

JACUMAR JUNTA NACIONAL ASESORA DE CULTIVOS MARINOS

PLANES NACIONALES DE CULTIVOS MARINOS

INFORME FINAL

Título: Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos y evaluación del impacto de la enfermedad. HERPEMOL (2011-2012)

RESUMEN EJECUTIVO (MÁXIMO 10 PÁGINAS)

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TITULO: Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos y evaluación del impacto de la enfermedad. HERPEMOL

FECHAS DE REALIZACIÓN: desde 01/01/2011 hasta 31/12/2012

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: Elvira Abollo Rodriguez
Organismo/ Centro: Centro Tecnológico del Mar- Fundación CETMAR
Correo electrónico: eabollo@cetmar.org

Comunidades Autónomas participantes

C.A. de GALICIA.

- Centro Tecnológico del Mar – Fundación CETMAR,
- Centro de Investigaciones Marinas (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia.
- Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR). Consellería do Mar. Xunta de Galicia

C.A. de ANDALUCÍA.

- Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA).

C.A. de CATALUÑA.

- Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA).

C.A. de ASTURIAS.

- Centro de Experimentación Pesquera (CEP). Dirección General de Pesca Marítima. Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos.

CIUDAD DE CEUTA.

- Obras, Infraestructuras y Medio Ambiente de Ceuta S.A.U (OBIMASA)

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS. Los objetivos desarrollados en el proyecto HERPEMOL, tras el recorte presupuestario del año 2012 y el cese del proyecto este mismo año, han sido los siguientes:

Línea 0. Coordinación del proyecto.

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo).

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

Actividad 2.1. Recopilación de información sobre los cultivos de *Crassostrea gigas* en el litoral de las CC AA implicadas, y elaboración de un plan de estudio epidemiológico.

Actividad 2.2. Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas.

Actividad 2.3. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana).

Actividad 2.4. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en criaderos de *Crassostrea gigas*.

Actividad 2.5. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas.

2.3. METODOLOGÍA (muy resumida)

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo).

El equipo de CETMAR diseñó el procedimiento operativo y el equipo del CIMA preparó el material necesario para un ejercicio de calibración interlaboratorios del diagnóstico del OsHV-1, en el que participaron tres laboratorios, IRTA de Sant Carles de la Ràpita (Cataluña), Centro Agua del Pino del IFAPA (Andalucía) y CIMA (Galicia). El ejercicio de intercalibración se ha llevado a cabo a partir de 60 muestras seleccionadas y procesadas tanto para el diagnóstico histológico como para el diagnóstico molecular utilizando los dos procedimientos más extendidos: PCR C2/C6+RFLP Mfel (POS-1) y PCR HerpF/R (POS-2). El análisis de los resultados lo realizó el equipo del IFAPA mediante el

cálculo del acuerdo (Índice Kappa de Cohen) inter e intra laboratorios y la estimación Bayesiana de la sensibilidad y especificidad diagnóstica

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

En **Galicia** se realizó un seguimiento de la evolución del crecimiento, la supervivencia y la prevalencia de la infección por OsHV-1 de varios lotes de semilla de ostra rizada a lo largo del engorde en la ría de Arousa, para evaluar el impacto del virus OsHV-1 en el cultivo de la ostra rizada en Galicia. El seguimiento se llevó a cabo en sendas bateas de dos polígonos de cultivo de la ría de Arousa, GROVE A y CAMBADOS D. Las muestras de mejillón se obtuvieron de bateas localizadas en los mismos polígonos.

En **Andalucía** los bancos naturales de ostra muestreados fueron los localizados en los ríos Guadiana, Carreras y Piedras. Durante 2012 se cumplió el programa de muestreo establecido en el plan de estudio epidemiológico. Coincidiendo con los muestreos de los bancos naturales de ostra se capturaron ejemplares de almeja fina y mejillón del río Carreras, procesándose los ejemplares de igual manera que las ostras y sometándose a idéntica metodología analítica.

En **Cataluña**, en el año 2011, el trabajo se llevó a cabo en la bahía del Fangar, por ser en la que la producción de *C. gigas* es ampliamente mayoritaria y donde las mortalidades habían sido anteriormente registradas y seguidas por el equipo del IRTA. A la espera de disponer de un protocolo consensuado, se llevó a cabo una primera valoración, para conocer la prevalencia del virus herpes mediante la prueba de PCR C2-C6 en muestras de 150 ejemplares, muestreados en grupos de 30 en 30 individuos, según Renault et al 2000. Se seleccionaron muestras de ADN positivas para herpes y se sometieron a PCR- RFLP: C2_C6 >Mfel para discriminar las correspondientes a la micro variante. En el año 2012, el trabajo se concentró en el seguimiento de la presencia del virus en las poblaciones de mejillón de cultivo (*Mytilus galloprovincialis*), haciendo extensivo el estudio a la bahía de Alfacs. Al igual que para *C.gigas*, todas las muestras fueron procesadas para análisis moleculares, mediante PCR convencional C2-C6 (Renault et al., 2000).

En **Asturias**, la metodología de trabajo se basó en la recopilación de la información de todas las explotaciones de cultivo, diseño de un Plan de muestreos y puesta a punto de producción de semilla en criadero.

En **Ceuta** se muestrearon bancos naturales de mejillón y se enviaron las muestras para su análisis al CIMA.

Para determinar la presencia/ ausencia de la infección por herpesvirus se aplicaron técnicas moleculares: PCR, PCR-RFLPs, secuenciación de productos de PCR e hibridación *in situ*.

2.4. RESULTADOS

Línea 0. Coordinación del proyecto.

La tarea de coordinación general del proyecto recae en la Fundación CETMAR. Esta tarea ha cursado con fluidez a lo largo del proyecto. Para ello, se han realizado continuas llamadas telefónicas, correos electrónicos, reuniones semestrales e intercambio de información entre todos los socios del proyecto.

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo):

El equipo de CETMAR diseñó el procedimiento operativo y el equipo del CIMA preparó el material necesario para un ejercicio de calibración interlaboratorios del diagnóstico del OsHV-1, en el que participaron tres laboratorios, IRTA de Sant Carles de la Ràpita (Cataluña), Centro Agua del Pino del IFAPA (Andalucía) y CIMA (Galicia). El análisis de los resultados fue realizado por el equipo del IFAPA. Brevemente indicar que:

- Los resultados obtenidos tras el ejercicio no son satisfactorios y revelan las dificultades actuales de disponer de un método fiable para el diagnóstico sistemático de OsHV-1- μ var, sin tener que recurrir a la secuenciación de los amplicones
- El diagnóstico Histológico no presenta un acuerdo aceptable entre los tres laboratorios
- Los valores de acuerdo interlaboratorios revelan que los métodos moleculares ensayados no aportan resultados suficientemente concordantes.
- La sensibilidad diagnóstica alcanzada en los métodos de diagnóstico molecular no son las esperadas para este tipo de procedimientos.
- La especificidad encontrada es inferior a lo que cabría esperar, en particular en el diagnóstico histológico, indicando que los criterios histopatológicos no son uniformes.
- El índice de Youden, la probabilidad de realizar un diagnóstico correcto, presentó valores no aceptables, alcanzando en el mejor de los casos el 0,6.
- El procedimiento POS-1 (PCR C2/C6+RFLP Mfel) presentó resultados ligeramente mejores que el POS-2 (PCR HerpF/R).

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

Actividad 2.1. Recopilación de información sobre los cultivos de *Crassostrea gigas* en el litoral de las CC AA implicadas, y elaboración de un plan de estudio epidemiológico.

En **Galicia**, en colaboración con la Organización de Productores de Galicia (OPOGA) se estableció un plan de seguimiento de lotes de semilla de ostra rizada de distinta procedencia, que se introducirían en los polígonos de cultivo donde se engorda la ostra rizada para evaluar su crecimiento, supervivencia y prevalencia del virus OsHV-1 a lo largo del proceso de engorde. Aprovechando la red de muestreos del INTECMAR para conocer el estado de salud de bancos y áreas de cultivo de moluscos bivalvos, se decidió diagnosticar la presencia de OsHV-1 en las muestras de bancos asilvestrados de *Crassostrea gigas* del litoral de Galicia

La información recopilada muestra que actualmente, en **Andalucía**, no se realiza la producción de semilla de *Crassostrea gigas* en criadero. En el litoral gaditano existen dos zonas de engorde (Santibáñez y Conil) que se han abastecido históricamente de semilla de procedencia francesa. Respecto al litoral onubense, existe una actividad fundamentalmente extractiva de los bancos naturales de los ríos Guadiana, Piedras y Carrera.

La caracterización de las zonas de estudio en **Cataluña** se realizó en las bahías del delta del Ebro (Alfacs y Fangar). Históricamente, desde el año 2000 al 2011, en la bahía del Fangar han sido registradas mortalidades de *Crassostrea gigas* en los meses de mayo y junio. Desde el año 2009, dichas mortalidades ocurrieron desde el inicio de abril. En algunos casos las mortalidades fueron del 100%.

En **Asturias** para el estudio epidemiológico, se recabó información de cada una de las concesiones, cuanto a superficies en explotación, autorizaciones, movimientos, procedencia de la semilla, tamaño, cantidad etc., así como especies acompañantes y parámetros medioambientales de la zona de producción. El cultivo de ostra *C. gigas* se inicia en el año 1985, en la ría del Eo, registrándose máximos de siembras y de producción de 14 millones de unidades al año y 450 Tm/año, respectivamente. La procedencia de la mayoría de los lotes era de Francia, hasta que en el 2008 se paralizan las importaciones y se sustituye por criaderos nacionales. El cultivo se realiza en zona intermareal, ocupando una superficie total de 31,8 Has, repartidas en 4 concesiones de cultivo. El engorde se realiza en sacos sobre parrillas durante 1,5 a 2 años de cultivo. El protocolo zosanitario, se inicia con la solicitud de autorización de siembra y el análisis de una muestra previa de la semilla, de los patógenos asociados a cada una de las especies.

Actividad 2.2 Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas.

En **Galicia**, se concluyó que la infección por virus OsHV-1 μ var afecta al engorde ostra rizada en los dos polígonos de la ría de Arousa implicados en este

estudio, provocando una mortandad elevada en la semilla de ostra rizada que se acentúa cuanto menor es la edad de la semilla. El impacto de la enfermedad se puede minimizar iniciando el engorde con individuos de mayor edad. El uso de semilla inicialmente libre del virus no garantiza una supervivencia elevada si el engorde se realiza en una zona afectada por el OsHV-1 μ Var, pues la infección se adquiere en un plazo muy corto. La semilla de ostra plana es tolerante a la infección por OsHV-1 μ var, aunque no hay que desdeñar su posible papel como reservorio de OsHV-1 μ var. En Galicia también se han realizado los análisis de diagnóstico de las muestras correspondientes a un estudio epidemiológico centrado en un área de cultivo de ostra rizada en el **litoral asturiano**, así como de muestras de bancos asilvestrados de ostra rizada de las rías de Viveiro y O Barqueiro. El OsHV-1 μ var está presente en el litoral asturiano pero no hay evidencia de su presencia en las dos rías gallegas mencionadas. Conviene preservar los bancos asilvestrados de ostra rizada de las rías de Viveiro y O Barqueiro libres del virus, pues además de garantizar la sostenibilidad de su explotación, dichos bancos podrían ser fuente de semilla sana para engordar en otras zonas libres del virus y de reproductores sanos para su utilización en criaderos

En **Andalucía** se constató que el OsHV-1 μ var está presente en las ostras de los tres ríos analizados del litoral onubense (Guadiana, Carreras y Piedras) siendo significativamente más abundante en el río Carreras; el herpesvirus OsHV-1 μ var está presente en las tres especies de ostras analizadas del litoral onubense, no encontrando diferencias significativas de prevalencia entre las especies, excepto entre *C.angulata* y *O. stentina* en el río Piedras. Los resultados positivos de cada especie y río fueron confirmados mediante la secuenciación e ISH.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo en **Cataluña**, el OsHV-1 está presente todo el año en *C. gigas* cultivado en la bahía del Fangar, aunque su prevalencia aumenta durante el periodo en que se manifiestan mortalidades. Todas las muestras analizadas por PCR- RFLP:C2_C6 >Mfel han resultado ser de la microvariante, lo que es coherente con resultados previos del grupo.

En **Asturias** durante los meses de verano del 2010 y 2011 surgen mortalidades. Se envían muestras de los supervivientes al CIMA de la Xunta de Galicia y se detecta la presencia del Herpesvirus OsHv-1 μ var, con prevalencias del 20% y 50%, respectivamente. Posteriores análisis de los lotes afectados confirman la presencia del Herpesvirus en un 3% y con registros de mortalidad del 1% mensual, lo que nos indica que una vez superado el primer episodio de mortalidad, en su fase juvenil, esta se mantiene en unos valores normales y asumibles. En el 2012, el Principado de Asturias, comunica a la Secretaría General de Pesca el episodio de mortalidades sufridas y refuerza el control zosanitario, con el fin de evitar la propagación de la enfermedad y erradicar los Herpesvirus de las explotaciones de cultivo en la ría del Eo.

Actividad 2.3. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana).

En **Galicia**, se analizaron dos muestras de mejillón *Mytilus galloprovincialis* recogidas en **Ceuta** y muestras de mejillón recogidas en sendas bateas de los polígonos GROVE A y CAMBADOS D, donde se había detectado OsHV-1 μ Var en muestras de ostra rizada. No se registró ningún caso positivo de OsHV-1 en las muestras de mejillón. Estos resultados no descartan la susceptibilidad de *M. galloprovincialis* al OsHV-1 y es necesario analizar semilla de menor edad procedente de zonas afectadas para determinar si el mejillón puede adquirir la infección y evaluar cuál puede ser su impacto en la mitilicultura española.

En **Andalucía** se puso en evidencia la presencia de OsHV-1- μ var en *Ostrea stentina* Los primeros análisis realizados sobre almeja fina, *R. decussatus*, del Río Carreras han puesto de manifiesto resultados positivos de la presencia de OsHV-1 que precisan ser confirmados por secuenciación e ISH. Desgraciadamente, estos análisis, junto con los de la presencia de OsHV-1 en *M. galloprovincialis* no han podido realizarse debido a la suspensión del proyecto en el 2013.

En **Cataluña** se observó que había mejillones positivos a la infección por herpesvirus en las dos bahías, que mostraban prevalencias superiores al 10%. Al igual que en el caso de *C.gigas*, todas las muestras analizadas por PCR-RFLP:C2_C6 >Mfel han resultado ser de la microvariante, El OsHV-1 está presente todo el año en *M. galloprovincialis* cultivado en la bahía del Fangar. Esta presencia tiene una prevalencia variable al largo del año. Observando conjuntamente los datos de prevalencia obtenidos en ostra rizada y mejillón, parecen indicar que el mejillón funcionase como un reservorio del virus. Sería muy importante profundizar en este tema, haciendo estudios de transmisión, ya que la estrategia de gestión de este patógeno debe basarse tanto en datos epidemiológicos como funcionales, por lo que es crucial saber si el herpes es viable en el mejillón y donde su ubica (esto se podrá analizar con las muestra tomadas para hibridización *in situ*).

Actividad 2.4. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en criaderos de *Crassostrea gigas*.

En **Asturias**, ante la situación planteada: presencia de Herpesvirus en los parques de cultivo y dificultad para el aprovisionamiento de semilla con garantías sanitarias, se planteo la producción de semilla en las instalaciones del CEP. Esta actuación, aunque ajena al proyecto HERPEMOL, se basó en el apoyo del equipo del CIMA para la realización de los análisis oportunos. Los progenitores se recolectaron en un banco natural de la ría de Ribadesella. Los análisis realizados por el CIMA, revelaron que el 80% de la muestra presentaba un genotipo característico de *C. gigas* y un 20% hibridación entre *C. gigas* y *C.*

angulata. En cuanto a su estatus sanitario ausencia de Herpesvirus. Los reproductores se acondicionaron en el mes de febrero, realizando el cultivo larvario en el mes de junio. Una vez que se produjo la cementación de las larvas, la semilla se preengordó en el criadero hasta un tamaño de 4-6mm y en instalaciones flotantes en el medio natural, hasta el tamaño de siembra de 10-12 mm. En el mes de diciembre se estabulan un total de 500.000 juveniles repartidos en sacos sobre parrillas en los parques de cultivo de la ensenada de La Linera, junto con los supervivientes de las mortalidades sufridas en el 2010 y 2011.

Actividad 2.5. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas.

El análisis molecular de las variantes del virus realizado en **Andalucía** se ha centrado fundamentalmente en la secuenciación y comparación de los amplicones obtenidos. Todas las secuencias analizadas, tanto de *C. gigas*, *C. angulata* como de *O. stentina*, han resultado similares a OsHV-1- μ var. Un análisis más exhaustivo exige la clonación de un número significativo de amplicones, tarea que no ha podido ser concluida debido a la suspensión del proyecto.

2.5. CONCLUSIONES/APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL PLAN

- Mediante el análisis de los resultados del ejercicio de intercomparación se ha puesto de manifiesto la necesidad de mejorar los actuales métodos de diagnóstico de OsHV-1- μ var.
- El análisis de los biotipos *C. gigas* / *C. angulata* ha puesto de manifiesto que *C. angulata* sigue siendo la especie predominante en los bancos naturales de los ríos Guadiana, Carreras y Piedras en Andalucía.
- Los resultados disponibles muestran que OsHV-1- μ var es la variedad predominante de OsHV-1 detectada en ostreidos en Galicia, Andalucía, Cataluña y Asturias.
- En Galicia, la infección por virus OsHV-1 μ var afecta al engorde ostra rizada en los dos polígonos de la ría de Arousa implicados en este estudio, provocando una mortandad elevada en la semilla de ostra rizada que se acentúa cuanto menor es la edad de la semilla. El impacto de la enfermedad se puede minimizar iniciando el engorde con individuos de mayor edad.

- El uso de semilla inicialmente libre del virus no garantiza una supervivencia elevada si el engorde se realiza en una zona afectada por el OsHV-1 μ var, pues la infección se adquiere en un plazo muy corto.
- En Galicia, no se ha detectado la presencia de OsHV-1 en los bancos asilvestrados de ostra rizada de las rías de Viveiro y O Barqueiro, por lo que es importante preservar estos bancos libres del virus para garantizar la sostenibilidad de su explotación. Dichos bancos podrían ser fuente de semilla sana para engordar en otras zonas libres del virus y de reproductores sanos para su utilización en criaderos
- Se ha detectado la presencia de OsHV-1- μ var en los ostreidos del litoral de Huelva (*C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*). Su presencia se ha demostrado tanto por secuenciación de DNA como por ISH.
- En Andalucía, la prevalencia de la infección fue significativamente superior en el río Carreras, donde la actividad acuícola es mayor, afectando al 85% de los ostreidos analizados.
- En Cataluña, la infección OsHV-1 está presente todo el año en *C. gigas* cultivadas en la bahía del Fangar, aumentando la prevalencia cuando aumentan las mortalidades.
- La semilla de ostra plana es tolerante a la infección por OsHV-1 μ var, aunque no hay que desdeñar su posible papel como reservorio de OsHV-1 μ Var.
- Se detectan individuos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) infectados por el herpesvirus OsHV-1 en las bahías de Alfacs y Fangar en Cataluña. No se registró ningún caso positivo de OsHV-1 en las muestras de mejillón en Galicia y Ceuta. En Galicia es necesario analizar semilla de menor edad procedente de zonas afectadas para determinar si el mejillón puede adquirir la infección y evaluar cuál puede ser su impacto en la mitilicultura española.

2.6. VALORACIÓN

- El presente proyecto ha permitido la primera evaluación del efecto de la introducción de *C. gigas* sobre los tradicionales bancos naturales de *C. angulata* del litoral onubense. Del mismo modo, ha supuesto los primeros datos sobre la presencia de OsHV-1- μ var en el litoral onubense y en la ría de Arosa.
- La aplicación de medidas como el seguimiento de los lotes afectados y el control de todas las partidas de semilla que se introduzcan, resultan imprescindibles para la erradicación de la patología. Por otra parte la existencia de poblaciones salvajes libres de Herpesvirus y la capacidad de producción de juveniles, son fundamentales para llevar a cabo una buena

gestión de la actividad, minimizando los riesgos de infección y posibilitando la supervivencia y rentabilidad de los cultivos.

2.7. DIFUSIÓN

- En el 2010 en Asturias, se desarrolla un Plan de Vigilancia para Herpesvirus (OsHV-1 μ var) en *C.gigas*, en colaboración con el Laboratorio Nacional de Referencia de Moluscos de Vigo, con el objetivo de conocer el estatus zosanitario de la ostra *C.gigas* en la ría del Eo y poder analizar todas las partidas de semilla introducidas, para una mejor gestión de los parques de cultivo de la ría del Eo. En el 2012, y ante los episodios de mortalidades sufridos, el Principado de Asturias comunica a la Secretaría General de Pesca mortalidades anormales superiores al 50%. Se refuerza el control zosanitario de todas las partidas con la finalidad de evitar la propagación de la enfermedad y los Herpesvirus en la ría del Eo.
- López-Sanmartín M.*, Navas-Triano J. I. Detection of Ostreid Herpesvirus-1-microvar in *Crassostrea* spp. from Huelva coast (SW Spain). AQUA 2012, Praga 1-5 septiembre 2012.
- López-Sanmartín M., Navas J. I. Prevalencia y distribución del OSHV-1 μ var en ostras del litoral de Huelva. FIRMA Cádiz, 26-29 noviembre 2012

Las tareas de difusión del proyecto HERPEMOL estaban programadas en la última anualidad del proyecto, año 2013. Con la suspensión del proyecto, estas tareas han quedado en su mayoría sin realizar.

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

En Andalucía, la puesta a punto de los métodos de diagnóstico molecular para OsHV-1- μ var y los resultados poco satisfactorios del ejercicio de intercomparación han exigido que una gran parte de los resultados positivos hayan tenido que ser confirmados por secuenciación de los amplicones. Esto ha ralentizado el desarrollo del diagnóstico en el amplio número de ejemplares muestreados, completándose el análisis en un total de 287 ejemplares. La suspensión del proyecto ha truncado el desarrollo del estudio epidemiológico que estaba previsto a pesar de la reducción del 60% del presupuesto en el segundo año.

En Asturias, en el 2012, y ante la constancia de Herpesvirus en la ría del Eo y la dificultad para el aprovisionamiento de semilla con garantías sanitarias, se producen 500.000 unidades en las instalaciones del CEP. Esta actuación, aunque ajena al proyecto, se basó en el apoyo del equipo del CIMA para la realización de los análisis y se planteó con la finalidad de obtener juveniles sanos que pudieran garantizar la viabilidad de los cultivos, evitando la dispersión de la enfermedad.

u

INFORME FINAL EXTENSO

1.- DATOS ADMINISTRATIVOS

TITULO: Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos y evaluación del impacto de la enfermedad. HERPEMOL

FECHAS DE REALIZACIÓN

Inicio: 1 de Enero de 2011

Finalización: 31 de Diciembre de 2012

DATOS DEL COORDINADOR DEL PROYECTO

Nombre y Apellidos: Elvira Abollo Rodríguez

Organismo: Fundación Pública

Centro: Centro Tecnológico del Mar- Fundación CETMAR

Departamento: Tecnología de Productos Pesqueros

Teléfono: 986 247 047

Fax.: 986 294 587

Correo electrónico: eabollo@cetmar.org

Dirección Postal: Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo

PARTICIPANTES por cada Comunidad Autónoma CENTROS DE INVESTIGACIÓN

GALICIA

Tipo de centro: Organismo Público

Nombre: Centro de Investigación Mariñas (CIMA). Consellería do Mar. Xunta de Galicia.

CIF: S1511001H

Nombre Representante Legal: José Molaes

Tipo de centro: Organismo Público

Nombre: Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR). Consellería do Mar. Xunta de Galicia

CIF: S1511001H

Nombre Representante Legal: Covadonga Salgado

ANDALUCIA

Tipo: Organismo Público

Nombre: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía

CIF: Q4100689A

Nombre del representante legal: Francisco Javier de las Nieves López (Presidente del IFAPA)

CATALUÑA

Tipo: Empresa pública de I+D

Nombre: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

CIF: Q-5855049-B

Nombre del representante legal: Agustí Fonts Cavestany

ASTURIAS

Tipo: Organismo Público

Nombre: Centro de Experimentación Pesquera. Dirección General de Pesca Marítima

CIF: S-3333001-J

Nombre del representante legal: Alberto Vizcaíno Fernández

CEUTA

Tipo: empresa pública

Nombre: Obras, Infraestructuras y Medio Ambiente de Ceuta S.A.U.

CIF: 51004422

Nombre del representante legal: Gregorio García Castañeda

DATOS DE LOS INVESTIGADORES

GALICIA

Apellidos: Abollo Rodriguez
Nombre: Elvira
Organismo: Fundación Publica
Centro: Fundación CETMAR
Departamento: Tecnología de Productos Pesqueros
Teléfono: 986 247 047
Fax.: 986 294 587
Correo electrónico: eabollo@cetmar.org
Dirección Postal: Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo

Apellidos: Maroto Leal
Nombre: Julio
Organismo: Fundación Publica
Centro: Fundación CETMAR
Departamento: Tecnología de Productos Pesqueros
Teléfono: 986 247 047
Fax.: 986 294 587
Correo electrónico: jmaroto@cetmar.org
Dirección Postal: Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo

Apellidos: Fernández Cañamero
Nombre: Maria Luisa
Organismo: Fundación Publica
Centro: Fundación CETMAR
Departamento: Control y gestión del medio y los recursos marinos
Teléfono: 986 247 047
Fax.: 986 294 587
Correo electrónico: mfernandez@cetmar.org
Dirección Postal: Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo

Apellidos: Diez Arenas
Nombre: Raquel
Organismo: Fundación Publica
Centro: Fundación CETMAR
Departamento: Control y gestión del medio y los recursos marinos
Teléfono: 986 247 047
Fax.: 986 294 587
Correo electrónico: mfernandez@cetmar.org
Dirección Postal: Eduardo Cabello s/n. 36208 Vigo

Apellidos: Villalba García
Nombre: Antonio
Organismo: Conselleria do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Investigacións Mariñas
Departamento: Patología

Teléfono: 886206331
Fax.: 886206372
Correo electrónico: villalba@cimacoron.org
Dirección Postal: Pedras de Corón s/n. Apto.13 Vilanova de Arousa, 36620

Apellidos: Ramilo Álvarez
Nombre: Andrea
Organismo: Conselleria do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Centro de Investigacións Mariñas
Departamento: Patología
Teléfono: 886206364
Fax.: 886206372
Correo electrónico: ramilo.andrea@cimacoron.org
Dirección Postal: Pedras de Corón s/n. Apto.13 Vilanova de Arousa, 36620

Apellidos: Darriba Couñago
Nombre: Susana
Organismo: Conselleria do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR).
Departamento: Patología
Teléfono: 986512320
Fax.:
Correo electrónico: sdarriba@intecmar.org
Dirección Postal: Pedras de Corón s/n. Apto.13 Vilanova de Arousa, 36620

Apellidos: Pérez Bello
Nombre: José Luis
Organismo: Conselleria do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia
Centro: Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR).
Departamento: Patología
Teléfono: 986512320
Fax.:
Correo electrónico: jlperéz@intecmar.org
Dirección Postal: Pedras de Corón s/n. Apto.13 Vilanova de Arousa, 36620

ANDALUCIA

Apellidos: Navas Triano
Nombre: José Ignacio
Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA).
Centro: Agua del Pino
Departamento: Producción
Equipo: Laboratorio de Patología

Teléfono: 671532203 / 671532204
Fax.: 959038803
Correo electrónico: josei.navas@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Crta. El Rompido – Punta Umbría km 3.8, Cartaya 21459 (Huelva)

Apellidos: Moreno Escalante
Nombre: Oscar
Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA).
Centro: Agua del Pino
Departamento: Producción
Equipo:
Teléfono: 671532206 / 671532204
Fax.: 959038803
Correo electrónico: oscar.moreno@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Crta. El Rompido – Punta Umbría km 3.8, Cartaya 21459 (Huelva)

Apellidos: López Sanmartín
Nombre: Monserrat
Organismo: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA).
Centro: Agua del Pino
Departamento: Producción
Equipo: Laboratorio de Patología
Teléfono: 671532191 / 671532204
Fax.: 959038803
Correo electrónico: montserrat.lopez.ext@juntadeandalucia.es
Dirección Postal: Crta. El Rompido – Punta Umbría km 3.8, Cartaya 21459 (Huelva)

CATALUÑA

Apellidos: Furones Nozal
Nombre: M^a Dolores
Organismo RTA
Centro: Sant Carles de la Ràpita
Departamento: Programa acuicultura
Equipo: Salud acuática
Teléfono: 977745427 –Ext 1804
Fax.: 977 744138
Correo electrónico: dolors.furones@irta.cat
Dirección Postal: C/ al Poble Nou SN, Km 5.5.
43540 Sant Carles de la Ràpita.

Apellidos: Andree
Nombre: Karl
Organismo RTA

Centro: Sant Carles de la Ràpita
Departamento: Programa acuicultura
Equipo: Salud acuática
Teléfono: 977745427 –Ext 1817
Fax.: 977 744138
Correo electrónico: karl.andree@irta.cat
Dirección Postal: C/ al Poble Nou SN, Km 5.5.
43540 Sant Carles de la Ràpita.

Apellidos: Trigo de Sousa Roque
Nombre: Ana
Organismo: IRTA
Centro: Sant Carles de la Ràpita
Departamento: Programa acuicultura
Equipo: Salud acuática
Teléfono: 977745427 –ext 1809
Fax.: 977744138
Correo electrónico: ana.roque@irta.es
Dirección Postal: C/ al Poble Nou SN, Km 5.5.
43540 Sant Carles de la Ràpita.

Apellidos: Carrasco Querol
Nombre: Noèlia
Organismo: IRTA
Centro: Sant Carles de la Ràpita
Departamento: Programa acuicultura
Equipo: Salud acuática
Teléfono: 977 745427
Fax.: 977 744138
Correo electrónico: noelia.carrasco@irta.cat
Dirección Postal: Ctra Poblenou SN, km 5.5 .
43540 Sant Carles de la Ràpita

ASTURIAS

Apellidos: Rodríguez Rodríguez
Nombre: Carmen
Organismo: Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos.
Dirección General de Pesca Marítima
Centro: Centro de Experimentación Pesquera
Departamento: Acuicultura:
Teléfono: 985635020
Fax.:985635020
Correo electrónico:carmen.rodriguezrodriguez@asturias.org
Dirección Postal: Paseo del Muelle 3760 Castropol (Asturias)

Apellidos: Carrasco Fidalgo
Nombre: José Francisco.

Organismo: Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos.
Dirección General de Pesca Marítima.
Centro: Centro de Experimentación Pesquera
Departamento: Acuicultura
Teléfono: 985 312711
Fax: 985312899
Correo electrónico: josefrancisco.carrascofidalgo@asturias.org
Dirección Postal: Avda. Príncipe de Asturias s/n. 33212.Gijón(Asturias)

CEUTA

Apellidos: Martínez Medina
Nombre: Francisco Javier
Organismo: OBIMASA
Centro:
Departamento:
Equipo:
Teléfono: 956 520104
Fax.: 956 520103
Correo electrónico: FJMartinez@ceuta.es
Dirección Postal: Carretera Benzú-García Aldave, s/n, 51004, Ceuta.

2.- RESULTADOS TECNICOS DEL PLAN NACIONAL

2.1. OBJETIVOS INICIALES

El **objetivo general** del proyecto HERPEMOL fue abordar la caracterización de la situación sanitaria litoral de las CC AA implicadas en el proyecto en lo referente a las infecciones por virus herpes tanto en poblaciones de *Crassostrea gigas* como en otras especies de interés marisquero. Con los resultados epidemiológicos y de transmisión de la enfermedad, obtenidos en laboratorio en la primera fase del proyecto, se pretendía realizar una evaluación del impacto potencial de la enfermedad en sectores estratégicos de la acuicultura de moluscos. Asimismo todos estos resultados se volcarían en una guía con el fin de promover las buenas prácticas y evitar posibles eventos epizooticos.

Objetivos concretos a desarrollar:

Línea 0. Coordinación del proyecto.

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo).

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

Actividad 2.1. Recopilación de información sobre los cultivos de *Crassostrea gigas* en el litoral de las CC AA implicadas, y elaboración de un plan de estudio epidemiológico.

Actividad 2.2. Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas.

Actividad 2.3. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana).

Actividad 2.4. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en criaderos de *Crassostrea gigas*.

Actividad 2.5. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas.

Línea 3. Estudios de transmisión de la enfermedad causada por virus herpes.

Actividad 3.1 Estudios de transmisión horizontal de la enfermedad.

Actividad 3.2. Estudios de transmisión vertical de la enfermedad.

Línea 4. Evaluación del impacto de la enfermedad para la industria marisquera: Recomendaciones.

Actividad 4.1. Valoración del impacto potencial de la enfermedad por virus herpes en sectores de interés estratégico: la mitilicultura.

Actividad 4.2. Elaboración de una guía de buenas prácticas dirigida a los ostricultores de criadero y engorde, en relación con esta enfermedad y su manejo.

2.2. OBJETIVOS REALIZADOS.

Tras el recorte presupuestario del año 2012 y la supresión de la financiación al proyecto en el año 2013, los objetivos realizados han sido:

Línea 0. Coordinación del proyecto.

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo).

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

Actividad 2.1. Recopilación de información sobre los cultivos de *Crassostrea gigas* en el litoral de las CC AA implicadas, y elaboración de un plan de estudio epidemiológico.

Actividad 2.2. Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas.

Actividad 2.3. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana).

Actividad 2.4. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en criaderos de *Crassostrea gigas*.

Actividad 2.5. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas.

2.3. METODOLOGÍA

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo).

Para el panel de muestras proeficiencia se utilizaron muestras de semilla de *Crassostrea gigas* infectada y no infectada que se había producido en dos criaderos de moluscos y que se habían transplantado a zonas de engorde de Asturias y Galicia. En total se analizaron 6 lotes de muestra de 30 individuos cada una (n=180) y se seleccionaron un total de 60 individuos para su inclusión en la prueba de intercalibración. El diagnóstico de todas esas muestras se llevó a cabo mediante PCR, de acuerdo con el protocolo recogido en el Reglamento 175/2010 de la UE. Además, todos los individuos se procesaron mediante técnicas histológicas y un corte histológico de cada uno se examinó con microscopía óptica para diagnosticar la infección vírica y las lesiones ocasionadas. El grupo del CIMA fue el encargado de elaborar el panel de muestras proeficiencia.

Para iniciar los ensayos de validación se desarrolló un Procedimiento Operativo Standard (POS), en el que se recogió un protocolo detallado para la validación de las técnicas histológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad causada por el OsHV-1 y su microvariante. El grupo del CETMAR fue el encargado de elaborar el POS. En los análisis participaron tres laboratorios, IRTA de Sant Carles de la Ràpita (Cataluña), Centro Agua del Pino del IFAPA (Andalucía) y CIMA (Galicia). A cada grupo participante en la prueba en anillo se le envió desde CETMAR un POS y las Hojas de Resultados a cubrir. En los documentos que se anexan al final de la memoria se incluye el POS que se ha desarrollado (*anexo1-HERPEMOL-POS.pdf*). Las hojas de resultados es una forma estandarizada de dar los resultados obtenidos, bajo instrucciones que se detallan en el POS de forma que no se incurran en errores subjetivos de interpretación. La redacción del POS y la estructuración de las hojas de resultados realizadas por CETMAR detallan el desarrollo de los objetivos específicos. Desde el CIMA se enviaron a los grupos participantes en la prueba de intercalibración las muestras proeficiencia y el siguiente material:

1. Preparaciones histológicas.
2. Pieza Tejido en etanol al 96% de 60 individuos
3. Alícuota de primers HerpF/R (10 micromolar).
3. Plásmido C+ con el fragmento HerpF/R de OsHV-1 μ var.
4. Plásmido C+ con el fragmento HerpF/R de OsHV-1.
5. Plásmido C+ con el fragmento C2-C6 de OsHV-1 μ var.

El POS recogía dos procedimientos diagnósticos diferentes. El primero utiliza los cebadores diseñados para este proyecto (Herp F / Herp R), que amplifican fragmentos de ADN que difieren en un tamaño de aproximadamente

15 pb entre OsHV-1 y OsHV uvar. El segundo utiliza cebadores C2 y C6 (Renault et al 2000 *), que amplifican una región cercana a una repetición de “ACT”, e incluye varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. El producto de PCR (aproximadamente 700 pb) después de la digestión con el enzima *Mfe* I, produce dos bandas de ADN vírico de OsHV uvar. A su vez, cada laboratorio tenía la posibilidad de realizar también dicho POS utilizando sus propios reactivos. Por último, el IRTA propuso una modificación de las condiciones de la PCR con HerpF/R que fue también ensayada por los otros dos laboratorios (CIMA e IFAPA). Tras la realización de los análisis correspondientes a esta prueba de intercalibración, los resultados obtenidos en el CIMA, IFAPA e IRTA se enviaron al Centro de Referencia siguiendo el cauce acordado.

El análisis estadístico de los resultados fue realizado por JI Navas (IFAPA). El análisis se basó en la determinación de la concordancia o acuerdo inter e intra laboratorios mediante el coeficiente Kappa (Cohen, 1960) y en la estimación de la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica mediante el análisis de clases latentes utilizando el programa de cálculo Bayesiano “tt2” desarrollado por Joseph et al. (1995). Una vez estimados Se y Sp, se calculó el Índice de Youden ($J=Se+Sp-1$) (Youden, 1950) como probabilidad de un diagnóstico correcto (Fig. 1).

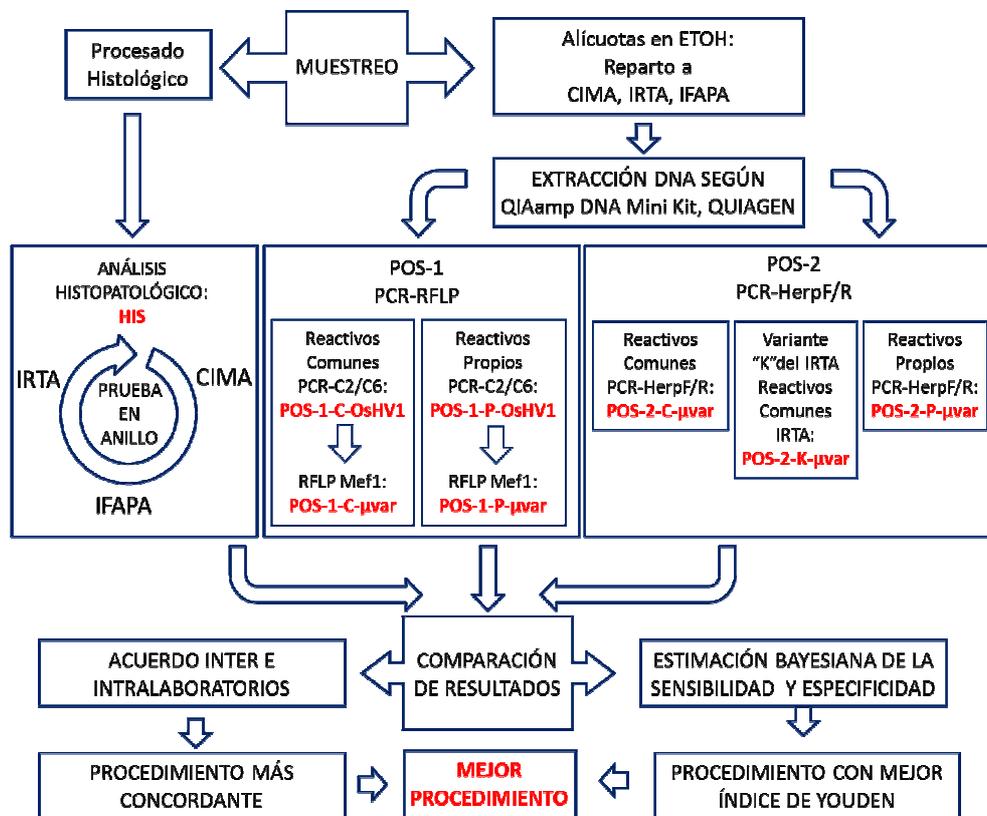


Figura 1. Esquema del ejercicio intercomparativo.

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

Actividad 2.1. Recopilación de información sobre los cultivos de *Crassostrea gigas* en el litoral de las CC AA implicadas, y elaboración de un plan de estudio epidemiológico.

GALICIA:

A lo largo del año 2011 se intentó en repetidas ocasiones formalizar una reunión con responsables de la gestión de la acuicultura de moluscos de la Administración de Galicia, para recabar información sobre localización de bateas dedicadas al cultivo de ostra *C. gigas* y personas titulares de dichas bateas. Por diversas circunstancias no fue posible recabar tal información, por lo que los propios investigadores de Galicia implicados en el proyecto establecieron las pautas a seguir para el desarrollo del estudio epidemiológico a lo largo del 2012 y 2013 utilizando información propia y la suministrada por la Organización de Productores de Ostra de Galicia (OPOGA).

ANDALUCÍA.

Se ha indagado mediante comunicación directa con los acuicultores y cooperativas el estado actual de la situación del cultivo de *C. gigas* en el litoral atlántico andaluz. Siguiendo el planteamiento inicial, se estableció un plan de muestreo a desarrollar en 2012/13 que abarca los principales bancos naturales localizados en:

- Río Carreras
- Río Piedras
- Desembocadura del río Guadalquivir
- Bahía de Cádiz

Las muestreos se establecieron al azar, sin selección de la talla y con periodicidad trimestral, iniciándose en julio de 2012, muestreándose también en octubre-noviembre de 2012, quedando suspendidos a partir de 2013.

CATALUÑA:

Más información relativa a la zona de estudio se puede consultar en el documento que se anexa al final de la memoria (*anexo2-HERPEMOL-zonas_de estudio Cataluña*).

En el año 2011, el trabajo se llevó a cabo en la bahía del Fangar, por ser en la que la producción de *C.gigas* es ampliamente mayoritaria y donde las mortalidades habían sido anteriormente registradas y seguidas por el equipo del IRTA. Según las estadísticas oficiales del DGPIAM (<http://www20.gencat.cat/portal/site/DAR>), entre las especies de bivalvos explotados se encuentran, por orden de importancia: la ostra rizada (*Crassostrea gigas*), el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y la almeja (*Ruditapes philippinarum*). No se dispone de estadísticas separadas para cada bahía, la zona de estudio de la Bahía del Fangar tiene 74 bateas fijas para el cultivo suspendido, donde entre el 60 y el 70% son utilizadas para el cultivo de la ostra rizada y el resto para el cultivo de mejillón.

En total, en la bahía del Fangar se producen cerca de 400 toneladas anuales de ostra rizada (cerca de 4 millones de individuos) para los cuales se requieren una cantidad mínima de 5 millones de semilla. La semilla generalmente llega con cerca de 5 mm de largo de concha y crece hasta un mínimo de 98 mm, lo cual tarda de 12 a 13 meses. Históricamente, en esta bahía han sido registradas mortalidades en los meses de mayo y junio desde el año 2000 al 2011. Desde el año 2009, dichas mortalidades ocurrieron desde el inicio de abril. En algunos casos las mortalidades fueron del 100%.

El IRTA ha llevado a cabo, por encargo de la Dirección General de Pesca y Asuntos Marítimos (DGPIAM, por sus siglas en catalán) del Gobierno de Cataluña, un seguimiento de los episodios de mortalidad desde el año 2005. Dichos estudios se basaron en la hipótesis de una causa por vertidos de productos fitosanitarios, no obstante, en el estudio se tomaron muestras microbiológicas (incluyendo herpes virus), histológicas, inmunológicas y fundamentalmente toxicológicas. Los resultados toxicológicos no fueron concluyentes y la etiología vírica se presentó como la más factible.

A pesar de que no se lleva a cabo un programa consolidado de monitoreo, los datos históricos recopilados de las prevalencias de Herpes virus en los cultivos de ostrón en la bahía, se recogen en el trabajo recientemente publicado (Roque et al. 2012 First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 324-325: 303-306.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848611008295>)

En el año 2012, el trabajo se concentró en el seguimiento de la prevalencias en las poblaciones de cultivo de mejillón, haciendo extensivo el estudio a la bahía de Alfacs. Esta ampliación a otra zona de estudio se decidió por el hecho de que hay movimientos de lotes de animales entre las dos bahías, lo que supone un riesgo potencial para la expansión del patógeno en el caso de que el mejillón pudiese actuar como reservorio y/o portador, debido a las traslaciones y al volumen de los movimientos. De la producción acuícola en la Bahía de Alfacs, la especie más importante es el mejillón mediterráneo, seguido de la ostra rizada y de las almejas fina y japonesa explotadas en 90 viveros. Además, en la bahía hay depuradoras de bivalvos y 18 centros de expedición.

ASTURIAS:

La metodología de trabajo se basó en la recopilación de la información de todas las explotaciones de cultivo en cuanto a stocks y movimientos de entradas y salidas de todos los lotes de siembra.

Actividad 2.2. Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas.

GALICIA:

1. Evaluación del impacto de la infección por virus herpes en el engorde de ostra rizada en Galicia.

El CIMA, con la colaboración del INTECMAR, inició un seguimiento de la evolución del crecimiento, la supervivencia y la prevalencia de la infección por OsHV-1 de varios lotes de semilla de ostra rizada a lo largo del engorde en la ría de Arousa, para evaluar el impacto del virus OsHV-1 en el cultivo de la ostra rizada en Galicia. El seguimiento se llevó a cabo en sendas bateas de dos polígonos de cultivo de la ría de Arousa, GROVE A y CAMBADOS D, ambas dedicadas al engorde de ostra rizada (Fig. 2). El primer lote de semilla de ostra rizada (4.000 individuos) provenía directamente de Francia, importado por una empresa de engorde de ostra, y se introdujo el 03/05/2012 en la batea del polígono GROVE A, con una talla media inicial de 10,4 mm; parte del lote (2.000 individuos) se transfirió a la batea del polígono CAMBADOS D el 30/05/2012.

También se incluyeron en el estudio dos lotes de semilla de ostra rizada producida en un criadero gallego, uno recogido directamente del criadero (2.000 individuos de talla media de 8,9 mm) y el otro recogido tras un preengorde en un semillero flotante (2.000 individuos de talla media de 23,9 mm); además se incluyó un lote de semilla de ostra plana *Ostrea edulis* (1.000 individuos de talla media de 26,1 mm) producida en un criadero gallego diferente del anterior. Todos los lotes derivados de criaderos gallegos se emplazaron en la batea del polígono GROVE A el 11/07/2012. Para el engorde de la semilla se siguieron los procedimientos habituales en este sector acuicultor. El seguimiento se basó en la recogida de muestras con periodicidad aproximadamente mensual. En cada muestreo, de cada lote de semilla se recogieron 30 individuos que se llevaron al laboratorio para su examen y diagnóstico; además se realizaron conteos de individuos vivos y muertos para estimar tasas de mortalidad, con un mínimo de 8 réplicas por lote. A partir de la tasa de mortalidad se calculó la mortalidad acumulada en cada fecha de muestreo. En el laboratorio, cada individuo se midió, se pesó y se procesó para su examen histológico y el diagnóstico de OsHV-1 mediante PCR, con los cebadores HERP-F/R diseñados en el seno de este proyecto.

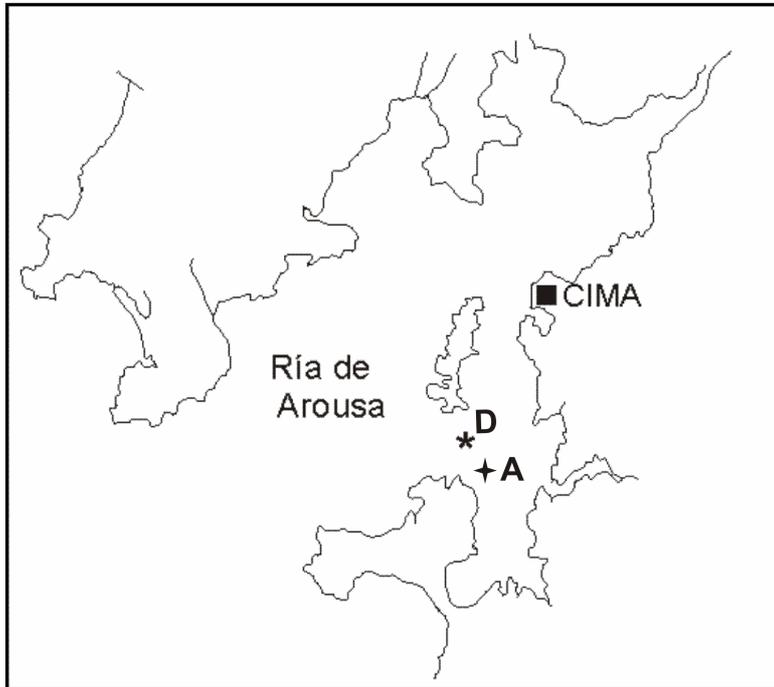


Figura 2. Mapa en el que se muestra la localización de los polígonos de cultivo GROVE A (A) y CAMBADOS D (D) en la ría de Arousa.

2. Otras líneas de investigación epidemiológica.

El equipo del CIMA ha realizado los análisis de diagnóstico de las muestras correspondientes a un estudio epidemiológico centrado en un área de cultivo de ostra rizada en el litoral asturiano de la ría del Eo (recogido con detalle en el apartado del informe correspondiente a Asturias), así como de muestras de bancos asilvestrados de ostra rizada de las rías de Viveiro y O Barqueiro, (Fig. 3) recogidas en el verano y el otoño de 2012. En el caso de O Barqueiro, se analizaron dos muestras recogidas el 10/07/2012, con ostras de un tamaño medio (\pm ES) de $88,7 \pm 3,39$ mm y $37,4 \pm 1,09$ mm, respectivamente, y una muestra del 30/10/2012, con ostras de un tamaño medio de $74,8 \pm 1,79$ mm. En el caso de Viveiro, se analizó una muestra del 10/07/2012, con ostras de un tamaño medio de $82,2 \pm 2,83$, y una muestra del 12/11/2012, con ostras de un tamaño medio de $93,6 \pm 2,09$. En el laboratorio, cada individuo se midió, se pesó y se procesó para su examen histológico y el diagnóstico de OsHV-1 mediante PCR, con los cebadores HERP-F/R diseñados en el seno de este proyecto

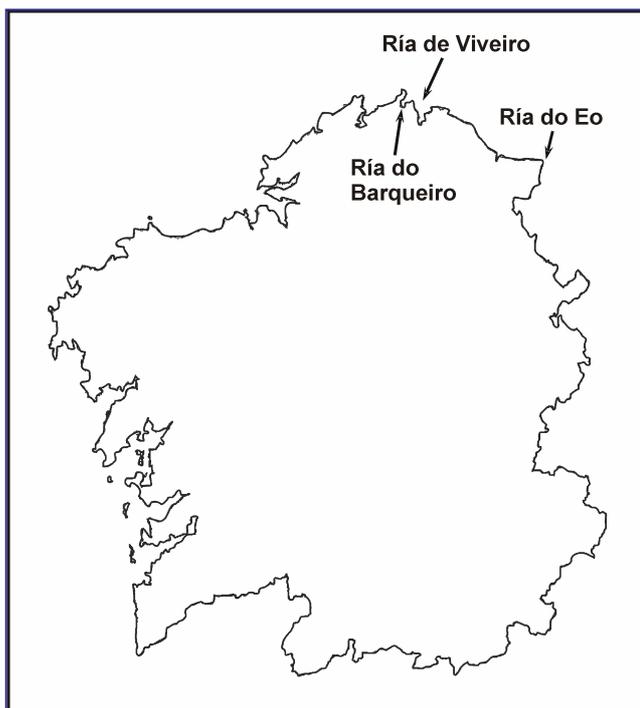


Figura 3. Mapa de Galicia en el que se muestra la localización de las rías de Viveiro, O Barqueiro y Eo.

ANDALUCÍA:

Coincidiendo con el inicio del proyecto, la CA de Andalucía llevó a cabo, en mayo junio de 2011, un primer muestreo exploratorio de los principales bancos naturales de ostra en el litoral onubense como base del posterior estudio epidemiológico. Los bancos naturales muestreados fueron los localizados en los ríos Guadiana, Carreras y Piedras. Durante 2012 se cumplió el programa de muestreo establecido en el plan de estudio epidemiológico

Los muestreos se realizaron al azar y sin selección de la talla, Las muestras se trasladaron refrigeradas al laboratorio y se abrieron en condiciones asépticas para evitar la contaminación cruzada entre individuos, Para la posterior extracción del DNA, una porción significativa de cada vianda se conservó en una solución saturada de NaCl en DMSO al 20% y EDTA 25 mM (Seutin et al 1991) El resto de vianda se procesó hasta su inclusión en parafina para posteriores estudios mediante histología clásica o hibridación in situ (ISH).

La extracción de DNA se realizó utilizando QIAmp DNA MiniKit (Quiagen) tras la cual se procedió a:

1. La identificación molecular de *Crassostrea gigas*, *C. angulata* y *Ostrea stentina* mediante el análisis del gen 5S rRNA y siguiendo el procedimiento por Cross y Rebordinos (2006). La diferenciación entre *C. gigas* y *C. angulata* se realizó mediante PCR-RFLP del gen mitocondrial de la

citocromo oxidasa subunidad I (Boudry et al 1998). La confirmación de *O. stentina* se llevó a cabo por secuenciación del fragmento amplificado del gen mitocondrial.

2. El diagnóstico de OsHV1 y su variantes OsHV1-var y OsHV1- μ var y en ostreidos mediante amplificación por PCR de la región C, usando los cebadores C2-C6 y posterior análisis RFLP utilizando las enzimas XhoI, StyI y AclI(=XapI) (Arzul et al 2001) y MfeI (Aranguren et al., 2012). Un gran parte de los positivos fueron confirmados por secuenciación del amplicón..
3. La demostración de la presencia de OsHV1 en los tejidos del molusco mediante hibridación *in situ* (ISH) utilizando la sonda C2-C6 sintetizada de *novo* y marcada con DIG-11-dUTP (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche Applied Science). También se han ensayado tres nuevas sondas diseñadas sobre la región C del genoma del virus:
 1. S1: para la detección de OsHV-1
 2. S2: para la detección de OsHV1 y OsHV-1 μ var
 3. S3: para la detección de OsHV-1var

CATALUÑA:

Criterios para la toma de muestras:

1. *Edad y etapa del ciclo de vida respecto a prevalencias e intensidad de infección.* Esta reportado que el virus afecta mayoritariamente a juveniles de primer año, siendo la mortalidad inversamente proporcional a la talla.
2. *Estacionalidad.* Las mortalidades se detectan habitualmente en la segunda quincena del mes de abril y pueden continuar hasta el mes de julio.
3. *Parámetros ambientales.* Las observaciones en el Delta, confirman, al igual que en otros lugares, que las mortalidades comienzan cuando la temperatura del agua es igual o mayor a 16°C.

Cronograma: El muestreo, tal y como estaba programado, se hizo con frecuencia estacional durante un año, iniciándose en otoño del 2011. Se muestreó la bahía del Fangar en las siguientes fechas: 20 de diciembre de 2011 (Otoño) , 12 de marzo de 2012 (invierno) , 12 de abril de 2012 (primavera) y 28 de agosto de 2012 (verano).

Tamaño de muestra: En todos los muestreos se tomaron 150 individuos de los cuales que se extrajo su ADN. Estos individuos se procesaron individualmente en

lotes de 30, que se iban analizando de 30 en 30 hasta que se obtenían positivos en un lote.

Procesamiento de muestras: Se llevó a cabo la extracción de todos los ADNs de forma individual con el Kit DNeasy blood and tissue (Qiagen), se ajustó la cantidad a 50 ng/μl. A la espera de tener un protocolo de diagnóstico definitivo, consensuado y validado para el proyecto. Se llevó a cabo una primera valoración para conocer la prevalencia de virus herpes de ostra rizada, llevando a cabo la prueba de PCR C2-C6 en lotes de 30 individuos (Renault et al 2000). En caso de que el lote analizado fuese totalmente negativo a la infección por virus herpes se procedería a analizar un lote más de 30 individuos y así sucesivamente hasta alcanzar los 150 individuos con el fin de asegurar que realmente la bahía no está infectada. Para la muestra de Diciembre, dado que inicialmente se había obtenido un prevalencia muy alta en los primeros 30 individuos, la muestra de volvió a preparar y además se verificó el resultado analizando 30 individuos más. Para poder discriminar el herpesvirus microvar se llevó a cabo, con muestras seleccionas que daban bandas claras y bien definidas, una PCR- RFLP: C2_C6 cortando con el enzima de restricción *Mfe* I (según el POS proporcionado por la coordinadora del proyecto).

ASTURIAS:

Se diseñaron campañas de muestreos en las distintas zonas de cultivo, en cuanto a tamaño de muestra, periodicidades y envío de muestras al CIMA de la Xunta de Galicia.

Actividad 2.3. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana).

GALICIA:

Se analizaron dos muestras de mejillón *Mytilus galloprovincialis* recogidas el 28/06/2012 en Ceuta, con tamaños medios (\pm ES) de $63,4 \pm 2,48$ mm y $23,1 \pm 0,82$ mm, respectivamente. Asimismo se analizaron muestras de mejillón recogidas el 10/07/2012 en sendas bateas de los polígonos GROVE A y CAMBADOS D, donde se había detectado OsHV-1 μ Var en las muestras de ostra; el tamaño medio de las muestras de mejillón gallego fue de $72,3 \pm 1,16$ mm y $46,2 \pm 2,31$ mm en GROVE A y $70,6 \pm 3,55$ mm y $51,2 \pm 2,26$ mm en CAMBADOS D. En el laboratorio, cada individuo se midió, se pesó y se procesó para su examen histológico y el diagnóstico de OsHV-1 mediante PCR, con los cebadores HERP-F/R diseñados en el seno de este proyecto

ANDALUCÍA:

Coincidiendo con los muestreos de los bancos naturales de ostra se capturaron ejemplares de almeja fina y mejillón del río Carreras, procesándose los ejemplares de igual manera que las ostras y sometiéndose a idéntica metodología analítica.

CATALUÑA:

En el presente proyecto se estudió la presencia de herpesvirus OsHv-1 en las poblaciones de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) cultivado en las dos bahías del Delta del Ebro (Alfacs y Fangar). Las dos bahías son diferentes en cuanto a la hidrodinámica, pero también en cuanto a la densidad de *C. gigas* cultivadas. Como ya se ha indicado anteriormente, en la bahía de Alfacs la especie mayoritaria cultivada es el mejillón, habiendo muy poca ostra rizada, en comparación con Fangar, donde mayoritariamente se cultiva ostra rizada y muy poco mejillón. Más información relativa a la zona de estudio se puede consultar en el documento que se anexa al final de la memoria (*anexo2-HERPEMOL-zonas_de estudio Cataluña*).

Criterios para la toma de muestras: En Alfacs el mejillón siempre ha sido recogido en la misma batea, y en Fangar, donde hay poco mejillón se ha recogido en función de la disponibilidad, pero siempre que ha podido ser también en la misma localización o una localización cercana

Cronograma y tamaño de la muestra: Se recogieron 30 mejillones en cada uno de los muestreos, que fueron bimensuales y cubrieron prácticamente el mismo periodo del estudio de *C. gigas* en Fangar (de enero a agosto 2012), y un año completo adicional en Alfacs (de enero 2012 a enero 2013). Se recogió en cada caso muestra para histología/hibridación *in situ*, para análisis moleculares y para TEM.

Procesamiento de muestras: Al igual que para *C. gigas*, todas las muestras fueron procesadas para análisis moleculares, realizándose análisis de PCR convencional C2-C6 ((Renault et al 2000).

Las muestras donde la amplificación se mostró con más intensidad fueron identificadas para posteriores pruebas preliminares de hibridación *in situ* para la corroboración de los resultados por PCR. Así pues, la hibridación *in situ* se realizó a partir de cortes en parafina siguiendo el protocolo utilizado por Le Roux *et al.*, (1999) con pequeñas modificaciones y la sonda C2-C6 marcada con DIG-UTP. Tres productos amplificados para 3 lotes donde hubo detección de herpesvirus por PCR (enero 2012 Fangar, agosto 2012 Fangar), así como un amplicón de enero 2013 Alfacs, fueron enviados a secuenciar al servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia. Las secuencias están a la espera de ser analizadas en más profundidad en función de la información obtenida tras la revisión, en proceso, de los resultados positivos. Para poder discriminar el herpesvirus

microvar_ se llevó a cabo, con muestras seleccionadas que daban bandas claras y bien definidas, una PCR- RFLP: C2_C6 cortando con el enzima de restricción *Mfel* (según el P.O.S proporcionado por la coordinadora del proyecto).

Actividad 2.4. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en criaderos de *Crassostrea gigas*.

ASTURIAS:

El cultivo se llevó a cabo según protocolos clásicos utilizando para la fijación tamices con concha de ostra molida y preengorde en criadero y medio exterior en tanques con flujo invertido, en pantalán flotante.

Actividad 2.5. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas.

ANDALUCIA:

Como se ha mencionado en el apartado 2.2, los positivos detectados para OsHV-1, mediante PCR con los cebadores C2-C6, fueron analizados mediante RFLP utilizando las enzimas *XhoI*, *StyI* y *AclI*(=*XapI*) (Arzul et al 2001) y *Mfel* (Aranguren et al., 2012). Un gran parte de los positivos fueron confirmados por secuenciación directa del amplicón. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas entre sí y con las secuencias de referencia de OsHV-1 (GenBank AY509253) y OsHV-1 μ var (GenBank HQ842610) utilizando el programa ClustalW.

2.4. RESULTADOS

Línea 0. Coordinación del proyecto.

La tarea de coordinación general del proyecto recae en la Fundación CETMAR. Esta tarea ha cursado con fluidez a lo largo del proyecto. Para ello, se han realizado continuas llamadas telefónicas, correos electrónicos, reuniones semestrales e intercambio de información entre todos los socios del proyecto.

Línea 1. Unificación de criterios y validación de las pruebas diagnósticas mediante calibración interlaboratorio (prueba en anillo).

Tras analizar las muestras proeficiencia siguiendo las instrucciones dadas en el POS, los grupos participantes enviaron sus resultados al grupo de CETMAR, que configuró los resultados de acuerdo a las instrucciones dadas por JI Navas (IFAPA), quien procedió al análisis estadístico de los mismos.

1.1. Acuerdo Interlaboratorios:

El coeficiente Kappa mide la concordancia o acuerdo entre dos observadores o procedimientos. Sus valores oscilan entre -1 y 1. Un valor de 0 indica que la concordancia observada es igual a la esperada por azar; valores de 1 y -1 indican, respectivamente, un acuerdo o desacuerdo perfectos. Landis y Koch (1977) establecieron la siguiente escala para la interpretación del coeficiente Kappa:

Escala de Landis y Koch 1977	
= 0 ó < 0	nulo o desacuerdo
0-0,2	ligero
0,2-0,4	razonable
0,4-0,6	moderado
0,6-0,8	sustancial
>0,8	casi perfecto

El acuerdo se resume por procedimientos en las siguientes tablas:

(1) Diagnóstico Histopatológico

HIS	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA	1	0,26	0,00
IRTA	-	1	0,22
IFAPA	-	-	1

(2) Diagnóstico molecular

POS-1-C (Reactivos Comunes):

POS-1-C-OsHV1	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA	1	0,36	0,27
IRTA	-	1	0,38
IFAPA	-	-	1

POS-1-C- μ var	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA*	1	cte*	cte*
IRTA	-	1	0,57
IFAPA	-	-	1

(*) El CIMA no pudo realizar la RFLP debido a la poca cantidad de amplicón obtenido tras la PCR con C2/C6 usando reactivos comunes

POS-1- P (Reactivos Propios):

POS-1-P-OsHV1	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA	1	0,21	0,06
IRTA	-	1	0,32
IFAPA	-	-	1

POS-1-P- μ var	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA	1	0,21	0,10
IRTA	-	1	0,45
IFAPA	-	-	1

POS-2-C (Reactivos Comunes):

POS-2-C- μ var	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA	1	0,41	0,08
IRTA	-	1	0,21
IFAPA	-	-	1

POS-2-K- μ var	CIMA	IRTA	IFAPA
CIMA	1	0,07	0,37
IRTA	-	1	0,08
IFAPA	-	-	1

POS-2-P-Reactivos Propios:

POS-2-P- μ var	CIMA	IRTA*	IFAPA
CIMA	1	-	0,13
IRTA	-	1	-
IFAPA	-	-	1

(*) IRTA no ensaya sus propios reactivos sino que desarrolla la variante K con reactivos comunes

Resumiendo:

- El diagnóstico Histológico no presenta un acuerdo razonable entre los tres laboratorios
- El POS-1 (PCR C2/C6+RFLP Mfel) presenta los mejores acuerdo entre IRTA e IFAPA
- El POS-2 (PCR HerpF/R) alcanza en mejor acuerdo entre el CIMA y el IRTA
- La Variante POS-2-K mejora sustancialmente el acuerdo entre el CIMA y el IFAPA pero no con el IRTA
- La inclusión de la intensidad de las bandas de los amplicones (0, 1, 2 y 3) en el cálculo del coeficiente de Kappa ponderado no mejoró el acuerdo interlaboratorios (resultados no mostrados)

1.2. Acuerdo Intralaboratorios:

CIMA	HIS	POS-1-C-OsHV1	POS-1-C- μ var	POS-1-P-OsHV1	POS-1-P- μ var	POS-2-C- μ var	POS-2-P- μ var	POS-2-K- μ var
HIS	1	-0,13	cte	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,07
POS-1-C-OsHV1	-	1	cte	0,07	0,07	0,52	0,65	0,34
POS-1-C- μ var	-	-	1	cte	cte	cte	cte	cte
POS-1-P-OsHV1	-	-	-	1	1,00*	0,25	0,10	0,08
POS-1-P- μ var	-	-	-	-	1	0,25	0,10	0,08
POS-2-C- μ var	-	-	-	-	-	1	0,68	0,66
POS-2-P- μ var	-	-	-	-	-	-	1	0,45

(*) Todas los OsHV1 resultaron μ var

IRTA	HIS	POS-1-C-OsHV1	POS-1-C- μ var	POS-1-P-OsHV1	POS-1-P- μ var	POS-2-C- μ var	POS-2-P- μ var**	POS-2-K- μ var
HIS	1	0,18	0,18	0,18	0,18	0,24	-	0,69
POS-1-C-OsHV1	-	1	1,00*	0,86	0,86	0,52	-	0,001
POS-1-C- μ var	-	-	1	0,86	0,86	0,52	-	0,00
POS-1-P-OsHV1	-	-	-	1	1,00*	0,59	-	0,08
POS-1-P- μ var	-	-	-	-	1	0,59	-	0,08
POS-2-C- μ var	-	-	-	-	-	1	-	0,15
POS-2-P- μ var	-	-	-	-	-	-	1	-

(*) Todas los OsHV1 resultaron μ var

(**) IRTA no ensaya sus propios reactivos sino que desarrolla la variante K con reactivos comunes

IFAPA	HIS	POS-1-C-OsHV1	POS-1-C- μ var	POS-1-P-OsHV1	POS-1-P- μ var	POS-2-C- μ var	POS-2-P- μ var	POS-2-K- μ var
HIS	1	0,29	0,34	0,18	0,31	0,17	0,08	0,05
POS-1-C-OsHV1	-	1	0,64	0,28	0,33	0,09	0,41	0,10
POS-1-C- μ var	-	-	1	0,40	0,46	0,11	0,26	0,34
POS-1-P-OsHV1	-	-	-	1	0,76	0,29	0,24	0,39
POS-1-P- μ var	-	-	-	-	1	0,22	0,32	0,36
POS-2-C- μ var	-	-	-	-	-	1	0,19	0,33
POS-2-P- μ var	-	-	-	-	-	-	1	0,12

Resumiendo:

- El POS-1 (PCR C2/C6+RFLP Mfel) se muestra más concordante (mejores acuerdo intralaboratorio) cuando cada laboratorio pasa a usar sus propios reactivos.
- El mayor número de cambios que realizó el IFAPA cuando aplica sus reactivos propios (cambios en la DNA polimerasa y endonucleasa Mfel) provoca una mayor pérdida de acuerdo dentro del laboratorio pasando de sustancial a moderado
- Sólo el IRTA mostró un acuerdo sustancial entre su diagnóstico histológico y uno de los diagnósticos moleculares, concretamente su variante "K" del POS-2 (PCR HerpF/R), sin embargo dicho procedimiento fue el más discordante con el resto de diagnósticos realizados por el mismo laboratorio

1.3. Sensibilidad (Se) y especificidad(Sp) diagnósticas:

La sensibilidad (probabilidad de un verdadero positivo) y especificidad (probabilidad de un verdadero negativo) se estimaron sólo para los diagnósticos de OsHV-1- μ var mediante los POS inicialmente establecidos con reactivos comunes. Es decir, para el diagnóstico mediante PCR con C2/C6 y RFLP con Mfel (POS-1-C- μ var) y para el diagnóstico mediante PCR con HerpF/R (POS-2-C- μ var). Sin embargo, debido a que en el CIMA no fue posible aportar datos positivos con la RFLP tras la PCR con C2/C6 con reactivos comunes, se estimó, en su defecto, la sensibilidad y especificidad del diagnóstico utilizando su POS-1

con reactivos propios (POS-1-P- μ var).

Las estimaciones se han realizado enfrentando dos a dos los resultados de cada test en cada laboratorio. Los valores que se muestran corresponden a las mejores aproximaciones Bayesianas de la Se y Sp que explican los resultados observados por los diferentes procedimientos en cada laboratorio. Se presentan también el índice de Youden (J) como una estimación de la probabilidad de un diagnóstico correcto ($J = Se+Sp-1$). El procedimiento también permite estimar la prevalencia (Prev) de la población analizada. De este modo, se han obtenido diferentes valores de Se, Sp y Prev con sus respectivos intervalos de confianza al 95% (IC95%). Dichos resultados se resumen en siguientes tablas:

CIMA	HIS		POS-1-P- μ var		POS-2-C- μ var	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
HIS (IC95%)	- -	- -	0,61 (0,24-0,91)	0,94 (0,84-0,98)	0,62 (0,31-0,92)	0,75 (0,54-0,94)
INDICE YODEN	-		0,55		0,37	
PREV (IC95%)	-		0,09 (0,02-0,33)		0,29 (0,05-0,74)	
POS-1-P- μ var (IC95%)	0,35 (0,07-0,76)	0,75 (0,62-0,86)	- -	- -	0,80 (0,50-0,96)	0,73 (0,59-0,87)
INDICE YODEN	0,10		-		0,53	
PREV (IC95%)	0,09 (0,02-0,33)		-		0,12 (0,03-0,31)	
POS-2-C- μ var (IC95%)	0,30 (0,07-0,70)	0,75 (0,53-0,91)	0,64 (0,29-0,91)	0,96 (0,88-0,99)	- -	- -
INDICE YODEN	0,05		0,60		-	
PREV (IC95%)	0,29 (0,05-0,74)		0,12 (0,03-0,31)		-	

IFAPA	HIS		POS-1-C- μ var		POS-2-C- μ var	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
HIS (IC95%)	- -	- -	0,73 (0,42-0,94)	0,80 (0,60-0,96)	0,75 (0,44-0,94)	0,55 (0,29-0,88)
INDICE YODEN	-		0,53		0,3	
PREV (IC95%)	-		0,31 (0,09-0,60)		0,41 (0,10-0,77)	
POS-1-C- μ var (IC95%)	0,51 (0,21-0,82)	0,83 (0,66-0,96)	- -	- -	0,74 (0,47-0,93)	0,51 (0,32-0,81)
INDICE YODEN	0,34		-		0,25	
PREV (IC95%)	0,31 (0,09-0,60)		-		0,35 (0,08-0,71)	
POS-2-C- μ var (IC95%)	0,37 (0,10-0,72)	0,79 (0,52-0,95)	0,63 (0,35-0,91)	0,76 (0,55-0,94)	- -	- -
INDICE YODEN	0,16		0,39		-	
PREV (IC95%)	0,41 (0,10-0,77)		0,35 (0,08-0,71)		-	

IRTA	HIS		POS-1-C- μ var		POS-2-C- μ var	
	Se	Sp	Se	Sp	Se	Sp
HIS (IC95%)	- -	- -	0,65 (0,33-0,92)	0,73 (0,49-0,94)	0,68 (0,38-0,92)	0,71 (0,44-0,93)
INDICE YODEN PREV (IC95%)	-		0,38 0,35 (0,07-0,72)		0,39 0,43 (0,11-0,75)	
POS-1-C- μ var (IC95%)	0,58 (0,19-0,85)	0,53 (0,30-0,81)	- -	- -	0,82 (0,63-0,96)	0,80 (0,61-0,95)
INDICE YODEN PREV (IC95%)	0,11 0,35 (0,07-0,72)		- -		0,62 0,39 (0,22-0,58)	
POS-2-C- μ var (IC95%)	0,63 (0,23-0,86)	0,58 (0,31-0,85)	0,78 (0,56-0,95)	0,86 (0,69-0,97)	- -	- -
INDICE YODEN PREV (IC95%)	0,21 0,43 (0,11-0,75)		0,64 0,39 (0,22-0,58)		- -	

1.4. Conclusiones de la prueba de intercomparación:

1. Los resultados obtenidos tras el ejercicio no son satisfactorios y revelan las dificultades actuales de disponer de un método fiable para el diagnóstico sistemático de OsHV-1- μ var sin tener que recurrir a la secuenciación de los amplicones
2. Los valores de acuerdo interlaboratorios revelan que los métodos ensayados no aportan resultados suficientemente concordantes.
3. La sensibilidad diagnóstica alcanzada en los métodos de diagnóstico molecular no son las esperadas para este tipo de procedimientos, revelando que existe una probabilidad elevada de falsos negativos.
4. Del mismo modo, la especificidad encontrada es también inferior a lo que cabría esperar, en particular en el diagnóstico histológico, donde en otras patologías suele estar próxima a 1. Esto refleja que los métodos ensayados, en particular el histológico, presenta una elevada probabilidad de falsos positivos, indicando que los criterios histopatológicos para diagnosticar la infección no son uniformes.
5. Con estos resultados, el índice de Youden, la probabilidad de realizar un diagnóstico correcto, presentó valores no aceptables, alcanzando en el mejor de los casos el 0,6. El procedimiento POS-1 (PCR C2/C6+RFLP Mfel) presentó resultados ligeramente mejores que el POS-2 (PCR HerpF/R).
6. Tras la puesta en común y análisis de estos resultados los laboratorios participantes resaltan diferentes circunstancias que pueden afectar a la fiabilidad del análisis y que han podido incidir sobre los resultados del ejercicio intercomparativo:

- Es esencial partir de muestras lo más homogéneas posibles o en su defecto iniciar a partir de alícuotas del DNA extraído de las muestras.
 - La principal dificultad del POS-1 (PCRC2/C6+RFLP Mfel) es la obtención de cantidad suficiente de amplicón para poder llevar a cabo la RFLP
 - Desde los primeros análisis se observó la dificultad de la interpretación de los resultados de las PCR debido a la aparición de amplificadores de tamaño no esperado en ambos POS, particularmente en el POS-2 (PCRHerpF/R). Esta situación llevó al IRTA a proponer la modificación de las condiciones de la PCR. Como se ha mencionado, dichas modificaciones mejoraron el acuerdo entre el CIMA y el IFAPA para dicho POS pero no con el IRTA.
7. Resulta necesario modificar sustancialmente los procedimientos de diagnóstico o desarrollar nuevos que eviten la necesidad de recurrir a la secuenciación de los amplicones para confirmar la presencia de OsHV-1- μ var.
8. Estos primeros resultados marcan una primera referencia para la mejora en el diagnóstico de OsHV-1- μ var

Línea 2. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.

Actividad 2.1. Recopilación de información sobre los cultivos de *Crassostrea gigas* en el litoral de las CC AA implicadas, y elaboración de un plan de estudio epidemiológico.

GALICIA:

En colaboración con la Organización de Productores de Galicia (OPOGA) se estableció un plan de seguimiento de lotes de semilla de ostra rizada de distinta procedencia, que se introducirían en los polígonos de cultivo donde se engorda la ostra rizada para evaluar su crecimiento, supervivencia y prevalencia del virus OsHV-1 a lo largo del proceso de engorde. Aprovechando la red de muestreos del INTECMAR para conocer el estado de salud de bancos y áreas de cultivo de moluscos bivalvos, se decidió diagnosticar la presencia de OsHV-1 en las muestras de bancos asilvestrados de *Crassostrea gigas* del litoral de Galicia

ANDALUCÍA:

La información recopilada muestra que actualmente, en Andalucía, no se realiza la producción de semilla de *Crassostrea gigas* en criadero. En el litoral gaditano existen dos zonas de engorde (Saco de la Bahía- Santibáñez y Conil)

que se han abastecido históricamente de semilla de procedencia francesa. Respecto al litoral onubense, existe una actividad fundamentalmente extractiva de los bancos naturales de los ríos Guadiana, Piedras y Carrera. Durante principios de 2000 se realizaron experiencias de preengorde en los ríos Carreras y Piedras con semillas de *C. gigas* procedentes de Francia. No se dispone de datos recientes de introducción de semilla francesa. El estudio epidemiológico estableció un primer muestro, realizado en el inicio del presente proyecto, el cual ha permitido una primera estimación del impacto de la introducción de *C. gigas* sobre los bancos naturales de *C. angulata* del litoral onubense.

El análisis de los biotipos *C. gigas* / *C. angulata* ha puesto de manifiesto que, a pesar de la introducción de semilla de *C. gigas* desde los años 80, *C. angulata* sigue siendo la especie predominante en los bancos naturales de los ríos Guadiana, Carreras y Piedras. La distribución por especies se refleja en la Figura 4..

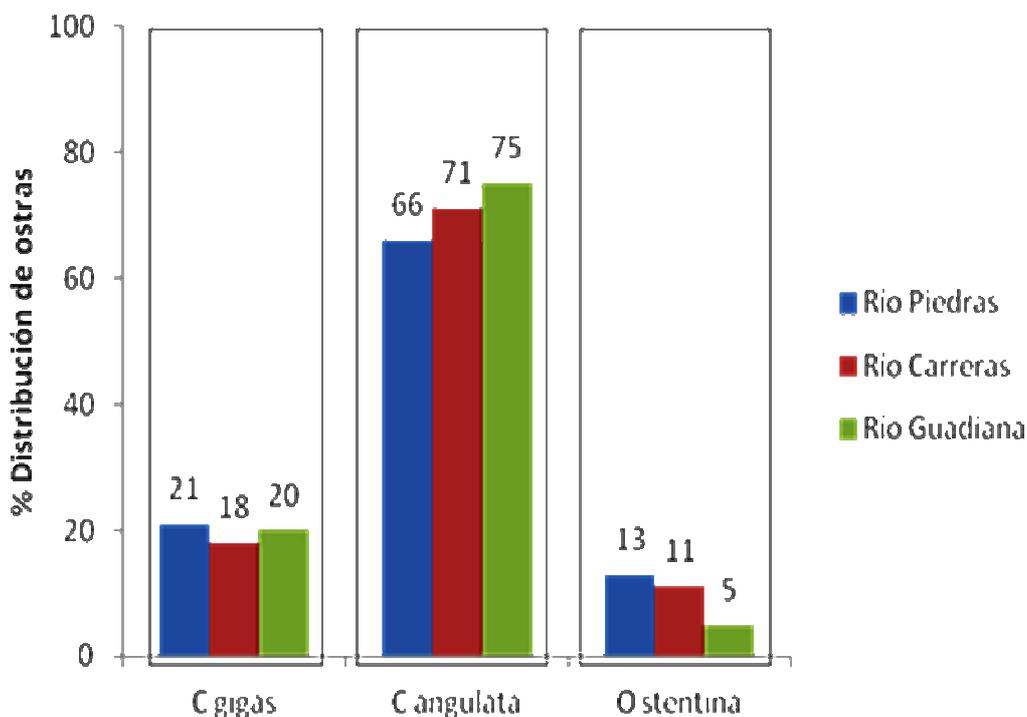


Figura 4. Distribución de especies de *Crassostrea gigas*, *C. angulata* y *Ostrea stentina* en los ríos Piedras, Carreras y Guadiana.

CATALUÑA:

Más información relativa a la zona de estudio se puede consultar en el documento que se anexa al final de la memoria (*anexo2-HERPEMOL-zonas_de_estudio Cataluña*). Como ya se ha expuesto anteriormente, en el año 2011, el trabajo se llevó a cabo en la bahía del Fangar, por ser en la que la producción de *C. gigas* es mayoritaria y donde las mortalidades para esta especie habían sido

registradas y seguidas por el equipo del IRTA. Históricamente, en esta bahía, han sido registradas mortalidades en los meses de mayo y junio desde el año 2000 a 2011. Desde el año 2009, dichas mortalidades ocurrieron desde el inicio de abril. En algunos casos las mortalidades fueron del 100%.

Según informaciones conseguidas por entrevistas directas con los productores, en relación al origen de la semilla de *C. gigas* utilizada, se puede concretar que la semilla de ostra que se utiliza proviene principalmente de Francia (aproximadamente 90%), también se siembran pequeñas cantidades de Remagro (Galicia) y de la captación natural dentro de la misma bahía (minoritaria). La semilla de origen francés proviene de diferentes orígenes geográficos: Bahía de Arcachon (captación natural), costa Atlántica francesa (Bretaña) y Normandía. Algunos productores compran semilla certificada en Satmar – Société Atlantique de Mariculture (Francia), las cantidades relativas y su ubicación no están disponibles.

Durante el año 2011, las primeras mortalidades en ostra rizada fueron detectadas el día 14 de abril, en los cultivos en cubanitos y de tubos enteros. El día 18 de abril fueron detectadas mortalidades también en tubos troceados. Toda la semilla había entrado en la bahía en noviembre de 2010 y la mayoría era de captación natural en Bretaña. En agosto había prácticamente un 100% de mortalidades acumuladas. Para el trabajo del presente proyecto, la aproximación se hizo mediante un estudio estacional de las prevalencias de herpes en *C. gigas* y uno paralelo bimensual en las de mejillón. El objetivo era valorar la dinámica de los episodios de mortalidades en ostra rizada y el posible papel de reservorio del mejillón. En el año 2012 el trabajo se concentró en el seguimiento de la prevalencias en mejillón, haciendo extensivo el estudio a la bahía de Alfacs.

Se decidió incluir el seguimiento de mejillón en el estudio epidemiológico debido a dos consideraciones, la primera es que debido a que la temperatura en la Bahía de Alfacs alcanza valores subóptimos en verano, los productores trasladan stocks a la Bahía vecina del Fangar para gestionar la comercialización del producto y para mantenerlo en unas condiciones más apropiadas. Esta práctica implica que se produce un trasiego de portadores potenciales de patógenos entre las dos bahías. En segundo lugar, el cultivo de *C. gigas* está aumentando en los últimos años en la Bahía de Alfacs y, aunque todavía no es muy significativo, se consideró importante valorar la situación epidemiológica de herpes virus en las poblaciones de mejillón en estos estados iniciales de cultivo de *C. gigas* en la bahía de Alfacs. Las constricciones del proyecto no permitieron hacer un seguimiento paralelo de *C. gigas* en Alfacs.

Adicionalmente, en repetidas ocasiones, se han reportado mortalidades masivas de mejillón en la Bahía de Alfacs y se han relacionado con fenómenos a mesoescala de incrementos de temperatura (\geq a 28 °C) sostenidos durante periodos prolongados en los veranos, seguidos de anoxias, que han ocasionado mortalidades masivas en la fauna no móvil (M. Ramón, comunicación personal). Se consideró, por lo tanto, importante llevar a cabo un seguimiento paralelo de las prevalencias de herpes virus en mejillón en las dos bahías del delta con la

finalidad de poder relacionar posibles episodios de mortalidades con el agente etiológico en estudio o con otras causas de origen ambiental o antropogénico. No se dispone de datos de mortalidades de *C. gigas* para la bahía del Fangar..

ASTURIAS:

Las mortalidades sufridas durante los últimos años en la ostra *C. gigas*, en Francia y otros países, y la importación sistemática de semilla de ostra francesa a las distintas zonas de producción, pusieron de manifiesto la necesidad de definir dichas zonas de producción de ostra, así como el control de los movimientos de la semilla, mortalidades, estatus zosanitario de la especie y parámetros medioambientales.

Se recopiló información en cuanto a superficies de los parques en explotación, autorizaciones, movimientos de entradas y salidas, procedencia de la semilla, tamaño, cantidad etc., así como de especies acompañantes y parámetros medioambientales de la zona de producción.

En Asturias, el cultivo de ostra *C.gigas* se remonta al año 1985, realizándose exclusivamente en la ría del Eo, declarada su margen derecha como zona de producción AST1-01 por Resolución de 7 de julio de 1993. El registro de movimientos de la ostra *C.gigas* refleja picos de siembras y de producción de 14 millones de unidades al año y 450 Tm/año, respectivamente. La procedencia de la mayoría de los lotes era de Francia (criadero o captación natural), hasta que en el 2008, y como consecuencia de las mortalidades registradas en Francia, se paralizan las importaciones y se sustituye por criaderos nacionales, produciéndose una importante reducción de la actividad durante los últimos 5 años.

El cultivo de ostra en Asturias se realiza exclusivamente en la ría del Eo, en zona intermareal, ocupando actualmente una superficie total de 31,8 Has, repartidas en 4 concesiones de cultivo. El engorde se realiza en sacos sobre parrillas durante 1,5 a 2 años de cultivo. El protocolo zosanitario establecido en Asturias, se inicia con la solicitud de autorización de siembra y el envío de una muestra previa de la semilla, por parte de las empresas titulares, para el análisis de los patógenos relacionados con cada una de las especies, que en un principio se dirigían fundamentalmente a *Perkinsus sp.*, “Anillo marrón”, *Marteilia refringens*, *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa* en almeja (*Ruditapes decussatus*), mejillón (*Mytilus edulis*) y ostra (*Ostrea edulis*) y posteriormente a Herpesvirus en ostra (*Crassostrea gigas*).

Actividad 2.2. Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas.

GALICIA:

1. Evaluación del impacto de la infección por virus herpes en el engorde de ostra rizada en Galicia.

Resultados

La Figura 5 muestra el crecimiento en talla y peso de cada lote de semilla durante el engorde. El crecimiento del lote de semilla de ostra rizada recogido directamente del criadero fue más lento que en los restantes lotes de la misma especie. El crecimiento de la ostra plana fue más lento que el de la rizada.

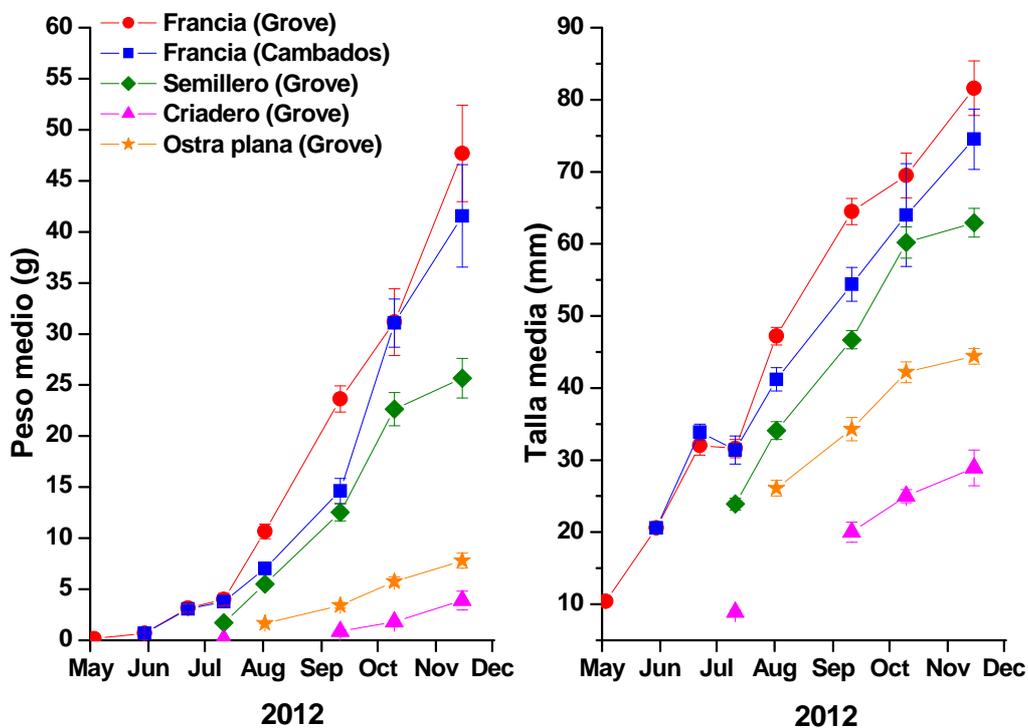


Figura 5. Evolución de la talla media y peso medio (\pm error estándar) de cada lote de semilla de ostra rizada *Crassostrea gigas* y del lote de ostra plana *Ostrea edulis* durante el engorde.

La mortalidad fue muy alta en la semilla procedente de Francia en los tres primeros meses en ambas bateas, GROVE A y CAMBADOS D, superando el 80%; a partir de ese momento la tasa de mortalidad se redujo marcadamente y la mortalidad acumulada se estabilizó en torno al 85% tras 5 meses de engorde (Fig. 6). En el lote recogido en el criadero gallego, la mortalidad fue extremadamente alta, registrándose el 97% tras 22 días desde su emplazamiento en batea. En el caso de la semilla preengordada en el semillero flotante la mortalidad registrada tras los primeros 22 días fue del 26%, semejante a la de la semilla francesa en su primer mes; sin embargo, la tasa de mortalidad fue disminuyendo desde entonces

y, así, la mortalidad acumulada aumentó de forma moderada, sin alcanzar el 50% tras 3 meses de engorde. La mortalidad acumulada de la ostra plana tras 4 meses de engorde fue inferior al 1%,

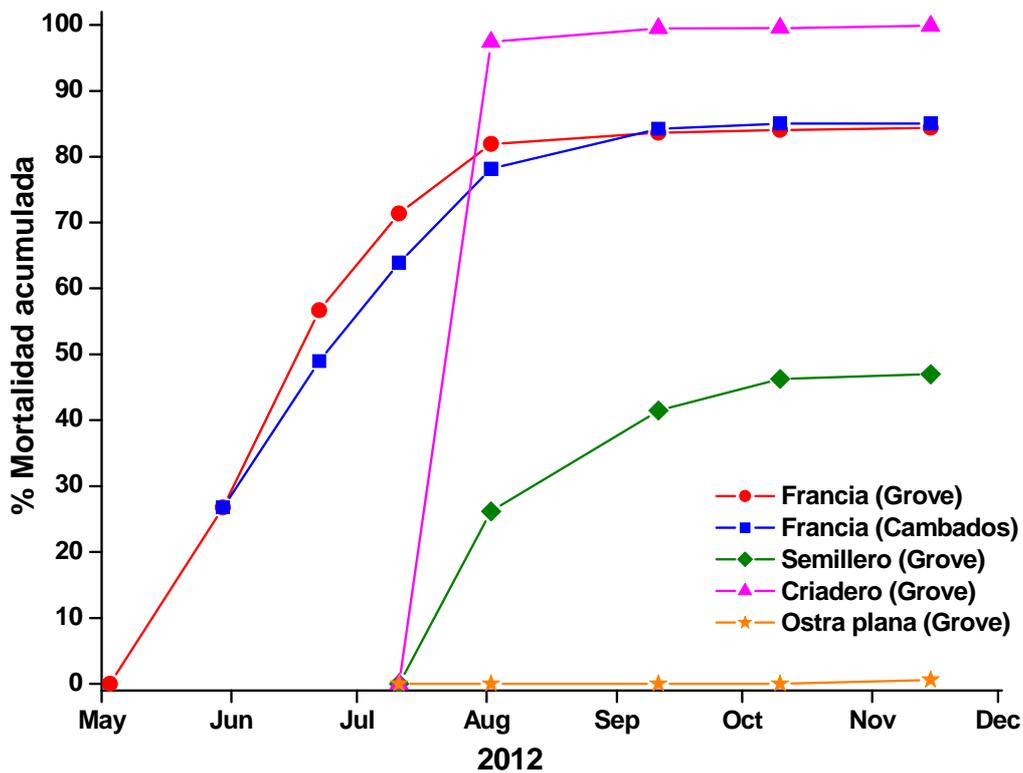


Figura 6. Evolución de la mortalidad acumulada (%) de cada lote de semilla de ostra rizada *Crassostrea gigas* y del lote de ostra plana *Ostrea edulis* durante el engorde.

Los resultados de los análisis por PCR para la detección del OsHV-1 μ var en cada muestra se recogen en la Tabla 1. Todos los ejemplares de la muestra inicial de semilla de Francia, antes de su emplazamiento en batea, mostraron resultados negativos para OsHV-1 μ Var. No se puede afirmar con rotundidad que todos los individuos estuviesen libres de la infección en el momento de su introducción en la batea; en todo caso, si había algún individuo infectado, la prevalencia tenía que ser muy baja. Sin embargo, en la muestra del 30 de mayo un 97% de los individuos fueron positivos, dicho de otro modo, al cabo de un mes escaso de su introducción en la batea casi todos los individuos ya estaban infectados. Desde entonces el porcentaje disminuyó en ambas bateas. En la muestra inicial de la semilla procedente del criadero gallego, antes de su emplazamiento en batea, el porcentaje de casos positivos de OsHV-1 μ Var fue del 10%; en la muestra recogida el 2 de agosto sólo uno de los ejemplares estaba

vivo, infectado por OsHV-1 μ Var, mientras que la concha de los restantes 29 ejemplares estaba vacía; teniendo en cuenta la tasa de mortalidad tan alta que se registró al tomar esta muestra, cabe pensar que la prevalencia era cercana al 100%; el porcentaje de positivos fue menor en los meses posteriores, cuando apenas quedaban supervivientes. En el lote preengordado en el semillero flotante, el 96% de los individuos resultaron positivos antes del emplazamiento en batea; en los meses siguientes el porcentaje disminuyó. Por tanto, en cada lote de semilla de ostra rizada, tras un máximo temprano de prevalencia del virus, a medida que la semilla infectada iba muriendo, la prevalencia disminuía entre los supervivientes. En el lote de ostra plana se llegó a detectar un porcentaje de casos positivos por encima del 50% en algún mes. Todos los casos de diagnóstico positivo para OsHV-1 detectados en este estudio correspondieron a OsHV-1 μ Var.

Tabla 1. Porcentaje de individuos con diagnóstico positivo para la infección con OsHV-1 μ var en las muestras correspondientes a cada lote de semilla.

Especie de ostra	Origen de la semilla	Polígono de cultivo	Fecha de muestreo						
			30/05	22/06	11/07	02/08	11/09	10/10	15/11
Rizada	Francia	Grove A	96,7	73,3	50,0	30,0	50,0	13,3	33,3
Rizada	Francia	Cambados D	NA	81,8	84,2	43,3	56,7	26,7	20,0
Rizada	Semillero	Grove A	NA	NA	96,4	70,0	76,7	46,7	46,7
Rizada	Criadero	Grove A	NA	NA	10,0	?	13,3	25,0	14,3
Plana	Criadero	Grove A	NA	NA	NA	0	53,3	63,3	30,0

* Tan sólo se analizó un ejemplar, que resultó positivo, debido a que los restantes 29 ejemplares de la muestra estaban muertos, con la concha cerrada y vacía.

Discusión

Todos los lotes de semilla de ostra rizada sufrieron una mortalidad inicial alta o muy alta, causada muy probablemente por el virus OsHV-1 μ var, aunque hubo diferencias en la magnitud de la mortalidad y en la duración de la tasa de mortalidad alta. De hecho, la mortalidad acumulada de la semilla procedente del semillero, de tamaño y edad mayores al inicio del engorde, fue marcadamente menor que en los otros lotes de ostra rizada, lo que probablemente se debió a que el lote del semillero ya había experimentado mortalidad importante en el propio semillero, pues este lote ya venía infectado por

el virus herpes antes de colocarlo en a batea de engorde. Siguiendo con esta hipótesis la semilla procedente del semillero ya había sufrido un proceso previo de selección de forma que los individuos más susceptibles (más débiles) ya habrían muerto antes del inicio del engorde; así el porcentaje de individuos más tolerantes sería mayor que en los otros lotes de semilla de ostra rizada, más pequeña y sin presión selectiva previa. La mortalidad de los lotes de ostra rizada de origen francés y del semillero disminuyó significativamente cuando la talla media superó 40-50 mm. Se ha publicado que tanto la edad como la estación del año (temperatura del agua) influyen significativamente en la mortalidad de la ostra rizada asociada a los brotes epidémicos del OsHV-1 μ Var en Francia e Irlanda (Cochennec-Laureau y Baud 2011, Peeler et al. 2012, Pernet et al. 2012), de forma que los adultos muestran más resistencia que la semilla y la infección y la mortalidad se acentúan en los meses cálidos. Será necesario confirmar la influencia de la edad (tamaño) de la ostra rizada y de la temperatura del agua en la susceptibilidad a la infección por OsHV-1 μ Var en el ámbito gallego, en definitiva determinar valores umbral de edad y temperatura que supongan cambios marcados en la dinámica de la infección y, por tanto, en el impacto de la enfermedad en las rías gallegas. Los resultados obtenidos sugieren que **el impacto de la enfermedad se puede minimizar iniciando el engorde con individuos que superen cierta edad.**

La caída del porcentaje de individuos con diagnóstico positivo para la infección con OsHV-1 μ Var desde valores superiores al 96% registrados en los lotes de ostra rizada de origen francés y del semillero tuvo que deberse a la muerte de los individuos infectados más intensamente (más débiles) y, probablemente, también contribuyó la desaparición de la infección en algunos de los individuos supervivientes (más resistentes), bien de forma absoluta bien permaneciendo a niveles no detectables.

Es muy probable que la semilla francesa adquiriese la infección tras su introducción en batea, aunque no se puede descartar completamente que el lote llegase de Francia con algún ejemplar infectado. Análisis previos a este estudio de una muestra de ostra rizada recogida en el polígono GROVE A, habían mostrado la presencia de OsHV-1 μ Var (resultados del CIMA no publicados). Por tanto, **el engorde de ostra rizada, incluso de lotes inicialmente libres del virus, puede verse afectado por mortandad masiva de semilla si se realiza en una zona afectada por el OsHV-1 μ Var.** Degremont (2011) demostró que en un lote de semilla de ostra rizada libre de OsHV-1 μ Var introducido en un área del litoral francés afectado por el virus, la infección se detectó tan sólo 7 días después de la introducción. La insignificante mortalidad de la ostra plana permite asegurar que **la elevada mortandad de la ostra rizada en el periodo de estudio no se debió a factores ambientales muy adversos o contaminación grave,** que probablemente habrían afectado a ambas especies por igual, sino a una causa inocua para la ostra plana, muy probablemente la infección por OsHV-1 μ Var. **La semilla de ostra plana es tolerante a la infección por OsHV-1 μ Var** pues incluso con porcentajes de diagnóstico positivo en más del 50% de los individuos no se detectó mortalidad. Renault et al. (2000b) demostraron que las larvas y la semilla de ostra plana son susceptibles a la infección por la variante clásica del

OsHV-1. Hay que tener en cuenta el posible papel de **la ostra plana como reservorio del virus** en el diseño de planes de gestión de esta enfermedad. Es necesario determinar si otras especies de moluscos juegan algún papel relevante desde el punto de vista epidemiológico.

No se detectaron diferencias reseñables en crecimiento, supervivencia o prevalencia del virus achacables a la localización del engorde, de forma que el impacto del OsHV-1 μ Var se registró tanto en la batea de O GROVE A como en la de CMBADOS D. La mortalidad tan elevada registrada en este estudio contrasta con la supervivencia alta de la semilla de ostra rizada procedente de Francia en el engorde en las rías de Arousa e Vigo, incluso en los mismos polígonos de cultivo que en este estudio, en los años previos a la aparición de los brotes epidémicos del OsHV-1 μ Var en Francia (Iglesias et al. 2005). De los resultados de este estudio se deduce **un impacto dramático de la infección por OsHV-1 μ Var en las rías gallegas**, donde el virus muestra una virulencia semejante a la registrada en el litoral francés (Segarra et al. 2010, Cochenec-Laureau y Baud 2011).

2. Otras líneas de investigación epidemiológica.

El OsHV-1 μ Var está presente en el litoral asturiano de la ría del Eo pero no hay evidencia de su presencia en las rías gallegas de Viveiro y O Barqueiro. **Es obvio el interés de preservar los bancos asilvestrados de ostra rizada de las rías de Viveiro y O Barqueiro libres del virus, pues además de garantizar la sostenibilidad de su explotación, dichos bancos podrían ser fuente de semilla sana para engordar en otras zonas libres del virus y de reproductores sanos para su utilización en criaderos.**

ANDALUCÍA:

El resultado de los análisis de los ejemplares muestreados al inicio del proyecto como punto de partida para el posterior estudio epidemiológico se resume en la tabla 2.

Tabla2. Resultados obtenidos para la infección herpesvirus en las muestras analizadas.

Lugar	Fecha	Especie	N	PCR C2/C6 Positivo	OsHV-1 μ var Positive (PCR-RFLP)	OsHV-1 μ var Prevalencia
Río Guadiana	25/05/2011	<i>C.angulata</i>	44	9/44	8/9	18% (8/44) ^a
		<i>C.gigas</i>	12	1/12	1/1	8% (1/12)
		<i>O.stentina</i>	3	0/3	0/0	0% (0/3)
		TOTAL	59	10/59	9/10	15% (9/59) ^b
Río Piedras	15/06/2011	<i>C.angulata</i>	76	37/76	35/37	46% (35/76) ^{a, c}
		<i>C.gigas</i>	24	11/24	6/11	25% (6/24)
		<i>O.stentina</i>	15	1/15	1/1	7% (1/15) ^c
		TOTAL	115	49/115	42/49	37% (42/115) ^b
Río Carreras	14/06/2011	<i>C.angulata</i>	80	66/80	66/66	83% (66/80) ^a
		<i>C.gigas</i>	20	19/20	18/19	90% (18/20)
		<i>O.stentina</i>	13	12/13	12/12	92% (12/13)
		TOTAL	113	96/113	96/96	85% (96/113) ^b
TOTAL		<i>C.angulata</i>	200	111/200	109/111	54% (109/200)
		<i>C.gigas</i>	56	31/56	25/31	45% (25/56)
		<i>O.stentina</i>	31	13/31	13/13	42% (13/31)
		TOTAL	287	155/287	147/155	51% (147/287)

(^{a, b, c}) Diferencias significativas entre porcentajes con el mismo superíndice

Resultados positivos de cada especie y río fueron confirmados mediante la secuenciación del amplicón obtenido con c2/c6. Muestras positivas de las tres especies fueron sometidas a ISH para confirmar la presencia de OsHV-1 en los tejidos de las ostras, como muestra la figura 7.

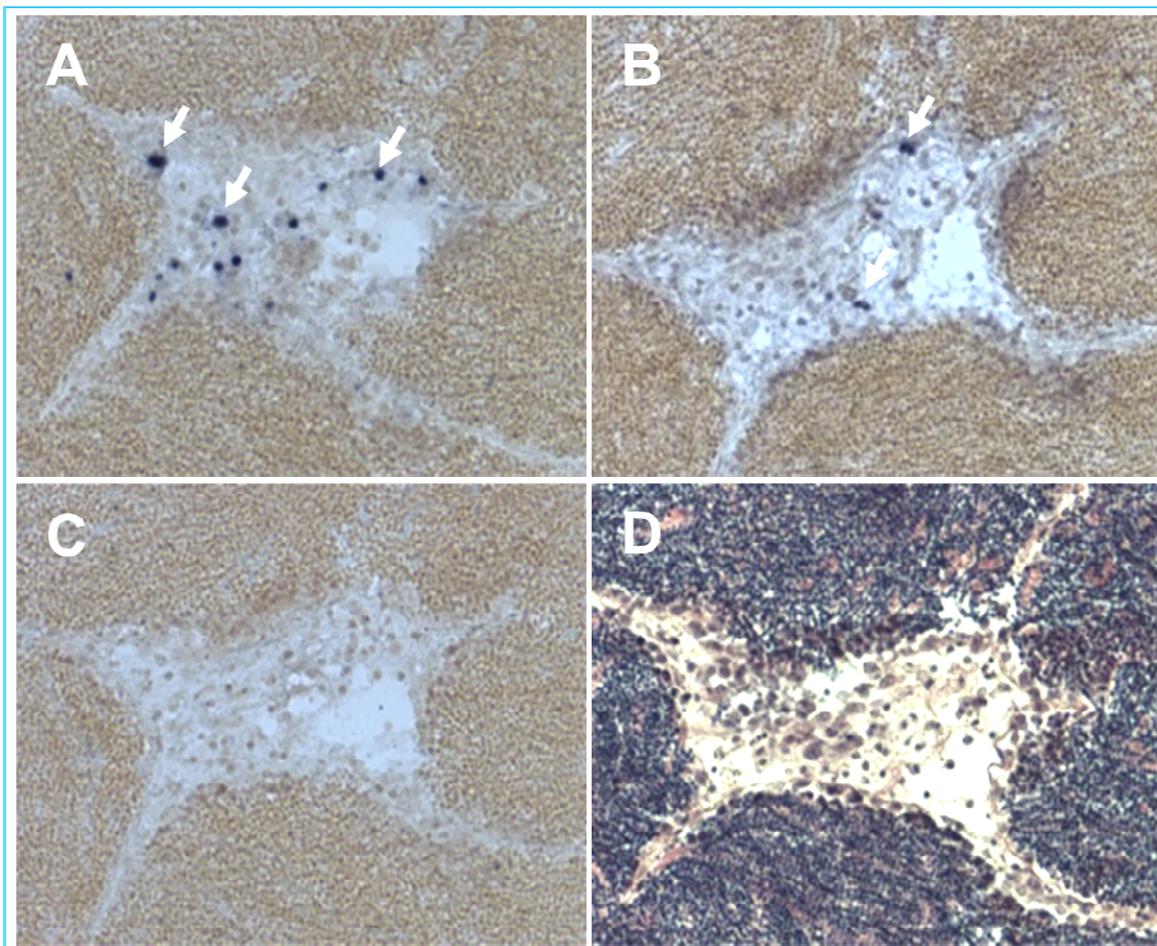


Figura 7. Hibridación in situ sobre cortes seriados de tejido gonadal de *C.angulata* infectada por OsHV-1- μ var. A) Sonda C2-C6-DIG mostrando una fuerte reacción positiva en el tejido conectivo (flechas). B) Sonda S1-DIG mostrando una señal positiva pero más débil (flechas) C) Control negativo sin sonda. D) Sección teñida con H&E.

Los resultados reflejan que:

- OsHV-1 μ var está presente en las tres especies de ostras analizadas, no encontramos diferencias significativas de prevalencia entre las especies, excepto entre *C.angulata* y *O. stentina* en el río Piedras
- OsHV-1 μ var está presente en los tres ríos analizados siendo significativamente más abundante en el río Carreras.

CATALUÑA:

A continuación se muestran los resultados de prevalencias obtenidos para *C.gigas*. (Tabla 3). En la tabla, se observa que las prevalencias aumentan mucho en el periodo en el que se registran mortalidades y que una vez que la tasa de mortalidad baja, la prevalencia de OsHV-1 también baja.

Tabla 3: Resumen de los resultados de los muestreos de *C. gigas* en la bahía del Fangar.

Bahía Fangar	Episodios	Muestra	Talla (mm)	C2-C6
Otoño. (Diciembre 2011)	No mortalidades	FCgDes11	Lote 1 =8.42 Lote 2=15.62	4/30 2/30
Invierno.(Marzo 2012)	Pre mortalidades	FCgMr12	26.92	2/30
Primavera .(Abril 2012)	Mortalidades	FCgAb12	30.52	22/30
Verano. (Agosto 2012)	Post mortalidades	FCgAg12	47.67	4/30

Otoño (Diciembre 2011): No mortalidades.

En diciembre 2011 se iniciaron los muestreos con dos lotes de 75 individuos, de cada uno de los cuales se analizaron 15 individuos (n=30) ,de acuerdo a la propuesta inicial. En el lote más pequeño (lote 1) se detectaron más individuos positivos que en el lote 2, de mayor talla media. Aunque el número de detecciones fue bajo, esto corresponde a una prevalencia cruda de 13.33 y 6.67 % respectivamente, lo que indican que estos lotes deben ser vigilados en las épocas de mayor riesgo de mortalidades..

Invierno (Marzo 2012): Premortalidades.

En este muestreo se tomaron 150 individuos, 30 individuos de 5 productores diferentes y se analizaron 5 ejemplares por lote. Estos lotes no se corresponden con los de diciembre 2011 pero sí se corresponden con las siguientes muestras de primavera . Son lotes entrados a finales de 2011, 4 de ellos de origen frances de captación natural, y uno de ellos de captación natural en la misma bahía del Fangar. En algunos lotes no hubo detección y en otros sí. Sin embargo, la bahía del Fangar debe ser considerada como una sola unidad epidemiológica debido a la falta de barreras entre lotes y al hecho que están físicamente muy próximos y los resultados, por tanto, se interpretan agrupados. En este muestreo la prevalencia cruda fue claramente más baja, (6.67%.) que en el lote 2 de invierno y algo inferior al lote 1 de menor tamaño.

Primavera (Abril 2012.). Mortalidades.

Este muestreo corresponde a cuando se detectaron mortalidades en la bahía del Fangar y en este muestreo la detección es, como seria de esperar , muy alta, del 73.33%. Las mortalidades fueron tambien elevadas en la bahía y ocurrieron durante un mes, a partir de ese momento comenzaron a bajar, y por lo general al cabo de 2 meses ya no se registraban.

Verano (Agosto 2012). Post mortalidades.

En este último muestreo de *C. gigas*, las detecciones volvieron a bajar (13.33 %) y tampoco se registraron mortalidades en la bahía. La figura 8, muestra, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en el PCR C2-C6 según Renault et al 2000.



Figura 8: PCR C2-C6 según Renault et al 2000. Para muestras de *C. gigas*_Post mortalidades. A la izquierda se ven los controles positivos y negativos en ambos geles. Las muestras positivas: 2,61, 212 y 123, se indican con +

A continuación, se llevo a cabo una selección de muestras claramente positivas con las que se realizó una PCR- RFLP:C2_C6 >Mfel (según el POS proporcionado por la coordinadora del proyecto) para poder discriminar el herpesvirus microvar. Como se puede apreciar en la figura 9, la técnica permite discriminar con claridad la microvariante, que produce 2 bandas, después del corte con el enzima de restricción Mfel. Como se ve en el gel de la figura 9, todas las muestras analizadas por esta técnica resultaron ser microvariante. En este gel se incluyeron 11 muestras de de *C. gigas*. del periodo de mortalidades (Abril 2012), que se pueden apreciar en la parte inferior del gel con mayor intensidad que las de la parte superior (calles 2-10 y 12-13).

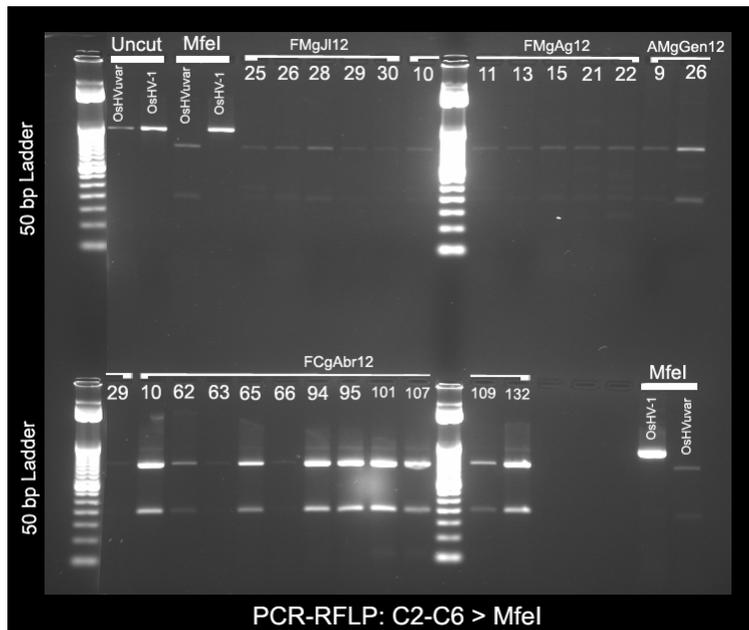


Figura 9: Gel PCR- RFLP:C2_C6 >Mfel (según el P.O.S proporcionado por la coordinadora del proyecto) . Marcadores de pesos moleculares en las calles 1,y 12 del la parte superior e inferior del gel. Calles 2 y 3 de la parte superior muestran los controles de OsHV-1 y OsHVuvar íntegros. Calles 4 y 5 de la parte superior y 18 y 19 de la inferior muestran controles tratados con Mfel. Muestras de *M.galloprovincialis* en calles 6-11, y 13-18 de la parte superior del gel y calle 2 de la parte inferior del gel. Muestras de *C.gigas*. en las calles 2-10 y 12-13 de la parte inferior del gel.

Discusión:

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el OsHV-1 está presente todo el año en *C. gigas* cultivado en la bahía del Fangar, aunque su prevalencia aumenta significativamente durante el periodo en que se manifiestan mortalidades. Esto es coherente con la información recogida en otros países de Europa (Anon. 2010). En Francia las mortalidades ocurren también en los periodos con mayor detección del virus (primavera y verano). En la Republica de Irlanda, las mortalidades son registradas en verano y coinciden igualmente con la detección del virus. Los datos preliminares obtenidos sobre la discriminación de la microvariante, apuntan a que esta pudiese ser la única presente, al menos en el periodo de mortalidades. La posible variabilidad del virus debe ser estudiada más a fondo, para ello, las muestras tomadas para secuenciación serán de gran ayuda en un futuro para comparar las muestras obtenidas en las diferentes zonas de estudio, épocas y especies.

Estos resultados son muy relevantes y se requiere un estudio en mayor profundidad para elucidar la dinámica del agente causal correlacionándolo con otros factores ambientales y de manejo del cultivo.

ASTURIAS:

El estudio epidemiológico permite hacer un seguimiento de las zonas de producción en cuanto a su estatus zoonosológico, incidencia de las mortalidades y registro de parámetros medioambientales y de cultivo. Teniendo en cuenta que hasta el 2008, la mayor parte de la semilla introducida en los parques de cultivo de ostras de la ría del Eo procedía de Francia, surgió la necesidad de elaborar y desarrollar un **Plan de Vigilancia para Herpesvirus (OsHV-1 μ var) en C.gigas**, con el objetivo de conocer el estatus zoonosológico del stock en cultivo y de la semilla a introducir en los parques de cultivo y de mejorar la gestión de la Zona de Producción, minimizando riesgos de diseminación de Herpesvirus y mortalidades en la ostra. El Plan se desarrolló en el 2010, en colaboración con el Laboratorio Nacional de Referencia de Moluscos Bivalvos de Vigo (LNR). El protocolo de muestreo se basó en el análisis de muestras de ostra adulta introducida durante los años 2007-2009, procedente de Francia y de criaderos nacionales, en cada una de las 3 concesiones en activo y muestras de semilla, previas a las siembras. Los resultados obtenidos por el LNR fueron negativos en todos los casos. Posteriormente a las siembras y a pesar de no haberse detectado Herpesvirus en las muestras previas, surgen mortalidades en los meses de verano, coincidiendo con lluvias e incremento de la temperatura del agua. Se envían muestras de los supervivientes al LNR de Vigo, obteniéndose resultados positivos a la presencia del Herpesvirus OsHv-1 μ var, con una prevalencia del 1%.

En el 2011 se autoriza la introducción de nuevos lotes de semilla, en base a los análisis negativos obtenidos para Herpesvirus por el LNR de Vigo, en muestras previas procedentes del criadero. Posteriormente, en el mes de julio, surgen mortalidades en torno al 80%, en los juveniles de dichas partidas. Durante el 2011 se mantuvo el control y se enviaron muestras al CIMA de la Xunta de Galicia, de los supervivientes del 2010 y 2011, y semilla procedente de otro criadero nacional, con la finalidad de buscar otros posibles proveedores de semilla. Los resultados obtenidos confirman de nuevo la presencia del virus OsHV1- μ var en los supervivientes del 2010 y 2011, con prevalencias del 20% y 50%, respectivamente y ausencia de Herpesvirus en la semilla del criadero.

En el 2012 y ante la situación planteada, el Principado de Asturias, comunica a la Secretaría General de Pesca el episodio de mortalidades sufridas y refuerza el control zoonosológico, con el fin de minimizar el impacto de la enfermedad. La información acumulada: identificación de las zonas afectadas, registros de movimientos y conocimiento de las prevalencias del Herpesvirus, nos permitió hacer un seguimiento de los supervivientes junto a los nuevos lotes de semilla introducidos. Así, en 2012, se recogieron muestras de los lotes afectados y se enviaron al CIMA. Los resultados confirman de nuevo la presencia del OsHv-1 μ var en un 3% en los supervivientes del 2010 y ausencia en los supervivientes del 2011. Ambos lotes de supervivientes registraron una mortalidad del 1% al mes durante los 7 últimos meses del año 2012, lo que nos confirma que una vez superado el primer episodio de mortalidad, en su fase juvenil, esta se mantiene en unos valores normales y asumibles.

Actividad 2.3. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana).

GALICIA:

No se registró ningún caso positivo de OsHV-1 en las muestras de mejillón analizadas de Ceuta y Galicia. Estos resultados no descartan la susceptibilidad de *M. galloprovincialis* al OsHV-1 y es necesario analizar semilla de menor edad procedente de zonas afectadas para determinar si el mejillón puede adquirir la infección y evaluar cuál puede ser su impacto en la miticultura española. **Ya hay precedentes de detección de virus herpes en *M. galloprovincialis* en otra zona geográfica, en concreto en California (EE. UU) (Burge et al. 2011).**

ANDALUCÍA:

Ya en el apartado anterior se puso en evidencia la presencia de OsHV-1- μ var en *Ostrea stentina* de los ríos Piedras y Carreras, siendo su prevalencia en el río Piedras significativamente menor a la detectada en *C. angulata*. Los primeros análisis realizados sobre almeja fina, *R. decussatus*, del Río Carreras han puesto de manifiesto resultados positivos de la presencia de OsHV-1 con una prevalencia inferior al 10%. Dichos resultados precisan ser confirmados por secuenciación e ISH. Desgraciadamente, estos análisis, junto con los de la presencia de OsHV-1 en *M. galloprovincialis* no han podido realizarse debido a la suspensión del proyecto en el 2013.

CATALUÑA:

Como se ha especificado anteriormente, en el caso de Cataluña, la especie estudiada fue el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). Los resultados obtenidos en cuanto al número de positivos de cada lote, están recogidos en la Tabla 4. Se observó que había positivos en las dos bahías, que mostraban, en las muestras positivas, prevalencias superiores al 10%. Una vez procesadas todas las muestras y revisados los resultados, los correspondientes al lote de invierno 11/12, FMg Gen 12b, con una prevalencia de 29+/30 hacía pensar en un posible dato erróneo, por lo que se procesó también mediante la técnica qPCR de Webb *et al.* (2007) para confirmar si era posible la existencia de semejantes prevalencias en dicha muestra.

Los cebadores de Webb *et al.* (2007) amplifican una región diferente del genoma (gen que codifica para la ADN polimerasa viral), de modo que si se tratase de una posible contaminación por el producto amplificado C2-C6, la detección por este protocolo no estaría afectada. La detección por qPCR mostró resultados negativos para todas las muestras de ese lote. Dicho resultado hace que sea imprescindible revisar los datos sobre mejillón y hacer interpretaciones al

respecto con cautela. Algunas muestras positivas por PCR C2-C6 del lote de enero 2012 de Fangar Alfacs fueron analizadas por hibridación *in situ*. Sin embargo las observaciones no fueron concluyentes, y necesitan repetirse con nuevas muestras y un protocolo optimizado.

Tabla 4. Resultados de PCR C2-C6 para la detección de herpesvirus OsHv-1 en mejillón *Mytilus galloprovincialis* en las bahías de Alfacs y Fangar en el Delta de Ebro. El color rojo identifica las muestras que se procesaron también por PCR- RFLP:C2_C6 >Mfel.(*) Muestra procesada también por Webb *et al*, 2007, con resultado negativo.(0 +/30) .

	ALFACS		FANGAR	
	Muestra	PCR c2-c6	Muestra	PCR C2-6
Invierno 11/12	AMgGen12	3+/30	FMgGen12b	29+/30 →0+/30(*)
	AMgFeb12	0+/30	FMgMr12	0+/30
Primavera 12	AMgMr12	1+/30	FMgAbr12b	6+/30
	AMgMa12	0+/30	FMgMa12	6+/30
Verano 12	AMgJl12	0+/30	FMgJl12	9+/30
	AMgSet12	No mejillón en bahía	FMgAg12	17+/30
Otoño 12	AMgNov12	0+/30	No muestra disponible	No muestra disponible -
Invierno 12/13	AMgGen13	5+/30	No muestra disponible	No muestra disponible -

A continuación, del mismo modo que para las muestras de *C. gigas*, se llevo a cabo una selección de muestras positivas con las que se realizó una PCR- RFLP:C2_C6 >Mfel (según el P.O.S proporcionado por la coordinadora del proyecto) para poder discriminar el herpesvirus microvar. Como se ve en el gel de la figura 2, todas las muestras de *M.galloprovincialis* analizadas por esta técnica resultaron ser microvariante: calles 6-11, y 13-18 de la parte superior del gel y calle 2 de la parte inferior del gel . Se incluyeron 14 muestras de mejillón, resaltadas en rojo en la tabla 4, que correspondían a: Alfacs- invierno (2011-2012), Fangar- verano (2012) , y en todas se obtuvieron las dos bandas correspondientes a la microvariante. .

Discusión.

Es la primera vez que se hace un estudio de este patógeno en mejillón *M. galloprovincialis*, y además en un abanico de tiempo que cubre como mínimo toda

la ventana crítica del cultivo de *C. gigas* (entrada de semilla-final de mortalidades) en Fangar, y un año completo en Alfacs. Se detectan positivos por PCR C2-C6 en las dos bahías. Estos lotes donde hay detección C2-C6 no tienen mortalidades asociadas. Se registran más muestras de mejillón positivas en Fangar que en Alfacs y podría estar relacionado con el hecho de que el Fangar tiene más carga de herpesvirus, al haber más densidad de cultivo de *C. gigas*. A la vista de los datos obtenidos y aunque todavía con cautela, se podría pensar en que el mejillón podría jugar un papel de reservorio para el herpes. La dinámica de su prevalencia en el mejillón y la interacción respecto a *C.gigas* requiere más trabajo. No obstante, lo que sí parece evidente es que un plan de gestión sanitaria para el herpes, tendrá que contemplar otras especies acompañantes. El resultado obtenido tras la realización de la qPCR Weeb en el lote de enero 2012 Fangar (FMgGen12b), muestra una falta de correlación en los dos tipos de análisis utilizados, que podría estar debida a contaminación del fragmento amplificado C2-C6, pero aún no se pueden descartar otras causas. Tal resultado, sin embargo, hace que queramos revisar los otros lotes positivos por otras técnicas diferentes a la PCR C2-C6 antes de completar los análisis por hibridación *in situ* y estudio de secuencias.

En cuanto al protocolo de hibridación *in situ* se identifica, por intercomparación con IFAPA y CIMA, que el protocolo de detección por hibridación *in situ* utilizada en el IRTA necesita ser optimizado, con tal de poder profundizar, con material de calidad, en el estudio de la detección molecular del virus en los tejidos del mejillón, y poder aportar conclusiones más concretas al respecto. Además, para completar el estudio se guardó muestra para procesar por TEM si se considerara relevante. Los futuros resultados de hibridación *in situ* podrían ser claves para comprender el papel que juega el mejillón en la epidemiología del herpes. en las zonas donde coexisten las dos especies de bivalvos.

La caracterización molecular de las secuencias obtenidas a partir de los amplicones se completará próximamente tras la revisión previa de todos los resultados positivos.

Actividad 2.4. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en criaderos de *Crassostrea gigas*.

ASTURIAS:

Ante la situación planteada: constancia de partidas de ostra contaminadas en los parques de cultivo y dificultad para el aprovisionamiento de semilla con garantías sanitarias, se planteo la producción de semilla en las instalaciones del CEP. Esta actuación, aunque ajena al proyecto HERPEMOL, se basó en el apoyo del equipo del CIMA para la realización de los análisis oportunos. Los progenitores se recolectaron en un banco natural de ostra *Crassostrea sp* de la ría de Ribadesella y se envió una muestra al CIMA, para su estudio genético y

análisis zoonosario..Los estudios genéticos revelaron que el 80% presentaba un genotipo característico de *C. gigas* y un 20% de los ejemplares presentaron hibridación entre *C. gigas* y *C. angulata*. En lo que se refiere a su estatus sanitario revelaron ausencia de Herpesvirus, en 29 ejemplares analizados.

Los reproductores se acondicionaron en el mes de febrero de 2012, utilizando como alimento las microalgas *Isocrysis galbana* (Ig), *Tetraselmis suecica* (Ts) y *Phaeodactylum tricornutum* (Pt). A los dos meses y medio de acondicionamiento se realizó la inducción con 18 ejemplares que se sometieron a shocks térmicos, respondiendo 3 hembras y 1 macho. El cultivo se inició con 10 millones de larvas, de las cuales 8 millones llegaron a fijarse, lo que representó una supervivencia del 80%. Para la fijación se emplearon tanques de fibra de 1000 L de volumen con tamices con luz de maya de 132 μm . y conchilla de ostra molida de tamaño entre 500 y 300 μm , como sustrato de fijación. A los 40 días de la fijación 6 millones de larvas quedan retenidas en tamiz de 700 μm , lo que representó un 18% de supervivencia. La baja supervivencia alcanzada en la etapa de fijación pudo ser debida a la alta densidad utilizada. No obstante, al tratarse de estudios preliminares en los que se pretende estandarizar el método, se consideran buenos resultados, ya que se dispone de semilla suficiente para realizar el seguimiento.

Una vez que se produjo la cementación y la metamorfosis de las larvas, la semilla se preengordó en el criadero hasta un tamaño de 4-6mm (T2000-T3000), a partir de ahí el preengorde se continuó en las instalaciones flotantes en el medio natural, hasta el tamaño de siembra de 10-12 mm. En el mes de diciembre se establecieron un total de 500.000 juveniles repartidos en sacos de distinta luz de malla sobre parrillas en los parques de cultivo de la ensenada de La Linera, junto con los supervivientes de las mortalidades sufridas en el 2010 y 2011

Actividad 2.5. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas.

ANDALUCÍA

El análisis de molecular de las variantes del virus se ha centrado fundamentalmente en la secuenciación y comparación de los amplicones obtenidos. Todas las secuencias analizadas, tanto de *C. gigas*, *C. angulata* como de *O. stentina* han resultado similares a OsHV-1- μvar . Un análisis más exhaustivo exige la clonación de un número significativo de amplicones, en particular del 5 % (8/155) de secuencias amplificadas por C2/C6 que han resistido la acción de la endonucleasa MfeI. Desafortunadamente, esta tarea no ha podido ser concluida debido a los recortes y a la suspensión del proyecto.

2.5. CONCLUSIONES

Se dedicará especial atención a la utilidad de los resultados para el sector acuícola.

- Mediante el análisis de los resultados del ejercicio de intercomparación se ha puesto de manifiesto la necesidad de mejorar los actuales métodos de diagnóstico de OsHV-1- μ var.
- En Andalucía, el análisis de los biotipos *C. gigas* / *C. angulata* ha puesto de manifiesto que, a pesar de la introducción de semilla de *C. gigas* desde los años 80, *C. angulata* sigue siendo la especie predominante en los bancos naturales de los ríos Guadiana, Carreras y Piedras, significando el 75, 71 y 66% respectivamente de los ostreidos muestreados.
- Los resultados disponibles muestran que OsHV-1- μ var es la variedad predominante de OsHV-1 detectada en ostreidos en Galicia, Andalucía, Cataluña y Asturias.
- En Galicia, la infección por virus OsHV-1 μ var afecta al engorde ostra rizada en los dos polígonos de la ría de Arousa implicados en este estudio, provocando una mortandad elevada en la semilla de ostra rizada que se acentúa cuanto menor es la edad de la semilla. El impacto de la enfermedad se puede minimizar iniciando el engorde con individuos de mayor edad.
- El uso de semilla inicialmente libre del virus no garantiza una supervivencia elevada si el engorde se realiza en una zona afectada por el OsHV-1 μ var, pues la infección se adquiere en un plazo muy corto.
- En Galicia, no se ha detectado la presencia de OsHV-1 en los los bancos asilvestrados de ostra rizada de las rías de Viveiro y O Barqueiro, por lo que es importante preservar estos bancos libres del virus para garantizar la sostenibilidad de su explotación. Dichos bancos podrían ser fuente de semilla sana para engordar en otras zonas libres del virus y de reproductores sanos para su utilización en criaderos
- Se ha detectado la presencia de OsHV-1- μ var en los ostreidos del litoral de Huelva (*C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*). Su presencia se ha demostrado tanto por secuenciación de DNA como por ISH.
- En Andalucía, la prevalencia de la infección fue significativamente superior en el río Carreras, donde la actividad acuícola es mayor, afectando al 85% de los ostreidos analizados.
- En Cataluña, la infección OsHV-1 está presente todo el año en *C. gigas* cultivadas en la bahía del Fangar, aumentando la prevalencia cuando aumentan las mortalidades.

- La semilla de ostra plana es tolerante a la infección por OsHV-1 μ var, aunque no hay que desdeñar su posible papel como reservorio de OsHV-1 μ Var.
- Se detectan individuos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) infectados por el herpesvirus OsHV-1 en las bahías de Alfacs y Fangar en Cataluña. No se registró ningún caso positivo de OsHV-1 en las muestras de mejillón en Galicia y Ceuta. En Galicia es necesario analizar semilla de menor edad procedente de zonas afectadas para determinar si el mejillón puede adquirir la infección y evaluar cuál puede ser su impacto en la miticultura española.
- Dada la situación actual epidemiológica actual en Asturias se propone un seguimiento de los lotes afectados y control y análisis de todas las partidas de semilla que se vayan introduciendo en los parques. Ambas actuaciones resultan imprescindibles para la erradicación de la patología y mantener la actividad de la ostricultura en aguas del Principado de Asturias.

2.6. VALORACIÓN

ANDALUCIA:

El presente proyecto ha permitido la primera evaluación del efecto de la introducción de *C. gigas* sobre los tradicionales bancos naturales de *C. angulata* del litoral onubense. Del mismo modo, ha supuesto los primeros datos sobre la presencia de OsHV-1- μ var en el litoral onubense, aportando información esencial sobre su distribución y prevalencia.

ASTURIAS:

Teniendo en cuenta la presencia de Herpesvirus en la ría del Eo, medidas como, el seguimiento de los lotes afectados estabulados en las concesiones de cultivo, y el control de todas las partidas de semilla introducidas en los parques, resultan imprescindibles para la erradicación de la patología. Por otra parte, el disponer de poblaciones salvajes libres de Herpesvirus, capacidad de producción de semilla y desarrollo e instalación de estructuras de preengorde, en la misma ría, para estabular semilla procedente directamente del criadero, podrían ser buenas herramientas para mejorar la gestión de la actividad, minimizando los riesgos de infección y posibilitando la supervivencia y rentabilidad de los cultivos

2.7. DIFUSIÓN

ANDALUCIA:

López-Sanmartín M.*, Navas-Triano J. I. Detection of Ostreid Herpesvirus-1-microvar in *Crassostrea* spp. from Huelva coast (SW Spain). AQUA 2012, Praga 1-5 septiembre 2012

López-Sanmartín M., Navas J. I. Prevalencia y distribución del OSHV-1 μ var en ostras del litoral de Huelva. FIRMA Cádiz, 26-29 noviembre 2012

ASTURIAS:

En el 2010, se elabora, aprueba y desarrolla un Plan de Vigilancia para Herpesvirus (OsHV-1 μ var) en *C.gigas*, en colaboración con el Laboratorio Nacional de Referencia de Moluscos de Vigo, con el objetivo de conocer el estatus zoonosario de la ostra adulta establecida en la zona de producción AST 1-01 y semilla, para una mejor gestión de los parques de cultivo de la ría del Eo.

En el 2012, el Principado de Asturias comunicó a la Secretaría General de Pesca mortalidades anormales superiores al 50%, con la finalidad de reforzar el control zoonosario y evitar la propagación de la enfermedad y los Herpesvirus en las concesiones de cultivo de la ría del Eo.

2.8. INCIDENCIAS DE DESARROLLO

ANDALUCIA:

La puesta a punto de los métodos de diagnóstico molecular para OsHV-1- μ var y los resultados poco satisfactorios del ejercicio de intercomparación han exigido que una gran parte de los resultados positivos hayan tenido que ser confirmados por secuenciación de los amplicones. Esta circunstancia ha ralentizado el desarrollo del diagnóstico en el amplio número de ejemplares muestreados, completándose el análisis en un total de 287 ejemplares. La suspensión del proyecto ha truncado el desarrollo del estudio epidemiológico que estaba previsto a pesar de la reducción del 60% del presupuesto en el segundo año.

ASTURIAS:

En el 2012, y ante la constancia de Herpesvirus en la ría del Eo y la dificultad para el aprovisionamiento de semilla con garantías sanitarias, se producen 500.000 unidades en las instalaciones del CEP. Esta actuación, aunque ajena al proyecto, se basó en el apoyo del equipo del CIMA para la realización de los análisis y se

planteó con la finalidad de obtener juveniles sanos que pudieran garantizar la viabilidad de los cultivos, evitando la dispersión de la enfermedad.

CEUTA:

La reducción de la asignación económica del ejercicio 2012 ha repercutido fundamentalmente en la partida destinadas a gastos destinados a muestreos (desplazamientos locales y mensajería), por lo que únicamente se ha recogido una muestra de 50 mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) salvajes. La eliminación de la asignación del ejercicio 2013 ha impedido la realización de tareas de difusión y divulgación de los resultados.

2.9. BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo 2010. Reglamento (UE) 175/2010 de la Comisión de 2 de marzo de 2010, por el que se aplica la Directiva 2006/88/CE del Consejo en lo referente a las medidas de lucha contra el aumento de la mortalidad de los ostiones de la especie *Crassostrea gigas* en relación con la detección del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 μ var (OsHV-1 μ var). Diario Oficial de la Unión Europea L 52: 1-13.
- Anónimo 2010. Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* EFSA Journal 2010;8(11):1894.
- Boudry, P., Huvet, A., Favioux, C. and Lapegue, S (2001). "Evidence for natural hybridisation between the two oyster sub sub-species *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata* in southern Europe". IFREMER Laboratoire de Génétique et Pathologie. La Tremblade – France
- Burge, C.A., Strenge, R.E., Friedman, C.S. 2011. Detection of the oyster herpesvirus in commercial bivalves in northern California, USA: conventional and quantitative PCR. Diseases of Aquatic Organisms 94:107-116.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.-P. 2011. Bilan des surmortalités des huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2008. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation 42: 2-5.
- Cohen, J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and psychological measurement*, 20:37-46
- Degremont, L. 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317. 94-98.

- Fabioux, C., Huvet, A., Lapéque, S., Heurtebise, S., Boudry, P. (2002). "Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angulata*) and Pacific (*C. gigas*) oysters along the European and north African Atlantic coasts". *Haliotis* 31: 33-44
- Garcia, C., Thébault, A., Dégremont, L., Arzul, I., Miossec, L., Robert, M., Chollet, B., François, C., Joly, J.P., Ferrand, S., Kerdudou, N. Renault, T. 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research* 2011, 42:73-83.
- Iglesias, D., Rodríguez, L., Montes, J., Conchas, R., Pérez, J.L., Fernández, M., Guerra, A. 2005. Estudio de viabilidad del cultivo de ostra rizada *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en diferentes rías gallegas. Primeros resultados biológico-productivos. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21:293-309.
- Joseph, L.; Gyorkos, T. W.; Coupal, L. 1995. Bayesian estimation of disease prevalence and parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *American Journal of Epidemiology*, 141: 263-272.
- Landis, J.R. and Koch, G.G. 1997. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-74.
- Martenot, C., Oden, E., Travaillé, E., Malas J.P., Houssin, M. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpes virus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* 160-25-31
- Peeler, E.J., Reese, R.A., Cheslett, D.L., Geoghegan, F., Power, A., Thrush M.A. 2012. Investigation of mortality in Pacific oysters associated with *Ostreid herpesvirus-1* μ Var in the Republic of Ireland in 2009. *Preventive Veterinary Medicine* 105:136-143.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J.F., Keck, N. 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture Environment Interactions* 2:215-237.
- Renault, T., Arzul, I. 2001. Herpes-like virus infections in hatchery reared bivalve larvae in Europe : specific viral DNA detection by PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24:161-167.
- Renault, T., Cochennec, N., Le Deuff, R.M., Chollet, B. 1994b, Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Fish Pathologists* 14: 64-66.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Chollet, B., Cochennec, N., Gérard, A. 2000b. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and

nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Diseases of Aquatic Organisms 42, 173-183.

Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., Maffart, P. 1994a. Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France - Comparative study. *Revue de Médecine Veterinaire* 145: 735-742.

Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C., Deslert, C. 2000a. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virology Methods* 88:41-50.

Segarra, A., Pépin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N., Renault, T. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153: 92-99.

Seutin, G., White, B. N. & Boag, P. T. 1991 Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90 (1991).

Webb, S.C., Fidler, A., Renault, T. 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture* 272:126-139

Youden, D. 1950. Index for Rating Diagnostic Tests. *Cancer*, 3: 32-5.

3.- ANEXOS CON LOS INFORMES DE LOS DISTINTOS GRUPOS DE TRABAJO (estos informes podrán tener el formato que determine cada grupo de trabajo, incluidos sus logotipos oficiales)

GALICIA: *anexo1-HERPEMOL-POS.pdf; HERPEMOL_Galicia.pdf*

ANDALUCÍA: *HERPEMOL_Andalucía.pdf*

CATALUÑA: *anexo2-HERPEMOL-zonas_de estudio Cataluña.pdf*

ASTURIAS: *HERPEMOL_Asturias.pdf*

4.- TAREAS Y OBJETIVOS QUE NO SE HAN PODIDO LLEVAR A CABO DEBIDO AL RECORTE PRESUPUESTARIO DE 2012 Y A LA NO EXISTENCIA DE FINANCIACIÓN EN 2013.

GALICIA:

1. Finalización del estudio epidemiológico iniciado en 2012 sobre la infección por virus herpes en las explotaciones de ostra rizada de Galicia. No se ha podido concluir el seguimiento a lo largo del engorde de los lotes de semilla en las dos bateas (GROVE A y CAMBADOS D) de la ría de Arousa. No se ha podido estudiar el impacto en el polígono de cultivo REDONDELA a (Ría de Vigo). La influencia de la edad y de las distintas etapas del ciclo de vida de la ostra rizada en la susceptibilidad a la infección habría podido confirmarse de forma inequívoca y más precisa con la prolongación de dichos seguimiento. Asimismo, la evaluación de la estacionalidad y de la influencia de las condiciones ambientales en la dinámica de la infección precisaban de un seguimiento más prolongado y del inicio del engorde de lotes de semilla en diferentes momentos del año.
2. Determinación de la presencia de virus herpes en poblaciones y cultivos de otras especies de moluscos de interés marisquero (semilla pequeña de mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra plana, ...).
3. Evaluación de la incidencia de virus herpes en un criadero de *Crassostrea gigas*. Determinación de la presencia y efectos de virus herpes en diferentes etapas del desarrollo: reproductores, gametos, larvas, postlarvas, semilla en pre-engorde)
4. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de ostra rizada y de otras especies de interés marisquero que pudiesen estar afectadas.
5. Elaboración de una guía de buenas prácticas en relación con esta enfermedad y su manejo, dirigida a los ostricultores de criadero y engorde.
6. Valoración del impacto potencial de la enfermedad por virus herpes en la miticultura.
7. Difusión de los resultados.

ANDALUCIA:

1. Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos.
 - 2.1. Estudio epidemiológico de la infección por virus herpes en poblaciones de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea angulata* afectadas: no se han

finalización de los muestreos previstos en el estudio epidemiológico ni tampoco se han podido realizar los análisis de las muestras obtenidas en el segundo semestre de 2012

- 2.2. Evaluación de la presencia de la infección por virus herpes en poblaciones y cultivos de especies interés marisquero (mejillón, almeja fina, almeja japonesa, ostra enana): no se ha podido completar el análisis de todas las muestras
 - 2.3. Caracterización molecular de la especie o variantes de virus herpes que infecta las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata*, así como las poblaciones de interés marisquero analizadas: no se ha podido completar el análisis sobre los principales aislados ni realizar el análisis de OsHV-1 procedente de otras especies de interés marisquero.
2. Estudios de transmisión de la enfermedad causada por virus herpes: no realizado.
 3. Evaluación del impacto de la enfermedad para la industria marisquera: Recomendaciones: no realizado

ASTURIAS:

No se pudo llevar a cabo la elaboración de una Guía de Buenas Prácticas, actividad contemplada en la Línea 5, aunque si podríamos decir que se sentaron las bases para una mejor gestión del cultivo de la ostra *C.gigas*, ante dicha patología.

CEUTA:

La reducción de la asignación económica del ejercicio 2012 ha repercutido fundamentalmente en la partida destinadas a gastos destinados a muestreos (desplazamientos locales y mensajería), por lo que no han podido ser muestreadas otras especies de interés marisquero distintas al mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). En el presupuesto inicialmente aprobado, la asignación de 2013 estaba consignada en partidas relacionadas con la difusión y divulgación de los resultados del proyecto (reuniones específicas, asistencias a congresos y edición de informes), por lo que su eliminación ha supuesto que no hayan podido alcanzarse los objetivos planteados en este ámbito.