



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

**Caracterización sanitaria de las piscifactorías gestionadas por la
Comunidad Autónoma de Aragón**

**Health control of the fish farms managed by the regional
government of Aragon**

Autor/es

Marta Buesa Pueyo

Director/es

**Imanol Ruiz-Zarzuela
Héctor Fuertes Negro**

Facultad de Veterinaria
2016

Índice

1. Resumen / Abstract	2
2. Introducción y justificación	4
2.1. La acuicultura en el siglo XXI	4
2.2. Situación sanitaria en la Comunidad Autónoma de Aragón	6
2.2.1. Principales enfermedades piscícolas más relevantes	7
3. Objetivos	13
4. Material y métodos	14
4.1. Diseño del estudio	14
4.1.1. Periodo y lugar del muestreo	14
4.1.2. Metodología del muestreo	14
4.2. Recogida de información	15
4.2.1. Recogida de muestras	15
4.2.1.1. <i>Recogida de aguas</i>	15
4.2.1.2. <i>Necropsia y toma de muestras</i>	15
4.2.2. Cuestionario	16
4.3. Metodología analítica	17
4.3.1. Estudio de la calidad físico-química del agua	17
4.3.2. Estudio de la calidad microbiológica del agua	18
4.3.3. Diagnóstico bacteriológico	19
4.3.3.1. <i>Medios de cultivo</i>	19
4.3.3.2. <i>Aislamiento bacteriano</i>	19
4.3.3.3. <i>Identificación bacteriana</i>	19
4.3.4. Diagnóstico vírico	20
4.3.4.1. <i>Preparación de los cultivos celulares</i>	20
4.3.4.2. <i>Aislamiento vírico</i>	21
4.3.5. Diagnóstico parasitológico y micótico	22
4.3.6. Diagnóstico molecular	22
4.3.6.1. <i>Extracción del ADN</i>	23
4.3.6.2. <i>Tipos de PCR</i>	23
4.3.6.3. <i>Condiciones necesarias: PCR convencional vs qPCR</i>	23
5. Resultados y Discusión	24
5.1. Con respecto a los parámetros de calidad del agua	24
5.2. Con respecto al diagnóstico bacteriológico	26
5.3. En relación al diagnóstico vírico	27
5.4. Sobre el diagnóstico parasitario y micótico	27
6. Conclusiones / Conclusions	28
7. Valoración personal	29
8. Bibliografía	31

1. Resumen / Abstract

En la actualidad existen seis explotaciones salmonícolas en la Comunidad Autónoma de Aragón, dos de ellas son gestionadas por la Diputación General de Aragón (DGA) cuya actividad se basa fundamentalmente en la cría y reproducción de ejemplares “*autóctonos*” de trucha común (*Salmo trutta fario*) con el fin de repoblar los ríos aragoneses. Éstas son Los Pajares, ubicada en Albarracín (Teruel) y Planduviar, en Sarvisé (Huesca).

Los objetivos del presente trabajo fueron valorar el estado sanitario de ambas explotaciones, así como saber aplicar las diferentes herramientas terapéuticas desde el punto de vista veterinario. Para ello, se realizó un control sanitario en cada piscifactoría donde se recogieron muestras de agua (entrada y salida de las piscifactorías), huevos y peces para su posterior estudio en el Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

Además de observar la calidad de las aguas de los ríos, se estudiaron las principales enfermedades víricas de declaración obligatoria como la Septicemia Hemorrágica Vírica (SHV) o la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI) y la importancia de otros procesos patológicos en acuicultura.

En términos generales, los parámetros de calidad del agua cumplen con los requisitos establecidos. No se ha detectado la presencia de agentes patógenos con etiología vírica mediante el cultivo celular, estos resultados eran esperables dado que Aragón fue declarado como zona autorizada libre en 1999. En cuanto al diagnóstico bacteriano, solamente se detectó la presencia de *Flavobacterium psychrophilum* mediante PCR convencional en huevos embrionados de Planduviar. También se han detectado ligeras infestaciones de ectoparásitos como *Gyrodactylus* spp. o *Trichodina* spp. sobre muestras de piel o aletas, en ambas explotaciones.

Estos resultados confirman la necesidad de seguir realizando controles sanitarios periódicos para mantener este estado frente a las enfermedades de declaración obligatoria señaladas así como, el estudio de otras patologías que pueden revestir cierta gravedad.

Abstract

Currently there are six salmonid farms in the Autonomous Community of Aragón, two of which are managed by the Government of Aragón (DGA) and are dedicated to the breeding and reproduction of "autoctonous" specimens of brown trout (*Salmo trutta fario*) in order to repopulate the Aragonese rivers. These are Los Pajares, located in Albarracín (Teruel) and Planduiar, Sarvisé (Huesca).

The objectives of this study were to monitor the health status of both farms through established diagnostic methods and their application, in order to adopt the necessary therapeutic measures from the veterinary point of view. For this purpose, water samples at the entrance and exit of the two farms along with samples from roe and fish were collected for processing in the Ictiopathology Laboratory of the Veterinary Faculty of Zaragoza.

In addition to routine physico-chemical properties determinations for the evaluation of the rivers water quality, specific diagnosis tools were used to check for the two major notifiable viral diseases: Hemorrhagic Septicemia Viral (VHS) and Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) and the relevance of other pathologies in aquaculture.

In general, the water quality parameters met the established prerequisites. None of the viral agents were encountered with cell culture technique. These results are expected since Aragon has been declared a free region since 1999. As for bacterial diagnostic results, only the presence of *Flavobacterium psychrophilum* was detected by conventional PCR from Planduiar embryo roe samples. However, the ectoparasites *Gyrodactylus* spp. and *Trichodina* spp. were also detectable in low concentrations in skin and fin fishes and in both farms.

These results indicate the need for maintaining further periodic health controls, to ensure this free state of these two "notifiable virus" and for the vigilance of bacterial, parasitic and fungi pathogens that may lead to critical situations as for possible epidemic surge.

2. Introducción y justificación

2.1. La acuicultura en el siglo XXI

En el mundo actual los recursos naturales y las fuentes de alimentos son limitados. La población mundial está en continuo crecimiento y, principalmente en los países en vías de desarrollo, la alimentación constituye un gran reto para la humanidad. Las previsiones de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) indican que la producción mundial de alimentos debería crecer un 70% entre 2010 y 2050 para hacer frente a este aumento de población. Por ello, es necesario buscar nuevas alternativas en la producción de alimentos y obtener un mayor provecho de una forma sostenible de los recursos naturales que garantice el abastecimiento de la población (FAO, 2014).

En este sentido, la acuicultura, definida por la FAO como “*la cría de organismos acuáticos como los peces, moluscos, crustáceos y las plantas acuáticas*”, tiene una gran importancia ya que es uno de los sectores económicos de más rápido crecimiento y actualmente produce más de la mitad del pescado que se consume en el mundo, superando por primera vez el consumo procedente de la pesca tradicional extractiva (APROMAR, 2016; FAO, 2016).

Según un informe de la FAO (2016) sobre el “*Estado mundial de la pesca y la acuicultura*”, la producción acuícola mundial (sin contar el cultivo de plantas acuáticas) alcanzó los 73,8 millones de toneladas en el año 2014, de las cuales el 54% aproximadamente procedían del medio marino y el resto, de aguas continentales. A pesar de este gran potencial, el desarrollo de la acuicultura presenta numerosos desequilibrios especialmente en cuanto a la desigualdad de la distribución y desarrollo de la producción, puesto que sólo China concentra más del 60% del volumen total (FAO, 2016).

En la Unión Europea la importancia económica y social de la acuicultura tampoco es igual en todos los países miembros, siendo en algunos de ellos y por primera vez, de mayor relevancia que la pesca extractiva; en parte esto es debido a las excelentes condiciones ambientales para la cría de muchas especies acuícolas y al alto grado de formación en recursos humanos que hacen que en la actualidad sea considerada una potencia mundial tanto en tecnología como en investigación (APROMAR, 2016).

Los principales productos procedentes de la acuicultura europea son pescados y moluscos, constituyendo el mejillón (*Mytilus edulis*) la especie con una mayor producción (466.995 toneladas). Entre los pescados de crianza destaca la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), principal especie de pescado de crianza producida, con aproximadamente 239.040 toneladas.

En segundo lugar, el salmón atlántico (*Salmo salar*) con 165.378 toneladas, seguida por la dorada (*Sparus aurata*) con 110.087 toneladas. En total, en 2015, se produjeron 2.350.278 toneladas de pescado procedente de la acuicultura en la Unión Europea, con un pequeño incremento (0,4%) respecto a 2014 (FEAP, 2016). Las especies marinas representaron el 84,9% de la producción y las especies continentales el 15,1%. Noruega acapara el 58% de esta producción, mientras que otros países que producen más de 100.000 toneladas anuales son Reino Unido, Grecia y Turquía. Las principales especies criadas son el salmón atlántico, la trucha, la carpa (*Cyprinus carpio*), el besugo (*Pagallus bogaraveo*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) que constituyen el 94% de la producción europea total en 2015 (FEAP, 2016).

España ocupa el tercer puesto entre los países productores de la Unión Europea en 2014 aportando 59.356 toneladas de peces, por detrás de Reino Unido y Grecia (FEAP, 2016). La principal especie producida en nuestro país es el mejillón seguida por la dorada, la trucha arco iris y la lubina (APROMAR, 2016).

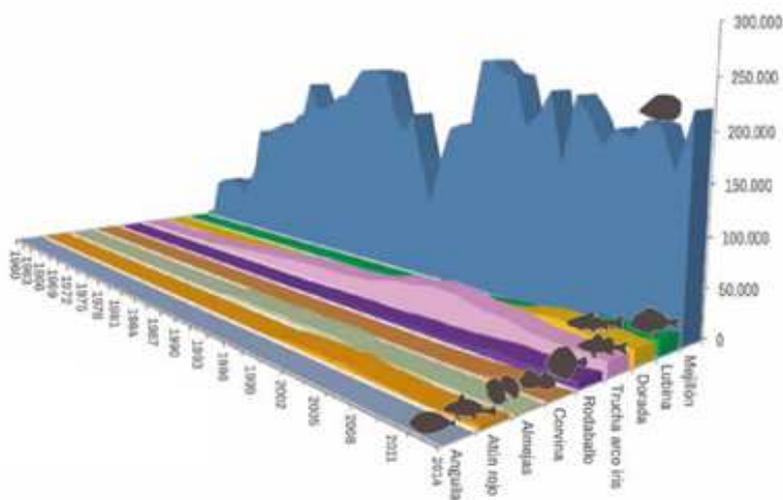


Figura 1. Evolución de la producción de la acuicultura en España en los últimos 50 años (APROMAR, 2016).

En España la importancia de la acuicultura ya ha superado económicamente a la pesca extractiva. Sin embargo, conforme se desarrollan nuevos métodos intensivos de producción y mejora en el nivel de control sobre los procesos productivos se ha observado un incremento en la aparición y el número de enfermedades, constituyendo el impacto de éstas uno de los principales retos que debe resolver la acuicultura moderna, sobre todo por las graves pérdidas económicas que están ocasionando en el sector (APROMAR, 2016).

Actualmente existe un Plan Estratégico de la Acuicultura Española que se enmarca dentro de la nueva Política Pesquera Común (PPC) y el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP) y que trata de dar respuesta en forma de *Directrices estratégicas para el desarrollo sostenible de la acuicultura* propuestas por la Comisión Europea relativas a las prioridades y necesidades comunes para el desarrollo del sector (MAGRAMA, 2015).

Con respecto a la situación del sector acuícola en la Comunidad Autónoma de Aragón existen actualmente seis explotaciones salmonícolas con una producción total muy próxima a las 1.200 toneladas (datos no publicados). De estas explotaciones, la Diputación General de Aragón (DGA) gestiona dos de ellas, cuya finalidad principal es la adaptación y reproducción de ejemplares “autóctonos” de trucha común (*Salmo trutta fario*) y, la producción de huevos embrionados y alevines destinados a la repoblación de los ríos aragoneses con el fin de incrementar las poblaciones naturales de esta especie intentando restaurar el equilibrio ecológico de los ríos así como atender la demanda de los pescadores. Aragón produjo, en 2015, 91.270 ejemplares de trucha común destinados a estos fines (MAGRAMA, 2016).

Estas dos piscifactorías son Los Pajares, ubicada en el término municipal de Albarracín (Teruel) y Planduviar, en Sarvisé (Huesca).

2.2. Situación sanitaria en la Comunidad Autónoma de Aragón

Como ya hemos comentado, la aparición de enfermedades es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la acuicultura actual. Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las enfermedades víricas son las más devastadoras no sólo por las cuantiosas pérdidas económicas y sanitarias que producen (no hay tratamientos disponibles frente a ellas) sino también por el grave riesgo medioambiental que supone su presencia sobre las poblaciones naturales (OIE, 2016). Entre estas enfermedades cabe destacar la Septicemia Hemorrágica Viral (SHV) y la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI), enfermedades ambas de declaración obligatorias (*Directiva 88/2006/CE; RD 1614/2008*), de los cuales hablaremos en el apartado posterior (**Apartado 2.2.1**).

La acuicultura intensiva constituye una actividad económica tradicional en Aragón, que se centra principalmente en la producción de trucha arcoíris. Este sector ha progresado notablemente de manera que se han mejorado sus instalaciones con un aumento de su calidad y productividad. Al mismo tiempo durante las últimas décadas se han llevado a cabo medidas sanitarias de forma conjunta, lo que ha permitido incrementar su nivel sanitario gracias en parte, al desarrollo y puesta en marcha de la primera Agrupación de Defensa Sanitaria Acuícola

en España integrada por todas las explotaciones existentes en la Comunidad de Aragón y a la creación de un Laboratorio Autorizado para las Enfermedades de los Peces ubicado, en estos momentos, en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (Ruiz-Zarzuela y cols., 2002). Todos estos elementos han contribuido que en la actualidad todas las cuencas fluviales de Aragón sean consideradas como zonas continentales autorizadas, por razones históricas, frente a la SHV y la NHI. Esta figura legal creada por la UE reconoce un determinado territorio como libre para ciertas enfermedades de los peces (*Decisión 2003/839/CE*).

Por todo ello y con el fin de llevar a cabo el mantenimiento del estatuto de zonas autorizadas frente a las enfermedades de declaración obligatoria señaladas así como, el estudio de la presencia de otras patologías que pueden revestir igualmente una cierta gravedad en las poblaciones piscícolas se ha realizado un control sanitario sobre aquellas explotaciones que gestiona en la actualidad la DGA; el fin último ha sido conocer la incidencia de aquellos patógenos que pueden actuar en un momento dado y proponer las herramientas de control y prevención más adecuados en su caso.

2.2.1. Principales enfermedades piscícolas

A continuación describiremos aquellas enfermedades de mayor interés o relevancia sanitaria tanto en la acuicultura continental española como aragonesa.

Septicemia Hemorrágica Viral (SHV): Es una enfermedad infecto-contagiosa, sistémica y hemorrágica grave en peces. El virus de la SHV es vehiculado por al menos 50 especies de peces marinos y de agua dulce, siendo la especie más sensible en el ámbito continental la trucha arcoíris y en el marino, el rodaballo (Schönherz y cols., 2013). Está causada por un virus perteneciente al género *Novirhabdovirus* de la familia *Rhabdoviridae*, al igual que la NHI (Tordo y cols., 2005).

Se caracteriza por un cuadro septicémico-hemorrágico que puede estar asociado a procesos neurológicos y que en la actualidad constituye una de las enfermedades más importantes que afectan a la acuicultura continental europea debido en parte, a las graves pérdidas de tipo económico que está ocasionando (CFSPH, 2007).

La SHV es una enfermedad que afecta generalmente a alevines y juveniles menores de 6 meses, provocando mortalidades del 80-100%. En edades superiores, la mortalidad se reduce entre un 10% y un 50%, aunque tiende a cronificarse manteniéndose en estado latente (Pérez y Rodríguez, 1997). La temperatura óptima para que aparezca un brote está entre 9 °C y 12 °C

y el mayor problema es que los peces que sobreviven a la enfermedad se convierten portadores de por vida, lo que hace necesaria su eliminación (Duesund y cols., 2010).

La infección se transmite horizontalmente a través del agua o por el contacto directo con las excreciones (orina), procedentes de peces enfermos o portadores asintomáticos (Smail y Snow, 2011). Las aves que se alimentan de peces infectados pueden introducir el virus en áreas libres de enfermedad actuando como importantes vectores mecánicos. Sin embargo, la transmisión vertical se desconoce o es extremadamente rara.

La SHV es una enfermedad altamente contagiosa y se debe realizar un control de los animales nuevos ya que constituyen la principal vía de entrada de esta enfermedad a las explotaciones. Se requiere establecer cuarentenas de aproximadamente un mes para controlar los brotes y lo más aconsejable es que lleguen a la explotación con una certificación sanitaria (Roberts, 2001).

Hay que evitar mezclar lotes de diferentes orígenes, ya que el virus puede transmitirse entre especies, y disminuir la densidad de población cuanto sea posible para evitar problemas. La piscifactoría debe realizar limpieza y desinfección a tres niveles: el estanque, el material y los peces. El virus es susceptible a muchos desinfectantes comunes como la formalina, los desinfectantes iodóforos, el hidróxido de sodio y el hipoclorito de sodio (CFSPH, 2007). En ausencia de tratamiento antivirales, los métodos de control de la SHV actualmente se basan en programas oficiales de vigilancia sanitaria junto con medidas de seguimiento (OIE, 2012a).

Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI): Al igual que la SHV es una enfermedad infecto-contagiosa de carácter hemorrágica y sistémica; por el contrario, esta enfermedad afecta únicamente a poblaciones de salmónidos tanto de vida libre como de producción intensiva (Wang y cols., 2016). Las especies que se infectan de forma natural con el virus de la NHI son: la trucha arcoíris así como la mayoría de las especies de salmones: el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) o las diversas variedades del salmón del Pacífico (*Oncorhynchus tshawytscha*, *O. nerka*, *O. keta*, *O. rhodurus*, *O. masou*, *O. kisutch*) (OIE, 2012b).

La enfermedad cursa generalmente de forma aguda, con mortalidades muy próximas al 90-100% de la población y afecta principalmente a alevines menores de 2 meses de edad. Aquellos peces de más de 6 meses padecen procesos crónicos y la mortalidad disminuye significativamente por debajo del 25% (Pérez y Rodríguez, 1997).

La temperatura óptima para que aparezca la enfermedad está entre 8 °C y 14 °C, no obstante, se han observado brotes en alevines de trucha entre 3 °C y 18 °C. La transmisión se produce

principalmente por vía horizontal a través del contacto entre peces sanos y enfermos, a través del agua o cadáveres donde el virus es capaz de sobrevivir durante varios meses. También se han registrado casos por transmisión vertical asociada a los huevos (Winton, 1991).

Los métodos de control de la NHI actualmente se basan en evitar la exposición al virus mediante la implementación de políticas de control estricto y buenas prácticas de higiene (Winton, 1991). La desinfección de huevos fecundados, la utilización de agua libre del virus para la incubación y la cría y el establecimiento de medidas de bioseguridad son fundamentales para prevenir la entrada de la NHI en cualquier piscifactoría. Por otro lado, la vacunación de salmónidos se encuentra en un estadio inicial; sin embargo, el desarrollo de algunas vacunas inactivadas o recombinantes (ADN) han mostrado resultados prometedores tanto a nivel experimental como en ensayos de campo. (OIE, 2012b).

Además de las enfermedades víricas son de gran importancia ciertas bacterias, parásitos y hongos que pueden provocar también problemas sanitarios y graves pérdidas económicas: enfermedades bacterianas como la lactococosis, la enfermedad de aguas frías y la forunculosis; enfermedades parasitarias como la enfermedad proliferativa renal (PKD), y la saprolegniosis de los salmónidos, como enfermedad micótica más relevante. Nos hemos centrado en estas enfermedades puesto que todas ellas están presentes en la Comunidad Autónoma de Aragón.

Lactococosis: Es una enfermedad aguda de carácter septicémica cuyo agente etiológico es una bacteria Gram positiva denominada *Lactococcus garvieae*, que en la trucha arcoíris (especie más susceptible) se asocia al aumento de la temperatura del agua por encima de 16 °C indicando un marcado carácter estacional (Pereira y cols., 2004; Gibello y cols., 2016). Además, se ha observado que la evolución del proceso se ve favorecido por una mala calidad del agua (déficit de oxígeno, altas concentraciones de compuestos nitrogenados), asociándose a notables deficiencias en las condiciones higiénico-sanitarias de las explotaciones.

En la actualidad se han observado brotes naturales en peces de cualquier tamaño, desde juveniles hasta la fase adulta pudiendo provocar mortalidades del 50% en poblaciones susceptibles (Ghittino y cols., 1998).

La transmisión de la enfermedad se produce principalmente por mecanismos horizontales debido a la introducción de nuevos lotes o mediante el contacto con excreciones procedentes de portadores asintomáticos (vía feco-oral), que favorece el mantenimiento latente de la

infección, lo que puede favorecer el desencadenamiento de la enfermedad cuando se den las condiciones óptimas (Ghittino y Múzquiz, 1998).

El tratamiento de la lactococosis está basado en la utilización de antibióticos como la doxiciclina, amoxicilina y eritromicina. Sin embargo, la aparición de múltiples resistencias hacen que la enfermedad resulte muy difícil de controlar por lo que el control de la misma pasa por el uso de vacunas inactivadas con adyuvante y administradas por vía intraperitoneal (Treves-Brown, 2000).

No obstante, es importante mantener unas condiciones óptimas tanto en el manejo diario de los peces como en el mantenimiento de las instalaciones con el fin de reducir al máximo el riesgo de entrada de *L. garvieae* y en el caso de que entre, la reinfección continuada en los estanques de producción (Romalde, 2004).

Enfermedad bacteriana de Aguas Frías o Síndrome del Alevín: Es un proceso altamente prevalente a nivel mundial cuyo agente etiológico es una bacteria filamentosa denominada *Flavobacterium psychrophilum*, englobada dentro del grupo de microorganismos fastidiosos, dada su complejidad para ser aislada, incluso a partir de peces enfermos (Valdebenito y Abendaño-Herrera, 2009).

Aunque la mayoría de las flavobacteriosis se manifiestan de forma externa (afectando a piel, aletas y branquias), uno de los grandes riesgos que presenta *F. psychrophilum* es precisamente su capacidad para inducir cuadros agudos de carácter septicémico, especialmente en los estadios más jóvenes de producción a temperaturas entre 4 °C y 12 °C; esto hace que su incidencia sea mayor durante los meses de invierno y primavera (Chiok, 2011). La mortalidad puede variar entre un 30% y un 50% aunque esto va a depender en gran medida de la acción de algunos factores predisponentes al estrés (traumatismos, transporte, altas densidades, etc.) que pueden favorecer la multiplicación y el desarrollo de la bacteria (Loch y Faisal, 2015).

La enfermedad se transmite generalmente por vía horizontal a través del agua así como por el contacto directo entre animales sanos y enfermos. Madetoja y cols., (2000), ponen de manifiesto la importancia en la retirada de peces muertos y moribundos como importantes fuentes de eliminación y transmisión de *F. psychrophilum*. Asimismo, se ha demostrado la transmisión vertical de la enfermedad a través de los fluidos seminales y ováricos a la progenie.

La administración de baños con cloramina T, sulfato de cobre o formol constituyen métodos de desinfección rutinaria bastante eficientes para controlar las bacterias presentes en la

superficie de los huevos e incluso ayudan en el tratamiento de peces con lesiones externas (Lönström y cols., 2008). Actualmente, no existen vacunas comerciales frente a la enfermedad y la administración de autovacunas por inmersión han resultado poco o nada efectivas (datos no publicados); contrariamente y a pesar de que se han descrito múltiples resistencias a distintos antibacterianos la administración oral (pienso) o mediante baños de oxitetraciclinas y florfenicol se han mostrado bastante efectivos en el curso inicial del proceso (Loch y Faisal, 2015).

Forunculosis clásica: Constituye uno de los procesos patógenos que afectan a los salmónidos mejor conocidos, no en vano, la primera descripción de la enfermedad data de 1884. Actualmente, se considera un proceso cosmopolita cuyo agente etiológico, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, no sólo es capaz de causar importantes daños económicos en las explotaciones intensivas sino que además, se considera uno de los factores más determinantes en el declive de algunas poblaciones silvestres (ejemplares reproductores), en determinados cursos fluviales de países como Noruega o España (Roberts, 2001; Marquez, 2009).

Se han observado la existencia de algunos factores de riesgo que inciden notablemente sobre la enfermedad: la edad (animales inferiores a 1 año manifiestan la enfermedad de forma hiperaguda o aguda, mientras que las formas subagudas y crónicas se presentan generalmente en individuos adultos); la temperatura (15-20 °C); la época del año (periodo estival); la esmoltificación (especies anádromas); la freza; una pobre calidad del agua (eutrofización); la presencia de heridas y lesiones; la presencia de otros agentes infecciosos o parasitarios; la alimentación y el estrés. Todos estos factores pueden favorecer la aparición de signos clínicos y de mortalidad en animales enfermos y/o portadores asintomáticos (Good y cols., 2001).

La principal vía de transmisión de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* es la vía horizontal directa por cohabitación entre poblaciones infectadas con el agente (enfermos o portadores asintomáticos y poblaciones ícticas no infectadas (Nordmo y cols., 1998).

El agua juega también un papel determinante, a pesar de que este patógeno no es considerado como una bacteria ubicuitaria del medio acuático (Roberts, 2001), ésta puede ser transportada en estado libre o adherida sobre partículas en suspensión o sedimentos donde puede permanecer viable durante algunas semanas, dependiendo de la temperatura y la salinidad del medio (Wiklund, 1995).

Jarp y cols., (1993), en un estudio epidemiológico llevado a cabo en Noruega, concluyeron que la presencia de especies anádromas en el curso del río constituía un importante factor de

riesgo en la infección y transmisión de *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* a las explotaciones próximas y una de las principales vías de entrada del patógeno a las mismas.

Los fómites y algunos vectores de transmisión (aves ictiófagas y ectoparásitos hematófagos) también favorecen la diseminación del agente (Schlotfeldt y Alderman, 1995).

La enfermedad proliferativa renal (PKD): Es un proceso patógeno de origen parasitario con un gran impacto económico en el cultivo de especies salmonícolas especialmente en la producción de trucha arcoíris, tanto en Estados Unidos como en el oeste de Europa, donde la enfermedad presenta una distribución de carácter endémico (Grabner y El-Matbouli, 2009). Afecta a numerosas especies ícticas, especialmente los salmónidos, tanto en poblaciones silvestres como en condiciones de cría intensiva (Mo y Jørgensen, 2016). Se han descrito infecciones naturales no sólo en la trucha arcoíris, sino también en la trucha común, el salvelino o trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), lucio (*Esox lucius*), así como en el timalo (*Thimallus thimallus*) y el salmón atlántico (Feist y cols., 2002; Grabner y El-Matbouli, 2009).

Se ha observado la presencia de algunos factores de riesgo que inciden notablemente sobre la presentación de la enfermedad, tanto en poblaciones cultivadas como silvestres: la edad (peces inferiores a un año manifiestan la enfermedad de forma hiperaguda o aguda; mientras que las formas subagudas y/o crónicas se presentan generalmente en individuos adultos) (Morris y cols., 2005); la temperatura (> 16 °C); la época del año (periodo estival); presencia de briozoos (hospedadores), una pobre calidad del agua (eutrofización); la presencia de agentes secundarios; la alimentación y el estrés (de Kinkelin y Lorient, 2001; El-Matbouli y Hoffmann, 2002); Todos estos factores pueden favorecer la aparición de signos clínicos y de mortalidad (10-90%), en animales enfermos y/o portadores asintomáticos.

En la actualidad, no existen vacunas disponibles ni tratamientos efectivos frente a la enfermedad. No obstante, la utilización con fines terapéuticos de algunos desinfectantes como sulfato de cobre y/o antibióticos como la fumagilina y derivados sintéticos (TNP-470), han presentado una cierta eficacia (Morris y cols., 2003). Sin embargo, la presencia de restricciones legales en algunos casos así como de numerosos efectos tóxicos en los animales tratados desaconseja el empleo de estas sustancias como medidas de control frente al PKD. Así, las medidas de control y prevención se basarán en una profilaxis de tipo higiénico-sanitario, mediante la instauración de buenas pautas de limpieza y desinfección de los estanques y del material utilizado en los mismos, evitando al máximo el estrés de los peces que pudieran ser provocados por un manejo inadecuado y/o excesiva densidad de población.

Saprolegniosis: *Saprolegnia* spp., responsable de esta enfermedad infecciosa es considerado como uno de los patógenos fúngicos más relevantes en acuicultura continental, especialmente en aquellas explotaciones dedicadas a la venta de huevos y gametos. El carácter ubicuitario en el medio acuático de dicho hongo facilita su amplia distribución afectando prácticamente a todas las especies dulceacuícolas, especialmente a los salmónidos; normalmente actúa como un patógeno secundario en peces enfermos o ya debilitados por otras enfermedades (Thoen y cols., 2011).

La temperatura óptima para el desarrollo de las zoosporas infectivas se produce alrededor de los 20 °C, mientras que la movilidad de éstas es máxima a 4 °C. Se ha observado que un descenso brusco de la temperatura (6-10 °C) o periodos fríos prolongados (superiores a 1 semana) pueden favorecer la presencia de altos niveles de estas zoosporas en el agua (superiores a 5 esporas/mililitro (ml)). Esta situación favorece el incremento del riesgo de infección y presentación de manifestaciones clínicas, puesto que contribuye significativamente también a un descenso en el número de células mucosas de la epidermis (Bruno y Wood, 1999).

La transmisión de la Saprolegniosis se produce por vía horizontal a partir de las fases infectantes (zoospora y quiste secundario), que una vez liberadas del micelio quedan suspendidas en el agua.

La utilización de rayos ultravioleta y la administración de determinados desinfectantes químicos tales como, sulfato de cobre, permanganato potásico, cloruro sódico y formalina, en general resultan efectivos para controlar la infección. La prevención implica el mantenimiento de los peces en correctas condiciones de nutrición, calidad del agua y evitar la superpoblación (Khodabandeh y Abtahi, 2006; Heikkinen y cols., 2014).

3. Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo han sido:

1. Conocer y valorar el estado sanitario (presencia o ausencia de infección/enfermedad) de dos piscifactorías gestionadas por el Gobierno de Aragón.
2. Aplicar las diferentes herramientas terapéuticas disponibles desde un punto de vista veterinario, según el caso, derivadas de la gestión piscícola.

Para alcanzar estos objetivos se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar y poner a punto las metodologías adecuadas.
- Conocer y aplicar la legislación sanitaria actual en materia piscícola.

4. Material y métodos

4.1. Diseño del estudio

Tal y como ya hemos señalado, el presente trabajo ha consistido en un estudio sanitario encaminado en primer lugar al mantenimiento del estatuto de zona libre frente a la SHV y NHI alcanzado por la Comunidad Autónoma de Aragón en el año 1999, y por otro, al control y prevención de otras enfermedades que si bien no son de declaración obligatoria pueden ocasionar igualmente un importante impacto económico.

4.1.1. Periodo y lugar de muestreo

Los muestreos se llevaron a cabo durante el mes de febrero en la explotación de Los Pajares (Albarracín, Teruel) y en el mes de abril en la piscifactoría de Planduviar (Sarvisé, Huesca).

4.1.2. Metodología de muestreo

Este estudio se llevó a cabo en las dos piscifactorías que gestiona actualmente el Gobierno de Aragón para la cría de ejemplares de trucha común. Tanto la selección de los peces como el tamaño muestral vienen marcados por la legislación vigente (*Decisión en Ejecución 2015/1554/UE*) de tal forma que en cada una de las piscifactorías señaladas se recogió un mínimo de 30 peces distribuidos en tres lotes representativos, de 10 peces cada uno, en función de los distintas unidades o estadios de producción (Tabla 1). Por otro lado, se seleccionaron preferentemente aquellos peces que presentaban algún tipo de debilidad o anomalía, o bien aquellos que habían muerto de forma muy reciente.

Tabla 1. Composición de los diferentes lotes estudiados.

Piscifactoría	Tipo de muestra	Número (n)	Referencia
Planduviar	Huevas	10	L1 (Ésera)
	Huevas		L2 (Gállego)
	Huevas		L3 (Aragón)
	Huevas		L4 (Aragón-Cinca)
	Alevines		L5 (Ésera)
	Alevines		L6 (Gállego)
	Alevines		L7 (Aragón)
	Alevines		L8 (Aragón-Cinca)
Pajares	Alevines	10	L1 (Guadalaviar)
	Alevines		L2 (E10 Pancrudo)
	Alevines		L3 (E4 Pancrudo)
	Adultos		L4 (Pancrudo 2014)

4.2. Recogida de información

4.2.1. Recogida de muestras

En cada una de las piscifactorías señaladas se recogieron dos muestras de agua (a la entrada y a la salida de la explotación) y de peces para su posterior estudio en el Laboratorio de Ictiopatología (Laboratorio Autorizado para las Enfermedades de los Peces), ubicado en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza.

4.2.1.1. Recogida de aguas

La toma de muestras de agua se realizó de la forma más representativa y homogénea posible en relación al punto de muestreo del cual provenía. Para ello, se tomó un volumen total de 200 mililitros (ml) de agua repartido en dos envases de polietileno estériles provistos de tapón roscado, de 100 ml capacidad cada uno, en la cabecera y en la cola de la explotación.

Cada uno de los envases se abrió debajo del agua y se mantuvo sumergido completamente en posición invertida con el fin de evitar la formación de burbujas y la entrada de materia orgánica. Una vez llenos, se etiquetaron y se mantuvieron a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su posterior procesado en el laboratorio.

4.2.1.2. Necropsia y toma de muestras

Una vez recogidos los peces estos fueron eutanasiados con una sobredosis anestésica (500 miligramos/litro) (mg/l) de metasulfonato de tricaina (MS-222).

La necropsia de los peces recogidos se realizó mediante dos incisiones ventrales: la primera se practicó desde la zona anal hasta la zona bucal y la segunda, desde la zona anal hasta el opérculo branquial describiendo así un arco, de tal forma que una vez retirada la pared abdominal se consigue un mejor acceso a la mayoría de los órganos internos (Brown, 2000).

Una vez finalizada la necropsia, se recogieron las muestras necesarias (Figura 2), para cada uno de los diagnósticos señalados en apartados posteriores (**4.3. Metodología analítica**). Todas las muestras fueron igualmente transportadas al laboratorio a temperatura de refrigeración hasta su posterior procesado.

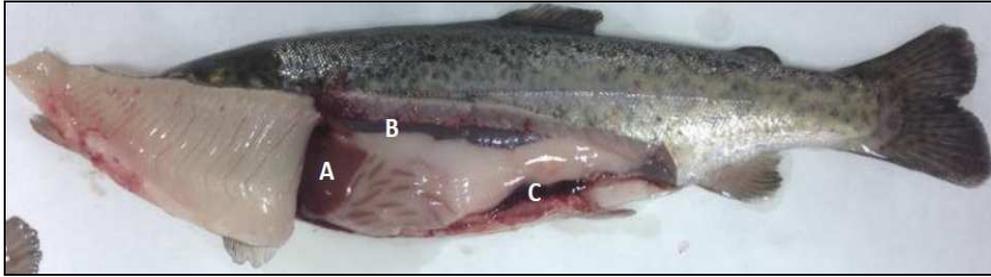


Figura 2. Necropsia de un salmónido. Leyenda: A (hígado), B (riñón) y C (bazo).

4.2.2. Cuestionario

Simultáneamente a la recogida de muestras se cumplimentó un cuestionario con todos aquellos datos obtenidos *in situ* mediante observación directa, así como la información correspondiente a la zona, ubicación y determinadas características medioambientales y productivas de la instalación. Además de ello, mediante conversación con el piscicultor se anotó aquella información relativa al grado de cumplimiento del programa sanitario, la aparición de posibles problemas así como las medidas puestas en marcha con el fin de paliarlos tal y como se recoge en la tabla 2.

Tabla 2. Cuestionario realizado en las piscifactorías estudiadas.

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	
Origen de la fuente de agua:	R /M /P
Laboratorio:	Sí / No
¿Existen aves o mamíferos que entren en la explotación?*	Sí / No
*¿Cuáles?:	Sí / No
¿Entran otras especies en la explotación?*	Sí / No
*¿Cuáles?:	Sí / No
Almacén:	Sí / No
2. MANEJO Y CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS	
¿Se introducen peces vivos?*	Sí / No
*Origen:	Sí / No
¿Se introducen huevos?	Sí / No
*Origen:	Sí / No
¿Salen peces vivos?*	Sí / No
*Destino:	Sí / No
¿Salen huevos embrionados?	Sí / No
Densidad de los estanques:	A/M/B
Tipos de estanques:	M / A
Distribución del alimento:	A/M/B
Manejo general:	A/M/B
Limpieza y desinfección del material:	A/M/B

Vacunación:	Sí / No
Oxigenación forzada:	SÍ / No
Material de los estanques:	T/C/F
Nivel higiénico general:	A/M/B
Limpieza y desinfección de estanques:	A/M/B
Tipo / Marca de alimento:	

Leyenda: R (río) /M (manantial) /P (pozo); A (alto) /M (medio) /B (bajo); M (manual) /A (automático); T (tierra) /C (cemento) /F (fibra de vidrio).

4.3. Metodología analítica

4.3.1. Estudio de la calidad físico-química del agua

El concepto de calidad del agua se refiere a la caracterización de sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas. En el caso de la acuicultura, estos parámetros son de una importancia trascendental, ya que debe asegurarse unas propiedades de calidad del agua que garanticen el nivel sanitario de la producción. Para ello, el manejo adecuado de los factores que intervienen en el proceso productivo sirven para reducir el estado de estrés, disminuyendo así la aparición de enfermedades y mortalidad en peces (CIAD, 2003).

La determinación de los parámetros físico-químicos del agua se llevó a cabo mediante el empleo de aparatos de medida *in situ*, valoraciones colorimétricas y fotometría (fotómetro DR 2600, Hach Lange) a partir de diferentes kits comerciales tal y como se indica en la tabla 3. Para la determinación de sólidos en suspensión se utilizó el método de filtración en membrana mediante el empleo de filtros de fibra de vidrio de 0,45 micras (μm) y posterior secado a una temperatura de 105 °C hasta obtener una pesada constante empleando para ello una balanza de precisión (Sartorius AG).

Tabla 3. Principales parámetros físico-químicos estudiados.

Parámetro	Técnica analítica	Medidores/Kits comerciales
Turbidez (NTU)	Nefelometría	HI 93703 (Hanna instrument)
Oxígeno disuelto (mg/l)	Electrometría	Oxi 330 (Crison)
Temperatura (°C)	Electrometría	Oxi 330 (Crison)
pH (unidades de pH)	Electrometría	pH-metro portátil 507 (Crison)
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Electrometría	Conductímetro portátil 524 (Crison)
Sólidos en suspensión	Filtración	Millipore
Alcalinidad (mg/l)	Titramétrica	HI-4811
Dureza total (mg/l)	Titramétrica	HI-4812

Amonio total (mg/l)	Fotometría	LCK 340 (Neurtek)
Nitratos (mg/l)	Fotometría	LCK 339 (Neurtek)
Nitritos (mg/l)	Fotometría	LCK 341 (Neurtek)
Fosfatos totales (mg/l)	Fotometría	LCK 349 (Neurtek)
DQO* (mg/l)	Fotometría	LCK 414 (Neurtek)
Cloruros (mg/l)	Fotometría	LCK 310/343 (Neurtek)
Cobre (mg/l)	Fotometría	LCK 321 (Neurtek)

Leyenda: DQO (Demanda química de oxígeno).

4.3.2. Estudio de la calidad microbiológica del agua

Para la determinación cuantitativa de bacterias coliformes y estreptococos fecales se utilizó un método de filtración en membrana y su posterior siembra en distintos medios de cultivo selectivos a una temperatura adecuada para cada una de ellos, tal y como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Tipos de medios de cultivo empleados para el estudio microbiológico del agua.

Medios de cultivo	Parámetro (UFC/100 ml)	Incubación	Interpretación
ENDO agar	Coliformes totales	37 °C / 24 h	Color verde metalizado
mFC agar	Coliformes fecales	44 °C / 24 h	Color azul
Slanetz-Bartley agar	Estreptococos fecales	37 °C / 24 h	Color marrón

El método de filtración por membrana consiste en filtrar un volumen determinado de muestra (generalmente 100 ml) a través de un filtro de membrana estéril de acetato de celulosa, de 47 milímetros (mm) de diámetro y un tamaño de poro de 0,45 μm , colocado sobre un soporte estéril y con ayuda de una bomba de filtrado (Millipore).

Dado el origen de las muestras (muestras no tratadas) y con el fin de obtener unos resultados lo más representativos y fiables posibles, se hizo necesario trabajar con distintas diluciones en agua destilada estéril; en nuestro caso, se trabajó con una dilución 1/100 para la determinación de bacterias coliformes y 1/10 para el recuento de estreptococos fecales. En todos los casos el resultado final se expresó como número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en 100 ml.

4.3.3. Diagnóstico bacteriológico

4.3.3.1. Medios de cultivo

Para el aislamiento de agentes bacterianos se utilizaron medios de cultivo deshidratados, disueltos en agua destilada a un pH adecuado; algunos generales y otros de carácter diferencial y selectivo.

Todos los medios de cultivo utilizados fueron medios sólidos:

- Agar Sangre: medio de cultivo enriquecido con un 5% de sangre de oveja, utilizado para el aislamiento de microorganismo Gram negativos y Gram positivos.
- Agar Tripticasa Soja (TSA): medio de cultivo muy usado en microbiología para el aislamiento general de microorganismos tanto Gram negativos como Gram positivos.
- Agar TYES: medio de cultivo selectivo, enriquecido con extracto levadura, especialmente indicado para el aislamiento de bacterias filamentosas del género *Flavobacterium*.
- Agar Bilis Esculina (BEA): medio selectivo, enriquecido con extracto de carne y sales biliares para el crecimiento de microorganismos Gram positivos, especialmente enterococos y estreptococos.
- Agar Mueller Hinton (M-H): medio de cultivo recomendado para estudios de sensibilidad a antimicrobianos.

4.3.3.2. Aislamiento bacteriano

El aislamiento se realizó mediante la siembra en los medios de cultivo anteriormente citados de muestras tomadas de hígado, bazo, riñón anterior y lesiones en el caso de presentarse. Una vez sembrados, se mantuvieron a una temperatura de incubación de 22 °C durante 48-72 horas. Para el aislamiento de agentes del género *Flavobacterium* la temperatura de incubación fue de 15-18 °C (72-96 horas).

Transcurrido el periodo de incubación se seleccionaron aquellas placas en las cuales había crecimiento positivo y se resembraron de nuevo en los medios de cultivo adecuados, con el fin de facilitar la posterior identificación.

4.3.3.3. Identificación bacteriana

La identificación de los agentes aislados se llevó a cabo mediante el estudio de las características de crecimiento y pigmentación de las colonias así como su capacidad para crecer a determinadas temperaturas (37 °C); tinción de Gram y microscopía, lo que nos permitió observar la morfología de los agentes aislados (bacilar, cocoide, cocobacilar), tamaño y disposición de los mismos (aislados, en parejas, en racimos) (Austin y Austin, 2007; Whitman, 2004).

En determinadas ocasiones se utilizaron pruebas bioquímicas entre las que se incluyeron sistemas API de identificación rápida (API 20E, API 20NE, API 20Strep) incubados a 22 °C durante 48-72 horas. Entre dichas pruebas destacamos la prueba de la catalasa, citocromo-oxidasa, estudio del metabolismo oxidativo-fermentativo de la glucosa, producción de α y β hemólisis, prueba de la urea, producción de indol (Austin y Austin, 2007; Whitman, 2004).

En aquellos casos en los que se sospechó la presencia de agentes patógenos *per se*, la confirmación de éstos se realizó mediante la técnica de la PCR tal y como se describe en el **apartado 4.3.6.**

4.3.4. Diagnóstico vírico

El protocolo de diagnóstico para las enfermedades víricas se basó en las líneas de actuación definidas en el Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos (OIE, 2015), y en la legislación europea donde se establecen determinadas disposiciones en lo que respecta a los requisitos de vigilancia y métodos de diagnóstico (*Decisión de Ejecución 2015/1554/UE*).

4.3.4.1. Preparación de los cultivos celulares

Los cultivos celulares utilizados para el aislamiento vírico pertenecen a las líneas celulares continuas de origen íctico, Fibroblastos de Bluegil (BF-2) y Epitelio Papuloso de Ciprínidos (EPC). La elección de estas líneas celulares se basó en su óptimo crecimiento, alta sensibilidad y el marcado efecto citopático que en ellas producen las infecciones víricas (Lorenzen y cols., 1999).

El crecimiento de estas líneas celulares se llevó a cabo en frascos de cultivo celular de 25 centímetros cuadrados (cm²) de superficie. El medio elegido para el mantenimiento celular fue el medio Medio Mínimo Esencial (MEM) de Eagle tamponado con HEPES y 0,85 mg/ml de bicarbonato sódico, enriquecido con suero fetal bovino al 10% y, adicionado con 125 unidades internacionales (UI) UI/ml de penicilina G sódica, 130 microgramos μ g/ml de estreptomicina y 2,5 μ g/ml de anfotericina B. Para el subcultivo, el tapiz celular se disgregó con tripsina EDTA al 0,025%.

A partir de los cultivos preparados, se realizaron subcultivos en placas Falcon de 24 pocillos incubados a una temperatura de 20-30 °C durante 24 horas, lo que permitió el crecimiento en monocapa del tapiz celular.

Todos los reactivos y materiales utilizados se esterilizaron previamente en autoclave. Así mismo, todo el proceso se llevó a cabo en una campana de seguridad de flujo vertical (Telstar Bio-II-A) para garantizar dichas condiciones de esterilidad.

4.3.4.2. Aislamiento vírico

Para el diagnóstico virológico se tomaron muestras a partir de bazo, riñón anterior y encéfalo de cada uno de los peces que conformaban los distintos lotes recogidos en las piscifactorías estudiadas. Una vez en el laboratorio se tomó una muestra representativa de las mismas que fue introducida en una bolsa de *stomacher* estéril, previamente etiquetada. A cada muestra se le añadió medio MEM de Eagle mantenido a una temperatura de 4 °C sin suero fetal bovino y con una concentración de antibióticos cinco veces superior a la utilizada para la preparación del cultivo celular, hasta conseguir una proporción final 1:10.

Esta se introdujo en el *stomacher* durante 10 minutos con el objeto de conseguir un macerado más homogéneo. Para permitir la liberación del virus de los restos del tejido y facilitar la acción de los antibióticos, los homogeneizados se incubaron a una temperatura de 14 °C durante 2 horas, o bien durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se traspasaron 2 ml de cada homogeneizado a un tubo de ensayo y se centrifugaron durante 5 minutos a 13.000 g a una temperatura de 4 °C. Con el sobrenadante obtenido se inocularon por adsorción las placas preparadas previamente con los cultivos celulares.

Para la inoculación se tomaron los cultivos celulares de 24 horas preparados en placas, a los que se les retiró el medio con una pipeta estéril y se depositaron 0,15 ml de muestra (sobrenadante) por pocillo, utilizando dos pocillos de cada línea celular por muestra. La placa se incubó durante una hora a 14 °C agitándola ligeramente cada 10 minutos. Tras la incubación, a cada pocillo se le añadió 1 ml de MEM tamponado, junto con antibióticos y suero fetal bovino al 2%. El cultivo celular ya inoculado se incubó finalmente a 14 °C.

Diariamente se observó la aparición de efecto citopático en cada uno de los pocillos inoculados, de forma que si a los 7 días no se había detectado, se procedió a realizar un segundo pase de las muestras mediante un nuevo cultivo celular. Para ello, se congeló y descongeló rápidamente la placa con las muestras con el fin de romper las células y liberar el virus, e inmediatamente inoculamos la nueva placa siguiendo la metodología anteriormente descrita.

El proceso se repitió hasta un tercer pase; la muestra se consideró finalmente como negativa en el caso de no aparecer ningún efecto citopático tras 7 días de cultivo. En caso contrario (aparición de efecto citopático) se utilizó la técnica de seroneutralización como método de identificación mediante la utilización de antisueros específicos.

En todos los casos se dejaron varios pocillos como control negativo, es decir, sin inocular, para confirmar que el efecto citopático se debía a la acción de un posible virus y no a problemas de tipo citotóxico.

4.3.5. Diagnóstico parasitológico y micótico

El diagnóstico parasitológico se inició con una inspección minuciosa macro y microscópica de los peces muestreados. Para el estudio e identificación de los distintos grupos y agentes parasitarios se emplearon los siguientes métodos, siguiendo las pautas y recomendaciones de Hoffman, 1998; Eiras y cols., 2000; Roberts, 2001:

- Visualización directa en fresco, mediante un ligero raspado de la superficie externa del pez (piel, aletas, ojos y branquias) y de las mucosas digestivas mediante una hoja de bisturí. El mucus obtenido se depositó entre un cubre y un portaobjetos y se observó al microscopio óptico. El tamaño de las superficies fue el mínimo posible, recomendándose dimensiones inferiores a 1 cm. Para la identificación de parásitos monogenéticos (*Gyrodactylus* spp. y *Dactylogyrus* spp.) se introdujeron entre cubre y portaobjetos con suficiente agua para evitar su aplastamiento y se retiró con un papel el exceso de fluido.
- Visualización de parásitos y de muestras de tejidos (piel, aletas, branquias, bazo, hígado, tracto digestivo, riñón y músculo) conservados en formol al 3%. Los tejidos de los peces sufren una rápida autólisis por lo que fueron procesados antes de que se produjeran cambios degenerativos irreversibles.
- Se tomaron muestras de riñón para la detección del agente de la Enfermedad Proliferativa del Riñón (*Tetracapsuloides bryosalmonae*) mediante diagnóstico molecular.

El diagnóstico micológico se realizó mediante observación directa al microscopio óptico a partir de raspados de muestras piel, aletas y branquias y posterior identificación mediante el estudio de algunas estructuras morfológicas como las hifas y conidióforos (Roberts, 2001).

4.3.6. Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular se basó en la determinación específica de una porción del genoma del organismo a estudiar, a partir del tejido seleccionado y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.3.6.1. Extracción del ADN

Una vez tomada las muestras pertinentes (bazo, hígado y riñón anterior) de todos los animales que componían el conjunto de lotes a estudiar, se realizó la extracción del ADN agrupando varios ejemplares en *pool*, con un máximo de 5 peces para no perder sensibilidad diagnóstica. Para ello se utilizó el kit comercial *Ultra Clean®Tissue&Cells DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories, Inc., EEUU), siguiendo en todo momento el protocolo fijado por el fabricante.

4.3.6.2. Tipos de PCR

En primer lugar se realizó una PCR múltiple previamente descrita por del Cerro y cols., 2002, para la detección de *Flavobacterium psychrophilum* y *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. En este estudio no se realizó el análisis de *Yersinia ruckerii* por ser más frecuente en invierno. Además, para la detección y cuantificación del parásito *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKD) se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) descrita por Grabner y El-Matbouli 2009.

La PCR múltiple se realizó para determinar cualitativamente que muestras eran positivas frente a estos patógenos. Mientras que con la qPCR cuantificamos relativamente la carga bacteriana que posee el tejido renal estudiado. El cálculo de las copias de ADN del PKD se realizó mediante la fórmula 2^{-DDCT} (Livak y cols., 2001).

4.3.6.3. Condiciones de ambos tipos de PCR

La concentración de todos los cebadores seleccionados fue de $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ (μM), el volumen de ADN de 5 microlitros (μl) y el volumen total de la reacción, en ambas técnicas, fue de 25 μl . El fluoróforo empleado en todas las técnicas fue *SYBR Green I* (GoTaq® Hot Start Green Master Mix, Promega, EEUU). Todas las determinaciones se llevaron a cabo en un termociclador CFX Connect™ (Biorad).

Las condiciones en la PCR múltiple fueron las siguientes, una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 60 segundos, 60 °C durante 40 segundos y 72 °C durante 60 minutos, después de ello se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los amplicones de PCR convencional se confirmaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, adicionando Gel Red (Biotium) como tinte fluorescente de ácidos nucleicos.

En cambio, el protocolo de qPCR para el PKD fue el siguiente, una primer paso a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 38 ciclos a 95 °C durante 45 segundos, 51 °C durante 45 segundos y 72 °C durante 45 segundos. Después de ello, se realizó un paso adicional desde 60 °C hasta 95 °C en un ratio de 0.5 °C para observar la especificidad del amplicón obtenido (curva de fusión, *melting curve-Tm*-).

Asimismo y para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos se realizó una reacción adicional para cada una de las muestras utilizando como control interno endógeno, el gen *housekeeping* Actina. En la tabla 5 se pueden apreciar las características de los cebadores objeto de este estudio.

Tabla 5. Características de los cebadores.

Nombre cebador	Secuencia	Gen estudiado	Amplicón (pb)	Referencia
PAAS1 F	5'- CGTTGGATATGGCTCTTCT-3'	16S rRNA	423	Del Cerro y cols., 2002
PAAS2 R	5'- CTCAAACGGCTGCGTACCA-3'			
FP1 F	5'-CTTAGTTGGCATCAACAC-3'			
FP3 R	5'-ACACTGGCAGTCTTGCTA-3'	18S rDNA	166	Grabner y El-Matbouli, 2009
PKD-real F	5'-TGTCGATTGGACACTGCATG-3'			
PKD-real R	5'- ACGTCCGCAAACCTTACAGCT -3'			
Actina F	5'-GCATCCTGACCCTCAAGTACC-3'	B_Actina	137	Diseño propio
Actina R	5'-GGTGTGGTGCCAGATCTTC-3'			

5. Resultados y Discusión

5.1. Con respecto a los parámetros de calidad del agua

En las tablas 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la calidad del agua en sus características físico-químicas y microbiológicas tanto a la entrada como a la salida de cada una de las explotaciones estudiadas.

Tabla 6. Descripción de la calidad del agua de la piscifactoría Los Pajares, Albarracín (Teruel).

Parámetros	Unidad	Resultados		Valores recomendables	
		Entrada	Salida		
Físico-Químicos	Temperatura	°C	6,3	5,2	≤ 20**
	Oxígeno disuelto (OD)	mg/l	6,1	7,5	≥ 6*
	pH	valor absoluto	7,01	7,24	6 – 9*
	N-Nitratos (N-NO ₃ -)	mg/l	0,763	0,782	---
	Nitratos (NO ₃ -)	mg/l	3,37	3,46	≤ 50**
	N-Nitritos (N-NO ₂ -)	mg/l	< 0,001	0,001	---
	Nitritos (NO ₂ -)	mg/l	0,02	0,03	< 0,01*

Físico-Químicos	Amonio total (NH ₄ ⁺)	mg/l	0,021	0,016	≤ 1*
	Fosfatos totales	mg/l	ND	0,056	0,2*
	P-Fosfatos	mg/l	ND	0,015	---
	Cobre	mg/l	< 0,01	< 0,01	< 0,04
	Cloruros	mg/l	14,8	17	---
	Dureza total	mg/l	445	462,8	---
	Turbidez	NTU	204	242	< 10**
	Conductividad	μS	686	717	---
	Alcalinidad	mg/l	204	210	---
	Sólidos en suspensión	mg/l	1,2	2,5	≤ 25*
	DQO	mg/l	8,70	4,18	≤ 40**
Microbiológicos	Coliformes totales	UFC/100 ml	610	825	---
	Coliformes fecales	UFC/100 ml	610	636	---
	Estreptococos fecales	UFC/100 ml	110	130	---

Leyenda: ND (no detectable); * (*Real Decreto 927/1988*); ** (Schlotfeldt y Alderman, 1995).

En términos generales hemos observado que la mayor parte de los parámetros estudiados cumplen con los requisitos de calidad establecidos tanto en la bibliografía existente como en la legislación vigente (Alabaster y Lloyd, 1982; *Real Decreto 927/1988*; Schlotfeldt y Alderman, 1995), a pesar de que la acuicultura como otras actividades humanas puede tener efectos adversos sobre el medio acuático sobre el que se desarrolla. La eutrofización del medio debido a una carga excesiva de nutrientes derivados del metabolismo de los peces y de los piensos no consumidos constituye uno de sus principales efectos (Alabaster y Lloyd, 1982).

Tabla 7. Descripción de la calidad del agua de la piscifactoría Planduviar, Sarvisé (Huesca).

Parámetros	Unidades	Resultados		Valores recomendables	
		Entrada	Salida		
Físico-Químicos	Temperatura	°C	9,8	10	≤ 20**
	Oxígeno disuelto (OD)	mg/l	6,12	7,21	≥ 6*
	pH	valor absoluto	6,95	7,04	6 – 9*
	N-Nitratos (N-NO ₃ ⁻)	mg/l	0,260	0,266	---
	Nitratos (NO ₃ ⁻)	mg/l	1,15	1,18	≤ 50**
	N-Nitritos (N-NO ₂ ⁻)	mg/l	0,009	0,009	---
	Nitritos (NO ₂ ⁻)	mg/l	0,030	0,029	< 0,01*
	Amonio total (NH ₄ ⁺)	mg/l	0,019	0,051	≤ 1*

Físico-Químicos	Fosfatos totales	mg/l	ND	ND	0,2*
	P-Fosfatos	mg/l	ND	ND	---
	Cobre	mg/l	ND	ND	< 0,04
	Cloruros	mg/l	2,36	4,61	---
	Dureza total	mg/l	284,8	284,8	---
	Turbidez	NTU	0	8,42	< 10**
	Conductividad	μS	351	392	---
	Alcalinidad	mg/l	138	135	---
	Sólidos en suspensión	mg/l	< 1	< 1	≤ 25*
	DQO	mg/l	4,16	ND	≤ 40**
Microbiológicos	Coliformes totales	UFC/100 ml	< 100	200	---
	Coliformes fecales	UFC/100 ml	< 10	< 10	---
	Estreptococos fecales	UFC/100 ml	< 10	10	---

Leyenda: ND (no detectable); * (*Real Decreto 927/1988*); ** (Schlotfeldt y Aldreman, 1995).

Se han observado incrementos puntuales en la turbidez de las aguas (> 200 NTU) en la piscifactoría de Los Pajares (Tabla 6); el hecho de que este aumento, sobre los valores normales (> 25 mg/l), se haya producido tanto a la entrada como a la salida de la piscifactoría, nos hace pensar que muy probablemente esté asociado a fenómenos naturales derivados de condiciones climatológicas adversas y no a la actividad acuícola propiamente dicha.

Por otro lado, señalar que si bien se han obtenido concentraciones de nitritos muy por debajo de 0,1 mg/l, la legislación española establece límites más restrictivos (< 0,01 mg/l), cuando requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces, especialmente para las especies salmonícolas mucho más sensibles a los cambios medioambientales (*Real Decreto 927/1988*).

5.2. Con respecto al diagnóstico bacteriológico

Mediante el empleo de procedimientos microbiológicos clásicos no se realizó ningún tipo de aislamiento ni identificación bacteriana en ninguna de las muestras analizadas en nuestro estudio. No obstante, el empleo de técnicas moleculares nos permitió la detección, mediante una PCR múltiple, de ADN procedente del agente patógeno *F. psychrophilum*, responsable de la enfermedad de aguas frías (Valdebenito y Abendaño-Herrera, 2009). Las muestras que resultaron positivas correspondieron a los lotes de huevos embrionados, L1, L2, L3 y L4, respectivamente, procedentes de la piscifactoría de Planduviar, lo que demuestra la transmisión vertical de la enfermedad y el importante riesgo de diseminación que implica esta

vía a partir de la venta de huevas infectadas a otras explotaciones libres o destinadas a la repoblación de los ríos (Loch y Faisal, 2015). Además de los controles sanitarios periódicos y el desarrollo de técnicas cada vez más sensibles capaces de detectar posibles portadores y facilitar su eliminación y, con el fin de minimizar dichos riesgos se hace necesaria también la incorporación rutinaria de protocolos periódicos de desinfección (cloramina T, sulfato de cobre), puesto que además se ha demostrado que son efectivos frente al desarrollo y multiplicación del agente en las fases iniciales (Lönström y cols., 2008).

Por otro lado, a pesar de que los alevines son especialmente sensibles a la enfermedad principalmente a temperaturas frías (Chiok, 2011), como las registradas en el agua en el momento de la toma de muestras. El resto de los lotes analizados correspondientes a este grupo de edad (L4 a L8) resultaron todos negativos.

5.3. En relación al diagnóstico vírico

A lo largo del periodo del estudio no se han aislado agentes de etiología vírica en ninguna de las piscifactorías estudiadas. En consecuencia, no han sido detectados ninguno de los agentes etiológicos responsables de la SHV e NHI, enfermedades no exóticas enumeradas en el Anexo IV del *Real Decreto 1614/2008*, relativa a los requisitos zoonosarios de los animales y productos de la acuicultura, así como a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. Se ha demostrado que el desarrollo y la puesta en marcha de sistemas de vigilancia activa, basados en el seguimiento de las poblaciones piscícolas (especialmente sobre aquellos lotes nuevos) mediante controles sanitarios periódicos, junto con la instauración de óptimas medidas higiénico-sanitarias y de bioseguridad son imprescindibles para evitar la proliferación y diseminación de nuevas enfermedades, principalmente aquellas que presentan un mayor impacto económico y medioambiental (Roberts, 2001; Ruiz-Zarzuela y cols., 2002; OIE, 2016).

5.4. Sobre el diagnóstico parasitario y micótico

A pesar de que el parasitismo es un fenómeno muy frecuente entre las poblaciones ícticas, especialmente favorecido por las condiciones de cría que se llevan a cabo en las instalaciones de acuicultura (Roberts, 2001), los resultados obtenidos en este estudio señalan ligeras infestaciones (1-2 parásitos por campo) de ectoparásitos del género *Gyrodactylus* spp., sobre muestras de piel y aletas de los lotes L1 y L3 procedentes de Los Pajares y sobre L5 y L6 de la piscifactoría de Planduviar. Además se ha detectado *Trichodina* spp. en muestras de branquias

correspondientes al lote L1 de la piscifactoría Los Pajares. Estos resultados se pueden observar en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados sobre el diagnóstico parasitario en ambas piscifactorías.

Piscifactoría	Tipo de muestra	Referencia	Diagnóstico parasitario	
			<i>Gyrodactylus</i> spp.	<i>Trichodina</i> spp.
Planduviar	Alevines	L5 (Ésera)	Positivo	Negativo
	Alevines	L6 (Gállego)	Positivo	Negativo
	Alevines	L7 (Aragón)	Negativo	Negativo
	Alevines	L8 (Aragón-Cinca)	Negativo	Negativo
Pajares	Alevines	L1 (Guadalaviar)	Positivo	Positivo
	Alevines	L2 (E10 Pancrudo)	Negativo	Negativo
	Alevines	L3 (E4 Pancrudo)	Positivo	Negativo
	Adultos	L4 (Pancrudo 2014)	Negativo	Negativo

La mayoría de estas especies se han descrito en poblaciones sanas a bajas intensidades de parasitación, aunque en determinadas situaciones de estrés: en peces debilitados o inmunodeprimidos, con una deficiente calidad del agua, en asociación con otros procesos infecciosos, etc. situaciones que pueden favorecer su capacidad de multiplicación y actuar como verdaderos agentes patógenos de carácter oportunista induciendo daños importantes en la población (Brown, 2000; Roberts, 2001).

Finalmente, señalar que las muestras procedentes del riñón anterior mostraron un resultado negativo para el mixozoo *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKD). Asimismo, no se identificó el hongo *Saprolegnia* spp. en ninguno de los lotes analizados en las explotaciones pertinentes, a pesar de su carácter ubicuitario (Thoen y cols., 2011).

6. Conclusiones / Conclusions

En base a las condiciones del estudio y de los resultados observados, se han obtenido las siguientes conclusiones:

Primera. No ha sido detectado ningún patógeno de etiología vírica, incluyendo los agentes responsables de la Septicemia Hemorrágica Viral y la Necrosis Hematopoyética Infecciosa, enfermedades de declaración obligatoria enumeradas en el *Anexo IV del Real Decreto 1614/2008*, lo que corrobora la eficacia de los planes de vigilancia instaurados en la Comunidad Autónoma de Aragón para el mantenimiento de ésta dentro del listado de zonas autorizadas frente a dichos procesos.

Segunda. Durante el periodo de estudio se ha identificado la presencia de otros agentes aunque mayoritariamente ubicuitarios, salvo *F. psychrophilum*, patógeno responsable de la enfermedad de aguas frías de gran importancia sanitaria y económica para el sector acuícola. Su detección precoz en fase de huevo, conjuntamente con la puesta en marcha de planes de erradicación, control y prevención, ha evitado su diseminación al medio natural y dentro de la explotación.

Conclusions

Based on the study conditions and the observed results, the following conclusions were obtained:

First. It has not been detected in any pathogen of viral etiology, including agents responsible for Viral Hemorrhagic Septicemia and Infectious Hematopoietic Necrosis, notifiable diseases listed in *Annex IV of Royal Decree 1614/2008*, which confirms the effectiveness of plans surveillance instituted in Aragon to maintain it in the list of approved zones against these processes.

Second. During the period of study, we have identified the presence of other agents although mostly ubiquitous except *F. psychrophilum*, pathogen responsible for the disease coldwater. This disease has a high health and economical importance for the aquaculture sector. Early detection in the egg stage together with the implementation of plans for the eradication, control and prevention has prevented it spreading into the natural environment and within the farm.

7. Valoración personal

Considero que haber podido realizar mi TFG sobre acuicultura e ictiopatología ha sido una suerte. Si bien desde antes de empezar la carrera universitaria en Veterinaria, ya me planteé cursar la titulación de Ciencias del mar, la asignatura de Acuicultura e Ictiopatología del año pasado me suscitó más interés por ampliar mis conocimientos en este campo. Además, creo que es un área de conocimiento en plena expansión internacional, pues dada la tendencia mundial de incremento del consumo de pescado y el estado de explotación de la pesca extractiva, se debe ayudar a equilibrar el estado medioambiental del sector. Así que lo entiendo como una oportunidad profesional en un campo en pleno desarrollo que está en el foco de muchas organizaciones ecologistas por sus posibles impactos medioambientales.

Con la realización de este trabajo he tenido la oportunidad de conocer la producción piscícola en la Comunidad de Aragón, visitando dos piscifactorías. Pude ver y participar de cómo trabajan en ellas, aprender del trabajo diario del piscicultor y conocer sus problemáticas, así como las respuestas que la veterinaria puede aportar. Esto me ha ayudado a entender la utilidad técnica, medioambiental y sobre todo social que nuestro trabajo puede conllevar.

Me ha encantado tener la oportunidad de poder poner en práctica las técnicas microbiológicas que se usan habitualmente en el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades víricas, bacterianas, micológicas y parasitológicas de los peces y conocer el rigor y la organización del trabajo en el laboratorio. Igualmente, entrar en contacto con la legislación específica sobre enfermedades infecciosas en acuicultura y patologías más comunes en la Comunidad de Aragón, me ha aportado una visión más integral del sector.

En general, la realización de este trabajo me ha dado a conocer la estructura del sector, los diferentes problemas que se pueden presentar en la gestión piscícola y los requisitos legales para mejorar la vida y supervivencia de las poblaciones. En resumen, me ha motivado para seguir aprendiendo para poder llegar a ser una gran profesional. Me ha hecho plantearme la necesidad de estudiar un máster específico o buscar otras prácticas a través de algún programa de becas para ir adquiriendo experiencia y conocimientos.

8. Bibliografía

- Alabaster, J.S., Lloyd, R. 1982. Finely divided solids. Water quality criteria for freshwater fish. Second edition. Butterworth, London, UK, 1-20.
- APROMAR, 2016. Informe la acuicultura en España, 2016. Disponible en: https://drive.google.com/file/d/0B4_4E-v9oqL_NVdyVWZJc21XT0U/view [Acceso 24 agosto]
- Austin, B., Austin, D.A. 2007. Bacterial Fish Pathogens. Diseases in Farmed and Wild Fish. 4th ed. Springer Praxis Publishing Ltd. Chinchester, U.K.
- Brown, L. 2000. Acuicultura para veterinarios, 1-33. 1ª edición. Editorial Acribia. Zaragoza.
- Bruno, D.W., Wood, B.P. 1999. Saprolegnia and other Oomycetes.
- CFSPH, 2007. The Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologist. Iowa. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/viral_hemorrhagic_septicemia-es.pdf [Acceso 26 agosto]
- Chiok, K.L. 2011. Patogenicidad y tipificación de *Flavobacterium psychrophilum* en Trucha Arcoíris. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (Sirivs). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, Perú. Disponible en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_kim_Flavobacterium_psychrophilum_Trucha_Arcoiris.pdf [Acceso 22 agosto]
- CIAD, 2003. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Manual de buenas prácticas de producción acuícola de trucha, para la inocuidad alimentaria. México. Disponible en: http://web.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/memorias/Extenso/QA/EO/QAO-14.pdf [Acceso 24 agosto]
- Decisión de Ejecución (UE) 2015/1554 de la Comisión, de 11 de septiembre de 2015, por la que se establecen disposiciones de aplicación de la Directiva 2006/88/CE en lo que respecta a los requisitos de vigilancia y los métodos de diagnóstico. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2015/247/L00001-00062.pdf> [Acceso 12 septiembre]
- Decisión de la Comisión 2003/839/CE de 21 de noviembre de 2003, por la que se modifica los anexos I y II de la Decisión 2002/308/CE por la que se establecen listas de zonas y piscifactorías autorizadas en relación con la septicemia hemorrágica viral (SHV) y la Necrosis Hematopoyética Infecciosa (NHI). L31: 9-39. Disponible en: http://www.mispecies.com/opencms/export/sites/mispecies/nav/legislacion/galeria-documentos-legislacion/dec-031215_904_zonas-autorizadas-SHV-NHI.pdf [Acceso 2 septiembre]
- De Kinkelin, P., Lorient, B. 2001. A water temperature regime which prevents the occurrence of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 24(8): 489-493.
- Del Cerro, A., Marquez, I., Guijarro, J.A. 2002. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. Applied Environmental Microbiology, 68(10): 5177-80.
- Directiva 88/2006/CE del Consejo, de 24 de octubre de 2006, relativa a los requisitos zoonosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2006/328/L00014-00056.pdf> [Acceso 9 septiembre]
- Duesund, H., Nylund, S., Watanabe, K., Ottem, K.F., and Nylund, A. 2010. Characterization of a VHS virus genotype III isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at a marine site on the west coast of Norway. Virology Journal, 7: 19.

- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C. 2000. Métodos de estudio y técnicas laboratoriales en parasitología de peces. Acribia, Zaragoza.
- El-Matbouli, M., Hoffmann, R.W. 2002. Influence of water quality on the outbreak of proliferative kidney disease—field studies and exposure experiments. *Journal of Fish Diseases*, 25(8): 459-467.
- FAO, 2014. Informe el estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2014. Informe SOFIA. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> [Acceso 18 agosto]
- FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y a la nutrición de todos. Roma. 224 pp. Disponible en: www.fao.org/3/a-i5555s.pdf [Acceso 21 Agosto]
- FEAP, 2016. Annual Report. Federation of European Aquaculture Producers. Disponible en: www.feap.info/DocDownload.asp?ID=B488944A4D07020D06E3 [Acceso 21 agosto]
- Feist, S.W., Peeler, E.J., Gardiner, R., Smith, E., Longshaw, M. 2002. Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *Journal of Fish Diseases*, 25(8): 451-458.
- Gibello, A., Blanco, M.M., Cutuli, M.T., Vela, A.I., Domínguez, L., y Fernández-Garayzábal, J.F. 2016. Especial Microbiología del Medio Acuático. *Lactococcus garvieae*, un patógeno de peces con posible implicación en Salud Pública. *Sem@foro* num, 61. Disponible en: https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/61/15_Lactococcus.pdf [Acceso 25 agosto]
- Ghittino, C., Múzquiz, J.L. 1998. La estreptococosis de la trucha arcoiris en España. Reunión de Piscicultores. Zaragoza. *Revista Aquatic*, 2. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?c=21> [Acceso 25 agosto]
- Ghittino, C., Prearo, M., Bozzetta, E., Eldar, A. 1998. Recenti acquisizioni sulle Stretococcosi d'acqua calda nella trota irídea. *Bolletino Società Italiana di Patologia Ittica*, 23: 43-50.
- Good, C.M., Thorburn, M.A., Stevenson, R.M. 2001. Host factors associated with the detection of *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri* in Ontario, Canada government fish hatcheries. *Preventive Veterinary Medicine*, 49(3): 165-173.
- Grabner, D.S., El-Matbouli, M. 2009. Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD). *Veterinary Parasitology*, 165(3-4): 200-6.
- Heikkinen, J., Tirola, M., Mustonen, S.M., Eskelinen, P., Navia-Paldanius, D., Wright, A. 2014. Suppression of Saprolegnia infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs using protective bacteria and ultraviolet irradiation of the hatchery water. *Aquaculture Research*, 1-15.
- Hoffman, G.L. 1998. Parasites of North American freshwater fishes. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- Jarp, J., Tangen, K., Willumsen, F.V., Djupvik, H.O., Tveit, A.M. 1993. Risk factors for the infection with *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Norwegian freshwater hatcheries. *Diseases of Aquatic Organism*, 17: 81-86.
- Khodabandeh, S., Abtahi, B. 2006. Effects of sodium chloride, formalin and iodine on the hatching success of common carp, *Cyprinus carpio*, eggs. *Applied Ichthyology*, 22: 54–56.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-8.
- Loch, T.P., Faisal, M. 2015. Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(3): 283-300.
- Lönström, L.G., Hoffrén, M.L., Wiklund, T. 2008. *Flavobacterium psychrophilum* associated with mortality of farmed perch, *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Diseases*, 31(10): 793-797.
- Lorenzen, E., Carstensen, B., Olesen, N.J. 1999. Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37(2): 81-88.

- Madetoja, J., Nyman, P., Wiklund, T. 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43(1): 27-38.
- MAGRAMA, 2015. Plan Estratégico de la Acuicultura Española 2014-2020. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/plan_estrategico_6_julio_tcm7-389036.pdf [Acceso 23 agosto]
- MAGRAMA, 2016. Producción de acuicultura. Producción de criadero año 2015. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/produccion-de-acuicultura/> [Acceso 17 agosto]
- Marquez, I. 2009. Evolución histórica de las principales patologías asociadas a la salmicultura en el Principado de Asturias. Tesis Doctoral. Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. 72-73 pp
- Mo, T.A., Jørgensen, A. 2016. A survey of the distribution of the PKD-parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Cnidaria: Myxozoa: Malacosporea) in salmonids in Norwegian rivers - additional information gleaned from formerly collected fish. *Journal of Fish Diseases*.
- Morris, D.J., Ferguson, H.W., Adams, A. 2005. Severe, chronic proliferative kidney disease (PKD) induced in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* held at a constant 18 degrees C. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(3): 221-6.
- Morris, D.J., Adams, A., Smith, P., Richards, R.H. 2003. Effects of oral treatment with TNP-470 on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected with *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Malacosporea), the causative agent of proliferative kidney disease. *Aquaculture*, 221(1): 51-64.
- Nordmo, R., Ramstad, A., Riseth, J.H. 1998. Induction of experimental furunculosis in heterogenous test populations of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by use of a cohabitation method. *Aquaculture*, 162(1): 11-21.
- OIE, 2012a. Manual Acuático de la OIE, 2012. Capítulo 2.3.9 Septicemia Hemorrágica Viral. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.3.09_VHS.pdf [Acceso 26 agosto]
- OIE, 2012b. Manual Acuático de la OIE, 2012. Capítulo 2.3.4 Necrosis Hematopoyética Infecciosa. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.3.04_IHN.pdf [Acceso 26 agosto]
- OIE, 2015. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 2015. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-acuatico/acceso-en-linea/> [Acceso 2 septiembre]
- OIE, 2016. Organización Internacional de Epizootias. Disponible en: www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/ [Acceso 23 agosto]
- Pereira, F., Ravelo, C., Toranzo, A.E., Romalde, J.L. 2004. *Lactococcus garvieae*, an emerging pathogen for the Portuguese trout culture. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 24: 274-9.
- Pérez, S.I., Rodríguez, S. 1997. Major viral diseases affecting fish aquaculture in Spain. *Microbiología SEM*, 13: 149-160
- RD 1614/2008. Real Decreto 1614/2008, de 3 de octubre, relativo a los requisitos zosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, así como a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos. <https://www.boe.es/boe/dias/2008/10/07/pdfs/A40185-40206.pdf> [Acceso 2 septiembre]
- Real Decreto 927/1988, de 29 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de la Administración Pública del Agua y de la Planificación Hidrológica, en desarrollo de los títulos II y III de la Ley de Aguas. Anexo IV. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/1988/08/31/pdfs/A26412-26425.pdf> [Acceso 8 septiembre]
- Roberts, R.J. 2001. *Fish Pathology*. WB Saunders. Harcourt Publishers Ltd. London.

- Romalde, J.L. 2004. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. En: Seminario Internacional Enfermedades Emergentes en la Acuicultura. Chile: Puerto Varas.
- Ruiz-Zarzuela, I., Clavero, J.L, Orós, J., Claver, R., Múzquiz, J.L. 2002. Cuadernos de caza y pesca de Aragón. Seguimiento sanitario de los centros de piscicultura y los ríos en la Comunidad Autónoma de Aragón.
- Schlotfeldt, H.J., Alderman, D.J. 1995. What Should I Do? A Practical Guide for the Fresh Water Fish Farmer. European Association of Fish Pathologists, 15: 1-60.
- Schönherz, A.A., Lorenzen, N., and Einer-Jensen, K. 2013. Inter-species transmission of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from turbot (*Scophthalmus maximus*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of General Virology, 94: 869–875.
- Smail, D.A. y Snow, M. 2011. Chapter 3: Viral Haerrogic Septicaemia, p. 110-143. En: Woo, P.T.K., Leatherland, J.F., Bruno, D.W. Fish Diseases and Disorders, Volumen 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd edition. Aberdeen, Scotland, UK.
- Thoen, E., Evensen, Ø., Skaar, I. 2011. Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. Journal of Fish Diseases, 34(8): 601-608.
- Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, C., Dietzgen, R.G., Fang, R.X., Jackson, A.O., Kurath, G., Nadin-Davis, S.A., Tesh, R.B., Walker, P.J. 2005. Family rhabdoviridae. Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 623-644. Amsterdam, Netherlands.
- Treves-Brown, K.M. 2000. Applied Fish Pharmacology. Springer, London.
- Valdebenito, S., Avendaño-Herrera, R. 2009. Phenotypic, serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from salmonids in Chile. Journal of Fish Diseases. 32(4): 321-33.
- Wang, C., Lian, G.H., Zhao, L.L., Wu, Y., Li, Y.I., Tang, L.J., Qiao, X.Y., Jiang, Y.P., Liu, M. 2016. Virulence and serological studies of recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout. Virus Research, 220: 193-202.
- Whitman, K.A. 2004. Finfish and Shellfish Bacteriology Manual: Techniques and Procedures. Wiley Blackwell.
- Wiklund, T. 1995. Survival of “atypical” *Aeromonas salmonicida* in water and sediment microcosms of different salinities and temperatures. Diseases of Aquatic Organisms, 21: 137-143.
- Winton, J.R. 1991. Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. Annual Review of Fish Diseases, 1: 83–93.