



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO SOBRE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL
HERPESVIRUS DE LOS OSTREIDOS-1
(*Malacoherpesviridae*)

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

ACUACULTURA

P r e s e n t a

Ayin Quetzalcoatl Alvarado Arellano

La Paz, Baja California Sur, Octubre de 2013

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 04 del Mes de Octubre del 2013, 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:

"Estudio sobre la diversidad genética del Herpesvirus de los Ostreidos-1 (*Malacoherpesviridae*)"

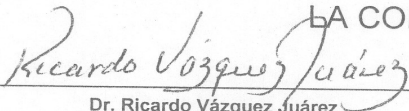
Presentada por el alumno:

Ayin Quetzalcoatl Alvarado Arellano

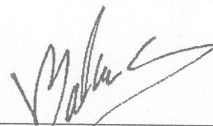
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ACUACULTURA

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.

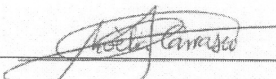
LA COMISION REVISORA



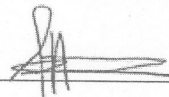
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Valérie Barbosa Solomieu
CO-TUTOR



Dra. Noélia Carrasco Q.
CO-TUTOR



Dr. Alfonso Maeda Martínez
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Ricardo Vázquez Juárez (CIBNOR-La Paz, México)

Dra. Valérie Barbosa Solomieu (Ifremer La Tremblade, Francia)

Dra. Noélia Carrasco Querol (IRTA Saint Carles La Rapita, España)

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez (UNCIBNOR Nayarit, México)

COMITÉ REVISOR

Dr. Ricardo Vázquez Juárez (CIBNOR-La Paz, México)

Dra. Valérie Barbosa Solomieu (Ifremer La Tremblade, Francia)

Dra. Noélia Carrasco Querol (IRTA Saint Carles La Rapita, España)

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez (UNCIBNOR Nayarit, México)

JURADO

Dr. Ricardo Vázquez Juárez (CIBNOR-La Paz, México)

Dr. Alfonso N. Maeda Martínez (UNCIBNOR Nayarit, México)

Dr. Pedro Cruz Hernández (CIBNOR-La Paz, México)

SUPLENTE

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas (CIBNOR-La Paz, México)

Resumen

El objetivo de este trabajo fue contribuir al estudio sobre la diversidad genética del Herpesvirus de los Osteidos (OsHV-1), basado en la secuenciación parcial y comparación de tres regiones dentro de su genoma con alto grado de polimorfismo, identificadas en muestras de diferentes especies como la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y ostión japonés (*Crassostrea gigas*) ambas cultivadas en Baja California Sur (BCS), México. Paralelamente, se analizaron muestras de *C. gigas*, especies marinas alternativas (crustáceos y mejillones), así como muestras de sedimento y agua de mar, provenientes de cultivos intensivos localizados en Francia, las que se recolectaron antes, durante y después de episodios de mortalidad en 2011 y 2012. La detección del virus se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR con los primers DPF/DPR, para cuantificar la carga viral presente en las muestras. Aquellas que presentaron suficiente carga viral, fueron seleccionadas para realizar rondas independientes de PCR convencional, para amplificar tres regiones con diferentes pares de primers, C2/C6 (ORF4), Del 35,-36 (ORF 35,-36) e IA2/IA1 (ORF42-43). De estas regiones el ORF4 fue el que presentó un mayor nivel de polimorfismo, ya que en las muestras de BCS, México, solo se logró amplificar en una muestra de *N. subnodosus* y en cuatro muestras de *C. gigas*. Las secuencias obtenidas presentaron 97% y 100% de similitud con respecto a OsHV-1 La Cruz, Sonora (JF894308), respectivamente. Por otra parte, las muestras de *C. gigas* colectadas en Francia, en cuatro de 2011 y dos de 2012 no se logró obtener la amplificación esperada con los primers C2/C6, el resto de las muestras de estos grupos presentaron 100% de similitud con OsHV-1 μ Var (HQ842610). En los ORFs 35,-36,-37,-38 y ORF 42,-43, las muestras de BCS, México presentaron 99% de similitud con OsHV-1 μ Var (HQ842610) y 100% de similitud con OsHV-1 REF (AY509253); mientras que en las muestras de Francia, estas dos regiones exhibieron 100% de identidad para OsHV-1 μ Var (HQ842610). Este trabajo describe por primera ocasión la detección de OsHV-1 en *N. subnodosus*, mediante histología, hibridación *in situ*, Microscopía Electrónica de Transmisión y qPCR, también se confirmó la presencia de DNA viral de OsHV-1 en especies marinas como *Mytilus galloprovincialis*, *Sphaeroma* sp y *Balanus* sp así como muestras de agua de mar.

Palabras clave: OsHV-1, moluscos bivalvos, variación genética

Vo. Bo. Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Director de Tesis

Abstract

The aim of this work was to contribute to the study of the genetic diversity of the Ostreid Herpesvirus -1 (OsHV-1) based on the partial sequencing of three polymorphic areas of its genome. Samples of Lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and the Pacific cupped oyster (*Crassostrea gigas*) specimens cultivated in Baja California Sur (BCS) Mexico were analyzed and compared. Similarly *C. gigas* samples were collected in intensive farming areas located in France from 2011 to 2012. Before, during, and after the onset of mortality outbreaks alternative species such as *Mytilus galloprovincialis*, including *C. gigas* and environmental samples (seawater and sediment) were screened. The initial analysis was performed by qPCR with the primers DPF/DPR to quantify the amount of viral DNA in each sample. Samples with sufficient viral loads were selected for independent rounds of conventional PCR amplification of three target areas with primer sets C2/C6 (ORF 4), Del 35,-36 (ORF 35,-36), and IA2/IA1 (ORF 42,-43). ORF4 was the genome area with the highest level of polymorphism. In the samples from BCS Mexico, only one sample of *N. subnodosus* and four samples of *C. gigas* could be amplified by regular PCR. The sequence of these products displayed 97% and 100% of similitude with the OsHV-1 strain La Cruz, Sonora (JF894308), respectively. Among the *C. gigas* samples collected in France, only 4 samples from 2011 and 2 samples from 2012 did not yield any amplification product with C2/C6. All the other samples in this group displayed 100% similitude with OsHV-1 μ Var (HQ842610). As for ORFs 35,-36,-37,-38, and the ORF 42,-43 the samples from BCS, Mexico they displayed 99 % identity with OsHV-1 μ Var (HQ842610) and 100% similitude to OsHV-1 REF (AY509253) whereas samples from France showed 100% similitude with OsHV-1 μ Var (HQ842610). This work constitutes the first report of OsHV-1 detection in *N. subnodosus* using a combination of histology, Transmission Electron Microscopy, in situ hybridization, and qPCR techniques. It also confirms the presence of DNA from OsHV-1 in alternative marine species such as *Mytilus galloprovincialis*, *Sphaeroma* sp, and *Balanus* sp., as well as in sea water samples.

Key words: OsHV-1, OsHV-1, bivalve mollusk, genetic variation, genetic variation

Dedicatoria

A mi esposa Mariana, por ser parte de esta aventura desconocida, llena de imprevistos, altibajos, risas, lágrimas, pero sobre todo llena de mucho amor y sueños por cumplir.

A mi familia por dejarme volar tras mis sueños y correr para alcanzar mis metas.

A la familia Pérez Rivera por su gran apoyo y afecto.

Agradecimientos

Al CIBNOR y a todo el personal de la Dirección de Estudios de Posgrado, dirigidos por la Dra. Elisa Serviere Zaragoza, así como a la Licenciada Osvelia Ibarra Morales, gracias por su apoyo.

A CONACyT por la beca otorgada número 386855 durante mi posgrado

Al IFREMER de La Tremblade, Francia por las facilidades prestadas durante mi estancia de investigación.

Al Dr Ricardo Vázquez Juárez, por su confianza, enseñanzas y apoyo incondicional para lograr culminar este trabajo.

A la Dra. Valérie por compartir sus conocimientos, por hacer que mi estancia en Francia fuera de lo mejor y sobre todo por su gran disposición para resolver mis dudas.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Genética y Patología de moluscos del IFREMER conformado por el Dr Trsitán Renault, Isabelle Arzul y Nicole Faury.
Merci pour votre accueil

A los M. C. Neftalí Gutiérrez Rivera y Griselda Gallegos Simental del laboratorio de Biología Molecular del CIBNOR por las facilidades y asesorías durante la detección del virus en el análisis retrospectivo.

A la M. C. Carmen Rodríguez Jaramillo y la Técnico Eulalia Meza Chávez del laboratorio de Histología del CIBNOR por el procesamiento y facilidad de muestras para su análisis histopatológico.

A los Doctores Gracia Gómez Anduro, Carlos Angulo Valadez y al M. C. Julio Hernández del laboratorio de Biología Molecular de plantas del CIBNOR por la facilidad de espacio, equipo y materiales necesarios para llevar a cabo la clonación de las muestras de OsHV-1.

Al Biól. Mar. Hever Latisnere Barragán del laboratorio de Biología de Organismos Marinos del CIBNOR por las facilidades y atenciones prestadas en el laboratorio.

A Horacio Gómez Sandoval por su ayuda y soporte técnico para poder realizar las videoconferencias durante mis evaluaciones.

A la maestra Diana Leticia Dorantes Salas, por su apoyo en la revisión y edición del resumen en inglés presentado en esta tesis y reportes generados durante mi maestría.

Al Sr Philippe Danigo por sus facilidades para poder realizar el monitoreo en su granja ostrícola.

A la Dra. Noelia por sus comentarios y observaciones, que ayudaron a enriquecer mi trabajo.

Al Dr Maeda por haber formado parte de mi comité revisor

A Cristina por su inmenso e incondicional apoyo, por ser muy buena amiga y por compartir tan buenos ratos.

Índice de contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
Los virus en el mundo acuático.....	4
Los virus en la evolución de la vida.....	4
Los virus en la actualidad.....	6
Herpesvirus.....	7
Taxonomía de los Herpesvirus.....	9
Herpesvirus de moluscos bivalvos (OsHV-1).....	11
Morfología de OsHV-1.....	13
Organización genómica de OsHV-1.....	15
Otros genotipos de OsHV-1.....	17
Mecanismo de transmisión.....	23
Ciclo viral de OsHV-1.....	24
Métodos de control.....	26
Métodos de diagnóstico.....	26
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. HIPÓTESIS.....	37
V. OBJETIVO GENERAL.....	38
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
VII. METODOLOGÍA.....	39
Detección de OsHV-1.....	39
Identificación de OsHV-1 en muestras colectados en BCS, México.....	39
Análisis retrospectivo.....	39
Monitoreo de granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos.....	39
Identificación de OsHV-1 en diferentes episodios de mortalidad (Francia)....	41
Muestras de agua de mar, sedimento y otras especies marinas.....	41
Muestras de <i>Crassostrea gigas</i>	42
Análisis de la variación genética de OsHV-1.....	43
Amplificación de regiones variables (ORF 4, ORF 35-38 y ORF 42-43).....	43
Purificación de productos de PCR.....	44
Clonación de productos.....	46
Secuenciación parcial de regiones variables.....	46
Análisis de secuencias y alineamientos.....	47
Análisis de la diversidad genética.....	47
Entre las diferentes especies de moluscos bivalvos.....	47
Durante los episodios de mortalidad (Solo muestras de Francia).....	47
Análisis filogenético entre las diferentes muestras positivas a OsHV-1.....	48
VIII. RESULTADOS.....	49
Detección de OsHV-1.....	49

Identificación de OsHV-1 en muestras colectadas en BCS, México.....	49
Análisis retrospectivo.....	49
Monitoreo de granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos.....	52
Identificación de OsHV-1 en diferentes episodios de mortalidad (Francia) .	53
Muestras de <i>C. gigas</i>	53
Muestras de agua de mar, sedimento y otras especies marinas.....	54
Análisis de la variación genética de OsHV-1	56
Amplificación de regiones variables de OsHV-1.....	56
Muestras de BCS México.....	56
Muestras colectadas durante de episodios de mortalidad (Francia).....	58
Secuenciación parcial de regiones variables	61
Muestras de BCS, México	
ORF4.....	61
ORF 42-43.....	65
ORF 35,-36,-37,-38	66
Muestras de Francia	
ORF4.....	67
ORF 42-43.....	67
ORF 35,-36,-37,-38	67
Análisis de la diversidad genética.....	68
Entre las diferentes especies de moluscos bivalvos.....	68
Durante los episodios de mortalidad antes (Solo muestras de Francia) .	69
Análisis filogenético entre las diferentes muestras positivas de OsHV-1.....	70
IX. DISCUSIÓN.....	73
X. SÍNTESIS Y CONCLUSIONES.....	83
XI CONCLUSIÓN GENREAL	85
XII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	86
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	87
XI. ANEXOS	100
1. Protocolos de extracción de ADN para muestras del proyecto BIVALIFE....	100
A. Protocolo para la extracción de ADN en mejillones	100
B. Protocolo para la extracción de ADN con el protocolo Kit Qiamp DNA	101
C. Protocolo para la extracción de ADN de sedimento de agua.....	102
2. Secuencias de OsHV-1.....	103
A. Secuencia ORF4 <i>C. gigas</i> y <i>N. subnodosus</i> BCS, México.....	103
B. Alineamientos ORF 41-43 <i>N. subnodosus</i> y <i>C. gigas</i> BCS, México.....	104
C. Alineamientos ORF 35,36,37,38 <i>N. subnodosus</i> y <i>C. gigas</i> BCS, Méx	108
D. ORF4 <i>C. gigas</i> Francia 2011.....	110
E. ORF4 <i>C. gigas</i> Francia 2012.....	113

Listado de figuras

Figura 1. La influencia de los virus en la divergencia de los dominio de la vida.....	6
Figura 2. Orden Herpesvirales.....	9
Figura 3. Presencia oficial de OsHV-1 en México.....	13
Figura 4. Morfología de los Herpesvirus.....	13
Figura 5. MET partículas OsHV-1.....	14
Figura 6. MET OsHV-1.....	15
Figura 7. Organización genómica de OsHV-1.....	16
Figura 8. Alineamiento ORF 4 (C2/C6) OsHV-1 y AVNV.....	18
Figura 9 Alineamiento ORF 4 (C2/C6) OsHV-1 y OsHV-1 μ Var.....	20
Figura 10 Esquema ORF 35,36,37,38 OsHV-1.....	20
Figura 11. Representación hipotética sobre el ciclo viral de OsHV-1	25
Figura 12. Ubicación de los primers dentro del genoma de OsHV-1.....	33
Figura 13. Histología branquias <i>N. subnodosus</i>	50
Figura 14. Hibridación in situ OsHV-1 branquias <i>N. subnodosus</i>	50
Figura 15. MET Branquias <i>N. subnodosus</i> y <i>C. gigas</i>	51
Figura 16. Alineamiento ORF4 (C2/C6) OsHV-1 <i>N. subnodosus</i> y <i>C. gigas</i>	61
Figura 17. Árbol filogenético OsHV-1 análisis verosimilitud muestras <i>C. gigas</i>	70
Figura 18. Árbol filogenético OsHV-1 análisis vecinos cercanos muestras de <i>C. gigas</i>	71
Figura 19. Árbol filogenético OsHV-1 máxima parsimonia muestras <i>C. gigas</i>	71
Figura 20 Árbol filogenético OsHV-1 muestras de <i>C. gigas</i> y <i>N. subnodosus</i>	72

Listado de tablas

Tabla I Clasificación taxonómica de los Herpesvirus	10
Tabla II. Especies de moluscos bivalvos reportadas con virus tipo herpes.....	11
Tabla III. Países donde se han reportado virus tipo herpes.....	12
Tabla IV. Métodos para la vigilancia y diagnóstico de OsHV-1 (OIE).....	27
Tabla V. Métodos de extracción de ADN para la detección de OsHV-1 por PCR...30	
Tabla VI. Primers utilizados para el diagnóstico de OsHV-1.....	32
Tabla VII. Primers utilizados para el diagnóstico de OsHV-1 por qPCR.....	35
Tabla VIII. Fechas y tipos de muestras recolectadas en Bahía D'agnas.....	41
Tabla IX. Fechas y tipos de muestras recolectadas en Bahía de Thau.....	41
Tabla X. Primers utilizados para regiones variables de OsHV-1.....	45
Tabla XI. Análisis retrospectivo de OsHV-1 en muestras de BCS, México.....	49
Tabla XII. Resumen monitoreo en granjas y puntos de extracción de bivalvos.....	52
Tabla XIII. Total de muestras positivas a OsHV-1 colectadas en BCS, México.....	52
Tabla XIV. Muestras <i>C. gigas</i> de 2011 positivas por qPCR.....	53
Tabla XV. Muestras <i>C. gigas</i> de 2012 positivas por qPCR.....	53
Tabla XVI Muestras alternativas positivas a OsHV-1. Bahía D'agnas.....	54
Tabla XVII Muestras alternativas positivas a OsHV-1. Bahía Thau	55
Tabla XVIII. Regiones variables de OsHV-1 muestras de BCS, México.....	57
Tabla XIX. Regiones variables de OsHV-1 muestras de <i>C. gigas</i> (Francia 2011)..	59
Tabla XX. Regiones variables de OsHV-1 muestras de <i>C. gigas</i> (Francia 2012)..	60
Tabla XXI. Porcentajes de similitud muestras de BCS, México.....	66
Tabla XXII. Porcentajes de similitud muestras de Francia	67

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura en los países de América Latina se ha extendido continuamente desde hace años, se encuentra principalmente relacionada con la producción de camarones, peces y los moluscos bivalvos, son considerados como el tercer grupo más importante, en términos de producción acuícola, tan solo en 2005 se registró una producción de 130, 000 toneladas en América Latina (FAO, 2007). A nivel nacional la producción de moluscos bivalvos es aproximadamente de 79,000 toneladas, constituida principalmente por la producción ostión y de almeja. Por otra parte, la producción acuícola en Baja California Sur, se encuentra encabezada por la sardina (69,062 ton), calamar (38,877 ton) y almeja (20,268 ton) (CONAPESCA, 2010); dentro de las principales especies explotadas, primordialmente por captura, de moluscos bivalvos sobresalen la almeja catarina (*Argopecten ventricosus*), la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*), almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) y la almeja pata de mula (*Andara tuberculosa*).

Una de las principales amenazas para la producción de moluscos bivalvos es la presencia de agentes infecciosos, donde la manifestación e intensificación de estos son el resultado de las alteraciones del cambio climático (Marcogliese, 2008), contaminación y sobre-explotación. Hechos asociados a la constante expansión del ser humano en el mundo (Vitousek, 1997), acción que pone en riesgo dichas producciones y de esta manera las pérdidas son significativas, no solo en el aspecto económico sino también en el ámbito ecológico. Existen diversas enfermedades de importancia mundial que atañen la producción de moluscos bivalvos, hasta del 2013 la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE), reportó 7 enfermedades de declaración obligatoria, que por su impacto tienen severas consecuencias ecológicas, económicas y sociales. Dentro de estas

enfermedades se encuentran las causadas por: *Bonamia exitiosa*, *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni*, *Mikrocytos mackini* y recientemente se agregó al Herpesvirus de los Osteidos u OsHV-1 (por sus siglas en inglés Osterid Herpesvirus-1).

El estudio de las enfermedades en moluscos bivalvos tradicionalmente se ha llevado a cabo con técnicas citológicas, histológicas y ultraestructurales (Figueras y Novoa, 2011). Pero el desarrollo de técnicas basadas en la biología molecular, enfocadas principalmente en el uso y detección de DNA para el diagnóstico, aceleran el proceso de identificación de los patógenos y permiten un control en la introducción y vigilancia de enfermedades exóticas en diferentes áreas geográficas (Berthe *et al.*, 1999). Por tal motivo el diagnóstico de enfermedades no debe ser considerado como una técnica sino más bien un proceso ordenado para así tener una correcta interpretación con un contexto biológico y ambiental (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Los grandes avances en la ciencia y tecnología, han implementado el uso de secuenciación de ADN y el desarrollo de la metagenómica para la detección de enfermedades infecciosas, han ayudado a la caracterización de los microorganismos y virus presentes en la naturaleza. Estas dos herramientas arrojan información importante sobre el potencial funcional de los microorganismos, así como su relación evolutiva con otros, brindan pistas sobre sus adaptaciones al medio donde se desarrollan, y la gran ventaja de estas técnicas es que se pueden realizar sin la necesidad de cultivar o aislar los microorganismos (Relman, 2013).

En el presente trabajo se realizó un estudio sobre la diversidad del Herpesvirus de los Ostreidos (OsHV-1), presente en muestras de almeja mano de león (*N. subnodosus*) y ostión japonés (*C. gigas*) colectados en BCS, México así como, en muestras de otras especies, así como en agua de mar y sedimento provenientes de tres diferentes cultivos intensivos de *C. gigas* localizados en Francia colectadas antes, durante y después de los eventos de mortalidad asociados a la presencia de OsHV-1. Por otra parte, es importante recalcar que este es el primer trabajo que reporta una enfermedad viral en una especie del género *Nodipecten* (Luna-González *et al.*, 2011)

II. ANTECEDENTES

Los virus en el mundo acuático.

Los microorganismos son la principal fuerza para la formación de nutrientes y ciclos de energía en el mundo acuático y constituyen más del 90% de la biomasa presente en el mar. Dentro de este contexto se estima que los virus matan aproximadamente el 20% de esta biomasa por día (Suttle, 2007). Pero a pesar de la extensa información que existe sobre la biología, genética y patología de los virus, hay un conocimiento limitado sobre la diversidad así como de los hospederos de los virus presentes en el medio acuático (Wommack y Colwell, 2000). Las primeras hipótesis sobre la presencia y abundancia de los virus en el mar fue en la década de los 70's (Torrella & Morita, 1979), pero fue casi 10 años después que se estimó cuantitativamente el número de partículas virales presentes por mililitro (Bergh *et al.*, 1989). Actualmente con el desarrollo de nuevas tecnologías, se ha podido obtener el número más probable de la abundancia de virus marinos, la cual está en el rango de $< 10^4$ ml a 10^8 ml; concentración que variará con respecto a la localización geográfica, profundidad, temperatura e inclusive a lo largo de un día o periodo del año. Éstos cambios tan drásticos son producto del control y regulación directo o indirecto que tienen los virus sobre las poblaciones y/o ecosistemas en los que se encuentran (Wommack & Colwell, 2000).

Los virus en la evolución de la vida.

Desde un punto de vista filosófico y existencial *“el hombre siempre ha observado la evolución desde la punta de su vanidad”* (Charles Darwin), pero para que esta maravillosa “coincidencia” pudiera presentarse, existieron una serie de interacciones bastante complejas y que probablemente tomaron miles de años en llevarse a cabo. Quizás uno de los ingredientes imprescindibles para la evolución

celular fueron los virus; los cuales aún no pueden definirse, ya que dadas sus características “biológicas” es difícil limitarlos a un concepto o encasillarlos dentro de un grupo. Se cree que *“los virus fueron el centro del desarrollo celular, y que influyeron directamente en la divergencia de los tres dominios de la vida (bacterias, arqueas y eucariotas)”* (David Prangishvili virólogo de la Universidad de Regensburg, Alemania). La teoría se basa en la persistencia de *“los virus dentro de las células blanco, pero en lugar de matarlas, las células infectadas adquieren un nuevo conjunto de genes, que pueden evolucionar y de esta forma dar nuevas funciones a la célula”* (Luis Villareal virólogo de la Universidad de California). Una de estas evoluciones fue el núcleo, principal lazo de unión entre los seres humanos, animales (vertebrados e invertebrados), plantas y amebas, estructura que es el centro de comando de todos los procesos que ocurren en la célula (Pennisi, 2004) (Figura 1).

Entonces, ¿de dónde se originaron los virus? Existen tres teorías, la primera llamada *“hipótesis de escape o progresiva”* que se fundamenta en la habilidad de los virus para entrar y salir de diferentes células, y el escape de componentes celulares mínimos necesarios para conformar un sistema autosuficiente y capaz de replicarse. La segunda teoría es llamada *“hipótesis de reducción o regresiva”*, donde los virus derivan directamente de organismos celulares, y es mediante la pérdida progresiva de funciones celulares que se originan estos (Claverie, 2006). La tercera hipótesis es *“Los virus fueron primero”*, ya que en las dos anteriores se asume que la célula apareció antes que los virus, pero en esta teoría se propone a los virus como iniciadores de la vida (Wessner, 2012). Hipótesis que se refuerza con la idea de un origen monofilético de los virus, que derivan de un mismo ancestro; donde posteriormente el material genético de estos se sobrepuso al Último Ancestro Universal Común (LUCA, por sus siglas en inglés *Last Universal Common Ancestor*), lo cual formó virus *“gigantes”* (Claverie et al., 2006).

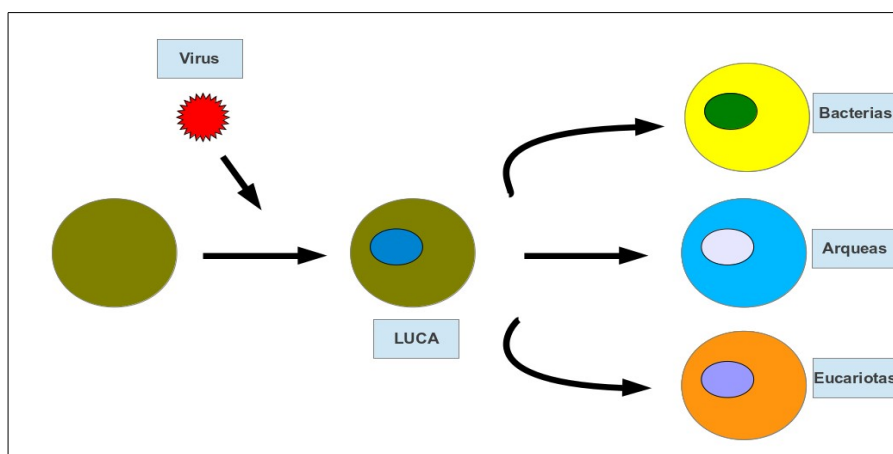


Figura 1. La influencia de los virus en la divergencia de los dominio de la vida. Modificada de Pennisi, 2004

Los virus en la actualidad

Si los virus han estado presentes paralelos a la evolución de la vida e inclusive se les ha considerado como precursores para brindar características genotípicas y fenotípicas esenciales, ¿por qué en la actualidad representan una seria amenaza para el desarrollo y existencia de diferentes especies? Se pueden citar diversos ejemplos de enfermedades virales las cuales tienen un gran impacto no solo en las producciones intensivas de animales domésticos, sino que además causan severos daños a las poblaciones humanas. Por mencionar algunos están: el virus pandémico de la influenza H5N1 (*Orthomyxovirus*), la rabia (*Lissavirus*), el virus del Ébola (*Filovirus*), Distemper o “Moquillo” canino (*Morbilivirus*), el virus del Síndrome Agudo Respiratorio Severo “SARS” (*Coronavirus*) y el virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA) (*retrovirus*). Muchas de estas enfermedades tienen la capacidad de infectar a diversas especies.

Quizás este en uno de los grandes precios que el humano debe pagar por su creciente y constante expansión en la tierra (Daszak & Cunningham, 2000), acción que conlleva a la homogeización biogeográfica global, producida por la introducción de flora y/o fauna a nuevas áreas. Hecho que resulta en una

contaminación biológica, y que ocasionará la pérdida y destrucción de la diversidad y ecosistemas (Vitousek, 1996). El movimiento no controlado de animales domésticos y otras especies lleva inherentemente a la introducción de la carga microbiana propia de estas (Daszak & Cunningham, 2000) y es este movimiento lo que lleve a la aparición de nuevas, letales e incontrolables enfermedades infecciosas, que son epidémicas y ponen en riesgo la existencia de muchas poblaciones susceptibles (Power & Mitchell, 2004).

Probablemente una de las enfermedades más cosmopolitas, importantes y con mayor presencia a nivel mundial, es la causada por los herpesvirus, ya que estos tienen la capacidad de infectar a diversas especies tanto de vertebrados como invertebrados marinos y terrestres, domésticos y silvestres (Davison *et al.*, 2009).

Herpesvirus

La infección por Herpesvirus (HVs) en animales domésticos es considerada como primera importancia, especialmente por que los HVs han desarrollado estrategias complejas de supervivencia (Thiry *et al.*, 1986). Se considera a los HVs como los virus con mayor dispersión en la naturaleza ya que muchas especies son susceptibles a la infección por al menos un tipo de HVs. (Roizman y Baines, 1991) Los HVs conocidos hasta la actualidad presentan cuatro características distintivas de su grupo (Roizman y Sears, 1990)

1. Enzimas específicas en la síntesis de proteínas y metabolismo de ácidos nucleicos.
2. La síntesis del DNA viral y el ensamblaje de la cápside se llevan a cabo en el núcleo de la célula infectada.
3. La producción de las partículas virales o "*progenie del virus*" provocará la destrucción irreversible de las células infectadas.

4. Los Herpesvirus conocidos hasta la fecha, tienen la capacidad de permanecer en un estado de latencia dentro de las células infectadas; y en interior de éstas el genoma viral se encontrará en forma circular y solo expresará un pequeño subconjunto de genes.

La manifestación de la enfermedad provocada por los HVs dependerá principalmente de tres factores (Thiry *et al.*, 1986):

1. Cepas virales infectantes
2. Edad del hospedero
3. Vía de entrada al hospedero.

Por ejemplo, el HV que infecta a los cerdos provoca la Enfermedad de *Aujeszky*, la cual en animales adultos se manifiesta con signología nerviosa, sin embargo en lechones la presentación clínica de la enfermedad son problemas digestivos (McGavin, 2007). Otro ejemplo es la enfermedad de Marek en las aves, la cual tiene diversas manifestaciones clínicas principalmente linfoproliferativa y neurotrópica, pero los tejidos que pueden verse afectados son: nerviosa, cutáneo, ocular y visceral (OIE, 2008). Otra de las características que le ayudan a los HVs a ser tan persistentes en la naturaleza, es su amplio espectro de infección en las especies; ya que un mismo genotipo viral tiene la capacidad de infectar a diferentes especies (Davison *et al.*, 2009)

Taxonomía de los Herpesvirus

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), reclasificó al orden *Herpesvirales* y lo dividió en tres familias. La primera es *Herpesviridae*, subdividida en *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, aquí están clasificados los HVs de mamíferos, aves y reptiles (Davison *et al.*, 2005). La segunda es *Alloherpesviridae*, donde se clasifican los HVs presentes en peces (Davison, 1992) y anfibios (Davison *et al.*, 1999); mientras que en la tercera se encuentran los HVs de los moluscos y es denominada *Malacoherpesviridae*; el cual es uno de los pocos herpesvirus con la capacidad de infectar a varias especies (Davison *et al.*, 2009) (Figura 2).

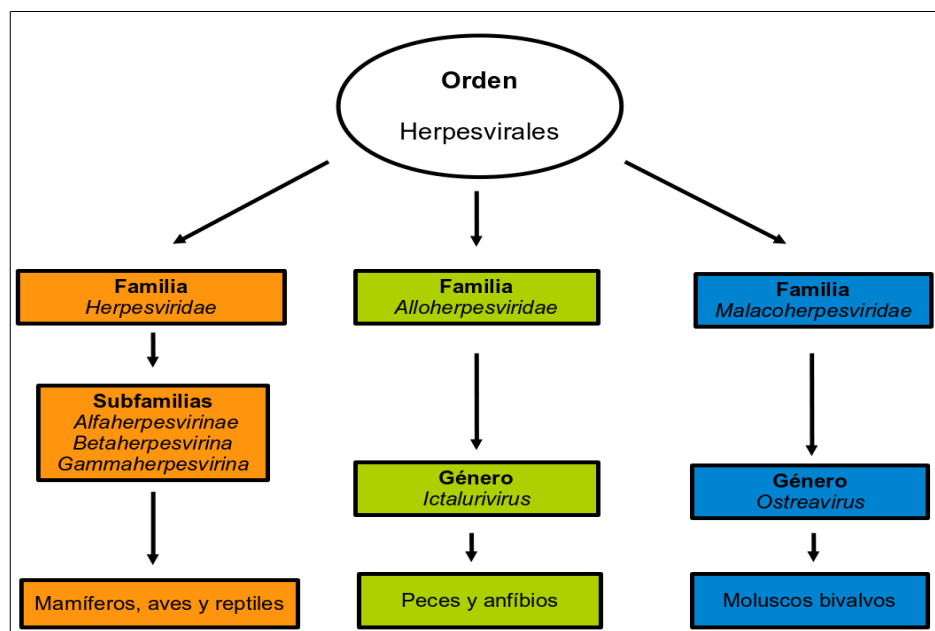


Figura 2. Orden Herpesvirales.

Tabla I. Clasificación taxonómica de los Herpesvirus (Davidson *et al.*, 2009)

Taxón	Nombre	Acrónimo	Nombre común
1. Familia Herpesviridae			
A. Subfamilia Alphaherpesvirinae			
Género	<i>Simplex</i>		
	Herpesvirus humano 1	HHV1	Herpesvirus simple 1
Género	<i>Varicellavirus</i>		
	Herpesvirus humano 3	HHV3	Varicela
	Herpesvirus porcino 1	SuHV 1	Pseudorabia
	Herpesvirus canino 1	CaHV 1	Herpesvirus canino
	Herpesvirus felino 1	FeHV 1	Rinotraqueitis felina 1
Género	<i>Iltovirus</i>		
	Herpesvirus de las gallinas 1	GaHV1	Laringotraqueitis infecciosa
B. Subfamilia Betaherpesvirus			
Género	<i>Cytomegalovirus</i>		
	Herpesvirus humano 5	HHV5	Citomegalovirus humano
	Herpesvirus de macacos 3	McHV3	Citomegalovirus del mono Rhesus
Género	<i>Roseolovirus</i>		
	Herpesvirus humano 6	HHV6	Herpesvirus humano 6
Género	<i>Proboscivirus</i>		
	Herpesvirus de elefantes 1	EIHV1	Herpesvirus endoteleiotrópico de elefantes
B. Subfamilia Gammaherpesvirinae			
Género	<i>Lymphocryptovirus</i>		
	Herpesvirus humano 4		Virus de Epstein-Barr
Género	<i>Rhadinovirus</i>		
	Herpesvirus Humano 8	HHV 8	Sarcoma de Kaposi
Género	<i>Macavirus</i>		
	Herpesvirus alcelaphine	AIHV 1	Fiebre Catarral Maligna
Género	<i>Percavirus</i>		
	Herpesvirus equino 2	EHV 2	Herpesvirus equino 2
2. Familia Alloherpesviridae			
Género	<i>Ictalurivirus</i>		
	Herpesvirus de ictalúridos	IcHV 1	Virus Herpes del Pez gato
	Herpesvirus de ciprínidos	CyHV 3	Virus Herpes de la carpa Koi
3. Familia Malacoherpesviidae			
Género	<i>Ostreavirus</i>		
	Herpesvirus de los ostreidos	OsHV-1	Herpesvirus de los ostiones

Herpesvirus de moluscos bivalvos (OsHV-1)

El primer reporte de un virus tipo herpes presente en cultivos de moluscos bivalvos fue descrito en ostiones americanos adultos de *Crassostrea virginica* (Farley, 1972), posteriormente se reportó en cultivos de *Crassostrea gigas* (Hine *et al.*, 1992) (Renault, 1994). En la actualidad el OsHV-1 se encuentra distribuido en todo el mundo y en diversas especies de moluscos bivalvos, tales como *Ostrea angasi* (Hine *et al.*, 1992), *Ostrea edulis* (Comps, 1993), *Triostrea chilensis* (Hine *et al.*, 1998), *Ruditapes philippinarum* (Renault *et al.*, 2001), *Pecten maximus* (Arzul *et al.*, 2001a) entre otros (Tabla II). La presencia de OsHV-1 o de virus tipo herpes en diversas especies de moluscos bivalvos, donde muchos de éstos representan una importancia económica, es trascendente ya que en la mayoría de los casos su presencia se ha asociado a eventos masivos de mortalidad, principalmente en semillas y juveniles (International OsHV-1, 2011).

Tabla II. Especies de moluscos bivalvos donde se han reportado virus tipo herpes

Especie	Referencia
<i>Crassostrea virginica</i>	(Farley <i>et al.</i> , 1972)
<i>Crassostrea gigas</i>	(Hine <i>et al.</i> , 1992)
<i>Ostrea edulis</i>	(Comps & Cochenec, 1993)
<i>Ostrea angasi</i>	(Hine & Thorne, 1997)
<i>Triostrea chilensis</i>	(Hine <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pinctada margaritifera</i>	(Comps <i>et al.</i> 1999)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	(Renault, 1998)
<i>Ruditapes decussatus</i>	(Renault, <i>et al.</i> , 2001)
<i>Crassostrea angulata</i>	(Arzul <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Pecten maximus</i>	(Arzul <i>et al.</i> , 2001a)
<i>Crassostrea rivularis</i>	(Arzul <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Crassostrea sikamae</i>	
<i>Ostrea lurida</i>	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	(Burge <i>et al.</i> , 2011)
<i>Venerupis philippinarum</i>	

Actualmente el OsHV-1 se puede encontrar prácticamente en los 5 continentes, los reportes de la enfermedad (tabla III) se pueden observar los países, así como el año en que fue reportada la presencia del virus en los mismos.

Tabla III. Países donde se han reportado virus tipo herpes

País	Referencia
EE. UU.	(Farley <i>et al.</i> , 1972)
Norte de Gales	(Alderman, 1980)
Nueva Zelanda	(Hine <i>et al.</i> , 1992)
Francia	(Renault <i>et al.</i> , 1994)
Australia	(Hine & Thorne, 1997)
México	(Vasquez-Yeomans, 2004) (Vazquez-Juarez <i>et al.</i> , 2006)
España	(Elandaloussi <i>et al.</i> , 2009)
Reino Unido	
Holanda	(International OsHV-1, 2011)
Isla de Jersey	
Irlanda	(Peeler <i>et al.</i> , 2012)
Italia	(Dundon <i>et al.</i> , 2011)
Japón	
China	(Renault <i>et al.</i> , 2012)
Brasil	
Túnez	Comunicación personal Renault 2013
Israel	
Corea	(Hwang <i>et al.</i> , 2013)

El primer reporte preliminar de un brote de mortalidad asociado a un virus tipo Herpes en México, ocurrió en cultivos intensivos de *C. gigas*, localizados en Bahía Falsa, Baja California (Vasquez-Yeomans, 2004), pero la confirmación de la presencia del virus en México con técnicas de biología molecular no fue hasta 2005 a partir de muestras recolectadas en Sinaloa (Vazquez-Juarez *et al.*, 2006). Hasta el 2013, oficialmente se ha detectado OsHV-1 solamente los estados del Noroeste de México (Figura 3).



Figura 3. Presencia oficial de OsHV-1 en México

Morfología de OsHV-1

Históricamente, entre 1960 y 1980 se realizó la asignación de los HVs, la cual fue mediante la morfología de los viriones. La morfología de estos virus es típica, ya que tiene una cápside icosaédrica ($T=16$) la cual contiene 162 capsómeros en su superficie con un diámetro entre 115-130 nm. 150 de los capsómeros están conformados principalmente por seis moléculas de una sola proteína (McGeoch *et al.*, 2006), misma que se encuentra delimitada por una envoltura lipídica, rodeada por una matriz proteínica denominada tegumento (Pellet & Roizman, 2006). Un virión clásico de HVs consiste en una cápsula que contiene una cadena lineal doble de DNA (dsDNA, double stranded), una cápside, tegumento y una envoltura (Roizman & Baines, 1991) (Figura 4).

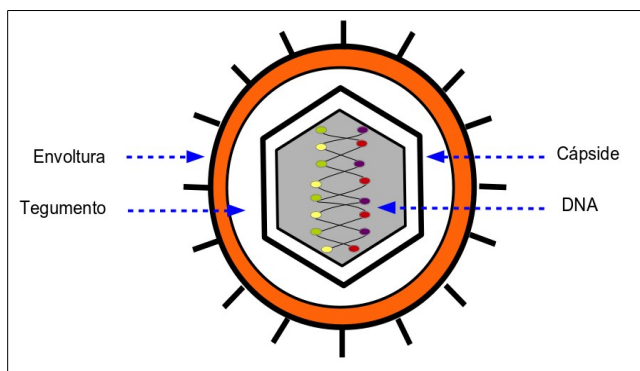


Figura 4. Morfología clásica de los Herpesvirus

Las partículas virales pueden ser esféricas o poligonales, de entre 70-120 nm de diámetro, dependiendo de la especie de molusco bivalvo afectado (Farley *et al.*, 1972, Hine *et al.*, 1992, Comps *et al.*, 1993). Algunas de estas partículas se llegan a observar vacías, mientras que otras contienen una capa electro densa toroidea, con un núcleo en forma de ladrillo y un anillo de concéntrico (nucleocápside). En ocasiones las cápsides vacías se quedan en el núcleo de las células infectadas. Las partículas virales citoplasmáticas se llegan a observar cerca de vesículas para conformar la envoltura. Estas partículas intracitoplasmáticas exhiben una envoltura con forma trilaminar, con la misma forma y componentes que las partículas virales. La envoltura y cápside se encuentran separadas por una zona electrolúcida de aproximadamente 5 nm llamada tegumento (Figura 5) (Renault *et al.*, 2001)

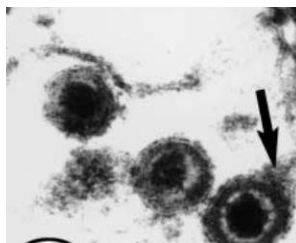


Figura 5. MET partículas OshV-1. Fotomicrografía de Microscopía Electrónica de Transmisión que muestra las partículas virales de OshV-1. Tomada de Arzul *et al* 2001

Otras características notables sobre la morfología de las partículas virales de OshV-1 es la formación de partículas L, las cuales son partículas virales vacías y que además se han encontrado asociadas a eventos recientes de mortalidad (Tristan Renault comunicación personal, 2013). El OshV-1 al pertenecer a los HVs, durante el desarrollo de la infección dentro de los tejidos blanco, llega a formar otras estructuras morfológicas, que son útiles para su identificación. Como es la fusión de partículas virales, la formación de protusiones en las partículas virales (Figura 6.A), y el arreglo de paracrystalino (panal de abeja) (Figura 6.B).

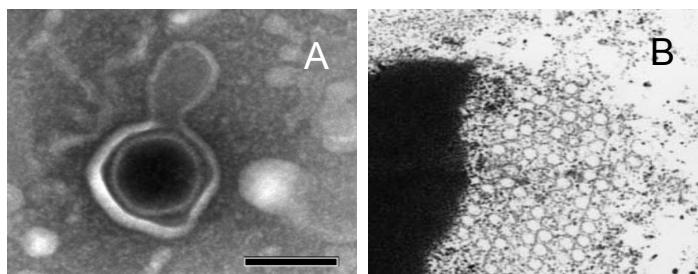


Figura 6. MET OsHV-1. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Transmisión morfología OsHV-1. A Protusiones presentes en las partículas virales de Herpesvirus tomada de Chen *et al.*, 2012 B. Arreglo de paracristalino. Tomada de Arzul *et al* 2001.

Organización genómica de OsHV-1

La primera descripción sobre el genoma de un virus tipo herpes fue en 1999 (Le Deuff & Renault, 1999), cuya secuenciación fue incompleta, pero esta información demostró que esta clase de virus no presentaba igualdad genética con los otros HVs. Sin embargo, no fue hasta el año 2005 que se logró secuenciar completamente el genoma del virus a partir de tejido infectado de larvas de *C. gigas* recolectadas en Francia, el tamaño estimado es de 207, 439 pb, el cual es considerado como el genotipo de referencia (Número de acceso GenBank AY509253). Presenta un total de 124 ORFs, con 124 regiones que codifican para proteínas, 12 ORFs, que resultan en un total de 136 genes dentro del genoma. Las regiones repetidas se encuentran organizadas en dos regiones únicas UL (167 843 pb) y Us (3370 pb), cada una flanqueada por secuencias invertidas y repetidas (TRL/ IRL (7584 pb) y Trs/IRs (9774 pb)). Con una región interna única X (1510 pb); por lo tanto la representación genómica de OsHV-1 es TRL-UL-IRL-X-IRs-Us-TRs (Figura 7). La composición de nucleótidos es 38·7 mol% G+C (Davison *et al.*, 2005).

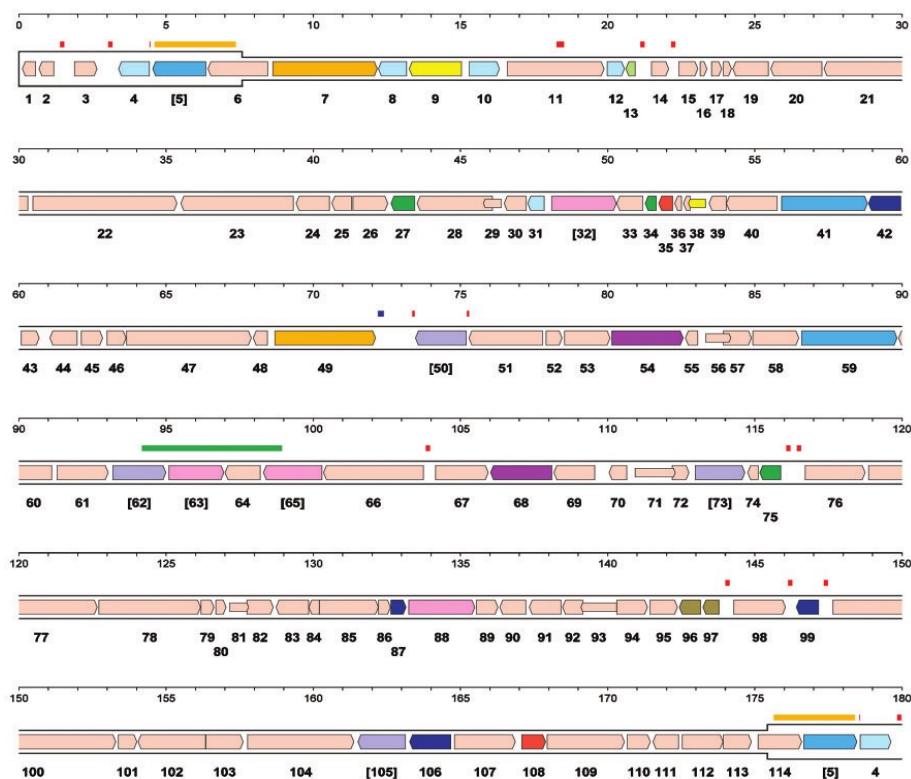


Figura 7. Organización genómica de OshV-1. Davison *et al.* (2005).

Una de las principales características del arreglo genómico de OshV-1, es que 38 genes se relacionan con 12 familias. Dentro de las cuales se han identificado que estos codifican para diversas proteínas, cuya función es desconocida; sin embargo algunos se han podido clasificar. Existen dos familias de proteínas que son secretadas, tres que se asocian a membranas, una que produce helicasas, otra que produce inhibidores de la apoptosis, la familia que está involucrada en la ruta de trifosfato deoxiutidina, dos familias de proteínas de anillo y otras dos mas de función desconocida (ORF 4).

Otros genotipos de OsHV-1

- **Acute Viral Necrosis Virus (Número de acceso GenBank GQ153938)**

Desde mediados de 1990 en cultivos intensivos de la almeja China (*Chlamys farreri*) se han presentado severos brotes de mortalidad, los mismos que han reincidido anualmente durante verano, donde existen sitios que han alcanzado hasta un 90% de mortalidad en un lapso de entre 5-8 días (Yu *et al.*, 1998). En un alto porcentaje de las almejas examinadas se encontró un virus tipo herpes llamado por sus siglas en inglés Acute Viral Necrosis Virus (AVNV) (Song *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002) el cual de acuerdo a su morfología se encontraba altamente relacionado con el OsHV-1, así como en los hallazgos histopatológicos (Liu *et al.*, 2002). Pero no fue hasta 2013 (Ren *et al.*, 2013) que se logró secuenciar el genoma de este virus y se determinó que presenta 210,993 pb; y además, presenta una composición nucleotídica de 38.5% G+C. La estructura genómica de AVNV consiste en dos regiones únicas (170.4 kb y 3.4 kb, respectivamente), con copias internas separadas por una tercera región única de 1.5 kb. Las secuencias de AVNV y OsHV-1 presentaron un 97% de similitud, sin embargo existen diversas inserciones y deleciones, donde es importante resaltar que todas éstas variaciones se encontraron en regiones no codificantes. Por ejemplo una de las regiones con mayor polimorfismo que sirve para diferenciar genotipos de OsHV-1 es la región ORF 4 (Arzul *et al.*, 2001a; Segarra *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 2012) con los primers C2/C6, se encontró que la semejanza entre OsHV-1 y AVNV fue del 97%, las diferencias radicaron en tres deleciones, una inserción y dos sustituciones. La mayor de las deleciones consistió en cinco copias de trinucleótidos repetidos (CTA) (Figura 8).

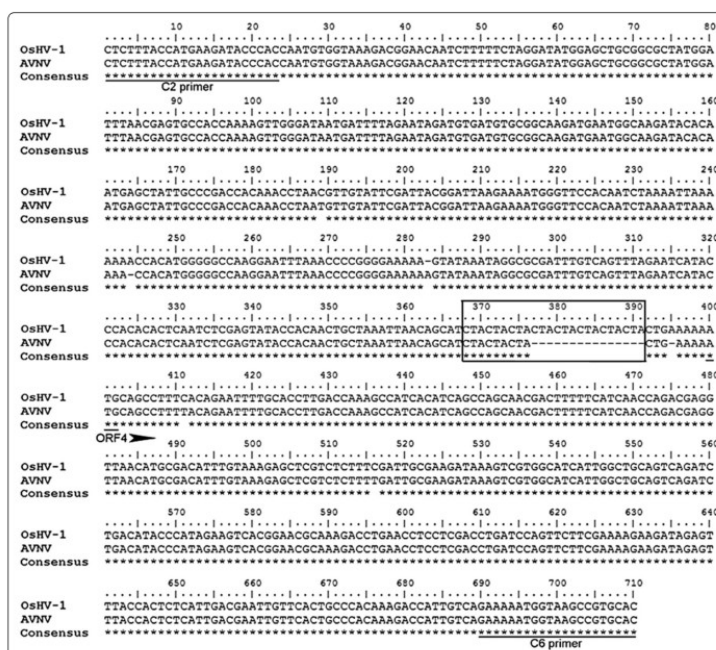


Figura 8. Alineamiento ORF 4 (C2/C6) OsHV-1 y AVNV. La secuencia de los primer C2 y C6 se encuentran subrayadas con una línea negra. La región microsatélite que presenta la delección CTA se encuentra enmarcada en el rectángulo. Ren *et al.*, (2013).

OsHV-1 var

En un estudio realizado para demostrar la transmisión interespecie con OsHV-1 (AY509253), se identificó en larvas de *C. gigas* y *R. philippinarum*, provenientes del mismo sitio de cultivo (Costa del Atlántico de Francia), que en la región ORF 4 amplificada con los primers C1 y C4, estas muestras presentaron una delección de 208 pb, pero también se encontraron otras diferencias como una inserción de 27 pb, una sustitución así como delecciones (Arzul *et al.*, 2001c).

- **OsHV-1 μ Var (Número de acceso GenBank HQ842610)**

Durante Mayo y Septiembre de 2008 en Francia se detectaron brotes de mortalidad en cultivos de *C. gigas*, donde se vieron afectados principalmente juveniles. Los rangos de mortalidad iban del 70-100%, este fenómeno se denominó como “síndrome de mortalidades de verano”. Se realizó la detección de OsHV-1 donde un 75% de los sitios analizados resultó positivo, lo cual coincidía con el análisis de años previos, pero para este periodo el porcentaje de mortalidad era mucho mas elevado (Segarra, 2009). En las muestras positivas a OsHV-1 se encontró que en la región ORF 4 presentaba una deleción consecutiva de 12 pb, en una región microsatelite característica con un patrón “CTA”, y además presentaba una adición y diversas sustituciones (Figura 9). Así mismo en el ORF 42-43 presentaba dos variaciones, la primera correspondía a una deleción de adenina en la posición 116 y una sustitución de citocina por tirosina en la posición 526 (Segarra *et al.*, 2010). Adicionalmente en la región ORF 35,-36,-37,-38, este genotipo presenta una deleción de 605 pb (Figura 10) (Renault *et al.*, 2012). La deleción de dos genes y la modificación de un tercero en esta región, son probablemente una coincidencia más que un incremento en la virulencia de este genotipo, ya que el ORF 38 codifica para proteínas de anillo del dominio ICP0, homólogo para los alphaherpesvirus, donde además esta proteína es indispensables para la activación del genoma (Moriuchi *et al.*, 1994; Cohen y Nguyen, 1998; Gu y Roizman, 2009; Ferenczy *et al.*, 2011).

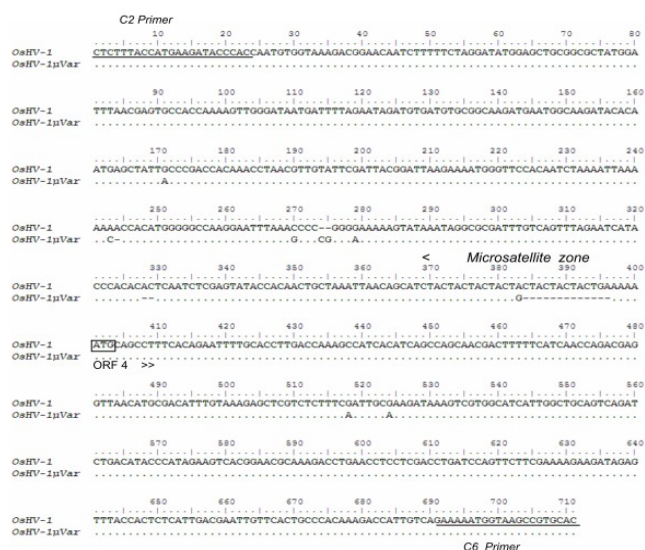


Figura 9. Alineamiento ORF 4 (C2/C6) OsHV-1 y OsHV-1 µVar. Delección de 12 pb en la zona del microsatélite. Segarra *et al.*, (2010).

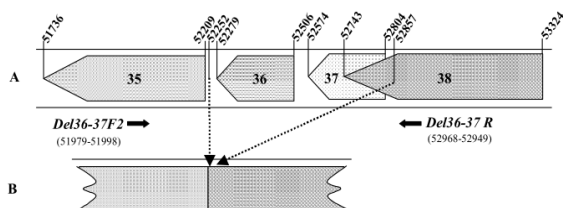


Figura 10. ORF 35,36,37, 38. A Esquema de los ORFs 35,36,37 y 38 de OsHV-1. B. Esquema de la fusión del ORF 35 y 38 por delección de los ORF's 36, 37 y parte del 38, característico de OsHV-1 µVar. Renault, *et al.* (2012).

Anteriormente se mencionaron tres genotipos de OsHV-1, el genotipo de referencia OsHV-1 (AY509253), OsHV-1 µVar (HQ842610) y el Acute Viral Necrosis Virus descrito en las almejas chinas (GQ153938), de estos se describieron las principales diferencias a nivel genómica que presentan. Estudios realizados en el ORF 4 han ayudado a la identificación de diversas variantes de OsHV-1, las cuales se describen brevemente.

OsHV-1 μ Var variante Irlanda (Gene bank JQ963169)

La secuencia de OsHV-1 obtenida de semillas de *C. gigas* en Irlanda, es casi idéntica a OsHV-1 μ Var (HQ842610). Las únicas diferencias radican en una delección (adenina/timina) y una inserción (guanina/citocina) sobre las primeras 360 pbs de la región ORF4. De esta forma se estableció la hipótesis de que el OsHV-1 μ Var variedad Irlanda (JQ963169), se originó a partir del genotipo de OsHV-1 μ Var (HQ842610) (Lynch *et al.*, 2012).

OsHV-1 μ Var Δ 9 Francia

En muestras de *C. gigas* colectadas durante 2008 a 2010, provenientes de Francia (Normadía), se identificó una variante de OsHV-1 μ Var (HQ842610) la cual denominaron OsHV-1 μ Var Δ 9, cuya distinción es una delección de tres repeticiones de tres nucleótidos “CTA” localizados en las posiciones de la región microsatelite 4,438-4,448 y 178,564-178,573. Esta variante se logró identificar en diferentes fases del desarrollo (semilla, juvenil y adultos), pero fue en semillas y juveniles recolectados durante 2009 que se encontraron los primeros reportes. Dado que esta variante se detectó tanto en ostiones muertos como en ostiones sanos, parece no ser mas virulenta que OsHV-1 μ Var (HQ842610). Las muestras positivas a la nueva variante procedían del mismo sitio de crianza Charente-Maritime, Francia, pero fueron criadas en diferentes sitios localizados en Normadía. Lo cual sugirió que esos ostiones se infectaron por esta variante en el área de crianza natural durante las primeras fases del desarrollo. Con este trabajo se concluyó que nuevas variantes de OsHV-1 (AY509253) pueden surgir, pero su patogenicidad y virulencia son desconocidas (Martenot *et al.*, 2011). Posterior a este trabajo se describieron otras dos nuevas variedades, uno que presentaba una delección de 15 pb OsHV-1 μ Var Δ 15 y el segundo similar a este pero con una inserción de tres nucleótidos (Martenot *et al.*, 2012).

OsHV-1 La Cruz, Sonora México (Gene bank JF894308)

En ostiones comerciales localizados en el Estero La Cruz, Sonora, México; se recolectaron ostiones juveniles y adultos aparentemente sanos. Al realizar el diagnóstico para OsHV-1, mediante la amplificación de la región ORF4 con los primers C2/C6 cuyo producto esperado es de 709 pb (Arzul *et al.*, 2001a; Renault & Arzul, 2001), se encontró que para estas muestras se obtuvo un producto de 723 pb., hecho que asoció a tres causas: 1. inserción de dinucleótidos AA en la posición 220-221, 2. una gran inserción de cuatro tripletes CTA mas que en comparación con el OsHV-1 de referencia (AY509253). 3. una sustitución de C por T en la posición 400 (Grijalva-Chon *et al.*, 2012).

Mecanismo de transmisión

Se piensa que el principal mecanismo de transmisión de OsHV-1 es por vía horizontal (Sauvage *et al.*, 2009), donde probablemente el agua de mar sea el vehículo de dispersión del virus, ya que al inicio de bioensayos, la detección de OsHV-1 en el medio acuático es negativa, pero 6 horas después de la infección, se pueden llegar a detectar hasta 1×10^2 copias virales de DNA/ μ l, mismas que pueden permanecer por más de 48 horas en el medio (Schikorski *et al.*, 2011). Es importante considerar que algunos organismos infectados por el virus, juegan un papel trascendental como reservorios, y son los organismos adultos quienes sobrevivieron a una infección temprana por OsHV-1 en los que persiste el agente infeccioso; y son precisamente éstos que lograron sobreponerse a la enfermedad, los que actúan como “focos de infección” de OsHV-1 (Arzul *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la transmisión horizontal de la enfermedad entre grupos de ostiones de *C. gigas*, dependerá primordialmente del “background” genético, ya que grupos de ostiones con menor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad o resilientes tendrán baja mortalidad, baja prevalencia de la misma y por ende el rol de reservorios será menor que aquellos que tienen mayor susceptibilidad (Dégremont *et al.*, 2013). Sin embargo el principal detonador para la manifestación de la enfermedad causada por el herpesvirus en moluscos es la temperatura, ya que en el campo al aumentar la temperatura del mar es cuando se han observado mayores mortalidades, como ocurre en el verano (Farley *et al.*, 1972; Renault *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2007; Segarra *et al.*, 2010). Actualmente se ha propuesto una nueva hipótesis sobre la dispersión de OsHV-1 a través de las partículas presentes en la columna de agua, y es posible que sea el plancton el encargado de cumplir esta función (Paul-Pont *et al.*, 2013).

La primera transmisión experimental que se realizó de OsHV-1, fue de un extracto viral obtenido de *C. gigas* el cual se inoculó directamente a larvas libres de

patógenos de dos días de *C. gigas* y larvas de siete días de *Ostrea edulis* (Le Deuff *et al.*, 1994), dos días después de la inoculación se presentaron las mortalidades, pero la identificación del virus en los tejidos de los moluscos infectados se realizó mediante microscopía electrónica, con este trabajo se demostró que el extracto viral obtenido de una especie tenía la capacidad de infectar a otras. Este no ha sido el único reporte de transmisión interespecies, ya que Arzul *et al* (2001b) a partir de larvas libres de patógenos de *C. gigas*, logró infectar con OsHV-1 a larvas axénicas de *Crassostrea. ruvularis* y *Ostrea. Edulis*. En México se ha realizado exitosamente la infección experimental en *C. gigas* por inyección en el músculo abductor (Dr. Manuel Grijalva comunicación personal), mediante cohabitación y por contaminación experimental agua de mar (Dr Ricardo Vázquez dato no publicado).

Ciclo viral de OsHV-1

Al igual que el resto de los virus, OsHV-1 debe seguir una serie de etapas para lograr su replicación y dispersión. De manera muy general se han descrito siete pasos seriados que comparten la mayoría de los virus, los cuales son fundamentales para su proliferación. Una vez que el virus ha ingresado a su hospedero, este deberá llegar a las células blanco y para poder ingresar a estas requerirán de un receptor específico localizado en la superficie de la membrana celular, en la figura 11 se describe brevemente una representación hipotética sobre el ciclo viral de OsHV-1. Dentro de este esquema se han detectado algunas rutas metabólicas y/o proteínas específicas encargadas del transporte y replicación dentro del virus dentro de células de *C. gigas*. La descripción de estos mecanismos, potencialmente pueden ayudar a explicar ¿porque algunos organismos tienen la capacidad de resistir o cual será el factor genético asociado

a la resistencia y supervivencia ante la infección por OsHV-1?, así como ¿cuales son los mecanismos que el virus utiliza para permanecer ya sea en un estado infeccioso crónico o de latencia?.

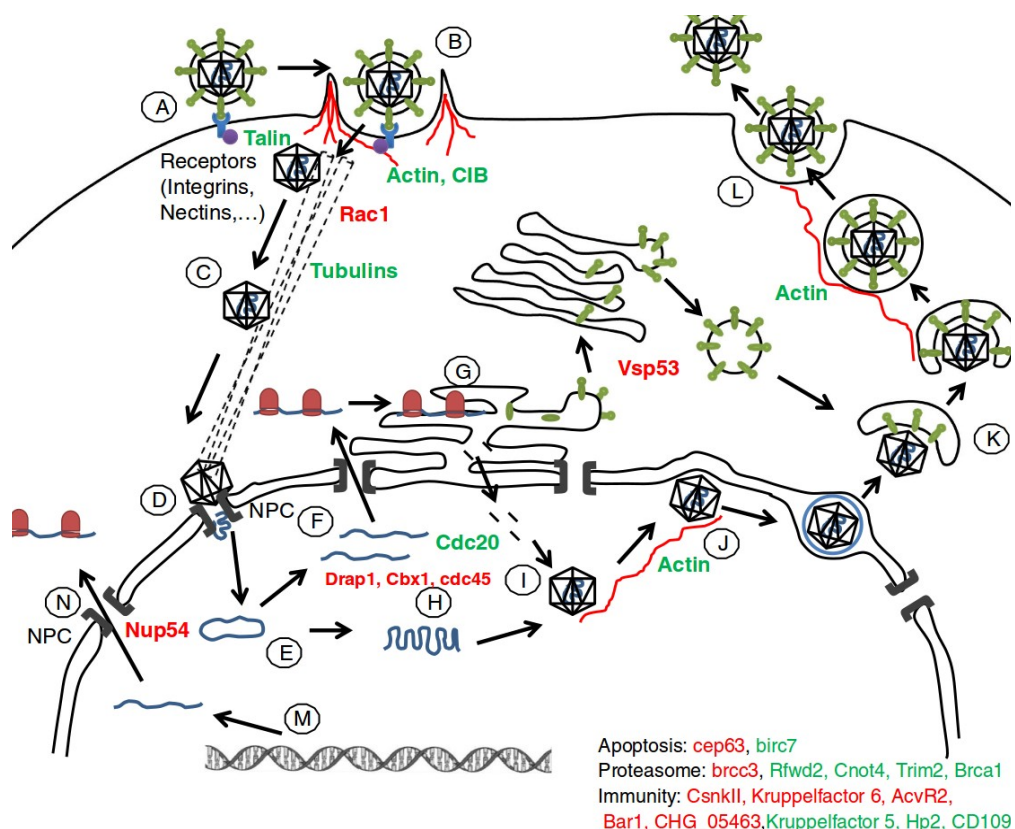


Figura 11. Representación hipotética sobre el ciclo viral de OsHV-1 tomado de Jouaux et al., 2013.

A continuación se describen los pasos durante la infección por OsHV-1. **A.** Unión. Este es un sitio específico el cual reconocerá el virus para lograr la internalización del mismo hacia el citoplasma. Es precisamente este receptor el que discriminará o facilitará la entrada del virus, por tal motivo existe especificidad entre el herpesvirus y la especie a la que infecta. **B.** Fusión de membrana. Intervienen proteínas de actina del citoesqueleto y proteínas de adhesión celular. **C.** Translocación de la cápside hacia el núcleo. Este transporte se sugiere esta dado por la presencia de microtúbulos y sobre-expresión de los mismos (45,19). **D.** Acoplamiento a poros nucleares. Al realizar esto el virus asegurará su replicación y expresión donde quizás las tubulinas α y β se encuentren involucradas junto con el Complejo del Poro Nuclear (NPC), lo que facilitará la entrada del genoma viral al nucleoplasma. **E.** Formación de concatémeros. **F.** Transcripción de ARNm viral. **G.** Traducción de RNAm viral. **H.** Replicación. **I.** Formación de la cápside. **J.** Germinación con la membrana nuclear interna para liberar la cápside hacia el citoplasma. **K.** Formación de la envoltura por el aparato de Golgi. **L.** Fusión de la vesícula del virión con la membrana plasmática, lo cual asegurará la liberación de los viriones maduros. Los colores rojo y verde ubicados en la parte inferior derecha del esquema, hacen mención sobre las proteínas involucradas en procesos de apoptosis, proteosoma e inmunidad así como en el sitio hipotético de acción. Figura obtenida de. Jouaux et al., 2013.

Métodos de control

Se han establecido principalmente buenas prácticas de manejo dentro de los sitios de cultivo; las medidas de bioseguridad deberán estar encaminadas a ser aplicadas en instalaciones confinadas y/o controladas como sitios de engorda y/o crecimiento, con la finalidad de proteger y evitar la entrada del virus a estos sitios. Como la mayoría de los HVs, se piensa que OsHV-1 probablemente es muy susceptible fuera del hospedero; por tal motivo altas temperaturas, agentes químicos o la luz solar (UV) pueden destruir su envoltura lipídica. En laboratorios de producción de semilla así como en cultivos intensivos, los brotes de OsHV-1 se pueden controlar mediante cuarentena y medidas de higiene; por ejemplo, la radiación con rayos UV y filtración del agua, pero en el mejor de los casos se deberán destruir aquellos lotes infectados y/o positivos. Los ostiones moribundos o muertos deberán ser removidos y destruidos en la medida de lo posible. El equipo utilizado en una zona infectada no deberá ser enviado ni utilizado en zonas libre o no infectadas con el virus (OIE, 2013). Por otra parte, se ha demostrado en *C. gigas* que la transmisión y prevalencia de OsHV-1 dependerá del background genético o la capacidad de resiliencia que los organismos expuestos presenten para enfrentar la infección viral (Sauvage *et al.*, 2009; Dégremon, 2011; Dégremon *et al.*, 2013). En países como Francia y México se están desarrollando programas de mejoramiento genético, cuyo objetivo es seleccionar familias resistentes a OsHV-1, de esta forma se podrá controlar la infección.

Métodos de diagnóstico

Las primeras herramientas utilizadas para la detección de los virus tipos Herpes en el medio marino fueron mediante microscopía electrónica de transmisión (Farley *et al.*, 1972). Inclusive la primera observación que se realizó en México

sobre la presencia de un Herpesvirus en cultivos de *C. gigas* fue mediante microscopía electrónica (Vasquez-Yeomans, 2004). Sin embargo más recientemente la tendencia ha sido hacia el uso de métodos moleculares de diagnóstico como PCR, qPCR hibridación *in situ*, entre otros. En la tabla IV se realiza una comparación de las diferentes técnicas utilizadas para la detección de OsHV-1 en diferentes fases del desarrollo de los moluscos bivalvos con especial énfasis en *C. gigas*.

Tabla IV. Métodos para la vigilancia y diagnóstico de OsHV-1 en diferentes fases del desarrollo de los moluscos bivalvos (OIE) . A = Método recomendado por la habilidad, utilidad en el diagnóstico por su especificidad y sensibilidad. B = Método estandar como buen diagnóstico por sus sensibilidad y especificidad. C = Método aplicado en algunas situaciones, pero su costo, precisión u otros factores limitan su aplicación. D = Método no recomendado para este propósito. Cuadro tomado y modificado de Chapter 2.4.9 Infection with Ostreid Herpesvirus 1 microvariant OIE 2013

Método de diagnóstico	Fase del desarrollo en vigilancia		
	Larva	Juveniles	Adultos
Lesiones macroscópicas	D	D	D
Bioensayo	D	D	D
Histopatología	D	D	D
Microscopía Electrónica de Transmisión	D	D	D
Ensayo con anticuerpos	D	D	D
Hibridación <i>in situ</i> con DNA	C	C	C
PCR	A	A	A
qPCR	A	A	A
Secuenciación	D	D	D

A continuación se describen brevemente algunos de los métodos utilizados para el diagnóstico de la infección por OsHV-1.

Histopatología

Como la mayoría de los Herpesvirus, las lesiones asociadas a OsHV-1 serán principalmente cambios en la morfología celular nuclear (McGavin, 2007),

asociados en la mayoría de los casos con cuerpos de inclusión intranucleares tipo Cowdry A (cuerpos de inclusión eosinofílicos) (Meyers *et al.*, 2009), dichos cuerpos de inclusión no siempre se logran observar, pero se pueden llegar a encontrar lesiones tales como hipertrofia nuclear, marginación celular y picnosis, la cual también se puede observar en hemocitos (Vasquez-Yeomans, 2004; Friedman *et al.*, 2005). Los principales sitios anatómicos en los cuales se pueden llegar a observar estas lesiones, son aquellos con tejido conectivo en donde las células fibroblásticas presentarán dichas alteraciones (Hine *et al.*, 1992), también se pueden encontrar en glándula digestiva, branquias y manto (OIE 2013). Las lesiones a nivel estructural no siempre se logran observar asociadas con la presencia del virus (Renault *et al.*, 1994; Renault & Le Deuff, 1994). Por tal motivo la examinación histológica no se considera como una técnica adecuada para identificar la infección por OsHV-1. Para el estudio histopatológico el preservador de elección es la solución de Davidson, pero formalina al 10% y otros fijadores estandar para histología son aceptados (OIE 2013).

Microscopía Electrónica de Transmisión

Mediante el uso de la microscopía electrónica de transmisión se han podido identificar los principales tejidos en los cuales el virus tiene una mayor replicación, y es además utilizada para confirmar la presencia del virus las muestras (Renault & Le Deuff, 1994; Renault *et al.*, 2001; Arzul *et al.*, 2001; Arzul *et al.*, 2001b; Vasquez-Yeomans, 2004). La gran desventaja que presentan esta técnica, es que el tiempo de diagnóstico es largo, es un método impráctico para la vigilancia epidemiológica y la detección de algunos virus puede llegar a ser difícil debido a su baja abundancia dentro de especies como peces, moluscos y macroalgas (Batista *et al.*, 2007). Gracias al uso de ésta técnica se ha podido describir y

conocer más sobre el ciclo de replicación del virus en las células blanco. Se ha observado por ejemplo, que la replicación ocurre principalmente en las células fibroblásticas a lo largo del tejido conectivo, especialmente en manto, palpos labiales, branquias y glándula digestiva (Renault & Le Deuff, 1994; Renault *et al.*, 1995; Schikorski *et al.*, 2011). Las muestras que serán procesadas para su observación mediante esta técnica, deberán ser conservar en glutaraldehído al 2.5 % con 0.1 M de buffer de cacodilatos (OIE 2013).

Técnicas moleculares alternativas para la detección de OsHV-1

Dentro de las pruebas convencionales para el diagnóstico se han desarrollado técnicas útiles para la identificación de OsHV-1, como es el caso de la inmunohistoquímica, con la producción de anticuerpos policlonales producidos en ratones BalbC (Arzul *et al.*, 2002). Otro método propuesto es el llamado LAMP (loop-mediated isothermal amplification), mismo que se desarrolló para la amplificación de ADN bajo condiciones isotermales. Esta técnica demostró ser simple, rápida, con alta sensibilidad y especificidad y capaz de ser utilizada tanto en el laboratorio como en el campo (Ren *et al.*, 2010)

Hibración *in situ*

En *C. gigas* el uso de sondas marcadas de DNA viral obtenidas a partir de productos de PCR, se utilizó primero como una herramienta para el diagnósticos de OsHV-1 (Renault & Lipart, 1998; Renault *et al.*, 2000; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004; pero también se ha utilizado para la detección en organismos que resistieron una infección primaria y fueron portadores asintomáticos de la enfermedad (Arzul *et al.*, 2002). Tiene también su importancia como método confirmatorio en nuevos hospederos corroborando la detección por PCR y verdadera infección. El uso de esta herramienta es para demostrar la presencia del virus en los tejidos, así como su tropismo o bien para conocer el desarrollo de la infección en los diferentes órganos infectados (Lipart & Renault, 2002).

Detección de OsHV-1 mediante PCR y qPCR

Dentro de los métodos moleculares son la PCR y la qPCR, las técnicas de elección para la detección de OsHV-1 (OIE 2013). Para estas técnicas la extracción del ADN es un paso crítico. En la tabla V se resumen los diversos métodos que se han utilizado para la extracción de ADN viral.

Tabla V. Métodos de extracción de ADN para la detección de OsHV-1 por PCR. Batista 2007

Fase del desarrollo	Condiciones de muestreo	Méteodo	Referencia
Larva y semillas	Congelación a -20°C	Moler y ebulir	(Renault <i>et al.</i> , 2000)
Larva	Congelación a -80°C	Lavar, moler, digerir con proteinasa K y ebulir	(Batista <i>et al.</i> , 2005)
Semilla	Material fresco y muestras fijadas en etanol al 95%	Kit Comercial unidos a gel de sílica	(Friedman <i>et al.</i> , 2005)
Adultos	Congelación -80°C	Moler, digestión con proteinasa K, purificación con fenol-cloroformo	(Renault <i>et al.</i> , 1995)
Adultos y semillas	Fijados en solución de Davidson y Carson. Bloques de parafina	Desparafinación, digestión con proteinasa K y calor	(Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , 2004)
Adultos	Fijados en solución de Davidson	Digestión con proteinasa K y calor	(Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , 2005)
Adultos	Fijados en solución de Davidson	Digestión con proteinasa K y purificación con fenol-cloroformo	(en Batista <i>et al.</i> , 2007)
Adultos	Branquias fijadas en etanol al 95%	Digestión con proteinasa K y purificación con fenol-cloroformo	(en Batista <i>et al.</i> , 2007)
Adultos, semillas y larvas	Branquias y manto fijadas en etanol al 95%	Digestión con buffer de lisis y proteinasa K en ebullición y precipitación con NaCl	(Vázquez-Juárez Dato no publicado)

Se han propuesto una gran variedad de primers de PCR para la detección de OsHV-1 (Batista *et al.*, 2007). El diseño de los mismos se encuentra dirigido a cuatro regiones. Región A, que codifica para proteínas de función desconocida. Región B, la cual se encarga de la formación de inhibidores de la apoptosis. Región C, se encuentra repetida en el genoma de OsHV-1 (TRL e IRL) (Davison *et al.*, 2005) y codifica para proteínas de función desconocida y por último la región Gp que codifica para glicoproteínas putativas (Arzul *et al.*, 2001a). Existen primers

cuyo blanco son regiones conservadas las cuales son de gran utilidad para la identificación de OsHV-1, como los son los de la región ORF 100 (Webb *et al.* 2007); pero existen otros que ayudaran a evaluar la diversidad del virus, tal es el caso de los que tienen como blanco la región C u ORF 4, principalmente C2-C6 (OIE 2013). Para la identificación de otras regiones variables como en OsHV-1 μ Var se utilizarán los primers que tienen como blanco la región ORF 35-36-37-38 (Renault *et al.*, 2012). En la tabla VI se pueden observar algunos de los primers utilizados para identificación de OsHV-1 y sus variedades.

La especificidad de los primers utilizados se define como la habilidad en el ensayo para lograr la amplificación solo del ADN blanco del agente; mientras que la sensibilidad (o límite de la detección) es la capacidad en la detección sistemática de pequeñas cantidades de DNA viral (Batista *et al.*, 2007). Los órganos indicados para la detección de OsHV-1 en el moluscos bivalvos son principalmente manto y branquias (Arzul *et al.*, 2002), ya que el virus tiene una gran afinidad por el tejido conectivo (Renault comunicación personal).

Tabla VI. Primers utilizados para el diagnóstico de OsHV-1.(Batista, 2007)

Nombre	Secuencia 5'- 3'	Forward/Reverse	Referencia
Región A			
A3	GCCAACCGTTGGAACCATAACAAGCG	Forward	(Renault <i>et al.</i> , 2000)
A4	GGGAATGAGGTGAACGAACTATAGACC	Reverse	
A5	CGCCCAACCACGATTTTTCACTGACCC	Forward	
A6	CCCCTAGATATAGGATGAGATTTG	Reverse	
Región B			
B1	ATGTAATGGGTGGTGGTGCT	Forward	(Arzul <i>et al.</i> , 2001c)
B2	CAACAGCTTTGGAGGTTGGT	Reverse	(Arzul <i>et al.</i> , 2001a)
B3	GTGGAGGTGGCTGTTGAAAT	Forward	
B4	ACTGGGATCCGACTGACAAC	Reverse	
Región C			
C1	TTCCCCTCGAGGTAGCTTTT	Forward/Reverse	(Arzul <i>et al.</i> , 2001c)
C2	CTCTTTACCATGAAGATACCCACC	Forward/Reverse	
C4	GCAGTTGTGGTATACTCGAGATTG	Forward/Reverse	
C5	CCGTGACTTCTATGGGTATGTCAG	Forward/Reverse	
C6	GTGCACGGCTTACCATTTTT	Forward/Reverse	
C9	GAGGGAAATTTGCGAGAGAA	Forward/Reverse	
C10	ATCACCGGCAGACGTAGG	Forward/Reverse	(Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , 2005)
C11	GAGGGAAATTTGCGAGAGAG	Forward/Reverse	
C13	CCTCGAGGTAGCTTTTGTCAAG	Forward/Reverse	
C14	CCGTGACTTCTATGGGTATG	Forward/Reverse	(Renault <i>et al.</i> , 2004)
C15	GATTACCCAGATTCCCCTC	Forward/Reverse	
Región Gp			
Gp3	GGTGTGGGTTTGAAATGT	Forward	(Arzul <i>et al.</i> , 2001a)
Gp4	GGCGTCCAAACTCGATTAAA	Reverse	
Gp7	TTACACCTTTGCCGGTGAAT	Forward	(Batista <i>et al.</i> , 2007)
Gp8	TCACATCACTTGGTGGCAAT	Reverse	
Gp10	AAGCAAATGACACGACACCA	Reverse	
Gp17	AACCACCACACAAGCTCCTC	Forward	
Gp18	ACATCTGGTGGTGGGATAGG	Reverse	
ORF 100			
DPF	ATTGATGATGTGGATAATCTGTG	Forward	(Weeb <i>et al.</i> , 2007)
DPR	GGT AAATACCATTGGTCTTGTTC	Reverse	
ORF 42-43			
IA1 F	CGGTCATATCCAAAGTT	Forward	(Segarra <i>et al.</i> , 2010)
IA2 R	AATCCCCATGTTTCTTGCTG	Reverse	

ORF 35-36-37-38			
Del 36-37 F2	ATACGATGCGTCGGTAGAGC	Forward	(Renault <i>et al.</i> , 2012)
Del 36-37 R	CGAGAACCCCATTCCTGTAA	Reverse	

En la figura 12 se puede observar la ubicación y dirección en el genoma de OsHV-1 de algunos de los primers utilizados para su detección.

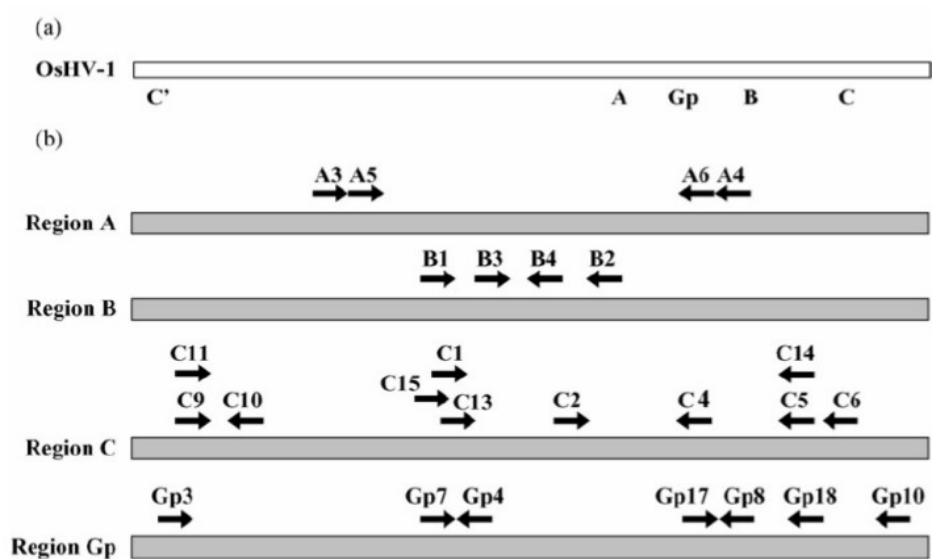


Figura 12. Ubicación de los primers dentro del genoma de OsHV-1 (Batista *et al.*, 2007). Esquema que muestra la posición de algunos de los primers utilizados para la detección de OsHV-1. (a) Posición de las regiones A, B, C y Gp. La región C' representa la posición invertida y repetida de la región C. (b) Diagrama con los primers (flechas negras) colocados en los sitios de alineación en las cuatro regiones.

PCR cuantitativo (qPCR)

Se propuso a la PCR cuantitativa como método de diagnóstico principalmente por tres razones, (i) la PCR convencional es una técnica en la que se utiliza bromuro de etidio el cual es un componente tóxico, (ii) en ocasiones existe dificultad en la interpretación de bandas débiles en el gel de agarosa, (iii) no es considerada como una prueba cuantitativa, lo que puede ayudar a determinar el número mínimo de viriones que puedan inducir enfermedad (natural o experimentalmente). Se han desarrollado protocolos con Sybr® Green donde lograron detectar 4 copias de ADN viral/ μ l (Pepin *et al* 2008) y alternativamente se ha propuesto el protocolo con sondas Taqman® (Martenot *et al.*, 2010), la comparación de ambos protocolos se llevó a cabo con 210 semillas de *C. gigas*, donde el índice de kappa (0.41) indicó cierta concordancia entre ambos. Durante esta comparación se detectaron 76 muestras negativas por el protocolo propuesto por Pepin *et al* (2008), mientras que por el protocolo Martenot *et al* (2010) solo 46 resultaron negativas. Dado que estas observaciones demuestran que la detección con Taqman® puede ser más sensible que con Sybr® Green, se necesita realizar un proceso de validación (OIE 2013).

Para llevar a cabo la detección de OsHV-1 por qPCR se han propuesto diversos pares de primers, los cuales se describen en la tabla VII.

Tabla VII. Primers utilizados para el diagnóstico de OshV-1 por qPCR

Primer	Secuencia	ORF	Función	Tamaño del producto (pb)	Referencia
B4	5'-ACT-GGG-ATC-CGA-CTG-ACA-AC-3'	ORF 99	Pt BIR	207	(Arzul <i>et al.</i> , 2001)
B3	5'-GTG-GAG-GTG-GCT-GTT-GAA-AT-3'				
C9	5'-GAG-GGA-AAT-TTG-CGA-GAG-AA-3'	ORF 5	Pt de función desconocida	197	(Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , 2004)
C10	5'-ATC-ACC-GGC-AGA-CGT-AGG-3'				
Gp4	5'-GGC-GTC-CAA-ACT-CGA-TTA-AA-3'	ORF 88	Pt de membrana tipo I	85	(Arzul <i>et al.</i> , 2001)
Gp7	5'-TTA-CAC-CTT-TGC-CGG-TGA-AT-3'				
DPF	5'-ATT-GAT-GAT-GTG-GAT-AAT-CTG-TG-3'	ORF 100	Subunidad de la ADN polimerasa	197	(Webb <i>et al.</i> , 2007)
DPR	5'-GGT-AAA-TAC-CAT-TGG-TCT-TGT-TCC-3'				

III. JUSTIFICACIÓN

La producción de moluscos bivalvos representa una importante fuente de ingresos para la población que se dedica a ésta actividad; lo cual se traduce en mayores ganancias y a su vez en un mejor desarrollo social para las personas involucradas. Por tal motivo es necesario conocer los agentes infecciosos que representan una amenaza para estos cultivos; tal es el caso de OsHV-1, ya que se ha reportado que la enfermedad causada por este virus presenta un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad.

Al realizar la caracterización de OsHV-1 se mejorarán los métodos de diagnóstico, lo cual contribuirá para la elaboración de planes de manejo y/o el establecimiento de estrategias sanitarias.

IV. HIPÓTESIS

A. El OsHV-1 identificado en muestras de moluscos bivalvos recolectados en costas de Baja California sur México, se agrupará filogenéticamente con el genotipo de OsHV-1 de referencia (AY509253).

B. Existirá variación genética de OsHV-1 con respecto a los episodios de mortalidad presentes en cultivos intensivos de *C. gigas* localizados en Francia.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar y analizar la variación genética de OsHV-1 en muestras colectadas en BCS, México y en cultivos intensivos de *C. gigas* localizados en Francia.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detección de OsHV-1

- 1.1 Identificación de OsHV-1 en moluscos bivalvos colectados en BCS, México
 - Análisis retrospectivo
 - Monitoreo de granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos
- 1.2 Identificación de OsHV-1 antes, durante y después de episodios de mortalidad en cultivos de *C. gigas* localizados en Francia durante 2011 y 2012.
 - Muestras de agua de mar, sedimento y otras especies marinas (Crustáceos, Balanos y Mejillones).
 - Muestras de *C. gigas*.

2. Análisis de la variación genética de OsHV-1 de las muestras positivas recolectadas en BCS, México y las muestras de cultivos de *C. gigas* de Francia.

- Amplificación de regiones variables (ORF 4, ORF 35-38 y ORF 42-43)
- Secuenciación parcial de regiones variables

3. Análisis de la variación genética de OsHV-1

- Entre las diferentes especies de moluscos bivalvos
- Durante los episodios de mortalidad antes, durante y después de los brotes de mortalidad (Solo en *C. gigas* en las muestras de Francia)

4. Análisis filogenético entre las diferentes muestras positivas de OsHV-1

VII. METODOLOGÍA

1. Detección de OsHV-1

1.1 Identificación de OsHV-1 en muestras recolectadas en BCS, México

○ Análisis retrospectivo

En los archivos del laboratorio de biología molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) se buscaron muestras remitidas para el diagnóstico de agentes infecciosos. Las cuales fueron tejidos fijados en etanol o DNA diluido en agua.

○ Monitoreo de granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos

Con la colaboración de productores se realizaron muestreos mensuales de diferentes sitios cultivo de moluscos bivalvos, los cuales se localizaron en Baja California Sur, México.

1.1.1 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN se siguió el método de precipitación con NaCl. En tubos Eppendorf se colocó aproximadamente 1 g de tejido (branquias y manto) con 400 µl de bufer de lisis (5 MNaCl, 1 M de Tris pH 8, 0.5 M EDTA, 10% SDS, aforado con 50 ml de agua) y 20 µg (10 µl) y proteinasa K. Las muestras se colocaron en baño maría 40 min a 60°C, al finalizar se realizó maceración mecánica con pistilos de plástico. Nuevamente se incubaron en baño maría 20 min a 60°C. Posteriormente a cada muestra se le agregó 200 µl de NaCl y se agitaron vigorosamente durante unos segundos. Las muestras se incubaron en hielo durante 10 minutos. Al finalizar se realizó una centrifugación (12,000 g, 10 min a 21°C) y se transfirió el sobrenadante a tubos con 1 ml de etanol absoluto frío. Adicionalmente se llevo a cabo otra centrifugación (12,000 g, 10 min a 21°C) y se

lavo el pelet con etanol al 70%. El exceso de etanol se decantó y se colocaron las muestras en un concentrador de vacío. Finalmente, el DNA obtenido se diluyó en 50 μ l de agua. Las muestras fueron cuantificadas en un nanodrop y llevadas a una concentración de 100 ng/ μ l.

1.1.2 Análisis por PCR de punto final

Se siguió el protocolo de diagnóstico establecido en el laboratorio de biología molecular del CIBNOR, la Paz, México. Los iniciadores utilizados para la detección de OsHV-1 fueron C9 R/C10 F (Barbosa-Solomieu, *et al*, 2004), cuyo producto esperado fue de 197 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 12 μ l, con 0.5 U de Gotaq® Flexi DNA Polymerase, Buffer 5X, 10 mM de dNTPs, 125 ng de cada primer, 25 mM de MgCl₂ y 1 μ l de DNA a una concentración de 100 ng. Al control negativo se le agregó 1 μ l de agua destilada. Como control positivo se añadieron 5 nanogramos de DNA viral genómico. Para estimar el tamaño de los productos obtenidos se tomaron 5 μ l de cada producto de PCR y se analizaron por electroforesis, en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL); estos fueron observados en un transiluminador UV. El tamaño de los productos de la amplificación fueron determinados mediante la comparación con un marcados de peso molecular de 1 Kb.

○ **1.2 Identificación de OsHV-1 en diferentes episodios de mortalidad en cultivos de *C. gigas* localizados en Francia durante 2011 y 2012**

El diagnóstico para la detección de OsHV-1 se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética y Patología del IFREMER, La Tremblade, Francia, siguiendo el protocolo previamente establecido para su diagnóstico, utilizando la técnica de qPCR con los primers DPF/DPR.

○ **Muestras de agua de mar, sedimento y otras especies marinas**

De cultivos intensivos de *C. gigas* localizados en dos sitios en Francia (Bahía D'agnas y Bahía de Thau) se recolectaron muestras antes, durante y después de episodios de mortalidad. En las tablas VIII y IX se resumen la fecha de recolección y tipo de muestra recolectada para la detección de OsHV-1.

Tabla VIII. Fechas y tipos de muestras recolectadas en Bahía D'agnas

Fecha de muestreo	Episodio	No.	Tipo de muestra
22/05/2012	Antes	1	Sedimento
13/07/2012	Durante	1	Sedimento
19/07/2012	Durante	1	Agua de mar
		1	Caracol
		4	Molusco gasterópodo
		4	Crustáceos (<i>Sphaeroma</i> sp)
		1	Almeja

Tabla IX. Fechas y tipos de muestras recolectadas en Bahía de Thau

Fecha de muestreo	Episodio	No.	Muestra
30/05/2012	Antes	2	Agua de mar
		31	Mejillones (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)
		26	Crustáceos (<i>Sphaeroma</i> sp)
01/06/2012	Durante	20	Balános (<i>Balanus</i> sp)
		2	Sedimento
16/08/2012	Después	2	Agua de mar
		1	Sedimento
		14	Mejillones (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)
		7	Balános (<i>Balanus</i> sp)
		25	Crustáceos (<i>Sphaeroma</i> sp)

- **Muestras de *Crassostrea gigas***

De cultivos intensivos localizados en tres sitios en Francia (Brest, Bahía D'agnas y Bahía de Thau) se recolectaron muestras antes durante y después de episodios de mortalidad durante 2011 y 2012.

1.2.1 Extracción de ADN

A. Especies marinas

A.1 Mejillones (*Mytilus galloprovincialis*).

El protocolo para la extracción de ADN en éstos organismos se describe detalladamente en el Anexo 1 inciso A. Dado que en esta especie en particular no se conoce con certeza en que tejidos se puede encontrar en virus se decidió seguir el protocolo antes referido.

A.2. Crustáceos (*Sphaeroma* sp), Balános (*Balanus* sp) y moluscos gasterópodos.

Estos organismos fueron desconchados, posteriormente la masa visceral fue pesada en tubos Eppendorff. Con respecto al peso obtenido de cada organismo se diluyó en buffer de lisis de acuerdo al protocolo descrito en el Kit Qiamp DNA (Qiagen) (Anexo 1 inciso B).

B. Muestras de agua de mar

Para realizar la extracción de muestras de agua de mar, se tomaron 5 mL de agua de mar en una jeringa estéril, posteriormente se filtró a través de una malla de 0.22 μ . Inmediatamente se tomó el filtro para realizar la extracción de ADN con el protocolo del Kit Qiamp DNA (Qiagen) (Anexo 1 inciso B).

C. Sedimento de agua

La metodología utilizada para extraer ADN de estas muestras fue el protocolo alternativo para los máximos rendimientos (Mo BIO Laboratories, Inc.) (Anexo 1 inciso C).

D. Ostiones y Almejas

A partir de branquias y manto se llevó a cabo la extracción de ADN siguiendo el protocolo del Kit Qiamp DNA (Qiagen) (Anexo 1 inciso B).

2. Análisis de la variación genética de OsHV-1 en las muestras positivas

- **Amplificación de regiones variables (ORF 4, ORF 35-38 y ORF 42-43)**

En el laboratorio de Genética y Patología del IFREMER, Francia se analizaron las muestras positivas obtenidas en BCS México y las muestras de ostión obtenidas durante 2011 y 2012 colectadas en Francia. Para su estudio se utilizaron diferentes primers y condiciones (Tabla X).

Para conocer la cantidad de copias virales presentes en las muestras positivas, se realizó qPCR en un volumen de 20 μ l en un placa con 96 pozos. Cada uno contenía 10 μ l Brilliant[®] Syber green buffer, 5 μ l (25 ng) de DNA (5 ng/ μ l), 2 μ l de cada primer DPF/DPR (5uM) y 1 μ l de agua destilada. Posteriormente las muestras se analizaron en rondas independientes de PCR convencional con tres juegos de primers C2/C6 (10uM), IA2-IA1 (10 uM) and Del 36-37 F- Del 36-37 R (10uM). Las muestras se trabajaron en un volumen de 50 μ l, cada una contenía 2.5 U (0.8 μ l) taq Polimerasa Goldstar (Eurogentec), 10X (5 μ l) de buffer (Eurogentec), 1.5 mM (3 μ l) MgCl excepto para la reacción de Del 36-37F2/Del36-37R 2 mM (4 μ l), 0.05 mM (0.5 μ l) dNTP y 2.5 μ l cada primer diluido. Para estimar el tamaño de los

productos obtenidos se tomaron 5 μ l de cada producto de PCR para su análisis por electroforesis, en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL). El tamaño de los productos de la amplificación fueron determinados mediante la comparación con un marcador de peso molecular y observados en un transiluminador UV.

- **Purificación de productos de PCR**

Los productos obtenidos de las diferentes rondas de PCR para cada par de primers utilizados, fueron purificados utilizando el kit Milipore Kit Montage® Centrifugal Filter Devices, los purificados fueron analizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) y comparados con marcadores de peso molecular correspondientes al fragmento esperado. Las imágenes obtenidas fueron analizadas para calcular la concentración de las muestras antes de ser secuenciadas.

Tabla X. Primers utilizados para la amplificación de las regiones variables de OsHV-1

Primer	Secuencia	Región	Tamaño esperado	Condiciones de amplificación	Reference
DPF	5-ATTGATGATGTGGATAATCTGTG-3'	ORF 100	197 pb	qPCR Preincubación 1 ciclo: 95°C 3 min (segment o1) 40 ciclos de amplificación 95°C 5 seg, 60°C 20 seg.(segmento 2) Análisis de la curva de disociación 1 ciclo: 95°C 1 min, 60°C 30 seg, 95°C 30seg (segmento 3)	(Webb <i>et al.</i> , 2007)
DPR	5'- GGT AAATACCATTGGTCTTGTTC-3'				
C9 F	5'-GAGGGAAATTTGCGAGAGAG-3'	ORF 5	196 pb	PCR convencional Precalentamiento 1 ciclo 95°C 1 min. 42 ciclos de fase de amplificación 95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min Extensión: 72°C 3 min	(Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , 2004)
C10 R	5'-ATCACCGGCAGACGTAGG-3'				
C2F	5'-CTCTTTACCATGAAGATACCCACC-3'	ORF 4	709 pb	PCR convencional Precalentamiento 1 ciclos 94°C, 3 minutos 35 ciclos de fase de amplificación 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1:30 min Extensión 1 ciclo 72°C 10min.	(Arzul <i>et al.</i> , 2001a)
C6R	5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3'				
IA2 F	5'-AATCCCATGTTTCTTGCTG-3'	ORF 41-43	607 pb	PCR convencional Precalentamiento 1 ciclo 94°C, 3 minutos 35 ciclos de fase de amplificación 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1:30 min Extensión 1 ciclo 72°C 10min.	(Segarra <i>et al.</i> , 2010)
IA1 R	5'-CGGTTTCATATCCAAAGTT-3'				
Del 36-37 F2	5'-ATACGATGCGTCGGTAGAGC-3'	ORF 35-36-37-38	A) 984 pb B) 384 pb C) NA	PCR convencional Precalentamiento 1 ciclo 94°C, 3 minutos 35 ciclos de fase de amplificación 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1:30 min Extensión 1 ciclo 72°C 10min.	(Renault <i>et al.</i> , 2012)
Del 36-37 R	5'-CGAGAACCCCATTCCTGTAA-3'				

- **Clonación de productos**

Los productos de PCR que presentaron más de una banda en la amplificación fueron clonados, utilizando el protocolo del Kit Topo TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen).

- **Secuenciación parcial de regiones variables (ORF 4, ORF 35-38 y ORF 42-43)**

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, la cual contenía 1.8 μ l de buffer de secuenciación, 0.4 μ l de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1.5 μ l del primer específico Forward o Reverse a 5 μ M (se utilizaron los mismos primers específicos para cada reacción que se llevó a cabo en la ronda previa de PCR de punto final) y entre 1 a 4 μ l producto de PCR purificado, lo cual dependía de la concentración del mismo. Las reacciones se realizaron en placas con 96 pozos. El programa para la amplificación fue específico para cada producto (Tabla X). Al finalizar el proceso se preparó la reacción de secuenciación. A cada muestra se le agregaron 60 μ l de etanol al 100% frío y posteriormente se centrifugaron a 3000 g durante 30 minutos. Al finalizar, la placa fue invertida para remover el exceso de etanol. Posteriormente se añadieron 60 μ l de etanol al 70%, seguido de otra centrifugación a 1650 g durante 10 min. Al finalizar este se retiró el exceso de etanol para después centrifugarla “boca abajo” durante 30s. Finalmente las muestras fueron secadas por Speed Vac y resuspendidas en 10 μ l de formamida, la cual se dejó por 30 minutos. La placa con las muestras fue cargada en un secuenciador ABI PRISM® 3130 XL-Avant Genetic Analyzer, con capilares de 30 cm y polímero POP 7.

- **Análisis de secuencias y alineamientos**

Los alineamientos de los pares de las bases obtenidos se realizaron con el software Chromas lite 2.01 y Mega 5. Para encontrar la similitud entre las secuencias obtenidas se utilizó el programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast), donde las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de OsHV-1 disponibles en GENE BANK.

3. Análisis de la diversidad genética

3.1 Entre las diferentes especies de moluscos bivalvos

Se describió la variación genética de las tres regiones amplificadas (ORF 4, ORF 35,-36,-37,-38 y ORF 42-43) de OsHV-1; la comparación de las secuencias obtenidas se realizó entre las muestras de *N. subnododus* y las muestras de *C. gigas* colectadas en BCS, México y los diferentes sitios de Francia durante 2011 y 2012.

3.2 Durante los episodios de mortalidad antes, durante y después de los brotes de mortalidad (Solo muestras de Francia)

Se describió la variación genética de OsHV-1 con respecto a los episodios de mortalidad en las muestras de *C. gigas* colectadas en Francia durante 2011 y 2012.

4. Análisis filogenético entre las diferentes muestras positivas de OsHV-1

Las relaciones filogenéticas entre las variantes de OsHV-1 identificadas en BCS, México así como las obtenidas en Francia durante 2011 y 2012, se establecieron mediante la región ORF4 (C2/C6). Para dar un mayor sustento a las relaciones establecidas, se realizaron tres construcciones filogenéticas, las cuales fueron: máxima verosimilitud, máxima parsimonia y el análisis de “vecinos más cercanos” (neighbor-joining por sus siglas en inglés). La reconstrucción filogenética se llevó a cabo con el método bootstrap con 1000 réplicas para obtener soporte en cada método, utilizando el modelo sustitución nucleotídica y en el caso de máxima verosimilitud se utilizó también el modelo de Tamura-Nei.

Las secuencias obtenidas de este trabajo fueron comparadas con las secuencias de OsHV-1 disponibles en la base de datos de GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

VIII. RESULTADOS

1. Detección de OsHV-1

- **Identificación de OsHV-1 en muestras colectadas en BCS, México**
 - **Análisis retrospectivo**

En la tabla XI se pueden observar el total de muestras que se localizaron en los archivos del laboratorio de biología molecular del CIBNOR, mismas que fueron analizadas con la técnica de PCR por punto final.

Tabla XI. Análisis retrospectivo de OsHV-1 en muestras de BCS, México.

Especie/ año	2010	2011	2012	Total	Total (+)
<i>Crassostrea gigas</i>	20	229	75	324	8
<i>Nodipecten subnodosus</i>	15	15	9	39	7
Total de muestras	35	244	84	363	
Total (+)	2	5	8	15	15

La detección del virus en estas muestras se realizó mediante la PCR de punto final con los primers C9/C10.

Adicionalmente se revisaron cortes histológicos de muestras sospechosas a OsHV-1. En una de las muestras de *N. subnodosus* se encontró leve infiltración hemocitaria en branquias, necrosis (Figura 13.A), núcleos hipertrofiados con la cromatina marginada hacia la periferia y en algunas células se observaron cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos (tipo A Cowdry) (Figura 13.B). La presencia del virus en el tejido se confirmó con hibridación *in situ* (Figura 14); además a partir del bloque de parafina se tomaron muestras para observar ultraestructuralmente las partículas virales en tejidos de *N. subnodosus* y *C. gigas* (esto últimos previamente identificados) (Figura 15).

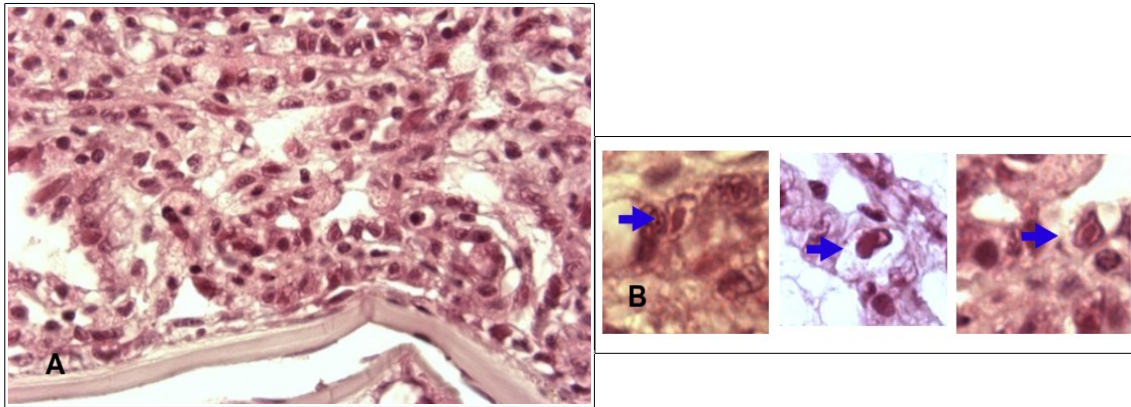


Figura 13. Histología branquias *N. subnodosus* H&E 100X. **A** branquias de *N. subnodosus* que exhiben moderada infiltración por hemocitos, además algunas células epiteliales presentan moderada degeneración vacuolar y núcleos picnóticos. **B** Acercamiento de las células epiteliales que presentan inclusiones intranucleares eosinofílicas, con marginación de la cromatina (flechas azules).

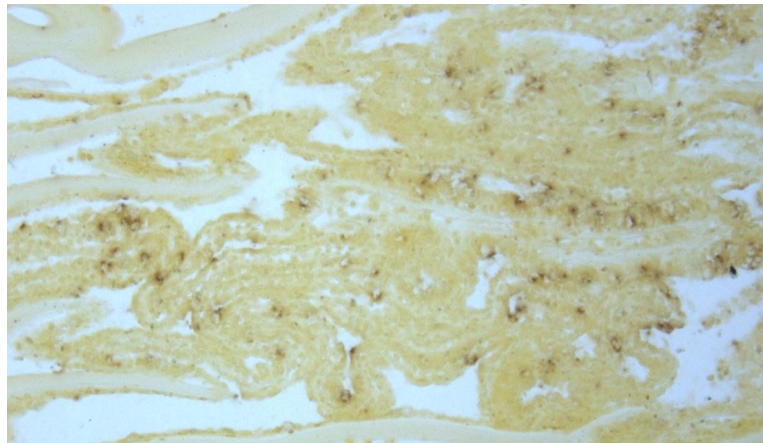


Figura 14. Hibridación *in situ* OshV-1 en branquias de *N. subnodosus*. Sonda marcada con Dig DNA labeling and detection kit Roche Diagnostics. 10X.

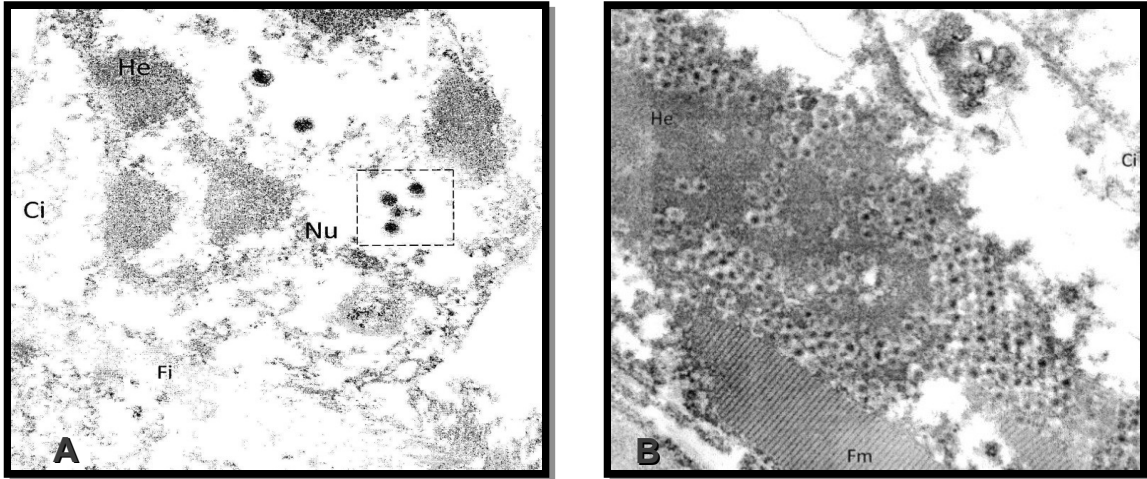


Figura 15. Fotomicrografías de Microscopía Electrónica de Transmisión Branquias *N. subnodosus*. Técnica de contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo. **A** Célula de *C. gigas* que exhibe partículas virales consistentes con OsHV-1 recuadro punteado, también se observa la Heterocromatina (He) condensada en cúmulos. Aumento 30 000 X. **B.** Célula de Branquia de *N. subnodosus* que entre la Heterocromatina (He) muestra numerosas partículas virales electrodensas con diferentes intensidades, rodeadas por un halo electrolúcido. Citoplasma (Ci) y Fibras musculares (Fm)

○ **Monitoreo de granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos**

El principal sitio del cual se obtuvieron muestras fue de una granja localizada en Bahía Tortugas en el Pacífico en Baja California Sur, México (Tabla XII)

Tabla XII. Resumen monitoreo en granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos

Mes	# muestras	Especie	Sitio	Etapa	Resultado
2012					
Abril	180	<i>C. gigas</i>	B. Tortugas	Semillas	-
Mayo	210	<i>C. gigas</i>	B. Tortugas	Semillas y adultos	-
Junio	60+35 = 95	<i>C. gigas/ N. subnodosus</i>	B. Tortugas	Ostrilla/Ostión comercial/ Almeja chica, mediana y grande	-
Agosto	180	<i>C. gigas</i>	B. Tortugas	Ostrillas	-
Septiembre	235	<i>C. gigas</i>	B. Tortugas	Ostrillas y adultos	-
Octubre	12	<i>N. subnodosus</i>	B. Tortugas	Almeja chica	+ (3)
2013					
Enero	44	<i>N. subnodosus</i>	Ojo de liebre	Adultos	-
Total	956				3

La detección del virus en estas muestras se realizó mediante la técnica de PCR de punto final con los primers C9/C10. Excepto para las muestras de *N. subnodosus* Enero de 2013 ya que esas se analizaron en Francia con qPCR con los primers DPF/DPR.

En la tabla XIII se resume el total de muestras recolectadas en BCS, México, el cual es la suma del estudio retrospectivo, monitoreo de granjas y puntos de extracción de moluscos bivalvos. En total de analizaron 1309 muestras, donde 89.3% fueron de *C. gigas* (1169) y 10.69% (140) de *N. subnodosus*. Con la técnica de PCR convencional con los primers C9/C10, donde el 1.37% (18) fueron positivas. Las muestras analizadas correspondieron de 2010 a 2013,

Tabla XIII. Total de muestras positivas a OsHV-1 colectadas en BCS, México

Especie/Año	2010	2011	2012	2013	Total
<i>C. gigas</i>	0/20	0/229	8/920	-	8/1169
<i>N. subnodosus</i>	2/15	5/15	3/66	0/44	10/140
Total	2/35	5/244	11/986	0/44	18/1309

- **Identificación de OsHV-1 en diferentes episodios de mortalidad en cultivos de *C. gigas* localizados en Francia durante 2011 y 2012**

- **Muestras de *Crassostrea gigas***

Un total de 43 muestras fueron seleccionadas para el análisis por PCR con tres diferentes pares de primers (C2/C6, IA2/IA1 y Del F2/R). Las muestras colectadas antes y después de los brotes de mortalidad presentaron una baja cantidad de copias virales/ ng de ADN, por tal motivo el número de muestras analizadas para estos periodos fue reducido. En las tablas XIV y XV se describen los sitios y episodios de muestreo para el 2011 y 2012.

Tabla XIV. Muestras de 2011, positivas por qPCR seleccionadas para la ronda de PCR de punto final

Episodio	Sitio de muestreo	No. de muestras	No. de copias virales/ ng ADN
Antes	D'agnas	2	1.5e+01
Durante	Brest	3	5.16e+05
	D'agnas	9	1.24e+0.1 a 1.31e+05
Después	Brest	2	5.48e+01
	D'agnas	2	2.80e+01
Total de muestras		18	

Tabla XV. Muestras de 2012, positivas por qPCR seleccionadas para la ronda de PCR de punto final

Episodio	Sitio de muestreo	No. de muestras	No. de copias virales/ ng de ADN
Antes	D'agnas	1	NQ
	Thau	3	NQ
Durante	D'agnas	6	1.6e+02 a 5e+07
	Brest	5	3.28e+03 a 6e+07
	Thau	6	3.38e+03 a 1.81e05
Total de muestras		20	

○ **Muestras de agua de mar, sedimento y otras especies marinas (Crustáceos, Balanos y Mejillones) durante el 2012**

La carga viral de OsHV-1 en muestras alternativas y especies marinas no reportadas como hospederas fue baja, ya que el rango se encontró entre 1.008e+001 a 2.25e+02 copias virales/ ng de ADN. Cabe destacar que algunas muestras se encontraron en el límite de la detección, debido a que su Ct fue elevado en comparación con los valores de la curva estandar (Crustáceo A2), pero la temperatura de disociación (Tm) se encontró entre 77.2 ±0.4 °C. La especie con mayor prevalencia en la detección de OsHV-1 fueron los Crustáceos (*Sphaeroma* sp) 13.72% (7/51), seguido de los Mejillones (*Mytilus edulis*) 13.33% (6/45). La presencia de OsHV-1 con respecto al episodio de mortalidad fue, antes 18.96% (11/58), durante 8.82% (3/34) y después 8.16% (4/49) Tablas XVI y XVII.

Tabla XVI. Muestras no hospederas y alternativas positivas a OsHV-1. Bahía D'agnas

Especie	Episodio	Id	Ct	No. de copias virales/ ng de ADN
Crustáceos (<i>Sphaeroma</i> sp)	Durante (19/07/12)	Ag7	35.63	1.65e+02
		Ag9	33.58	2.25e+02

Tabla XVII. Muestras no hospedadas y alternativas positivas a OsHV-1. Bahía Thau

Especie (+/total)	Episodio	#	Id	Ct	No. de copias virales/ ng de ADN
Mejillones <i>Mytilus edulis</i> (6/45)	Antes	1	M26	34.44	1.340e+001
		2	M27	32.50	5.435e+001
		3	M33	34.05	1.779e+001
		4	M41	33.85	2.048e+001
	Después	5	M11	34.83	1.008e+001
		6	M13	32.19	6.783e+001
Crustáceos <i>Sphaeroma</i> sp (6/51)	Antes	1	A1	36.15	2.25e+01
		2	A2	37	1.28e+01
		3	A5	35.92	2.63e+01
		4	A7	34.73	5.84e+01
		5	A15	34.87	5.32e+01
		6	A31	35.95	2.58e+01
Balanos <i>Balanus</i> sp (1/27)	Durante	1	B24	38.25	9.21
Agua de mar (2/4)	Antes	1	Sw4	35.49	7.49e+01
	Después	2	Sw1	36.01	5.56e+01

2. Análisis de la variación genética de OsHV-1

- **Amplificación de regiones variables**

Análisis de la variación genética de OsHV-1 en muestras positivas de BCS México

A las muestras colectadas en BCS, México (18) se les realizó qPCR con los primers DPF/DPR. El rango en el cual se encontró el Ct del control positivo fluctuó entre 23.24 y 35.93, donde las muestras de *N. subnodosus* sobrepasaron el límite de detección (34) (protocolo de detección y cuantificación de OsHV-1 por qPCR, establecido por el IFREMER); pero al realizar la PCR convencional fueron positivas para IA2/IA1 y Del 35,-36,-37,-38. Por otra parte solo una muestra de *N. subnododus* (Mx08) y cuatro muestras de *C. gigas* (Mx51, Mx53, Mx54 y Mx55) fueron positivas con los primers C2/C6; mientras que ninguna muestra de *N. subnodosus* amplificó para la región C9/C10 (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Amplificaciones de regiones variables de OsHV-1 en muestras de BCS, México

#	Id	Sitio	Fecha	Especie	qPCR		PCR convencional			
					Ct	Copias virales/ ng de ADN	C9/C10 197 pb	C2/C6 709 pb	IA2/IA1 607 pb	Del 35,-36,-37,-38 984, 384, NA
1	Mx03				38.07	2.10	-	-	+	384
2	Mx08	Lot 1	Nov-12		37.81	2.56	-	+	+	384
3	Mx11				36.26	8.29	-	-	+	384
4	Mx21				38.68	1.32	-	-	+	384
5	Mx22			<i>Nodipecten subnodosus</i>	38.68	1.32	-	-	+	384
6	Mx23	Lot 2	Agos-11		37.18	4.14	-	-	+	384
7	Mx25				38.96	1.07	-	-	+	384
8	Mx26				38.06	2.11	-	-	+	384
9	Mx39	Lot 4	Jun-10		No Ct	NQ	-	-	+	384
10	Mx40				39.90	5.245e-001	-	-	+	384
11	Mx49				26.08	1.024e+004	+	-	+	384
12	Mx50				16.68	9.22e+006	+	-	+	384
13	Mx51				21.84	2.195e+005	+	+	+	384
14	Mx52	Lot 5	2012	<i>Crasostera gigas</i>	29.54	8.316e+002	+	-	+	384
15	Mx53				16.03	1.473e+007	+	+	+	384
16	Mx54				35.65	1.002e+001	+	+	+	384
17	Mx55				34.10	3.074e+001	+	+	+	384
18	Mx57				30.32	4.750e+002	+	-	+	384

Análisis de la variación genética de OsHV-1 en muestras recolectadas en cultivos intensivos de *C. gigas* antes, durante y después de episodios de mortalidad en Francia

En las tablas XIX y XX se resumen los resultados de las amplificaciones obtenidas de las muestras de *C. gigas* recolectadas en tres sitios de Francia antes, durante y después de brotes de mortalidad. Es importante señalar que en algunas muestras positivas por qPCR para el ORF100 (DPF/DPR), no se lograron obtener amplificaciones por PCR convencional con ningún par de primers (muestras 12, 16, 17 de 2011 y 1, 2,3,6 y 19 de 2012). En las muestras 9, 11,14, 16 de 2011 (tabla 19) y 16, 18 de 2012 (tabla 20) de la región ORF 4 con los primers C2/C6 no se logró obtener amplificación del producto esperado, mientras que para regiones ORF 35,-36,-37,-38 y ORF 42-43 fueron consistentes es sus amplificaciones.

Tabla XIX. Amplificación de regiones variables de OsHV-1 en muestras de *C. gigas* recolectadas en 2011

Muestra	ORF blanco			Episodio
	ORF4 (C2-C6)	ORF 35,36,37,38 (Del 36,37)	ORF 42-43 (IA2-IA1)	
1	+	+	+	Antes
2	+	+	+	
3	+	+	+	Durante
4	+	+	+	
5	+	+	+	
6	+	+	+	
7	+	+	+	
8	+	+	+	
9	-	+	+	
10	+	+	+	
11	-	+	+	
12	NA	NA	NA	
13	+	+	+	
14	-	+	+	Después
15	-	+	+	
16	NA	NA	NA	
17	NA	NA	NA	
18	+	+	+	

(+) Positivo, (-) Negativo y NA No Amplificación

Tabla XX. Amplificación de regiones variables de OsHV-1 en muestras de *C. gigas* recolectadas en 2012

Muestra	ORF blanco			Episodio
	ORF4 (C2-C6)	ORF 35,36,37,38 (Del 36,37)	ORF 42-43 (IA2-IA1)	
1	NA	NA	NA	Antes
2	NA	NA	NA	
3	NA	NA	NA	
4	+	+	+	Durante
5	+	+	+	
6	NA	NA	NA	
7	+	+	+	
8	+	+	+	
9	+	+	+	
10	+	+	+	
11	+	+	+	
12	+	+	+	
13	+	+	+	
14	+	+	+	
15	+	+	+	
16	-	+	+	
17	+	+	+	
18	-	+	+	
19	NA	NA	NA	

(+) Positivo, (-) Negative y NA No Amplificación

Comparación de la región microsatélite del ORF 4 de las secuencias de OsHV-1 obtenidas de *N. subnodosus* y *C. gigas* recolectadas en BCS, México las que se comparan con OsHV-1 La Cruz Sonora, México (JF894308), donde se observó un 97% y 100% de similitud respectivamente. La principal diferencia radicó en un delección de 21 pb presente en la muestra de *N. subnodosus*.

La Cruz Sonora <i>C. gigas</i> BCS <i>N. subnodosus</i> BCS	ATTTAAA-CCCCGGGGAAAAAG-TATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACC ATTTAAA-CCCCGGGGAAAAAG-TATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACC ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAGTATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACC *****
La Cruz Sonora <i>C. gigas</i> BCS <i>N. subnodosus</i> BCS	CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT *****
La Cruz Sonora <i>C. gigas</i> BCS <i>N. subnodosus</i> BCS	<u>ACTACTACTACTACTACTACTACT</u> GAAAAAATGCAGCCTTTTACAGAATTTTGCACCTTG <u>ACTACTACTACTACTACTACTACT</u> GAAAAAATGCAGCCTTTTACAGAATTTTGCACCTTG AC-----TGAAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTG **
La Cruz Sonora <i>C. gigas</i> BCS <i>N. subnodosus</i> BCS	ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGC ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGC ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGATGAGGTTAACATGC *****
La Cruz Sonora <i>C. gigas</i> BCS <i>N. subnodosus</i> BCS	GACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT GACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT GACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT *****

Comparación entre de la región microsatélite del ORF de las secuencias de OsHV-1 obtenidas de *N. subnodosus* y *C. gigas* colectadas en BCS, México con respecto al OsHV-1 de referencia (AY509253), cuya similitud fue de 96% y 98%, respectivamente. Donde en las muestras de *C. gigas* se encontró un adición de 21pb, mientras que la muestra de *N. subnodosus* presentó una delección de 9pb.

```

OsHV-1 referencia      ATTTAAA-CCCCGGGGAAAAAG-TATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACC
C. gigas BCS          ATTTAAA-CCCCGGGGAAAAAG-TATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACC
N. subnodosus BCS     ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAGTATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACC
*****
OsHV-1 referencia      CACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
C. gigas BCS          CACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
N. subnodosus BCS     CACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
*****
OsHV-1 referencia      ACTACTACTACT-----GAAAAAATGCAGCCTTTACAGAATTTTGACCTTG
C. gigas BCS          ACTACTACTACTACTACTACTACTGAAAAAATGCAGCCTTTACAGAATTTTGACCTTG
N. subnodosus BCS     ACT-----GAAAAAATGCAGCCTTTACAGAATTTTGACCTTG
***
OsHV-1 referencia      ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGC
C. gigas BCS          ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGC
N. subnodosus BCS     ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGATGAGGTTAACATGC
*****
OsHV-1 referencia      GACATTTGTAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT
C. gigas BCS          GACATTTGTAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT
N. subnodosus BCS     GACATTTGTAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT
*****
OsHV-1 referencia      GCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGAC
C. gigas BCS          GCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGAC
N. subnodosus BCS     GCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGAC
*****

```

Comparación entre de la región microsatélite del ORF de las secuencias de OsHV-1 obtenidas de *N. subnodosus* y *C. gigas* colectadas en BCS, México con respecto al OsHV-1 μ Var (HQ842610), cuya similitud fue de 97% y 95%, respectivamente. Donde las muestras de *C. gigas* presentan una adición de 25pb, mientras que la muestra de *N. subnodosus* presentó una adición de 4pb.

```

OsH-1  $\mu$ Var      ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTA-TAATAGGCGCGATTGTGTCAGTTTAGAATCATACC
C. gigas BCS    ATTTAAA-CCCCGGGGAAAAAGTAT-AAATAGGCGCGATTGTGTCAGTTTAGAATCATACC
N. subnodosus BCS ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGATTGTGTCAGTTTAGAATCATACC
*****
OsH-1  $\mu$ Var      CACAC--TCAATCTCGAGTATACCACAAGTCT- AATTAACAGCATCTACTACTACTACT
C. gigas BCS    CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
N. subnodosus BCS CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
*****
OsH-1 $\mu$ Var      G-----AAAAAAAAATGCAGCCTTTACACAGAATTTTGCACCTTG
C. gigas BCS    ACTACTACTACTACTACTACTGAAAAAATGCAGCCTTTACACAGAATTTTGCACCTTG
N. subnodosus BCS ACTG-----AAAAAAAAATGCAGCCTTTACACAGAATTTTGCACCTTG
*****
OsH-1  $\mu$ Var      ACCAAAG-CATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGC
C. gigas BCS    ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGC
N. subnodosus BCS ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGATGAGGTTAACATGC
*****
OsH-1  $\mu$ Var      GACATTTGTAAAG-GCTCGTCTCTTTCAATTGCAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT
C. gigas BCS    GACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT
N. subnodosus BCS GACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCT
*****
OsH-1  $\mu$ Var      GCAGTCAGATCTGACATACC-ATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGAC
C. gigas BCS    GCAGTCAGATCTGACATACCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGAC
N. subnodosus BCS GCAGTCAGATCTGACATACCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGAC
*****

```

Las principales diferencias encontradas en esta región microsatélite se encuentran marcadas en rojo.

Análisis de la región ORF 42-43

En las 18 muestras positivas a OsHV-1 de BCS, México se logró amplificar esta región y al comparar la secuencia obtenida entre estas, presentaron 100% de similitud (Anexo 2B). Por otra parte al realizar la comparación con OsHV-1 de referencia (AY509253) de igual forma se encontró un 100% de similitud.

OsHV-1 BCS	<u>AATCCCATGTTTCTTGCTG</u> TAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTTGTA	60
OsHV-1 Referencia	<u>AATCCCATGTTTCTTGCTG</u> TAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTTGTA	60

OsHV-1 BCS	AAGCTTTTATATATCTTCAAATCCGGAAGTGTTTTAAACAACAAGATTACAAAAAATATC	120
OsHV-1 Referencia	AAGCTTTTATATATCTTCAAATCCGGAAGTGTTTTAAACAACAAGATTACAAAAAATATC	120

OsHV-1 BCS	AACGGCAATGTCTAATTTGTTTCATTCCCGATCTACCAAACGTGCAGTCTACGACGGCCC	180
OsHV-1 Referencia	AACGGCAATGTCTAATTTGTTTCATTCCCGATCTACCAAACGTGCAGTCTACGACGGCCC	180

OsHV-1 BCS	TTTGCCAATGGTAGGCTCTCCCTGCCCCAATAGAAATAAACAGCAAAGGTGATAAATC	240
OsHV-1 Referencia	TTTGCCAATGGTAGGCTCTCCCTGCCCCAATAGAAATAAACAGCAAAGGTGATAAATC	240

OsHV-1 BCS	GGTAGTTTATCTCAGGGGTGATGATCAACCAATTGATGTTAACAGGGAACATAGAAGGGT	300
OsHV-1 Referencia	GGTAGTTTATCTCAGGGGTGATGATCAACCAATTGATGTTAACAGGGAACATAGAAGGGT	300
	***** **	
OsHV-1 BCS	AAAAGTTACGTATAATGAATACGATGAGCAAGAAACGATCAAGGTTATTTCTCGACAA	360
OsHV-1 Referencia	AAAAGTTACGTATAATGAATACGATGAGCAAGAAACGATCAAGGTTATTTCTCGACAA	360

OsHV-1 BCS	GAAAGCAACAATAAAAAGATCTACATAACCTAATGAGTGTGGTAGGGATCTTACAACGGG	420
OsHV-1 Referencia	GAAAGCAACAATAAAAAGATCTACATAACCTAATGAGTGTGGTAGGGATCTTACAACGGG	420

OsHV-1 BCS	TGTCTGCAATATAGAAGTACAACCGGAATATGGATTCACACTGAGGATACCAGACCCAGA	480
OsHV-1 Referencia	TGTCTGCAATATAGAAGTACAACCGGAATATGGATTCACACTGAGGATACCAGACCCAGA	480

OsHV-1 BCS	CAAGTTGAAATATAAAAAGTATAGATGCAGTCTATAGACTCTTCGCTTCAAATACGA	540
OsHV-1 Referencia	CAAGTTGAAATATAAAAAGTATAGATGCAGTCTATAGACTCTTCGCTTCAAATACGA	540

OsHV-1 BCS	CAATAGCGATCTATTGAAAGGCATCAGAGTCATTAGCGTTTCAAAT <u>AACITTTGGATGAACCGC</u>	607
OsHV-1 Referencia	CAATAGCGATCTATTGAAAGGCATCAGAGTCATTAGCGTTTCAAAT <u>AACITTTGGATGAACCGC</u>	607

La secuencia de los primers se encuentran en rojo subrayados y en cursivas

Análisis de la región ORF 35,-36,-37,-38

Las 18 muestras positivas a OsHV-1 colectadas en BCS arrojaron el productos de 384pb, donde la similitud entre estas fue de 100% (Enexo 2C). Al realizar la comparación con otras aislados la similitud fue de 100% con el OsHV-1 Nueva Zelanda (JN800252.1).

```

OsHV-1_BCS      CGATGCGTCGGTAGAGCCAATAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCTCTGC 60
OsHV-1_Nueva   CGATGCGTCGGTAGAGCCAATAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCTCTGC 60
*****

OsHV-1_BCS      CCGTGTCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCTTGGGACCTCTGAT 120
OsHV-1_Nueva   CCGTGTCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCTTGGGACCTCTGAT 120
*****

OsHV-1_BCS      TGGTAGTGAATCAAATGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTAGCTT 180
OsHV-1_Nueva   TGGTAGTGAATCAAATGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTAGCTT 180
*****

OsHV-1_BCS      CAGTTTAAGATTGTTTCTCTTCCACGCTGTTTCTAATGGGAGCCATGGTGATGAATGA 240
OsHV-1_Nueva   CAGTTTAAGATTGTTTCTCTTCCACGCTGTTTCTAATGGGAGCCATGGTGATGAATGA 240
*****

OsHV-1_BCS      AGTTGAAAGACGAAAATCAACAAAATATATACTATCTTTTTGGCATTGATGATTACGCTT 300
OsHV-1_Nueva   AGTTGAAAGACGAAAATCAACAAAATATATACTATCTTTTTGGCATTGATGATTACGCTT 300
*****

OsHV-1_BCS      TTGAGTATCGTCCACAAGTACCTTGATGTGGTATATCTCCCAATGGATATTCCGTG 360
OsHV-1_Nueva   TTGAGTATCGTCCACAAGTACCTTGATGTGGTATATCTCCCAATGGATATTCCGTG 360
*****

OsHV-1_BCS      TTTACAGGAATGGGGTTCTC 381
OsHV-1_Nueva   TTTACAGGAATGGGGTTCTC 381
*****

```

La secuencia de los primers se encuentran en rojo subrayados y en cursivas

En la tabla XXI se muestran los porcentajes de similitud obtenidos de la comparación de las secuencias con los diferentes aislados de OsHV-1, donde se presentó un mayor porcentaje para cada uno de los ORFs analizados obtenidos de las muestras positivas a OsHV-1 de las dos especies de moluscos bivalvos colectados en BCS, México.

Tabla XXI. Porcentajes de similitud muestras BCS, México

Especie	ORF4			ORF 42-43	ORF 35,-36,-37,-38	
	OsHV-1La Cruz Sonora, México (JF894308)	OsHV-1 referencia (AY509253)	OsHV-1 µVar (HQ842610)	OsHV-1 referencia (AY509253)	OsHV-1 Nueva Zelanda (JN800252.1)	
<i>N. subnodosus</i>	97%	96%	97%	100%	100%	
<i>C. gigas</i>	100%	98%	95%	100%	100%	

Muestras de Francia

No resulto posible obtener productos de amplificaciones por PCR para secuenciación parcial en el caso de las muestras de especies alternativas, agua de mar y sedimento. Por lo tanto el análisis incluyó únicamente las muestras de *C. gigas* recolectadas antes, durante y después de eventos de mortalidad.

Análisis de la región ORF 4

Se analizaron 33 secuencias obtenidas de *C. gigas* para el ORF4 de OsHV-1, donde 32 de 33 presentaron 100% (Anexo 2D y 2E) de identidad con respecto a OsHV-1 μ Var Francia 2010 (JQ959597.1), mientras que solo una muestra 11-13 presentó 99% de identidad para este aislado. Las diferencias se muestran más adelante.

Análisis de le región ORF 42-43

Las 29 secuencias obtenidas para esta región presentaron 100% de identidad entre ellas y el mismo porcentaje de similitud con respecto a OsHV-1 μ Var Francia 2010 (JQ959597.1)

Análisis de la región ORF 35,-36,-37,-38

La secuencia obtenida para esta región presentó un tamaño de 384 pb, el cual fue 100% similar entre las 29 secuencias analizadas durante los diferentes episodios de mortalidad durante 2011 y 2012. Por otra parte la similitud fue del 100% con respecto al aislado de OsHV-1 μ Var Francia 2010 (JQ959597.1).

Tabla XXII. Porcentajes de similitud muestras de Francia

Especie	ORF4	ORF 42-43	ORF 35,-36,-37,-38
	OsHV-1 μ Var Francia 2010 (JQ959597.1)	OsHV-1 μ Var Francia 2010 (JQ959597.1)	OsHV-1 μ Var Francia 2010 (JQ959597.1)
<i>C. gigas</i>	100%*	100%	100%

* una muestra presentó 99% de identidad con respecto a esta secuencia

3. Análisis de la diversidad genética

- Entre las diferentes especies de moluscos bivalvos

El OsHV-1 descrito en este trabajo se encontró en dos especies de moluscos bivalvos, *N. subnodosus* y *C. gigas*, este último colectado en dos sitios, el primero en BCS, México y el segundo en Francia durante 2011 y 2012, donde para este último la similitud fue entre 99 y 100 % con respecto al OsHV-1 μ Var (JQ959597.1). A continuación se muestran las principales diferencias encontradas en el ORF4 con respecto a cada especie.

```

OsH-1 Francia 2011 ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTA-TAATAGGCGCGATTGTCAGTTTAGAATCATACC
OsH-1 Francia 2012 ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTA-TAATAGGCGCGATTGTCAGTTTAGAATCATACC
C. gigas BCS ATTTAAA-CCCCGGGGAAAAAGTAT-AAATAGGCGCGATTGTCAGTTTAGAATCATACC
N. subnodosus BCS ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGATTGTCAGTTTAGAATCATACC
***** *****. : :*****

OsH-1 Francia 2011 CACAC-TCAATCTCGAGTATACCACAAGTCT-AATTAACAGCATCTACTACTACTACT
OsH-1 Francia 2012 CACAC-TCAATCTCGAGTATACCACAAGTCT-AATTAACAGCATCTACTACTACTACT
C. gigas BCS CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
N. subnodosus BCS CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAAGTCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT
***** *****

OsH-1 Francia 2011 G-----AAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTG
OsH-1 Francia 2012 G-----AAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTG
C. gigas BCS ACTACTACTACTACTACTACTACTACTACTGAAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTG
N. subnodosus BCS ACTG-----AAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTG

```

Cabe resaltar que la mayor diferencia se localizó en la región microsatelite, donde las muestras de OsHV-1 colectadas en *C. gigas* BCS, México presentaron una inserción de 12 pb; por otra parte, la muestras de OsHV-1 de *N. subnodosus* presentaron una deleción de 4 pb.

- Durante los episodios de mortalidad antes, durante y después de los brotes de mortalidad (Solo para las muestras de Francia)

No existieron diferencias entre las 32 de 33 secuencias analizadas para el ORF4, 11 de 2011 y 12 de 2012. Estas presentaron 100% de identidad entre ellas; excepto la muestra 13 de 2011 (11-13) que fue colectada durante el brote de mortalidad; y presentó un 99% de identidad con respecto a las otras. Las diferencias radicaron en una adición de Guanina en la posición 269 y cuatro sustituciones, A-G (329), T-C (453), G-A (628) y A-C(656).

4. Análisis filogenético OsHV-1 *C. gigas*

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con los tres modelos utilizados arrojaron las mismas topologías Análisis de verosimilitud (Figura 17), Análisis de vecinos más cercanos (Figura 18) y Análisis de máxima parsimonia (Figura 19). Las secuencias se agruparon en dos clados, donde los soportes de los bootstraps se comportaron de la misma forma. En el primero (A) se agruparon las muestras relacionadas con OsHV-1 μ Var (HQ842610), donde se localizan las muestras de Francia colectadas durante 2011 y 2012. El segundo clado (B) presentó al OsHV-1 de referencia (AY509253) y cercano a este se encontraron las muestras colectadas en BCS y Sonora México junto con la secuencia de USA California (JN800128); pero con diferentes soportes de porcentajes para los bootstraps de las secuencias del ORF4 de OsHV-1 obtenidas a partir de *C. gigas*. Cabe mencionar que los valores obtenidos se encontraron por arriba de 65%, por tal motivo son considerados como significativos.

Figura 17. Árbol filogenético OsHV-1 análisis de verosimilitud muestras de *C. gigas*

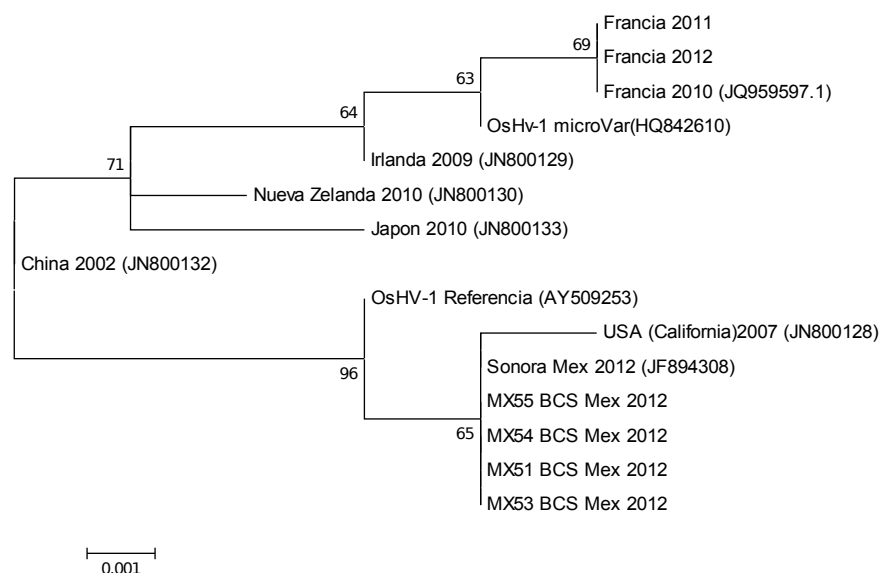


Figura 18. Árbol filogenético OsHV-1 vecinos más cercanos muestras de *C. gigas*

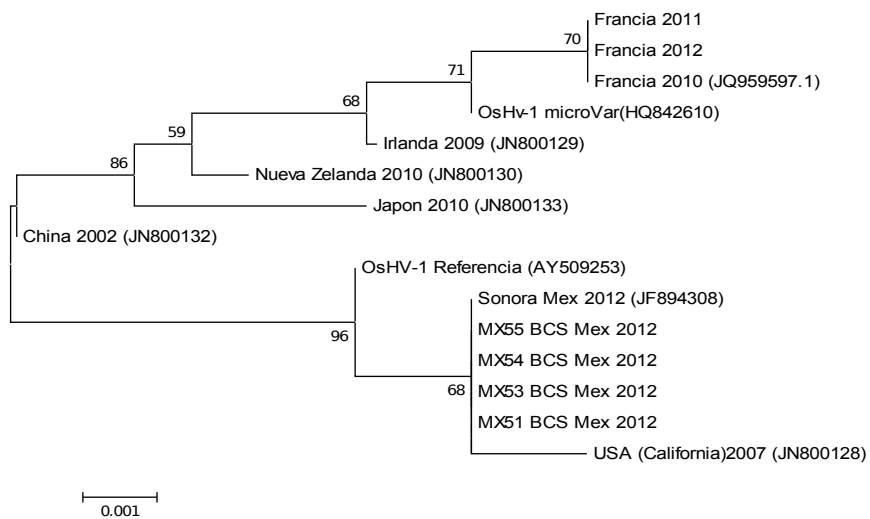
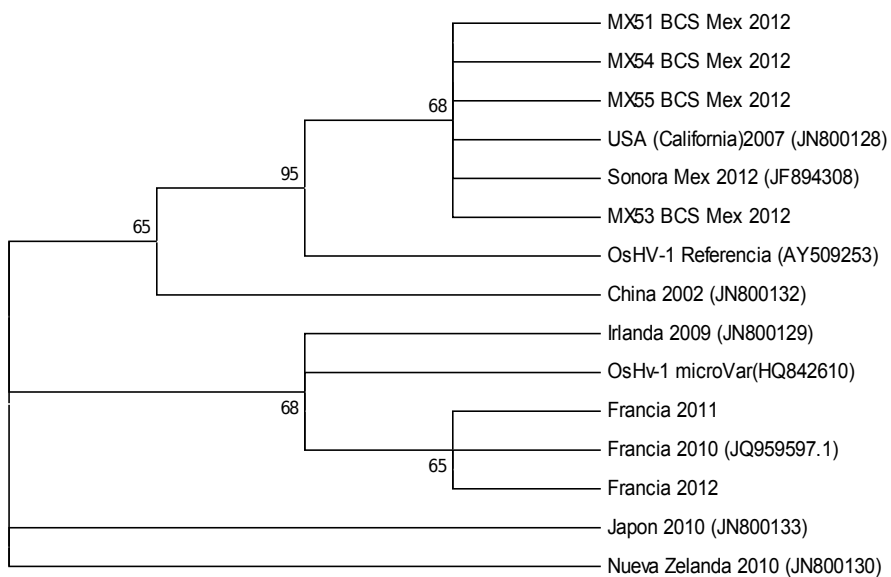


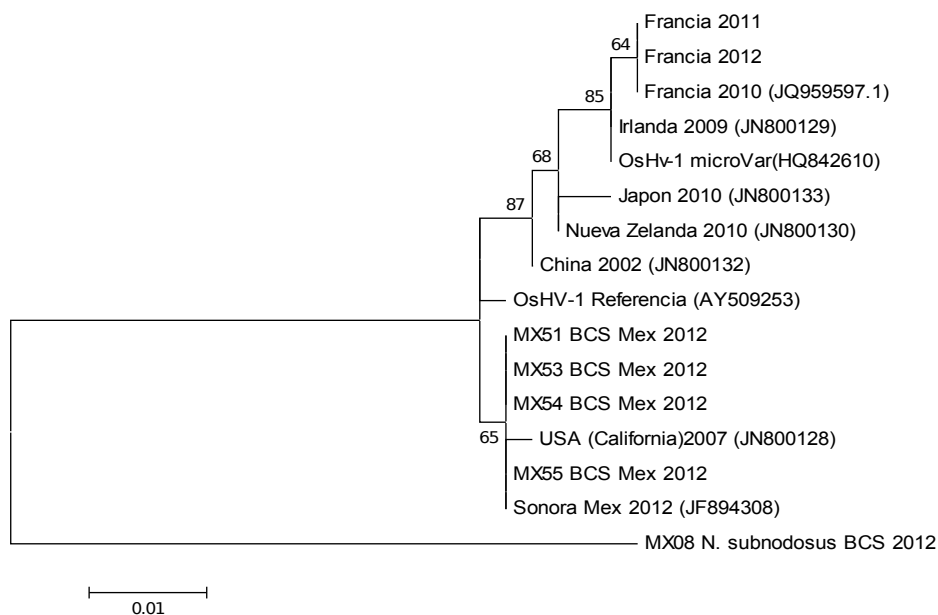
Figura 19. Árbol filogenético OsHV-1 máxima parsimonia muestras de *C. gigas*



Análisis filogenético entre las diferentes muestras positivas a OsHV-1 de *C. gigas* y *N. subnodosus*

Adicionalmente se realizó la reconstrucción filogenética, pero añadiendo la muestra de *N. subnodosus* y utilizando los tres métodos anteriormente descritos pero los valores obtenidos así como la topología se comportó de la misma forma, por tal motivo, solo se presenta un método el cual es de máxima verosimilitud (Figura 20). La topología obtenida es similar a las descritas anteriormente, pero se añade un tercer clado donde se localiza de manera aislada la secuencia de OsHV-1 obtenida en *N. subnodosus*.

Figura 20. Árbol filogenético OsHV-1 máxima verosimilitud muestras de *C. gigas* y *N. subnodosus*



IX. DISCUSIÓN

La aparición de nuevas y letales enfermedades tanto en animales domésticos, silvestres y en la población humana, es quizás el resultado de la creciente y constante expansión del ser humano en la tierra, fenómeno conocido como “*invasión antropogénica*” (Daszak & Cunningham, 2000). Con este movimiento se introducen de manera consciente o inconscientemente nuevas especies a ciertos ecosistemas, mismas que llevan inherentemente el desplazamiento de su carga parasitaria, viral y/o microbiana (Daszak & Cunningham, 2000), hecho que favorece la aparición de nuevas, letales e incontrolables enfermedades infecciosas e infecto-contagiosas (Power & Mitchell, 2004).

En los sistemas de producción acuícola las enfermedades infecciosas pueden ser introducidas a los cuerpos de agua (aguas marinas, estuarios, ríos, etc.), a través de la descarga de aguas contaminadas tratadas y no tratadas (Rao & Melnick, 1986). También pueden llegar a los diferentes sitios mediante la introducción de especies vivas no endémicas, para el caso específico de las enfermedades presentes en moluscos bivalvos el “*biofouling*” (moluscos unidos al casco de los barcos) juega un papel importante en la dispersión de agentes infecciosos; mientras que en cultivos intensivos, laboratorios de semillas o larvas, el uso de material infectado y/o contaminado puede llegar a ser una fuente de contaminación (International OsHV-1, 2011). En enfermedades virales como el herpesvirus de los ostreidos (OsHV-1), se ha demostrado que la cohabitación (Arzul *et al.*, 2001), es uno de los principales factores para la propagación de la enfermedad, ya sea por la presencia de las partículas virales en el agua (Schikorski *et al.*, 2011) y en el plancton (Paul-Pont *et al.*, 2013); pero se debe tener especial atención en la introducción de organismos portadores asintomáticos de la enfermedad, ya que estos tienen la capacidad de diseminar la infección a

otros moluscos bivalvos (Arzul *et al.*, 2002). Además, es muy importante considerar este punto, ya que una de las principales características de los Herpesvirus es el estado de latencia (Roizman y Sears, 1990) y la introducción o desplazamiento no controlado de estos organismos portadores latentes, puede desencadenar severos problemas en sitios donde no se encontraba la enfermedad o a especies susceptibles a la infección por OsHV-1.

Se pueden considerar a los Herpesvirus como estrategias de selección *K*, ya que dentro de su ciclo de replicación, tienden a producir cargas virales bajas y sus tiempos generacionales son largos; ya que tienen la capacidad de establecer una estrecha relación con su hospedero mediante un verdadero periodo de latencia, facultad que les permite vivir por largos periodos dentro de las células que infectan (Borderia & Elena, 2002; Weinbauer, 2004; Wichman *et al.*, 2005). Pero probablemente el OsHV-1, como respuesta al medio ambiente, desencadenado primordialmente por la contaminación, cambios radicales físico-químicos, cultivos intensivos más la selección genética, lo han llevado a utilizar la estrategia *r*, donde produce un gran número de partículas virales y sus ciclos son muy cortos (Suttle, 2007). Es quizás esta característica, la explicación de los eventos de mortalidad estacionales presentes en los cultivos de moluscos bivalvos en todo el mundo, mismos que se han descrito y asociado a la presencia de virus tipo herpes o en los casos confirmados mediante métodos moleculares a OsHV-1, que se han presentado desde 1972 (Farley *et al.*, 1972; Hine *et al.*, 1992; Comps, 1993; Renault *et al.*, 1994; Hine & Thorne, 1997; Comps *et al.*, 1999; Renault *et al.*, 2001; Arzul *et al.*, 2001; Vasquez-Yeomans, 2004; Chang *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2008; Segarra *et al.*, 2010;).

“El éxito en la replicación de los virus en su hospedero es el resultado un proceso complejo el cual consiste en numerosas interacciones, la mayoría de ellas relacionadas a la coevolución de los patógenos y huéspedes. Esta coevolución en

ocasiones conduce a las especies hacia la especificidad y hace que la transmisión interespecies sea difícil. Por lo tanto, el cambio en la gama de hospederos naturales es un evento raro. Sin embargo, cuando esto llega a suceder, el resultado puede ser severo ya que los virus se pueden dispersar extensamente hacia hospedador no adaptados y por lo tanto a poblaciones inmunológicamente susceptibles” (Bandín & Dopazo, 2011) ya que nunca habían estado en contacto con el virus.

Con el avance en la biología molecular y en las técnicas de diagnóstico se ha podido detectar la presencia de virus tipo herpes y OsHV-1 en diversas especies de moluscos bivalvos, tales como: *Crassostrea virginica* (Farley et al., 1972), *Ostrea angasi* (Hine et al., 1992), *Ostrea edulis* (Comps, 1993), *Crassostrea gigas* (Renault et al., 1994), *Triostrea chilensis* (Hine et al., 1998), *Ruditapes philippinarum* (Renault et al., 2001), *Pecten maximus* (Arzul et al., 2001) y ahora en este trabajo se reporta en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Lo cual demuestra la habilidad de este virus para infectar a diversas especies de moluscos bivalvos, probablemente a consecuencia de la selección para mantener a estas especies en condiciones intensivas de producción así como por el establecimiento de policultivos, (Arzul et al., 2001b). Es posible que el OsHV-1 se encontrara confinado a una sola especie y que además ambos hayan coevolucionado en condiciones naturales (Arzul et al., 2001a).

Dada la importancia que representan las pérdidas por las mortalidades económicas asociadas a los eventos de mortalidad por OsHV-1 y su creciente dispersión en cultivos intensivos y el medio natural, los métodos de diagnóstico para su detección deben presentar alta sensibilidad y especificidad (Renault et al., 2000). Se han descrito diversos métodos para lograr la identificación, diagnóstico y vigilancia de OsHV-1 tanto en campo como en el laboratorio, por ejemplo:

histología (Hine *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2005) , microscopía electrónica de transmisión (Farley *et al.*, 1972; Renault *et al.*, 1994), hibridación *in situ* (Arzul *et al.*, 2002; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004), inmunohistoquímica (Arzul *et al.*, 2002), PCR convencional (Renault *et al.*, 2000), PCR cuantitativa (Pepin *et al.*, 2008; Martenot *et al.*, 2010) y otros métodos moleculares como el LAMP (loop-mediated isothermal amplification), mismo que se desarrolló para la amplificación de ADN bajo condiciones isotermas y es además un método cualitativo para el diagnóstico (Ren *et al.*, 2010).

La homologación e intercalibración de estos métodos diagnósticos, debe ser un asunto tomado en cuenta por las autoridades, instituciones y centros de investigación involucrados en este tema. La OIE recomienda a los métodos moleculares como los adecuados para la detección e identificación del virus en cualquier etapa del desarrollo, ya sea por PCR convencional o PCR cuantitativa, la detección del virus se debe enfocar en diferentes regiones blanco del ADN de OsHV-1 que sean conservadas y no tengan alta variación genética lo cual ayudará a conocer mas sobre la diversidad del virus (OIE 2013). En años recientes se han utilizado diversos primers para el diagnóstico de OsHV-1 e inclusive Batista *et al.* (2009) realiza una minuciosa revisión sobre las ventajas en el uso de los mismos. Por ejemplo los primers C9-C10 (Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004) fueron diseñados para la región ORF5 que en los herpesvirus se encuentra repetida (Davison *et al.*, 2005). así como los primers DPF-DPR, diseñados para amplificar el ORF100 (Webb *et al.*, 2007), que codifica para la subunidad catalítica de la DNA polimerasa, esencial para la replicación del virus (Davison *et al.*, 2005), Sin embargo se pueden utilizar otras regiones conservadas para el diagnóstico como el ORF99 (B4/B3) que codifica para una proteína BIR y el ORF88 (Gp47Gp7) que codifica para proteínas de membrana tipo I (Arzul *et al.*, 2001). Una región en el OsHV-1 que presentan alto grado de polimorfismo, es el ORF 4 (Renault *et al.*,

2013), y es precisamente este ORF el utilizado para conocer sobre la diversidad del virus, ya sea la variedad de referencia OsHV-1 (AY509253), la variedad OsHV-1 μ Var (HQ842610) que presenta una delección consecutiva de 12 pares de bases (Segarra *et al.*, 2010), o el recientemente descrito OsHV-1 La Cruz, Sonora (JF894308) de México que presenta una adición de 12 pares de bases con respecto a la variedad de referencia (OsHV-1 (AY509253)). En este trabajo se encontró que algunas muestras positivas a OsHV-1 mediante la técnica de qPCR con los primers DPF/DPR, no amplificaron con los primers C2/C6 que tienen como blanco el ORF4; lo cual denota el alto grado de polimorfismo de esta región, tanto en muestras de una misma especie, como es muestras colectadas en un mismo sitio. Estas observaciones se fortalecieron con las muestras analizadas de *C. gigas* provenientes de Francia, en donde muestras colectadas en la misma área geográfica durante el mismo evento de mortalidad no arrojan el fragmento esperado de 709 pb con los primers C2/C6. La imposibilidad de amplificar el ORF 4, se ha observado también al utilizar los primers C1/C6, en muestras de *C. gigas* y *R. philippinarum* infectadas con OsHV-1, este evento se asoció a una delección de 2.8 kpb en el genoma viral (Arzul *et al.*, 2001c). En ese trabajo, una delección o reordenamiento del ORF4 que afecte al sitio de unión de los primers podría explicar que no haya sido posible amplificar por PCR esta región. Un hecho semejante se presentó en este trabajo, con las muestras de *N. subnodosus* pero para el ORF 5 (C9/C10), donde en ninguna de las muestras analizadas se obtuvo el producto esperado de 197 pb.

Al determinar la carga viral de OsHV-1 mediante qPCR con los primers DPF/DPR (ORF100), en las muestras de la almeja mano de león *N. subnodosus*, se encontró baja ya que el intervalo de copias virales/ng de ADN se encontró entre No Cuantificable (NQ) y 8.29 copias virales/ng de ADN. Adicionalmente, se demostró

la presencia OsHV-1 en las branquias de esta especie mediante histología (Figura 13); donde se observó leve infiltración hemocítica, núcleos hipertrofiadas con la cromatina desplazada hacia la periferia con cuerpos de inclusión intranucleares anfófilicos tipo Cowdry (Hine *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2005); posteriormente se corroboró la presencia del virus en estos tejidos con Hibridación *in situ* (Figura 14) (Arzul *et al.*, 2002; Barbosa-Solomieu *et al.*, 2004) y microscopía electrónica de transmisión (Figura 15) (Farley *et al.*, 1972; Renault *et al.*, 1994). Hasta el momento, oficialmente no se ha relacionado algún evento de mortalidad con la presencia de OsHV-1 y se desconoce la susceptibilidad que *N. subnodosus* presente a la infección por OsHV-1. Por tal motivo es importante realizar bioensayos para tratar de determinar la susceptibilidad de la especie a OsHV-1, y además, complementar las observaciones con herramientas como microscopía electrónica de transmisión, histología e histoquímica (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013), con la finalidad de detectar los órganos y/o tejidos blanco del virus, en el hipotético caso de que existiera una infección. Pero la presencia de un virus tipo herpes ya se ha reportado otros pectínidos como es el caso de *Pecten maximus* (Arzul *et al.*, 2001); así como bivalvos silvestres (Meyers *et al.*, 2009) y también se ha demostrado experimentalmente la transmisión interespecies, a partir de larvas infectadas de *C. gigas* a larvas axénicas de *C. rivularis* y *Ostrea edulis* (Arzul *et al.*, 2001b).

Por otra parte, la presencia OsHV-1 en las muestras de *C. gigas* de Baja California Sur, México se logró identificar mediante qPCR con los primers DPF/DPR, donde el rango de la carga viral se encontró entre $1.002e+001$ y $1.473e+007$ copias virales/ng de ADN, y además, para los ORF 35,-36,-37,-38 y ORF 42,-43 al igual que el ORF 5 (C9/C10) todas las muestras amplificaron los productos esperados, mientras que en el ORF 4 solo se pudo amplificar en 4 muestras. Al analizar en

conjunto las muestras positivas de *N. subnodosus* y *C. gigas* colectadas en BCS, México. Se observó que los resultados a los 3 grupos de primers utilizados (C2-C6 (ORF4), IA2-IA1 (ORF42-43) y Del F2/R (ORF -35,-36,-37,-38)), concuerdan parcialmente con los datos reportados por Renault *et al.*, 2012. Puesto que éstas muestras presentan una delección de 605 pb en el ORF 35,-36,-37,-38, característico de OsHV-1 μ Var (HQ842610); sin embargo, en las regiones ORF4 y ORF42-43, no presentaron los cambios distintivos y la similitud fue 99 y 100% con OsHV-1 (AY509253), respectivamente. Con estas observaciones se demuestra que las características observadas en el OsHV-1 presente en muestras de *N. subnodosus* y *C. gigas* recolectadas en BCS, México, presentaron similitud con genotipos reportados, como lo son OsHV-1 de referencia (AY509253) para el ORF42-43 y OsHV-1 μ Var (HQ842610) para el ORF -35,-36,-37,-38; y de un aislado, el OsHV-1 La Cruz, Sonora (JF894308) para el ORF4. Este último se debe tomar en cuenta, ya que 14 muestras no se logró amplificar, será importante determinar si en estas muestras existe una delección de la zona o un reordenamiento del ORF.

La detección de OsHV-1 en especies alternativas se llevó a cabo con qPCR, donde se pudo cuantificar el número de partículas virales/ng de ADN, el cual para *Mytilus edulis*, *Sphaeroma* sp y *Balanus* sp se encontró entre 9.21 y 2.25e+02 partículas virales/ ng de ADN. La presencia de ADN viral en estos organismos no indica que se encuentren infectados por el virus, pero pueden ser utilizados como bioindicadores, ya que se encuentran en contacto con el medio y además filtran el agua y otras partículas como el fitoplancton que pudieran acarrear al virus (Paul-Pont *et al.*, 2013) OsHV-1 podría contar con múltiples reservorios en el medio acuático, por lo cual será necesario analizar mayor número de muestras y/o especies acuáticas, durante diversos periodos del año, para de esta manera confirmar la presencia del virus y detectar variaciones cuantitativas.

Adicionalmente, se podría hacer uso de la metagenómica, para poder caracterizar y estudiar los genomas de manera global y/o en organismos donde se encuentra en bajos niveles.

El virus solo se pudo detectar en las muestras de antes y después de los brotes de mortalidad donde el número de copias virales/ ng de ADN fue 7.49×10^1 y 5.56×10^1 . Sobresale el hecho de que no se obtuvo amplificación de las muestras de agua durante los brotes de mortalidad, ya que se ha demostrado en bioensayos que al inicio de la infección por OsHV-1 no se detecta el virus y que la carga viral incrementará con respecto al tiempo, alcanzará un punto máximo y posteriormente irá disminuyendo (Schikorski *et al.*, 2011).

Al analizar la diversidad del virus, se encontró que en la región ORF4 el OsHV-1 detectado en muestras de *C. gigas* de BCS, México presentó 100% de identidad con respecto al OsHV-1 la Cruz Sonora (JF894308) (Grijalva-Chon *et al.*, 2012), donde la principal diferencia con respecto al OsHV-1 de referencia (AY509253) es una adición de 12 pb en la región microsatélite, característica que lo hará 24 pb mayor en esta región con respecto al OsHV-1 μ Var (HQ842610). Es por esta característica que las secuencias de OsHV-1 provenientes de BCS y Sonora, México se encuentran dentro de un clado junto con el OsHV-1 USA, California 2007 (JN800128) (Renault *et al.*, 2012), el cual presenta mayor relación filogenética con OsHV-1 de referencia (AY509253). El polimorfismo genético ya se ha reportado en el herpesvirus presente en vertebrados y se ha utilizado como marcador geográfico y/o para la detección de los diferentes fenotipos virales (Torrella & Morita, 1979; Franti *et al.*, 1998; Grose *et al.*, 2004; Bowden *et al.*, 2006). En el caso de OsHV-1 el polimorfismo de ciertas regiones de su genoma también pudo ser relacionado (Segarra *et al.*, 2010). En base a estos datos y tomando en cuenta los resultados de los análisis filogenéticos llevados a cabo en este trabajo podemos sugerir que las variantes de OsHV-1 detectadas en *C. gigas*

colectadas en BCS, Sonora y California, provenientes de muestras colectadas en costras del Pacífico y agrupadas en un mismo clado, presentan una relación filogenética geográfica. Este análisis podrá ser complementado y enriquecido con un mayor número de secuencias de OsHV-1 de la misma región de estudio y de otras regiones del país y de otras partes del mundo.

Por otra parte, el OsHV-1 detectado en muestras de *N. subnodosus*, presentó un porcentaje 97% de similitud en relación con OsHV-1 μ Var (HQ842610) para el ORF4. Es por esta característica que se agrupó como un clado aislado, ya que parece no presentar relación filogenética con los otros aislados y genotipos de OsHV-1 utilizados para construir el árbol filogenético. Se podrían plantear dos hipótesis para explicar este resultado. 1. Que se trate de un evento independiente y que efectivamente sea un OsHV-1 presente exclusivamente en *N. subnodosus*, tal y como se describió en el Acute Viral Necrosis Virus (AVNV) (Ren *et al.*, 2013), pero la identidad del OsHV-1 detectado en *N. subnodosus* para las regiones ORF35,-38 y ORF 42-43 fue del 98% y 100% con respecto a OsHV-1 μ Var (HQ842610) y OsHV-1 de referencia (AY509253), respectivamente, característica que no comparte AVNV. 2. Que este no sea un evento aislado, ni independiente, y que dicho distanciamiento se deba a la transmisión interespecífica (transfaunación) que presenta el virus en el medio natural; ese salto que da OsHV-1 de forma natural en el medio ambiente entre las diferentes especies de moluscos bivalvos, estas comparaciones deberán tomarse con reserva ya que las secuencias con las que se comparó el OsHV-1 fueron obtenidas de *C. gigas*. Es importante recordar que en laguna Ojo de Liebre, Guerrero Negro BCS, México, es un sitio donde se encuentra de forma natural *N. subnodosus*, pero además se encuentran especies nativas como *Argopecten circularis*, *Spondylus princeps*, *Pteria sterna*, *Pinna rugosa*, *Megapitaria squalida*, *Anadara multcostata*, *Tagelus californianas*, *Chione californiensis* y algunas otras del género *Ostrea* (Cárdenas,

1997) ; aunado a esto, existen sitios cercanos donde se cultiva de forma intensiva *C. gigas*. Arzul *et al* (2001c) al demostrar la transmisión interespecies de OsHV-1 de *C. gigas* hacia *Ostrea edulis*, *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*, describieron la presencia un mutante y variante de OsHV-1 el cual presentaba una delección de 2.8 kpb en el ORF4 así como una inserción de 27pb. En otros trabajos también realizados por Arzul *et al* (2001a), donde reportan la almeja francesa (*Pecten maximus*) como nuevo hospedero (2001) y donde experimentalmente se demuestra la transmisión interepsecies de OsHV-1, en algunas de las muestras analizadas no se obtuvieron los amplicones esperados con los primers C2/C6 para el ORF4, situación que se presentó también en las muestras positivas de *N. subnodosus*. La conclusión fue que “*Existe la posibilidad de que el herpesvirus de los bivalvos, de manera natural se encontrara confinado a una sola especie, pero por las condiciones intensivas cultivo, donde diferentes especies y gran número de moluscos bivalvos son mantenidos confinados estrechamente de manera no natural, hecho que promueve la transmisión del virus hacia nuevos hospederos*” (tomado de Arzul *et al*, 2001c). Si a este evento le sumamos la contaminación del agua, alteraciones radicales de la temperatura de los cuerpos, introducción de especies exóticas e invasoras así como la constante mejora continua que se implementa en los cultivos para obtener mayores beneficio en la producción, obtenemos un conjunto de variables que favorecen la dispersión del virus y potenciales modificaciones en su genotipo. Una de las preocupaciones que deben ser consideradas, es sobre ¿qué pasará con el OsHV-1 una vez que ha brincado a un nuevo hospedero, sufre modificaciones dentro de su genoma y posteriormente regrese a su hospedero original?, y de ser el caso, ¿éstas modificaciones en su genoma representarán una mayor virulencia para el hospedero original? ¿tendrá la capacidad inmunológica el hospedero original, para contener la infección por este nuevo genotipo genotípicamente modificado?

X. SÍNTESIS Y CONCLUSIONES

A) El OsHV-1 presente en muestras de *C. gigas* recolectadas en BCS, México durante 2012, se encuentra relacionado filogenéticamente en el ORF4 (C2/C6) con el OsHV-1 La Cruz, Sonora, México (JF894308), pero es importante realizar la caracterización del virus en aquellas muestras donde no se logró obtener la amplificación esperada con este juego de primers (C2/C6). Por otra parte, las regiones Del 35,-36,-37,-38 y ORF 42-43 presentaron una identidad del 99% y 100% con respecto al OsHV-1 μ Var (HQ842610) y al OsHV-1 de referencia (AY509253) respectivamente.

B) El OsHV-1 detectado en muestras de *N. subnodosus* recolectadas en BCS, México del 2010 al 2012, en el ORF4 (C2/C6) pareciera presentar un origen diferente con respecto a OsHV-1 μ Var (HQ842610) y al OsHV-1 de referencia (AY509253), ya que parece no presentar relación filogenética con dichos genotipos, pero la comparación se llevo a cabo con muestras positivas a OsHV-1 a partir de *C. gigas* y este variable podría influir en el organización de la topología.

C) En muestras recolectadas de *C. gigas* provenientes de cultivos intensivos localizados en Francia, los ORFs 35,-36,-37,-38 y 42,-43 no presentan variación con respecto a los episodios de mortalidad (antes, durante y después de brotes de mortalidad) ni con respecto al año de muestreo que para este caso fue durante 2011 y 2012 ya que todas se relacionaron con OsHV-1 μ Var (HQ842610). Sin embargo, el ORF 4 con los primers C2/C6 no siempre se logró amplificar y en algunas muestras se llegaron a encontrar algunos cambios; por tal motivo se deberán caracterizas estas muestras con otros primers diferentes a C2/C6 (ORF4.

D) La carga viral de OsHV-1 en especies alternativas como *N. subnodosus*, *Mytilus edulis*, *Sphaeroma* sp, *Balanus* sp y en muestras de agua de mar, fue baja. La detección del virus en estas especies puede ser útil como indicador de la presencia de OsHV-1 dentro de cuerpos de agua y/o sitios de cultivos de moluscos bivalvos.

XI. CONCLUSIÓN GENERAL

La producción de moluscos bivalvos, específicamente el ostion japonés *C. gigas*, representa una fuente importante de ingresos económicos. A nivel mundial esta actividad se ve seriamente amenazada por la infección por OsHV-1. En este trabajo se encontró que la prevalencia de OsHV-1 en muestras archivadas en el CIBNOR y recolectadas en algunos sitios de BCS México es baja. Es importante resaltar que la vigilancia epidemiológica de estas muestras se realizó con la técnica de PCR convencional con los primers C9/C10 (ORF5), arrojaron tan solo 18 muestras positivas de 1300 muestras de *C. gigas* y *N. subnodosus* analizadas. En el caso de las muestras de almeja mano de león (*N. subnodosus*) detectadas como positivas a OsHV-1 por medio del análisis de qPCR con los primers DPF/DPR (ORF100), el ORF5 no se logró amplificar. Esta falta de amplificación denotó el polimorfismo que presenta OsHV-1 en ciertas regiones de su genoma, y es precisamente este polimorfismo el que ayudará a determinar la variante de OsHV-1 presente. Actualmente la caracterización se basa principalmente en el análisis del ORF4 y en menor grado de los ORFs 35-36-37-38 y 42-43.

La construcción de árboles filogenéticos a partir de la comparación de secuencias obtenidas en este trabajo con secuencias de OsHV-1 disponibles en bases de datos permite profundizar el estudio de la diversidad genética del virus. Las secuencias de OsHV-1 obtenidas a partir de *C. gigas* de BCS, México, se relacionaron con secuencias de OsHV-1 de Sonora México y California, USA. El alto grado de identidad compartido por estas secuencias refleja la proximidad geográfica de los sitios de colecta y podría ser el resultado de la dispersión de de OsHV-1 por medio de la movilización de organismos infectados (por ejemplo de semilla o adultos) provenientes de un mismo sitio.

XII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

1. En BCS, México se deberá establecer un programa de vigilancia epidemiológica para identificar la presencia de OsHV-1 tanto en sitios de cultivo intensivo y en medios naturales. Este análisis deberá estar dirigido a identificar regiones que presenten poca variabilidad o más conservadas, como el es caso del ORF 100 (DPF/DPR) y evitar el uso de regiones con alto grado de polimorfismo como el ORF4 y ORF5, que servirán para el análisis sobre la diversidad del virus.

2. Como análisis preliminar al establecimiento de un programa de vigilancia epidemiológica que se pueda establecer en BCS, México; se deberán contemplar diferentes especies de moluscos bivalvos tanto de importancia comercial como organismos silvestres, así como especies consideradas como no hospederas, tal es el caso de crustáceos, baláños, mejillones y muestras de agua de mar . Con esta información se tendrá un panorama mas completo y amplio sobre la distribución y dispersión de OsHV-1 en el estado.

3. Determinar la susceptibilidad y comportamiento de OsHV-1 mediante la elaboración de bioensayos, en especies como *N. subnodosus*, crustáceos, balanos y mejillones, las cuales pueden actuar como reservorios y/o dispersores del virus.

4. Evitar la movilización de organismos donde se ha identificado la presencia de OsHV-1 así como realizar la desinfección y esterilización de material contaminado y/o fomites, que potencialmente servirán como introductores del virus hacia nuevos sitios libres de la enfermedad.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alderman, D. 1980. Shellfish disease, past, present and future. Proceeding del 11th Annual Conference of Shellfish Association. Great Britain. 30–40p.
- Arzul, I. 2001. Herpèsvirus infectant les bivalves marins: détection, génome et transmission. Université de Montpellier II. Doctoral Thesis
- Arzul, I., J.L. Nicolas, A J. Davison, y T. Renault. 2001a. French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*. 290(2):342–9.
- Arzul, I., T. Renault, y C. Lipart. 2001b. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*. 46:1–6.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart, y A. Davison. 2001c. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*. 82(Pt 4):865–70.
- Arzul, I., T. Renault, A. Thébault, y A. Gérard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research*. 84(1-2):151–60.
- Bandín, I. y C. Dopazo. 2011. Host range, host specificity and hypothesized host shift events among viruses of lower vertebrates. *Veterinary Research*. 42(1):67.
- Barbosa-Solomieu, V., L. Miossec, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-Valle, y T. Renault. 2004. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *Journal of Virological Methods*. 119(2):65–72.
- Barbosa-Solomieu, V., L. Dégremont, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-Valle, P. Boudrya, y T. Renault. 2005. Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among

- three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Research*. 107:47–56.
- Batista, F., N. Taris, y P. Boudry. 2005. Detection of ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) by PCR using a rapid and simple method of DNA extraction from oyster larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 64:1–4.
- Batista, F.M., I. Arzul, J.-F. Pepin, F. Ruano, C.S. Friedman, P. Boudry, y T. Renault. 2007. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. *Journal of Virological Methods*. 139(1):1–11.
- Bergh, O., K. Borsheim, G. Bratbak, y M. Haldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. 340:467–468.
- Berthe, F., E. Burreson, y M. Hine. 1999. Use of molecular tools for mollusc disease diagnosis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 19(6):277–278.
- Borderia, A. y S. Elena. 2002. r- and K selection in experimental populations of vesicular stomatitis virus. *Infection, Genetics and Evolution*. 2:137–143.
- Bowden, R., R. Sakaoka, H. Ward, y R. Donnelly. 2006. Patterns of Eurasian HSV-1 molecular diversity and inferences of human migrations. *Infection, Genetics and Evolution*. 6:63–74.
- Burge, C.A., L.R. Judah, L.L. Conquest, F.J. Griffin, D.P. Cheney, A. Suhrbier, B. Vadopalas, P.G. Olin, T. Renault, y C.S. Friedman. 2007. Summer seed mortality of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg Grown In Tomales Bay , California , Usa : The Influence Of Oyster Stock , Planting Time, Pathogens, And Environmental Stressors. *Jornal of Shellfish Research*. 26(1):163–172.
- Burge, C. a, R.E. Strenge, y C.S. Friedman. 2011. Detection of the oyster

herpesvirus in commercial bivalve in northern California, USA: conventional and quantitative PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*. 94(2):107–16.

Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2013. Uso de la técnica de PCR en el proceso de diagnóstico de enfermedades infecciosas en organismos acuáticos, su validación y su interpretación. *Ciencia Pesquera*. 21(3918):57–65.

Cárdenas, L.A. 1997. Evaluación estacional de la fauna ictiológica, malacológica y flora ficológica de la Reserva de la Biósfera El Vizcaíno, BCS, Fase I: Laguna Ojo de Liebre.

Chang, P., S. Kuo, S. Lai, H. Yang, Y. Ting, C. Hsu, y H. Chen. 2005. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65:23–27.

Chen, M.H., S.T. Kuo, T. Renault, C.S. Friedman, y P.H. Chang. 2012. Development of a polymerase chain reaction for the detection of abalone herpesvirus infection based on the DNA polymerase gene. *Journal of Virological Methods*. 185(1):1–6.

Claverie, J.M. 2006. Virus take center stage in celular evolution. *Genome Biology*. 7(6):110–110.5.

Cohen, J. y H. Nguyen. 1998. Varicella-zosters virus ORF61 deletion mutants replicate in cell culture, but a mutant with stop codons in ORF61 reverts to wild-type virus. *Virology*. 246:306–316.

Comps, M. y N. Cochennec. 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 62:201–203.

Comps, M., C. Herbaut, y A. Fougerouse. 1999. Virus-Like Particles In Pearl Oyster *Pinctada*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*.

19(2):85–88.

- CONAPESCA . 2010. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2010. 285p.
- Daszak, P. y A. Cunningham. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science*. 287(5452):443–449.
- Davison, A. 1992. Channel catfish virus: a new type of herpes-virus. *Virology*. 186:9–14.
- Davison, A., W. Sauerbier, A. Dolan, C. Addison, y R. McKinnell. 1999. Genomic studies of the Lucké tumor herpesvirus (RaHV-1). *Journal of Cancer Research Clinical Oncology*. 125:232–238.
- Davison, A.J., B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Watson, C. Cunningham, R.-M. Le Deuff, y T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *The Journal of General Virology*. 86(Pt 1):41–53.
- Davison, A., R. Eberle, B. Ehlers, G.S. Hayward, D.J. McGeoch, A.C. Minson, P.E. Pellett, B. Roizman, M.J. Studdert, y E. Thiry. 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology*. 154(1):171–7.
- Dégremont, L. 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture*. 317(July):94–98.
- Dégremont, L., T. Guyader, D. Tourbiez, y J.-F. Pépin. 2013. Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture*. 408-409:51–57.
- Deuff, R. Le, J. Nicolas, y T. Renault. 1994. Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 14(2):69–72.

- Deuff, R. Le. y T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. The Journal of General Virology. 80 (Pt 5):1317–22.
- Dundon, W.G., I. Arzul, E. Omnes, M. Robert, C. Magnabosco, M. Zambon, L. Gennari, A. Toffan, C. Terregino, I. Capua, y G. Arcangeli. 2011. Detection of Type 1 Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ Var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. Aquaculture. 314(1-4):49–52.
- Elandaloussi, L., N. Carrasco, K. Andree, D. Furones, y A. Roque. 2009. Esdeveniments de mortalitat de l'ostró del Pacífic (*Crassostrea gigas*) en el delta de l'Ebre- Estudi de cas. II Simposi D'aquicultura de Catalunya.
- FAO. 2007. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Chile. 377p.
- Farley, C.A., W.G. Banfield, G. Kasnic, y W.S. Foster. 1972. Oyster Herpes-Type Virus. Science. 178(4062):759–760.
- Ferenczy, M., D. Ranayhossaini, y N. DeLuca. 2011. Activities of ICP0 involved in the reversal of silencing quiescent herpes simplex virus. Journal of Virology. 85:4993–5002.
- Figueras, A. y B. Novoa. 2011. Enfermedades de moluscos bivalvos. Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid. 541p.
- Franti, M., J. Aubin, L. Poirel, A. Gautheret-Dejean, A. Candotti, J. Huraux, y H. Agut. 1998. Definition and distribution analysis of glycoprotein B gene alleles of human herpesvirus 7. Journal of Virology. 72:8725–8730.

- Friedman, C.S., R.M. Estes, N. a Stokes, C. a Burge, J.S. Hargove, B.J. Barber, R.A. Elston, E.M. Burreson, y K.S. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63(1):33–41.
- Grijalva-Chon, J.M., R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes, T.L. Enríquez-Espinoza, y F. Mendoza-Cano. 2012. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* , from the Gulf of California. *Journal of Fish Diseases*. DOI 10.1111/jfd 12028
- Grose, C., S. Tyler, G. Peters, J. Hiebert, J. Stephens, G. Ruyechan, W. Jackson, W. Storlie, y G. Tipples. 2004. Complete DNA sequence analyses of the first two Varicella- Zoster virus Glycoprotein E (D150N) mutant viruses found in north America: Evolution of genotypes with an accelerated cell spread phenotype. *Journal of Virology*. 78:6799–6807.
- Gu, H. y B. Roizman. 2009. The two functions of herpes simplex virus 1 ICP0, inhibition of silencing by the CoREST/REST/HDAC complex and degradation of PML, are executed in tandem. *Journal of Virology*. 83:181–187.
- Hine, P. y T. Thorne. 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Diseases of Aquatic Organisms*. 29:189–196.
- Hine, P., B. Wesney, y P. Besant. 1998. Replication of a herpes- like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Diseases of Aquatic Organisms*. 32:161–171.
- Hwang, J.Y., J. Park, H. Yu, Y. Hur, I. Arzul, Y., Couraleau y M.Park. 2012. Ostreid Herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal of Fish Diseases*. DOI 10.1111/jfd.12093

- International OsHV-1, 2011. μ Var Workshop, Australian Government Fisheries Reserch and Development Corporation, Cairns, QL, Australia.
- Jenkins, C., P. Hick, M. Gabor, Z. Spiers, S.A. Fell, X. Gu, A. Read, J. Go, M. Dove, W. O'Connor, P.D. Kirkland, y J. Frances. 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ Var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 105(2):109–26.
- Jouaux, A., M. Lafont, J.-L. Blin, M. Houssin, M. Mathieu, y C. Lelong. 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics*. 14(1):590.
- Lipart, C. y T. Renault. 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal of Virological Methods*. 101:1–10.
- Liu, Y., X. Wu, M. Zhu, C. Wang, Q. Zhang, y J. Pan. 2002. Ultrastructural observation and cytopathology of spherical virus in *Chlamys farreri* (Jones and Preston). *Journal of Tropical Oceanography*. 21:76–79.
- Luna-González, A., V. Barbosa-Solomieu y M. Mendes-De-Bem. 2011 Inmunología y Patología microbiana de moluscos bivalvos con énfasis en especies del género *Nodipecten* spp. En Maeda-Martínez A y C. Lodeiros-Seijo (eds). *Biología y Cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. Editorial Limusa, México D.F. 212p.
- Lynch, S. A, J. Carlsson, A O. Reilly, E. Cotter, y S.C. Culloty. 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology*. 139(12):1526–32.

- Marcogliese, D.J. 2008. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics). 27(2):467–84.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillé, J.P. Malas, y M. Houssin. 2010. Comparison of two real-time PCR methods for detection of ostreid herpesvirus 1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Virological Methods*. 170(1-2):86–90.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillé, J.P. Malas, y M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research*. 160(1-2):25–31.
- Martenot, C., S. Fourour, E. Oden, a. Jouaux, E. Travaillé, J.P. Malas, y M. Houssin. 2012. Detection of the OsHV-1 μ Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture*. 338-341(July 2010):293–296.
- McGavin. 2007. *Pathologic Basis of Veterinary Diseases*. Ed Mosby.
- McGeoch, D.J., Frazer J Rixon, y A.J. Davidson. 2006. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Research*. 117:90–104.
- Meyers, T., T. Burton, W. Evans, y N. Starkey. 2009. Detection of viruses and virus-like particles in four species of wild and farmed bivalve molluscs in Alaska, USA, from 1987 to 2009. *Diseases of Aquatic Organisms*. 88:1–12.
- Moriuchi, H., M. Moriuchi, y J. Cohen. 1994. The RING finger domain of the varicella-zoster virus open reading frame 61 protein is required for its transregulatory functions. *Virology*. 205:238–246.
- OIE. 2008. Marek's disease. En OIE (eds) *Terrestrial Manual*. 566–576p.
- OIE. 2013. Enfermedades de los moluscos. En: OIE (eds.) *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*. 297–309p.

- Paul-Pont, I., N.K. Dhand, y R.J. Whittington. 2013. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*. 105(2):127–38.
- Peeler, E.J., R. Allan Reese, D.L. Cheslett, F. Geoghegan, A. Power, y M.A. Thrush. 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with Ostreid herpesvirus-1 μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine*. 105(1):136–143.
- Pellet, P. y B. Roizman. 2006. The Herpesviridae a brief introduction. En: Knipe D. *et al.* (eds.) *Fields virology*. Lippincott, Philadelphia. 2479–2499p.
- Pennisi, E. 2004. The birth of the nucleus. *Science*. 305(6):766–768.
- Pepin, J.F., A. Riou, y T. Renault. 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*. 149(2):269–276.
- Power, A.G. y C.E. Mitchell. 2004. Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist*. 164:79–89.
- Rao, V. y J. Melnick. 1986. Environmental virology. En: Cole J. *et al.* (eds.) *Aspects of Microbiology*. American Society of Microbiology, Washington DC.
- Relman, D.A. 2013. Metagenomics, infectious disease diagnostics, and outbreak investigations: sequence first, ask questions later? *Journal of the American Medical Association*. 309(14):1531–2.
- Ren, W., T. Renault, Y. Cai, y C. Wang. 2010. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 DNA. *Journal of Virological Methods*. 170(1-2):30–6.
- Ren, W., H. Chen, T. Renault, Y. Cai, C. Bai, C. Wang, y J. Huang. 2013. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive

- mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. Virology journal. 10(1):110.
- Renault, Chollet., L. Deuff., y N. Cochenec. 1994. Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 14:64–66.
- Renault, T. y R. Le Deuff. 1994. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. Revue de Médecine Veterinaire.145:735–742.
- Renault, T., R. Le Deuff, N. Cochenec, B. Chollet, y P. Maffart. 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. Veterinary Research. 26:539–543.
- Renault, T. y C. Lipart. 1998. Diagnosis of herpesvirus-like virus infections in oysters using molecular techniques. Aquaculture and water: Fish Culture, Shellfish Culture and Water Usage. 235–236p.
- Renault Tristan, R.-M. Le Deuff, C. Lipart, y D. C. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of an Herpes-like infecting oyster in France. Journal of Virology. 88:41–50.
- Renault, T. y I. Arzul. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. Journal of Fish Diseases. 24(3):161–167.
- Renault, T., C. Lipart, y I. Arzul. 2001. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. Diseases of Aquatic Organisms. 45(1):1–7.

- Renault, T., P. Moreau, N. Faury, J.-F. Pepin, A. Segarra, y S. Webb. 2012. Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (*Malacoherpesviridae*) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal of Virology*. 86(10):5942–7.
- Roizman, B. y A. Sears. 1990. Herpes simplex and their replication. En: Fields B. (eds.) *Virology*. Raven Press, New York. 1795–1894p.
- Roizman, B. y J. Baines. 1991. The diversity and unity of herpesviridae. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 14(2):63–79.
- Sauvage, C., J.F. Pépin, S. Lapègue, P. Boudry, y T. Renault. 2009. Ostreid herpes virus 1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. *Virus research*. 142(1-2):181–7.
- Schikorski, D., N. Faury, J. Pepin, y D. Saulnier. 2011. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research*. 155(1):28–34.
- Segarra, A. 2009. Genetic polymorphism study within Ostreid Herpesvirus 1 isolates collected from cupped oysters (*Crassostrea gigas*) in France during 2008 summer mortality. Report of research stay.
- Segarra, A., J.-F. Pépin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury, y T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in. *Virus Research*. 153(1):92–99.
- Silva, P. Da, T. Renault, J. Fuentes, y A Villalba. 2008. Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various

- geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*. 78:181–188.
- Song, W., C. Wang, X. Wang, y Y. Li. 2001. New research progress on massive mortality of cultured scallop *Chlamys farreri*. *Marine Science*. 25:23–27.
- Suttle, C. A. 2007. Marine viruses-major players in the global ecosystem. *Nature reviews. Microbiology*. 5(10):801–12.
- Thiry, E., J. Dubuisson, y P. Pastoret. 1986. Patogenia, latencia y reactivación de las infecciones provocadas por herpesvirus. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*. 5(4):829–836.
- Torrella, F. y R. Morita. 1979. Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Environ. Microbiol.* 37:774–778.
- Vasquez-Yeomans, R. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 23:418–419.
- Vazquez-Juarez, R, R. Hernández-López, N. Gutierrez, Coronado-Molinda, y D. Mazón-Suastegui. 2006. First report of Herpes virus in Pacific oyster *Crassostrea gigas* from farms in Northwestern Mexico. En OIE Global Conference on Aquatic Animal Health. Defining Roles and Responsibilities. Berg, Norway. 9-12 October.
- Vitousek, P. 1997. Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science*. 277(5325):494–499.
- Wang, C., X. Wang, X. Song, J. Huang, y W. Song. 2002. Purification and ultrastructure of a spherical virus in cultured scallop *Chlamys farreri*. *Fish China*. 26:180–184.

- Webb, S.C., A. Fidler, y Renault Tristan. 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus- (OsHv-): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*. 272:126–139.
- Weinbauer, M. 2004. Ecology of prokaryotic viruses. *Microbiology*. 28:127–181.
- Wessner, D. 2012. The origin of viruses. *Nature education*. 3(9):37.
- Wichman, H., J. Wichman, y J. Bull. 2005. Adaptative molecular evolution for 13,000 phage generation: a possible arms race. *Genetics*. 170:19–31.
- Wommack, K.E. y R.R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64(1):69.
- Yu, R., R. Wang, C. Tian, y Z. Wang. 1998. Discussion on the high mortality and its prevention in scallop *Chlamys farreri*. *Trans Oceanolo Limnol*. 71:69–72.

XIV. ANEXOS

1. Protocolos de extracción de ADN para las muestras del proyecto BIVALIFE

A. Protocolo para la extracción de ADN en mejillones

Este protocolo permite tratar de forma individual los tejidos de animales que se procesaron para el proyecto BIVALIFE.

1. Desconchar a los organismos con una navaja estéril
2. Enjuagar la masa visceral con agua de mar estéril (piseta)
3. Colocar la masa visceral en un tubo de plástico de 15mL
4. Pesar la masa visceral y añadir 4 veces de acuerdo al peso, agua de mar estéril
5. Macerar la solución con un pistón en un ultra mezclador durante 1 minutos o hasta observar que la suspensión se encuentre homogénea.
6. Centrifugar el tubo 1000 g x 2 minutos
7. Recolectar 200µl de la fase intermedia y colocarlos en un tubo eppendor de 1.5 mL
8. Realizar la extracción de DNA con el protocolo del Kit Qiamp DNA (Qiagen).

B. Protocolo para la extracción de ADN con el protocolo Kit Qiamp DNA (Qiagen)

Colocar en un tubo eppendorf 20-40 mg de muestra

Añadir 180 μ l de buffer **ATL**

Agregar 20 μ l de **proteínasa K**

Realizar vortex a las muestras unos segundos

Incubar las muestras a 56°C durante 3 horas con 700 rpm de agitación

Centrifugar (1,000 g, 1 minuto)

Añadir a la solución 200 μ l de buffer **AL**

Realizar vortex 15 segundos

Incubar 10 minutos a 70 °C con 700 rpm de agitación

Centrifugar 1,000 g, 1 minuto

Agregar 200 μ l de alcohol absoluto frío y homogenizar mediante pipeteo

Cargar la solución a las cartuchos con el filtro (aproximadamente 800 μ l)

Centrifugar 6,000 g, 1 minuto.

Recuperar el cartucho con el filtro y colocarlo en un tubo limpio de 2 ml

Añadir 500 μ l de solución **AW1**

Centrifugar 6,000 g, 1 minuto

Recuperar el cartucho con el filtro y colocarlo en un tubo limpio de 2 ml

Añadir 500 μ l de solución **AW2**

Centrifugar 20,000 g, 3 minuto

Recuperar el cartucho con el filtro y colocarlo en un tubo limpio de 1,5 ml

Depositar 50 μ l de agua mQ

Dejar incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar 6,000 g durante 2 minutos.

Cuantificar el DNA obtenido.

C. Protocolo para la extracción de ADN de sedimento de agua

Protocolo alternativo para los máximos rendimientos (Mo BIO Laboratories, Inc.)

1. Agregar a los tubos Bead solution 0.25-1 g de muestra de sedimento.
2. Mezclar brevemente con vortex
3. Agregar 60 μ l de la solución S1, invertir varias veces el tubo con la solución o realizar vortex
4. Añadir 200 μ l de la solución IRS (Inhibitor Removal Solution)
5. Colocar los tubos horizontalmente y realizar vortex durante 10 minutos
6. Centrifugar los tubos 10,000 g por 30 segundos. **PRECAUCIÓN:** No exceder de la velocidad pues los tubos se pueden romper.
7. Trasferir el sobrenadante un tubo limpio de 2 ml **Nota:** Con 0.25 mg de sedimento y dependiendo del tipo de sedimento se obtendrán entre 400 y 450 μ l.
8. Añadir 250 μ l de la solución S2 y realizar vortex 5 segundos. Posteriormente incubar a 4°C durante 5 minutos.
9. Centrifugar el tubo 10,000 g por 1 minuto
10. Evitar el pellet y obtener el sobrenadante para transferirlo a un tubo de 2 ml.
11. Añadir 1.3 ml de la solución S3 al tubo con el sobrenadante y realizar vortex 5 segundos
12. Cargar 700 μ l de la mezcla y las columnas con filtro, centrifugar 10,000 g durante 1 minuto.
13. Descartar el líquido filtrado, añadir el sobrenadante restante a la columna con el filtro y repetir la centrifugación hasta que todo el sobrenadante haya sido filtrado. **Nota:** Un total de tres cargas para cada muestra son necesarias.
14. Añadir 300 μ l de la solución S4, centrifugar a 10,000 g por 30 segundos.
15. Descartar el líquido centrifugado
16. Centrifugar nuevamente a 10,000 g durante 1 minuto.

MX54-C2C6 ACGAGGTTAACATGCGACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTC 540
 MX55-C2C6 ACGAGGTTAACATGCGACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTC 540

 MX51-C2C6 GTGGCATCATTGGCTGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGAC 600
 MX53-C2C6 GTGGCATCATTGGCTGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGAC 600
 MX54-C2C6 GTGGCATCATTGGCTGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGAC 600
 MX55-C2C6 GTGGCATCATTGGCTGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGAC 600

 MX51-C2C6 CTGAACCTCCTCGACCTGATCCAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATT 660
 MX53-C2C6 CTGAACCTCCTCGACCTGATCCAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATT 660
 MX54-C2C6 CTGAACCTCCTCGACCTGATCCAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATT 660
 MX55-C2C6 CTGAACCTCCTCGACCTGATCCAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATT 660

 MX51-C2C6 GACGAATTGTTCACTGCCACAAAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCG 711
 MX53-C2C6 GACGAATTGTTCACTGCCACAAAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCG 711
 MX54-C2C6 GACGAATTGTTCACTGCCACAAAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCG 711
 MX55-C2C6 GACGAATTGTTCACTGCCACAAAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCG 711

Secuencia ORF4 *N. subnodosus* colectada en BCS, México

MX08 TCTCTTTTACCATGAAGATACCCACCCCACTGTGATATCATCGCAATGAATACAATCT 60
 MX08 AAAATTA AAAAACCCATG GGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAAT 120
 MX08 AGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATACCCACACACTCAATCTCGAGTATACCACA 180
 MX08 GCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACTGAAAAAATGCAGCCTTTTCACAGAATTT 240
 MX08 TGCACCTTGACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGATGAGG 300
 MX08 TTAACATGCGACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCA 360
 MX08 TCATTGGCTGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAAC 420
 MX08 CTCTCGACCTGATCCAGTTCTGCGAAAAGAAGAAGATCCCAGA 464

B. Alineamientos ORF 42-43 muestras de *N. subnodosus* y *C. gigas* colectadas en BCS, México. La secuencia de los primers se encuentra subrayada y en cursivas.

La secuencia de los primers se encuentran en letras cursivas roja y subrayadas

MX03 *AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA* 60
 MX08 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX11 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX21 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX22 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX23 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX25 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX26 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX39 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX40 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX49 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX50 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX51 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX52 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX53 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX54 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX57 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60
 MX55 AATCCCATGTTTCTTGCTGTAGAATAATTTGCTATCTGATTTGGTTTATATTTTTGTA 60

C. Alineamientos ORF 35,36,37,38 entre las muestras de *N. subnodosus* y *C. gigas* colectadas en BCS, México

La secuencia de los primers se encuentran en letras cursivas roja y subrayadas

```

MX03      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX08      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX11      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX21      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX22      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX23      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX25      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX26      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX39      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX40      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX49      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX50      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX51      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX52      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX53      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX54      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX57      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
MX55      TATACGATGCGTCGGTAGAGCAATAAAAAATCCCTGTTCTGTCTGTCTTGATATTTCTTCT 60
*****

MX03      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX08      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX11      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX21      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX22      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX23      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX25      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX26      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX39      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX40      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX49      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX50      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX51      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX52      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX53      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX54      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX57      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
MX55      CTGCCCGTGCATCGGTGCATATCTTGATCGGCAAGGATTCCTTACTTCCTTGGGACCTC 120
*****

MX03      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX08      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX11      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX21      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX22      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX23      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX25      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX26      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX39      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX40      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX49      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180
MX50      TGATTGGTAGTGAATCAAAATTGCAATTGTTTCTGATTGTAATTTCTTCTGTAAGGTTTA 180

```


MX51 GCTTTT GAGTATCGTCCACAAGTACCTTGTATGTGGTATATCTTCCATAATGGATATTC 360
 MX52 GCTTTT GAGTATCGTCCACAAGTACCTTGTATGTGGTATATCTTCCATAATGGATATTC 360
 MX53 GCTTTT GAGTATCGTCCACAAGTACCTTGTATGTGGTATATCTTCCATAATGGATATTC 360
 MX54 GCTTTT GAGTATCGTCCACAAGTACCTTGTATGTGGTATATCTTCCATAATGGATATTC 360
 MX57 GCTTTT GAGTATCGTCCACAAGTACCTTGTATGTGGTATATCTTCCATAATGGATATTC 360
 MX55 GCTTTT GAGTATCGTCCACAAGTACCTTGTATGTGGTATATCTTCCATAATGGATATTC 360

MX03 CGTG *TTACAGGAATGGGGTTCTC* 385
 MX08 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX11 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX21 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX22 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX23 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX25 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX26 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX39 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX40 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX49 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX50 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX51 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX52 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX53 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX54 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX57 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385
 MX55 CGTGTTTACAGGAATGGGGTTCTC 385

D. Alineamiento ORF 4 OsHV-1 *C. gigas* Francia 2011

La secuencia de los primers se encuentran en letras cursivas roja y subrayadas

11-01 *CTCTTTACCATGAAGATACCCACCA*ATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-02 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-03 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-04 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-05 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-06 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-07 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-08 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-10 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-18 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 11-13 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60

11-01 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-02 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-03 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-04 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-05 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-06 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-07 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-08 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-10 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-18 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120
 11-13 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGA 120

11-01 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-02 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-03 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-04 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-05 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-06 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-07 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-08 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-10 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-18 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 11-13 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180

11-01 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-02 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-03 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-04 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-05 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-06 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-07 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-08 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-10 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-18 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240
 11-13 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTTAA 240

11-01 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-02 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-03 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-04 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-05 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-06 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-07 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-08 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-10 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-18 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 11-13 AACCCACATGGGGGCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300

11-01 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-02 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-03 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-04 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-05 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-06 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-07 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-08 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-10 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-18 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 11-13 TTGTCAGTTTAGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360

11-01 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-02 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-03 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-04 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-05 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-06 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-07 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420
 11-08 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAAA 420

11-10 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 11-18 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 11-13 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420

11-01 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-02 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-03 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-04 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-05 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-06 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-07 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-08 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-10 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-18 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 11-13 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTTCATTAAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480

11-01 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-02 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-03 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-04 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-05 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-06 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-07 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-08 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-10 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-18 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 11-13 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540

11-01 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-02 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-03 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-04 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-05 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-06 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-07 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-08 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-10 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-18 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
 11-13 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600

11-01 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-02 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-03 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-04 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-05 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-06 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-07 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-08 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-10 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-18 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCCAC 660
 11-13 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCCTCTCATTGACGAATTGTTCACTGACCAC 660

11-01 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAAGCCGTGCAC 695
 11-02 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAAGCCGTGCAC 695
 11-03 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAAGCCGTGCAC 695

11-04 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-05 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-06 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-07 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-08 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-10 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-18 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
 11-13 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695

E. Alineamiento ORF 4 OsHV-1 C. *gigas* Francia 2012

La secuencia de los primers se encuentran en letras cursivas roja y subrayadas

12-04 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-05 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-07 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-08 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-09 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-10 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-12 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-13 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-14 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60
 12-15 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATA 60

12-04 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-05 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-07 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-08 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-09 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-10 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-12 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-13 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-14 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120
 12-15 TGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTGA 120

12-04 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-05 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-07 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-08 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-09 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-10 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-12 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-13 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-14 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180
 12-15 ATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCAC 180

12-04 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-05 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-07 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-08 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-09 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-10 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-12 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-13 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-14 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240
 12-15 AAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTA 240

12-04 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-05 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-07 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-08 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-09 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-10 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-12 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-13 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-14 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300
 12-15 AACCACATGGGGCCAAGGAATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAAGTATAAATAGGCGCGAT 300

12-04 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-05 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-07 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-08 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-09 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-10 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-12 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-13 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-14 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360
 12-15 TTGTCAGTTTGAATCATACCCCACTCAATCTCGAGTATACCACAACCTGCTAAATTAAC 360

12-04 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-05 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-07 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-08 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-09 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-10 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-12 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-13 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-14 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420
 12-15 AGCATCTACTACTACTACTGAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTGACCAA 420

12-04 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-05 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-07 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-08 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-09 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-10 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-12 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-13 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-15 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480
 12-14 GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTATCAACCAGACGAGGTTAACATGCGACATT 480

12-04 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-05 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-07 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-08 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-09 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-10 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-12 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-13 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-14 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540
 12-15 TGTAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGCTGCAGTC 540

12-04 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-05 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-07 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-08 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-09 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-10 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-12 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-13 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-14 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600
12-15 AGATCTGACATACCCATAGAAGTCACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 600

12-04 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-05 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-07 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-08 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-09 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-10 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-12 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-13 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-14 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660
12-15 CAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATTGACGAATTGTTCACTGCCAC 660

12-04 AAAGACCATTGTCAG **AAAAATGGTAAGCCGTGCAC** 695
12-05 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-07 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-08 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-09 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-10 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-12 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-13 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-15 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
12-14 AAAGACCATTGTCAGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 695
