

## CAPÍTULO 2.3.10.

# HERPESVIROSIS DEL SALMÓN MASOU

---

## 1. Ámbito de aplicación

La herpesvirosis del salmón masou (*Oncorhynchus masou*) (HVSM) es un trastorno oncogénico que cursa con ulceraciones de la piel y hepatitis en peces salmónidos de Japón, y que probablemente también tiene lugar en los ríos costeros de Asia oriental en los que habita salmón del Pacífico.

## 2. Información sobre la enfermedad

### 2.1. Factores del agente

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

El agente etiológico es el virus de *Oncorhynchus masou* (VOM), de la familia Herpesviridae, aunque también se ha denominado virus Nerka del Lago Towada, un lago de la prefectura de Akita y Amori (VNLT), virus del tumor de Yamame (VTY), virus del tumor del coho (VTSC), virus de *O. kisutch* (VOK), herpesvirus del coho (HVSC), virus del riñón de la trucha arco iris (VRTA) o herpesvirus de la trucha arco iris (HVTA) (Yoshimizu *et al.*, 1995).

#### 2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Se observó una reducción significativa en el título infeccioso del VOM en un plazo de 3 y de 7 días en agua ambiental a 15°C y a 10°C, respectivamente. No obstante, la infectividad se mantuvo durante 7-14 días en un ambiente de menos de 5°C (Yoshimizu *et al.*, 2005), lo cual indica la presencia de cepas bacterianas con actividad antivírica en el agua.

#### 2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

En acuicultura, a menudo es fundamental disponer de suministros de agua libre de patógenos. El agua que procede de ríos o lagos, a menudo utilizada en los viveros, contiene agentes patógenos para los peces. Este tipo de suministros de agua abierta no deben utilizarse sin un tratamiento que permita matar dichos agentes patógenos para los peces. Los virus de los peces se clasifican en dos grupos en función de su sensibilidad a la luz UV. El VOM pertenece a un grupo sensible y se inactiva por tratamiento con una dosis de radiación ultravioleta de  $10^4 \mu\text{W segundo cm}^{-2}$  (Yoshimizu *et al.*, 1986). A 15°C durante 20 minutos, las concentraciones mínimas de yodóforos, solución de hipoclorito de sodio, solución de cloruro de benzalconio, solución de cresol saponificada, solución de formaldehído y solución de permanganato de potasio que permiten un 100% de reducción de la placa de VOM fueron de 40, 50, 100, 100, 3.500 y 16 mg litro<sup>-1</sup>, respectivamente (Hatori *et al.*, 2003).

El VOM es sensible al calor, al éter y al medio ácido (pH 3) y no hemaglutina células O humanas. Se inactiva por completo mediante radiación ultravioleta (UV) con  $3,0 \times 10^3 \mu\text{W segundo cm}^{-2}$ . En presencia de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  del análogo de la pirimidina 5- yododesoxiuridina (IUdR), la replicación se inhibe. La replicación del VOM también se inhibe mediante agentes antiherpéticos, como el fosfonoacetato (PA), el aciclovir (ACV), la (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVdU), y la 1-B-D-arabino- furanosilcitosina (Ara-C), debido a la inhibición de la ADN polimerasa inducida por el VOM (Kimura *et al.*, 1981a; 1983a; 1983b).

#### 2.1.4. Ciclo de vida

Tras la fase de septicemia de la infección por el VOM, tiene lugar una respuesta inmunitaria que da lugar a la síntesis de anticuerpos neutralizantes contra el VOM. A menudo se produce un estado de portador que hace que el virus se excrete con los productos sexuales en el momento del desove.

## 2.2. Factores del hospedador

### 2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles (nombres comunes y científicos)

Las especies de peces que son susceptibles al VOM son las siguientes: el salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), el salmón masou (*O. masou*), el keta (*O. keta*), el coho (*O. kisutch*) y la trucha arco iris (*O. mykiss*) (Kimura *et al.*, 1983c).

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

La edad de los peces es crucial y los alevines de 1 mes son la diana más susceptible del virus (Kimura *et al.*, 1981b; 1983c). El factor ambiental que más favorece la infección por el VOM es una baja temperatura del agua, inferior a los 15°C (Kumagai *et al.*, 1994).

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

Los salmónidos son los únicos peces susceptibles a la infección por el VOM; de más a menos susceptibles, los peces se ordenan como sigue: salmón rojo, keta, salmón masou, coho y trucha arco iris (Kimura *et al.*, 1983a).

### 2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Clínicamente, la infección inicial por el VOM es sistémica y a menudo letal, y se asocia a edema y hemorragias. La multiplicación del virus en células endoteliales de los capilares sanguíneos, tejidos hematopoyéticos y hepatocitos subyace a los signos clínicos. Cuatro meses después de los primeros signos clínicos, una cantidad variable de peces supervivientes presenta epitelomas que tienen lugar principalmente alrededor de la boca (mandíbula superior o inferior), y, en menor grado, en la aleta caudal, el opérculo y la superficie del cuerpo (Kimura *et al.*, 1981a; Yoshimizu *et al.*, 1987). Esta neoplasia puede persistir durante incluso 1 año tras la infección. En el caso del coho, en concreto peces infectados de 1 año de edad presentan úlceras en la piel, manchas blancas en el hígado y tejidos neoplásicos alrededor de la boca o en la superficie del cuerpo. En el caso de la trucha arco iris, peces de tamaño comercial fueron infectados y los peces enfermos casi no presentaron signos externos, aunque algunos manifestaron lesiones ulcerantes en la piel. Internamente, se observaron hemorragias intestinales y manchas blancas en el hígado (Furihata *et al.*, 2003).

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

En condiciones naturales, los supervivientes a la HVSM quedan infectados de forma persistente por el virus y lo excretan; los peces retienen el virus hasta la edad adulta (Yoshimizu *et al.*, 1993).

### 2.2.6. Vectores

El agua es el principal vector abiótico. No obstante, en la transmisión también pueden intervenir otras especies de peces, como invertebrados parasitarios o aves y mamíferos piscívoros.

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

Existe un caso de ejemplares de salmón masou que se capturaron en la boca del río y que presentaban neoplasias alrededor de la boca, de las cuales se aisló el VOM. Recientemente, se ha observado que truchas arco iris que vivían en el río y que podrían haber escapado de piscifactorías estaban infectadas por el VOM y murieron (Furihata *et al.*, 2003; Yoshimizu y Nomura, 2001).

## 2.3. Patrón de la enfermedad

### 2.3.1. Mecanismos de transmisión

Los reservorios del VOM son peces infectados clínicamente y abarcan portadores de entre grupos de peces de piscifactoría, asilvestrados o salvajes. El virus infeccioso se excreta con las heces, la orina, productos sexuales y probablemente el moco de la piel, mientras que el riñón, el bazo, el hígado y los tumores son los lugares donde el virus es más abundante durante el curso de una infección manifiesta. La transmisión del VOM es horizontal y posiblemente “se asocia a la superficie de los huevos”. La transmisión horizontal puede ser directa o vectorial, en la que el agua es el principal factor abiótico. La desinfección de los huevos justo después de la fecundación y del desarrollo embrionario es eficaz para la prevención de la infección por el VOM. La enfermedad causada por el VOM no se ha observado en alevines procedentes de huevos desinfectados que han sido incubados y desovados en agua libre del virus (Yoshimizu, 2009).

### 2.3.2. Prevalencia

Se ha aislado el VOM del salmón masou en todos los lugares estudiados a excepción de un vivero. En base a nuestro estudio epizootológico, se considera que las raíces del VOM se encuentran en la costa del Mar de Japón a la altura de Hokkaido, y se considera que el salmón masou fue una de las primeras especies hospedadoras. En los años 1960, se recogieron huevos de salmón masou de los ríos de la costa del Mar de Japón a la altura de Hokkaido, y se transportaron a la isla de Honshu, la principal del archipiélago japonés. Con los desplazamientos de peces sin restricción, el virus se propagó a varios lugares de Honshu, donde se observó el primer cáncer en salmón masou (Kimura, 1976). Posteriormente, se llevaron a cabo cultivos de coho y de trucha arco iris en las mismas aguas en las que se había cultivado el salmón masou. El coho podría haber resultado infectado por el VOM en la fase de alevín en agua dulce, porque se hallaron tejidos tumorales alrededor de la boca de ejemplares de coho cultivados en compartimientos en el mar; el vivero del cual se trasplantaron ejemplares de coho a compartimientos en el mar tenía antecedentes de HVSM (Furihata *et al.*, 2003; Kumagai *et al.*, 1994; Yoshimizu y Nomura, 2001).

### 2.3.3. Distribución geográfica

Tras los primeros informes de HVSM en el norte de Japón (Kimura *et al.*, 1980), la zona geográfica considerada afectada por la enfermedad se ha vuelto muy amplia dentro de Japón. No se dispone de informes de la aparición de la enfermedad fuera de este país.

### 2.3.4. Mortalidad y morbilidad

Se ha estudiado experimentalmente la susceptibilidad de los alevines de varias especies de salmónidos al VOM, mediante inmersión en agua que contenía 100 DICT<sub>50</sub> (mediana de la dosis infectiva en cultivo tisular) ml<sup>-1</sup> de VOM a 10°C durante 1 hora. Al comparar los alevines de las cinco especies distintas de salmónidos, a la edad de 1 mes, se observó que el salmón rojo presentaba la mayor sensibilidad, con un 100% de mortalidad. El salmón masou y el keta también presentaron una alta sensibilidad, con mortalidades del 87% y del 83%, respectivamente. El coho y la trucha arco iris presentaron menos sensibilidad a la infección por el VOM, con mortalidades del 39% y de 29%, respectivamente. Así, el VOM tiene muchos hospedadores entre las especies de salmónidos (Kimura *et al.*, 1983c). Ocho grupos de edad de keta (de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 meses de edad) se sumergieron en las mismas condiciones. La mortalidad acumulada del keta acabado de desovar, observada a lo largo de los 4 meses siguientes, fue del 35%, pero en alevines de entre 1 y 5 meses de vida, fue superior al 80%. A los 6 y 7 meses, la susceptibilidad de los alevines se redujo y solo un 7% y un 2% de los peces, respectivamente, sucumbieron a la enfermedad. No hubo muertes en los alevines de 8 meses de edad. Por otra parte, los alevines de salmón masou de 1 mes de vida fueron más sensibles y la mortalidad acumulada alcanzó el 87%. En alevines de entre 3 y 5 meses de vida, la mortalidad acumulada descendió del 65% al 24% (Kimura *et al.*, 1983c). Desde 1988, se habían aislado herpesvirus del hígado, el riñón y neoplasias en desarrollo en coho cultivados en estanque y en compartimientos en el mar (Kumagai *et al.*, 1994). Los peces afectados mostraban los siguientes signos clínicos: úlceras en la piel, manchas blancas en el hígado y tejidos neoplásicos en la boca o la superficie corporal. El cultivo del coho resultó afectado económicamente por esta enfermedad. Todos estos virus se neutralizaron mediante suero de conejo anti-VOM o anti-VNLT, y se confirmó oncogenicidad mediante infección experimental. El virus aislado mostró una fuerte patogenicidad en el coho. En cuanto a la trucha arco iris, se han observado casos de mortalidad masiva en cultivos de estanque de Hokkaido desde 1992. Los peces enfermos casi no han mostrado signos clínicos. Algunos peces han presentado lesiones ulcerantes en la piel. Internamente, se han observado hemorragias intestinales y manchas blancas en el hígado. Tuvieron lugar epizootias en trucha arco iris de piscifactoría de entre 12 g y 1,5 kg de peso en 18 piscifactorías entre febrero del 2000 y enero del 2001 en la Prefectura de Nagano, en Japón. Se hallaron títulos de infectividad altos, de alrededor de 10<sup>8</sup> DICT<sub>50</sub> g<sup>-1</sup> en los principales órganos internos y se observaron múltiples focos necróticos en el hígado. El virus se identificó como VOM utilizando pruebas serológicas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En más del 80% de los casos, los brotes se asociaron a introducciones de peces vivos (Furihata *et al.*, 2003).

### 2.3.5. Factores ambientales

En los viveros se aplican medidas de higiene general por norma. Debe tenerse cuidado de evitar los traslados de equipo de un tanque a otro, todo el cual debe desinfectarse tras cada uso. Deben desarrollarse cuidadosamente métodos de desinfección de cada unidad de desove, teniendo en cuenta la toxicidad de las sustancias químicas para los peces, los efectos de la temperatura del agua y su uso reiterado. Debe recordarse que los trabajadores en sí podrían servir de eficientes vectores a los agentes patógenos y que una cuidadosa desinfección de manos y botas será necesaria para prevenir la diseminación de los virus. Aunque tal vez sea difícil desinfectar las unidades de desove y engorde cuando se están utilizando, los canales y estanques deben desinfectarse con cloro antes y después de ser usados (Yoshimizu, 2009).

## 2.4. Control y prevención

El VOM es sensible al tratamiento con radiación ultravioleta, con ozono y con iodóforos (Yoshimizu y Kasai, 2011). Desde 1983, se ha recomendado vivamente como estrategia de control la inspección del líquido ovárico de peces adultos y la desinfección con yodo de huevos recogidos en todos los viveros de Hokkaido al inicio de la fase de desarrollo embrionario. Actualmente, en la mayoría de viveros de esta zona ya no se detecta el VOM. Hoy en día, todos los huevos e instalaciones se han desinfectado con iodóforos justo antes de la fecundación y de nuevo al principio del desarrollo embrionario. Gracias a ello, ya no se aísla VOM de la zona de Hokkaido y Tohoku, y se podrían evitar los brotes de HVSM en salmón masou y en coho, aunque no en trucha arco iris (Furihata *et al.*, 2003; Yoshimizu, 2009).

### 2.4.1. Vacunación

La vacunación de trucha arco iris adulta con VOM inactivado por formalina podría reducir el porcentaje de resultados positivos al VOM en los análisis de líquido ovárico (Yoshimizu y Kasai, 2011). Además, la vacunación con VOM inactivado por formalina es muy eficaz para proteger a los alevines de la infección por el VOM (Yoshimizu y Kasai, 2011)

### 2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

La eficacia terapéutica del compuesto ACV (manzana, sidra y vinagre) se evaluó utilizando el VOM y alevines de keta. Los peces se infectaron experimentalmente con el VOM, y se trataron con ACV por vía oral o por inmersión. La inmersión diaria de peces en solución de ACV ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 30 minutos  $\text{día}^{-1}$ , 15 veces) redujo la mortalidad de los peces infectados. La administración por vía oral de ACV ( $25 \mu\text{g pez}^{-1}$  al día, 60 veces) no afectó a la supervivencia del keta. Por el contrario, el grupo al que se administró IUDR por vía oral mostró una mayor supervivencia que el grupo al que se administró ACV. Esto sugirió que no se mantuvo un nivel eficaz de ACV en los peces que recibieron el producto por vía oral. La inmersión diaria de peces infectados en solución de ACV ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 30 minutos  $\text{día}^{-1}$ , 60 veces) suprimió considerablemente el desarrollo de tumores inducidos por el VOM (Kimura *et al.*, 1983a; 1983b).

### 2.4.3. Inmunoestimulación

Actualmente no se dispone de ninguna información publicada sobre el uso de inmunoestimulantes para el control de la HVSM en salmónidos. Sin embargo, se sabe que este es un campo de investigación interesante.

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

Actualmente no se dispone de ninguna información publicada sobre el uso de la selección genética a favor de la resistencia para el control de la HVSM en salmónidos.

### 2.4.5. Repoblación con especies resistentes

Los híbridos constituyen un posible método de control para prevenir pérdidas importantes derivadas de la HVSM. En estudios sobre una población de salmónidos híbridos triploides (trucha arco iris tetrámera x trucha marina) se ha observado que son resistentes a la HVSM.

### 2.4.6. Agentes bloqueantes

No es aplicable.

### 2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

La desinfección de los huevos puede llevarse a cabo mediante tratamiento con iodóforos. Se ha observado que el VOM se inactiva mediante iodóforos a razón de  $50 \text{ mg litro}^{-1}$  durante 15 minutos a  $15^\circ\text{C}$ , o  $25 \text{ mg litro}^{-1}$  durante 20 minutos a  $15^\circ\text{C}$  (Yoshimizu, 2009).

### 2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las medidas de bioseguridad deben incluir el garantizar que los peces que se introduzcan procedan de lugares libres de la enfermedad, así como la instalación de un sistema de cuarentena donde puedan alojarse los peces recién llegados con peces centinela, a temperaturas que permitan la infección por la HVSM. Así, los peces serán sometidos a cuarentena durante un mínimo de 4 semanas y hasta 2 meses antes de ser transferidos al estanque principal y mezclados con peces nunca antes expuestos al virus. Las medidas de higiene de dicho lugar deben ser similares a las recomendadas

para la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) e incluir desinfección de huevos, desinfección periódica de los estanques, desinfección química del equipo de la piscifactoría y una cuidadosa manipulación de los peces para no causarles estrés, así como una eliminación inocua de los peces muertos.

### 3. Obtención de muestras

#### 3.1. Elección de ejemplares

*Peces afectados clínicamente:* alevines enteros (longitud corporal  $\leq 4$  cm), vísceras, incluido el riñón (4 cm  $\leq$  longitud corporal  $\leq 6$  cm) o, en el caso de peces más grandes, lesiones ulcerantes cutáneas o tejidos neoplásicos, y el riñón, el bazo, el hígado y el encéfalo.

*Peces aparentemente sanos:* el riñón, el bazo y el encéfalo (en peces de cualquier tamaño) y/o líquido ovárico de reproductores en el momento del desove.

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

Deben enviarse peces enteros al laboratorio vivos o muertos y empacutados individualmente en recipientes asépticos precintados. No obstante, es claramente preferible y recomendable obtener muestras de órganos de los peces inmediatamente después de extraerlos del agua. Deben enviarse al laboratorio peces enteros o muestras de órganos seleccionados, en recipientes refrigerados (+0°C a 5°C) y con hielo. Debe evitarse la congelación tanto de peces como de órganos.

#### 3.3. Combinación de varias muestras

Cuando se analizan peces afectados clínicamente mediante cultivo celular o métodos basados en la PCR, debe evitarse la combinación de muestras, o restringirse a un máximo de cinco peces por muestra combinada. En el caso del cultivo celular para la vigilancia sanitaria, las muestras deben estar formadas por un máximo de cinco peces cada una.

#### 3.4. Órganos y tejidos de elección

*Peces afectados clínicamente:* alevines enteros (longitud corporal  $\leq 4$  cm), vísceras, incluido el hígado o el riñón (4 cm  $\leq$  longitud corporal  $\leq 6$  cm) o, en el caso de peces más grandes, lesiones ulcerantes cutáneas o tejidos neoplásicos, y el hígado o el riñón.

*Peces aparentemente sanos:* el hígado, el riñón, el bazo y el encéfalo (en peces de cualquier tamaño) y/o líquido ovárico de reproductores en el momento del desove.

#### 3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados(es decir, en los que nunca es posible detectar el agente)

Los peces muertos en los que se observen signos de descomposición tisular muy avanzada pueden no ser adecuados para el análisis por ningún método.

## 4. Métodos de diagnóstico

### 4.1. Métodos de diagnóstico de campo

#### 4.1.1. Signos clínicos

Clínicamente, la infección inicial por el VOM es una infección sistémica y a menudo letal que se asocia a edema y hemorragias. La multiplicación del virus en células endoteliales de los capilares sanguíneos, tejidos hematopoyéticos y hepatocitos subyace a los signos clínicos (Kimura *et al.*, 1981b). Cuatro meses después de los primeros signos clínicos, una cantidad variable de peces supervivientes presenta epitelomas que tienen lugar principalmente alrededor de la boca (mandíbula superior o inferior), y, en menor grado, en la aleta caudal, el opérculo y la superficie corporal (Kimura *et al.*, 1981a; Yoshimizu *et al.*, 1987). Esta neoplasia puede persistir durante incluso 1 año tras la infección. En el caso del coho, en concreto peces infectados de 1 año de edad presentan úlceras en la piel, manchas blancas en el hígado y tejidos neoplásicos alrededor de la boca o en la superficie del cuerpo. En el caso de la trucha arco iris, peces de tamaño comercial fueron infectados y los peces enfermos casi no presentaron signos externos, aunque algunos manifestaron lesiones ulcerantes en la piel.

Internamente, se observaron hemorragias intestinales y manchas blancas en el hígado (Furihata *et al.*, 2003).

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

Los peces se vuelven letárgicos, y se agrupan en la salida de agua o en los laterales de un estanque. Algunos pueden sufrir pérdida del equilibrio y desorientación.

### **4.2. Métodos clínicos**

#### **4.2.1. Anatomopatología macroscópica**

En los peces infectados, los signos clínicos son falta de apetito y exoftalmia, así como petequias en la superficie corporal, sobre todo debajo de la mandíbula inferior. No se ha observado natación agónica ni anómala. Internamente, el hígado presenta manchas blancas, y en los casos avanzados todo el hígado se vuelve de color blanco perla. En algunos casos, se observa hinchazón esplénica. En el tracto digestivo no hay alimento (Kimura *et al.*, 1981b).

#### **4.2.2. Bioquímica clínica**

No se dispone de información publicada.

#### **4.2.3. Anatomopatología microscópica**

El riñón de los ejemplares infectados de salmón masou de 1 y 3 meses de vida, del coho de 1 mes de vida y del keta de 2 meses de vida es el principal órgano diana del virus, a juzgar por la gravedad de las alteraciones histopatológicas halladas en salmón masou infectado de 1 mes de vida. Se observó necrosis de células epiteliales y de riñón en los primeros ejemplares moribundos, y necrosis del hígado, del bazo y del páncreas en los últimos ejemplares moribundos de este grupo. Se observó necrosis del tejido hematopoyético del riñón en salmón masou infectado de 3 meses de vida. Aunque el riñón se consideró el órgano diana del VOM, progresivamente adquirió resistencia a la infección por el VOM. Por ello, se interpretó que el principal órgano diana pasaba de ser el riñón a ser el hígado, y en las últimas fases se observaron destacadas alteraciones histopatológicas hepáticas. Los focos de necrosis del hígado tendían a ser más intensos con un periodo de incubación más largo. Había hepatocitos que presentaban marginación de la cromatina. También se observó degeneración celular en el bazo, el páncreas, el músculo cardíaco y el encéfalo (Kimura *et al.*, 1983c). Las alteraciones histopatológicas observadas en coho y en keta fueron las mismas que las observadas en salmón masou (Tanaka *et al.*, 1984). En el caso de la trucha arco iris, se observaron altos títulos de infectividad en los principales órganos internos y múltiples focos necróticos en el hígado. La alteración definitiva fue una necrosis de las células infectadas por el VOM, que se observaron en el bazo, tejidos hematopoyéticos del riñón, el hígado, el intestino, el corazón, los filamentos de las branquias, la epidermis y la musculatura lateral. En concreto, el intestino mostró una intensa necrosis y hemorragia en el epitelio y tejidos subyacentes, lo cual es la nueva descripción del herpesvirus de la trucha arco iris (Furihata *et al.*, 2003).

#### **4.2.4. Preparaciones húmedas**

El VOM se ha identificado en improntas de contacto de riñón mediante la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT).

#### **4.2.5. Frotis**

No se dispone de información publicada.

#### **4.2.6. Microscopía electrónica/citopatología**

Se han detectado partículas víricas mediante examen por microscopía electrónica de transmisión (MET) de tejidos hepáticos de keta, salmón masou, coho y trucha arco iris infectados clínicamente (Kimura *et al.*, 1980; Tanaka *et al.*, 1984). La microscopía electrónica de células infectadas pone de manifiesto que las cápsidas hexagonales intranucleares tienen un diámetro de 115 nm. También se observan abundantes viriones con envoltura protuyendo, de 200 x 240 nm de diámetro, en la superficie y dentro de vesículas citoplasmáticas. El número calculado de capsómeros de viriones teñidos negativamente es de 162. Estas características confirman que el VOM es un herpesvirus.

### 4.3. Métodos de detección e identificación del agente

La infectividad del agente permanece intacta durante al menos 2 semanas a 0-5°C, pero a -20°C, el 99,9% de la infectividad se pierde en un plazo de 17 días. El aislamiento del virus debe llevarse a cabo utilizando peces transportados sobre hielo al laboratorio. Para la filtración del VOM, se recomienda utilizar un filtro (de policarbonato) con un nucleoporo de 0,40 µm porque el filtro de membrana de acetato de celulosa atrapa partículas víricas. Para un estudio virológico de salmónidos adultos, se recoge líquido ovárico por el método descrito por Yoshimizu *et al.* (1985), añadiendo el mismo volumen de antibiótico y dejándolo reaccionar a 5°C durante toda la noche. En el caso del tejido tumoral, se corta el tejido y se desinfecta con yodo, y después se lava con BSS de Hank y se transporta con una solución de antibiótico al laboratorio. Los tejidos tumorales deben prepararse para el cultivo primario o el co-cultivo con células RTG-2. Tras cada subcultivo de células de cultivo primario, debe llevarse a cabo la inspección de virus en el medio de cultivo. Normalmente se recogen células RTG-2 y se inoculan; la temperatura adecuada para la incubación es de 15°C. Se utilizó en el laboratorio suero de conejo o anticuerpo monoclonal contra el VOM para una prueba de inmunofluorescencia (Hayashi *et al.*, 1993), y también se utilizó una sonda de ADN para la detección del genoma vírico (Gou *et al.*, 1991). Con la PCR, utilizando un cebador F10 y un cebador R05 (Aso *et al.*, 2001) se amplificó un segmento de ADN de 439 pares de bases de cepas del VOM aisladas de salmón masou, coho y trucha arco iris, y de tejido de hígado, riñón, encéfalo y sistema nervioso. El perfil de ADN amplificado en el gel de agarosa permitió distinguir el VOM del herpesvirus *H. salmonis* (Aso *et al.*, 2001).

#### 4.3.1. Métodos directos de detección

Se identificó el VOM en improntas de contacto de riñón, mediante IFAT. El método más utilizado para la detección del VOM directamente en tejidos de pez es la PCR específica del VOM.

##### 4.3.1.1. Métodos microscópicos

###### 4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Se han detectado antígenos del virus en tejidos infectados, mediante IFAT. En el caso del coho, se trasplantan peces cultivados en un estanque a un compartimiento de red en el mar. Se someten a gran presión tejidos de riñón para que se adapten al medio marino. Durante este periodo, se replica VOM y aparece antígeno de VOM en tejidos renales. El método de la inmunofluorescencia indirecta es útil y eficaz para detectar los peces infectados por el VOM (Kumagai *et al.*, 1994).

###### 4.3.1.1.2. Frotis

No se dispone de información publicada.

###### 4.3.1.1.3. Cortes fijados

Este método se detalla en el apartado 4.3.1.1.1 anterior, y también es adecuado para la detección de antígeno del VOM en cortes incluidos en parafina y fijados en formalina tamponada neutra (NBF) al 10%. Un tratamiento frecuente es la incubación de los cortes con tripsina al 0,1% en PBS a 37°C durante 30 minutos. A continuación, los cortes se lavan en PBS fría.

#### 4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

##### 4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

Línea celular a utilizar: RTG-2 o CHSE-214.

###### Inoculación de monocapas celulares

- i) Se prepara una dilución decimal adicional de los sobrenadantes de homogenado de órgano a 1/10 y se transfiere un volumen adecuado de cada una de las dos diluciones a monocapas celulares de 24 horas de edad. Se inoculan al menos 2 cm<sup>2</sup> de monocapa celular drenada con 100 µl de cada dilución.
- ii) Se deja adsorber durante 1 hora a 15°C y, sin retirar el inoculado, se añade medio de cultivo celular tamponado a pH 7,4 y suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 2% (1 ml pocillo<sup>-1</sup> en el caso de las placas de cultivo celular de 24 pocillos), y se incuba a 15°C.

###### Seguimiento de la incubación

- i) Se sigue el curso de la infección en controles positivos y otros cultivos celulares inoculados, mediante examen microscópico a 4 o 10 aumentos y durante 14 días. Se recomienda utilizar un microscopio de contraste de fases.

- ii) Durante la incubación, se mantiene el pH del medio de cultivo celular a 7,2-7,4. Esto se puede lograr añadiendo tampón bicarbonato estéril (en el caso de los frascos de cultivo celular muy bien cerrados) o solución de tampón de Tris (en el caso de las placas de cultivo) al medio de cultivo celular inoculado o, mejor aun, utilizando medio tamponado con HEPES (HEPES= ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-2-etanosulfónico).
- iii) Si aparece un efecto citopático (ECP) en los cultivos celulares inoculados con las diluciones de los sobrenadantes del homogenado problema, deben llevarse a cabo los procedimientos de identificación de inmediato (véase la prueba de neutralización, abajo).

Si se está implementando un programa de vigilancia/control, tal vez tengan que tomarse medidas para suspender el reconocimiento del estado sanitario de la unidad y/o zona de producción (si con anterioridad se reconoció) de la cual proceda la muestra positiva al virus. La suspensión del reconocimiento sanitario se mantendrá hasta que se demuestre que el virus en cuestión no es el VOM.
- iv) Si no aparece ECP en los cultivos inoculados (a pesar del avance normal del ECP en los controles positivos), los cultivos inoculados deben subcultivarse durante 7 días más. En el caso de que el control positivo no desarrolle ECP, el proceso debe repetirse con células susceptibles nuevas y nuevos lotes de muestra

#### *Procedimientos del subcultivo*

- i) Se recogen alícuotas de medio de cultivo celular de todas las monocapas inoculadas con diluciones de cada sobrenadante de homogenado de órganos.
- ii) Si es necesario, se repite la prueba de neutralización del virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) y/o del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) como se ha descrito anteriormente (véase el Capítulo 2.30, apartado, 2.2.3), con una dilución del sobrenadante anterior (1/10 a 1/100).
- iii) Se inoculan monocapas celulares como se ha descrito arriba.
- iv) Se incuban y controlan como se ha descrito arriba.
- v) Si no aparece ECP, la prueba puede declararse negativa.

#### *Aislamiento del VOM de cultivos de células neoplásicas*

- i) Se recogen tejidos neoplásicos, se desinfectan con yodóforo, a razón de 50 partes por millón durante 20 minutos, y se lavan tres veces con solución salina equilibrada de Hanks.
- ii) Los tejidos se dejan toda la noche en tripsina al 0,25% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 5°C. A continuación, se siembran  $3,5 \times 10^5$  células neoplásicas/ml en un frasco de cultivo tisular y se incuban con medio de cultivo que contenga FBS al 20%.
- iii) Se recoge el cultivo celular neoplásico primario y se co-cultiva con células RTG-2 o CHSE-214.
- iv) Se incuba y se controla como se ha descrito arriba.

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

##### *Prueba de neutralización*

- i) Se recoge el medio de cultivo de la monocapa celular que presente ECP y se centrifuga a 2.000 **g** durante 15 minutos a 4°C para eliminar detritos celulares.
- ii) Se diluye el medio que contiene el virus, pasando de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$
- iii) Se mezclan las alícuotas de cada dilución de virus (por ejemplo, de 200  $\mu$ l) con volúmenes iguales de una solución de anticuerpos específicos contra el VOM, y de forma similar se tratan alícuotas de cada dilución del virus con medio de cultivo celular. (La solución del anticuerpo neutralizante [MAB] debe tener un título de reducción del 50% en placa de al menos 2000).
- iv) Paralelamente, deben llevarse a cabo otras pruebas de neutralización contra:
  - una cepa de virus homóloga (prueba de neutralización positiva)
  - una cepa de virus heteróloga (prueba de neutralización negativa).



- v) Si es necesario, puede llevarse a cabo una prueba de neutralización similar utilizando anticuerpos contra el VNPI, para garantizar que no haya escapado ningún VNPI a la primera prueba anti-VNPI.
- vi) Se incuban todas las mezclas a 15°C durante 1 hora.
- vii) Se transfieren alícuotas de cada una de las mezclas anteriores a monocapas celulares (se inoculan dos cultivos celulares por dilución) y se dejan adsorber durante 0,5-1 hora a 15°C; para este fin son adecuadas las placas de cultivo celular de 24 o de 12 pocillos, utilizando un inóculo de 50 µl.
- viii) Cuando ha terminado la adsorción, se añade a cada pocillo medio de cultivo celular suplementado con FBS al 2% y tamponado a pH 7,4-7,6 y se incuba a 10-15°C.
- ix) Se comprueba en los cultivos celulares si ha empezado el ECP y se leen los resultados en cuanto este empieza en controles no neutralizados (protegiendo las monocapas celulares de los controles de neutralización positivos). Los resultados se registran tras un examen por microscopía simple (preferiblemente de contraste de fases) o tras desechar el medio de cultivo celular y teñir las monocapas celulares con una solución de cristal violeta al 1% en etanol al 20%.
- x) El virus problema se identifica como VOM cuando el ECP se previene o se retrasa considerablemente en los cultivos celulares que han recibido la suspensión de virus tratada con el anticuerpo específico contra el VOM, siempre que se observe ECP en todos los demás cultivos celular
- xi) En ausencia de neutralización del VOM por parte de los NAb, es obligatorio llevar a cabo una IFAT con la muestra sospechosa.

#### 4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

##### PCR (Aso *et al.*, 2001)

- i) Se extrae ácido nucleico de células infectadas por la cepa OO-7812 del VOM y por *H. salmonis* utilizando la InstGene Matrix (Biorad<sup>1</sup>).
- ii) Se sedimentan los tejidos infectados por el virus o las células cultivadas infectadas mediante centrifugación a 19.000 **g** durante 15 minutos.
- iii) Se lavan los sedimentos dos veces con 1 ml de PBS y se mezclan con 200 µl de resina quelante (Sigma).
- iv) Se incuba la mezcla a 56°C durante 20 minutos en un baño de agua, se somete al vortex y, a continuación, se introduce en un baño de agua hirviendo durante 8 minutos.
- v) Se someten las muestras al vortex y se centrifugan a 8.200 **g** (10.000 rpm) durante 90 segundos.
- vi) Se somete el sobrenadante a PCR.
- vii) El cebador directo (F10) es 5'-GTA-CCG-AAA-CTC-CCG-AGT-C-3', y el inverso (R5), 5'-AAC-TTG-AAC-TAC-TCC-GGG-G-3'.
- viii) Se incuban las muestras, los conjuntos de cebadores y las mezclas de reacción durante 30 ciclos en un termociclador automático (GeneAmp PCR 9700, Applied Biosystems), y cada uno de estos ciclos consistirá en una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 56°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos.
- ix) Se analiza el tamaño y la pureza del producto amplificado mediante electroforesis (100 V durante 30 minutos) en gel de agarosa al 2% y se tiñe con bromuro de etidio.
- x) Con una PCR en la que se utilizaron estos conjuntos de cebadores se amplificó un segmento de ADN de 439 pb de cepas del VOM aisladas de salmón masou, coho y trucha arco iris, y tejido de hígado, riñón, encéfalo y sistema nervioso, y un segmento de ADN de 800 pares de bases de herpesvirus 1 de los salmónidos (HVSa1-1). El HVSa1-1 se pudo distinguir del herpesvirus 2 de los salmónidos (HVSa1-2) mediante el perfil de este ADN amplificado en el gel de agarosa (Aso *et al.*, 2001).

1 La referencia a productos comerciales específicos como ejemplos no implica su aprobación por parte del a OIE. Esto es aplicable a todos los productos comerciales indicados en este *Manual Acuático*.

### 4.3.2. Métodos serológicos

#### 4.3.2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta

- i) Se preparan monocapas de células en pocillos de 2 cm<sup>2</sup> de placas de plástico de cultivo celular o en cubreobjetos con el fin de alcanzar alrededor de un 80% de confluencia, que normalmente se logra en un plazo de 4 horas tras la incubación a 22°C (se siembran seis monocapas celulares por cepa vírica problema, más dos para el control positivo y dos para el control negativo). El contenido en FBS del medio de cultivo celular se puede reducir al 2-4%. Si tienen que identificarse muchas cepas víricas, es muy recomendable utilizar placas Terasaki.
- ii) Cuando las placas celulares estén listas para la infección, es decir, el mismo día o el día después de la siembra, se inoculan las suspensiones del virus problema por pasos de diluciones decimales seriadas directamente en los pocillos o frascos de cultivo celular.
- iii) Se diluye la suspensión de virus control de VOM de forma similar, con el fin de obtener un título vírico de unas 5.000–10.000 unidades formadoras de placa (UFP) ml<sup>-1</sup> en el medio de cultivo celular.
- iv) Se incuba a 15°C durante 48 horas.
- v) Se retira el medio de cultivo celular, se enjuaga una vez con solución PBS 0,01 M, pH 7,2, y a continuación tres veces brevemente con acetona fría (guardada a -20°C) en el caso de los portas o cubreobjetos, o bien una mezcla de acetona al 30%/etanol al 70%, también guardada a -20°C, en el caso de los pocillos de plástico.
- vi) Se deja actuar el fijador durante 15 minutos. Un volumen de 0,5 ml es suficiente para 2 cm<sup>2</sup> de monocapa celular.
- vii) Se dejan las monocapas celulares secar al aire durante al menos 30 minutos y se procesan de inmediato o se congelan a -20°C.
- viii) Se prepara una solución de anticuerpo purificado o suero contra el VOM en PBS 0,01 M, a pH 7,2, que contenga Tween 80 al 0,05% (PBST), a la dilución adecuada (que se habrá establecido previamente o que suministrará el proveedor del reactivo).
- ix) Se rehidratan las monocapas celulares mediante cuatro pasos de enjuagado con la solución de PBST, y se retira este tampón por completo tras cada enjuagado.
- x) Se tratan las monocapas celulares con la solución de anticuerpos durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda y se impide la evaporación. El volumen de solución a utilizar es de 0,25 ml por cada pocillo de 2 cm<sup>2</sup>.
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBST, como arriba.
- xii) Se tratan las monocapas celulares durante 1 hora a 37°C con una solución de anticuerpos contra la inmunoglobulina utilizada en la primera capa, y preparados según las instrucciones del proveedor, conjugados a isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Estos anticuerpos conjugados a ITCF suelen ser de conejo o de cabra.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se examinan las monocapas celulares tratadas en placas de plástico de inmediato, o se montan los cubreobjetos utilizando solución salina de glicerol a pH 8,5 antes de la observación al microscopio.
- xv) Se examinan bajo luz UV incidente utilizando un microscopio con oculares de 10 aumentos y objetivos de 20 a 40 aumentos con aperturas numéricas de >0,65 y >1,3, respectivamente. Antes de proceder a observación alguna, hay que asegurarse de que los controles positivo y negativo dan los resultados esperados.

#### 4.3.2.2. Enzimoinmunoanálisis

- i) Se recubren los pocillos de microplacas diseñadas para enzimoinmunoanálisis (ELISA) con diluciones adecuadas de anticuerpos monoclonales o inmunoglobulinas (Ig) purificadas específicas del VOM, en PBS 0,01 M, a pH 7,2 (200 µl pocillo<sup>-1</sup>).
- ii) Se incuban durante toda la noche a 4°C.
- iii) Se enjuagan cuatro veces con PBS 0,01 M que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST).
- iv) Se bloquean con leche desnatada (al 5% en PBST) u otra solución bloqueante durante 1 hora a 37°C (200 µl pocillo<sup>-1</sup>).
- v) Se enjuagan cuatro veces con PBST.

- vi) Se añade Triton X-100 al 2% a la suspensión de virus problema.
- vii) Se distribuyen 100 µl/pocillo de una dilución de dos o cuatro pasos del virus problema y de virus control VOM, y se dejan reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento contra el VOM durante 1 hora a 20°C.
- viii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- ix) Se añade a los pocillos anticuerpo policlonal biotinilado contra el VOM.
- x) Se incuban durante 1 hora a 37°C.
- xi) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xii) Se añade peroxidasa de rábano conjugada a estreptavidina a los pocillos que han recibido el anticuerpo conjugado a biotina, y se incuban 1 hora a 20°C.
- xiii) Se enjuagan cuatro veces con PBST.
- xiv) Se añade el sustrato y cromógeno. Se detiene el curso de la prueba cuando reaccionan los controles positivos, y se realiza un seguimiento de los resultados.

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

A modo de ejemplo, los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de la HVSM se detallan en la Tabla 5.1. Las denominaciones utilizadas en la Tabla indican: a =el método es el recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad de diagnóstico; b= el método es estándar, con buena sensibilidad y especificidad de diagnóstico; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la precisión u otros factores limitan seriamente su aplicación; y d= el método no se recomienda actualmente para este fin. Esta clasificación es de alguna forma subjetiva ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas incluidas en las categorías a o b se han sometido a estandarización y validación formales, su naturaleza sistemática y el hecho de que se hayan usado generalmente sin resultados dudosos las hace aceptables.

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

| Método                                | Vigilancia dirigida |    |           |         | Diagnóstico provisional | Diagnóstico confirmativo |
|---------------------------------------|---------------------|----|-----------|---------|-------------------------|--------------------------|
|                                       | Larvas              | PL | Juveniles | Adultos |                         |                          |
| <b>Signos macroscópicos</b>           | d                   | b  | b         | b       | b                       | c                        |
| <b>Cultivo celular</b>                | b                   | b  | b         | b       | b                       | a                        |
| <b>MO directa</b>                     | d                   | d  | d         | d       | d                       | d                        |
| <b>Histopatología</b>                 | b                   | b  | b         | b       | b                       | a                        |
| <b>ME de transmisión</b>              | c                   | c  | c         | c       | c                       | c                        |
| <b>Pruebas basadas en anticuerpos</b> | b                   | b  | b         | b       | b                       | a                        |
| <b>Sondas de ADN <i>in situ</i></b>   | c                   | c  | c         | c       | c                       | c                        |
| <b>PCR</b>                            | b                   | b  | b         | b       | a                       | a                        |
| <b>Secuenciación</b>                  | d                   | d  | d         | d       | d                       | d                        |

PL = postlarvas; MO=microscopía óptica; ME = microscopía electrónica; PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

## 6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de herpesvirosis del salmón masou

Para la prevención de la transmisión de la enfermedad desde salmónidos adultos a su descendencia es importante disponer de información sobre la distribución e incidencia del VOM. Por tanto, es importante el estudio de la frecuencia del VOM entre salmónidos adultos. Se obtuvo una muestra de sesenta peces y cada ejemplar se extrajo individualmente. Se obtuvieron muestras de líquido ovárico según el método de Yoshimizu *et al.* (1985). Se insertó una punta de pipeta automática esterilizada en el orificio urogenital del pez adulto. Se tomó un mililitro de líquido ovárico del pez y se trató con el método del tratamiento con antibiótico. Se transportaron muestras tratadas con antibiótico al laboratorio, con hielo.

## 7. Criterios de diagnóstico confirmativo

### 7.1. Definición de caso sospechoso

Debe sospecharse del VOM si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:

- i) La presencia de signos clínicos típicos de la HVSM en una población de peces susceptibles.
- ii) La presencia de alteraciones histopatológicas típicas en cortes de tejido hepático, compatibles con la HVSM.
- iii) Un solo resultado positivo en una de las pruebas de diagnóstico, como la IFAT en improntas de tejido hepático o renal, o la PCR.
- iv) La transferencia de peces vivos de un lugar donde se ha confirmado la presencia del VOM, o se ha sospechado del mismo, debido a la presencia de enfermedad clínica, a lugares sin sospecha del VOM.
- v) La detección de anticuerpos contra el VOM.

### 7.2. Definición de caso confirmado

Para la confirmación del VOM deben cumplirse los siguientes criterios:

- i) Mortalidad, signos clínicos y alteraciones anatomopatológicas compatibles con la HVSM y detección del VOM mediante uno o más de los siguientes métodos:
  - a) Aislamiento e identificación del VOM en cultivo celular a partir de al menos una muestra de cualquier pez del lugar, como se ha descrito en el apartado 4.3.1.2.1.
  - b) Detección del VOM mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3.
  - c) Detección del VOM en preparaciones tisulares por medio de anticuerpos específicos contra el VOM (por ejemplo, la IFAT en improntas de tejido, como se describe en el apartado 4.3.2);
- ii) En ausencia de mortalidad o signos clínicos, mediante uno o más de los siguientes métodos:
  - a) Detección y confirmación del VOM mediante PCR por los métodos descritos en el apartado 4.3.1.2.3;
  - b) Resultados positivos en dos pruebas diagnósticas independientes y distintas, de entre las descritas arriba.

## 8. Bibliografía

ASO Y., WANI J., KLENNER D.A.S. & YOSHIMIZU M. (2001) Detection and identification of *Oncorhynchus masou* virus (VOM) disease by polymerase chain reaction (PCR). *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **52**, 111–116.

FURIHATA M., HOSOE A., TAKEI K., KOHARA M., NAKAMURA J., MOTONISHI A. & YOSHIMIZU M. (2003). Outbreak of salmonid herpesviral disease in cultured rainbow trout. *Fish Pathol.*, **38**, 23–25.

GOU, D. F., KUBOTA, H., ONUMA, M. & KODAMA, H. (1991) Detection of salmonid herpesvirus (*Oncorhynchus masou* virus) in fish by southern-blot technique. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 43–48.

- HATORI S., MOTONISHI A., NISHIZAWA T. & YOSHIMIZU M. (2003). Virucidal effect of disinfectants against *Oncorhynchus masou virus* (VOM). *Fish Pathol.*, **38**, 185–187.
- HAYASHI Y., IZAWA H., MIKAMI T. & KODAMA H. (1993). A monoclonal antibody cross-reactive with three salmonid herpesviruses. *J. Fish Dis.*, **16**, 479–486.
- KIMURA I. (1976). Tumor of lower vertebrates. In: Cancer, Sugiyama T. & Yamamoto Y., eds. Iwanami-Shoten, Tokyo, Japan, 270–283.
- KIMURA T., SUZUKI, S. & YOSHIMIZU M. (1983a). *In vitro* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on the fish herpesvirus *Oncorhynchus masou virus* (VOM). *Antiviral Res.*, **3**, 93–101.
- KIMURA T., SUZUKI S. & YOSHIMIZU M. (1983b). *In vivo* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou virus* (VOM). *Antiviral Res.*, **3**, 103–108.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M. & TANAKA M. (1980). Salmonid viruses, a syncytium-forming herpesvirus from landlocked *Oncorhynchus masou*. *Fish Health News*, **9**, iii.
- KIMURA T., YOSHIMISU M. & TANAKA M. (1981a). Studies on a new virus (VOM) from *Oncorhynchus masou* II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149–153.
- KIMURA T., YOSHIMISU M. & TANAKA M. (1983c). Susceptibility of different fry stages of representative salmonid species to *Oncorhynchus masou virus* (VOM). *Fish Pathol.*, **17**, 251–258.
- KIMURA T., YOSHIMIZU M., TANAKA M. & SANNOHE H. (1981b). Studies on a new virus (VOM) from *Oncorhynchus masou virus* (VOM) I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143–147.
- KOHARA K. & DENDA I. (2010). Production of allotriploid “Shinsyu Salmon” by chromosome manipulation. *Fish Genet. Breed. Sci.*, **37**, 6–66.
- KUMAGAI A., TAKAHASHI K. & FUKUDA H. (1994). Epizootics caused by salmonid herpesvirus type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127–134.
- TANAKA M., YOSHIMISU M. & KIMURA T. (1984). *Oncorhynchus masou virus*: Pathological changes in masu salmon (*Oncorhynchus masou*), chum salmon (*O. keta*) and coho salmon (*O. kisutch*) fry infected with VOM by immersion method. *Bull. Jpn Soc. Scientif. Fisheries*, **50**, 431–437.
- YOSHIMIZU M. (2009). Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seeds production facility in Japan. *Fish Pathol.*, **44**, 9–13.
- YOSHIMIZU M., FUKUDA H., SANO T. & KIMURA T. (1995). Salmonid herpesvirus 2. Epizootiology and serological relationship. *Vet. Res.*, **26**, 486–492.
- YOSHIMIZU M. & KASAI H. (2011). Chapter 7: Oncogenic viruses and *Oncorhynchus masou virus*. In: Fish Diseases and Disorders, Vol. 3, Second Edition: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Woo P.T.K. & Bruno D.D., eds., CAB International, UK, 276–301.
- YOSHIMIZU M., KIMURA T. & WINTON J.R. (1985). An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish Culturist*, **47**, 199–200.
- YOSHIMIZU M. & NOMURA T. (2001). *Oncorhynchus masou virus* (VOM): Epidemiology and its control strategy. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquaculture*, Suppl. **5**, 11–14.
- YOSHIMISU M., NOMURA T., EZURA Y. & KIMURA T. (1993). Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Oncorhynchus masou virus* (VOM) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976 to 1991. *Fisheries Res.*, **17**, 163–173.
- YOSHIMIZU M., TAKIZAWA H. & KIMURA T. (1986). U.V. susceptibility of some fish pathogenic viruses. *Fish Pathol.*, **21**, 47–52.
- YOSHIMISU M., TANAKA M. & KIMURA T. (1987). *Oncorhynchus masou virus* (VOM): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish Pathol.*, **22**, 7–10.

YOSHIMIZU M., YOSHINAKA T., HATORI S. & KASAI H. (2005). Survivability of fish pathogenic viruses in environmental water, and inactivation of fish viruses. *Bull. Fish. Res. Agen.*, Suppl. 2, 47–54.

\*  
\* \*

**NB:** Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la herpesvirosis del salmón masou (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int)).