue Y., Yasukawa M. and Fujita S. 1997. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J. Virol.* 71(5):3751-3759.
- Inouye K., Yamano K., Maeno Y. et al. 1992. Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.* 27: 19-27.
- Islam M.R., Zierenberg K. and Muller H. 2001. The genome segment B encoding the RNA-dependent RNAPolymeraseprotein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Arch. Virol.*146:2481-2492.
- Jacob R.J. and Roizman B. 1977. Anatomy of herpes simplex virus DNA. VIII. Properties of the replicating DNA. *J. Virol.* 23:394-411.
- Jacob R.J., Morse L.S. and Roizman B. 1979. Anatomy of herpes simplex virus DNA. XIII. Accumulation of head to tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA. *J. Virol.* 29:448-457.
- Jeffries V.E. 1982. Three vibrio strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquacult.* 29:201-226.

- Johnson D.C. and Spear P.G. 1982. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.* 43:1102-1112.
- Johnson D.C. and Spear P.G. 1983. O-Linked oligosaccharides are attached to herpes simplex virus glycoproteins in the Golgi apparatus. *Cell.* 32:987-997.
- Johnson D.C., Burke R.L. and Gregory T. 1990. Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *J. Virol.* 64:2569-2576.
- Jongeneel C.V. and Bachenheimer S.L. 1981. Structure of replicating herpes simplex virus DNA. *J. Virol.* 39(2):656-660.
- Kaplan AS. and Ben-Porat T. 1959. The effect of pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and on the nuclei of rabbit kidney cells. *Virology.* 8:352-366.
- Karlin S., Doerfler W. and Cardon L.R. 1994. Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses. *J. Virol.* 68(5):2889-2897.
- Katkansky S.C. and Warner R.W. 1970. Sporulation of a haplosporidan in a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Humboldt Bay, California. *J. Fish. Res. Board Can.* 27(7): 1320-1321.
- Katkansky S.C., Sparks A.K. and Chew K.K. 1967. Distribution and effects of the endoparasitic copepod, *Myticola orientalis*, on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, on the Pacific coast. *Proc. Nat. Shellfish. Assoc.* 57:50-58.
- Kawanishi M. 1997. Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody. *J. Virol.* 71(4):3319-3322.
- Kawanishi M. 2000. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) enhances TNF alpha-induced apoptosis of intestine 407 epithelial cells: the role of LMP1 C-terminal activation regions 1 and 2. *Virology.* 270(2):258-266.
- Keir H.M. 1968. Virus-induced enzymes in mammalian cells infected with DNA-viruses. In : *The molecular biology of viruses* (ed LV Crawford and MGP Stoker), pp 67-99. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kenchington E.L., Roddick R.K., Singh R.K. and Bird C.J. 1994. Analysis of small-subunit rRNA gene sequences from six families of molluscs. *J. Mar. Biotechnol.* 1:215-217.
- Kern F.G. 1976. Sporulation of *Minchinia* sp. (*Haplosporidia*, *Haplosporididae*) in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thünberg) from the Republic of Korea. *J. Protozool.* 23(4):498-500.
- Kibenge F.S.B. and Dhama V. 1997. Evidence that virion-associated VP1 of avibirnaviruses contains viral RNA sequences. *Arch. Virol.* 142:1227-1236.
- Kieff E. and Liebowitz D. 1990. Epstein-Barr virus and its replication. In: *Field's Virology*, 2nd edition (ed BN Fields and DM Knipe), pp 1889-1920. Raven Press, New York.
- Kieff E. and Shenk T. 1998. Modulation of apoptosis by Herpesviruses. *Semin. Virol.* 8:471-480.
- Kishi M., Bradley G., Jessip J., Tanaka A. and Nonoyama M. 1991. Inverted repeat regions of Mareck's disease virus DNA possess a structure similar to that of the a sequence of the herpes simplex virus DNA and contain host cell telomere sequences. *J. Virol.*, 65:2791-2797.
- Kit S. and Dubbs D.R. 1963. Acquisition of thymidine kinase activity by herpes simplex infected mouse fibroblast cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 11:55-59.

- Kitamura S.I., Jung S.J. and Suzuki S. 2000. Seasonal change of infective state of marine birnavirus in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata*. Arch. Virol. 145:2003-2014.
- Kitamura S., Kamata S., Nakano S. and Suzuki S. 2003. Detection of marine birnavirus genome in zooplankton collected from the Uwa Sea, Japan. Dis. Aquat. Organ. 54(1):69-72.
- Koganezawa A. 1975. Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Proc. 3rd U.S. Japan. Meet. Aquac., Tokyo. Oct. 15-16 1974. In Spec. Publ. Fish. Agency, Jap. Gouv. And Jap. Sea Reg. Fish. Res. Lab. Nigata, Jap. 29-34.
- Kondo K., Kaneshima H. and Mocarski E.S. 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A. 91(25):11879-11883.
- Kondo K., Xu J. and Mocarski E.S. 1996. Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A. 93(20):11137-11142.
- Kondo K., Kondo T., Okuno T., Takahashi M. and Yamanishi K. 1991. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. J. Gen. Virol. 72(6):1401-1408.
- Kraft M.S., Henning G., Fickenscher H., Lengenfelder D., Tschopp J., Fleckenstein B. and Meinel E. 1998. Herpesvirus saimiri transforms human T-cell clones to stable growth without inducing resistance to apoptosis. J. Virol. 72(4):3138-3145.
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gelebart F., Cordevant C., Lange M. and Poulet S.A. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis. Aquat. Organ. 46(2):139-45.
- Ladin B.F., Blankenship M.L. and Ben-Porat T. 1980. Replication of herpesvirus DNA. V. The maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. J. Virol. 33:1151-1164.
- Langdon J.S. 1989. Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. J. Fish Dis., 12, 295-310.
- Langdon J.S., Humphrey J.D., Williams L.M., Hyatt A.D. and Westbury H.A. 1986. First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redbfin perch *Perca fluviatilis*. J. Fish Dis. 9:263-268.
- Le Borgne Y. 1989. Reproduction contrôlée des mollusques bivalves. In : Aquaculture. Vol 1 (ed G Barnabé), pp 275-286. Lavoisier, Paris.
- Le Deuff R.M. 1995. Contribution à l'étude de virus de mollusques marins apparentés aux *Iridoviridae* et aux *Herpesviridae*. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II, 234 pp
- Le Deuff R.M. and 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. and Gérard A. 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dis. Aquat. Organ. 24: 149-157.
- Le Deuff R.M., Nicolas J.L., Renault T. and Cochennec N. 1994. Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., 14(2):69-72.
- Leong J.C., Brown D., Dobos P., Kibenge F.S., Ludert J.E., Muller H., Mundt E. and Nicholson B. 2001. Family *Birnaviridae*. In: Virus Taxonomy, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (eds. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B.), pp 203-225. Academic Press.

- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Nicolas J.L., Gouy M. and Berthe F. 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on gyrB gene sequences. *Dis. Aquat. Organ.* 58(2-3):143-50.
- Le Roux F., Gay M., Lambert C., Waechter M., Poubalanne S., Chollet B., Nicolas J.L. and Berthe F. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* 15 : 251-258.
- Lipart C. and Renault T. 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J. Virol. Meth.* 101(1-2):1-10.
- Little T.J., O'Connor B., Colegrave N., Watt K. and Read A.F. 2003. Maternal transfer of strain-specific immunity in an invertebrate. *Curr. Biol.* 13(6):489-92.
- Lombardo E., Maraver A., Caston J.R., Rivera J., Fernandez-Arias A. Serrano A., Carrascosa J.L. and Rodriguez J.F. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73:6973-6983.
- Longy M., Duboue B., Soubeyran P. and Moynet D. 1997. Method for the purification of tissue DNA suitable for PCR after fixation with Bouin's fluid. Uses and limitations in microsatellite typing. *Diagn Mol Pathol.* 6(3):167-73.
- Lo C.F., Hong Y.W., Huang S.Y. and Wang C.H. 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* 23:147-154
- Loosanoff V.L. and Davis H.C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. In : *Advances in Marine Biology*, 1 (ed FS Russel), pp 1-136. Academic Press Inc., Londres.
- Lopez-Lastra M., González M., Jashes M. and Sandino A.M., 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR). *J. Fish Dis.* 17: 269-282.
- Lorbacher de Ruiz H., Gelderblom H., Hofmann W. and Darai G. 1986. Insect iridescent virus type 6 induced toxic degenerative hepatitis in mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 175:43-53.
- Lu Y., Yu Q., Zamzow J.P., Wang Y., Losey G.S., Balazs G.H., Nerurkar V.R. and Yanagihara R. 2000. Detection of Green Turtle Herpesviral Sequence in Saddleback Wrasse *Thalassoma duperrey*: A possible mode of transmission of Green Turtle Fibropapilloma. *J. Aq. Anim. Health.* 12(1):58-63.
- Luppi M., Barozzi P., Morris C., Maiorana A., Garber R., Bonacorsi G., Donelli A., Marasca R., Tabilio A. and Torelli G. 1999. Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *J. Virol.* 73(1):754-759.
- Lusso P., Secchiero P., Crowley R.W., Garzino-Demo A., Berneman Z.N. and Gallo R.C. 1994. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* 91(9):3872-3876.
- Lycke E. 1985. Virological aspects on herpesvirus infections. *Scand. J. Inf. Dis.* 47:9-15.
- Mao J., Hedrick R.P. and Chinchar V.G. 1997. Molecular characterization, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virol.* 229:212-220.
- Mao J., Wang J., Chinchar G.D. and Chinchar V.G. 1999. Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Dis. Aquat. Organ.* 37:107-114.
- Mao J., Tham T.N., Gentry G.A., Aubertin A. and Chinchar V.G. 1996. Cloning, sequence analysis and expression of the major capsid protein (MCP) of the Iridovirus frog virus 3. *Virol.* 216 (2):431-436.

- Marsh I.B., Whittington R.J., O'Rourke B., Hyatt A.D. and Chisholm O. 2002. Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Mol. Cell Probes*. 16(2):137-51.
- Marteil, L. 1976. La conchyliculture française, 2^{ème} partie: biologie de l'huître et de la moule. Chapitre VI: maladies et mortalités. *Rev. Travx. Inst. Pêches Marit*. 40: 285-313. [In French].
- Martins A., Ribeiro G., Marques M.I. and Costa J.V. 1994. Genetic identification and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of African swine fever virus. *Nucl. Acid. Res*. 22:208-213.
- Mastino A., Sciortino M.T., Medici M.A., Perri D., Ammendolia M.G., Grelli S., Amici C., Pernice A. and Guglielmino S. 1997. Herpes simplex virus 2 causes apoptotic infection in monocytoid cells. *Cell Death Diff*. 4:629-638.
- Mathers N.F., Wilkins N.P. and Walne P.R. 1974. Phosphoglucose isomerase and esterase phenotypes in *Crassostrea angulata* and *C. gigas*. *Biochem. Syst. Ecol*. 2:93-96.
- Matsusato T., Hoshina T., Arakawa K.Y. and Masumura K. 1977. Studies on the so-called abnormal egg-mass of Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) - I. Distribution of the oyster collected in the coast of Hiroshima Pref., and parasite in the egg-cell. *Bull. Hiroshima Fish. Exptal. St*. 8:9-25.
- Mattern C.F., Hruska J.F. and Diamond L. 1974. Virus of *Entamoeba histolica*. V. Ultrastructure of the polyhedral virus V 301. *J. Virol*. 247-249.
- Mattiucci S. and Villani F. 1983. Electrophoretic study of gene-enzyme systems in oysters classified as *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* *Mollusca Ostreidae*. *Parassitologia (Rome)* 25 (1): 21-28.
- Maurer D. and Comps M. 1986. Mortalités estivales de l'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon: facteurs du milieu, aspects biochimiques et histologiques. *In: Pathology in Marine Aquacult*. Vivarès, C.P., Bonami J.R. and Jaspers E. (eds). European Aquaculture Society, Special Publication No. 9. Bredene, Belgium. 29-41.
- Mayo M.A. and Pringle C.R. 1998. Virus taxonomy 1997. *J. Gen. Virol*. 79(4):649-657.
- Mazón-Suastegui J.M. 1996. Cultivo de Ostión Japonés. *In: Estudio del Potencial Pesquero y Acuicola de Baja California Sur* (eds. Margarita Casas Valdez y Germán Ponce Díaz), pp 625-650.
- Mc Combs R., Brunschwig J.P., Mirkovic R. and Benyesh-Melnick M., 1971. Electron microscopic characterization of a herpes-like virus isolated from three shrews. *Virology*. 45:816-820.
- Mc Geoch D.J. 1990. Evolutionary relationships of virion glycoprotein genes in the S regions of alphaherpesvirus genomes. *J. Gen. Virol*. 71(10):2361-2367.
- Mc Geoch D.J. 1992. Molecular evolution of large DNA viruses of eukaryotes. *Sem. Virol*. 3:399-408.
- Mc Geoch D.J., Cook S., Dolan A., Jamieson F.E. and Telford E.A.R. 1995. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J. Mol. Biol*. 247:443-458.
- Mc Geoch D.J., Dalrymple M.A., Davison A.J., Dolan A., Frame M.C., McNab D., Perry L.J., Scott J.E. and Taylor P. 1988. Some highlights of animal virus research in 1987. *J. Gen. Virol*. 69:1531-1574.
- Mendelson M., Monard S., Sissons P. and Sinclair J. 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol*. 77(12):3099-3102.
- Menzel R.W. 1974. Portuguese and Japanese Oysters are the same species. *J. Fish. Res. Board Can*. 31(4):453-456.

- Milne R.S., Connolly S.A., Krummenacher C., Eisenberg R.J. and Cohen G.H. 2001. Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/nectin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology*. 281(2):315-328.
- Minson A.C., Davison A.J., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., McGeoch D.J., Pellett P.E., Roizman B. and Studdert M.J. 2000. *Herpesviridae*. In: *Virus Taxonomy*, 7th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (eds. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B.), pp 203-225. Academic Press.
- Minton E.J., Tysoe C., Sinclair J.H. and Sissons J.G. 1994. Human cytomegalovirus infection of the monocyte/macrophage lineage in bone marrow. *J. Virol.* 68(6):4017-4021.
- Mirandola P., Ravaioli T. and Cassai E. 1997. PCR analysis of human telomeric repeats present on HHV-6A viral strains. *Virus Genes*. 15(1):29-32.
- Mizell M. and Zambarnard J. 1965. Viral particles of the renal adenocarcinoma : causative agent or passenger virus? II. A promising model system for the demonstration of a "lysogenic" state in a metazoan tumor. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* 126:146-169.
- Mocarski E.S. 1996. Cytomegalovirus and their replication. In: *Field's Virology*, 3rd edition (ed BN Fields, DM Knipe and PM Howley), pp 2447-2492. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
- Moret Y. and Schmid-Hempel P. 2001. Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature*. 414(6863):506.
- Morgan C., Rose H.M. and Mednis B. 1968. Electron microscopy of herpes simplex virus. I. Entry. *J. Virol.*, 2:507-516.
- Morgan C., Rose H.M., Holden M. and Jones EP. 1959. Electron microscopic observations on the development of herpes simplex virus. *J. Exp. Med.* 110:643-656.
- Mori T. 1935. *Mytilicola orientalis*, a new species of parasitic copepod. *Zool. Mag., Tokyo.* 47 : 687-690.
- Mori T., Ando K., Tanaka K., Ikeda Y. and Koga Y. 1997. Fas-mediated apoptosis of the hematopoietic progenitor cells in mice infected with murine cytomegalovirus. *Blood*. 89(10):3565-3573.
- Mortensen, S.H., Hjeltnes, B., Rodseth, O., Krogsrud, J. K. and Christie, K. E. 1990. Infectious pancreatic necrosis virus, serotype N1, isolated from Norwegian halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and scallops (*Pecten maximus*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 10(2):42-43.
- Mortensen S.H., Bachere E., Gall G.L. and Mialhe E. 1992. Persistence of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in scallops *Pecten maximus*. *Dis. Aquat. Organ.* 12:221-227.
- Muller H. and Nitschke R. 1987. The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90000-Da protein. *Virology*. 159 :174-177.
- Müller M., Schnitzler P., Koonin E.V. and Darai. G. 1995. Identification and properties of the largest subunit of the DNA-dependent RNA polymerase of fish lymphocystis disease virus. Dramatic difference in the domain organisation in the *Iridoviridae* family. *J. Gen. Virol.* 76:1099-1107.
- Naegle R.F. and Granoff A. 1972. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. XIII. Transmission of the Lucke tumor by herpesvirus-containing ascitic fluid from a tumor-bearing frog. *J. Nat. Cancer Inst.* 49:299-303.
- Nakajima K., Inouye K. and Sorimachi M. 1998. Viral diseases in cultured marine fish in Japan. *Fish Pathol.* 33:181-188.
- Nazerian K. 1974. DNA configuration in the core of Mareck's disease virus. *J. Virol.* 13:1148-1150.

- Newell N.D., 1969. Classification of Bivalvia. In: *Treatise of Invertebrate Paleontology, (N) Mollusca, Bivalvia*, Vol. 1 (ed RC Moore), pp 205-224. Geological Society of America, Inc. and the University of Kansas Press, Lawrence, Kans.
- Nicholas J., Cameron K.R. and Honess R.W. (1992) Herpesvirus saimiri encodes homologues of G protein-coupled receptors and cyclins. *Nature*, 355(6358):362-365.
- Nicholas J., Cameron K.R. and Honess R.W. 1992. Herpesvirus saimiri encodes homologues of G protein-coupled receptors and cyclins. *Nature*, 355(6358):362-365.
- Nicolas J.L., Comps M. and Cochenne N. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 12(1):11-13.
- Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K. 1994. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Organ.* 18:103-107.
- Novoa B. and Figueras A. 1996. Heterogeneity of marine birnaviruses isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Pathol* 31:145-150.
- Novoa B., Figueras A., Puentes C.F., Ledo A. and Toranzo A.E. 1993. Characterization of a birnavirus isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Dis. Aquat. Organ.* 15:39-44.
- Nusbaum K.E. and Grizzle J.M. 1987. Adherence of Channel catfish virus to sperm and leukocytes. *Aquacult.* 65:1-5.
- O'Foighil D., Gaffney P.M., Wilbur A.E. and Hilbish T.J., 1998. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Mar. Biol.* 131:497-503.
- Oda H., Tamai T., Tsuzimura K., Sato N., Kimura S., Shirahata S. and Murakami H. 1993. Establishment and characterization of monoclonal antibodies against fish virus (*Iridoviridae*). In: Kaminogawa S et al. (eds), *Animal Cell technology: Basic and Applied Aspects*. Vol. 5, pp 565-571, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Okan I., Wang Y, Chen F., Hu L.F., Imreh S., Klein G. and Wiman K.G. 1995. The EBV-encoded LMP1 protein inhibits p53-triggered apoptosis but not growth arrest. *Oncogene.* 11(6):1027-1031.
- Olesen N.J., Jorgensen P.E.V., Bloch B. and Mellergaard S. 1988. Isolation of an IPN-like virus belonging to the serogroup II of the aquatic birnaviruses from dab, *Limanda limanda* L. *J. Fish. Dis.* 11: 449-451.
- Oshima S., Hata J., Segawa C. Hirasawa N. and Yamashita S. 1996. A method for direct DNA amplification of uncharacterized DNA viruses and for development of a viral polymerase chain reaction assay: application to the red sea bream iridovirus. *Anal. Biochem.* 242(1):15-9.
- Oshima S., Hata J., Hirasawa N., Ohtaka T., Hirono I., Aoki T. and Yamashita S. 1998. Rapid diagnosis of red sea bream iridovirus infection using the polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Organ.* 32(2):87-90.
- Pajot R., Hennequart F., Trintignac P. and Glize P. 1998. Etude des familles de naissains pour la compréhension de mortalités "anormales" chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Rapport SMIDAP. pp 36.
- Palacios-Fest M.R., Mazón-Suástegui J.M., García-Sandoval S., Diego-Peralta M., Estrada-Ortega J.C., Altamiranos-Saucedo A.A. and Pérez-Flores J. 1988. Manual Técnico para la Operación de los Centros Acuícolas Productores de Ostión. SEDEPESCA. Dir. Gral. Comunic. Social México. 324 pp.

- Park M.S. and Chun S.K. 1989. Study on *Marteilioides chungmuensis* Comps et al., 1986 parasite of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thünberg. J. Fish Pathol. 2(2):53-70.
- Perng G.C., Jones C., Ciacci-Zanella J., Stone M., Henderson G., Yukht A., Slanina S.M., Hofman F.M., Ghiasi H., Nesburn A.B. and Wechsler S.L. 2000. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. Science. 287(5457):1500-1503.
- Plumb J.A. and Zilberg D. 1999. The LD50 of largemouth bass virus (LMBV) in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmonides*) and the comparative susceptibility of striped bass (*Morone saxatilis*). J. Aquat. Anim. Health. 11:246-252.
- Plumb J.A., Grizzle J.M., Young H.E. and Noyes A.D. 1996. An iridovirus isolated from wild largemouth bass. J. Aquat. Anim. Health. 8:265-270.
- Plumb J.A., Noyes A.D., Graziano S., Wang J., Mao J. and Chinchar V.G. 1999. Isolation and identification of viruses from adult largemouth bass during a 1997-1998 survey in the south-eastern United States. J. Aquat. Anim. Health. 11:391-399.
- Ponce de Leon M., Eisenberg R.J. and Cohen G.H. 1977. Ribonucleotide reductase from herpes simplex virus (types 1 and 2) infected and uninfected KB cells : properties of the partially purified enzymes. J. Gen. Virol. 36:163-173.
- Post E. Mackem S. and Roizman B. 1981. The regulation of alpha genes of herpes simplex virus. Expression of chimeric genes produced by thymidine kinase with alpha genes promoters. Cell. 24:555-565.
- Powell K.L. and Purifoy D.J.M. 1977. Nonstructural proteins of herpes simplex virus. I. Purification of the induced DNA polymerase. J. Virol. 24:618-626.
- Pozet F., Morand M., Moussa A., Torhy C. and de Kinkelin P. 1992. Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribo-virus from the catfish *Ictalurus melas*. Dis. Aquat. Organ. 14:35-42.
- Preston C.M. 1979. Control of herpes simplex virus type 1 mRNA synthesis in cells infected with wild-type virus or the temperature-sensitive mutant tsK. J. Virol. 29:275-284.
- Purifoy D.J.M. and Powell K.L. 1976. DNA-Binding proteins induced by herpes simplex virus type 2 in HEp-2 cells. J. Virol. 19:717-731.
- Qin Q.W., Chang S.F., Ngoh-Lim G.H., Gibson-Kueh S., Shi C. and Lam T.J. 2003. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*. Dis. Aquat. Organ. 53(1):1-9.
- Qin Q.W., Lam T.J., Sin Y.M., Shen H., Chang S.F., Hgoh G.H. and Chen C.L.. 2001. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*. J. Virol. Meth. 98:17-24.
- Quackenbush S.L., Work T.M., Balazs G.H., Casey R.N., Rovnak J., Chaves A., duToit L., Baines J.D., Parrish C.R., Bowser P.R. and Casey J.W. 1998. Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. Virol. 246:392-399.
- Quayle D.B. 1961. Denman Island oyster disease and mortality, 1960. Manuscript Report Series (Biological) Fish. Res. Board Can. 713:1-6.
- Quayle, D.B., 1969. Pacific oyster culture in British Columbia. Fisheries Research Board of Canada : 193 p.
- Rafferty K.A. Jr. 1964. Kidney tumors of the leopard frog: A review. Cancer Res. 24:169-185.
- Ranson G. 1967. Les espèces d'huîtres vivant actuellement dans le monde, définies par leurs coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude des collections de quelques-uns des grands musées d'Histoire Naturelle. Rev. Travx. Inst. Pêches Marit. 31(12):127-199.

- Razvi E.S. and Welsh R.M. 1995. Apoptosis in viral infections. *Adv. Virus Res.* 45:1-60.
- Renault T. 1998. Infections herpétiques chez les invertébrés: détection de virus de type herpes chez les mollusques bivalves marins. *Virol.* 2(5): 401-403.
- Renault T. and Arzul I. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery reared bivalve larvae in Europe : specific viral DNA detection by PCR. *J. Fish Dis.* 24:161-167.
- Renault T. and Cochenne N. 1994. Rickettsia-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Inv. Pathol.* 64: 160-162.
- Renault T. and Cochenne N. 1995. Chlamydia-like organisms in ctenidia and mantle cells of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Organ.* 23: 153-159.
- Renault T. and Lipart C. 1998. Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. *In: Aquaculture and Water: Fish Culture, Shellfish Culture and Water Usage*, pp 235-236. European Aquaculture Society, Special Publication No.26. Compiled by Grizel H. and Kestemont P. Oostende, Belgium. *Eur. Aquacult. Soc.*
- Renault T., Lipart C. and Arzul I. 2001a. A herpes-like virus infects a non ostreid bivalve species : virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Dis. Aquat. Organ.* 45:1-7.
- Renault T., Lipart C. and Arzul I. 2001b. A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. *J. Fish Dis.* 24 : 369-376.
- Renault T., Cochenne N., Le Deuff R.M. and Chollet B. 1994b. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 14(2):64-66.
- Renault T., Le Deuff R.M., Cochenne N. and Maffart P. 1994a. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France. Comparative study. *Rev. Med. Vet.* 145 (10): 735-742.
- Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C. and Delsert C. 2000a. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *J. Virol. Meth.* 88: 41-50.
- Renault T., Le Deuff R.M., Chollet B., Cochenne N. and Gérard A. 2000b. Concomitant herpes-like virus infections among hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 42: 173-183.
- Renault T., Le Deuff R.M., Cochenne N., Chollet B. and 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(5-6):539-43.
- Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C., Chollet B. and Haffner P. 1997. Programme herpesvirus : synthèse des travaux réalisés au laboratoire IFREMER de La Tremblade – Mars 1996/Février 1997. Note IFREMER.
- Renault T., Stokes N.A., Chollet B., Cochenne N., Berthe F., Gerard A. and Bureson E.M. 2000c. Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis Aquat Organ.* 42(3):207-14.
- Reyburn H.T., Mandelboim O., Vales-Gomez M., Davis DM., Pazmany L. and Strominger J.L. 1997. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature.* 386(6624):514-517.
- Rimstad E., Krona R., Hornse E., Olsvik O. and Hyllseth B. 1990. Detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) RNA by hybridization with an oligonucleotide DNA probe. *Vet. Microbiol.* 23:211-219.

- Rivas C., Cepeda C., Dopazo C.P., Novoa B., Noya M. and Barja J.L. 1993. Marine environment as reservoir for birnaviruses from poikilothermic animals. *Aquaculture*. 115:183-194.
- Roizman B. and Baines J. 1991. The diversity and unity of *Herpesviridae*. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* 14(2):63-79.
- Roizman B. and Batterson W. 1985. Herpesviruses and their replication. In: *Virology* (ed BN Fields and al.). pp 497-526. Raven Press, New York.
- Roizman B. and Furlong D. 1974. The replication of herpesviruses. In : *Comprehensive Virology*, vol 3 (ed H Fraenkel-Conrat and RR Wagner), pp 229-403. Plenum Press, New York.
- Roizman B. and Knipe D.M. 2001. Herpes simplex viruses and their replication, p. 2399-2459. In *Fields virology* (ed. Knipe D.M. and Howley P.M.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa
- Roizman B. and Sears A.E. 1990. Herpes simplex viruses and their replication. In : *Virology*, 2nd edition (ed. Fields B.N. et al.) pp 1795-1894. Raven Press New York.
- Roizman B., Borman G.S. and Kamali-Rousta M. 1965. Macromolecular synthesis in cells infected with herpes simplex virus. *Nature*. 206:1374-1375.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. and Studdert M.J. 1992. The family *Herpesviridae*: an update. *Arch. Virol.* 123(3-4):425-449.
- Roizman B., Desrosiers R.C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A.C. and Studdert M.J. 1995. Family *Herpesviridae*. In : *Virus Taxonomy* (Arch. Virol., suppl. 10), (ed Murphy F.A. et al.), pp 114-127. Springer-Verlag: Wien, New-York.
- Russell P.H. 1974. Lymphocystis in wild plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) in British coastal waters. A histopathological and serological study. *J. Fish Biol.* 6:771-778.
- Schnitzler P. and Darai G. 1993. Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus. *J. Gen. Virol.* 74:2143-2150.
- Schultz M., May E.B., Kraeuter J.N. and Hetrick F.M. 1984. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from an epizootic occurring in cultured striped bass, *Morone saxatilis* Walbaum. *J. Fish Dis.* 7:505-507.
- Schwartz J. and Roizman B. 1969. Similarities and differences in the development of laboratory strains and fresh isolated strains of herpes simplex virus in Hep-2 cells : electron microscopy. *J. Virol.* 4:879-889.
- Scott T.F., Burgoon C.F., Coriell L.L. and Blank M. 1953. The growth curve of the virus of herpes simplex in rabbit corneal cells grown in tissue culture with parallel observations on the development of intranuclear inclusion body. *J. Immunol.* 71:385-396.
- Searles R.P., Bergquam E.P., Axthelm M.K. and Wong S.W. 1999. Sequence and genomic analysis of a Rhesus macaque rhadinovirus with similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J. Virol.* 73(4):3040-3053.
- Secchiero P., Flamand L., Gibellini D., Falcieri E., Robuffo I., Capitani S., Gallo R.C. and Zauli G. 1997. Human Herpesvirus 7 induces CD4(+) T-cell death by two distinct mechanisms: necrotic lysis productively infected cells and apoptosis in uninfected or nonproductively infected cells. *Blood*. 90(11):4502-4512.
- Secchiero P., Nicholas J., Deng H., Xiaopeng T., van Loon N., Ruvolo V.R., Berneman Z.N., Reitz M.S. Jr. and Dewhurst S. 1995. Identification of human telomeric repeat motifs at the genome termini of human herpesvirus 7: structural analysis and heterogeneity. *J. Virol.* 69(12):8041-8045.

- Severini A., Scraba D.G. and Tyrell D.L.J. 1996. Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 70:3169-3175.
- Sheldrick P. and Berthelot N. 1975. Inverted repetitions in the chromosome of herpes simplex virus. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 39:667-678.
- Silverstein S., Millette R., Jones P. and Roizman B. 1976. RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. XII. Sequence complexity and properties of RNA differing in extent of adenylation. *J. Virol.*, 18, 977-991.
- Sindermann C.J. 1984. Disease in marine aquaculture. *Helgoländer Meeresunters*, 38:1-28.
- Sindermann C.J. and Rosenfield A. 1967. Principal disease of commercially important marine bivalve mollusca and crustacea. *Fishery Bull. (US)* 66:335-385.
- Smith W.R. and McAuslan B.R. 1969. Biophysical properties of frog virus 3 and its desoxyribonucleic acid: fate of radioactive virus in the early stage of infection. *J. Virol.* 4:339-347.
- Smith P.J., Ozaki H. and Fujiyo Y. 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 20 (4): 569-574.
- Soderberg-Naucler C., Fish K.N. and Nelson J.A. 1997. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogenic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell.* 91(1):119-126.
- Soletchnik P. et al. 1998. "Hydrobiology of the Marennes-Oleron bay. Seasonal indices and analysis of trend from 1978 to 1995". *Hydrobiologia.* 386:131-146.
- Soletchnik, P., Héral M., et al. 1993. Energetic budget of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) during the fast growth period of May 1992 in Marennes-Oléron Bay (France). Copenhagen (Denmark), ICES.
- Soletchnik P., Le Moine O., Gouletquer P., Geairon P., Razet D., Faury N., Fouché D. and Robert S. 2001. Optimisation of the traditional Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* culture on the French Atlantic coastline : autumnal fattening in semi closed ponds. *Aquaculture* 199 (1-2):73-91.
- Sorimachi M. and Hara T. 1985. Characteristics and pathogenicity of a virus isolated from yellowtail fingerlings having ascites. *Gyobyo Kenkyu. Fish Pathol.* 19:231-238.
- Spangler C.M. and Essani K. 1994. Transactivation of methylated HIV-LTR by a frog virus 3 protein. *Virology.* 204:651-655.
- Sparks A.K. 1962. Metaplasia of the gut of the oyster, *Crassostrea gigas* (Thünberg) caused by infection with the copepod *Mytilicola orientalis* Mori. *J. Insect Pathol.* 4(1):57-62.
- Spear P.G. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. Virol.* 3:167-180.
- Spender L.C., Cannell E.J., Hollyoake M., Wensing B., Gawn J.M., Brimmell M., Packham G. and Farrell P.J. 1999. Control of cell cycle entry and apoptosis in B lymphocytes infected by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 73(6):4678-4688.
- Stackpole C.W. 1969. Herpes-type virus of the frog renal adenocarcinoma. I. Virus development in tumor transplants maintained at low temperature. *J. Virol.* 4:75-93.
- Stanier P., Kitchen A.D., Taylor D.L. and Tyms A.S. 1992. Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. *Mol. Cell. Probes.* 6(1):51-58.
- Stanier P., Taylor D.L., Kitchen A.D., Wales N., Tryhorn Y. and Tyms A.S. 1989. Persistence of cytomegalovirus in mononuclear cells in peripheral blood from blood donors. *Brit. Med. J.* 299(6704):897-898.

- Starobogatov Y.I. 1992. Morphological basis for phylogeny and classification of *Bivalvia*. *Ruthenica*, 2:1-25.
- Stasiak K., Renault S., Demattei M.V., Bigot Y. and Federici B.A. 2003. Evidence for the evolution of ascoviruses from iridoviruses. *J. Gen. Virol.* 84(Pt 11):2999-3009.
- Steiner G. and Müller M. 1996. What can 18S rRNA do for bivalve phylogeny? *J. Mol. Evol.* 43:58-70.
- Steven A.C. and Spear P.G. 1997. Herpesvirus capsid assembly and envelopment. *In: "Structural Biology of Viruses"* (Chiu W., Burnett R.M. and Barcea R., Eds.). New York: Oxford University Press, pp 312-351.
- Sudthongkong C., Miyata M. and Miyazaki T. 2002a. Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and Dwarf gourami. *Dis. Aquat. Organ.* 48:163-173.
- Sudthongkong C., Miyata M. and Miyazaki T. 2002b. Viral DNA sequences of genes encoding the ATPase and the major capsid protein of tropical iridovirus isolates which are pathogenic to fishes in Japan, South China Sea and Southeast Asian countries. *Arch. Virol.* 147:2089-2109.
- Sugaya K., Bradley G., Nonoyama M. and Tanaka A. 1990. Latent transcripts of Mareck's disease virus are clustered in the short and long repeat regions. *J. Virol.* 64(12):5773-5782.
- Suzuki S. and Nojima M. 1999. Distribution of a marine birnavirus in wild shellfish species from Japan. *Fish Pathol.* 34:121-125.
- Suzuki S., Hosono N. and Kusuda R. 1997a. Production kinetics of antigenicity and serological analysis of viral polypeptides of yellowtail ascites virus. *Fish Pathol.* 30:209-214
- Suzuki S., Hosono N. and Kusuda R. 1997b. Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. *J. Mar. Biotechnol.* 5:205-209.
- Suzuki S., Kamakura M. and Kusuda R. 1998a. Isolation of birnavirus from Japanese Pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish. Sci.* 64:342-343.
- Suzuki S., Nakaat T., Kamakura M., Yoshimoto M., Furakawa Y., Yamashita Y. and Kusuda R. 1998b. Isolation of birnavirus from Agemaki (Jack Knife Clam) *Sinovacula consticta* and survey of the virus using PCR technique. *Fish. Sci.* 63:563-566.
- Tamai T., Tsujimura K. Shirahat S., Oda H., Noguchi T., Kusuda R., Sato N., Kimura S., Katakura Y. and Murakami H. 1997. Development of DNA diagnostic methods for the detection of new fish iridoviral disease. *Cytotechnology.* 23:211-220.
- Tan W.G.H., Barkman T.J., Chinchar V.G. and Essani K. 2004. Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus *Ranavirus* (family *Iridoviridae*). *Virology.* 323:70-84.
- Tanner J.E. and Alfieri C. 1999. Epstein-Barr virus induces Fas (CD95) in T cells and Fas ligand in B cells leading to T-cell apoptosis. *Blood.* 94(10):3439-3447.
- Tapiovaraa H., Olesen N.J., Linden J., Rimaila-Parnaen E. and von Bonsdorff C.H. 1998. Isolation of an iridovirus from pike-perch *Stizostedion lucioperca*. *Dis. Aquat. Organ.* 32:185-193.
- Taylor-Wiedeman J., Sissons P. and Sinclair J. 1994. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.* 68(3):1597-1604.
- Taylor-Wiedeman J., Sissons J.G., Borysiewicz L.K. and Sinclair J.H. 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72 (9):2059-2064.

- Thompson J.D., Granoff A. and Willis D.B. 1986. Trans-activation of a methylated adenovirus promoter by a frog virus 3 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:7688-7692.
- Thomson J. M. 1952. The acclimatization and growth of the Pacific oyster (*Gryphaea gigas*) in Australia. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, 3: 64-73.
- Thomson J. M. 1959. Pacific oyster success. *Fish. Newsl.*, 18(12): 17.
- Thomson D.R., Dewhurst S. and Gray D. 1994. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J. Virol.* 68:3007-3014.
- Thomson D.R., Efstathiou S. and Honess R.W. 1991. Acquisition of the human adeno-associated virus type-2 rep gene by human herpesvirus type-6. *Nature.* 351:78-80.
- Tidona C.A. and Darai G., 1997a. The complete DNA sequence of lymphocystis disease virus. *Virol.* 230: 207-216.
- Tidona C.A. and Darai G. 1997b. Molecular anatomy of lymphocystis disease virus. *Arch. Virol.* 13:49-56.
- Tubiash H.S., Colwell R.R. and Sakazaki R. 1970. Marine vibriosis associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J. Bacteriol.* 103:272-273.
- Turner A., Bruun B., Minson T. and Browne H. 1998. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J. Virol.* 72(1):873-875.
- Tweedell K.S. 1969. Simulated transmission of renal tumors in oocytes and embryos of *Rana pipiens*. *In: Recent results in Cancer Research* (ed M Mizell), pp 229-239. Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag.
- Umene K. and Sakaoka H. 1999. Evolution of Herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch. Virol.* 144:637-656.
- Underwood B.O., Smale C.J., Brown F. and Hill B.J. 1977. Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J. Gen. Virol.* 36(1):93-109.
- Van Devanter D.R., Warrener P., Bennett L., Schultz E. Coulter S. Garber R.L. and Rose TM. 1996. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34(7) :1666-1671.
- Van Dyk L.F., Hess J.L., Katz J.D., Jacoby M., Speck S.H. and Virgin H.W. 1999. The murine gammaherpesvirus 68 v-cyclin gene is an oncogene that promotes cell cycle progression in primary lymphocytes. *J. Virol.* 73(6):5110-5122.
- Van Regenmortel M.H.V., Faquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., Mc. Geoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B. 1999. *Virus Taxonomy- Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, New York.
- Vaux DL., Haecker G. and Strasser A. 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 76(5):777-779.
- Vernberg, W.B. and Vernberg F.J. 1972. *Environmental physiology of marine animals.* Springer-Verlag, NY, NY.
- Vlazny D.A., Kwong A. and Frenkel N. 1982. Site specific cleavage packaging of herpes simplex virus DNA and the selective maturation of nucleocapsids containing full length viral DNA. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.* 79:1423-1427.

- Waechter M., Le Roux F., Nicolas J.L., Marissal E. and Berthe F. 2002. Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. C. R. Biol. 325(3):231-8. [In French].
- Wagner E.K. 1985. Individual HSV transcripts: characterization of specified genes. In: Herpesviruses, Vol 3 (ed Roizman B.), pp 45-104. Plenum Press, New-York.
- Wagner M.J. and Summers W.C. 1978. Structure of the joint region and the termini of the DNA of herpes simplex virus type 1. J. Virol. 27:374-387.
- Walker R. 1962. Fine structure of lymphocystis disease virus in fish. Virol. 18:503-505.
- Waller T.R. 1998. Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In: *Bivalves: An eon of evolution – Paleobiological studies honoring Norman D. Newell*. (Johnston PA and Haggart JW eds), pp 1-45. University of Calgary Press, Calgary.
- Wang G.H., Bertin J., Wang Y, Martin D.A., Wang J., Tomaselli K.J., Armstrong R.C. and Cohen J.I. 1997. Bovine herpesvirus 4 BORFE2 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis and contains death effector domains shared with other gamma-2 herpesviruses. J. Virol. 71(11):8928-8932.
- Weng S.P., He J.G., Zeng K., Huang Z.J., Hou K.T., Huang W.P., Chen J.H. and Luo J.R. 1998. Infectious spleen and kidney necrosis virus infections in *Siniperca chuatsi*-histopathology and relationship with HB, RBC. and WBC. Journal of South China Normal University. 82:70-76. [English abstract].
- Weng S.P., Wang Y.Q., He J.G., Deng M., Lu L., Guan H.J., Liu Y.J. and Chan S-M. 2002. Outbreaks of an iridovirus in red drum, *Sciaenops ocellata* (L.), cultured in southern China. J. Fish Dis. 25:681-685.
- Wildy P. and Watson D.H. 1963. Electron microscopic studies on the architecture of animal viruses. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 27:25-47.
- Williams G.T. 1994. Programmed cell death : a fundamental protective response to pathogens. Trends in Microbiol. 2:463-464.
- Williams T. 1993. Covert iridovirus infection of blackfly larvae. Proc. R. Soc. Lond. 251:225-230.
- Williams T. 1994. Comparative studies of iridoviruses: further support for a new classification. Virus Res. 33(2):99-121.
- Williams T. 1996. The iridoviruses. Adv. Virus Res. 46:345-412.
- Williams T., Chinchar G.D., Darai G., Hyatt A.D., Kalmakoff J. and Seligy V.L. 2000. Family *Iridoviridae*. In: "Virus Taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of viruses" (eds. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B.), pp. 167-182. Academic Press.
- Willis D.B., Goorha R., Miles M. and Granoff A. 1977. Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3: VII. Transcriptional and post-transcriptional regulation of virus gene expression. J. Virol. 24:326-342.
- Willis D.B. and Granoff A. 1980. Frog virus 3 DNA is heavily methylated at CpG sequences. Virology. 107:250-257.
- Willis D.B. and Granoff A. 1985. *trans* activation of an immediate-early frog virus 3 promoter by a virion protein. J. Virol. 56:495-501.
- Wilson C.B. 1938. A new copepod from Japanese oysters transplanted to the Pacific coast of the United States. J. Wash. Acad. Sci. 28: 284-288.

- Wilson S.E., Pedrosa L., Beuerman R. and Hill J.M. 1997. Herpes simplex virus type-1 infection of corneal epithelial cells induces apoptosis of the underlying keratocytes. *Exp. Eye Res.* 64:775-779.
- Winnepenninckx B., Backeljau T. and DeWachter R. 1994. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of *Mollusca*. *Nautilus* 2:98-110.
- Wise J.A., Bowser P.R. and Boyle J.A. 1985. Detection of channel catfish virus in asymptomatic adult channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 8:485-493.
- Wise J.A., Harrell S.F., Busch R.L. and Boyle J.A. 1988. Vertical transmission of channel catfish virus. *Am. J. Vet. Res.* 49(9):1506-1509.
- Wissenberg, R. 1965. Fifty years of research on the lymphocystis virus disease of fishes: 1914-1964. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126:362-374.
- Wolf K. 1973. Herpesviruses of lower vertebrates. *In* : The herpesviruses (ed. Kaplan A.S.), pp 495-520. Academic Press, New-York.
- Wolf K. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, New York, pp 476.
- Wu S.Q., Li X.H., Pan H.J. and Huang Z.B. 1997. Research on the pathogen of the outbreak-infective disease of *Siniperca chuatsi*. *J. Fish. China* 21(Suppl.):56-60 [Abstract in English].
- Yurochko A.D., Kkwalik T.F., Huong S.M. and Huang E.S. 1995. Human cytomegalovirus upregulates NF-kappa B activity by transactivating the NF-kappa B p105/p50 and p65 promoters. *J. Virol.* 69:5391-5400.
- Zhang Q.Y. and Li Z.Q. 1999. Detection of viral pathogen from diseased mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) with pathological observations. *Acta Hydrobiol. Sinica.* 23(2):151-154 [Abstract in English].
- Zhang Y. and McKnight J.L.C. 1993. Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *J. Virol.* 67:1482-1492.
- Zhang C.X. and Suzuki. 2003. Comparison of the RNA polymerase genes of marine birnavirus strains and other birnaviruses. *Arch.Virol.* 148:745-758.
- Zhu H., Shen Y. and Shenk T. 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.*, 69(12):7960-7970.

ANEXOS

PRESENTACION DEL IFREMER, DEL LABORATORIO DE GENETICA Y PATOLOGIA DE LA TREMBLADE, DEL PROGRAMA MOREST Y DE LA REPAMO

El IFREMER (Instituto Francés de Investigación para la Explotación del Mar) es un instituto público con carácter industrial y comercial bajo la tutela conjunta de cuatro secretarías: Investigación, Agricultura y Pesquerías, Transporte y Vivienda y Medio Ambiente. Está presente tanto en Francia metropolitana como en sus territorios y dominios exteriores. El Instituto cuenta con cinco centros (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon, Tahiti) y veinte estaciones.



Localizado en el corazón de la bahía de Marennes-Oléron, la estación de IFREMER La Tremblade alberga dos laboratorios que realizan investigación en campos aplicados al cultivo de moluscos y al monitoreo del ambiente costero:

- ❶ El Laboratorio de Recursos y Medio Ambiente de la región de Poitou Charentes (LER/PC)
- ❷ El Laboratorio de Genética y Patología de Invertebrados Marinos (LGP)

El LGP maneja programas de investigación en genética y supervisa la red de patología de moluscos (REPAMO) que efectúa una supervisión epidemiológica constante (monitoreo de patógenos conocidos y detección de enfermedades exóticas, emergentes o reemergentes). El LGP es laboratorio de referencia para enfermedades de moluscos bivalvos de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y para la Unión Europea. Sus principales actividades son la identificación y la descripción de patógenos (ciclo biológico y medios de transmisión), el desarrollo de herramientas de diagnóstico, la reproducción experimental de las enfermedades y el estudio de los mecanismos de defensa.

Los principales patógenos de *Ostrea edulis* (*Bonamia ostrea* y *Marteilia refringens*) y de *C. gigas* (virus de tipo herpes y vibrios) son estudiados en el LGP. Estos modelos han sido identificados y descritos por microscopía de luz y electrónica y/o por aislamiento por métodos celulares, bacteriológicos y virológicos. También se estudian la transmisión y el desarrollo de diversas enfermedades. Como complemento a la histopatología, la investigación se ha enfocado hacia la respuesta inmune celular de los moluscos y el desarrollo de métodos de diagnóstico moleculares e inmunológicos. Otro objetivo del laboratorio es desarrollar nuevas propuestas para controlar el impacto de las enfermedades en los cultivos.

EL PROGRAMA MOREST:
ESTUDIO DE LA MORTALIDAD ESTIVAL DEL OSTION JAPONES



IFREMER considera las mortalidades estivales del ostión Japonés *C. gigas* como un problema considerable para la acuicultura, por lo cual dio inicio en el año 2001 a un programa específico llamado MOREST (**MOR**talidad **EST**ival). Equipos de quince laboratorios de ocho instituciones diferentes así como organizaciones profesionales e instancias regionales y nacionales están asociados con este proyecto cuyo objetivo es combinar especialidades para estudiar el fenómeno multifactorial que provoca este tipo de mortalidades.

A pesar de que este fenómeno de mortalidad estival ha sido observado a nivel internacional desde los años 40, su impacto en la industria del ostión sigue siendo considerable. Las tasas de mortalidad que afectan a la semilla (5 a 18 meses) y en ciertos casos a los adultos (2 años o más) pueden alcanzar un 30 a 60%.

En 1995 varios equipos de patología de IFREMER asociados con instancias regionales llevaron a cabo una serie de estudios preliminares que no permitieron identificar a ningún patógeno como agente causal de los eventos de mortalidad. En ciertas ocasiones, virus de tipo herpes o determinadas especies de vibrio han sido aisladas de una parte de los ostiones moribundos, pero la presencia de estos patógenos no permite explicar la totalidad de los eventos de mortalidad. Se emitió la hipótesis que, en determinados estadios de desarrollo del ostión, la combinación de ciertas condiciones ambientales puede resultar favorable para el desarrollo de infecciones por patógenos oportunistas. Un nuevo enfoque era por lo tanto necesario.

A partir del año 2001 fue requerida la colaboración de especialistas en genética, fisiología, inmunología, patología y ecología costera para darle nacimiento a MOREST. Este proyecto abarca cinco campos de trabajo:

- ❶ -validación de técnicas analíticas existentes o adaptación de estas según las necesidades
- ❷ -caracterización de las mortalidades estivales, con la ayuda de los laboratorios costeros de IFREMER en tres localidades: Bahía de Marennes-Oléron (Poitou-Charentes), el río de Auray (Bretaña) y la Bahía de Veys (Normandía)
- ❸ -estudios experimentales para estudiar por separado el impacto de cada factor
- ❹ -coordinación de las actividades de la red de patología de moluscos (REPAMO) y del proyecto MOREST
- ❺ -desarrollo de herramientas para la gestión de la información y la comunicación interna (entre los participantes) y externa.

El cultivo de moluscos (principalmente ostiones y almejas en el caso de Francia) involucra transferencias frecuentes de organismos. Por ejemplo, la semilla colectada en las cuencas de Arcachon y de Marennes-Oléron (donde las condiciones son favorables para los desoves) es transportada a otras regiones (Bretaña y Normandía) para su engorda. Posteriormente, los animales de talla comercial son comercializados en toda la Unión Europea. Desafortunadamente, los moluscos sirven de vehículo para parásitos (gasterópodos o protozoarios) y micro-algas que pueden ser nocivos. Este tipo de transferencias deben por lo tanto ser supervisadas para evitar que se propaguen epidemias nuisbles para las especies comerciales. Cabe mencionar que este tipo de enfermedades no afecta de ninguna manera a los seres humanos.

Por más de diez años, IFREMER ha coordinado una red llamada REPAMO (**REd de PA**tología de **MO**luscus). Las actividades del REPAMO están basadas en una estrecha colaboración entre el Departamento de Pesquerías del Ministerio de la Agricultura de Francia, los laboratorios regionales de IFREMER y organismos profesionales. Los resultados son sistemáticamente almacenados en una base de datos de acceso controlado. Uno de los objeivos de la REPAMO es proporcionarle a las autoridades competentes y a los profesionales los elementos necesarios para aplicar los reglamentos Franceses y Europeos referentes a la patología de moluscos bivalvos. Los principales objetivos de la REPAMO se hallan definidos por las directivas Europeas (1991¹, 1995²) que describen las medidas que deben ser tomadas para controlar las enfermedades que afectan a bivalvos :

- ▶ controlar el desarrollo de epidemias de enfermedades infecciosas que deben ser declaradas y la emergencia de patógenos nuevos o exóticos
- ▶ investigar la etiología de mortalidades anormales y evaluar el nivel de contagio cuando un agente patógeno se encuentra involucrado
- ▶ efectuar análisis para comprobar que ciertas zonas son (o siguen siendo) indemnes a ciertos patógenos
- ▶ controlar productos destinados a la importación y a la exportación dentro y fuera de la Unión Europea

La REPAMO está coordinada por el Laboratorio de Genética y Patología de IFREMER La Tremblade que efectúa también todos los análisis y restituye los resultados al resto de los participantes. Doce “corresponsales costeros” cumplen con la tarea de coleccionar información y muestras en el campo (por ejemplo en el caso de eventos de mortalidad) y efectuar el seguimiento de los lotes cultivados en sus áreas respectivas. La vigilancia que ejerce la REPAMO es pasiva ya que depende de que los productores den la alerta cada vez que un fenómeno anormal afecta sus cultivos.

¹ 91/67/EEC concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products

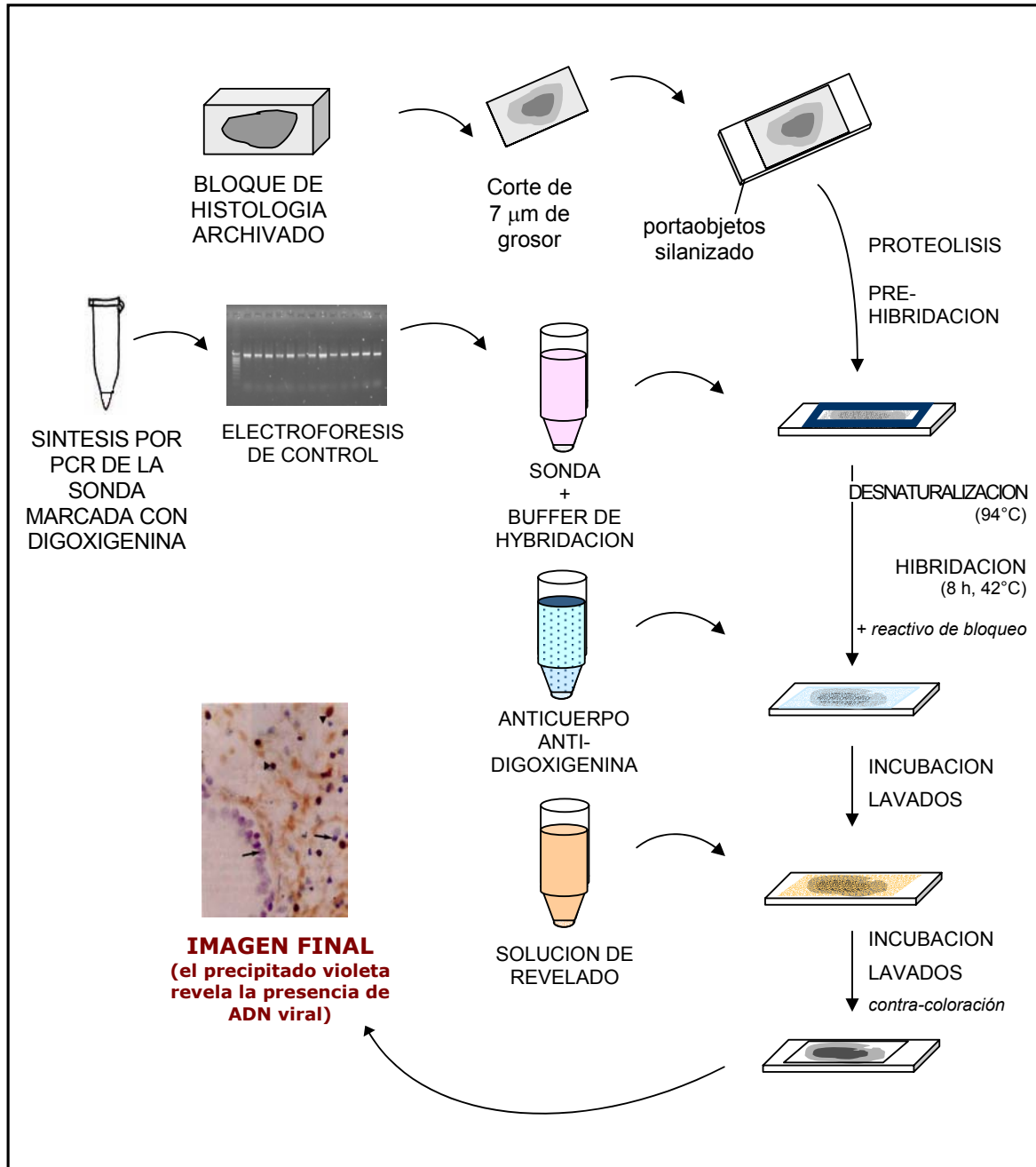
² 95/70/EC introducing minimum Community measures for the control of certain diseases affecting bivalve mollusks

ANEXO 2

DETECCION DE OshV-1 USANDO HIBRIDACION *IN SITU* CON REVELADO DIRECTO


(Arzul et al., 2002 ; Lipart y Renault, 2002)

1- ESQUEMA TECNICO



2- SINTESIS POR PCR DE LA Sonda MARCADA CON DIGOXIGENINA

2.1 Coctel de reacción

BUFFER 10X (Eurogentec)	5 μ L
digoxigenina-11-dUTPs (Boehringer, Mannheim)	0.2 nM (0.05 c/uno)
MgCl ₂	1.5 mM
Primer C ₁	100 ng
Primer C ₆	100 ng
Taq DNA polimerasa Goldstar (Eurogentec)	2.5 U
H ₂ O	q.s.p.
	49 μ L
	↓
	
	1 μ L de ADN de OsHV-1 (0.1 ng \leftrightarrow 5.10 ⁵ partículas virales)

2.2 Condiciones de amplificación

ETAPA	TEMP	DURACION	CICLOS
DESNATURALIZACION INICIAL	94° C	2 min	1
DESNATURALIZACION	94° C	1 min	 └─▶ 30
ALINEAMIENTO	50° C	1 min	
EXTENSION	72° C	1 min	
EXTENSION FINAL	72°	5 min	1

3- PREPARACION DE LOS CORTES

A partir de los bloques de histología, se efectúan cortes de 7 μm de grosor que se recogen en portaobjetos silanizados (silane-prep TM slides, SIGMA, France) para una mejor adhesión de los tejidos. Estos cortes requieren un procesamiento previo a la prehibridación y la hibridación:

- i. Desparafinado en xilol (2 x 5 min)
- ii. Lavado en etanol absoluto (2 x 5 min)
- iii. Secado bajo la campana (15 min)
- iv. Proteólisis con 200 μL de Proteinasa K ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en TBE) depositados sobre los tejidos. Incubación en cámara húmeda (37°C , 15 min)
- v. Bloqueo de la proteólisis: baño en un buffer de bloqueo (3 min)
- vi. Deshidratación por medio de un enjuague en etanol a 95% (1 min) seguido de un enjuague en etanol 100% (1 min)
- vii. Secado bajo la campana (20 min)

4- PREHIBRIDACION E HIBRIDACION

- i. Se depositan 500 μL de buffer de hibridación sobre cada corte y se deja incubar en cámara húmeda (30 min, 42°C)
- ii. Se elimina el buffer y se seca el portaobjetos con un papel absorbente
- iii. Se pega una cámara autoadhesiva (Polylabo, France) de tal forma que los tejidos queden enmarcados
- iv. Se depositan 100 μL de la sonda marcada diluída en tampon de hibridación ($v/v=1$) dentro de la cámara y se cubre con una laminilla de plástico de tal forma que no queden burbujas de aire.
- v. Los cortes son desnaturalizados por calor (5 min, 94°C)
- vi. Los portaobjetos son incubados toda la noche en cámara húmeda (42°C)

5- LAVADOS Y REVELADO

- i. Se retiran las cámaras autoadhesivas
- ii. Los portaobjetos son lavados en SSC 1X a temperatura ambiente (2 X 5 min)
- iii. Se efectúa otro lavado en SSC 0.4 X (10 min, 42°C)
- iv. Se sumergen los portaobjetos en buffer DIG 1 (1 min)
- v. Se depositan 200 μL de DIG 2 y se deja incubar (30 min) en cámara húmeda con el fin de saturar los cortes

- vi. Se enjuagan los portaobjetos en DIG 1 (1 min)
- vii. Se recubren los tejidos con 100 μ L de una solución de anticuerpos anti-digoxigenina acoplados con una fosfatasa (Boehringer Mannheim, Alemania) diluidos al 1/500 en DIG 1. La incubación se efectúa en cámara húmeda y a temperatura ambiente (1 h)
- viii. Los portaobjetos son enjuagados en buffer DIG 1 (2 X 1 min)
- ix. Los portaobjetos son sumergidos en buffer DIG 3 (5 min) y secados con papel absorbente
- x. Se depositan 100 μ L de solución de revelado sobre los tejidos y se deja incubar 30 min aproximadamente en cámara húmeda y en la oscuridad.
- xi. Se bloquea la reacción de revelado por medio de la inmersión de los portaobjetos en DIG 4

6- CONTRACOLORACION Y MONTAJE

- i. Se sumergen los portaobjetos en una solución de amarillo de Bismarck durante un minuto
- ii. Se enjuagan los portaobjetos con tres baños sucesivos, uno en etanol al 95% (1 min) y dos en etanol absoluto (2 x 1 min)
- iii. Los portaobjetos se sumergen en xilol por 10-30 segundos antes de ser montados con resina Eukitt.

7- BUFFERS Y SOLUCIONES EMPLEADOS

- **Amarillo de Bismarck**

Amarillo de Bismarck	30 g
Etanol 30%	100 mL



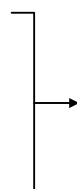
Filtrar a través de un filtro para café

- **Buffer de hibridación**

100% formamida	5 mL
Sulfato de dextrano 50%	2 mL
SSC 20X	20 mL
ARNt de levadura(10 mg mL ⁻¹)	250 μ L
Solución de Denhart 50X	200 μ L

- **Solución de Dehart 50 X**

Ficoll	5 g
Polivinil pirolidona	5 g
BSA	5 g
H ₂ O destilada	qsp 500 mL



Almacenar a -20°C

- DIG 1**

Acido maleico	11.61 g	}			
NaCl 5M	30 mL				
H ₂ O destilada	qsp 1 L				

Ajustar el pH a 7.5

- DIG 2**

Agente de bloqueo (Amersham, Francia)	1 g	}			
Buffer DIG 1	qsp 100 mL				

Mezclar a 50° C
Conservar a -20°C

- DIG 3**

1M Tris pH 8	50 mL	}			
5M NaCl	10 mL				
1M MgCl ₂	2.5 mL				
H ₂ O destilada	qsp 500 mL				

Ajustar a pH 9.5

- DIG 4**

1M Tris, pH 8	5 mL	}			
0.5M EDTA, pH 8	10 mL				
1M MgCl ₂	2.5 mL				
H ₂ O destilada	qsp 500 mL				

Ajustar a pH 9.5

- Proteinasa K**

Solución madre: 10 mg mL⁻¹ en TBE diluido al 1/100

- Solución de revelado**

NBT/BCIP (67% en DMSO, v/v)	20 µL				
Buffer DIG 3	1 mL				

- SSC 20X**

NaCl	0.3 M	88.2 g	}		
NaCl	3 M	175.3 g			
H ₂ O destilada		qsp 1 L			

Ajustar a pH 7

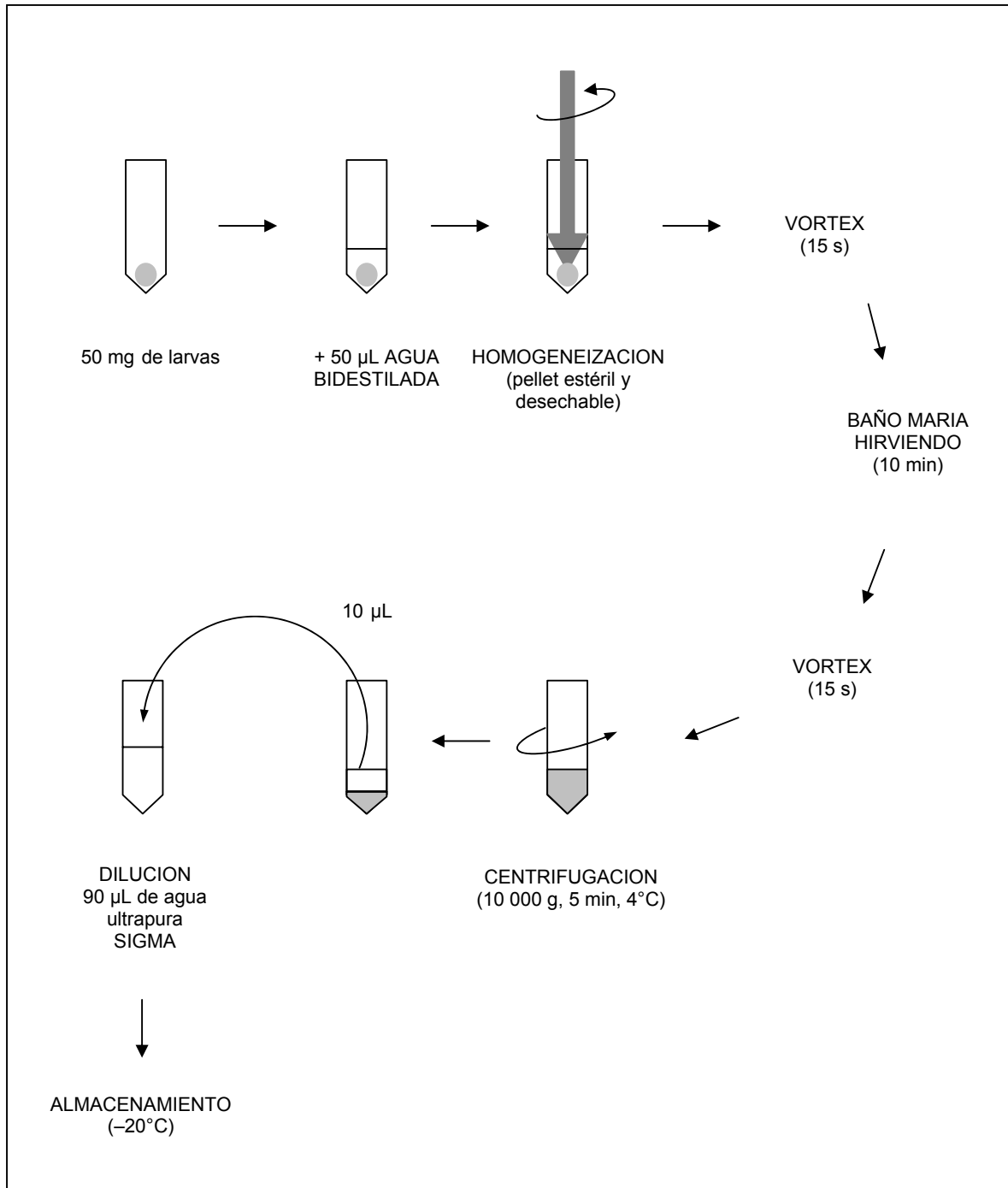
- TBE concentrado**

Tris Base	54 g				
Acido bórico	27.5 g				
0.5 M EDTA, pH 8	20 mL				
H ₂ O destilada	qsp 1 L				

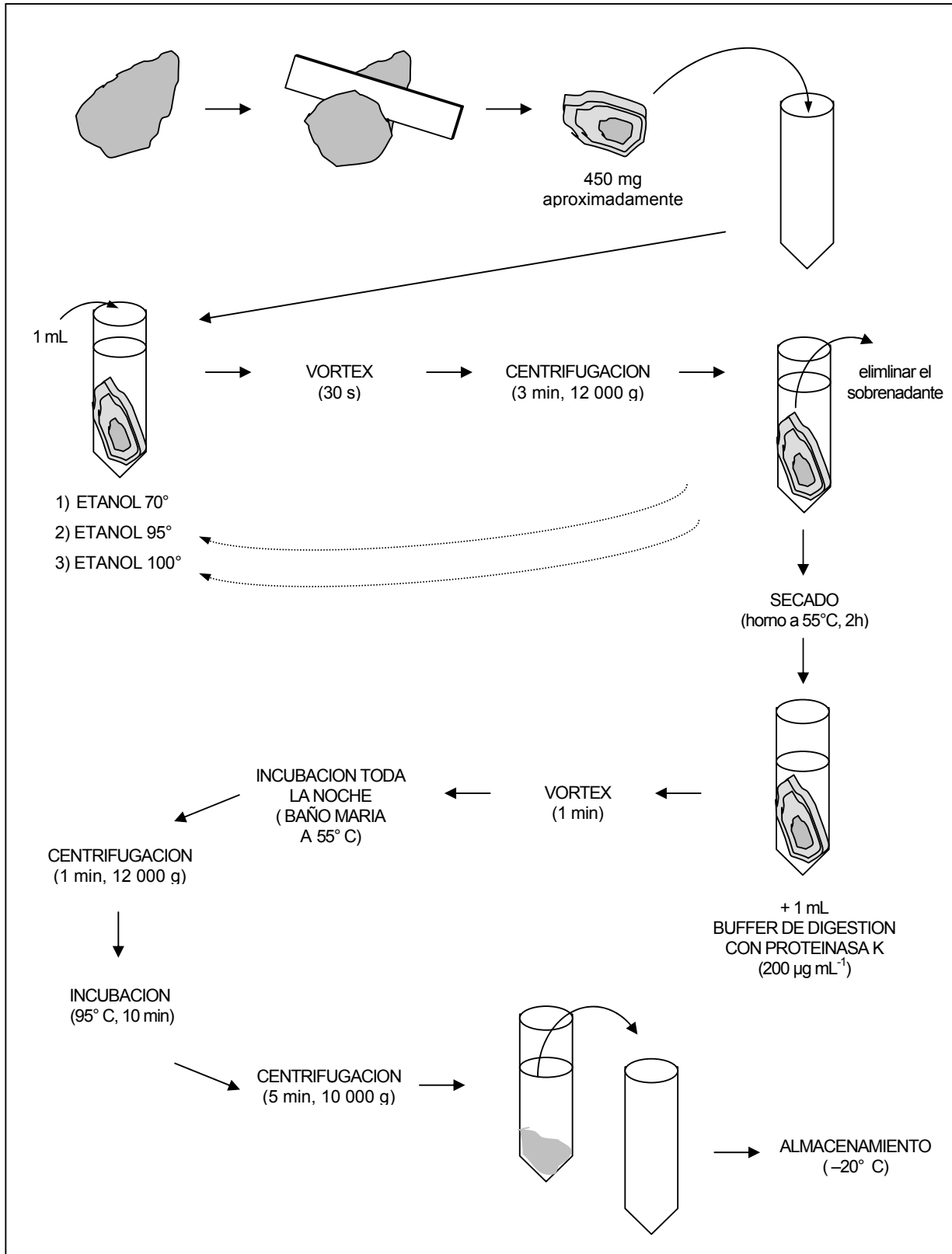
ANEXO 3

PROTOCOLOS DE EXTRACCION DE ADN

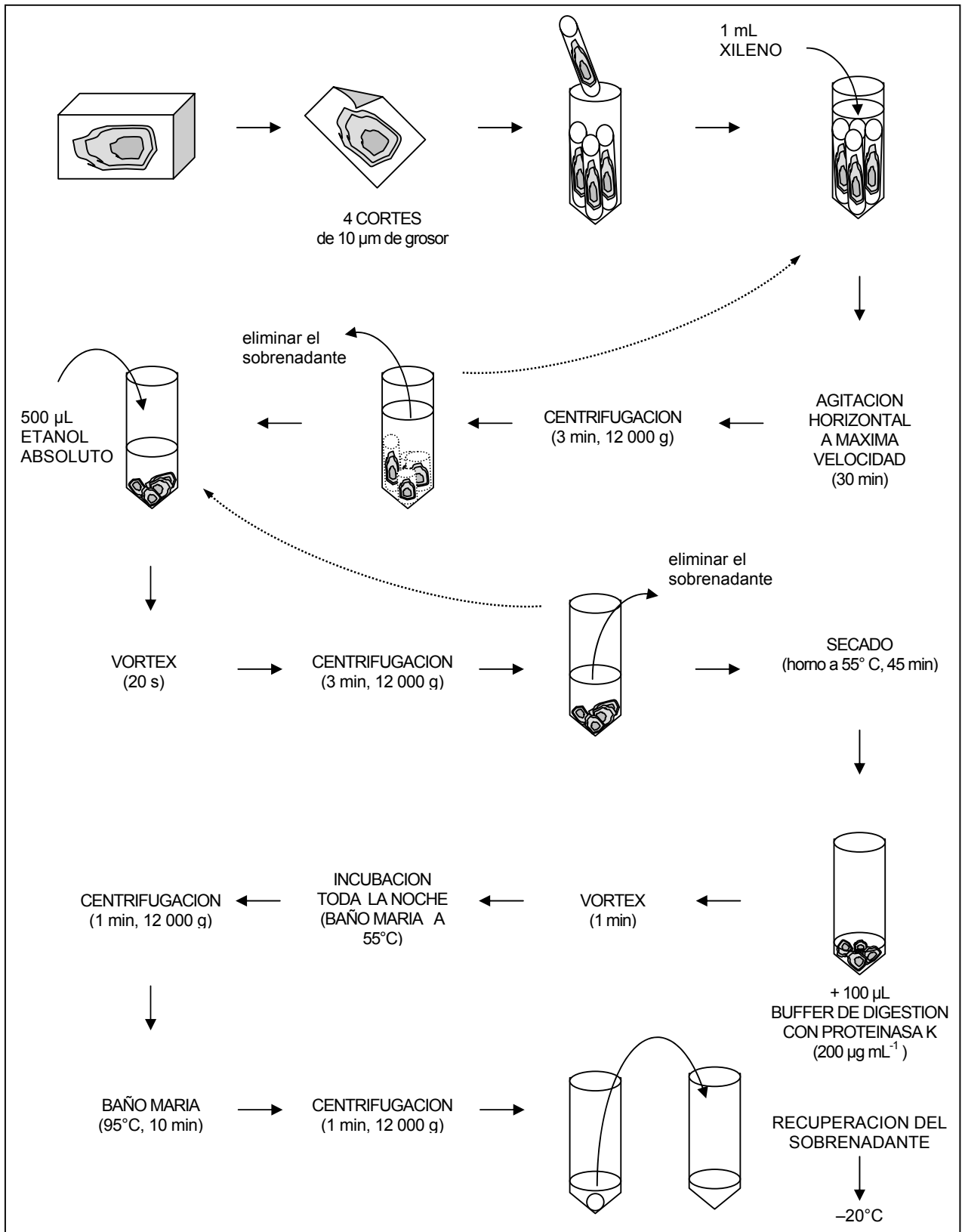
3a- EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE LARVAS DE OSTION CONGELADAS



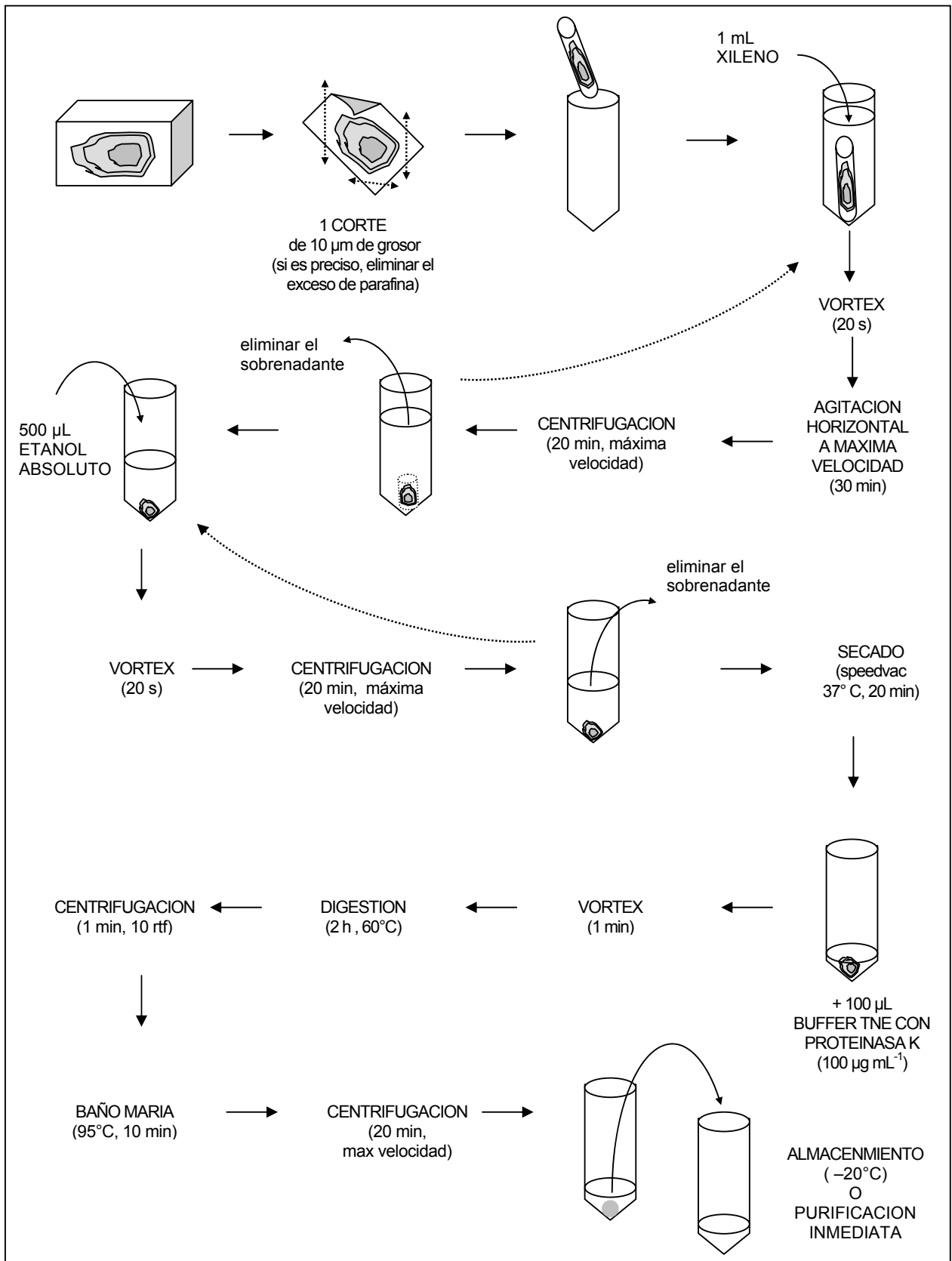
3b- EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS FIJADOS EN DAVISON

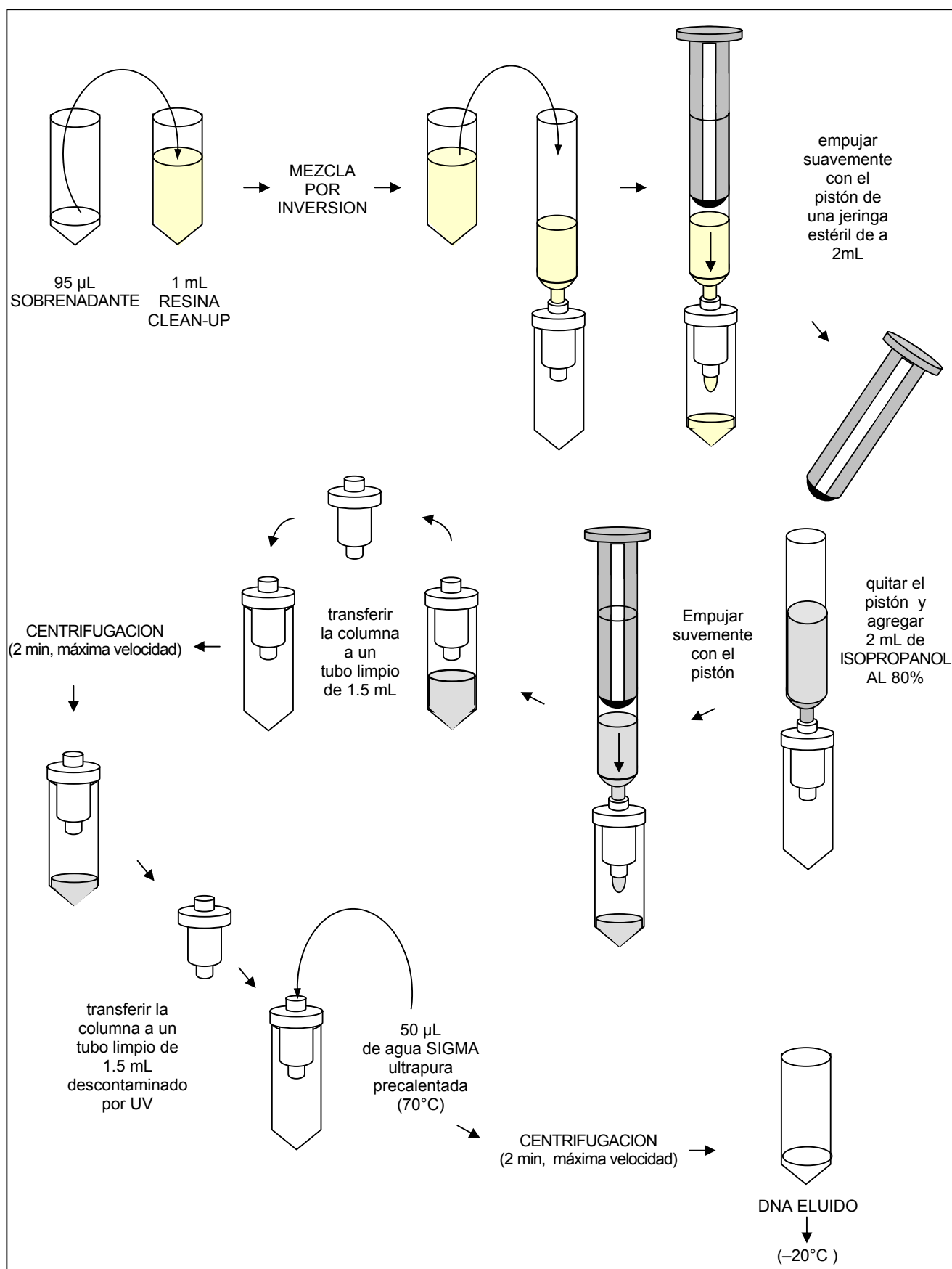


3c- EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS FIJADOS E INCLUIDOS EN PARAFINA



**3d- EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS FIJADOS E INCLUIDOS EN PARAFINA
(PROTOCOLO MODIFICADO)**





3e- SOLUCIONES EMPLEADAS

- **Buffer de digestión (ANEXOS 4B y 4C)**

50 mM Tris	}	→	Almacenar a -20°C
1 mM EDTA			
0.5% tween 20 (v/v)			
Q.S.P. H_2O agua bi-distilada			

Extemporáneamente, agregar $200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteinasa K (solución madre a $10\ \text{mg mL}^{-1}$).

- **Buffer TNE 10X (ANEXO 4E)**

100 mM Trizma base	12.1 g	}	→	agregar 80 mL de agua bidestilada ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$)
2.0 M NaCl	116.8 g			
10 mM EDTA disodio	3.7 g			

↓

ajustar a pH 7.4 con HCl concentrado

↓

completar con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ a 1L

↓

filtrar ($0.22\ \mu\text{m}$) y autoclavar

↓

almacenar a 4°C

La digestión se lleva a cabo con proteinasa K ($100\ \mu\text{g mL}^{-1}$) diluida en TNE 1X (buffer TNE 10X diluido con $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$).

ANEXO 4

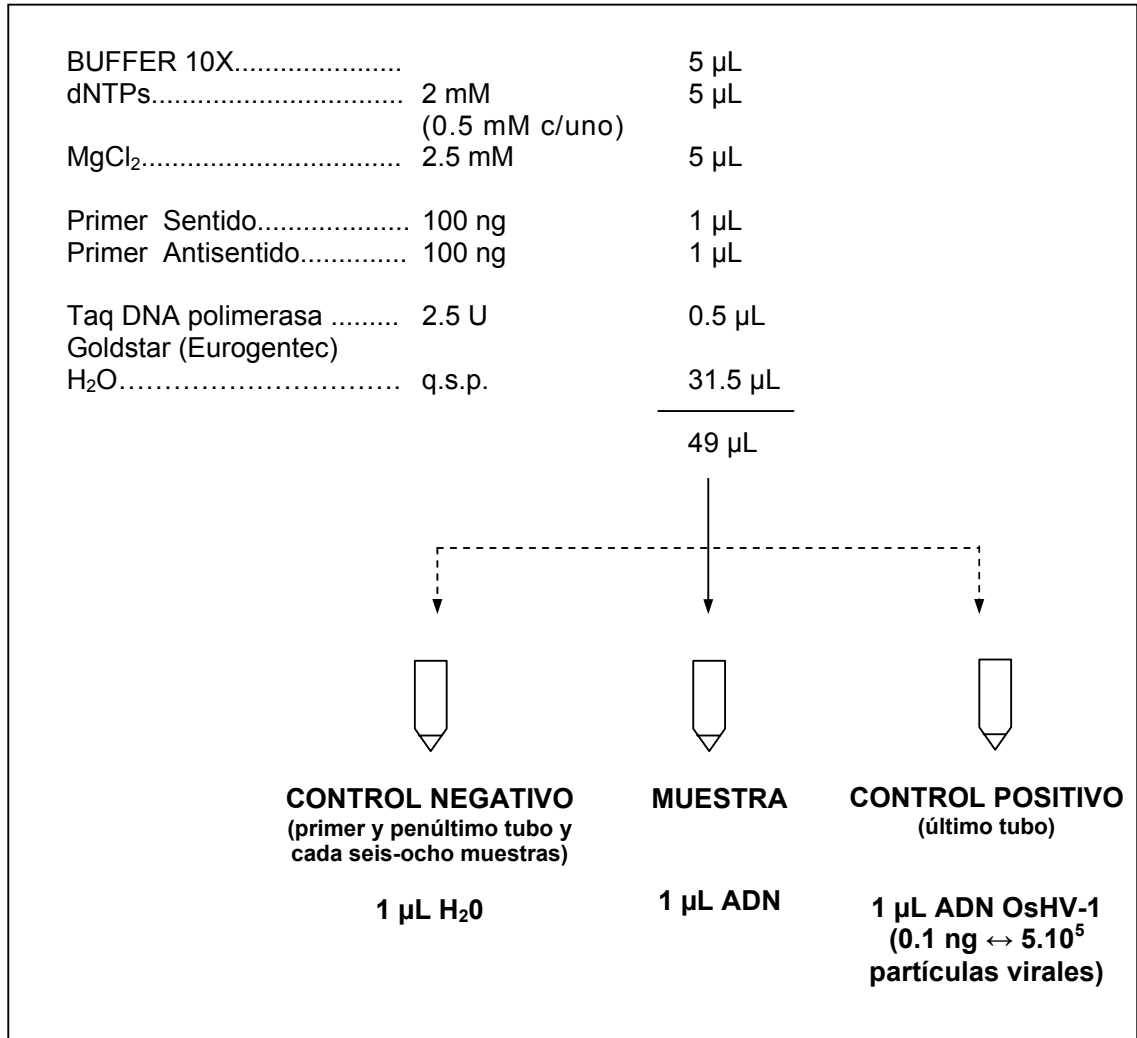
PARES DE PRIMERS EMPLEADOS PARA LA DETECCION POR PCR DE OSHV-1

PRIMER	ORIENTACION	SECUENCIA (5' → 3')	TALLA DEL PRODUCTO
C₉ C₁₀	REV DIR	GAG GGA AAT TTG CGA GAG AG ATC ACC GGC AGA CGT AGG	196 pb
C₂ C₄	REV DIR	CTC TTT ACC ATG AAG ATA CCC ACC GCA GTT GTG GTA TAC TCG AGA TTG	353 pb
C₅ C₁₃	REV DIR	CCG TGA CTT CTA TGG GTA TGT CAG CCT CGA GGT AGC TTT TGT CAA G	744 pb
C₁ C₆	REV DIR	TTC CCC TCG AGG TAG CTT TT GTG CAC GGC TTA CCA TTT TT	877 pb
B₃ B₄	REV DIR	GTG GAG GTG GCT GTT GAA AT ACT GGG ATC CGA CTG ACA AC	207 pb
GP₁ GP₂	REV DIR	GGC GAA TAT GTT GAC CGA AT CAC CGA CCA TGA ATC TAG GG	500 pb


ANEXO 5

DETECCION DE OSHV-1 POR PCR SENCILLA

1- COCTEL DE REACCION (50 µL)



2- CONDICIONES DE AMPLIFICACION

ETAPA	TEMP	DURACION	CICLOS
DESNATURALIZACION INICIAL	94° C	2 min	1
DESNATURALIZACION	94° C	1 min	
ALINEAMIENTO	50° C	1 min	
EXTENSION	72° C	1 min	
EXTENSION FINAL	72°	5 min	1

ANEXO 6

AMPLIFICACION POR PCR DE UN GEN QUE CODIFICA ACTINA EN C. GIGAS


1- UBICACION DE LOS PRIMERS

Tres primers (un primer sentido y dos antisentido) fueron diseñados en base a la secuencia reportada por Cadoret et al., 1999 (No. Acceso Genbank: AF026063)

```
CCGAACTCAAACCATCACTTTCTTGTCTGGATATTAATCTTACAAC TTCACAATGGGAGATGAAGATATT
GCAGCTTTAGTCGTAGACAATGGATCCGGAATGTGCAAGGCCGGATTTGCCGGAGACGATGCTCCCAGAG
CTGTGTTTCCCTCCATTGT CGGACGCCCCAGACATCAG GGTGTGATGGTTGGTATGGGACAGAAGGACAG
CTATGTAGGAGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGTATCCTCACCTCAAGTACCCATTGAACACGGCATC
GTCACCAACTGGGATGACATGGAGAAAATCTGGCATCATACTTCTAC AATGAACTCCGTGTGGCCCC AG
AGGAACACCCCGTCTCTCTGACCGAGGCCCACTCAACCCCAAGGCCAACAGAGAAAAGATGACACAGAT
CATGTTTCGAGACCTTCAACTCTCCCGCCATGTACGTCGCCATCCAGGCCGTACTGTCCCTGTACGCTTCC
GGTCGTACAACCGGTATCGTACTCGACTCCGGAGATGGTGTGTCTCACACAGTCCCCATCTACGAA GGTT
← ACT rev1
ACGCCCTTCCCCACGCCATCATGAGATTGGATCTCGCTGGACGTGATCTGACCGATTACCTCATGAAAAT
CCTCACAGAACGTGGATACTCTTTACCACCACAGCCGAGAGAGAAAATCGTCAGAGACATCAAGGAGAAA
CTGTGCTACGTTGCCCTGGACTTCGAACAAGAGATGACTACTGCTGCTTCATCCTCATCTCTAGAGAAGA
GCTATGAACTTCCCGACGGTCAGGTCATCACCATTGGCAACGAGCGATT CAGGTGCCCAGAGGCCATGTT
CCAGCCATCCTTCCCTTGGAAATGGAATCTTCCGGAATCCATGAAACATCATAACAAGTATCATGAAATGT
GATGTCGATATCCGTAAAGACTTGTACGCTAATATTGTCTGTCTGGAGGTACCACCATGTTCCCGGCA
TTGCTGACCGTATGCAAAAGGAGGTCACCGCCCTCGCTCCCCCAACAATGAAGATTAAGGTCAATTGCTCC
ACCTGAGAGGAAATACTCCGTCTGGATCGGTGGTTCCATCCTTGCTTCTCTCTCCACCTTCCAACAGATG
TGGATCAGCAAACAGGAGTACGACGAATCTGGACCATCCATTGTCCACAGGAAATGCTTCTAAATAGACT
CATTAGTTTTTAATAAGATTCTTTTTCTGTAGTTTAAATTGTTTAGTAGTAGTTCTCATTACACACACGTT
ATGATTGAGTAAAGACCTTCTGGCCATCAAGTGCTGTGATAGGAGTTTAAATATAGATTGCATACCCCTT
AGAAATATCTTAGATCAGACTAGTATGAAATATGATAAAGCTTTATTAACACTGTTTCGTTCTTGATTCT
GAATAAAATGTTATCACATTGTT
```


2- CONDICIONES DE AMPLIFICACION

2.1 Coctel de reacción

10X BUFFER.....	5 µL
dNTPs.....	0.2 mM (50 µM c/uno)
MgCl ₂	3.5 mM
Primer ACTdir.....	100 ng
Primer ACTrev.....	100 ng
Taq ADN polimerasa	2 U
H ₂ O SIGMA ultrapura	Y µL.
	(50-X -Y) µL
	↓
	
	MUESTRA (X µL) 100 ng ADN templado

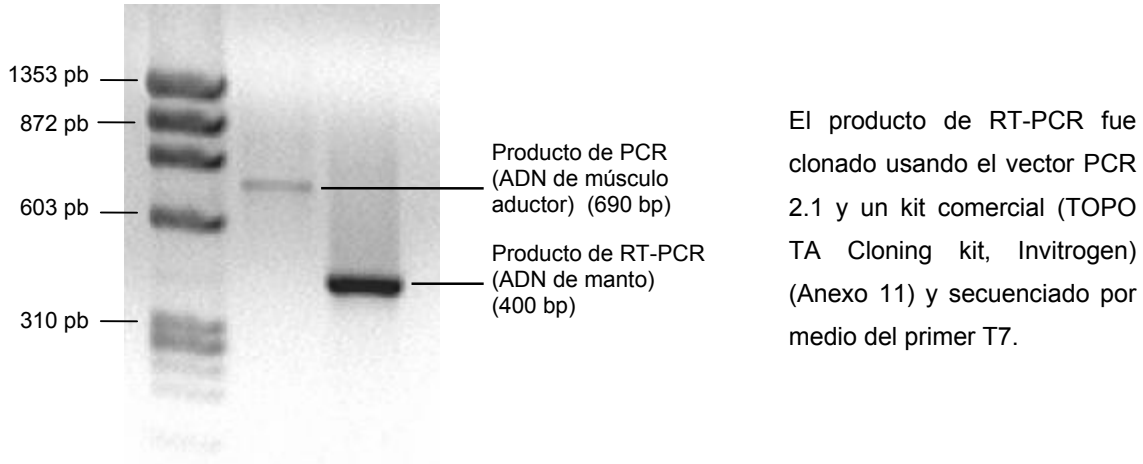
2.3 Condiciones de amplificación por PCR y RT-PCR

ETAPA	PCR		
	TEMP	DURACION	CICLOS
DESNATURALIZACION INICIAL	94° C	2 min	1
DESNATURALIZACION	94° C	1 min	 └─▶ 35
ALINEAMIENTO	64.5° C	1 min	
EXTENSION	72° C	1 min	
EXTENSION FINAL	72°	5 min	1

ETAPA	RT-PCR		
	TEMP	DURACION	CICLOS
TRANSCRIPCION REVERSA	48° C	45 min	1
DESNATURALIZACION INICIAL	94° C	2 min	1
DESNATURALIZACION	94° C	1 min	 └─▶ 35
ALINEAMIENTO	64.5° C	1 min	
EXTENSION	72° C	1 min	
EXTENSION FINAL	72°	5 min	1

3- PRODUCTOS DE AMPLIFICACION

La RT-PCR generó un producto de talla esperada (400 pb) y la PCR un producto de 690 pb.



La secuencia obtenida fue alineada con la secuencia de ARNm de actina de *C. gigas* (Cadoret et al., 1999) disponible en las bases de datos por medio del programa Blast 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>) :

Score = 748 bits (389), Expect = 0.0
Identities = 389/389 (100%) Strand = Plus / Plus

```
Query: 1 aggggtgatgggttggtatgggacagaaggacagctatgtaggagacgaggcccagagca 60
          |||
Sbjct: 177 aggggtgatgggttggtatgggacagaaggacagctatgtaggagacgaggcccagagca 236

Query: 61 agagaggtatcctcaccctcaagtacccattgaacacggcatcgtcaccaactgggatg 120
          |||
Sbjct: 237 agagaggtatcctcaccctcaagtacccattgaacacggcatcgtcaccaactgggatg 296

Query: 121 acatggagaaaatctggcatcataccttctacaatgaactccgtgtggccccagaggaac 180
          |||
Sbjct: 297 acatggagaaaatctggcatcataccttctacaatgaactccgtgtggccccagaggaac 356

Query: 181 acccgtcctcctgaccgaggccccactcaacccaaggccaacagagaaaagatgacac 240
          |||
Sbjct: 357 acccgtcctcctgaccgaggccccactcaacccaaggccaacagagaaaagatgacac 416

Query: 241 agatcatgttcgagaccttcaactctcccgccatgtacgtcgccatccaggccgactgt 300
          |||
Sbjct: 417 agatcatgttcgagaccttcaactctcccgccatgtacgtcgccatccaggccgactgt 476

Query: 301 cctgtacgcttccggtcgtacaaccggatcgtactcgactccggagatggtgtgtctc 360
          |||
Sbjct: 477 cctgtacgcttccggtcgtacaaccggatcgtactcgactccggagatggtgtgtctc 536

Query: 361 acacagtccccatctacgaaggttacgcc 389
          |||
Sbjct: 537 acacagtccccatctacgaaggttacgcc 565
```

ANEXO 7

LOCALIZACION DE ALGUNOS PRIMERS EMPLEADOS PARA LA DETECCION DE IRIDOVIRUS

Localización de los pares de primers empleados para la detección de iridovirus en la secuencia completa del gen de la MCP de FV₃ (No. Acceso Genbank : NC_004168)

```

                                MCP1 ▶▶                                MCP4 ▶▶
TTATAATAAAAAGGAAATGCTTCTGTAAACCGGTTCAGGTATCACAAAGTGGTTTCATCGACTTGGCCACT
TATGACAAATCTCGAGAGCAATGTACGGGGGCTCGGACGCCACCACGTACTTTGTCAAGGAGCACTACC
CCGTGGGGTGGTTCACCAAGCTGCCGTCTCTGGCCGCCAAGATGTCGGGCAACCCGGCTTTCGGGCAGCA
GTTTTCGGTGGCGTTCCCAGGTCGGGGATTACATCCTCAACGCCTGGTTGGTGTCAAGACCCCCGAG
                                IR3 ▶▶
GTCAAGCTCCTGGCCGCAAACCAGCTGGGAGACAACGGCACAATCAGGTGGACAAAGAACCCCATGCACA
ACATTGTGGAGAACGTCAACCTCTCATTCAACGACATCAGCGCCAGTCCTTAACACGGCATACTGGA
                                IR6 ◀◀
CGCCTGGAGCGAGTACACCATGCCAGAGGCCAAGCGCATAGGCTACTATAACATGATAGGCAACACCAGC
GATCTCATCAACCCCGCCCGGCCAGAGCCAGAACGGAGCCAGGGTCTCCCGGCCAAGAACCTGGTTCT
                                MCP5 ◀◀
TTCCCTCCCATCTTCTTCTCCAGAGACAGCGGCCTGGCCCTGCCAGTCTCTCCCTCCCCTACAACGA
GATCAGGATAACAGTCAAGCTGAGGGCCATCCAGGACCTCTGATCCTCCAGCACAACACCACAGGGGCA
ATCAGCCCCATCGTGGCCCGGACCTCGAGGGAGGTCCTCCCGACACCGTCCGAGGCCAACGTCTACATGA
CCGTGCGCCTCATCACCGGGGACGAGAGGCCAGGCCATGAGCAGCACAGTCAGGGACATGGTCTGGAGCA
GGTGCAGGCCCGCCAGTCCACATGGTCAACCCAGGAACGCGGCCACCTTCCACACCGACATGCGGTTCT
                                IR1 ▶▶
TCACACGCAGTCAAGGCCCTGATGTTTATGGTGCAGAACGTACACACCCCTTCCGTCGGCTCCAATTACA
CCTGCGCCACTCCCGTCTGTGGGAGTCGACAACACGGTCTCGGAGCCAGCCCTGGCGGTGGATCCCGTCAA
                                IR2 ◀◀
GAGCGCCAGCCTGGTGTACGAAAACACCACAAGGCTCCCCGACCTGGGAGTCGAGTACTACTCGCTGGTG
                                IR4 ◀◀
CAGCCCTGGTACTATGCCACCTCCATCCCAGTCAGCACCGGGCACCACCTTACTCTTATGCCCTCAGCC
TGCAGGACCCCAACCATCCGGATCCACCAATTACGGCAGACTGACCAACGCCAGCCTTAACGTACCCCT
GTCCGCTGAGGCCACCACGGCCTCCGCAGGAGGGGAGGCGACAACCTCTGGGTACACCACGCCCAAAG
                                MCP2 ◀◀
TACGCCCTCATCGTTCTGGCCATCAACCACAACATTATCCGCATCATGAACGGCTCGATGGGATCCCAA
TCTTGTAAAGAGTATTTTTTCAGCGCAAAGTCTTTTCCGTCATGGGTCTCCATGATGGAAATAAACATG
AA
```

ANEXO 8

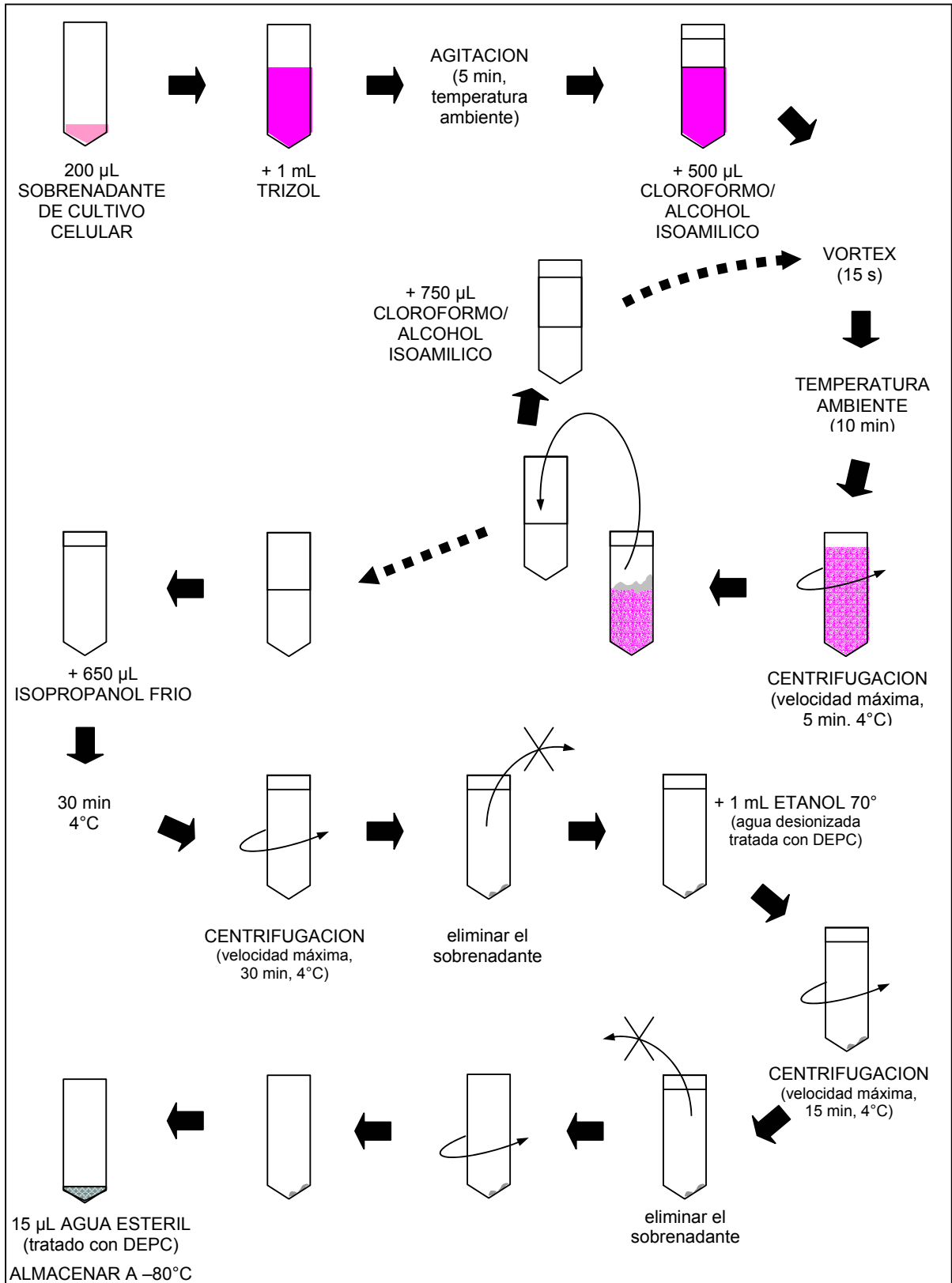
UBICACION DE LOS PRIMERS EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DE MABV

Localización de los pares de primers diseñados por Suzuki et al. (1997) en la secuencia completa del segmento A del birnavirus marino (MABV) (No. Acceso Genbank : NC_004168)

CGTCGATGGCGAAAGCCCTTTCTAACAAACAACCTACAATTCCATCTACATGAATCATGAACACAACAAA
GGCAACCGCAACTTACTTGAGATCCATTATGCTTCCCAGAAATGGTCCAGCAAGCATTCCGGACGACATA
ACAGAGAGACACATACTAAAACAAGAGACCTCGTCATACAACTTAGAGGTCTCAGACTCCGGAAGTGGGC
TTCTTGTCTGCTTCCCTGGAGCTCCTGGATCCAGAGTCCGGTGGCCACTACAAGTGAATCAGAACCAGAC
GGAAGTGAATTCGACCAGTGGCTGGAAACATCACAGGACCTGAAGAAGCATTCAACTACGGGAGGCTG
ATCTCACGGAATACGACGTCCAGAGCTCAACCCTACCCGCTGGTCTGTATGCCCTGAATGGGACCTGA
ACGCCGCGACCTTCGAAGGAAGTCTGTCTGAAGTGGAGAGCTTCTCCTACAACAGTCTGATGTCCCTCAC
CACGAACCCCGAGGACAAAGTGAACAACCAGCTAGTCACCAAAGGAGTGACAGTCTTAAACCTACCAACA
GGGTTTCGACAAGCCATACGTCCGCCTGGAGGACGAGACCCCAAGGGCCCCAGTCAATGAACGGCGCCC
GGATGAGGTGCACAGCTGCAATTGCACCACGAAGGTACGAAATCGACCTCCCATCCGCACGCCTCCCCAC
AGTACCAGCGACTGGGACCTCACAACAATCTATGAAGGGAACGCCGACATTGTGAACTCAACCACAGTG
ACCGGCGACATCAGCTTCAGACTGGAACAAGACCCCGAATGACACGAAGTACGACTTCCAGCTCGACT
TCCTCGGCTTAGACAACAACGTCCCGTCTGTCAATAACCAGCTCTACGCTGGCCACAACCAGCAACTA
CAGGGGGTCTCAGTCAAATTCACACAGTCAATCCCAACAGAGACAATCAGAAAACCCATCACCAGGGTC
AAGTGTCTTACAAAATCAACCAGCAGACAGCTATCGGCAATGCAGCAACGCTTGGACCCCTGGGGCCCT
CATCCGTCTCATTCTCATCAGGAAACGGCAACGTACCTGGAGTGTCTCAGGCCAATCACCCTGGTGGCCTA
CGAGAAGATGACCCCGAGTCGATCCTGACGGTAGCTGGAGTGTCAAACCTACGAGCTGATCCCAAACCC
GAACTCCTGAAGAATATGGTACGAAATATGGCAAGTATGACCCCTGAAGGTCTCAACTACGCCAAGATGA
TCTGTCCCACCGAGAGGAGCTAGACATCAGAACAGTCTGGAGAACCAGGAGTACAAGGAGAGAACAAG
AGCCTTCAA**TGAGATCACAGACTTCTCAAGTGACC**TCCCAACCTCAAAGCCTGGGGGTGGAGAGACATT
GTGAGAGGCATCCGGAAGGTGGCAGCACCAGTGCTGT**CAACACTCTTCCCATG**GCGGCACCCTCATCG
GAGCCGCGACCAATTTCATCGGAGACCTGACCAAGACCAACGCAGCCGGAGCCCGCTACCTAACACATGC
AGCAGGAGGACGCTACACTGACGTAATGGACTCCTGGCCAGCGGCAC**AGACTGGGAGTTCT**CACGC
AACCTCAAAGACCGGCTGGAGTCAAACAATATGAGGAGATGGAACCTCCTCCCAACGAAAG**GAGTCA**
TCATACCTGTAGTGACACACAGTGGAGAGTGCACCTGGTGGAGCCTTTGGGTCCCTTCTGGTAATCATCCC
AGGAGCATACCCAGAACTTCTTGACCCAAACCAGCAGGTCTGTCCCCTTCAAAAACGACACCGGATGT
GTCTGGGGCATAGGAGAAGACATTCCATTGAAAGGTGACGACATATGCTACACCGCCCTGCCTCTCAAAG
AGATCAAGAAGAACGGAAACATCGTGGTGGAGAAAGTCTTCGCTGGCCCTGCGATGGGACCATCTGCCA
GCTGGGCCTGTGCTCCTTGTCAACGACATCGACAAGGGCGTACCCAGAAATGGTGTTCCTGAGAGATC
GCAAACGACGAGGAAACCATCGTCCCATCTGCGGTGTAGACATCAAAGCCATCGCCGCCCATGAACATG
GGCTGCCACTCGTTGGCTGTCAACCAGGAGTGCATGAGGTGGTGGCAAACACATCTCTCGCCTCACACCT
GATCCAGAGCGGAGCACTACCAGTGCAGAAAGCACAAGGCGCCAGCAGGAGGATCAAGTACCTGGGGGAA
CTAATGAGAACAACCTGCATCAGGGATGGATGAAGAGCTGCAGAAGCTGCTGCACGCCACCATGGCCAGAG
CAAAAGAGGTGAAAGACGCCGAAGTCTTCAAACCTTCTCAAGCTGATGTCTGGACCAGGAAGAACGGGCT
CACCGACCACATGTATGAATGGTCAAAGAGGACCCTGAAGCAGTCAAATTTGGCAAACCTCATCAGCACA
CCACAAAACACCAAGAGAAGCCAAAAGGACCCGACCAGCACACGGCACAGGAGGCAAAAGCCGTCCGGA
TCTCACTAGATGCAAGTGAAGCAGGAGCAGACTTTCCTCCCGACTGGATCGCGGAGAATGGATACCG
CGGTCCATCACCAGCCAGTTCAAGTACTACGTATCACAGGGCGCGTCCAGACCCACAGACGAGATCAG
GAGGACTACGTGCGAAAACCAATAACAAGACCCAGGACATGGACAAAATCAGACGCCTAGCCAACAGTG
TCTACGACTTCCCAACCAAGAACCTGCACCAGAGGAATTTACCAAGCGGTAGTCGAGATCTTCGCAGA
AAATGGAGGACGAGGACCAGATCAAGACCAGATGCAAGACCTGAGGGACTTGGCCCGGAGATGAAACGA
CGACCCCGACCAGCTGAGACACGCAGGCAAAACCGAGCTCCACCACGGGCGGCACCCAGTGAAGCTCAC
GTTTTACCCCTCCGGAGATAACGGAGAAGTGTAAAC

ANEXO 9

EXTRACCION DE ARN DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS CELULARES INFECTADOS




ANEXO 10

CONDICIONES DE AMPLIFICACION DE FRAGMENTOS DE ACUABIRNAVIRUS

10a- AMPLIFICACION POR RT-PCR (SENCILLA)

1- COCTEL DE REACCION



BUFFER 5X	10 μ L	
dNTPs 40 mM	5 μ L	(0.2 mM)
MgSO ₄ 25 mM	2 μ L	(1 mM)
Primer sentido	3 μ L	(50 pmol)
Primer antisentido	3 μ L	(50 pmol)
Transcriptasa Reversa AMV	1 μ L	(0.1U/ μ l)
ADN polimerasa Tvl	1 μ L	(0.1U/ μ l)
H ₂ O	q.s.p.	
	<hr/>	
	48 μ L	
	↓	
		
	X μ L de ARN total (muestra o control)	

2- TRANSCRIPCION REVERSA Y CONDICIONES DE AMPLIFICACION

ETAPA	TEMP	DURACION	CICLOS
TRANSCRIPCION REVERSA	48° C	45 min	1
DESNATURALIZACION INICIAL	95° C	2 min	1
DESNATURALIZACION	95° C	30 s	40
ALINEAMIENTO	48° C	1 min	
EXTENSION	68° C	2 min	
EXTENSION FINAL	68°	7 min	1

10b- AMPLIFICACION POR PCR ANIDADA

1- COCTEL DE REACCION

BUFFER 10X	5 μ L	
dNTPs	5 μ L	(2 mM)
MgCl ₂	5 μ L	(2.5 mM)
Primer sentido	1 μ L	(50 pmol)
Primer antisentido	1 μ L	(50 pmol)
Taq ADN polimerasa	0.5 μ L	(2.5 U)
H ₂ O	31.5 μ L	
	<hr/>	
	49 μ L	
		
		
	1 μ L de producto de RT-PCR o de ADN control	

2- CONDICIONES DE AMPLIFICACION

ETAPA	PCR		CICLOS
	TEMP	DURACION	
DESNATURALIZACION INICIAL	95° C	2 min	1
DESNATURALIZACION	95° C	30 s	35
ALINEAMIENTO	48° C	1 min	
EXTENSION	68° C	2 min	
EXTENSION FINAL	68°	7 min	1

ANEXO 11

PROTOCOLO DE CLONACION

(TA TOPO CLONING KIT, INVITROGEN)

LIGACION A Pcr 2.1

La cantidad (X) de producto de PCR fresco que debe ser ligada a 50 ng de vector pCR2.1 puede ser estimada con la fórmula:

$$X \text{ ng de producto de PCR} = \frac{700pb * 50ngvector}{3900pb(vector)}$$

X ng corresponde a una proporción 1:1

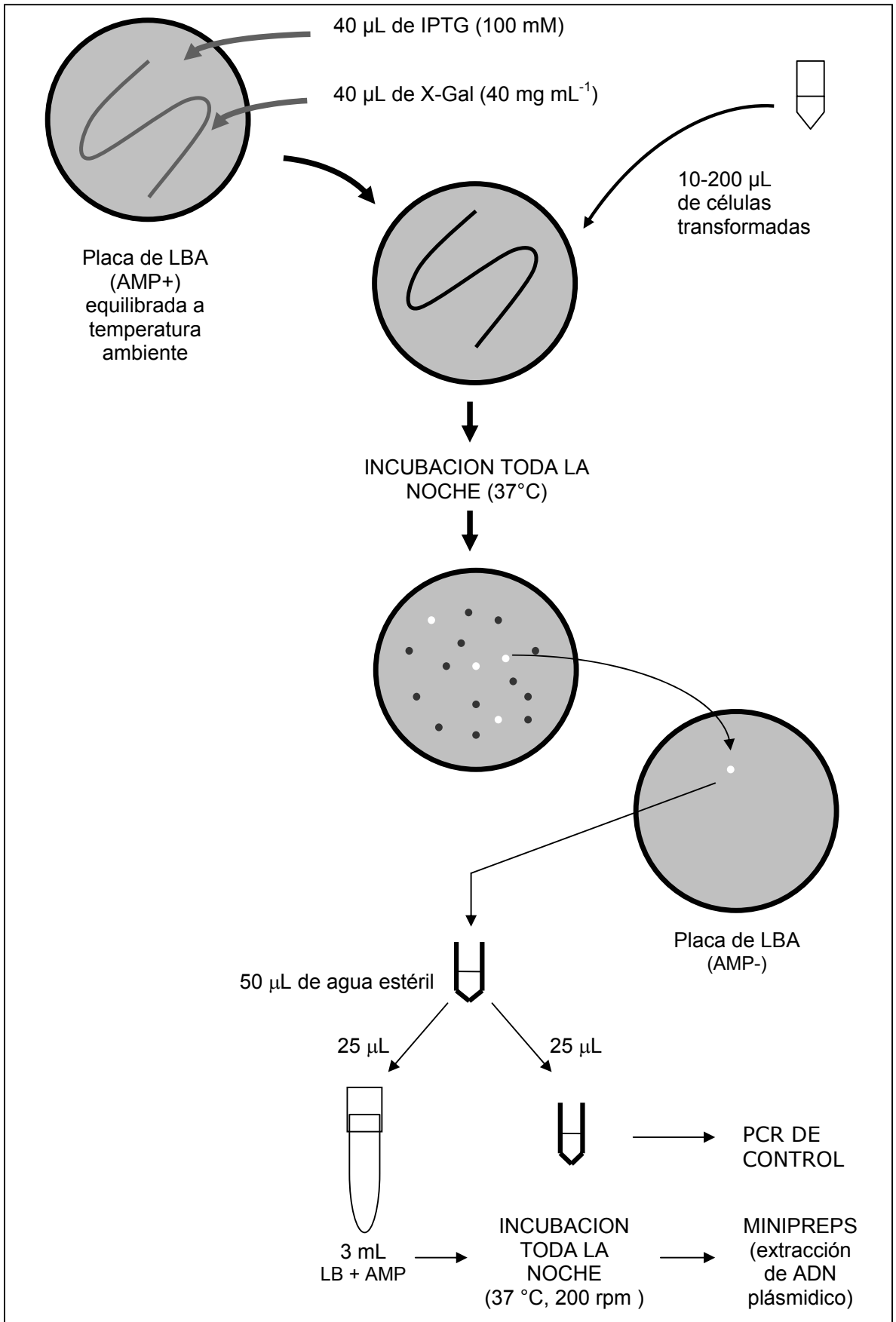
La reacción de ligación (10µL) se prepara del siguiente modo:

Producto de PCR fresco	3X=2 µL
Buffer 10X	1 µL
Vector pCR 2.1	2 µL (25 ng µL ⁻¹)
Agua estéril	4 µL (qsp 10 µL)
T4 DNA ligasa	1 µL (4 WU)

Tras una incubación a 14°C toda la noche se almacena a -20°C o se emplea inmediatamente para la reacción de transformación.

TRANSFORMACION DE CELULAS TOP10F'

- 1) Equilibrar un baño maría a 42°C y equilibrar el medio SOC a temperatura ambiente.
- 2) Descongelar en hielo 50µL de células competentes y mezclar suavemente.
- 3) Pipetear 3µL de cada producto de ligación directamente dentro del vial de células competentes y mezclar suavemente. Incubar en hielo por 30 min.
- 4) Introducir los viales en el agua a 42°C por 35 segundos y luego ponerlos en hielo.
- 5) Agregar 250µL de medio SOC en cada tubo.
- 6) Agitar los viales horizontalmente a 37°C por 1 hora a 225 rpm en un incubador.
- 7) Plaquear las células transformadas (c.f. página siguiente).



MINIPREPS
(EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO)

- 1) Transferir 1.5 mL de cultivo celular a un tubo Eppendorf y centrifugar (14 000 rpm, 1 min). Eliminar el sobrenadante, reemplazar por el 1.5 mL restante y centrifugar de nuevo.
- 2) Resuspender manualmente.
- 3) Agregar 200 μ L de S1 y vortexear.
- 4) Incubar 5 min en hielo.
- 5) Agregar 200 μ L de S2 y mezclar.
- 6) Incubar 5 min a temperatura ambiente y 5 min en hielo.
- 7) Agregar 200 μ L de S3 y vortexear a baja velocidad.
- 8) Incubar 30 min en hielo.
- 9) Centrifugar (12 000 rpm, 10 min).
- 10) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 11) Extraer con 700 μ L de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1).
- 12) Agregar 3 μ L de RNAsa (10 mg mL⁻¹).
- 13) Incubar 2.5 horas a temperatura ambiente.
- 14) Repetir la etapa 11.
- 15) Agregar acetato de amonio a 3M (1/10 del volúmen de la fase acuosa).
- 16) Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 17) Dejar toda la noche a -20°C.
- 18) Centrifugar (14 000 rpm, 10 min).
- 19) Lavar con 800 μ L de etanol al 70%.
- 20) Centrifugar (14 000 rpm, 10 min).
- 21) Secar el pellet al aire libre.
- 22) Resuspender en 30 μ L de agua destilada estéril.

MEDIOS Y SOLUCIONES PARA CLONACION Y MINIPREPS

- **Medio SOC**

Triptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCL ₂	10 mM
MgSO ₄	10mM
Glucosa	20 mM

- **Medio LB (LBA= LB agar)**

Triptona	20 g L ⁻¹
Extracto de levadura	10 g L ⁻¹
NaCl	10 mM
KCl	10 mM
(Agar)	(15 g L ⁻¹)

Autoclavear.

Para los medios (AMP+) agregar 50 mg L⁻¹ de ampicilina.

- **X-GAL 50 mM**

X-Gal	20 mg
DMF (Dimetilformamida)	1 mL

Extender 40 µL en cada placa.

Almacenar a -20°C.

- **S1 (MINIPREP)**

Glucosa	50 mM
Tris-HCL, pH 8	25 mM
EDTA	10 mM

- **S2 (MINIPREP)**

NaOH	0.2 N
SDS	0.1 %

- **S2 (MINIPREP) (acetato de potasio, pH 4.8, 5 M)**

CH ₃ COOK 5M	60 mL
Acido acético	11.5 mL
Agua destilada	28.5 mL

ANEXO 12

ARTICULO 3 (PUBLICADO):

« ENFERMEDADES MICROBIANAS DE PECTINIDOS CULTIVADOS EN IBEROAMERICA »

Coautores : Barbosa V., Luna A., Aguirre G., Riquelme C. and Ascencio F.

en : *Moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.*

A.N. Maeda-Martínez editores. Capítulo 16 : 325-342

GLOSARIO

ácido nucleico: biomolécula formada por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una generación a la siguiente. Existen dos tipos: el ácido desoxirribonucleico (**ADN**) y el ácido ribonucleico (**ARN**).

acuicultura: cultivo de peces, moluscos, crustáceos y otras plantas y animales acuáticos en lagos, arroyos, brazos de agua, bahías y estuarios. Las actividades acuiculturales incluyen la reproducción experimental de los organismos acuáticos, su alimentación, siembra, cultivo y cosecha así como la construcción y el mantenimiento de los edificios, equipos y áreas de engorda necesarios. Múltiples factores de la biología de cada especie deben ser tomados en consideración (tipo de alimentación, flujo de agua, salinidad y temperatura óptimas, sensibilidad a enfermedades) y el diseño de las unidades de producción debe estar adaptado (fuente y calidad del agua, sistemas de almacenamiento, filtración y aereación).

ADN (ácido desoxirribonucleico): ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Los desoxirribonucleótidos están ligados por enlaces fosfodiéster entre el grupo 5'-fosfato de un nucleótido y el grupo 3'-hidroxil del siguiente. En la naturaleza, el ADN puede adoptar una conformación en doble cadena (modelo de Watson y Crick) o de cadena sencilla. El ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células así como para su propia replicación y cumple la función de archivo de la información genética contenida en su secuencia de bases.

ADNc: ADN complementario sintetizado a partir de un templado de ARN por la enzima transcriptasa reversa y que no contiene, por tanto, ningún intrón.

aislado: los virus aislados del hospedero natural en el campo constituyen los aislados virales nuevos (al contrario de los “tipos silvestres” o mutantes de laboratorio).

alineamiento de secuencias: esquema en que se escriben dos secuencias, una encima de la otra, y se estima que los residuos que comparten la misma posición tienen un origen evolucionario común: (1) si la misma letra se encuentra en la misma posición, entonces esta posición ha sido conservada a través de la evolución (2) si las letras difieren, se asume que ambas difirieron a partir de una misma base ancestral. Secuencias homólogas pueden ser de talla diferente debido a los eventos de inserción/delección. Un alineamiento múltiple acomoda una serie de secuencias de tal forma que las posiciones homólogas se escriban en una columna común.

aminoácido: molécula orgánica de fórmula general $R-CH(NH_2)COOH$ que posee grupos básicos (NH_2) y ácidos ($COOH$) así como un grupo lateral (R) específico de cada aminoácido. Subunidad de base de las proteínas.

ancestro : organismo, población o especie del cual desciende otro organismo, población o especie por medio de la reproducción.

anclaje (viral): ligación específica de una proteína del virión (antireceptor) a un elemento de la superficie celular (receptor). Un ejemplo clásico de antireceptor es la hemaglutinina del virus de la influenza (familia *Orthomyxoviridae*). Todos los virus que infectan a humanos y animales poseen antireceptores. Los virus más complejos (como la familia *Poxviridae*) pueden disponer de más de un tipo de moléculas con función de antireceptor. Además, ciertos antireceptores cuentan con varios dominios, cada uno de los cuales puede reaccionar con un receptor diferente.

anticuerpo: proteína del suero producida en respuesta a la inmunización; los anticuerpos están generalmente definidos en términos de su vinculación específica al antígeno inmunizador.

antígeno: cualquier material extranjero ligado de manera específica por anticuerpos o linfocitos específicos. Los antígenos pueden ser inmunógenos si son capaces de provocar una respuesta inmune. En el caso contrario se les llaman haptenos.

apoptosis: proceso de muerte celular programada y genéticamente regulada en el que células dañadas o peligrosas son eliminadas de organismos pluricelulares. La apoptosis juega un papel esencial en el desarrollo normal y la homeostasis de los tejidos de metazoarios e interviene en el desarrollo embrionario y la metamorfosis de los insectos. Constituye además un mecanismo antiviral sumamente conservado y repandido que hace intervenir una familia de proteínas proapoptóticas llamadas caspasas. Los virus han desarrollado mecanismos para bloquear este sistema de defensa por autoeliminación de las células hospederas.

árbol filogenético: estructura matemática utilizada para modelar la historia evolucionaria de un grupo de secuencias u organismos. Un árbol consiste en nodulos conectados por **ramas**. Los nodulos terminales (llamados también Unidades Taxonómicas Operacionales u OTUs, nodulos externos o taxones terminales) representan secuencias u organismos extintos o en proceso de extinción. Los nodulos internos representan ancestros hipotéticos. El ancestro de todas las secuencias representadas en el árbol es la raíz de ese árbol. La mayoría de los métodos intentan estimar el grado de evolución que separa a los nodulos del árbol, y que está representado por el largo de la rama.

ARN (ácido ribonucleico): ácido nucleico formado por nucleótidos en los que el azúcar es ribosa y las bases nitrogenadas son adenina, uracilo, citosina y guanina. Actúa como intermediario y complemento de las instrucciones genéticas codificadas en el ADN. Existen varios tipos diferentes de ARN, relacionados con la síntesis de proteínas: ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y un ARN heterogéneo nuclear (ARN Hn). El ARN es normalmente el producto de la transcripción de un templado de ADN, aunque en las ciertas familias de virus el ARN actúa de plantilla.

ARN (ds): ARN bicatenario que constituye el genoma de los miembros de dos familias de virus: *Reoviridae* y *Birnaviridae*.

ARNm (ARN mensajero): molécula de ARN que representa una copia en negativo de las secuencias de aminoácidos de un gen. El ARNm maduro carece de **intrones**. Con pocas excepciones el ARNm posee una secuencia de cerca de 200 adeninas (cola de poli A), unida a su extremo 3' que no es codificada por el ADN.

ARN (ss, + / -): RNA de cadena sencilla, de sentido positivo o negativo, que constituye el genoma de ciertas familias virales **(+) RNA sentido (RNA positivo):** RNA cuya polaridad es idéntica a la del ARNm (*Togaviridae*, *Coronaviridae*). **(-) RNA anti-sentido (RNA negativo):** RNA cuya polaridad es contraria al del ARNm (*Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*).

ATP (adenosina trifosfato): ester de adenosina y de ácido trifosfórico ($C_{10}H_{12}N_5O_4H_4P_3O_9$) formado por la reacción de un ADP y de un ortofosfato (oxidación) o por la interacción de un ADP y de fosfocreatina u otros sustratos. Fuente de energía para reacciones fisiológicas como la contracción muscular.

ATPasa: adenosina trifosfatasa: cualquiera de las enzimas que cataliza la hidrólisis de ATP en ADP y fosfato.

base: compuesto que usualmente contiene nitrógeno y que es capaz de aceptar un H^+ . Se emplea para designar los componentes de los nucleótidos que no son azúcares. Las cinco bases que constituyen los ácidos nucleicos son la adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U).

bicapa lipídica: membrana natural o sintética en la que los lípidos anfipáticos están dispuestos en dos capas con sus cadenas apolares dirigidas hacia el interior, una hacia otra, y su grupos polares dirigidos hacia el exterior i.e. la fase acuosa.

CAP: metilguanósina trifosfato con la que se sella el extremo 5' de un transcrito primario.

capping: la estructura de la 5' cap de los ARNm de eucariotas consiste en un grupo 7-metilguanósina ligado al extremo del transcrito por medio de un puente 5'-5' trifosfato. El capping es el resultado de una serie de tres reacciones enzimáticas en las que el extremo 5' trifosfato del pre-mRNA es hidrolizado en 5' difosfato (RNA trifosfatasa), sellado con GMP (RNA guanililtransferasa) y metilado en el N7 de la guanina (metiltransferasa). El capping del ARN es esencial para el crecimiento celular.

cápside: cáscara proteica que forma un complejo con el material genético del virus.

capsómero: unidad estructural básica de la cáscara proteica de un virus. Los capsómeros pueden constar de varias proteínas o protómeros. Cuando la cápside está constituida por múltiples ejemplares de una misma proteína, protómero y capsómero son equivalentes. Un capsómero ubicado en una vértice es un pentámero ya que forma parte de un grupo de cinco capsómeros. Si el virus es suficientemente grande y complejo, se les llama hexámeros a los capsómeros ubicados en una cara de la cápside y que son parte de un grupo de seis capsómeros.

captura de genes: apropiación de genes del hospedero por los genomas de virus a través de la coevolución.

cepa: este término suele designar varios tipos silvestres del mismo virus (como las cepas Arsay y Nueva Jersey del virus de estomatitis vesicular).

clonación (de genes): producción de un linaje de células que contienen un fragmento de ADN particular. La clonación de genes implica varias etapas: (1) inserción (recombinación) de una población de moléculas de ADN, dentro de la cual se encuentra el ADN de interés, dentro de una población de vectores de tal forma que cada vector contenga una única molécula de ADN (2) transformación de una población de células hospederas con los vectores recombinantes de tal forma que cada célula adquiera sólo un vector (3) crecimiento de las células hospederas (clonación) por plaqueo a bajas densidades para generar una colección de colonias aisladas (4) identificación de las clonas que contienen el ADN de interés.

coevolución: la evolución concertada se refiere a la capacidad de dos genes relacionados para evolucionar juntos como si formaran un locus único.

colinearidad: correspondencia exacta entre la secuencia de ADN de genes sin intrones y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

concatémero (ADN): serie de genomas repetidos en tándem.

conservación: en biología molecular, preservación a través del tiempo de algunas bases o aminoácidos de la secuencia de un gen o de una proteína que está evolucionando.

convergencia: similitudes en caracteres genéticos o fenotípicos que han surgido en dos o más organismos que no están relacionados. Contraste con **homología**.

core: cáscara proteica que rodea al material genético de virus herpes, de reovirus o de poxvirus.

corte y empalme del ARN: en las células eucariotas, proceso postranscripcional autocatalítico o enzimático de eliminación de los intrones y reunión de los exones de moléculas de (i) ARN nuclear heterogéneo para formar el ARNm que será traducido en proteína (ii) ARN ribosómico (iii) ARN de transferencia. Un proceso similar ha sido descrito en ARN de transferencia de procariontes y bacteriófagos.

cromatina: complejo de ADN asociado a proteínas (histonas y no histonas) que representa el estado normal de los genes en el núcleo. Existe en dos formas: la eucromatina que puede ser transcrita y la heterocromatina altamente condensada y que no puede ser transcrita.

cruza consanguínea: cruza entre reproductores con lazos de sangre. La forma más extrema es el hermafroditismo.

cuerpo de inclusión (viral): área del núcleo o del citoplasma de una célula infectada por un virus que presenta una coloración alterada. Algunos cuerpos de inclusión constituyen “fábricas virales” en las que ácidos nucleicos o proteínas virales están siendo sintetizadas, otros corresponden a arreglos cristalinos de viriones, cápsides u otros componentes virales y otros son artefactos provocados por los procesos de fijación o coloración.

cuerpos de inclusión de Cowdry tipo A: masas de material acidófilo en forma de gotas rodeadas por halos claros al interior del núcleo, acompañadas por una **marginación** de la cromatina contra la membrana nuclear.

cuerpos de inclusión de Cowdry tipo B: masas de material acidófilo en forma de gotas rodeadas por halos claros al interior del núcleo sin otros cambios nucleares (estadios tempranos del desarrollo de la inclusión).

delección: eliminación de una secuencia de ADN acompañada por la ligación de las regiones adyacentes.

depresión genética por endogamia: reducción de la *fitness* de la descendencia provocada por la existencia de lazos de sangre entre los genitores.

desnaturalización: destrucción del plegamiento ordenado de una proteína o ácido nucleico que es necesario para su funcionamiento normal. La desnaturalización de proteínas provoca el pasaje de una conformación específica globular o fibrosa a un enrollamiento al azar. La desnaturalización de ácidos nucleicos implica la disociación de la doble cadena en hebras sencillas.

divergencia (gen): porcentaje de diferencias de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de dos secuencias de ADN o de dos proteínas relacionadas.

dNTP: desoxiribonucleótido trifosfato i.e. nucleótido que consiste en un azúcar, una base nitrogenada y tres fosfatos.

duplicación: presencia o creación de dos copias de un fragmento de ADN en el genoma.

efectos citopáticos (CPE): cambios degenerativos en células (especialmente en cultivos de tejido) asociados con la multiplicación de ciertos virus. La citopatología puede ser de varios tipos: lisis (o necrosis), formación de inclusiones, citomegalia, formación de sincitios y vacuolización del citoplasma. Cuando, en cultivos celulares, la propagación del virus está limitada por una capa de agar (u otra sustancia adecuada) el efecto citopático puede conducir a la formación de placas.

electroforesis: técnica que separa, según su movilidad, partículas disueltas o coloidales sometidas a un campo eléctrico. La movilidad electroforética de una partícula depende de su tamaño, estructura tridimensional y carga eléctrica.

endonucleasa de restricción: endonucleasa que reconoce y es capaz de cortar una secuencia corta específica de ADN. Este tipo de enzimas permite a las células protegerse de infecciones virales y es empleado para el análisis del ADN (RFLP).

enfermedad epizootica: enfermedad que afecta a un gran número de animales al mismo tiempo y en una misma región geográfica.

enfermedad oportunista: infección establecida por un microorganismo usualmente inofensivo en un hospedero cuyo sistema inmune se encuentra debilitado.

ensamblaje: etapa de la replicación viral en la que todos los componentes estructurales se reúnen para armar la estructura básica de la partícula viral. El ensamblaje puede llevarse a cabo en el citoplasma (picornavirus, poxvirus, reovirus) o en el núcleo (adenovirus, papovavirus, parvovirus). Todos los virus que se ensamblan y adquieren su infectividad dentro de la célula dependen de desintegración de ésta para poder salir. En otros casos (virus sin envoltura) la última etapa antes del ensamblaje viral puede ser combinada con su extrusión de la superficie celular. En este caso, los virus pueden ser desde altamente citolíticos (togavirus, paramyxovirus, rhabdovirus) hasta prácticamente no citolíticos (retrovirus).

envoltura: membrana lipídica que envuelve a una partícula viral. La envoltura puede estar derivada del aparato de golgi (virus vaccinia) o ser adquirida por el virus durante su pasaje a través de la membrana nuclear o citoplásmica de la célula hospedera (virus herpes, HIV). La envoltura viral contiene los componentes lipídicos y proteicos de la membrana de la cual fue derivada así como proteínas virales que pueden formar protuberancias. La envoltura es común en virus de animales mas no en virus de plantas.

eosinofílico: células o elementos de tejido que se tiñen con eosina.

epidemiología: estudio de los factores y eventos que determinan y afectan el estado de salud de las poblaciones y aplicación de estos estudios al control de los problemas de salud. En el caso de la virología, la epidemiología es el estudio de las causas, distribución y frecuencia de las enfermedades virales así como de la distribución y transmisión de los virus que causan enfermedad.

episoma: plásmido capaz de establecerse en el núcleo de ciertas células sin integrarse al genoma.

especificidad: capacidad que tiene un método analítico para evaluar de manera inequívoca un analito en presencia de otros componentes susceptibles de estar presentes en las muestras.

etiología: causa de una enfermedad (por ejemplo, un patógeno o una toxina).

eurihalina: animal acuático que tolera amplias gamas de salinidad en el medio.

exactitud: distribución de los valores proporcionados por un método analítico alrededor de un valor « real » (valor « verdadero » convencional o valor aceptado como referencia).

exon: región de un gen que está presente en el transcrito funcional final de ese gen. Los exones constituyen el ARNm que es traducido en proteína. Cualquier sección no intrónica de la secuencia de un gen.

expresión de genes: etapa esencial de la replicación viral en la cual la información genética del virus se expresa. Punto de control de la replicación viral.

expresión ectópica: expresión de un gen en un tejido en donde no se expresa usualmente. En organismos transgénicos, puede obtenerse por medio de la inserción en el genoma de elementos enhancer adecuados.

fibropapilomatosis (FP): la fibropapilomatosis de la tortuga de mar es una enfermedad marcada por la proliferación de fibropapillomas cutáneos benignos pero debilitantes y de fibromas viscerales ocasionales.

filogenie: relaciones evolucionarias entre organismos; esquemas de ramificación de los linajes de organismos basados en la historia evolucionaria de los organismos considerados.

filo: división del reino animal abajo del subreino pero arriba del subfilo (los géneros relacionados son colocados en una misma familia, las familias relacionadas en un orden, los órdenes relacionados en una clase y las clases relacionadas en un filo).

fouling: acumulación de depósitos en superficies submarinas como las de los barcos. En cultivo de bivalvos, este término se refiere a la invasión de los instrumentos de producción (bolsas, canastas...) por algas y organismos indeseables.

gameto: célula reproductiva haploide.

gen: determinante segregacional y heritable del fenotipo. Dentro de un organismo, un gen puede ser definido como un segmento de ADN o ARN esencial para que se lleve a cabo una función específica.

genogrupo: grupo de virus determinado por similitudes de secuencia (por ejemplo, los virus de tipo Norwalk, miembros de la familia *Caliciviridae*, han sido subdivididos en el genogrupo 1-virus Norwalk- y el genogrupo 2-virus snowmountain, de Hawaï y Toronto).

genoma : contenido genético completo de una célula u organismo, incluyendo cromosomas, plásmidos y profagos. Información genética completa de un organismo.

hairpin: región de una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla que puede aparearse por complementariedad entre ciertas pares de bases.

hebra sentido: hebra del ADN cuya secuencia es idéntica a la del transcrito de ARN i.e. hebra que no es trascrita.

hermafroditismo: presencia simultánea o sucesiva de órganos reproductores macho y hembra en un organismo.

hibridación *in situ* (HIS): hibridación específica de una sonda nucleica marcada a secuencias complementarias en tejido fijado, seguida por una visualización de la localización de la sonda. Esta técnica puede ser empleada para localizar secuencias de ADN en cromosomas o detectar ADN o ARN viral. Las sondas específicas son generadas por clonación de secuencias de ADN o síntesis de oligonucleótidos.

homología: medida cualitativa que establece una relación evolucionaria entre dos o mas secuencias de ácidos nucleicos o proteínas. La homología le atribuye un origen evolutivo (no azaroso) a la existencia de similitudes entre las secuencias comparadas : las regiones similares son así regiones conservadas a través del tiempo. La **similitud** es el resultado de una medida cuantitativa mientras que la **homología** es una hipótesis basada en la similitud de las secuencias y en otros datos biológicos sobre el origen de éstas. Puede definirse un porcentaje de similitud, mas no un porcentaje de homología, ya que las secuencias son o no son homólogas. Sin embargo, ambos términos son frecuentemente empleados como sinónimos (ver **homólogos**).

homología (biológica): dos estructuras son homólogas cuando han sido heredadas de un ancestro común que poseía dicha estructura. Cuando las estructuras ha sido modificadas en la descendencia puede ser difícil determinar su homología

homólogo(a)s: (1) moléculas de ácidos nucleicos que comparten la misma secuencia de bases excepto por diferencias menores en alelos; (2) moléculas de ácidos nucleicos de varias cepas de una misma especie que tienen largos fragmentos de ADN con secuencias idénticas; (3) familias de genes o proteínas que tienen un origen evolucionario común y reconocible.

hospedero: organismo o población (población hospedera) predispuesta a la contaminación por un patógeno.

icosaedro: sólido geométrico con 12 vértices, 20 caras, y 30 bordes (el ejemplo más común es el balón de soccer). Cada vértice, cara o borde constituye un eje de simetría. El número asociado a un eje de simetría (eje de orden n) es el número de veces en que, al ser sometido a una rotación de 360 grados, el sólido adopta una posición idéntica a su posición inicial

ICTV: Comité internacional de Taxonomía de Virus (antes Comité Internacional de Nomenclatura de Virus fundado en 1966) que comprende seis sub-comités, 45 grupos de estudio y más de 400 virólogos. Actualmente, el ICTV opera bajo la tutela de la División de Virología de la Unión Internacional de Sociedades de Microbiología. El ICTV asigna a los virus dentro de un esquema jerárquico accesible para todos a través de una base de datos universal (ICTVdB) disponible en línea.

infección abortiva: infección improductiva que se produce cuando un virus infecta a una célula (u hospedero) que no es permisiva para alguna función viral. Debido a que no puede llevarse a cabo el ciclo completo de replicación, no hay producción de partículas virales.

infección aguda: infección relativamente breve (unos cuantos días o semanas) tras la cual, generalmente, el sistema inmune elimina por completo al virus del organismo infectado.

infección crónica: infección prolongada y tenaz causada por virus capaces de persistir en el organismo. A menos que la infección sea letal, el sistema inmune del hospedero logra generalmente eliminar por completo al virus.

infección latente: los virus capaces de limitar la expresión de sus genes pueden establecer infecciones latentes *sensu stricto*, es decir infecciones con una expresión génica estrictamente restringida en las cuales no hay replicación viral. Las infecciones latentes pueden durar toda la vida del hospedero (c.f. **infección restrictiva**).

infección persistente : infección en la que se lleva a cabo la replicación viral, pero en la que el virus limita su replicación y patogenicidad de forma a no eliminar a su hospedero. En las infecciones persistentes, el virus puede mantenerse y replicarse en su hospedero durante toda la vida de éste.

infección primaria: primera infección por un microorganismo.

infección productiva: infección de células permisivas para la replicación viral, acompañada por la liberación de la progenie viral.

infección restrictiva: infección que se establece en una célula transitoriamente permisiva y genera una cantidad muy limitada de partículas virales. Aunque la replicación se detiene rápidamente, el genoma viral persiste en las células infectadas (EBV, HSV). Este tipo de infecciones puede tener serias consecuencias para el hospedero.

inserción: (1) mutación cromosómica que implica la eliminación de un segmento de cromosoma, su rotación a 180 grados y su re inserción en el mismo lugar (2) mutación (generalmente acompañada por una delección) en la que uno o más nucleótidos son insertados en una secuencia de ADN.

intrón: segmento de ADN de función desconocida que, dentro de un gen, interrumpe las secuencias codificantes (**exones**) del gen. Los ARN mensajeros maduros no contienen intrones ya que éstos son eliminados del transcrito primario por medio de un mecanismo de corte y empalme.

isómeros (genéticos): genomas formados de secuencias únicas y repetidas-invertidas cuya recombinación genera varias estructuras que difieren únicamente en la orientación relativa de las secuencias únicas.

kinasa: enzima que transfiere un fosfato de un ATP a otra molécula.

liberación (viral): etapa de la replicación viral en que las partículas virales salen de las células infectadas.

límite de cuantificación: cantidad más pequeña de un analito que puede ser detectada y cuantificada en una muestra con una **precisión** y una **certeza** aceptables.

límite de detección: cantidad mínima de analito que puede ser detectada en una muestra por una técnica analítica particular.

linaje: descendientes de un ancestro común considerado como el fundador del linaje.

línea celular: población celular genéticamente homogénea derivada de un cultivo primario por medio de una subcultura. Las líneas celulares pueden ser finitas o continuas.

linealidad: capacidad de un método analítico para generar, dentro de un rango establecido, medidas o resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito presente en la muestra.

maduración: etapa de la replicación viral en la que una partícula viral se vuelve infecciosa.

marco de lectura : serie ordenada de tripletes o codones contiguos y no solapados en el ADN o el ARN. Dado que el código genético se compone de tripletes no solapados, existen en principio tres formas posibles de traducir una secuencia de nucleótidos en proteína, según cual sea el nucleótido de partida. Cada una constituye un marco de lectura.

marco abierto de lectura (ORF): marco de lectura compuesto únicamente de tripletes no solapados y que codifica un polipéptido. Incluye un codón de iniciación de la traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'.

metilación : adición de grupos metil a una **base** (C o A). El ADN de eucariotas contiene casi exclusivamente 5-metil citosinas (mC) mientras que el ADN de procariontes contiene también 6-metil adenosinas (mA). Como la transcripción no puede llevarse a cabo cuando el ADN está metilado y doblado en los nucleosomas, la metilación reprime la expresión de ciertas regiones del genoma. Sin embargo, la metilación puede tener otras funciones. Los patrones específicos de mC y mA de la mayoría de los ADNs bacterianos les permite a estos microorganismos reconocer su propio ADN. La metilación actúa como parte de un mecanismo de defensa ya que las bacterias lo emplean para reconocer y destruir de manera específica el ADN de los bacteriófagos.

mutación: (1) proceso que genera un gen o un cromosoma que difiere del tipo silvestre (2) gen o cromosoma que resulta de un proceso de este tipo.

núcleo: organelo limitado por una membrana que contiene a los cromosomas en las células eucariotas.

nucleocápside: complejo proteína-ácido nucleico que constituye la forma empacada del genoma de una partícula viral.

nucleótido: unidad monomérica que constituye el **ADN** o el **ARN**, formada por un grupo fosfato, un pentosa y una **base** nitrogenada (A, T/U, C, G). En el ADN, los nucleótidos son el adenilato, el guanilato, el citidilato y el timidilato. En el ARN son el timidilato está reemplazado por el uridilato.

número de triangulación: un icosaedro consiste de 20 facetas triangulares equilaterales es decir 20T unidades estructurales donde T es el número de triangulación definido por la fórmula: $T=P^2$ donde P puede ser cualquier número de la serie: 1,3,7,13,19,21,31... ($P=h^2 + hK + K^2$, en donde h y K son números enteros sin factor común) y f es cualquier número entero.

precisión intermedia: variaciones intralaboratorios del desempeño de una técnica analítica (por ejemplo, ensayos efectuados por diversos analistas, en diferentes días o con equipos diferentes).

par de bases (pb): (1) nucleótido de una hebra de un ácido nucleico que se liga por medio de un enlace hidrógeno con un nucleótido de la otra hebra siguiendo las reglas de apareamiento entre purinas (A o G) y pirimidinas (C o T) (2) unidad de medida del ADN de doble cadena.

patogenicidad: carácter genético de un patógeno que le permite infectar a un hospedero. Tiene dos componentes: virulencia y agresividad. El crecimiento de un microorganismo en condiciones inhabituales (medios de cultivo, líneas celulares heterólogas) puede alterar su patogenicidad hacia determinado hospedero. En el sentido epidemiológico, la patogenicidad es la proporción de infecciones que causan síntomas de enfermedad. Esta varía de un virus a otro y puede ser afectada por factores inherentes al hospedero.

PCR: ver **reacción en cadena de la polimerasa**

penetración: etapa del ciclo viral en que el genoma del virus entra dentro de la célula hospedera.

plásmido: ADN circular extracromosómico autónomo y auto-replicativo.

plasticidad (fenotípica): capacidad que tiene un genotipo para producir diferentes fenotipos cuando está expuesto a ambientes diferentes. La plasticidad puede ser morfológica y/o, anatómica y/o, fisiológica y/o bioquímica.

polimerasa (ADN- o ARN-): enzima que cataliza la síntesis de ácidos nucleicos a partir de templados de ácidos nucleicos preexistentes, formando ARN a partir de ribonucleótidos o ADN a partir de desoxiribonucleótidos.

precisión: concordancia de una serie de medidas obtenidas, bajo condiciones idénticas, a partir de múltiples alícuotas de una misma muestra homogénea. La precisión debe ser considerada a tres niveles: **repetibilidad**, **precisión intermedia** y **reproductibilidad**. La precisión de un método analítico está generalmente representada por la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de medidas.

prevalencia: cantidad total de casos de una enfermedad en una población durante un periodo específico.

primer: oligonucleótido sintetizado al cual la ADN polimerasa puede adicionar nuevos desoxiribonucleótidos.

primitivo: carácter que está presente en el ancestro común de un clado. Se dice que un carácter es primitivo cuando se intuye que se trata de la condición original del carácter considerado.

proteína de fusión: proteína(s) de la superficie de la partícula viral responsable(s) de la fusión de la envoltura del virus con la membranas celular.

proteína de matriz: proteína estructural de una partícula viral que liga a la envoltura con la core.

proteína recombinante: proteína producida como resultado de la expresión de un gen contenido en una molécula de ADN recombinante (vector+gen). Los vectores de expresión contienen secuencias indispensables para la regulación de la transcripción y la optimización de la traducción, un origen de replicación y genes marcadores que permiten identificar las clonas en donde los genes de interés se están expresando.

proteínas virales de adhesión: proteínas de la superficie de la partícula viral responsable de su adhesión a los receptores de la célula hospedera (llamadas también anti-receptores).

provirus: genoma viral integrado al genoma de la célula hospedera.

rama: representación gráfica de una relación evolucionaria en un árbol filogenético.

rango: intervalo entre las concentraciones (cantidades) más alta y baja de analito para las que ha sido demostrado que el método analítico tiene un nivel aceptable de **precisión, certeza y linealidad**.

rango de hospedero: el rango de hospedero de un virus define a la vez el tipo de células o tejidos y la(s) especie(s) que éste puede infectar y en los que pueden multiplicarse. La amplitud del rango de hospedero es muy variable : ciertos virus tienen un rango sumamente amplio mientras que otros están limitados a una sola especie o tipo celular.

reacción en cadena de la polimerasa (PCR): procedimiento *in vitro* que genera millones de copias de un fragmento de ADN específico por medio de la repetición de una reacción que involucra a la ADN polimerasa.

reactivación: reanudación de la replicación viral tras un periodo de latencia o dormancia. La reactivación puede ser espontánea o provocada por una variedad de estímulos.

reactividad cruzada: (1) capacidad de un anticuerpo específico de un antígeno para reaccionar con otro antígeno (2) medida de la relación de dos sustancias antigénicas diferentes.

receptor (viral): molécula específica de la superficie celular a la que se adhiere el virus por medio de un anti-receptor .

recombinación: (1) organización de los alelos en la progenie diferente del arreglo parental y que puede resultar tanto de una re-distribución independiente o de un crossing-over (2) cualquier proceso de una célula diploide o parcialmente diploide que engendra nuevas combinaciones de genes o cromosomas que no se encuentran en la célula o en los progenitores (3) durante la meiosis, proceso que genera un producto haploide cuyo genotipo difiere de ambos genotipos haploides que conformaban el diploide meiótico original.

recurrencia: reaparición de los signos clínicos de una enfermedad viral, que corresponde a una **reactivación** del virus ya presente en el organismo en estado latente.

regiones repetidas invertidas (IR): dos copias de la misma secuencia de ADN repetidas en sentido opuesto en una misma molécula. Dos secuencias repetidas invertidas adyacentes constituyen un palíndromo.

repetibilidad: precisión de un método analítico aplicado varias veces bajo las mismas condiciones en un lapso corto de tiempo.

replicación: síntesis de nuevas hebras de ADN complementario a partir de templado existentes.

replicación del genoma viral: etapa de la replicación viral en la que el genoma viral es copiado.

reproductibilidad: precisión interlaboratorios de un método analítico.

ribosoma: partícula intracelular compuesta de ARNr y de proteínas que constituye el sitio de iniciación de la traducción de los ARN mensajeros.

robustez: medida de la capacidad de un método analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de diversos parámetros y proporcionar datos confiables cuando es utilizado normalmente.

RT-PCR (transcripción reversa-PCR): método de amplificación de un ARN específico por medio de una transcripción reversa que genera ADNc específicamente amplificado por PCR.

secuencia consenso: secuencia idealizada en la que cada base representa la base más comúnmente encontrada en esa posición cuando se comparan secuencias reales.

secuenciación: determinación del orden de nucleótidos (bases) en una molécula de ADN o de ARN o del orden de aminoácidos en una proteína .

serogrupo: los serogrupos virales están definidos por la reactividad de los virus con antisueros estándar que reaccionan de manera específica con proteínas conservadas. Miembros de dos serogrupos diferentes no deberían tener reactividad cruzada. Las ambigüedades pueden ser resueltas por medio de pruebas con anticuerpos monoclonales específicos de un serogrupo. Los métodos comúnmente empleados para identificar a los virus a nivel de serogrupo son la inmunofluorescencia, el ELISA con captura de antígeno, el inmunospot y la identificación indirecta por medio del complejo peroxidasa/antiperoxidasa.

serotipo : población de microorganismos infecciosos (usualmente de virus) que poseen antígenos idénticos identificados por anticuerpos específicos. Por lo tanto, las poblaciones de un mismo virus con antígenos diferentes constituyen serotipos diferentes. Un virus capaz de expresar múltiples serotipos constituye un blanco difícil para el desarrollo de una vacuna. La determinación de los serotipos se lleva generalmente a cabo por medio de pruebas de neutralización (como la reducción o inhibición de placas o la inhibición de fluorescencia).

shedding: liberación de microorganismos a partir de un organismo infectado.

silvestre : organismo que escapa a la domesticación para volver a un estado salvaje pero que es distinto de las especies salvajes. Los peces que se escapan regularmente de las plantas de cultivo pueden interferir con las especies salvajes, infectándolas con microorganismos patógenos, cruzándose con ellas o dominando los ecosistemas previamente ocupados por ellas.

similitud : medida cuantitativa que resulta de la comparación de la estructura primaria de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Por ejemplo, dos secuencias con un 85% de similitud son secuencias en las que las posiciones de 85 de cada 100 nucleótidos o aminoácidos son idénticas. Por sí sola, la similitud entre secuencias no indica la existencia de ninguna relación biológica o evolucionaria ya que puede tener por origen cambios aleatorios acumulados a través del tiempo (c.f. **homología**).

sincitio: tejido en el que las paredes y los cuerpos celulares fusionan de tal forma que el tejido consiste en una masa continua de protoplasma en la que se distribuyen los núcleos (como en el músculo estriado). La replicación viral puede provocar la formación de sincitios en células susceptibles (c.f. **efectos citopáticos**).

sistemática: campo de la biología que se refiere a la diversidad de la vida. La sistemática está generalmente dividida en dos áreas: filogenie y taxonomía.

sonda: ADN o ARN de cadena sencilla con una secuencia específica, marcado por métodos radiactivos o inmunológicos, usado para detectar la secuencia complementaria por hibridación.

splicing: ver **Corte y empalme**.

sustitución de nucleótidos: mutación en la que un nucleótido es sustituido por otro. En evolución, sustitución de un nucleótido por otro que se fija en la población.

susceptibilidad: capacidad de una célula o de un organismo a ser infectado. La susceptibilidad no debe ser confundida con la permisividad. Las células de pollo, por ejemplo, no son susceptibles al poliovirus ya que carecen de receptores específicos para su adhesión. Sin embargo, son permisivas ya que la introducción de moléculas intactas de ARN extraídas de poliovirus resulta en la producción de partículas virales.

taxón: cualquier grupo de organismos, no necesariamente un clado.

taxonomía (clasificación): principios y procedimientos según los cuales las especies son designadas y asignadas a grupos taxonómicos.

taxonomía viral: en el esquema universal desarrollado por el ICTV, las características del virión sirven para establecer divisiones a nivel de familia, eventualmente subfamilia, y género (solo un orden, el orden de los Mononegavirales, ha sido aprobado). El concepto de especie viral fue definido en los años 90. Las familias y los géneros son definidos de forma monotética (i.e. en base a una carácter único o un número reducido de estos) en tanto que la definición de las especies es más bien política (Van Regenmortel, 1990). El Séptimo Reporte del ICTV presenta un esquema universal que consiste en un orden, 71 familias, 9 subfamilias y 164 géneros, incluyendo 24 géneros "flotantes" y más de 3600 especies virales. Cientos de virus aún no han sido asignados a ningún taxón, básicamente por falta de información.

tegumento: estructura particular de los virus herpes ubicada entre la cápside y la envoltura que contiene proteínas que el virus requiere para iniciar su ciclo de vida en la célula infectada.

tipo: término que se ha vuelto sinónimo de **serotipo**.

traducción: síntesis de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido a partir de la secuencia de una molécula de ARNm por medio de intermediarios de ARNt. La traducción se lleva a cabo en los ribosomas.

transcripción inversa : síntesis de una molécula de ADN catalizada por una transcriptasa inversa a partir de una hebra de ARN. Reacción llamada también retrotranscripción o transcripción inversa.

transcriptasa reversa: ADN polimerasa dirigida por ARN i.e. ADN polimerasa que utiliza ARN como templado.

transmisibilidad: la facilidad con la que una infección se transmite de un hospedero a otro depende de la cantidad de microorganismos liberados a partir del individuo infectado, de la estabilidad de éstos fuera del organismo y de la facilidad (y velocidad) con la que la infección se establece en nuevos hospederos.

transmisión horizontal: transmisión de una infección de un individuo a otro dentro de una población (diferente de la **transmisión vertical**).

transmisión vertical: transmisión de una infección directamente de un reproductor a su descendencia. Puede llevarse a cabo *in utero* por medio de los ovocitos, el esperma o la placenta o de modo postnatal por medio de la leche materna, la sangre, etc.

tropismo: capacidad de un virus para infectar un tipo de células o de tejido en particular.

uncoating: etapa de la replicación viral en que las proteínas estructurales son eliminadas y el genoma viral se halla expuesto a la maquinaria de replicación celular.

validación: el objetivo de la validación de un método analítico es demostrar que éste es adecuado para cumplir con su propósito. Las características típicamente consideradas en los procesos de validación son la **exactitud**, la **precisión**, la **repetibilidad**, la **precisión intermedia**, la **especificidad**, el **límite de detección**, la **cuantificación**, la **linealidad**, el **rango** y la **robustez**. Un proceso de revalidación puede ser necesario en ciertos casos (cambios en el proceso de síntesis de alguna sustancia activa, en la composición de algún reactivo o en el método analítico).

variante: por lo general, virus que es fenotípicamente diferente del tipo salvaje aunque se desconozcan las bases genéticas de su variación.

vector: (1) agente, usualmente un insecto u otro animal, responsable de la transmisión de un patógeno de un hospedero a otro (2) elemento genético capaz de incorporar un fragmento de ADN y provocar su replicación en otra célula.

virión: partícula viral extracelular, estructuralmente madura.

virulencia: capacidad que tiene un patógeno para provocar una enfermedad severa. La virulencia depende de múltiples factores como la adherencia, la actividad antifagocítica y/o la producción de toxinas, es decir que está frecuentemente relacionado con más de un gen.

virus: parásito intracelular obligado que consiste en un ácido nucleico (**ARN** o **ADN** de cadena sencilla o doble) rodeado por una capa proteica. Un virus depende de la célula hospedera para la **replicación** de su material genético y la síntesis de su proteínas.