

Virus tipo herpes de los ostreidos en almeja mano de león en Baja California Sur, México.

Ostreid Herpesvirus 1 in pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* from Baja California Sur, Mexico.

Escobedo-Fregoso C.¹ , Alvarado-Arellano A.Q.², Hernández-González J.A.² ,
Mendoza Carrión G.², Vázquez-Juárez R.^{2*} 

¹ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S. Mexico. C.P. 23096

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S. Mexico. C.P. 23096



Please cite this article as/Como citar este artículo: Escobedo-Fregoso C., Alvarado-Arellano A.Q., HernándezGonzález J.A., Mendoza Carrión G., Vázquez-Juárez R. (2023). Ostreid Herpesvirus 1 in pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* from Baja California Sur, Mexico. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1489. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1489>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: March 10th 2023.

Accepted/Aceptado: June 26th 2023.

Available on line/Publicado: August 16th 2023.

RESUMEN

Este estudio reporta por primera vez la presencia del herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHV-1) en la almeja *Nodipecten subnodosus* de Baja California Sur, México, colectada de 2010 a 2012. Este reporte se fundamenta en un estudio retrospectivo para evaluar si OsHV-1 estuvo implicado en el decaimiento de la población de *N. subnodosus* a partir del 2010. El virus fue detectado por PCR y las partículas virales fueron cuantificadas mediante qPCR. La detección de OsHV-1 de *N. subnodosus* fue realizada amplificando con PCR tres regiones diferentes del genoma utilizadas para describir las variantes de OsHV-1. Se realizó un análisis filogenético para mostrar la posición de OsHV-1 de *N. subnodosus* en muestras de OsHV-1 colectadas anteriormente en diferentes países y bivalvos, obteniendo que OsHV-1 of *N. subnodosus* es diferente a OsHV-1 μ Var. Los análisis de similitud mostraron diferencias entre OsHV-1 de *Crassostrea gigas* y el OsHV-1 de *N. subnodosus* de México, sin embargo, la secuencia fue idéntica al OsHV-1 de Francia 1993. Este estudio contribuye a comprender la diversidad genética de OsHV-1 e identificar el hospedero potencial del virus o las especies involucradas en el ciclo viral.

PALABRAS CLAVE: Enfermedades de ostreidos, *Nodipecten subnodosus*, polimorfismo viral, bivalvos, OsHV-1

*Corresponding Author:

Ricardo Vázquez Juárez, Programa de Acuicultura, CIBNOR, S.C. Instituto Politécnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita Sur, La Paz, B.C.S. México: C.P. 23096

ABSTRACT

The present study is the first report of the presence of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) in the pacific lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus* from Baja California Sur, Mexico, collected from 2010 to 2012. The retrospective study was conducted to evaluate if the OsHV-1 was implicated in the population decline of 2010. OsHV-1 was detected by PCR, while viral particles were quantified by qPCR. OsHV-1 detection was conducted by PCR amplification of three different genome regions used to identify OsHV-1 variants. The phylogenetic analysis revealed the position of *N. subnodosus* OsHV-1 among OsHV-1 samples previously collected in different countries and bivalves, where the OsHV-1 of *N. subnodosus* was different from OsHV-1 μ Var. Similarity analyses showed differences between the OsHV-1 of *Crassostrea gigas* and the OsHV-1 of *N. subnodosus* from Mexico, however, the sequence was identical to that of OsHV-1 from France 1993. This study contributes to understanding the OsHV-1 genetic diversity and identifies the potential virus host or species involved in the viral cycle.

KEY WORDS: Oyster's diseases, *Nodipecten subnodosus*, viral polymorphism, bivalves, OsHV-1.

Introducción

La pesquería de la almeja *Nodipecten subnodosus* fue una actividad económicamente importante en Laguna Ojo de Liebre, localizada al norte de Baja California Sur (BCS), México. La población de *N. subnodosus* disminuyó por causas desconocidas, se sugiere que la causa pudiera ser la sobre-explotación, aunada a la baja tasa reproductiva (González-Ortiz *et al.*, 2017). Sin embargo, los patógenos en el área son un factor a considerar, motivo por el cual se realizó este estudio que detectó el virus tipo herpes de ostreidos OsHV-1 en *N. subnodosus*, debido a que en el área de laguna Ojo de Liebre se cultiva el ostión *C. gigas* introducido de diferentes países. El virus OsHV-1 se ha dispersado ampliamente, y se ha detectado en diferentes bivalvos como ostiones, almejas, mejillones (Arzul *et al.*, 2001a); sin embargo, las mayores mortalidades son causadas en *C. gigas* (Renault *et al.*, 1994). En BCS, el virus OsHV-1 no había sido reportado; sin embargo, en el estado vecino de Baja California y en la laguna La Cruz de Sonora, México el virus OsHV-1 se detectó en *C. gigas* (Vasquez-Yeomans *et al.*, 2004; Martínez-García *et al.*, 2020).

El genoma de OsHV-1 esta integrado por 124 ORFs (Davison *et al.*, 2005; Gallardo-Ybarra *et al.*, 2019), y diferentes areas son utilizadas para su diagnóstico. Las regiones ORF 35–38 y ORF 42–43 son polimórficas, y la región ORF 100 es menos polimórfica (Davison *et al.*, 2005); sin embargo, el ORF 4 es aparentemente la mejor región polimórfica para describir la diversidad

del virus (Renault *et al.*, 2012; De la Re-Vega *et al.*, 2017). Los análisis filogenéticos de la región ORF 4 muestran diferencias entre los aislados del virus de Francia 1993 y France 2005–2012 (Martenot *et al.*, 2015), e incluso a permitido identificar la variante mas patogénica OsHV-1 μ Var (Segarra *et al.*, 2010). Este estudio describe por primera vez la presencia de OsHV-1 in BCS México, y compara la filogenia entre el virus que hospeda en *C. gigas* y en *N. subnodosus*.

Material y Métodos

Detección de OsHV-1

El virus fue analizado en 15 almejas del 2010, 15 del 2011, 66 del 2012, y 44 del 2013. Se juntó una porción de branquias y manto de cada individuo adulto de *N. subnodosus* de laguna Ojo de Liebre, BCS, México. Las branquias fueron muestreadas porque es el sitio de replicación de virus en *C. gigas* y el manto porque se ha encontrado inactivo en *C. gigas* (Gallardo-Ybarra *et al.*, 2019). El DNA se extrajo siguiendo las instrucciones del protocolo QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Alemania). Una porción de manto y branquias (10 mg) de cada individuo se homogenizó con 100 μ L del amortiguador de lisis ATL y 20 μ L de proteinasa K, y se incubó a 56 °C por 1 h. El botón celular fue recuperado con centrifugación (8000 rpm), posteriormente se incorporaron 200 μ L de etanol al 96 %. El botón celular se lavó con 500 μ L de amortiguador AW1 y se filtró con las columnas del kit a 8000 rpm, y 500 μ L de amortiguador AW2 se adicionó y centrifugó. El DNA se resuspendió con agua destilada.

Se amplificaron 709 pb del ORF 4 con los cebadores C2/C6 (Arzul *et al.*, 2001b), 607 pb del ORF 42–43 se amplificaron con los cebadores IA2–IA1 (Segarra *et al.*, 2010), y para el ORF 35–38 se utilizaron los cebadores Del 36–37F/Del 36–37R (Renault *et al.*, 2012) que amplifican dos amplicones de 989 pb o 384 pb. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 μ L, con 2.5 U (0.5 μ L) de Taq polimerasa DNA GoldStar , 5 μ L 10 \times de amortiguador para Taq DNA polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium), 1.5 mM de MgCl₂ excepto para el cebador Del 36–37F/Del 36–37R que se utilizaron 2 mM MgCl₂, 0.05 mM de dNTP, 1 μ M de cada cebador, y 100 ng de DNA. Las condiciones del PCR fueron de 3 min a 94 °C, 42 ciclos a 94 °C por 1 min, 58 °C por un minuto (55 °C para IA2/IA1), y un paso de elongación a 72 °C por 90 s. Los tamaños esperados fueron purificados con el kit *gel extraction kit Montage* (Merck Millipore, MA, EU) y secuenciados en el equipo ABI PRISM®3130 XL-Avant (Thermo Fisher Scientific, MA, EU).

Cuantificación de OsHV-1 por qPCR

Las copias del virus OsHV-1 se cuantificaron en las 10 muestras que fueron positivas (10 almejas) a OsHV-1 (Tabla 1). Las reacciones de PCR se realizaron en 20 μ L con 10 μ L de Brilliant® SYBR Green PCR, 25 ng de DNA, 5 μ M de los cebadores DPF/DPR (Webb *et al.*, 2007), y agua. Las copias fueron cuantificadas en el sistema qPCR Mx3000p (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EU) en el laboratorio de genética y patología de IFREMER, Francia. Las condiciones del qPCR fueron: 95 °C por 3 min, 40 ciclos a 95 °C durante 5 s, y 60 °C por 20 s; la curva de

disociación se realizó a 95 °C por 1 min, 60 °C por 30s y 95 °C 30s. El número de copias/ng de OshV-1 del DNA se comparó con la curva estándar para OshV-1 μ Var (HQ842610).

Análisis de secuencias

Se realizó el alineamiento múltiple en el programa en línea CLUSTAL W. Todas las secuencias fueron recortadas de acuerdo a la secuencia de referencia del virus AY5093253. Las distancias filogenéticas de la región ORF 4 se calcularon con el modelo Tamura Nei, y las regiones ORF 35–38 y ORF42–43 fueron evaluadas con el modelo Tamura-3-parametro en MEGA 6. Los árboles filogenéticos fueron evaluados con 10,000 repeticiones.

Resultados y Discusión

Detección de OshV-1

Las regiones ORF 42–43, y ORF 35–38 del virus tipo herpes de ostreidos, se detectó en solo 10 muestras de *N. subnodosus* (Tabla 1). El tamaño del amplicón del ORF 35–38 fue de 384 pb, longitud que corresponde a la delección de 605 pb en el genoma de OshV-1 μ Var (HQ842610). El amplicón de 989 pb de OshV-1 no se detectó en este estudio, sugiriendo que el virus detectado en *N. subnodosus* tiene la característica del virus OshV-1 μ Var. Sin embargo, el análisis de similitud de la región ORF 35–38 con los herpesvirus de ostreidos, indicaron el 100 % de identidad con el virus OshV-1 de Francia, Japón, Portugal, y Nueva Zelanda (KT429193, KT429194, KT429195, y JN800252), con un 99 % de cobertura y 100 % de identidad con *Chlamys farreri* virus de la necrosis aguda (GQ153938), y un 98 % de cobertura, presentó un 99 % de similitud con el virus OshV-1 μ Var (KF185077). Los resultados de esta región, indican una alta similitud con los virus OshV-1 y OshV-1 μ Var; sin embargo, la región ORF 35–38 presenta bajo polimorfismo.

Los análisis de similitud de la región ORF 42–43 presentaron 99 % de identidad con el genoma de OshV-1 (AY509253) y con *C. farreri* virus de la necrosis aguda. La similitud con el virus OshV-1 μ Var (KU864508 y KU864508) fue del 99 %, con el 91 % de cobertura. Este resultado muestra la alta similitud con los virus OshV-1 y OshV-1 μ Var, por lo cual se evaluó la región ORF 4, que es más polimórfica y permite identificar entre estos virus.

A pesar de que las regiones ORF 42–43 y ORF 35–38 de OshV-1 fueron detectadas en 10 muestras, la región ORF 4 solamente se detectó en una muestra (Tabla 1). La inconsistencia entre los resultados se debe al alto polimorfismo en la región ORF4 (Arzul *et al.*, 2001b) comparada con las regiones ORF 35–38 y ORF 42–43. De acuerdo al análisis de similitud, la secuencia de la región ORF 4 del virus de ostreidos detectado en *N. subnodosus* tiene la mayor similitud con (97 % identidad, y 96 % cobertura) con el virus OshV-1 de Francia aislado en 1993 (JN800065), y solo el 87 % de cobertura presentó un 98% con el virus OshV-1 μ Var de *C. gigas* de Francia (KF185073). Adicionalmente, el 87 % de cobertura, presentó el 97 % de identidad con el virus *C. farreri* (GQ153938).

El análisis de las tres regiones del virus detectado en *N. subnodosus*, presenta mayor similitud con el virus OsHV-1, seguido del virus de la necrosis aguda que causa mortalidades en *Chlamys farreri* (Ren et al., 2013), y con el virus OsHV-1 μ Var of *C. gigas*. Sin embargo, el análisis con la región más polimórfica ORF 4 presenta la mayor similitud con el virus OsHV-1.

Tabla 1. Diagnóstico de OsHV-1 en muestras de *N. subnodosus* analizadas por qPCR y PCR

Sample name	Sampling date	qPCR		PCR		
		ORF100 DPF/DPR		ORF4 C2/C6 (709 bp)	ORF 42-43 IA1/IA2 (607 bp)	ORF 35-38 Del 35-38 (989 bp, or 384 bp)
		No. of Ct	Viral copies/ ng of total DNA			
A1	November 2012	38.07	2.10	Not detected	+	+(384 bp)
A2		37.81	2.56	+	+	+(384 bp)
A3		36.26	8.29	Not detected	+	+(384 bp)
B4		38.68	1.32	Not detected	+	+(384 bp)
B5	August 2011	37.18	4.14	Not detected	+	+(384 bp)
B6		38.96	1.07	Not detected	+	+(384 bp)
B7		38.88	1.13	Not detected	+	+(384 bp)
B8		38.06	2.11	Not detected	+	+(384 bp)
C9	June 2010	Not detected	Not detected	Not detected	+	+(384 bp)
C10		39.90	5.24E-001	Not detected	+	+(384 bp)

Filogenia del virus tipo herpes de ostreidos

De acuerdo a los resultados filogenéticos, las secuencias del ORF 4 de los herpes virus de ostreidos se agruparon en dos clados principales (Figura 1). El primero agrupó a las secuencias de OsHV-1 de Asia, Oceanía, Francia 2008–2012, USA San Diego (MW504462), y la secuencia del OsHV-1 μ Var de Francia (HQ842610). El segundo clado agrupó las secuencias de OsHV-1 de *C. gigas* de Francia del 2003, USA del 2007, México del 2011 (Grijalva-Chon et al., 2013), y con la secuencia de referencia AY509253, la cual es 100% igual a la secuencia de OsHV-1 de *C. gigas* cultivado en el Estero La Cruz, Sonora, México 2017–2018 (Martínez-García et al., 2020), y con la secuencia del virus detectado en *C. gigas* del Estero Morua, en bahía Kino, Sonora, México (De La Re Vega et al., 2017). Sin embargo, el virus OsHV-1 de *N. subnodosus* de México 2012 (OQ716803) y la secuencia de *C. gigas* de Francia 1993 (JN800065) se agruparon en un subclado.

La alta similitud del virus OsHV-1 de *N. subnodosus* con el virus OsHV-1 de Francia 1993, y la divergencia con los aislados de Francia 2008–2012, sugieren que el virus OsHV-1 de *N. subnodosus* no es de reciente introducción a México. Aunque el virus se reportó en *C. gigas* muestreadas en el 2011, el alineamiento de las secuencias de la región ORF 4 del OsHV-1 de *N. subnodosus* (OQ716803) cuenta con una deleción de 21 pb en la región microsatelite comparada con la secuencia de *C. gigas* de México (JF894308), por lo cual se considera que son diferentes fenotipos los virus de OsHV-1 de *N. subnodosus* y el de *C. gigas* de México (JF894308).

El análisis filogenético del vecino más cercano de la región ORF 42–43 de OsHV-1 detectado en *N. subnodosus* (OQ716804, Figura 1), indica una divergencia del virus OsHV-1 μ Var. La secuencia de OsHV-1 detectada en *N. subnodosus* se agrupó con las secuencias de OsHV-1 del genoma de referencia, con el OsHV-1 de Francia 1993, y con *Chlamys farreri* virus de la necrosis aguda. El análisis filogenético de la región ORF35–38 de OsHV, separó el virus de *N. subnodosus* del clado del virus OsHV-1 μ Var (KF185077), descartando que el virus de *N. subnodosus* es la microvariante OsHV μ Var que causa altas mortalidades en Francia.

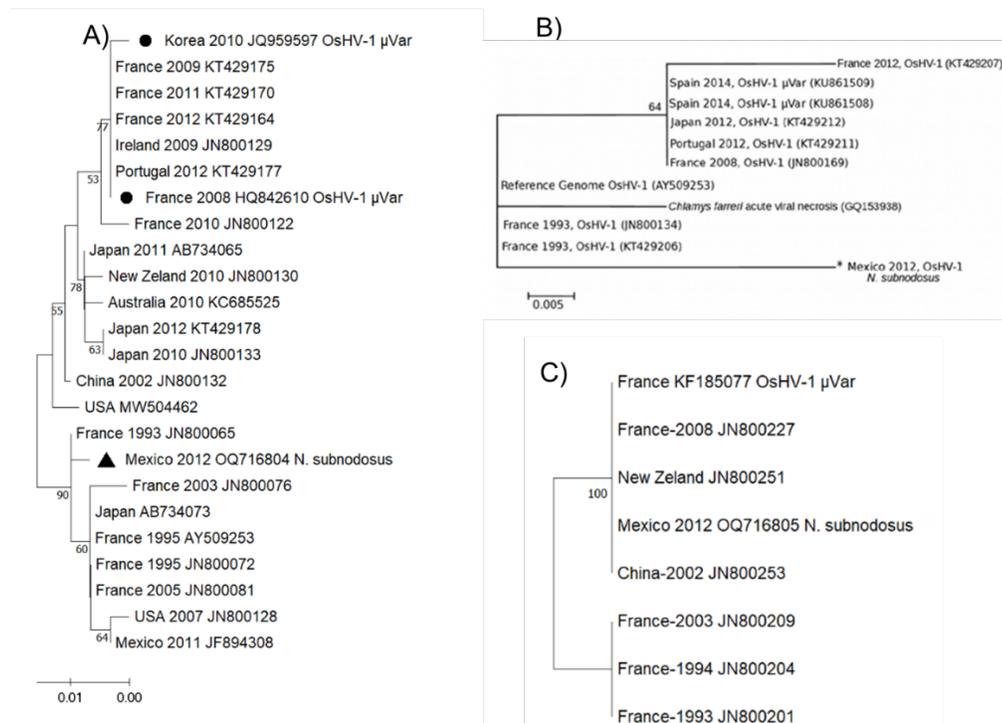


Figura 1. Árbol filogenético de la región.

A) ORF4 de OsHV-1. Análisis evaluado con el algoritmo Neighbor-joining, soportado con 10,000 repeticiones bootstrap basado en el modelo de Kimura-2-parametros. B) Árbol filogenético de la región ORF-42-43 y ORF 35-38 de OsHV-1 evaluado con el algoritmo Neighbor-joining, soportado con 10,000 repeticiones bootstrap basado en el modelo de Tamura-3-parametros.

Carga viral en *N. subnodosus*

El análisis de detección de OsHV-1 mediante qPCR, detectó 9/10 muestras positivas, sin embargo, la carga viral fue baja, e incluso no se detectó en una muestra que amplificó por PCR las regiones ORF 42–43 y ORF 35–38, esto se asocia a las diferencias de las regiones de amplificación que se realizaron por qPCR. Reportes de cargas virales por debajo a 50 copias/mg de tejido en *C. gigas* no causan mortalidades en Francia (Pepin *et al.*, 2008), y cargas virales de 2.6×10^4 copias/ng de DNA total se han encontrado en *Ostrea edulis* muertos (López Sanmartín *et al.*, 2016). Se sugiere que la baja carga viral encontrada en *N. subnodosus* no es la causa de las mortalidades en las almejas adultas, y la transmisión del virus puede ser de *C. gigas* cultivado en la laguna. Sin embargo, esta detección de OsHV-1 se realizó únicamente en almejas vivas, las cuales pudieran ser las no infectadas. Monitoreos a lo largo del año, podrían clarificar el efecto de los factores ambientales sobre la carga viral.

En conclusión, el virus tipo herpes de los ostreidos fue detectado en *N. subnodosus* de la laguna Ojo de Liebre, BCS, México, siendo un aislado diferente al virus OsHV-1 μ Var. La alta similitud entre el OsHV-1 de *N. subnodosus* y el OsHV-1 de Francia 1993, indica que el virus no fue recientemente introducido a BCS, México, siendo un riesgo si se dispersa mediante los cultivos de *C. gigas* cultivado en el área. La baja carga viral detectada en este estudio, sugieren que las almejas sobrevivientes adultas de *N. subnodosus* actúan como hospederos asintomáticos del virus OsHV-1 y probablemente son un reservorio del virus.

Con base en los resultados presentados, se debe descartar la posibilidad de que el virus OsHV-1 sea la causa de las altas mortalidades y el decrecimiento de las poblaciones de *N. subnodosus*. Sin embargo, los organismos muestreados fueron los sobrevivientes y la detección puede estar asociada a una selección de organismos resistentes por lo que se recomienda un muestreo estacional.

Contribución de Autores

“Conceptualización del trabajo, CEF, RVJ. Desarrollo de la metodología, AQAA, JAHG. Análisis de resultados, AQAA, CEF, JAHG, RVJ. Escritura y preparación del manuscrito, AQAA, CEF, GMC. Redacción, revisión y edición, CEF, RVJ. Administrador de proyectos, adquisición de fondos, CEF, RVJ.

Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México mediante Beca #106887 SEP-CONACYT.

Referencias

- Arzul, I., Nicolas, J. L., Davison, A. J., & Renault, T. (2001a). French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*, 290(2), 342–349. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1186>
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., & Davison, A. J. (2001b). Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*, 82(Pt 4), 865–870. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-4-865>
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R. M., & Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology*, 86(1), 41–53. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
- De-la-Re-Vega, E., Sánchez-Paz, A., Gallardo-Ybarra, C., Lastra-Encinas, M. A., Castro-Longoria, R., Grijalva-Chon, J. M., López-Torres, M. A., & Maldonado-Arce, A. D. (2017). The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpes virus 1 infectivity. *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.07>
- Gallardo-Ybarra, C., Minjarez-Osorio, C., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., Lastra-Encinas, M. A., & De-la-Re-Vega, E. (2019). Expression and Tropism of the Ostreid Herpesvirus 1 in two tissues of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 21(3), 35–40. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v21i3.1009>
- González-Ortiz, L., Hernández-Alcántara, P., Vázquez-Juárez, R., Quiroz-Guzmán, E., García-Garza, M. E., & de León-González, J. Á. (2017). Variación espacial y temporal de la infestación de la concha por *Polydora* sp. (Spionidae: Polychaeta) sobre la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en la laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(4), 845–852. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.10.017>
- Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J., Enríquez-Espinoza, T. L., & Mendoza-Cano, F. (2013). Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. *Journal of Fish Disease*, 36(11), 965–968. <https://doi.org/10.1111/jfd.12028>
- López Sanmartín, M., Power, D.M., de la Herrán, R., Navas, J. I., & Batista, F. M. (2016). Experimental infection of European flat oyster *Ostrea edulis* with ostreid herpesvirus 1 microvar (OsHV-1 μ var): Mortality, viral load and detection of viral transcripts by *in situ* hybridization. *Virus Research*, 217, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.01.023>
- Martenot, C., Lethuillier, O., Fourour, S., Oden, E., Trancart, S., Travaillé, E., & Houssin, M. (2015). Detection of undescribed ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) specimens from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132(1-2), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.012>
- Martínez-García, M. F., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R., De Re-Vega, E., Valera-Romero, A., & Chávez-Villalba, J. E. (2020). Prevalence and genotypic diversity of ostreid herpesvirus type 1 in *Crassostrea gigas* cultured in the Gulf of California, Mexico. *Disease of Aquatic Organisms*, 138, 185–1194. <https://doi.org/10.3354/dao03462>
- Pepin, J.F., Riou, A., & Renault, T. (2008). Rapid and sensitive detection of Ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virology Methods*, 149(2), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.022>
- Ren, W., Chen, H., Renault, T., Cai, Y., Bai, C., Wang, C., & Huang, J. (2013). Complete genome

- sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal*, 10(1), 110. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-110>
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Cochenec, N., & Maffart, P. (1994). Herpes viruses associated with mortalities among Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in France-Comparative study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 145(1), 735–742. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2898/>
- Renault, T., Moreau, P., Faury, N., Pepin, J. F., Segarra, A., & Webb, S. (2012). Analysis of clinical Ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal of Virology*, 86(10), 5942–5497. <https://doi.org/10.1128/jvi.06534-11>
- 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(1), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.011>
- Vasquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J., & Figueras, A. (2004). Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *J. Shellfish Research*. 23, 417–419. http://findarticles.com/p/articles/mi_m0QPU/is_2_23/ai_n6276406/
- Webb, S. C., Fidler, A., & Renault, T. (2007). Primers for PCR-based detection of Ostreid herpes virus-1 (OsHV): Application in survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture*, 272(1-4), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.224>