



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

Cryptosporidium y otros parásitos gastrointestinales en truchas

Seila Couso Pérez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL EN CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA
MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2019



DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

***Cryptosporidium* y otros parásitos gastrointestinales en truchas**

Dña. Seila Couso Pérez

Presenta su Tesis Doctoral, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declara que:

- 1) La Tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
De ser el caso, en la Tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 2) La Tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 3) Confirmando que la Tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, a 20 de junio de 2019

Fdo. Seila Couso Pérez



AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

***Cryptosporidium* y otros parásitos gastrointestinales en truchas**

D. Hipólito Gómez Couso (Director y Tutor)

Dña. Elvira Ares Mazás (Directora)

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. Seila Couso Pérez, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, a 20 de junio de 2019

Fdo. Hipólito Gómez Couso

Fdo. Elvira Ares Mazás



CONFLICTO DE INTERÉS

***Cryptosporidium* y otros parásitos gastrointestinales en truchas**

Dña. Seila Couso Pérez

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con su Tesis Doctoral.



En Santiago de Compostela, a 20 de junio de 2019

Fdo. Seila Couso Pérez





A María y Dino



“No se atrapa una trucha con pantalones secos”

Miguel de Cervantes (1547-1616)

*“De un junco desprendido a una corriente un gusano cayó,
y una trucha, saltando de repente, voraz se lo tragó.
Un martín-pescador cogió a la trucha con carnívoro afán;
y al pájaro después, tras fiera lucha, lo apresó un gavilán...”*

El gran festín, Ramón de Campoamor (1817-1901)





AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este tiempo hubo muchas personas que, de una manera u otra, me ayudaron a realizar y concluir esta etapa, y a los que les estoy y estaré siempre muy agradecida.

En primer lugar, debo dar las gracias a Elvira Ares Mazás y a Hipólito Gómez Couso, oficialmente mis Directores, quienes me dieron la oportunidad de iniciar este proyecto, pero extraoficialmente, dos personas que me transmitieron sus conocimientos, su experiencia y me enriquecieron tanto profesional como personalmente. ¡Gracias Elvira e Hipólito!

Otras dos personas sin las que sería muy difícil que yo llegase a donde me propuse son María del Carmen Pérez Castro y Secundino Couso Rodríguez, mis padres, que nunca me ponen límites y siempre me motivan y apoyan incondicionalmente. ¡Gracias mamá y papá!

Realizar esta Tesis no hubiera sido posible sin la colaboración voluntaria y desinteresada de las asociaciones de pesca y pescadores particulares que nos facilitaron una gran cantidad de muestras de trucha común. Muchas gracias a la Xavier Pazo Blanco, presidente de la *Asociación de Troiteiros do Río Furelos*, a José Ángel Casal Fernández del *Club de Pesca Tambre-Barrié*, a Fernando Prieto Romero del *Club de Pesca Parga*, a Hipólito Prego Martínez, a José Manuel Prego Castro, a María Luísa López Pérez, a Manuel Ogando Piñón, a Jesús Vilar Becerra, a Carlos Gesto García y a Eloi Saavedra, entre otros.

De igual forma, agradecer a Javier de la Calle, propietario de una piscifactoría de trucha arcoíris, por proporcionarnos los ejemplares de peces y permitirnos recoger las muestras hídricas.

También quiero agradecerle a la Red de Observación Ambiental de Galicia, Laboratorio de Medio Ambiente de Galicia (ROAGA-LMAG, Xunta

de Galicia) la información que nos aportaron sobre los macroinvertebrados bentónicos de varios ríos.

Agradezco a Emilio del Cacho, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, el facilitarme un aislado de *Eimeria tenella*.

No quisiera olvidarme de las personas con las que compartí mi día a día durante esta etapa. A los distintos compañeros de laboratorio que pasaron por aquí o que todavía están. Especialmente a Rainer Campo Ramos y a Antonio Cañizo Outeiriño, mis *chicuelos*, quienes me procesaron gran parte de las muestras, me acompañaron en muchos muestreos y con los que me reía constantemente. También a María Jesús Abeledo Lameiro, es decir, a Chus, realmente mi compañera del día a día, incluso antes de empezar la Tesis, compartiendo muchos momentos y ayudándonos y apoyándonos la una a la otra.

También a Anabel Vidal Varela, la técnico de laboratorio y, al final, una más de los nuestros, por su colaboración y también por su cariño y a todos los profesores del Departamento.

Este último año conocí a Ana González Abril, una compañera de Departamento de la que también recibí su apoyo y buenos momentos.

Finalmente, y no por ellos menos importantes, quiero darle las gracias a Andrea y a Gonzalo, amigos incondicionales y dos personas extraordinarias por sus consejos, su apoyo y su cariño. ¡Gracias *chatungos*!



Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, Dña. Seila Couso Pérez fue beneficiaria de una beca para el inicio o continuación de los estudios universitarios conducentes al título universitario de Doctor concedida por la Fundación del Excmo. Sr. D. Manuel Ventura Figueroa (Convocatoria 2016).

Esta Tesis fue financiada por la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria a través del programa de Ayudas para la Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas del Sistema Universitario de Galicia (GPC-2014-069 y ED431C 2017/31).



Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han publicado o se encuentran en proceso de publicación en los siguientes artículos:

Couso-Pérez, S., Cañizo-Outeiriño, A., Campo-Ramos, R., Ares-Mazás, E. y Gómez-Couso, H. (2018). Remarkable differences in the presence of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* in brown trout (*Salmo trutta*) captured in two adjacent river basins in Galicia (NW Spain). *Parasitology Open* **4**, e5. doi.org/10.1017/pao.2017.24.

Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E. y Gómez-Couso, H. (2018). Identification of a novel piscine *Cryptosporidium* genotype and *Cryptosporidium parvum* in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasitology Research* **117**, 2987-2996. doi: 10.1007/s00436-018-5995-3.

Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E. y Gómez-Couso, H. (2019). First report of *Cryptosporidium molnari*-like genotype and *Cryptosporidium parvum* zoonotic subtypes (IIaA15G2R1 and IIaA18G3R1) in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Parasitology* **105**, 170-179. doi: 10.1645/18-83.

Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E. y Gómez-Couso, H. (2019). First molecular data on *Eimeria truttae* from brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitology Research* (en prensa) doi: 10.1007/s00436-019-06320-y

Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E. y Gómez-Couso, H. Gastrointestinal helminth parasites of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) captured in Galician rivers (NW Spain) (en realización).

Couso-Pérez, S., Ares-Mazás, E. y Gómez-Couso, H. Identification of Myxosporidia species in gastrointestinal tracts of brown trout (*Salmo trutta*). (en realización).



ÍNDICE

RESUMEN	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1 CRYPTOSPORIDIUM	3
1.1 Historia	4
1.2 Taxonomía	7
1.3 Biología de <i>Cryptosporidium</i> en peces	9
1.4 Cryptosporidiosis en peces	12
1.4.1 Prevalencia de <i>Cryptosporidium</i>	12
1.4.1.1 Peces salvajes	12
1.4.1.2 Peces de cultivo	14
1.4.1.3 Peces ornamentales	15
1.4.2 Patología y manifestaciones clínicas	16
1.4.3 <i>Cryptosporidium</i> en el medio acuático	18
2 LA TRUCHA	23
2.1 La trucha común (<i>Salmo trutta</i> Linnaeus, 1758)	24
2.1.1 Descripción	24
2.1.2 Distribución	25
2.1.3 Sistemática	26
2.1.4 Hábitat	27
2.1.5 Alimentación	28
2.1.6 Reproducción y desarrollo	29
2.1.7 Estatus y medidas de conservación	30
2.1.8 Interés económico y ecológico	32
2.2 La trucha arcoíris (<i>Onchorhynchus mykiss</i> Walbaum, 1792)	33
2.2.1 Descripción	33
2.2.2 Distribución	33
2.2.3 Hábitat, alimentación y reproducción	34
2.2.4 Producción en acuicultura	35
2.3 Parásitos de la trucha	39
OBJETIVO	41

MATERIAL Y MÉTODOS	45
1 ESTUDIO EN LA TRUCHA COMÚN (<i>S. TRUTTA</i>)	47
1.1 Origen y procesamiento de las muestras	47
1.2 Análisis microscópico	51
1.2.1 Microscopía óptica	51
1.2.2 Microscopía de epifluorescencia	51
1.3 Caracterización molecular	53
1.3.1 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)	53
1.3.2 Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
1.3.3 Visualización del resultado	55
1.3.4 Purificación de los productos de PCR	58
1.3.5 Secuenciación del ADN y análisis filogenético	58
1.4 Análisis de formas macroscópicas de helmintos	59
1.4.1 Identificación	59
1.4.2 Estudio de la comunidad helmíntica	60
2 ESTUDIO EN LA TRUCHA ARCOÍRIS (<i>O. MYKISS</i>)	61
2.1 Recogida y procesamiento de las muestras	61
2.1.1 Peces	61
2.1.2 Muestras hídricas	62
2.2 Detección y caracterización molecular de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i>	64
3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
RESULTADOS	67
1 RESULTADOS DEL ESTUDIO EN LA TRUCHA COMÚN	
(<i>S. TRUTTA</i>)	69
1.1 <i>Cryptosporidium</i>	69
1.1.1 Detección de ooquistes mediante microscopía de epifluorescencia	69
1.1.2 Caracterización molecular	72
1.2 <i>Giardia</i>	79
1.3 <i>Eimeria</i>	80
1.3.1 Detección de ooquistes mediante microscopía óptica	80
1.3.2 Caracterización molecular	81
1.4 Mixosporidios	85
1.5 Helmintos	87
1.4.1 Especies gastrointestinales de helmintos	87
1.4.2 Estudio de la comunidad helmíntica	98

2 RESULTADOS DEL ESTUDIO EN LA TRUCHA ARCOÍRIS	
(<i>O. MYKISS</i>)	101
2.1 <i>Cryptosporidium</i> en muestras de peces	101
2.1.1 Detección de ooquistes mediante microscopía de epifluorescencia.....	101
2.1.2 Caracterización molecular	104
2.2 Detección de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en muestras hídricas	109
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	143
REFERENCIAS	149
APÉNDICE	181





ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APROMAR	Asociación Empresarial de la Acuicultura en España
ARN	Ácido ribonucleico
CE	Comisión Europea
CP	Ciegos pilóricos
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	Contraste diferencial de interferencia
DMA	Directiva Marco del Agua
DS	Desviación estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
<i>gp60</i>	Gen que codifica la glicoproteína de 60 kDa
HCl	Ácido clorhídrico
<i>hsp70</i>	Gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa
IFD	Inmunofluorescencia directa
IMS	Inmunoseparación magnética
INT	Intestino
n	Número de muestras
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

- SSF** Solución salina fisiológica
- SSU-rRNA** Gen que codifica el ARN de la subunidad ribosomal pequeña
- TAE** Tampón tris/ácido acético/EDTA
- UE** Unión Europea
- USEPA** Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
- UV** Ultravioleta
- χ^2 Test chi-cuadrado



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies y genotipos de <i>Cryptosporidium</i> reconocidos en peces.	7
Tabla 2. Especies de <i>Cryptosporidium</i> identificadas en peces ornamentales.	16
Tabla 3. Genotipos de <i>Cryptosporidium</i> identificados en peces ornamentales.	17
Tabla 4. Relación de especies parásitas más frecuentes en truchas, localización anatómica en el hospedador e importancia en acuicultura.	40
Tabla 5. Superficie de las cuencas hidrográficas, número de ríos muestreados y de ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) analizados en cada una de ellas.	47
Tabla 6. Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de fragmentos de los distintos genes considerados para la caracterización molecular de las especies/genotipos de <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> y <i>Eimeria</i>	56
Tabla 7. Condiciones de trabajo empleadas en la amplificación mediante la técnica de PCR de fragmentos de los distintos genes considerados para la caracterización molecular de las especies/genotipos de <i>Cryptosporidium</i> , <i>Giardia</i> y <i>Eimeria</i>	57
Tabla 8. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de los ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. en ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) capturados en ríos gallegos y agrupados de acuerdo con su longitud y edad estimada.	70
Tabla 9. Presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp. en ríos gallegos de 10 cuencas hidrográficas inferida a partir del análisis de ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>).	72
Tabla 10. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de los ooquistes de <i>Eimeria</i> sp. en ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) capturados en ríos gallegos de acuerdo con el grupo de edad establecido.	82
Tabla 11. Comparación de los datos morfométricos (μm) de los ooquistes de <i>Eimeria</i> detectados en trucha común (<i>S. trutta</i>) capturada en varios ríos de Galicia con los publicados previamente para <i>E. truttae</i>	83
Tabla 12. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de las esporas de mixosporidios detectadas en ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) capturados en ríos de Galicia de acuerdo con el grupo de edad establecido.	86
Tabla 13. Prevalencias, intensidades medias (rango) y abundancias medias (\pm DS) de formas adultas de helmintos detectadas en muestras gastrointestinales de trucha	

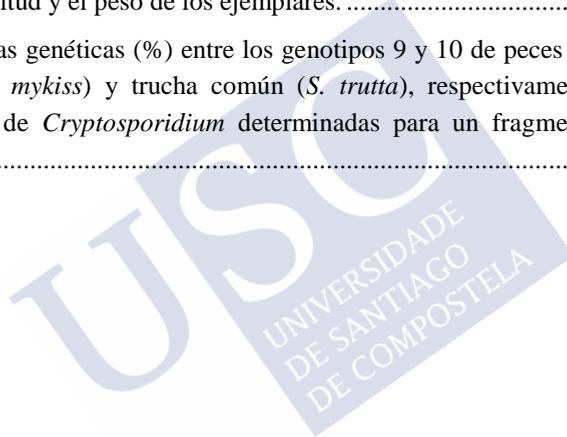
común (*S. trutta*) procedentes de ríos de Galicia de acuerdo con el grupo de edad establecido. 88

Tabla 14. Presencia de formas de diseminación de helmintos (huevos) en muestras del tracto gastrointestinal de ejemplares de trucha común (*S. trutta*) procedentes de ríos de Galicia de acuerdo con el grupo de edad establecido. 90

Tabla 15. Comunidad de helmintos gastrointestinales de tres poblaciones de trucha común (*S. trutta*) capturadas en ríos pertenecientes a las cuencas hidrográficas del Tambre, Ulla y Miño-Sil. 100

Tabla 16. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectados en trucha arcoíris (*O. mykiss*) de acuerdo con la longitud y el peso de los ejemplares. 102

Tabla 17. Distancias genéticas (%) entre los genotipos 9 y 10 de peces descritos en trucha arcoíris (*O. mykiss*) y trucha común (*S. trutta*), respectivamente, y otras especies/genotipos de *Cryptosporidium* determinadas para un fragmento del gen *SSU-rRNA*. 123



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de secciones histológicas del estómago de <i>Oreochromis aureus</i> × <i>Oreochromis niloticus</i> infectado con <i>Cryptosporidium</i> sp.	11
Figura 2. Sección histológica del estómago de un pez guppy (<i>P. reticulata</i>) teñido con hematoxilina-eosina mostrando numerosos ooquistes de <i>C. huwi</i> a lo largo de la línea epitelial, así como grupos de ooquistes localizados profundamente dentro del tejido.	11
Figura 3. Representación del ciclo biológico de <i>Cryptosporidium</i> en peces.	13
Figura 4. Ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).	24
Figura 5. Distribución de la trucha común (<i>S. trutta</i>) en España.	26
Figura 6. Ciclo biológico de la trucha común (<i>S. trutta</i>).	31
Figura 7. Ejemplar de trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>).	33
Figura 8. Distribución natural e introducciones internacionales de la trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>).	34
Figura 9. Ciclo de producción de la trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>).	38
Figura 10. Localización geográfica de las cuencas hidrográficas de las que procedieron los ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) en los que se investigó la presencia de <i>Cryptosporidium</i> spp.	48
Figura 11. Ilustración de las secciones anatómicas del tracto gastrointestinal de la trucha común (<i>S. trutta</i>) examinadas.	51
Figura 12. Fotografías de las instalaciones de la piscifactoría de trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>) visitada mensualmente durante un año hidrológico.	62
Figura 13. Microfotografías de un grupo de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> sp. observado en los ciegos pilóricos de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).	71
Figura 14. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (<i>SSU-rRNA</i>), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de <i>Cryptosporidium</i> obtenidos de trucha común (<i>S. trutta</i>) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.	74

- Figura 15.** Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies/genotipos del género reconocidos en peces, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura. 75
- Figura 16.** Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura. 76
- Figura 17.** Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura. 77
- Figura 18.** Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la actina, mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies/genotipos del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura..... 78
- Figura 19.** Microfotografía de un quiste de *Giardia* sp. detectado mediante microscopía de epifluorescencia en la muestra de ciegos pilóricos de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*). 79
- Figura 20.** Microfotografías de ooquistes de *E. truttae* observados en una muestra de ciegos pilóricos de trucha común (*S. trutta*) bajo contraste diferencial de interferencia. (A) Ooquiste esporulado; (B) Esporocisto con dos esporozoítos en su interior. 82
- Figura 21.** Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento de ~1300 pb del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Eimeria* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura. 84

Figura 22. Microfotografías de esporas de mixosporidios de los géneros <i>Myxobolus</i> (A y B) y <i>Henneguya</i> (C y D) detectadas en muestras del tracto gastrointestinal de ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) bajo contraste diferencial de interferencia.....	86
Figura 23. Microfotografías de <i>C. metoecus</i> procedente de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).....	91
Figura 24. Microfotografías de <i>C. farionis</i> procedente de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).....	92
Figura 25. Microfotografías de <i>S. ephemeridarum</i> procedente de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).....	93
Figura 26. Microfotografías de <i>R. acus</i> procedente de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).....	94
Figura 27. Microfotografías de <i>P. coregoni</i> procedente de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).....	95
Figura 28. Microfotografías de <i>E. truttae</i> procedente de un ejemplar de trucha común (<i>S. trutta</i>).....	96
Figura 29. Prevalencias de helmintos gastrointestinales detectados en ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) procedentes de las cuencas hidrográficas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil.....	98
Figura 30. Porcentaje de muestras gastrointestinales positivas correspondientes a cada infracomunidad de helmintos detectada en ejemplares de trucha común (<i>S. trutta</i>) capturados en ríos de Galicia de acuerdo con la edad estimada de los peces.	100
Figura 31. Microfotografía de un grupo de ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> sp. detectado en los ciegos pilóricos de un ejemplar de trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>) mediante la técnica de inmunofluorescencia directa.	103
Figura 32. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (<i>SSU-rRNA</i>), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de <i>Cryptosporidium</i> obtenidos de trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.....	106
Figura 33. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal	

pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y otras especies/genotipos del género reconocidos en peces, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura. 107

Figura 34. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura. 108

Figura 35. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en ejemplares de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y en muestras hídricas del influente y efluente de una piscifactoría analizados mensualmente a lo largo de un año hidrológico..... 110

Todas las figuras de la presente Tesis Doctoral son originales de la autora o del Grupo de Investigación (GI-2109), excepto aquellas en las que se incluye la correspondiente licencia.

RESUMEN

Los ríos son fuente de una gran biodiversidad constituida por distintas y particulares comunidades de organismos. A su vez, los peces albergan una amplia variedad de especies parásitas adquiridas directamente o a través de la cadena alimentaria. *Cryptosporidium* es un género de protozoos parásitos que infectan el tracto gastrointestinal de todas las clases de vertebrados, incluyendo al hombre, animales domésticos y salvajes. A pesar de su conocida dispersión en ambientes acuáticos, son muy escasos los estudios realizados en peces, tanto salvajes como de cultivo. El objetivo de la presente Tesis Doctoral es investigar la presencia e identificar las especies/genotipos de *Cryptosporidium* en la trucha común (*Salmo trutta*) y en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), contribuyendo al conocimiento de este apicomplejo en organismos de agua dulce. Para ello, se dispuso de los tractos gastrointestinales de 613 ejemplares de trucha común capturados por pescadores en 44 ríos gallegos pertenecientes a 10 cuencas hidrográficas. De igual forma, se recogieron 360 ejemplares de trucha arcoíris en una piscifactoría próxima a Santiago de Compostela. La metodología aplicada incluyó la detección de las formas parasitarias por microscopía de epifluorescencia, previa concentración de las mismas a partir de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal, y estudios de biología molecular consistentes en la amplificación y secuenciación de fragmentos de los genes *SSU-rRNA*, *hsp70*, *gp60* y actina.

Se determinaron prevalencias del 16,8% y del 9,2% en la trucha común y en la trucha arcoíris, respectivamente. La caracterización molecular permitió identificar los subtipos IIaA15G2R1 y IIaA18G3R1 de *Cryptosporidium parvum*, comúnmente detectados en la población humana y en los rumiantes domésticos, confirmando que la contaminación de los cursos fluviales por este enteroparásito es consecuencia de las actividades antropogénicas. El hallazgo de esta especie zoonótica en ejemplares de trucha puede repercutir en salud pública, al representar un riesgo de infección para los pescadores y los manipuladores de alimentos. Además, se observaron grupos de ooquistes en los ciegos pilóricos de ambas especies de trucha, identificados como pertenecientes a *C. parvum* que, junto con la elevada carga parasitaria detectada en esta sección anatómica, sugiere que la infección natural por la citada especie de *Cryptosporidium*, propia de mamíferos, es posible en estos salmónidos. De igual forma, se obtuvieron secuencias próximas a *Cryptosporidium molnari*,

estableciéndose dos nuevos genotipos de *Cryptosporidium* que parasitan a peces: el genotipo 9 en la trucha arcoíris (*O. mykiss*) y el genotipo 10 en la trucha común (*S. trutta*).

Paralelamente, se estudió la presencia de otros parásitos gastrointestinales en la trucha común. Así, se observaron ooquistes de *Eimeria* en el 30,8% de las muestras, que fueron morfológicamente identificados como pertenecientes a la especie *Eimeria truttae*, y cuya caracterización molecular se realizó por primera vez en el presente estudio, un siglo después de su descripción. También, se visualizaron esporas de mixosporidios en el 7,5% de las muestras (géneros *Myxobolus* y *Henneguya*), comprobando la amplia dispersión de este grupo de parásitos en los ríos gallegos. Finalmente, se identificaron seis especies de helmintos: dos trematodos (*Crepidostomum metoecus* y *Crepidostomum farionis*); tres nematodos (*Salmonema ephemeridarum*, *Raphidascaris acus* y *Pseudocapillaria salvelini*); y, un acantocéfalo (*Echinorhynchus truttae*). Los resultados obtenidos demuestran prevalencias e intensidades de infección muy variables, así como una comunidad helmíntica caracterizada por una baja riqueza y diversidad de especies. La infracomunidad estuvo constituida por un máximo de 4 helmintos, siendo la asociación constituida por *Crepidostomum* y *Salmonema* la más frecuente. Teniendo en cuenta que la mayoría de los helmintos detectados son especies con ciclos biológicos dependientes de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos, considerada uno de los mejores bioindicadores del estado ecológico de los cuerpos de agua, la diversidad de los helmintos presentes en este salmónido puede aportar información complementaria sobre la calidad del agua de los ríos.

Palabras clave: *Salmo trutta*; *Oncorhynchus mykiss*; *Cryptosporidium*; *Eimeria*; Myxozoa; Helmintos gastrointestinales; Galicia.

RESUMO

Os ríos son fonte dunha gran biodiversidade constituída por distintas e particulares comunidades de organismos. Á súa vez, os peixes albergan unha ampla variedade de especies parasitas adquiridas directamente ou a través da cadea alimentaria. *Cryptosporidium* é un xénero de protozoos parasitos que infectan o tracto gastrointestinal de tódalas clases de vertebrados, incluíndo ao home, animais domésticos e salvaxes. A pesar da súa coñecida dispersión en ambientes acuáticos, son moi escasos os estudos realizados en peixes, tanto salvaxes como de cultivo. O obxectivo da presente Tese de Doutoramento é investigar a presenza e identificar as especies/xenotipos de *Cryptosporidium* na troita común (*Salmo trutta*) e na troita arco da vella (*Oncorhynchus mykiss*), contribuíndo ao coñecemento deste apicomplexo en organismos de auga doce. Para este fin, dispúxose dos tractos gastrointestinais de 613 exemplares de troita común capturados por pescadores en 44 ríos galegos pertencentes a 10 concas hidrográficas. De igual forma, recolléronse 360 exemplares de troita arco da vella nunha piscifactoría próxima a Santiago de Compostela. A metodoloxía aplicada incluíu a detección das formas parasitarias por microscopía de epifluorescencia, previa concentración das mesmas a partir dos cegos pilóricos e do contido intestinal, e estudos de bioloxía molecular consistentes na amplificación e secuenciación de fragmentos dos xenes *SSU-rRNA*, *hsp70*, *gp60* e *actina*.

Determináronse prevalenzas do 16,8% e do 9,2% na troita común e na troita arco da vella, respectivamente. A caracterización molecular permitiu identificar os subtipos IIaA15G2R1 e IIaA18G3R1 de *Cryptosporidium parvum*, comunmente detectados na poboación humana e nos ruminantes domésticos, confirmando que a contaminación dos cursos fluviais por este enteroparasito é consecuencia das actividades antropoxénicas. A detección desta especie zoonósica en exemplares de troita pode repercutir na saúde pública, ao representar un risco de infección para os pescadores e os manipuladores de alimentos. Ademáis, observáronse grupos de ooquistes nos cegos pilóricos de ámbalas dúas especies de troita, identificados como pertencentes a *C. parvum* que, xunto coa elevada carga parasitaria detectada nesta sección anatómica, suxire que a infección natural pola citada especie de *Cryptosporidium*, propia de mamíferos, é posible nestes salmónidos. Do mesmo xeito, obtivéronse secuencias próximas a *Cryptosporidium molnari*, establecéndose dous

novos xenotipos de *Cryptosporidium* que parasitan a peixes: o xenotipo 9 na troita arco da vella (*O. mykiss*) e o xenotipo 10 na troita común (*S. trutta*).

Paralelamente, estudouse a presenza doutros parasitos gastrointestinais na troita común. Así, observáronse ooquistes de *Eimeria* no 30,8% das mostras, que foron morfolóxicamente identificados como pertencentes á especie *Eimeria truttae*, e cuxa caracterización molecular realizouse por primeira vez no presente estudo, un século despois da súa descrición. Tamén, visualizáronse esporas de mixosporidios no 7,5% das mostras (xéneros *Myxobolus* e *Henneguya*), comprobando a ampla dispersión deste grupo de parasitos nos ríos galegos. Finalmente, identificáronse seis especies de helmintos: dous trematodos (*Crepidostomum metoecus* e *Crepidostomum farionis*); tres nematodos (*Salmonema ephemeridarum*, *Raphidascaris acus* e *Pseudocapillaria salvelini*); e, un acantocéfalo (*Echinorhynchus truttae*). Os resultados obtidos demostran prevalenzas e intensidades de infección moi variables, así como unha comunidade helmíntica caracterizada por unha baixa riqueza e diversidade de especies. A infracomunidade estivo constituída por un máximo de 4 helmintos, sendo a asociación constituída por *Crepidostomum* e *Salmonema* a máis frecuente. Tendo en conta que a maioría dos helmintos detectados son especies con ciclos biolóxicos dependentes da comunidade de macroinvertebrados bentónicos, considerada un dos mellores bioindicadores do estado ecolóxico dos corpos de auga, a diversidade de helmintos presentes neste salmónido pode achegar información complementaria sobre a calidade da auga dos ríos.

Palabras chave: *Salmo trutta*; *Oncorhynchus mykiss*; *Cryptosporidium*; *Eimeria*; Myxozoa; Helmintos gastrointestinais; Galicia.

ABSTRACT

The rivers are source of a great biodiversity comprised of different and particular communities of organisms. In turn, fish can harbour a wide variety of parasitic species that can be acquired directly or through the food chain acquired. *Cryptosporidium* is a genus of protozoan parasites that infect the gastrointestinal tract of all vertebrate classes, including human, domestic and wild animals. Despite its well-known dispersion in aquatic environments, studies of *Cryptosporidium* in wild and cultured fish are scarce. The aim of this Ph.D. Thesis is to investigate the presence and identify the species/genotypes of *Cryptosporidium* in brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), contributing to the knowledge of this apicomplexan in freshwater organisms. For this purpose, the gastrointestinal tracts of 613 brown trout specimens captured by anglers in 44 Galician rivers belonging to 10 river basins were analysed. Similarly, 360 specimens of rainbow trout from a fish farm located close to Santiago de Compostela were collected. The applied methods included the detection of parasitic forms by epifluorescence microscopy, previous concentration of them from pyloric caeca and intestinal contents, and molecular studies based on amplification and sequencing of fragments of *SSU-rRNA*, *hsp70*, *gp60* and actin genes.

Prevalences of 16.8% and 9.2% were determined for brown trout and rainbow trout, respectively. The molecular characterization allowed to identify the subtypes IIAA15G2R1 and IIAA18G3R1 of *Cryptosporidium parvum*, frequently detected in human population and in domestic ruminants, confirming that the contamination of the river courses by this enteroparasite is consequence of the anthropogenic activities. The finding of this zoonotic species in trout specimens may have repercussions for public health, since it represents a risk of infection for fishermen and food handlers. In addition, groups of oocysts in the pyloric caeca of both trout species were observed, identified as belonging to *C. parvum* which, together with the high parasitic load detected in this anatomical section, suggests the natural infection by the mentioned species of *Cryptosporidium*, common of mammals, is possible in these salmonids. Likewise, sequences close to *Cryptosporidium molnari* were obtained and two new genotypes of *Cryptosporidium* parasitizing fish were established: genotype 9 in rainbow trout (*O. mykiss*) and genotype 10 in brown trout (*S. trutta*).

Simultaneously, the presence of other gastrointestinal parasites in brown trout was studied. Thus, *Eimeria* oocysts were observed in the 30.8% of the samples, which

were morphologically identified as belonging to the species *Eimeria truttae*, and, for the first time, it was molecularly characterized, a century later of its description. Also, myxosporidan spores were visualized in the 7.5% of the samples (belonging to genus *Myxobolus* and *Henneguya*), confirmed the wide dispersion of this group of parasites in the Galician rivers. Finally, six species of helminths were identified: two trematodes (*Crepidostomum metoecus* and *Crepidostomum farionis*); three nematodes (*Salmonema ephemeridarum*, *Raphidascaris acus* and *Pseudocapillaria salvelini*); and, one acanthocephalan (*Echinorhynchus truttae*). Prevalences and infection intensities obtained were variables, and the helminth community was characterized by a low richness and diversity of species. The infracommunity comprised a maximum of 4 helminths, being the most frequent association those constituted by *Crepidostomum* and *Salmonema*. Taken into account that the helminths detected are species with biological cycles that depend on the benthic invertebrate fauna, which is considered one of the best bioindicators of the ecological status of water bodies, the diversity of helminths present in this salmonid can provide complementary information on the rivers water quality.

Key words: *Salmo trutta*; *Oncorhynchus mykiss*; *Cryptosporidium*; *Eimeria*; Myxozoa; Gastrointestinal helminths; Galicia.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1 *CRYPTOSPORIDIUM*

El género *Cryptosporidium* está constituido por protozoos parásitos pertenecientes al filo Apicomplexa, el cual incluye organismos que poseen un complejo apical en algún estado de su ciclo biológico. *Cryptosporidium* infecta generalmente el epitelio del tracto gastrointestinal de todas las clases de vertebrados, incluyendo al hombre, animales domésticos y salvajes, en los que causa un proceso diarreico denominado cryptosporidiosis. La forma de resistencia e infectante, el ooquiste, es ubicuo en el ambiente y la infección, transmitida por la ruta fecal-oral, puede ser adquirida tanto por contacto directo entre personas y/o animales infectados como indirectamente a través de la ingestión de alimentos y aguas contaminados (Cacciò y Putignani, 2014).

Actualmente, se reconocen 41 especies de *Cryptosporidium* que infectan a peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Además, se han descrito más de 70 genotipos en diferentes hospedadores (Ryan *et al.*, 2014; Chalmers *et al.*, 2018; Holubová *et al.*, 2019).

Por otra parte, la demostrada presencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* en el medio hídrico, su alta resistencia a las condiciones ambientales y a los métodos convencionales para el tratamiento del agua, junto con la ausencia de una terapia totalmente eficaz, son factores que determinan la importancia de este protozoo parásito en sanidad humana y animal (Bhalchandra *et al.*, 2018; Hamilton *et al.*, 2018).

1.1 Historia

Han transcurrido más de 100 años desde que Clarke observó en el epitelio gástrico de ratones de laboratorio (*Mus musculus*) unos organismos que describió como “conglomerados de esporas” (Clarke, 1895). En 1907, Ernest Edward Tyzzer estableció el género *Cryptosporidium* para referirse a este protozoo parásito, describiendo la especie tipo *Cryptosporidium muris* y, posteriormente, la estructura de los ooquistes y su desarrollo endógeno en ratones experimentalmente infectados (Tyzzer, 1907, 1910). Una nueva especie, *Cryptosporidium parvum*, también observada en ratones, fue nombrada por Tyzzer, quien ilustró las formas de resistencia y reportó sus estados endógenos (Tyzzer, 1912). Este organismo permaneció como una curiosidad biológica hasta la descripción de *Cryptosporidium meleagridis* como responsable de patología intestinal y mortalidad en pavos (Slavin, 1955). Más tarde, en la década de 1970, se demostró la implicación de *C. parvum* en la etiología del síndrome diarreico neonatal en terneros (Panciera *et al.*, 1971), revelando la importancia que actualmente poseen ciertas especies de este género en sanidad animal. Por otra parte, la sucesión de una serie de hechos, (i) la descripción de los primeros casos de cryptosporidiosis humana reportados por Meisel *et al.* (1976) y Nime *et al.* (1976); (ii) la implicación de este protozoo parásito en procesos diarreicos graves y prolongados en pacientes diagnosticados con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Current *et al.*, 1983); y, (iii) la responsabilidad de *Cryptosporidium* en importantes brotes hídricos (Mac Kenzie *et al.*, 1994), confirmaron su relevancia en salud pública.

Por lo que respecta al estudio de *Cryptosporidium* en peces, los primeros trabajos publicados datan de 1981, cuando Hoover *et al.* nombran a *Cryptosporidium nasorum*, especie hallada en el intestino del pez marino tropical *Naso tang* (*Naso literatus*) (Hoover *et al.*, 1981). Tras la revisión taxonómica del género *Cryptosporidium*, cuyas especies se denominaron

inicialmente basándose en la presunta especificidad por el hospedador, Levine (1984) redujo la totalidad de las especies descritas a cuatro, sugiriendo que *C. natorum* debería ser una especie válida de acuerdo con la clase de hospedador. Sin embargo, ante la insuficiente descripción morfológica, genética y evolutiva, esta especie se considera actualmente *nomen nudum* (Xiao *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2004, 2014).

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* se observó en el estómago y/o intestino de diversas especies de peces: en la carpa (*Cyprinus carpio*) (Pavlásek, 1983); en peces cíclidos (*Oreochromis* spp.) (Landsberg y Paperna, 1986); en la trucha común (*Salmo trutta*) (Rush *et al.*, 1990); en el barramundi (*Lates calcarifer*) (Glazebrook y Campbell, 1987); y, en la corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) (Camus y López, 1996). Paralelamente, los resultados de estudios ultraestructurales condujeron a Paperna y Vilenkin (1996) a designar las especies *Piscicryptosporidium reinchenbachklinkei* y *Piscicryptosporidium cichlidis* para los correspondientes organismos hallados en el estómago del gurami (*Trichogaster leeri*) y en peces cíclidos (*Oreochromis* spp.), respectivamente, proponiendo un nuevo género, *Piscicryptosporidium*, para las especies de este protozoo que infectan a peces. Sin embargo, en la literatura científica no existen estudios biológicos y genéticos que avalen la validez de dicha propuesta.

Ya en el presente siglo, Álvarez-Pellitero y Sitjá-Bobadilla (2002) identifican una nueva especie, *Cryptosporidium molnari*, en el estómago de peces marinos de cultivo, concretamente en la dorada (*Sparus aurata*) y en la lubina (*Dicentrarchus labrax*). En el año 2004, Álvarez-Pellitero *et al.* describen la especie *Cryptosporidium scophthalmi* al detectar estados de desarrollo de este protozoo en el intestino de rodaballos (*Psetta maxima* syn. *Scophthalmus maximus*) (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004). Simultáneamente, Ryan *et al.* (2004) reportan los resultados de estudios histológicos, genéticos y filogenéticos de un aislado gástrico similar a *C. molnari* procedente del pez

ornamental guppy (*Poecilia reticulata*), denominándolo genotipo 1 de peces ante la ausencia de datos moleculares correspondientes a *C. molnari*. Más tarde, Palenzuela *et al.* (2010) caracterizan molecularmente los aislados de *C. molnari* y, en consecuencia, Ryan *et al.* (2015) basándose en las diferencias genéticas y biológicas observadas con respecto a otras especies gástricas e intestinales de *Cryptosporidium* en estos hospedadores, elevaron al rango de especie el genotipo 1 de peces, denominándolo *Cryptosporidium huwi*. A pesar de que Costa y Saraiva (2015a; b) identifican secuencias similares a *C. scophthalmi* en el rodaballo, la información genética correspondiente a *C. scophthalmi* no está todavía disponible. En consecuencia, ante la alta heterogeneidad genética y similitud morfológica observadas entre las especies de *Cryptosporidium*, no se considera en la actualidad una especie válida (Ryan *et al.*, 2014, 2015). Además, mediante la aplicación de técnicas moleculares, se identificaron un total de 7 nuevos genotipos de *Cryptosporidium* de peces (genotipos 2-8) (Tabla 1).

Por otra parte, diversos autores identificaron en peces varias especies/genotipos de *Cryptosporidium* propias de otros hospedadores. Así, se identificó *C. parvum*, *Cryptosporidium xiaoi* (hospedador principal: ovinos; Fayer y Santín, 2009), *Cryptosporidium bovis* (hospedador principal: terneros; Fayer *et al.*, 2005) y el genotipo II de cerdo en el silago bandeado (*Sillago vittata*) (Reid *et al.*, 2010); se detectó *C. parvum* en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y en el barbo plateado (*Puntius gonionotus*); las especies *C. parvum* y *Cryptosporidium hominis* (hospedador principal: hombre; Morgan-Ryan *et al.*, 2002) se encontraron en la caballa macarela (*Decaptes macarellus*) (Koinari *et al.*, 2013); y, el genotipo III de rata en la carpa dorada (*Carassius auratus*) (Morine *et al.*, 2012).

Tabla 1. Especies y genotipos de *Cryptosporidium* reconocidos en peces.

Especie/genotipo	Hospedador tipo	Localización	Referencia
<i>C. molnari</i>	<i>Sparus aurata</i>	Estómago	Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 2002
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Intestino	
<i>C. huwi</i>	<i>Poecilia reticulata</i>	Estómago	Ryan <i>et al.</i> , 2015
Genotipo 2	<i>Pterophyllum scalare</i>	Estómago	Murphy <i>et al.</i> , 2009
Genotipo 3	<i>Mugil cephalus</i>	Intestino	Reid <i>et al.</i> , 2010
Genotipo 4	<i>Gyrinocheilus aymonieri</i>	ND	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Chrysiptera hemicyanea</i>	ND	
	<i>Astronatus ocellatis</i>	ND	
Genotipo 5	<i>Pterophyllum scalare</i>	ND	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Monodactylus argenteus</i>	ND	
	<i>Gyrinocheilus aymonieri</i>	ND	
Genotipo 6	<i>Poecilia reticulata</i>	ND	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
Genotipo 7	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	ND	Morine <i>et al.</i> , 2012
Genotipo 8	<i>Gerres oblongus</i>	ND	Koinari <i>et al.</i> , 2013

ND = no determinado

1.2 Taxonomía

El género *Cryptosporidium* se incluyó tradicionalmente en el orden Eucoccidiorida, clase Coccidia, dentro del filo Apicomplexa (Levine, 1984, 1988). Sin embargo, los resultados de estudios bioquímicos y genéticos indican que *Cryptosporidium* difiere de otros organismos apicomplejos en diversas características fundamentales y, además desde un punto de vista filogenético, presenta ciertas peculiaridades que lo relacionan más estrechamente con los gregarínidos que con los coccidios (Carreno *et al.*, 1999; Leander *et al.*, 2003; Wetzel *et al.*, 2005; Ryan y Hijawi, 2015). Entre estas particularidades se encuentran: (i) la localización intracelular pero extracitoplasmática de los estados de desarrollo endógenos ubicados en la superficie apical de la célula hospedadora (Thompson *et al.*, 2005; Karanis y Aldeyarbi, 2011); (ii) la fijación del parásito a la célula hospedadora mediante

un orgánulo alimentador situado en la base de la vacuola parasitófora, facilitando así la adquisición de los nutrientes (Huang *et al.*, 2004); (iii) la existencia de dos tipos de ooquistes con diferente función (Karanis y Aldeyarbi, 2011); (iv) la forma esférica y el pequeño tamaño de los ooquistes (3-8 μm según la especie) en los que las estructuras morfológicas de esporocistos, micropilo y gránulos polares están ausentes (Tzipori y Widmer, 2000; Petry, 2004); (v) la resistencia a la mayoría de los fármacos anticoccidiales evaluados (Blagburn y Soave, 1997; Cabada y White, 2010); (vi) las reacciones cruzadas entre anticuerpos monoclonales frente a *Cryptosporidium* y organismos gregarínidos (Bull *et al.*, 1998); y, (vii) la detección de estados de desarrollo extracelulares similares a los existentes en los ciclos biológicos de los gregarínidos (Rosales *et al.*, 2005; Aldeyarbi y Karanis, 2016).

Recientemente, considerando las semejanzas entre las especies de *Cryptosporidium* y los gregarínidos, varios investigadores sugirieron que los cryptosporidia podrían representar un “eslabón perdido” entre los gregarínidos más primitivos y los coccidios. De esta forma, se propuso la reclasificación del género *Cryptosporidium* en una nueva subclase, Cryptogregaria, formada por este único género y constituida por parásitos epicelulares de vertebrados que poseen un orgánulo alimentador similar a los gregarínidos pero que carecen de apicoplasto (Carreno *et al.*, 1999; Hijjawi *et al.*, 2002; Cavalier-Smith, 2014). En consecuencia y al no haber sido cuestionada la reclasificación propuesta, *Cryptosporidium* es oficialmente un gregarínido de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Ryan *et al.*, 2016a).

Por otra parte, la caracterización molecular de las especies/genotipos de *Cryptosporidium* descritos en peces y actualmente aceptados, indica que desde el punto de vista evolutivo son más primitivos y genéticamente muy diferentes a las restantes especies/genotipos que infectan a otras clases de

hospedadores (Ryan *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2010; Zanguee *et al.*, 2010; Palenzuela *et al.*, 2010; Barugahare *et al.*, 2011; Morine *et al.*, 2012).

1.3 Biología de *Cryptosporidium* en peces

Las especies del género *Cryptosporidium* presentan un ciclo biológico directo, que se completa en un único hospedador (monoxeno). La forma infectante es el ooquiste, esférico, con un diámetro de 3-8 μm y una pared compuesta por tres láminas que le confiere una elevada resistencia a las alteraciones químicas y mecánicas, circunstancia que permite mantener la viabilidad de los 4 esporozoítos contenidos en su interior, incluso bajo condiciones ambientales desfavorables.

El ciclo comienza cuando un hospedador susceptible ingiere el ooquiste esporulado, que sufre un proceso de desenquistamiento, liberando los esporozoítos contenidos en su interior. Las especies de *Cryptosporidium* con localización gástrica responden más rápidamente a los factores desencadenantes del desenquistamiento en comparación con aquellas que infectan el intestino (temperatura corporal, enzimas gástricas, pancreáticas y sales biliares) (Widmer *et al.*, 2007; Cacciò y Putignani, 2014). Una vez liberados, mediante movimientos de contracción-extensión, los esporozoítos alcanzan la superficie apical de las células del epitelio gastrointestinal, las cuales desarrollan unas extensiones citoplasmáticas que engloban al esporozoíto en el interior de una vacuola parasitófora con localización intracelular, pero extracitoplasmática, en la que tendrán lugar las siguientes etapas de desarrollo. A diferencia de otras clases de hospedadores, en los peces, la membrana de la vacuola parasitófora presenta microvellosidades espaciadas a intervalos regulares que contienen una sustancia densa y pequeñas granulaciones. Además, la zona de unión entre la célula hospedadora y el parásito es distinta. En lugar de ser continua con la capa interlaminar de la envoltura parasitófora, en los peces consta de dos bandas electrodensas,

estando la banda interior conectada a dos placas mediante puntos osmofílicos. El órgano de alimentación se compone por múltiples pliegues paralelos con ensanchamientos en sus terminaciones, siendo más largos y numerosos que los correspondientes observados en otros cryptosporidia (Figura 1).

El esporozoíto se diferencia en un trofozoíto que presenta un gran núcleo, el cual sufre divisiones nucleares mediante un proceso denominado esquizogonia o merogonia, originando dos tipos de merontes multinucleados. El meronte tipo I tiene 6-8 núcleos que, tras la maduración, originan 6-8 merozoítos tipo I, los cuales infectan a células adyacentes donde se dividen asexualmente originando nuevos merontes tipo I o tipo II, que, al madurar, dan lugar a 4 merozoítos.

Cuando los merozoítos tipo II invaden otras células, inician la reproducción sexual o gamogonia a partir de la cual se producen microgamontes y macrogamontes. Como consecuencia de la división nuclear del microgamonte, se originan 14-16 microgametos aflagelados que salen de la vacuola parasitófora para fertilizar al macrogameto diferenciado. Tras la fertilización se forma un cigoto que, mediante un proceso de esporogonia, da lugar a ooquistes esporulados conteniendo 4 esporozoítos desnudos en su interior. A diferencia de otros hospedadores, en los peces, dichos ooquistes se encuentran dentro de una vacuola parasitófora localizada profunda e intracitoplasmáticamente en las células epiteliales. Además, se observó que en una misma célula infectada pueden aparecer más de un ooquiste en grupos, así como agregados de residuos celulares y sustancias necróticas (Figura 2). En algunos casos, las células infectadas experimentan una degeneración gradual para finalmente desintegrarse, permaneciendo los grupos de ooquistes en los espacios intercelulares (Landsberg y Paperna, 1986).

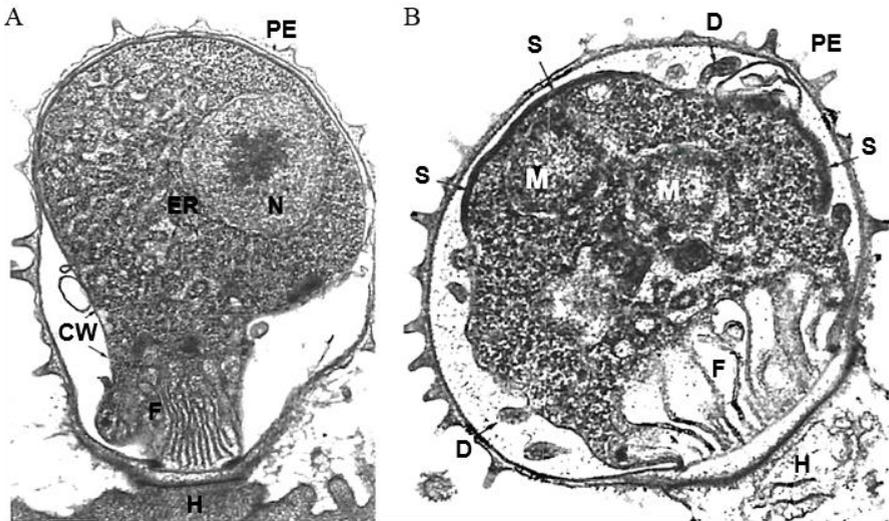


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de secciones histológicas del estómago de *Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus* infectado con *Cryptosporidium* sp.

(A) trofozoíto (29 300×) y (B) meronte joven (24 600×). PE, membrana de la vacuola parasitófora; ER, retículo endoplasmático rugoso; N, núcleo; CW, membrana citoplasmática del parásito; F, órgano de alimentación; H, célula hospedadora; M, merozoito en proceso de diferenciación; S, membrana subpelucular gruesa; D, pseudópodo (©Inter-Research 1986).

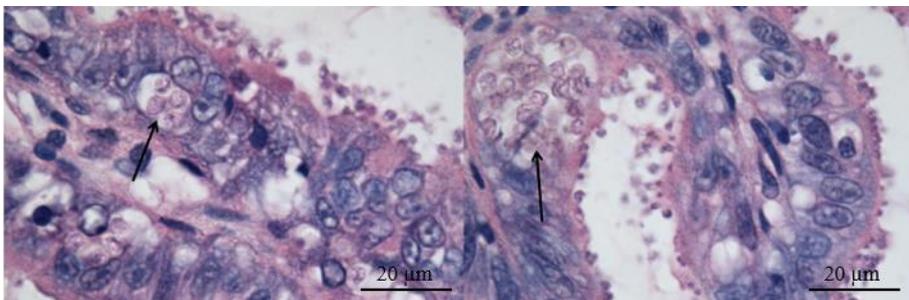


Figura 2. Sección histológica del estómago de un pez guppy (*P. reticulata*) teñido con hematoxilina-eosina mostrando numerosos ooquistes de *C. huwi* a lo largo de la línea epitelial, así como grupos de ooquistes localizados profundamente dentro del tejido (©Elsevier 2015).

Gran parte de los ooquistes esporulados poseen una pared gruesa (trilaminar) y son eliminados con las heces del hospedador, pudiendo infectar a otros hospedadores susceptibles. Sin embargo, algunos ooquistes presentan una cubierta fina (bilaminar) que se rompe fácilmente cuando el ooquiste se libera al lumen gastrointestinal y, por tanto, los esporozoítos libres pueden infectar a células adyacentes, reiniciando el ciclo mediante autoinfección endógena (Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 2002; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Palermo, 2016). En la Figura 3 se ilustra el ciclo biológico general de las especies de *Cryptosporidium* que infectan a peces.

1.4 Cryptosporidiosis en peces

La información disponible sobre las especies de *Cryptosporidium* que infectan a peces es muy limitada tanto para organismos de agua dulce como de agua salada, ya sean salvajes o de cultivo. En los escasos estudios publicados, los valores de prevalencia reportados son muy variables, oscilando entre 0,5-100%. En estos hospedadores, la infección puede causar altas tasas de morbilidad y mortalidad, así como diversos signos clínicos.

1.4.1 Prevalencia de *Cryptosporidium*

1.4.1.1 Peces salvajes

Actualmente existen tan solo 4 estudios, publicados entre los años 2010-2015, en los que se reporta la presencia de *Cryptosporidium* en peces salvajes, tanto de agua salada como de agua dulce.

En peces del medio marino, la caracterización molecular de los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de 20 especies distintas procedentes de las costas del oeste de Australia y de Papúa Nueva Guinea permitió identificar especies propias de rumiantes. La especie *C. parvum* se detectó en la caballa macarela (*D. macarellus*) (6,9%) y en el silago bandeado (*S. vittata*) (16,6%);

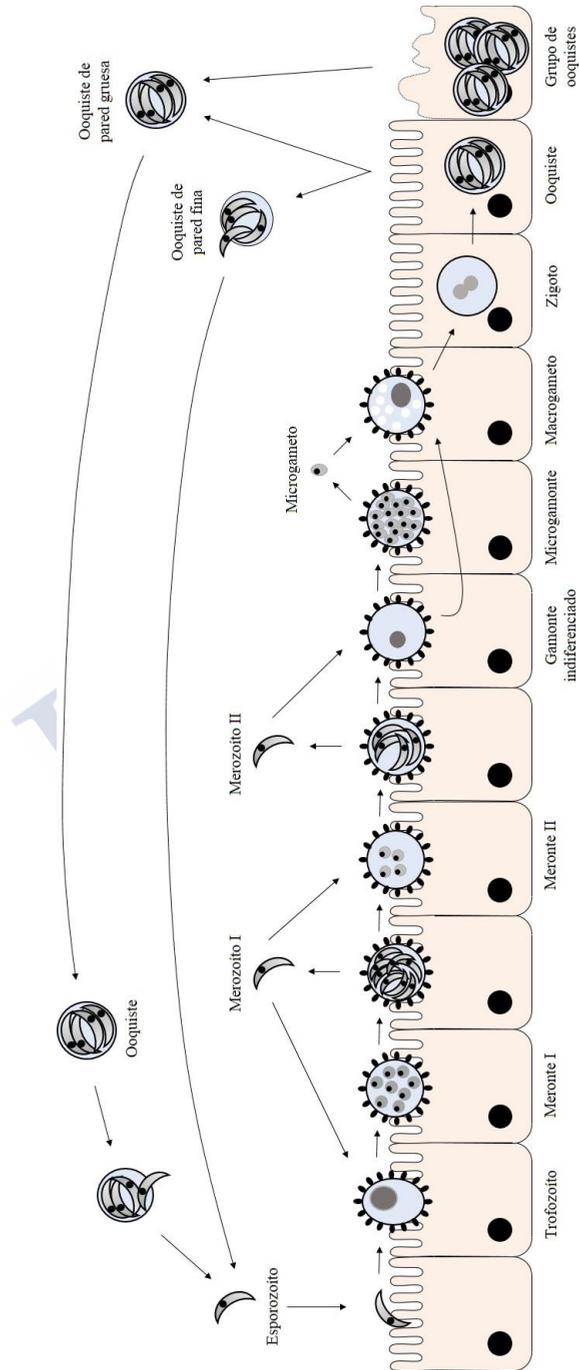


Figura 3. Representación del ciclo biológico de *Cryptosporidium* en peces.

en este último hospedador también se identificaron *C. xiaoi* (16,6%) y el genotipo II de cerdo (33,3%) (Reid *et al.*, 2010; Koinari *et al.*, 2013); además, los genotipos 2, 3 y 5 de peces se identificaron en el mágil (*Mugil cephalus*), con valores de prevalencia del 0,5%, 1,5% y 0,5%, respectivamente (Reid *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015); y, el genotipo 8 de peces se encontró en la mojarra plateada (*Gerres oblongus*), detectado en un 3,6% de los ejemplares analizados (Koinari *et al.*, 2013).

Una menor diversidad de especies de *Cryptosporidium*, aunque con valores de prevalencia superiores, se observó en peces de agua dulce procedentes del lago Lemán (Francia) y de Papúa Nueva Guinea. Así, se identificó *C. molnari* en el lucio (*Esox lucius*) con una prevalencia del 40,0% y *C. parvum*, además de en el lucio, en la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), en el lavareto (*Coregonus lavaretus*), en la perca (*Perca fluviatilis*), en el barbo plateado (*P. gonionotus*) y en el rutilo (*Rutilus rutilus*), con valores de prevalencia que oscilaron entre 20,0-100% (Koinari *et al.*, 2013; Certad *et al.*, 2015).

1.4.1.2 Peces de cultivo

Los datos existentes sobre *Cryptosporidium* en peces de cultivo también son muy escasos, disponiéndose de información referente a tan solo tres especies de peces marinos y a dos especies de agua dulce.

Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla (2002) realizaron los primeros estudios en la dorada (*S. aurata*) y en la lubina (*D. labrax*), ambas especies marinas, en las que reportaron valores de prevalencia para *C. molnari* que oscilaron entre 6,5-25,4% y 4,6-12,0%, respectivamente. Posteriormente, Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005) llevaron a cabo un estudio epidemiológico en estos mismos peces, comprobando diferentes prevalencias para *C. molnari* entre los ejemplares de los criaderos y los presentes en los tanques de engorde. Así, se detectaron valores de prevalencia comprendidos entre 11,6-100% y 11,1-50,0% en los ejemplares de dorada y lubina más pequeños,

respectivamente, mientras que los correspondientes a los peces procedentes de los tanques de engorde variaron entre 3,6-55,0% para la dorada y fue de un 57,9% para la lubina. En otra especie de cultivo, el rodaballo (*P. maxima*), se determinaron valores de prevalencia para *C. scophthalmi* que oscilaron entre 15,0-100%, correspondiendo los valores máximos a los ejemplares juveniles y comprobándose un descenso en el porcentaje de parasitación a medida que aumenta el tamaño del pez (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004).

Con respecto a las especies de agua dulce, la presencia de *Cryptosporidium* se investigó en ejemplares de lubina asiática o barramundi (*L. calcarifer*) y de tilapia del Nilo (*O. niloticus*). La caracterización molecular de los aislados permitió identificar *C. parvum* en ambas especies, con valores de prevalencia del 20,0% y del 2,4%, respectivamente (Gibson-Kueh *et al.*, 2011a; Koinari *et al.*, 2013).

1.4.1.3 Peces ornamentales

La mayoría de los estudios sobre *Cryptosporidium* en peces se llevaron a cabo en peces ornamentales, siendo examinadas unas 70 especies recogidas exclusivamente en varios acuarios y tiendas de mascotas de zonas metropolitanas de Perth, ciudad localizada en el oeste de Australia.

Mediante la aplicación de técnicas de biología molecular se detectó *Cryptosporidium* en un total de 13 y 19 especies de peces ornamentales de agua salada y de agua dulce, respectivamente, con prevalencias que oscilaron entre 15,4-100% para peces ornamentales de agua salada y 0,9-100% para especies de peces de agua dulce. La caracterización molecular de los aislados permitió identificar *C. molnari*, secuencias próximas a *C. molnari* y *C. huwi* (Zanguee *et al.*, 2010; Morine *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015) (Tabla 2).

Además, diversos autores caracterizaron un total de 5 nuevos genotipos de *Cryptosporidium*, concretamente los genotipos 2, 4, 5, 6 y 7 de peces, así como secuencias similares al genotipo 3 de peces, descrito en el múgil (Zanguee *et al.*, 2010; Morine *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015) (Tabla 3).

Tabla 2. Especies de *Cryptosporidium* identificadas en peces ornamentales.

Especie	Pez hospedador	n/%	Referencia
<i>Cryptosporidium molnari</i>	<i>Chromis viridis</i>	13/15,4	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Crossocheilus aymonieri</i>	5/20,0	
	<i>Ctenochaetus tominiensis</i>	1/100	
	<i>Monodactylus argenteus</i>	3/33,3	
	<i>Paracanthurus hepatus</i>	1/100	
	<i>Pseudanthias dispar</i>	2/50,0	
	<i>Synodontis nigriventris</i>	2/50,0	
<i>Cryptosporidium molnari</i> -“like”	<i>Amphiprion percula</i>	11/27,3	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Astronotus ocellatus</i>	20/10,0	
	<i>Carassius auratus</i>	110/2,7	
	<i>Centropyge eibli</i>	1/100	
	<i>Chrysiptera hemicyanea</i>	3/66,6	
	<i>Opistognathus aurifrons</i>	1/100	
	<i>Poecilia reticulata</i>	108/0,9	
	<i>Pseudanthias dispar</i>	3/33,3	
	<i>Pterophyllum altrum</i>	5/20,0	
<i>Cryptosporidium huwi</i>	<i>Paracheirodon innesi</i>	146/4,1	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Puntigrus tetrazona</i>	108/1,9	Yang <i>et al.</i> , 2015

1.4.2 Patología y manifestaciones clínicas

La patología de la cryptosporidiosis en peces no ha sido estudiada en profundidad, aunque varios autores reseñaron altas tasas de morbilidad y mortalidad, principalmente en ejemplares juveniles. Sin embargo, es conocido que la infección por este protozoo parásito está influenciada por: (i) la especie/genotipo de *Cryptosporidium*; (ii) la especie de pez hospedador; (iii) la edad/tamaño del pez; y, (iv) la existencia de coinfecciones con otros patógenos (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005; Palermo, 2016).

Tabla 3. Genotipos de *Cryptosporidium* identificados en peces ornamentales.

Genotipo	Pez hospedador	n /%	Referencia
Genotipo 2	<i>Astronotus ocellatus</i>	4/50,0	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Paracheiroidon innesi</i>	2/50,0	Yang <i>et al.</i> , 2015
Genotipo 3-“like”	<i>Carassius auratus</i>	110/0,9	Yang <i>et al.</i> , 2015
Genotipo 4	<i>Aptereronotus albifrons</i>	4/25,0	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Astronotus ocellatus</i>	4/25,0	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Chrysiptera hemicyanea</i>	1/100	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Crossocheilus aymonieri</i>	5/20,0	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Paracheiroidon innesi</i>	4/25,0	Morine <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pelvicachromis pulcher</i>	1/100	Yang <i>et al.</i> , 2015
Genotipo 5	<i>Aptereronotus albifrons</i>	4/25,0	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Carassius auratus</i>	110/2,7	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Crossocheilus aymonieri</i>	5/20,0	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Monodactylus argenteus</i>	3/33,3	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Paracanthurus hepatus</i>	1/100	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Poecilia reticulata</i>	110/0,9	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Pterophyllum scalare</i>	4/25,0	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Pterophyllum altrium</i>	5/20,0	Yang <i>et al.</i> , 2015
	<i>Xiphophorus maculatus</i>	9/22,2	Yang <i>et al.</i> , 2015
Genotipo 6	<i>Poecilia reticulata</i>	43/2,3	Zanguee <i>et al.</i> , 2010
	<i>Trichogaster trichopterus</i>	3/33,3	Yang <i>et al.</i> , 2015
Genotipo 7	<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	11/27,3	Morine <i>et al.</i> , 2012

En la mayoría de los casos de cryptosporidiosis en peces no se apreciaron signos clínicos de enfermedad, si bien diversos autores describieron manifestaciones clínicas como emaciación, atrofia del músculo esquelético, aplanamiento del abdomen, disminución de la tasa de crecimiento, anorexia, languidez, heces blanquecinas, inflamación abdominal y ascitis (Hoover *et al.*, 1981; Gratzek, 1993; Camus y López, 1996; Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 2002; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2009; Palermo, 2016).

Además, algunos estudios demostraron la existencia de un daño histopatológico inducido por la acumulación de ooquistes de *C. molnari* y *C. scophthalmi*, consistente en la presencia de grandes vacuolas que distorsionan la arquitectura normal de la mucosa, seguida de una necrosis masiva de las células epiteliales, con el consiguiente desprendimiento celular en ejemplares que mostraron altas intensidades de infección, y en los que, además, se observó una fuerte respuesta inflamatoria e intensa infiltración leucocitaria (Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 2002; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2016).

1.4.3 *Cryptosporidium* en el medio acuático

El agua es un excelente vehículo de diseminación de organismos patógenos de diferente naturaleza cuyo mecanismo de transmisión es la ruta fecal-oral, estando las enfermedades que ocasionan en el ser humano íntimamente relacionadas con el nivel de higiene ambiental. De hecho, las enfermedades infecciosas de transmisión hídrica son responsables de altas tasas de morbilidad y mortalidad, estimándose en más de 2,2 millones las muertes producidas cada año en el mundo. Entre las de etiología parasitaria, *Cryptosporidium* es uno de los agentes infecciosos más frecuentemente detectado. Así, *C. parvum* y *C. hominis* estuvieron implicados en un 63% de los brotes hídricos reportados en el período comprendido entre los años 2011 y 2016 (Fayer, 2004; OMS, 2009; Efstratiou *et al.*, 2017).

La presencia de ooquistes de diferentes especies de *Cryptosporidium* en aguas superficiales puede deberse a la contaminación de las mismas con residuos fecales de procedencia humana o de animales, tanto domésticos como salvajes. Dichos ooquistes pueden llegar a los cuerpos de agua directa o indirectamente por escorrentía a partir de superficies contaminadas (Lu *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2013; Sidhu *et al.*, 2013). Además, en países industrializados, la contaminación del medio hídrico puede ser ocasionada por

efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales mal diseñadas o de sistemas de tratamiento insuficientes o defectuosos (Ahmed *et al.*, 2010; Schneeberger *et al.*, 2015; Vermeulen *et al.*, 2019).

En este sentido, diversos estudios demostraron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en distintos tipos de agua (superficiales, destinada al consumo, recreacionales y efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales) (OMS, 2009; Hamilton *et al.*, 2018). Recientemente Vermeulen *et al.*, (2019) desarrollaron, a partir de datos disponibles en la literatura científica, un modelo matemático que permite predecir la concentración media de ooquistes de *Cryptosporidium* en cursos fluviales a nivel mundial, estableciendo unos valores de concentración comprendidos entre 10^{-6} y 10^2 ooquistes/L en la mayoría de los lugares.

Los ooquistes de *Cryptosporidium* están particularmente adaptados a la transmisión hídrica, como consecuencia de una serie de características que los hacen especialmente resistentes frente a diversas presiones ambientales favoreciendo su dispersión en el ambiente acuático (Carmena, 2010):

a) Eliminación de ooquistes en grandes cantidades

Cryptosporidium presenta altas tasas de multiplicación como una posible estrategia adaptativa para mejorar sus probabilidades de supervivencia y transmisión. Un hospedador infectado puede eliminar un gran número de ooquistes, ya infectantes para otro hospedador susceptible, durante largos periodos de tiempo con valores establecidos de hasta 10^7 ooquistes/g de heces durante la fase aguda de la infección, originando así altos niveles de contaminación ambiental (Putignani y Menichella, 2010).

b) Supervivencia en medios hídricos

Está demostrado que los ooquistes de *Cryptosporidium* pueden permanecer viables e infectantes durante al menos 6 meses en distintos tipos de agua superficial (Smith *et al.*, 2008). Esta supervivencia está muy influenciada por la temperatura, de forma que su infectividad disminuye a medida que aumentan los

valores de la misma (Ives *et al.*, 2007). La desecación, la amplia variación térmica (congelación-descongelación) y la radiación solar son otros factores ambientales que condicionan también la viabilidad e infectividad ooquisticas (King y Monis, 2007).

c) Pequeño tamaño de las formas parasitarias

Como consecuencia de su pequeño tamaño (5-8 μm), los ooquistes de *Cryptosporidium* tienen una gravedad específica muy baja, con velocidades de sedimentación que aumentan significativamente cuando se adhieren a otras partículas suspendidas en medios acuosos (Medema *et al.*, 1998). La existencia de ligeras turbulencias en el medio puede dar lugar a la resuspensión de sedimentos, provocando que los ooquistes depositados vuelvan a estar en suspensión. Las citadas características tienen implicaciones importantes en la industria del agua, ya que, debido a su tamaño, la mayoría de los filtros convencionales utilizados en las instalaciones de tratamiento de agua permiten el paso de los ooquistes y la eliminación de los mismos, mediante procesos de sedimentación, es insuficiente (Savioli *et al.*, 2006).

d) Resistencia a los desinfectantes químicos

Cryptosporidium es resistente a los desinfectantes derivados del cloro cuando se emplean a las concentraciones y tiempos de exposición comúnmente utilizados en las plantas de tratamiento, por lo que la cloración del agua como único método de desinfección no es suficiente para inactivar los ooquistes de este protozoo (Betancourt y Rose, 2004). Así, la inactivación o eliminación efectiva de los ooquistes de *Cryptosporidium* requiere la combinación de procesos de filtración y desinfección de agua aplicados en condiciones adecuadas [incluyendo la ozonización y la radiación ultravioleta (UV)] (OMS, 2009; Adeyemo *et al.*, 2019).

e) Alta infectividad

Desde los años 90 del siglo pasado, se conoce la baja dosis infectante de los ooquistes de *Cryptosporidium*. Se comprobó que tan solo se necesitan 10-30 ooquistes para desencadenar una cryptosporidiosis, dependiendo de factores propios del parásito y, fundamentalmente, del estado inmunitario del

hospedador (DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999). De hecho, en individuos inmunocomprometidos, se sospecha que la infección puede ser desencadenada tras la ingestión de un único ooquiste (Rose, 1997).

Ante lo expuesto anteriormente, es fundamental la implementación de medidas preventivas para disminuir la carga y propagación de los ooquistes en el ambiente hídrico, así como para mejorar el rendimiento de los procesos de tratamiento de agua. La aplicación de prácticas agropecuarias adecuadas permitiría minimizar la contaminación directa de las aguas superficiales (corrales o establos apropiados, limpios y desinfectados; compostaje adecuado del estiércol; prevención de escorrentías desde los corrales o establos; aislamiento de los animales enfermos; e, implementación de medidas que reduzcan la transmisión entre los animales). Además, la restricción de acceso del ganado a cuerpos de agua mediante cercas o rampas y el pastoreo rotativo pueden prevenir significativamente la contaminación. Por lo que respecta a las plantas de tratamiento de agua, tanto destinadas al consumo como residuales, deben operar monitorizando el funcionamiento del sistema e introduciendo las correcciones oportunas en aquellas circunstancias en las que el proceso pueda verse comprometido. También, la incorporación de tratamientos adicionales como la filtración por membrana, la radiación UV y la ozonización, favorecerían aún más la eficiencia del sistema con el fin de eliminar o inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium* (Carmena, 2010; Nasser, 2016).

Por otra parte, está documentada la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en diferentes organismos eucarióticos que habitan en el medio acuático y, por tanto, no debe descartarse su participación en la transmisión de este protozoo parásito. Varios rotíferos, especies de los géneros *Epiphanes* y *Euchlanis*, y ciertas amebas de vida libre, *Acanthamoeba* sp., pueden retener los ooquistes de *C. parvum* cuando coexisten en aguas contaminadas (Fayer *et al.*, 2000b; Gómez-Couso *et al.*, 2007). De manera similar, el camarón de salmuera, *Artemia franciscana*, puede participar como

vehículo en la transmisión de la cryptosporidiosis en peces de cultivo, al ser utilizado como dieta viva en acuicultura (Méndez-Hermida *et al.*, 2007). Recientemente, Reboredo-Fernández *et al.* (2014) demostraron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en comunidades de macroinvertebrados bentónicos de ríos gallegos, concluyendo que estos organismos podrían contribuir a la transmisión de estas formas parasitarias a través de la cadena alimentaria acuática.



2 LA TRUCHA

El vocablo trucha hace referencia a dos especies de peces teleósteos, la trucha común (*Salmo trutta*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), pertenecientes a la familia Salmonidae, caracterizada por la presencia de una aleta adiposa próxima a la aleta caudal. La amplia distribución geográfica de la trucha está justificada por su gran capacidad de expansión y colonización de nuevos cursos de agua, lo que permitió que ambas especies se introdujesen en ríos de todos los continentes excepto en la Antártida. Su hábitat está constituido por cursos fluviales con aguas frías y bien oxigenadas, siendo especies muy sensibles a la contaminación ambiental. Se alimentan de presas cuyo tamaño se adecúa a la etapa de desarrollo. Así, las truchas más pequeñas consumen zooplancton y macroinvertebrados bentónicos, mientras que los ejemplares adultos pueden ingerir también anfibios y pequeños peces. Las truchas alcanzan la madurez sexual entre el segundo y tercer año de vida, reproduciéndose una sola vez al año, entre noviembre y abril, según la especie (Doadrio, 2002; Alonso *et al.*, 2017).

En general, los salmónidos y particularmente las truchas, son unas de las especies ícticas más explotadas por el ser humano, tanto por su valor económico en acuicultura como recreativo en la pesca deportiva (Torrent Bravo, 2015; APROMAR, 2018).

2.1 La trucha común (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758)

2.1.1 Descripción

La trucha común o salvaje es un pez esbelto, de cuerpo fusiforme, poco aplanado lateralmente y con un pedúnculo caudal ancho y fuerte. Sus aletas caudal y anal son cortas con respecto a las que presentan otras especies de la familia Salmonidae. La aleta adiposa, característica de esta familia, es pequeña y está situada más próxima a la aleta caudal que a la dorsal, presentando el borde de color anaranjado o rojo en ejemplares juveniles y adultos sedentarios. Las escamas son pequeñas y redondeadas, y su número oscila, a lo largo de la línea lateral, entre 110-115 (Lozano Rey, 1935; Kottelat y Freyhof, 2007) (Figura 4).



Figura 4. Ejemplar de trucha común (*S. trutta*) (©Duane Raver).

Según el hábitat, las poblaciones pueden presentar una morfología y coloración variables. En general, el dorso y los laterales son de color pardo o verde oliva mientras que el vientre es amarillento, gris claro o blanquecino. Suelen tener manchas negras y rojas rodeadas de un ocelo blanco, distribuidas por el dorso y los flancos sin llegar a la zona ventral. Además, los alevines muestran varias manchas ovaladas, grandes y grises a lo largo del dorso, que suelen desaparecer con la edad. En aquellos ejemplares que migran al mar, las escamas adquieren un tono plateado como adaptación a la vida en el medio

marino –fenómeno denominado esguinado– recuperando el aspecto pardo cuando vuelven al río (Ade, 1989; Pakkasmaa y Piironen, 2001).

2.1.2 Distribución

En su origen, la distribución de la trucha común se limitaba a ríos del hemisferio norte, concretamente de Europa, abarcando desde la Península Ibérica hasta los montes Urales y el mar Caspio. En la actualidad, esta especie presenta una distribución mundial al haber sido introducida con éxito, en menos de un siglo, en más de 20 países de todos los continentes, excepto en la Antártida. Cronológicamente, la trucha común se introdujo en ríos del este de Rusia en 1852, llegando a Nueva Zelanda en 1867, a Estados Unidos y Canadá en 1883 y 1887, respectivamente, y un año más tarde a Australia. En Sudáfrica y Japón, se introdujo en 1892 y, en países de América del Sur, entre los años 1904-1938 (Eillot, 1994; Cobo *et al.*, 2015; Eschmeyer, 2019).

El establecimiento de la trucha salvaje en un área tan amplia es consecuencia de su gran variabilidad ecológica, su tolerancia a los cambios de hábitat y a su extraordinaria capacidad de adaptación a nuevos cursos fluviales (Klemetsen *et al.*, 2003). Sin embargo, la calidad del agua y la temperatura son los factores críticos que acotan la distribución de la trucha común, siendo sus temperaturas límite los 0°C y los 22°C (Eillot, 1994).

En España, la trucha común es un pez nativo presente en todos los cursos fluviales de las cuencas hidrográficas de los ríos de Galicia, las cabeceras de los ríos de la vertiente cantábrica, así como en las cuencas de los ríos Duero, Tago, Guadalquivir, Segura, Júcar, Ebro y de varios ríos de Cataluña. Sin embargo, está ausente en ríos de la zona de levante y de la cuenca del Guadiana (Doadrio, 2002) (Figura 5). Esta distribución, inicialmente más amplia, se redujo debido a factores relacionados con actividades antropogénicas y, hoy en día, está muy influenciada por las repoblaciones no

controladas que se llevaron a cabo en la península durante el siglo XX (Sáez-Gómez, 2010; Alonso *et al.*, 2017).



Figura 5. Distribución de la trucha común (*S. trutta*) en España.

2.1.3 Sistemática

Debido a su amplia área de distribución geográfica, la trucha común presenta una gran variabilidad fenotípica al ser una especie compuesta por distintas poblaciones sometidas a un aislamiento local y entre las que se produce un cierto flujo o intercambio genético que da lugar a variaciones morfológicas y ecológicas. Estas circunstancias provocaron, durante la segunda mitad del siglo XIX, la descripción de un sinnúmero de subespecies e incluso nuevas especies de trucha común. Tras varias revisiones taxonómicas, a finales del siglo XX, se consensó que este pez representa una única especie politípica, es decir, una especie con diferentes estrategias de vida o ecotipos (grupos de individuos de una misma población con distinta ecología) (Eillot, 1994; Cobo *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2017).

En este sentido, en la península ibérica hay dos ecotipos de trucha común, una población sedentaria o residente en el río y una población anádroma o migratoria, constituida por individuos que migran al mar y que vuelven al río para reproducirse. Aunque ambos grupos presentan diferencias morfológicas, fisiológicas y ecológicas, se consideran la misma especie, pudiendo convivir en una misma área (simpatria) y reproducirse entre sí (Alonso *et al.*, 2017).

2.1.4 Hábitat

La trucha suele habitar los tramos altos de los ríos con aguas limpias y frías, con corriente moderada o rápida y bien oxigenadas, por lo que este pez no sobrevive en aguas de calidad deficiente (MacCrimmon y Marshall, 1968; Mladineo *et al.*, 2009).

El efecto de la variación de la temperatura sobre las truchas es uno de los factores ecológicos mejor estudiados. Como se ha comentado, estos peces viven en aguas frías con valores óptimos de temperatura comprendidos entre 7-10°C y 15-17°C, siendo letales aquellos inferiores a 0°C y superiores a 22°C. Además, las truchas requieren altas concentraciones de oxígeno disuelto (>7 mg/L), con valores de saturación próximos al 80% (Breton, 2007; Cobo *et al.*, 2015).

Los cambios ontogénicos que experimenta esta especie hacen que las poblaciones de trucha se estructuren por grupo de edad a lo largo del curso fluvial atendiendo a ciertas variables físicas de gran influencia en el hábitat: (i) la profundidad; (ii) la velocidad de la corriente; (iii) el sustrato o la granulometría; y, (iv) la cobertura vegetal. Así, los alevines suelen situarse en tramos del río poco profundos (20-30 cm), con corrientes rápidas o moderadas (0,5-0,8 m/s) y con fondos de gravas y rocas; por el contrario, los ejemplares adultos prefieren zonas más profundas (35-50 cm) y con menor corriente (0,2-0,4 m/s), sustratos más gruesos y abundante vegetación que les proporcione refugio. Por lo tanto, a medida que aumenta su tamaño, la trucha

prefiere aguas más profundas y lentas (Breton, 2007; Ayllón *et al.*, 2009; Cobo *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2017).

2.1.5 Alimentación

Los estudios realizados sobre la alimentación de la trucha común demuestran su complejidad. Por lo general, se considera que la trucha es un pez eurifágico (amplio espectro alimentario) con una dieta definida (predominio de ciertas presas), aunque con muchas variaciones, tanto a nivel poblacional como individual, debido a su capacidad de adaptación a la disponibilidad de alimento. Este hecho le confiere un carácter generalista-opportunista en función de la distribución y la abundancia de las presas (de Sostoa y Lobon-Cervia, 1989; Oscoz *et al.*, 2000; Klemetsen *et al.*, 2003; Cobo *et al.*, 2015). La actividad alimentaria de la trucha suele ser mayor al amanecer y tras la puesta del sol, incrementado su intensidad en primavera y verano como consecuencia del régimen de temperaturas (Eillot, 1994; Alonso *et al.*, 2017).

Los macroinvertebrados bentónicos representan la principal fuente de alimento de la trucha común, aunque la deriva de superficie –insectos terrestres que caen al agua y son arrastrados por la corriente– constituye otro recurso alimentario. Sánchez Hernández (2009) en su revisión sobre la alimentación de la trucha común de ríos de Galicia detalla que, de modo general, los insectos que predominan en la dieta de estos peces son los quirómidos, seguidos de los efemerópteros, dípteros, trícópteros y, en menor medida, plecópteros. Además, cuando están presentes en la comunidad béntica, los gammáridos son una de las presas predilectas, pudiendo representar el 80% de la dieta (Oscoz *et al.*, 2000).

A medida que aumenta el tamaño del pez, se incrementa también el tamaño de las presas de las que se alimenta, experimentando un cambio ontogénico de dieta a partir del cual la trucha puede ser también ictiófaga y,

por tanto, consumir ejemplares juveniles de otras especies e incluso de la suya propia (Cobo *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2017).

En el caso de las truchas anádromas, su dieta en el medio marino se basa en crustáceos, poliquetos y peces, consumiendo fundamentalmente aguaciosos (*Ammodytes tobianus*), arenques (*Clupea harengus*) y espadines (*Sprattus sprattus*). Estas truchas adquieren el carácter ictiófago más precozmente que aquellas que residen en los ríos (Crisp, 2000; Keeley y Grant, 2001; Knutsen *et al.*, 2001).

2.1.6 Reproducción y desarrollo

La trucha común se reproduce durante las estaciones de otoño e invierno, normalmente entre los meses de noviembre y enero, aunque se puede adelantar en cursos fluviales que se encuentren a latitudes y altitudes mayores. La madurez sexual en las truchas varía entre machos y hembras: mientras que los machos alcanzan la madurez en torno a los 2 años, las hembras, al requerir un mayor aporte energético, lo hacen un año más tarde (Breton, 2007; Gortázar *et al.*, 2007; Cobo *et al.*, 2015).

Para que tenga lugar la freza, los adultos remontan el curso del río y se reúnen en un lugar adecuado, con poca profundidad, fondos de gravas y cantos, generalmente, con aguas corrientes y bien oxigenadas (Schneider, 2000; Klemetsen *et al.*, 2003). Una vez que la hembra selecciona una zona adecuada en el lecho del río, excava un nido mediante movimientos repetitivos de la aleta caudal con el fin de desplazar los sedimentos. Mientras tanto, varios machos vigilan el territorio para evitar que se acerquen especies depredadoras de huevos al tiempo que cortejan a la hembra, aunque solo uno de ellos, el dominante, fecundará la mayor parte de los huevos. Tras el cortejo y una vez terminado el nido, la hembra deposita los huevos (alrededor de 2000 huevos/kg) y, simultáneamente, los machos liberan el esperma que los fecunda. Inmediatamente después de la freza, la hembra cubre los huevos con

gravas y abandona el lugar, al contrario de los machos que permanecen bastante tiempo (Breton, 2007; Cobo *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2017). Los huevos se incuban enterrados bajo gravas durante unos 40 días, transcurridos los cuales, eclosiona un eleuteroembrión, es decir, un alevín transparente con un saco vitelino adherido ventralmente del que se alimenta para iniciar su desarrollo. Antes de la reabsorción completa del vitelo, los peces deben alejarse del frezadero y comenzar su alimentación autónoma, momento a partir del que adquieren un comportamiento territorial y agresivo (Eillot, 1994; Héland, 1999). Además, en esta etapa, los alevines comienzan a oscurecerse y pigmentarse, aparecen las primeras escamas y se van formando las aletas. Este cambio etológico es un periodo crítico, ya que la disponibilidad de alimento apropiado (larvas de insectos macrobentónicos, especialmente de dípteros), la capacidad de aprovechamiento del mismo, la adquisición de refugios adecuados y la depredación comprometen la supervivencia de los alevines (en esta etapa la mortalidad puede alcanzar el 90%). Finalmente, la trucha inicia una fase de crecimiento rápido tras la que alcanza la madurez sexual (Breton, 2007; Cobo *et al.*, 2015) (Figura 6).

2.1.7 Estatus y medidas de conservación

Desde el punto de vista de su estado de conservación, la trucha común está catalogada a nivel mundial como una especie de “preocupación menor” (Freyhof, 2011). Sin embargo, en España, Doadrio (2002) sugiere que esta especie debería incluirse en la categoría “vulnerable”, debido a que, en los últimos años, la población de trucha se redujo un 20% como consecuencia de una serie de factores amenazantes: (i) la introgresión genética por la repoblación con ejemplares no autóctonos (Almodóvar *et al.*, 2001; Doadrio Villarejo *et al.*, 2013); (ii) la introducción de especies de peces depredadoras como el lucio (*E. lucius*) (Alonso *et al.*, 2017); (iii) la construcción de infraestructuras hidráulicas que alteran el hábitat (Almodóvar y Nicola, 1999;

Alonso-González *et al.*, 2008); (iv) la contaminación del agua por vertidos químicos (Linde *et al.*, 1999); y, (v) la sobrepesca deportiva (Almodóvar y Nicola, 1998).

En los últimos años, en España se han establecido estrategias de conservación como son las repoblaciones controladas, la restauración de los ríos y la regulación de la pesca (Almodóvar, 2002). Con respecto a esta última medida, todas las comunidades autónomas peninsulares desarrollaron una normativa de gestión de su pesca instaurando cotos de pesca; estableciendo un periodo hábil de pesca (entre 3 y 5 meses durante la primavera y el verano); tamaños mínimos legales (19-22 cm); cupos de captura (5-10 truchas/día/pescador); prohibición de algunos cebos; y/o, la obligación de pesca sin muerte (Almodóvar *et al.*, 2001; Breton, 2007).

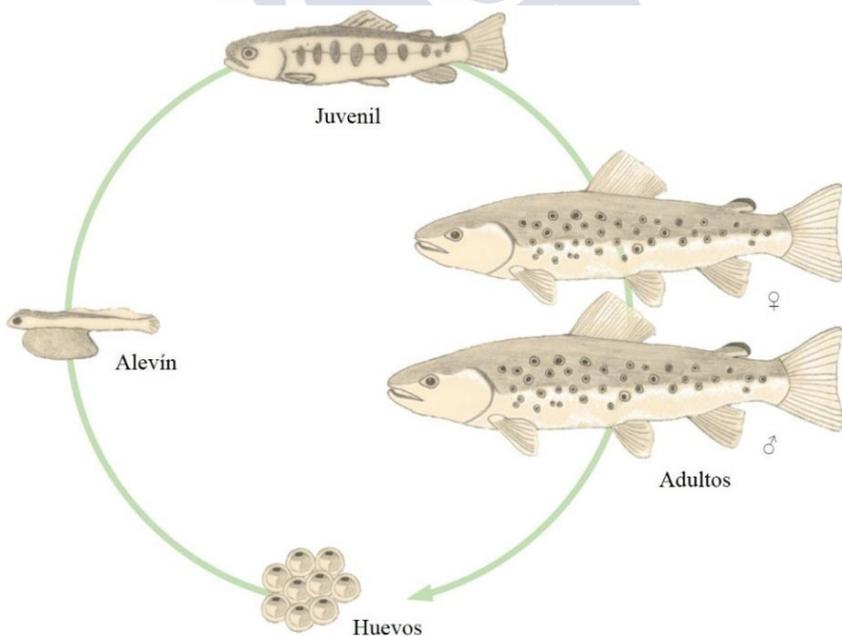


Figura 6. Ciclo biológico de la trucha común (*S. trutta*).

2.1.8 Interés económico y ecológico

La trucha común representa un recurso económico y social muy importante en España que, históricamente es uno de los peces más consumidos y presenta un elevado interés en la pesca deportiva. Este último aspecto promovió su introducción en todos aquellos cursos fluviales en los que las condiciones permitían su supervivencia y dio lugar al desarrollo de iniciativas turísticas íntimamente relacionadas con la pesca recreativa (concepto de “pesca-turismo”), así como a la celebración de numerosos e importantes campeonatos de pesca (Molina García, 2013; Torrent Bravo, 2015; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2019).

Por otra parte, la Directiva 2000/60/CE o Directiva Marco del Agua (DMA), modificada por la Directiva 2008/105/CE y la Directiva 2013/39/UE, establece que los peces son indicadores biológicos de la calidad del agua, junto con los macroinvertebrados bentónicos y la flora acuática. De esta forma, la trucha común es un modelo de bioindicador al ser una especie susceptible a las perturbaciones que acontecen en el medio acuático (Directiva 2000/60/CE; Directiva 2008/105/CE; Directiva 2013/39/UE; Oscoz *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2017). Determinadas actividades antropogénicas provocan una reducción de la calidad de los ecosistemas hídricos al favorecer el estrés medioambiental. Consecuentemente, la diversidad y riqueza de especies disminuye, aumentando por el contrario la presencia de fauna y/o flora tolerantes al nuevo entorno (Sabater *et al.*, 2018). Además, las variaciones acentuadas de temperatura, así como la presencia de contaminantes tóxicos aumentan la probabilidad de que la trucha salvaje sea susceptible a enfermedades infecciosas de diferente etiología (Ellis *et al.*, 2012; Nakano *et al.*, 2015).

2.2 La trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

2.2.1 Descripción

La trucha arcoíris es un pez de cuerpo alargado o fusiforme, semejante al de los demás salmónidos, aunque presenta una cabeza más pequeña que la de la trucha común. En general, su coloración es gris-verdosa en el dorso y blanca en el vientre, con una línea rosada o irisada que hace referencia a su nombre. Además, tanto su cuerpo como sus aletas dorsal, adiposa y caudal están cubiertas por numerosos y pequeños puntos negros (Kottelat y Freyhof, 2007; FAO, 2009) (Figura 7).



Figura 7. Ejemplar de trucha arcoíris (*O. mykiss*) (©Duane Raver).

2.2.2 Distribución

El área de distribución natural o nativa de la trucha arcoíris son los ríos de América del Norte que drenan la vertiente del océano Pacífico, desde Alaska hasta la baja California (Gutiérrez y Urbina, 2012). Esta especie, al igual que la trucha común, atravesó los océanos, pero en sentido contrario. Hoy en día se distribuye por todo el mundo, salvo en la Antártida, al haber sido introducida en 82 países con fines recreativos para la pesca deportiva o para su producción en acuicultura (FAO, 2011). La trucha arcoíris llegó a Canadá en 1881 y a la costa atlántica europea en 1874, continuando a través de Francia y Alemania en 1879 y 1884, respectivamente. Alcanzó Nueva Zelanda en 1883 y, a partir del año 1900, también se introdujo en Argentina

(1904), así como en Chile y Australia (1905). Finalmente, desde Europa se exportó a Japón en 1922 y al norte de África en 1925, llegando a Sudáfrica en 1994 (Breton, 2007; FAO, 2009).

En España, la trucha arcoíris está presente en diversas cuencas hidrográficas, aunque con poblaciones poco estables, siendo raros los casos en los que realmente se aclimatan y consiguen reproducirse naturalmente. En general, su presencia se debe a repoblaciones, como las realizadas en los ríos Gévora, Guadiana, Serpis y Tajo, y también a la proximidad de las piscifactorías de las que siempre se escapan ejemplares (Doadrio, 2002).



Figura 8. Distribución natural e introducciones internacionales de la trucha arcoíris (*O. mykiss*).

2.2.3 Hábitat, alimentación y reproducción

Debido a la importancia económica que representa la producción intensiva de esta especie en acuicultura, su biología se estudió ampliamente. Sin embargo, existe poca información acerca de su ecología.

El hábitat original de la trucha arcoíris son los ríos de aguas limpias, con corriente moderada o rápida y temperaturas en torno a los 12°C, tolerando

aguas menos frías y exigiendo menores concentraciones de oxígeno disuelto que la trucha común. Se aclimata bien a los lagos y embalses, así como a aguas salobres y saladas, existiendo también algunas poblaciones anádromas (Page y Burr, 2011). Es un depredador generalista por lo que su alimentación es muy similar a la de la trucha común, consumiendo especialmente larvas de macroinvertebrados y pequeños peces (Doadrio, 2002; Breton, 2007).

En cuanto a su biología, los machos y hembras alcanzan la madurez sexual a los dos y tres años, respectivamente. El periodo de freza ocurre un poco más tarde que el de la trucha común, durante las estaciones de invierno-primavera, principalmente entre los meses de enero y abril. La hembra construye el nido depositando entre 700 y 4000 huevos que son fecundados por el macho. Pasado el periodo de incubación, entre tres y siete días, eclosionan los alevines que inicialmente permanecen próximos al frezadero para luego migrar río abajo (Gall y Crandell, 1992; Doadrio, 2002).

2.2.4 Producción en acuicultura

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) define la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos (animales o plantas) en agua salada o dulce con el fin de incrementar su producción mediante técnicas que permitan aumentar la eficiencia de su proceso de cría (FAO, 2019). Esta actividad se lleva a cabo prácticamente en todos los países del mundo, al representar un motor económico y fomentar el comercio local e internacional, reduciendo la pobreza en países en vías de desarrollo. Además, la Comisión Europea (CE) considera la acuicultura como un pilar dentro del “Crecimiento Azul”, concepto que surge en el año 2012 como una estrategia para promover el equilibrio entre el progreso social y el desarrollo económico basándose en el uso eficiente de los ecosistemas hídricos. Esta medida apoya el crecimiento sostenible de los sectores marítimo y fluvial con la premisa de

que “un ecosistema saludable es más productivo que uno que no lo es” (APROMAR, 2018).

Dentro de la Unión Europea (UE), España es el país con mayor producción en acuicultura, concretamente 283 831 toneladas en el año 2016 (22% del total). Nuestro país dispone de aproximadamente 8000 km de costa y una gran red de cursos fluviales, que, junto con su topografía y clima, proporcionan unas características medioambientales y fisicoquímicas ideales para que la acuicultura se desarrolle satisfactoriamente (FAO, 2017; APROMAR, 2018).

La primera referencia sobre la cría en cautividad de peces en España data del año 1129, cuando se construyó un criadero de trucha en el río Sar (Galicia) por iniciativa del arzobispo de Santiago de Compostela, Don Diego Xelmírez. Siglos más tarde, en 1866, se puso en marcha la primera piscifactoría privada de trucha en el Monasterio de Piedra (Aragón) (Fernández Casal, 2013; FAO, 2017). Hoy en día, nuestro país cuenta con más de 200 instalaciones activas de acuicultura continental (agua dulce), 95 de las cuales se dedican a la producción de trucha arcoíris.

A nivel mundial, en el año 2016, la producción de trucha arcoíris alcanzó las 814 091 toneladas, incrementándose en un 8,3% con respecto al año anterior y representando la principal especie de agua dulce cultivada en la UE. En España, la producción acuícola de trucha arcoíris en el año 2017 fue de 17 984 toneladas, lo que supuso un incremento del 1,4% con respecto al año anterior, siendo Galicia la segunda región productora (3101 toneladas; 17,9%) después de Castilla y León (5413 toneladas; 31,2%) (APROMAR, 2018).

El sistema de producción más común de la trucha arcoíris es el monocultivo, siendo el suministro de agua de buena calidad un requisito indispensable. El ciclo de cultivo de esta especie consta de cuatro etapas (FAO, 2009) (Figura 9):

1) Desarrollo de reproductores

En los sistemas de acuicultura se precisan adultos reproductores (3-4 años) de alta calidad. El número de estos ejemplares varía en función del número de huevos que se necesiten para que la producción sea rentable. En general, la proporción de reproductores es de un macho por cada tres hembras que suelen mantenerse separados. La conservación y el cuidado de los reproductores es laboriosa y costosa, por lo que muchas instalaciones acuícolas optan por comprar los huevos embrionados a empresas externas.

2) Obtención de gametos y fertilización

El método de fertilización más frecuentemente utilizado es la fertilización en seco. Las truchas no desovan de modo natural, por lo que las hembras se anestesian y, mediante la aplicación de una presión manual a lo largo del vientre, se extraen los huevos que se recogen en un recipiente y se mantienen secos. De forma similar, se procede con los machos para obtener el semen, el cual se mezcla con el de otros ejemplares con el fin de reducir la endogamia. Una vez fertilizados, los huevos se colocan sobre una malla dispuesta a unos 5 cm del fondo de las bandejas de incubación. El tiempo de eclosión de los alevines varía en función de la temperatura, siendo necesarios 100 días cuando esta es de 3,9°C, mientras que a 14,4°C son suficientes tan solo 21 días.

3) Cría de alevines

A medida que eclosionan los huevos, los alevines con saco vitelino, caen al fondo de la bandeja de incubación a través de la malla. Cuando el vitelo se consume (10-14 días), los alevines comienzan a nadar hacia la superficie e inician la búsqueda activa de alimento. Es en ese momento cuando se trasladan a tanques de cría, circulares (2 m de diámetro), de fibra de vidrio y en los que el agua entra lateralmente y sale por el centro del mismo. La dieta de iniciación consiste en gránulos compuestos por harina y aceite de pescado.

4) Engorde

Una vez que los alevines alcanzan un tamaño comprendido entre 8-10 cm de longitud, se trasladan a los tanques de engorde, generalmente de hormigón

(2-3 m de ancho por 12-13 m de largo), ubicados al aire libre, con circulación longitudinal del agua y con suministro de oxígeno. El periodo de engorde dura en torno a unos 9 meses hasta que las truchas alcanzan el tamaño comercial (generalmente 30-40 cm; 250-300 g).

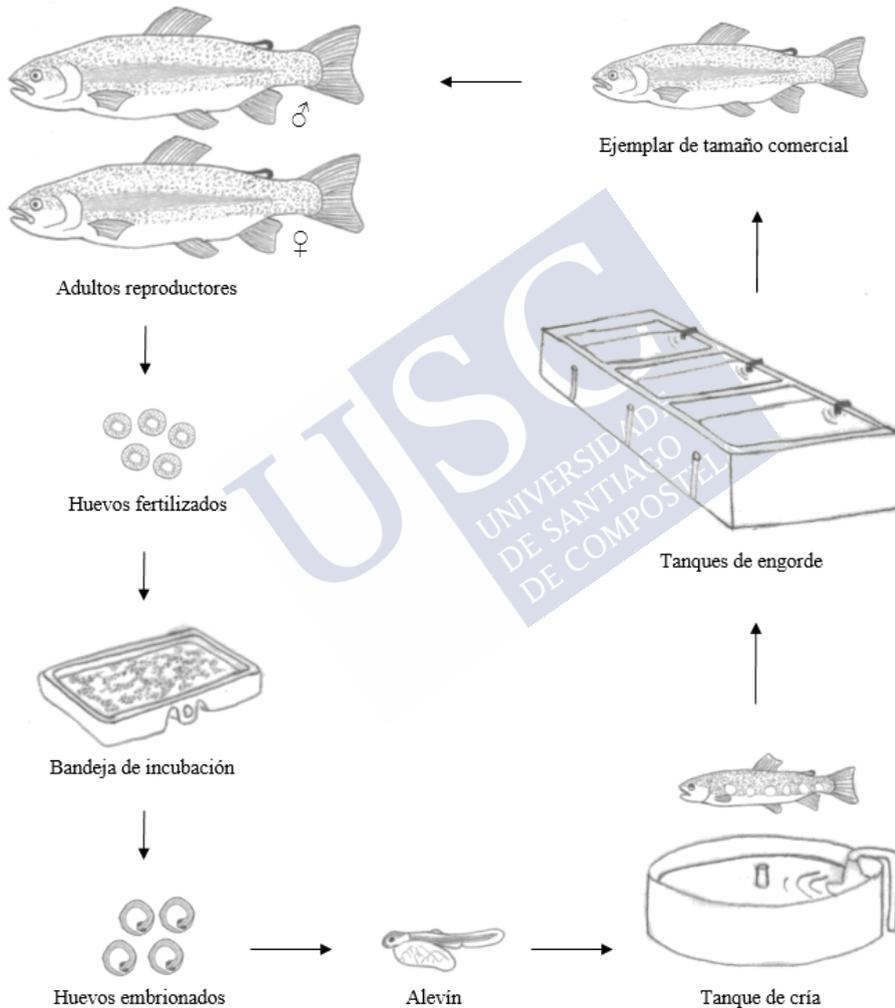


Figura 9. Ciclo de producción de la trucha arcoíris (*O. mykiss*).

2.3 Parásitos de la trucha

Como cualquier otro ser vivo, la trucha, tanto salvaje como de cultivo, es susceptible de ser parasitada. La aparición de enfermedades de esta etiología es prácticamente inapreciable en el medio natural; sin embargo, las condiciones de hacinamiento propias de los sistemas de cultivo intensivo favorecen la aparición de enfermedades parasitarias que pueden adoptar características epidémicas.

Se han descrito un amplio número de especies parásitas pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, tanto en la trucha común como en la especie de cultivo, pudiendo generar grandes pérdidas económicas, como ocurre con *Hexamita salmonis* (hexamitosis); *Ichthyobodo necator* (costiasis); *Ichthyophthirius multifiliis* (enfermedad del punto blanco); *Myxobolus cerebralis* (enfermedad del torneo); *Tetracapsula bryosalmonae* (enfermedad proliferativa del riñón); y, *Gyrodactylus* spp. (gyrodactilosis). En la Tabla 4, se presenta una relación de las especies parásitas más comunes que afectan a estos hospedadores, junto con su localización anatómica e importancia en acuicultura (Moravec, 1994; Buchmann y Bresciani, 2001; Breton, 2007; FAO, 2009, 2011; Arregui Maraver, 2013; Alonso *et al.*, 2017).

Con respecto a las parasitosis con importancia en acuicultura, la actual legislación europea en materia de sanidad animal es extremadamente restrictiva en estas instalaciones, al limitar las posibles terapias aplicables para la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas. Así, considerando que no se dispone de tratamientos para muchos de los parásitos que infectan a las truchas de cultivo, en aquellos casos en los que sí existe, este se limita a baños con formol, peróxido de hidrógeno o sulfato de cobre (Breton, 2007; FAO, 2009; Alonso *et al.*, 2017; APROMAR, 2018).

Tabla 4. Relación de especies parásitas más frecuentes en truchas, localización anatómica en el hospedador e importancia en acuicultura.

Grupo	Parásito	Localización anatómica	Importancia acuicultura
Protozoos	<i>Eimeria truttae</i>	I	Sí
	<i>Hexamita salmonis</i>	I	Sí
	<i>Ichthyobodo necator</i>	P, B	No
	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	P	Sí
	<i>Tricodina</i> spp.	P, B	Sí
Myxozoos	<i>Myxobolus cerebralis</i>	I, C	Sí
	<i>Tetracapsula bryosalmonae</i>	R	Sí
Trematodos			
Monogéneos	<i>Dactylogyrus</i> spp.	P, A, B	Sí
	<i>Gyrodactylus</i> spp.	P, A, B	Sí
Digenéos	<i>Crepidostomum farionis</i>	I	No
	<i>Crepidostomum metoecus</i>	CP	No
	<i>Diplostomum spathaceum</i>	O	Sí
Cestodos	<i>Cyathocephalus truncatus</i>	CP, I	No
	<i>Eubothrium crassum</i>	CP, I	No
Nematodos	<i>Pseudocapillaria salvelini</i>	E	No
	<i>Salmonema ephemeridarum</i>	E, CP, I	No
	<i>Spinitectus gordonii</i>	E	No
	<i>Raphidascaris acus</i>	I	No
Acantocéfalos	<i>Acanthocephalus anguillae</i>	I	No
	<i>Echinorhynchus truttae</i>	I	No
	<i>Pomphorhynchus laevis</i>	I	No
Anélidos	<i>Piscicola geometra</i>	P, A, B	Sí
	<i>Piscicola parasitica</i>	P, A, B	Sí
Crustáceos	<i>Argulus</i> spp.	P, A	Sí

A = aletas; B = branquias; C = cartílago; CP = ciegos pilóricos; E = estómago; I = intestino; O = ojos; P = piel; R = riñón.



OBJETIVO



La presente Tesis Doctoral tiene por objetivo investigar la presencia de *Cryptosporidium* en la trucha común (*S. trutta*) y en la trucha arcoíris (*O. mykiss*) de Galicia, contribuyendo al conocimiento de las especies/genotipos de este protozoo parásito en organismos de agua dulce. Paralelamente, se estudiarán otros parásitos del tracto gastrointestinal de estos hospedadores, actualizando la información existente sobre los parasitismos que afectan a estos salmónidos en España.







MATERIAL Y MÉTODOS



1 ESTUDIO EN LA TRUCHA COMÚN (*S. TRUTTA*)

1.1 Origen y procesamiento de las muestras

Durante la temporada de pesca del año 2015 (15 de marzo-15 de agosto), varios pescadores locales capturaron un total de 613 ejemplares de trucha común (*S. trutta*) en 44 ríos pertenecientes a 10 cuencas hidrográficas de Galicia: Verdugo-Oitavén, Lárez, Ulla, Tambre, Xallas, Grande de Baio, Anllóns, Mandeo, Xuvia y Miño-Sil. Los pescadores retiraron los tractos gastrointestinales de los peces y los introdujeron individualmente en bolsas de polietileno con cierre hermético que se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su envío al Laboratorio de Parasitología. Además, los citados pescadores proporcionaron información sobre la longitud de cada ejemplar, así como la fecha y el río de captura. En la Tabla 5, se muestra la superficie, el número de ríos muestreados y de truchas analizadas de cada una de las cuencas hidrográficas, cuya localización geográfica se ilustra en la Figura 10.

Tabla 5. Superficie de las cuencas hidrográficas, número de ríos muestreados y de ejemplares de trucha común (*S. trutta*) analizados en cada una de ellas.

Cuenca hidrográfica	Área (km ²)	Ríos (n)	Truchas (n)
Verdugo-Oitavén	333,5	4	16
Lárez	449,5	4	52
Ulla	2803,0	9	220
Tambre	1530,0	10	123
Xallas	504,0	3	9
Grande de Baio	283,0	1	3
Anllóns	516,4	1	5
Mandeo	366,2	1	2
Xuvia	182,4	2	5
Miño-Sil	12307,0	9	178
Total	19275,0	44	613

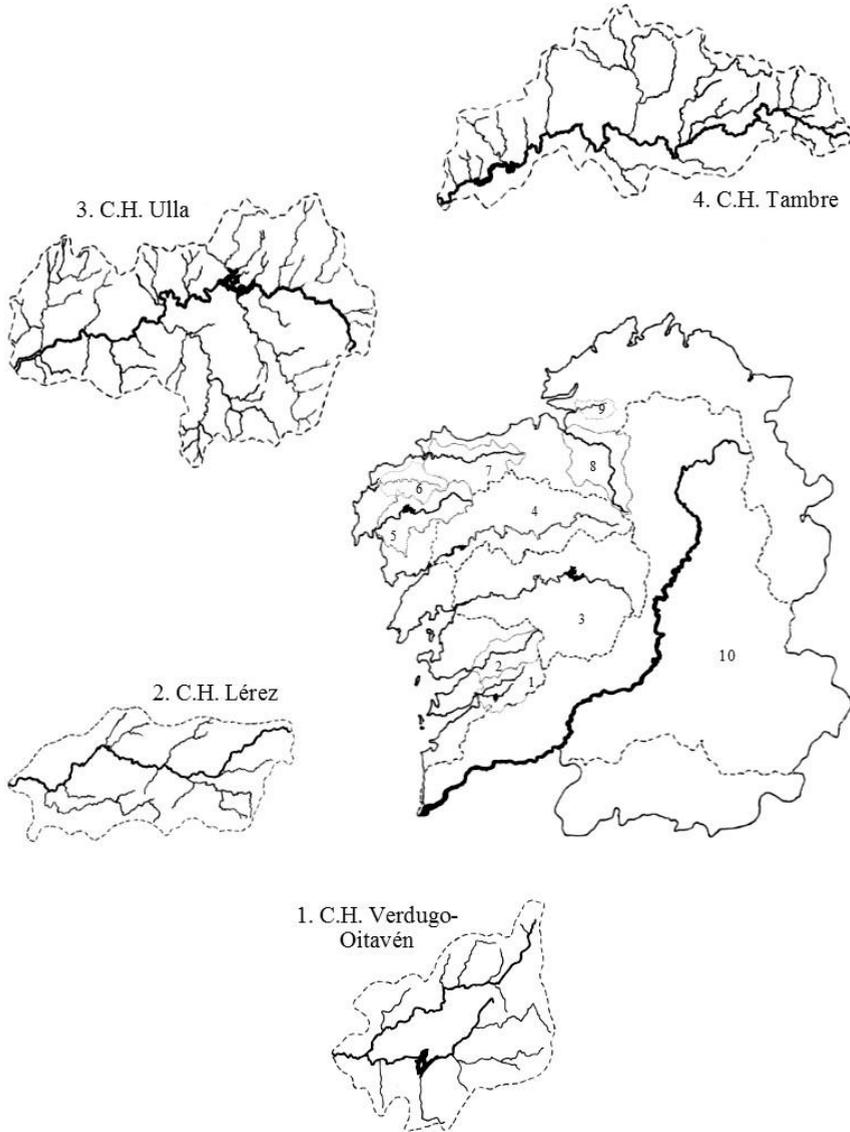
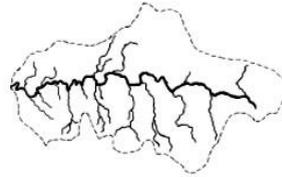
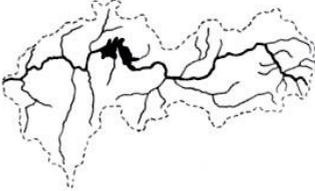


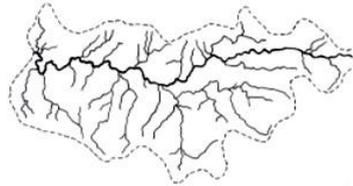
Figura 10. Localización geográfica de las cuencas hidrográficas de las que procedieron los ejemplares de trucha común (*S. trutta*) en los que se investigó la presencia de *Cryptosporidium* spp.

5. C.H. Xallas

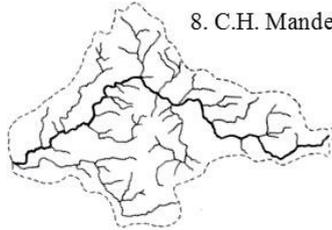


6. C.H. Grande de Baio

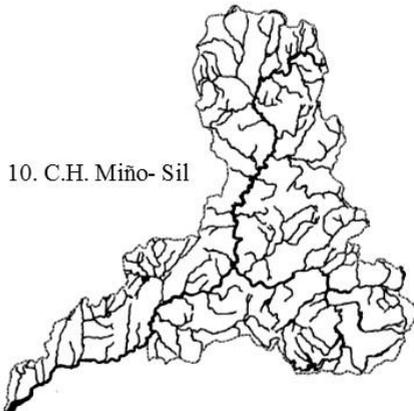
7. C.H. Anllóns



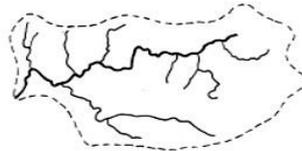
8. C.H. Mandeo



10. C.H. Miño- Sil



9. C.H. Xubia



Una vez en el laboratorio, las muestras se clasificaron de acuerdo con su longitud, con el fin de estimar la edad del pez siguiendo los criterios empleados por otros autores para truchas de la misma zona geográfica: 19,0-19,1 cm (<2 años; n = 160); 19,2-25,9 cm (2-3 años; n = 355); y, 26,0-50,0 cm (>3 años; n = 98) (Sánchez-Hernández *et al.*, 2012). Para su procesamiento, los tractos gastrointestinales se descongelaron y se diseccionaron en estómago, ciegos pilóricos e intestino (Figura 11). Cada sección se abrió longitudinalmente y se inspeccionó *de visu* y utilizando un estereomicroscopio (Z45 E, Leica Inc., Buffalo, NY, Estados Unidos) con el fin de detectar formas macroscópicas de helmintos, que una vez retiradas, se lavaron con solución salina fisiológica (SSF) (Apéndice) y se conservaron en etanol 70° para su posterior identificación. A continuación, los ciegos pilóricos se homogeneizaron en 20 mL de tampón fosfato salino (PBS) 0,04 M pH 7,2 (Apéndice) usando un homogeneizador de barras Ultra-Turrax® T25 (Ika®-Werke GmbH and Co., Kg, Staufen, Alemania), mientras que el contenido intestinal se recogió mediante raspado con la ayuda de un depresor de madera y se homogeneizó en un mortero con 20 mL de PBS 0,04 M pH 7,2.

Los homogeneizados así obtenidos se procesaron individualmente. En primer lugar, se filtraron a través de una gasa estéril y a continuación se sometieron a una concentración difásica en PBS 0,04 M pH 7,2/dietil éter (2:1) mediante centrifugación a 2000 ×g, a 4°C, durante 15 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y el proceso de concentración se repitió hasta obtener unos sedimentos libres de lípidos que, finalmente, se resuspendieron en 500-1000 µL de PBS 0,04 M pH 7,2 y se almacenaron a -20°C.

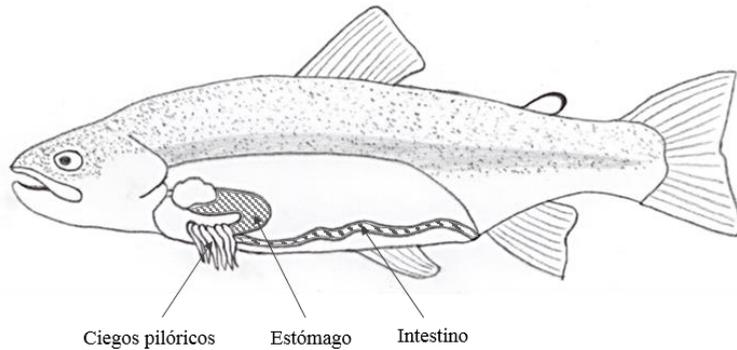


Figura 11. Ilustración de las secciones anatómicas del tracto gastrointestinal de la trucha común (*S. trutta*) examinadas.

1.2 Análisis microscópico

1.2.1 Microscopía óptica

Alícuotas de 10 μL de cada uno de los sedimentos obtenidos tras el procesamiento de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal se examinaron, por triplicado, bajo microscopía óptica de campo claro y/o contraste diferencial de interferencia (DIC) (400-1000 \times) con el fin de detectar la presencia de formas parasitarias (AX70, Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japón). El tamaño de las formas observadas se estableció empleando un micrómetro ocular y el programa informático DP Controller 2.1.1.183 (©2001-2004 Olympus Optical Co., Ltd.).

1.2.2 Microscopía de epifluorescencia

Alícuotas de 100 μL de los sedimentos obtenidos como se describe anteriormente, se depositaron en pocillos de portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (Apéndice) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con 50 μL de metanol (J.T. Baker, Deventer, Países Bajos). Una vez

evaporado el metanol, se aplicó una técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales frente a epitopos de la pared oo/quística de *Cryptosporidium* y *Giardia* y una tinción con el colorante fluorogénico 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Apéndice) para confirmar la identificación de las formas parasitarias detectadas. Para ello, se utilizó la prueba comercial *Aqua-Glo™ G/C Direct test* (Waterborne, Inc., Nueva Orleans, LA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- En cada pocillo se depositan 40 µL de una mezcla compuesta por 10 µL de la solución conteniendo anticuerpos monoclonales frente a *Cryptosporidium* y *Giardia* unidos a isotiocianato de fluoresceína (FITC), 15 µL de contracolorante azul de Evans (Apéndice) y 15 µL de PBS 0,04 M pH 7,2.
- A continuación, los portaobjetos se incuban en cámara húmeda, en oscuridad, a 4 °C, durante toda la noche.
- Tras la incubación, se lavan con PBS 0,04 M pH 7,2 en agitación suave (70 rpm), en oscuridad, durante 5 minutos.
- Posteriormente, se añaden a cada pocillo 100 µL de la solución de DAPI (1×) y los portaobjetos, de nuevo, se incuban en cámara húmeda, en oscuridad, a temperatura ambiente, durante 2-3 minutos.
- Transcurrido este tiempo, se lavan con PBS 0,04 M pH 7,2 en agitación suave (70 rpm), en oscuridad, durante 5 minutos.
- Se retira el exceso de PBS y se deja secar en oscuridad, a temperatura ambiente.
- Finalmente, sobre cada pocillo, se añaden 10 µL de medio de montaje (Apéndice) y se coloca un cubreobjetos.

Los oo/quistes se identificaron examinando los portaobjetos en un microscopio de epifluorescencia (AX70, Olympus Optical Co., Ltd.) equipado con un filtro azul de banda ancha para la tinción con FITC (excitación 450-480 nm; barrera 515 nm) de acuerdo con las siguientes características: fluorescencia verde brillante, correcto tamaño y forma de los objetos teñidos con FITC y pared oo/quística claramente visible. Para confirmar que las estructuras se correspondían con oo/quistes, se realizó un posterior examen bajo filtro UV de banda ancha para la tinción con DAPI (excitación 330-385 nm; barrera 500 nm), observando una coloración interna azul intensa o de

2-4 núcleos de color azul cielo, de acuerdo con los criterios propuestos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) (USEPA, 2005, 2012).

1.3 Caracterización molecular

1.3.1 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

La extracción del ADN se realizó a partir de 200 μ L de los sedimentos obtenidos como se describe en el Apartado 1.1, utilizando el kit comercial *Stool DNA Isolation* (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- A un tubo, conteniendo perlas de vidrio de 1 mm de diámetro (incluido en el kit), se añaden 200 μ L del sedimento, 1 mL de *Lysis Buffer L* y 100 μ L de *Lysis Additive A*. El tubo se coloca en un agitador horizontal Mini-Beadbeater-8TM (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK, Estados Unidos) y se agita a la velocidad máxima durante 5 minutos.
- A continuación, el tubo se centrifuga a 14000 $\times g$ durante 2 minutos y 600 μ L del sobrenadante se transfieren a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, añadiéndose 100 μ L de *Binding Buffer I* e incubándose en un baño de hielo durante 10 minutos.
- Posteriormente, el tubo se centrifuga a 14000 $\times g$ durante 2 minutos y 500 μ L del sobrenadante se transfieren a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, al que se añade el mismo volumen de etanol 70°.
- Seguidamente, se añaden 500 μ L de la mezcla a una columna colocada en un tubo colector y se centrifuga a 14000 $\times g$ durante 1 minuto. Este paso se repite hasta finalizar la totalidad del volumen, desechándose, cada una de las veces, el líquido del tubo colector.
- Para el lavado de la columna, inicialmente se añaden 500 μ L de *Binding Buffer C* y se centrifuga a 10000 $\times g$ durante 1 minuto. Después, se realizan dos lavados con 500 μ L de *Wash Solution A* y se centrifuga a 10000 $\times g$ durante 1 minuto, descartándose el líquido del tubo colector en cada paso.
- Finalmente, para eluir el ADN, la columna se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 1,7 mL (incluido en el kit), y se añaden 50 μ L de agua para biología molecular (H₂O_{BM}). Se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 10000 $\times g$ durante 1 minuto. El ADN así extraído se almacena a -20°C hasta su posterior utilización.

1.3.2 Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se empleó para detectar y caracterizar molecularmente las distintas especies/genotipos de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Eimeria* cuyas formas parasitarias se observaron en los sedimentos durante el análisis realizado bajo microscopía óptica o de epifluorescencia (Apartado 1.2). Todos los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos).

En todas aquellas muestras en las que se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* mediante la técnica de IFD, se llevó a cabo un protocolo de PCR-anidada que amplifica un fragmento de ~587 pares de bases (pb) del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*) de *Cryptosporidium* (Ryan *et al.*, 2003). Subsecuentemente, las muestras positivas para la *SSU-rRNA*, se sometieron a distintas técnicas de PCR-anidada para obtener fragmentos de 325, ~850 y ~1066 pb correspondientes a los *loci* que codifican la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*), la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*) y la actina, respectivamente (Sulaiman *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2014). En todos los ensayos se incluyeron controles positivos (ADN de *C. parvum* subtipo IIa17G2R1 procedente de un ternero de raza frisona infectado naturalmente) y controles negativos (H₂O_{BM}).

Las muestras en las que se observaron quistes de *Giardia* mediante la técnica de IFD también se sometieron a una amplificación por PCR para el gen que codifica la *SSU-rRNA* de *Giardia* y que origina un fragmento de ~130 pb (Appelbee *et al.*, 2003). En todos los ensayos se incluyeron controles positivos (ADN de *Giardia duodenalis* genotipo C procedente de un perro infectado naturalmente) y controles negativos (H₂O_{BM}).

Con respecto a los sedimentos en los que se observaron ooquistes de *Eimeria* mediante microscopía de campo claro, inicialmente se utilizó una técnica de PCR semi-anidada que amplifica un fragmento de ~420 pb del gen

de la *SSU-rRNA* de *Eimeria*. Los cebadores empleados, que comprenden una región hipervariable de dicho *locus*, se diseñaron en el presente estudio alineando secuencias de varias especies de *Eimeria* disponibles en la base de datos GenBank® (National Institute of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos). A continuación, con el fin de obtener un fragmento más largo del mismo gen (~1300 pb), las muestras positivas se amplificaron siguiendo el protocolo descrito por Yang *et al.* (2012). En todos los ensayos se incluyeron controles positivos (ADN de *Eimeria tenella* cepa Houghton procedente de pollos infectados naturalmente) y controles negativos (H₂O_{BM}).

Los cebadores utilizados, así como las condiciones de trabajo empleadas para la amplificación de los fragmentos de los distintos genes considerados para cada organismo diana se muestran en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

1.3.3 Visualización del resultado

Los productos resultantes de la técnica de PCR se analizaron por separación en geles de agarosa al 2% (p/v) (Bio-Rad Laboratories) conteniendo un 5% de Real Safe (Real Laboratory, Valencia, España) mediante electroforesis horizontal aplicando un voltaje constante de 70 V durante aproximadamente 45 minutos en tampón tris/ácido acético/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (TAE) (1×) (Apéndice). Los ácidos nucleicos se visualizaron usando un transiluminador UV (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories).

Tabla 6. Cebadores utilizados en la amplificación y secuenciación de fragmentos de los distintos genes considerados para la caracterización molecular de las especies/genotipos de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Eimeria*.

Organismo/Gen	Nombre	Dir.	Secuencia (5' → 3')	Referencia
<i>Cryptosporidium</i>				
<i>SSU-rRNA</i>	18SiCF2	D	GACATATCATTCAAGTTTCTGACC	Ryan <i>et al.</i> , 2003
	18SiCR2	R	CTGAAGGAGTAAGGAACAACC	
	18SiCF1	D	CCTATCAGCTTTAGACGGTAGG	
	18SiCR1	R	TCTAAGAATTTACCTCTGACTG	
<i>hsp70</i>	HSPF4	D	GGTGGTGGTACTTTTGATGTATC	Hong <i>et al.</i> , 2014
	HSPR4	R	GCCTGAACCTTTGGAATACG	
	HSPF3	D	GCTGATGATACTCACTTGGGTGG	
	HSPR3	R	CTCTGTCCATACCAGCATCC	
<i>gp60</i>	AL3531	D	ATAGTCTCCGCTGTATTC	Alves <i>et al.</i> , 2003
	AL3535	R	GGAAGGAACGATGTATCT	
	AL3532	D	TCCGCTGTATTCTCAGCC	
	AL3534	R	GCAGAGGAACCAGCATC	
<i>Actina</i>	F1	D	ATGRGWAAGAAGWARYWCAAGC	Sulaiman <i>et al.</i> , 2002
	R1	R	AGAARCA YTTTCTGTGYACAAT	
	F2	D	CAAGCWTRGTTGTTGAYAA	
	R2	R	TTTCTGTGKACAATWSWTGG	
<i>Giardia</i>				
<i>SSU-rRNA</i>	Gia2029	D	AAGTGTGGTGCAGACGGACTC	Appelbee <i>et al.</i> , 2003
	Gia2150c	R	CTGCTGCCGTCCTTGGATGT	
	RH4	D	AGTCGAACCCTGATTCTCCGCCAGG	
	RH11	R	CATCCGGTCGATCCTGCC	
<i>Eimeria</i>				
<i>SSU-rRNA</i>	Ei18sF	D	CCCAATGAAAACAGYTTCGAGG	Este estudio
	Ei18sR	R	AAACCCCTACTGTCGTTCTTG	
	ER10	R	GCCCCAACTGTCCCTATTA	
	EIF1	D	GCTTGCTCAAAGATTAAGCC	Yang <i>et al.</i> , 2012
	EIR3	R	ATGCATACTCAAAGATTACC	
	EIF3	D	CTATGGCTAATACATGCGCAATC	

Dir. = Dirección; D = directo; R = reverso

Tabla 7. Condiciones de trabajo empleadas en la amplificación mediante la técnica de PCR de fragmentos de los distintos genes considerados para la caracterización molecular de las especies/genotipos de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *Eimeria*.

Organismo	Gen/Cebadores	Fase	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos	Extensión final	
<i>Cryptosporidium</i>	SSU- <i>rRNA</i> 18SiCF2-18SiCR2 18SiCF1-18SiCR1	1	94°C, 5 min	94°C, 30 s	56°C, 30s	72°C,60 s	45	72°C, 10 min	
		2	94°C, 5 min	94°C, 30 s	56°C, 30s	72°C,60 s	45	72°C, 10 min	
	<i>hsp70</i> HSPF4-HSPR4 HSPF3-HSPR3	1	94°C, 5 min	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	40	72°C, 10 min	
		2	94°C, 5 min	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	40	72°C, 10 min	
	<i>gp60</i> AL3531-AL3535 AL3532-AL3534	1	94°C, 3 min	94°C, 45 s	50°C, 45 s	72°C, 45 s	35	72°C, 10 min	
		2	94°C, 3 min	94°C, 45 s	50°C, 45 s	72°C, 45 s	35	72°C, 10 min	
	<i>Actina</i> F1-R1 F2-R2	1	94°C, 5 min	94°C, 45 s	50°C, 45 s	72°C, 60 s	35	72°C, 10 min	
		2	94°C, 5 min	94°C, 45 s	50°C, 45 s	72°C, 60 s	35	72°C, 10 min	
	<i>Giardia</i>	SSU- <i>rRNA</i> Gia2029-Gia2150c RH4-RH11	1	96°C, 4 min	96°C, 45 s	55°C, 30 s	72°C, 45 s	35	72°C, 4 min
			2	96°C, 4 min	96°C, 45 s	59°C, 30 s	72°C, 45 s	35	72°C, 4 min
<i>Eimeria</i>	SSU- <i>rRNA</i> Ei18sF-Ei18sR Ei18sF-ER10 EIF1-EIR3 EIF3-EIR3	1	94°C, 5 min	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	40	72°C, 10 min	
		2	94°C, 5 min	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 30 s	40	72°C, 10 min	
		1	94°C, 3 min	94°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 90 s	35	72°C, 7 min	
		2	94°C, 3 min	94°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 90 s	45	72°C, 7 min	

1.3.4 Purificación de los productos de PCR

Las muestras cuyo fragmento amplificado se correspondía con el tamaño esperado se clasificaron como positivas y se purificaron utilizando el kit comercial *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN®, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Sobre el producto de PCR se adicionan 5 volúmenes de *Buffer PB* y se agita en un mezclador de vórtice (Genius 3, Ika®-Werke GmbH and Co.).
- A continuación, se coloca la columna en un tubo colector, se deposita la mezcla anterior y se centrifuga a 13000 $\times g$ durante 1 minuto. Se descarta el líquido del tubo colector.
- Para el lavado, se añaden a la columna 750 μL de *Buffer PE* y se centrifuga a 13000 $\times g$ durante 1 minuto. Se desecha el líquido del tubo colector y se vuelve a centrifugar a 13000 $\times g$ durante 1 minuto con el fin de garantizar el secado de la resina que contiene la columna.
- Para la elución del producto de PCR, la columna se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL al que se añaden 50 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{BM}}$. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 1 minuto, se centrifuga de nuevo a 13000 $\times g$ durante 2 minutos. El producto de PCR así purificado se almacena a -20°C .

Finalmente, la cuantificación del ADN se realizó utilizando 1 μL del producto de PCR purificado en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

1.3.5 Secuenciación del ADN y análisis filogenético

Con el fin de identificar las especies/genotipos de los tres géneros previamente considerados (*Cryptosporidium*, *Giardia* y *Eimeria*), así como determinar las diferencias nucleotídicas existentes, los productos de PCR purificados se enviaron a la empresa *Eurofins Scientific* (Luxemburgo) para su secuenciaron en ambas direcciones de acuerdo con el método establecido por Sanger *et al.* (1977), empleando concentraciones de 20-80 ng/ μL de ADN purificado y 5 pmol/ μL del cebador correspondiente.

Las secuencias obtenidas se alinearon y examinaron usando los programas informáticos SeqMan™ 7.0 (DNASTAR®, Madison, WI, Estados Unidos) y BioEdit 7.2.3 (©1997-2013 Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las secuencias consenso resultantes se compararon con otras secuencias depositadas en la base de datos GenBank® (National Institute of Health) utilizando el programa informático BLAST® 2.2.31 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, Estados Unidos).

Los análisis filogenéticos y evolutivos entre las secuencias obtenidas y aquellas depositadas en la base de datos GenBank® (National Institute of Health) se llevaron a cabo con el programa informático MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) basándose en las distancias genéticas calculadas mediante el modelo de 2-parámetros propuesto por Kimura (1980).

1.4 Análisis de formas macroscópicas de helmintos

1.4.1 Identificación

Las formas macroscópicas de helmintos recuperadas y conservadas en etanol 70° como se describe en el Apartado 1.1, se procesaron de acuerdo con su clase taxonómica. Los trematodos se tiñeron con carmín clorhídrico (Apéndice) mientras que los nematodos y los acantocéfalos se tiñeron con lactofenol-azul de algodón (Apéndice). La identificación de las formas parasitarias se realizó siguiendo las descripciones reportadas por Moravec (1994, 2004), Gibson (1996) y Buchmann y Bresciani (2001) tras la obtención de microfotografías en un microscopio equipado con una cámara digital (AX70, Olympus Optical Co., Ltd.).

1.4.2 Estudio de la comunidad helmíntica

Para el estudio de la comunidad helmíntica se consideraron los resultados obtenidos del análisis de 521 truchas del total de las 613 examinadas y procedentes de las tres cuencas hidrográficas en las que se capturaron un número superior a 100 ejemplares (cuencas hidrográficas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil) (Tabla 5). Se determinaron los parámetros prevalencia, intensidad media y abundancia media para describir la población parasitaria de acuerdo con los criterios establecidos por Bush *et al.* (1997). La prevalencia se define como el porcentaje de hospedadores infectados por un único taxón. La intensidad media es el número de individuos de un determinado taxón encontrados en un hospedador, dividido entre el número total de hospedadores infectados por dicho taxón. La abundancia media se calcula dividiendo el número total de especímenes de un taxón encontrado en un hospedador entre el número total de hospedadores examinados (incluyendo tanto los infectados como los no infectados). La infracomunidad es un término empleado para referirse a los individuos de todos los taxones identificados en un único hospedador. Además, se utilizaron otros parámetros ecológicos para estudiar la comunidad helmíntica de acuerdo con Magurran (1988). Así, la riqueza de especies (S) se define como el número total de especies identificadas. Para estimar la diversidad de helmintos se utilizaron: el índice de diversidad de Shannon-Wiener (H'), que cuantifica la proporción de individuos que representa cada especie encontrada; el índice de homogeneidad de Shannon-Wiener ($H'E$), que mide la uniformidad relativa de las especies presentes; y, el índice de Simpson (D'), que establece la dominancia relativa de las diferentes especies.

2 ESTUDIO EN LA TRUCHA ARCOÍRIS (*O. MYKISS*)

2.1 Recogida y procesamiento de las muestras

Una piscifactoría de trucha arcoíris (*O. mykiss*), ubicada en el lugar de Besteiros, municipio de A Estrada, próximo a Santiago de Compostela, se visitó mensualmente durante un año hidrológico, entre octubre de 2015 y septiembre de 2016. Las instalaciones de dicha piscifactoría ocupan un área de 500 m², disponen de 24 tanques y tienen una capacidad de producción anual de 60-65 toneladas. El suministro de agua lo proporciona el río Oca, un pequeño afluente del río Ulla, manteniéndose a un flujo de 140 L/s. Los tanques se desinfectan regularmente, con formaldehído y sulfacloramina T, y los peces se tratan con los antibióticos florfenicol y flumequina cuando se confirman brotes bacterianos (Figura 12).

2.1.1 Peces

Durante la realización del estudio, se dispuso de un total de 360 ejemplares de trucha arcoíris, sin aparentes signos clínicos de enfermedad, que se clasificaron según su tamaño: T1 (<12 cm; n = 120); T2 (12-18 cm; n = 120); y, T3 (>18 cm; n = 120). Mensualmente, se recogieron 10 especímenes de cada grupo, que, de acuerdo con la legislación vigente (OIE, 2012), se sacrificaron en la propia piscifactoría por choque térmico (hipotermia). Una vez en el laboratorio, las truchas se pesaron, se midieron (longitud corporal total) y se diseccionaron para extraer los tractos gastrointestinales que se diferenciaron en ciegos pilóricos e intestino. Ambas muestras se procesaron del mismo modo que las correspondientes a las obtenidas de trucha común como se describe en el Apartado 1.1.



Figura 12. Fotografías de las instalaciones de la piscifactoría de trucha arcoíris (*O. mykiss*) visitada mensualmente durante un año hidrológico.

(A) Rejilla de entrada; (B) Tanque de sedimentación; (C) Tanques de engorde; (D) Primer plano de alevines.

2.1.2 Muestras hídricas

En cada visita mensual a la piscifactoría, también se recogieron, en contenedores de polipropileno (20 L), muestras de agua del influente (agua de río) y del efluente. Las muestras se transportaron de inmediato al Laboratorio de Parasitología donde se procesaron de acuerdo con el método 1623 de la USEPA: *Cryptosporidium* y *Giardia* en agua por filtración/IMS/FA (USEPA, 2005, 2012), utilizando el sistema Filta-Max® (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

- Filtración de las muestras

Las muestras se filtraron en el laboratorio empleando una bomba de taladro Gardena (Husqvarna AB, Huskvarna, Suecia). Los filtros del sistema Filta-Max[®] constan de anillos de gomaespuma comprimidos por dos discos. Estos se colocan en la cápsula de filtración que se conecta a la bomba de agua. Una vez filtrado el volumen establecido, se retira el filtro para su elución.

- Elución de los filtros de gomaespuma

El equipo consta de dos cámaras conectadas mediante una varilla de aspiración, una cámara superior de elución, donde se coloca el filtro, y una cámara inferior de concentración, la cual dispone de un soporte poroso en el fondo sobre el que se coloca un filtro de membrana de nitrocelulosa de 2 μm de tamaño de poro y 73 mm de diámetro (IDEXX Laboratories Inc.). A través de un sistema de bombeo, el filtro se expande y comprime, permitiendo el lavado de los anillos de gomaespuma mediante el líquido de elución (Apéndice).

- Concentración de la muestra

El líquido eluido, contenido en la cámara de concentración, se filtra a través de la membrana ubicada en el fondo de esta con ayuda de una bomba de vacío Fisherbrand[™] FB 70155 (Fisher Scientific S.L., Madrid, España).

- Lavado de la membrana

Por último, la membrana se introduce en una bolsa de polietileno con cierre hermético y se lava manualmente tres veces con 4,5 mL de PBS 0,04 M pH 7,2. El líquido de lavado se transfiere a un tubo de fondo cónico de 15 mL.

Las muestras así concentradas se centrifugaron a 2000 $\times g$ durante 15 minutos, los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se resuspendieron en 2 mL de PBS 0,04 M pH 7,2. Un mililitro del sedimento resuspendido se sometió a la técnica de inmunoseparación magnética (IMS) utilizando el kit comercial *Dynabeads[®] GC-Combo* (Applied Biosystems, Life Technologies A.S., Oslo, Noruega) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- En un tubo de microcentrífuga de 2 mL se añade 1 mL del sedimento obtenido tras la concentración y se centrifuga a 10000 $\times g$ durante 10 minutos. Se descarta el sobrenadante y se adiciona hasta 1 mL de agua destilada en función del volumen del sedimento.

- A continuación, se añaden 100 μL de *SLTM-Buffer A*, 100 μL de *SLTM-Buffer B*, 25 μL de *Dynabeads[®] anti-Cryptosporidium* y 25 μL de *Dynabeads[®] anti-Giardia* y el tubo se incuba en un agitador rotatorio (MXICI, Dynal[®] A.S., Oslo, Noruega) a 18 rpm, a temperatura ambiente, durante 1 hora.
- Transcurrido el tiempo de incubación, el tubo se fija a un concentrador de partículas magnéticas MPC-S (Dynal[®] A.S.) y se balancea manualmente mediante oscilaciones suaves de 90° durante 2 minutos.
- Seguidamente, todo el sobrenadante se vacía por inversión del concentrador de partículas magnéticas, se añade 1 mL de *SLTM-Buffer A* y se balancea del mismo modo durante 1 minuto, descartándose, de nuevo, el sobrenadante.
- Para disociar los oo/quistes del complejo *Dynabeads[®]*, se retira la banda magnética, se añaden 50 μL de ácido clorhídrico 0,1 N y se agita en un mezclador de vórtice (Genius 3, Ika[®]-Werke GmbH and Co.) durante 10 segundos. Se deja reposar en el concentrador de partículas magnéticas a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Finalmente, se coloca de nuevo la banda magnética y, transcurridos 10 segundos, se recoge el sobrenadante (50 μL).

2.2 Detección y caracterización molecular de *Cryptosporidium* y *Giardia*

Alícuotas de los sedimentos obtenidos a partir de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal de cada trucha (100 μL) y de las muestras de agua purificada mediante la técnica de IMS (50 μL) se procesaron como se describe en el Apartado 1.2.2 con el fin de detectar oo/quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia*. Aquellas muestras que resultaron positivas mediante la técnica de IFD se caracterizaron molecularmente como se describe en el Apartado 1.3.

3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El programa estadístico Statgraphics[®] Centurion XVI v.16.2.04 (©1982-2013 StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, Estados Unidos) se empleó para el análisis estadístico. Los tests Exacto de Fisher y chi-cuadrado (χ^2) se utilizaron para determinar las diferencias entre los porcentajes

obtenidos. El ajuste de los datos a una distribución normal se comprobó mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov, excepto en aquellos casos en los que el tamaño muestral fue reducido ($n < 50$), en los que se aplicó el estadístico de Shapiro-Wilk. Las intensidades medias se compararon utilizando el test paramétrico t de Student cuando los datos se ajustaron a la distribución normal y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney en caso contrario. Los resultados se consideraron significativos para $P < 0,05$.







RESULTADOS



1 RESULTADOS DEL ESTUDIO EN LA TRUCHA COMÚN (*S. TRUTTA*)

Durante la temporada de pesca del año 2015 (15 de marzo - 15 de agosto), se investigó, mediante técnicas microscópicas y/o de biología molecular la presencia de protozoos, helmintos y otros parásitos en el tracto gastrointestinal de 613 ejemplares de trucha común (*S. trutta*) capturados en 44 ríos gallegos pertenecientes a 10 cuencas hidrográficas por pescadores locales, quienes, además, proporcionaron información sobre la longitud de cada ejemplar, así como la fecha y el río de captura.

1.1 *Cryptosporidium*

1.1.1 Detección de ooquistes mediante microscopía de epifluorescencia

Mediante la técnica de IFD y la tinción con DAPI, se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 103 de las 613 muestras gastrointestinales de trucha común analizadas, estableciéndose una prevalencia del 16,8% y una intensidad media de 326,7 ooquistes/trucha. Las prevalencias, las intensidades medias y la localización gastrointestinal de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectadas para cada grupo de edad, establecido de acuerdo con la longitud de los ejemplares, se muestran en la Tabla 8.

Considerando los grupos de edad, la prevalencia más alta se detectó en ejemplares menores de 2 años (23,1%), siendo este valor significativamente superior con respecto al obtenido en el grupo de ejemplares de 2-3 años (13,5%; $P = 0,01$) pero no al correspondiente porcentaje hallado en las truchas de mayor edad (18,4%). La intensidad de parasitación osciló entre un mínimo de 4 y un máximo de 8148 ooquistes/trucha, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de edad establecidos.

Teniendo en cuenta la ubicación anatómica, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se encontraron en los ciegos pilóricos (72 truchas; 69,9%); en el intestino (15 truchas; 14,6%); y, en ambas localizaciones (16 truchas; 15,5%), observándose diferencias estadísticamente significativas entre las dos localizaciones ($P < 0,01$). Aunque la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en los ciegos pilóricos aumentó con la edad de la trucha (62,2% vs. 70,8% vs. 83,3%), las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, la presencia de ooquistes en el intestino disminuyó con la edad de los ejemplares, aunque los porcentajes tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas (21,6% vs. 12,5% vs. 5,5%). La intensidad media de parasitación fue mayor en los ciegos pilóricos que en las muestras intestinales (298,4 vs. 54,3 ooquistes/trucha); sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

Tabla 8. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en ejemplares de trucha común (*S. trutta*) capturados en ríos gallegos y agrupados de acuerdo con su longitud y edad estimada.

Grupo de edad			Localización anatómica [■]		
			CP	INT	CP+INT
19,0*-19,1 cm (<2 años) n = 160	Muestras positivas (n/%)	37 / 23,1	23 / 62,2	8 / 21,6	6 / 16,2
	Intensidad media	157,5	210,4	86,6	49,1
	(rango, ooquistes/trucha)	(4-3684)	(4-3684)	(11-450)	(17-169)
19,2-25,9 cm (2-3 años) n = 355	Muestras positivas (n/%)	48 / 13,5	34 / 70,8	6 / 12,5	8 / 16,7
	Intensidad media	452,5	322,8	19,5	1328,4
	(rango, ooquistes/trucha)	(5-8148)	(5-8148)	(6-41)	(16,9-5056,3)
26,0-50,0 cm (>3 años) n = 98	Muestras positivas (n/%)	18 / 18,4	15 / 83,3	1 / 5,5	2 / 11,1
	Intensidad media	339,4	378,2	5,0	215,4
	(rango, ooquistes/trucha)	(5-3748)	(6-3748)	(5)	(86-344,8)
Total n = 613	Muestras positivas (n/%)	103 / 16,8	72 / 69,9	15 / 14,6	16 / 15,5
	Intensidad media	326,7	298,4	54,3	709,5
	(rango, ooquistes/trucha)	(4-8148)	(4-8148)	(5-450)	(17-5056,3)

[■]CP = ciegos pilóricos; INT = intestino; CP+INT = ciegos pilóricos e intestino; *Tamaño mínimo legal.

Es destacable la observación de grupos constituidos por 4-20 estructuras compatibles con ooquistes en los ciegos pilóricos de 5 truchas cuya longitud corporal estaba comprendida entre 20-28 cm (>2 años). La fluorescencia verde brillante, el tamaño y forma de las estructuras teñidas, la pared claramente visible y la coloración azul intensa de su interior o la presencia de 2-4 núcleos de color azul cielo, confirmó que dichos grupos estaban formados por ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Figura 13).

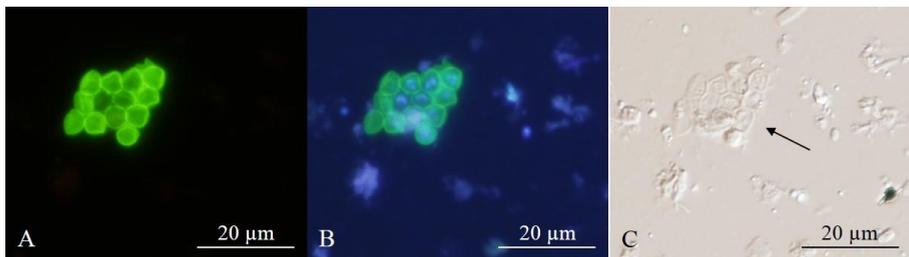


Figura 13. Microfotografías de un grupo de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. observado en los ciegos pilóricos de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

(A) Técnica de inmunofluorescencia directa; (B) Tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol; (C) Contraste diferencial de interferencia.

Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se detectaron en truchas capturadas en 27 de los 44 ríos gallegos muestreados (61,4%) pertenecientes a 9 cuencas hidrográficas. Se obtuvieron prevalencias superiores al 50% en peces capturados en ríos de todas las cuencas hidrográficas, excepto en aquellos de las cuencas de los ríos Ulla (33,3%) y Anllóns (0%) (Tabla 9).

Tabla 9. Presencia de *Cryptosporidium* spp. en ríos gallegos de 10 cuencas hidrográficas inferida a partir del análisis de ejemplares de trucha común (*S. trutta*).

Cuenca hidrográfica	Ríos (n)	Ríos positivos (%)	Truchas (n)	Truchas positivas (%)
Verdugo-Oitavén	4	3 (75,0%)	16	8 (50,0%)
Lérez	4	4 (100%)	52	18 (34,6%)
Ulla	9	3 (33,3%)	220	29 (13,2%)
Tambre	10	6 (60,0%)	123	21 (17,1%)
Xallas	3	3 (100%)	9	4 (44,4%)
Grande de Baio	1	1 (100%)	3	1 (33,3%)
Anllóns	1	0 (0,0%)	5	0 (0,0%)
Mandeo	1	1 (100%)	2	1 (50,0%)
Xuvia	2	1 (50,0%)	5	4 (80,0%)
Miño-Sil	9	5 (55,5%)	178	17 (9,6%)
Total	44	27 (61,4%)	613	103 (16,8%)

1.1.2 Caracterización molecular

De las 103 muestras gastrointestinales de trucha común en las que se observaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. mediante la técnica de IFD, en 48 ejemplares se amplificó un fragmento del gen que codifica la *SSU-rRNA* de *Cryptosporidium*. Así, la especie *C. parvum* se identificó en 47 peces, incluyendo las 5 truchas en cuyos ciegos pilóricos se observaron microscópicamente grupos constituidos por 4-20 ooquistes. Se obtuvieron 3 secuencias parciales (números de acceso en la base de datos GenBank® MH074866-MH074868) que mostraron una similitud genética del 99% entre ellas y con respecto a la secuencia de *C. parvum* aislada de terneros y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso KY619841. En el ejemplar de trucha restante y correspondiente a la muestra de ciegos pilóricos, se obtuvo una secuencia próxima a *C. molnari* (número de acceso en la base de datos GenBank® MH074869), mostrando una similitud del 92% con respecto a la secuencia de la misma especie obtenida a partir del epitelio gástrico de la dorada (*S. aurata*) y depositada en la base de datos GenBank®

con el número de acceso HM243547. El análisis filogenético reveló que los aislados de los 47 ejemplares de trucha común eran 100% homólogos a *C. parvum* y el aislado restante era genéticamente distinto, agrupándose próximo a *C. molnari* (12,6% de distancia genética) (Figuras 14 y 15).

Para el gen *hsp70*, se obtuvieron 6 secuencias parciales en 43 de las 48 muestras positivas para la *SSU-rRNA*, que mostraron 1-3 diferencias nucleotídicas y una similitud genética del 97-99% entre ellas (números de acceso en la base de datos GenBank® MH107839-MH107844). Todas las muestras se caracterizaron como *C. parvum* y mostraron una similitud del 99% con respecto a la secuencia de la misma especie aislada de terneros y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso KX342050. El análisis filogenético reveló que los aislados obtenidos mostraron una homología del 99-100% con respecto a *C. parvum* (Figura 16).

Secuencias parciales del gen *gp60* se obtuvieron en 10 de los 48 peces positivos para la *SSU-rRNA* (números de acceso en la base de datos GenBank® MH107845 y MH107846). Los subtipos de *C. parvum* IIaA18G3R1 (identificado en 9 muestras con una similitud genética del 100% entre ellas) y IIaA15G2R1 (identificado en una muestra) exhibieron una similitud del 99% con respecto a las secuencias encontradas en muestras humanas y depositadas en la base de datos GenBank® con los números de acceso JF727758 y JF727755, respectivamente. El análisis filogenético reveló que los aislados obtenidos en la trucha común eran 100% homólogos a otros pertenecientes a la familia IIa de *C. parvum* (Figura 17).

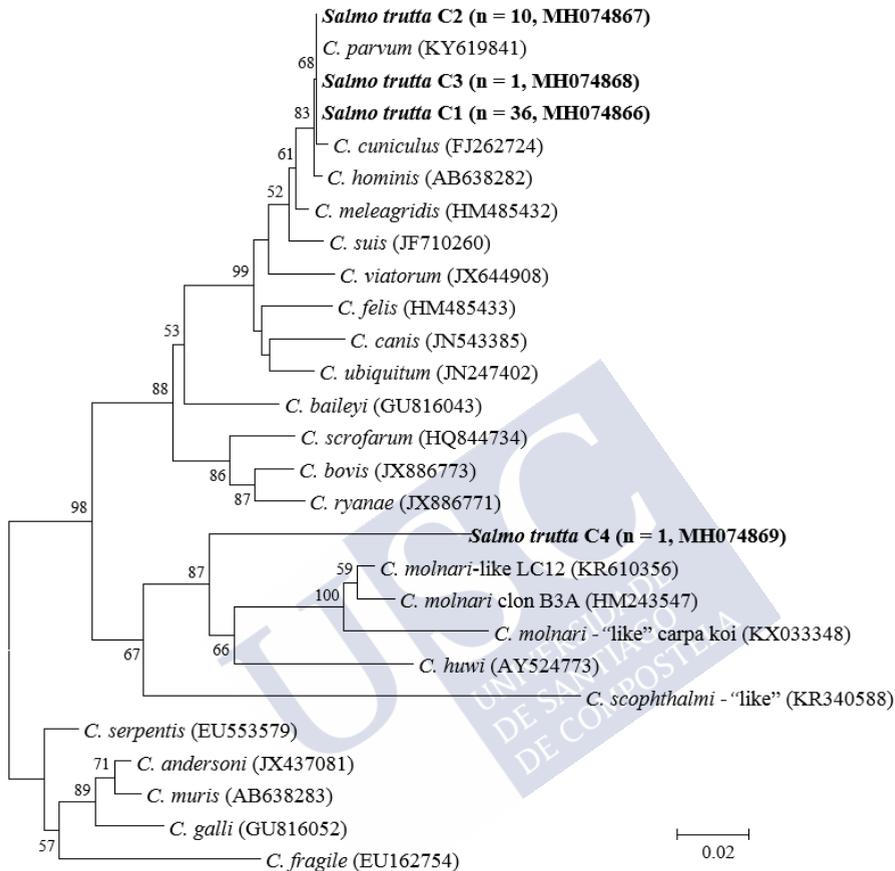


Figura 14. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores "bootstrap" (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

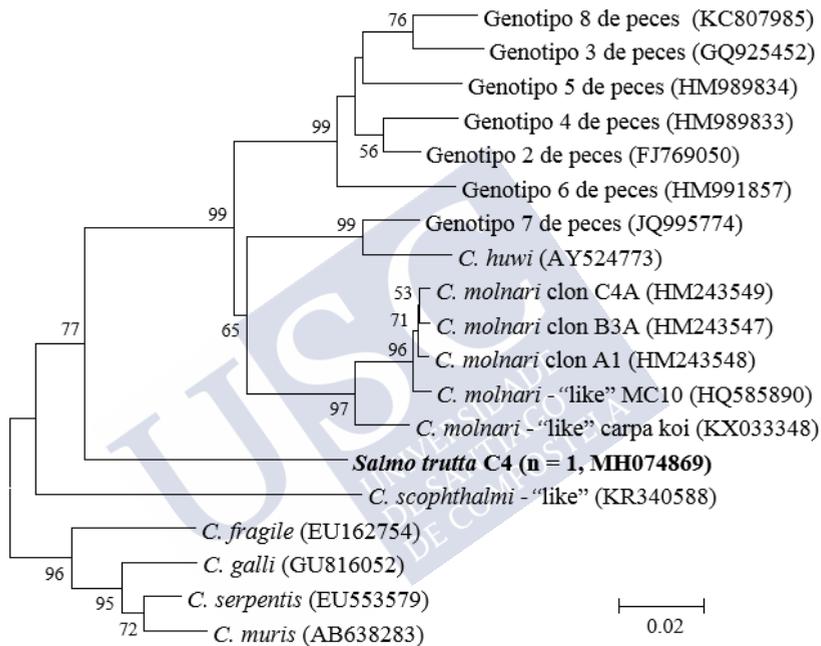


Figura 15. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies/genotipos del género reconocidos en peces, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores "bootstrap" (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

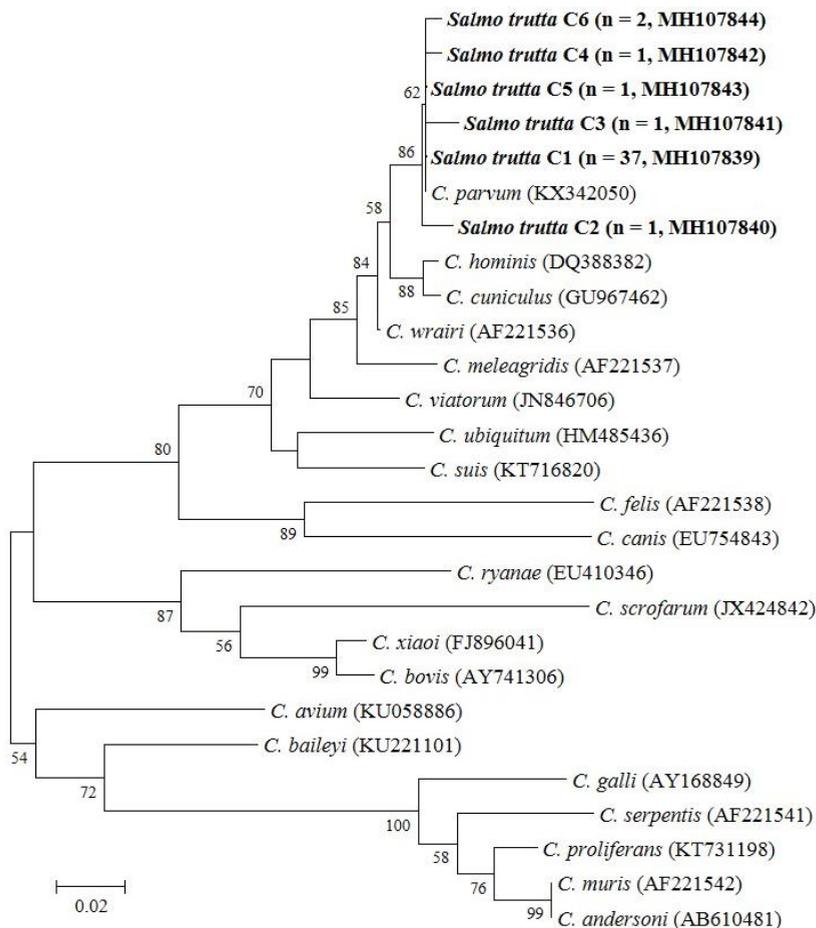


Figura 16. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores “bootstrap” (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

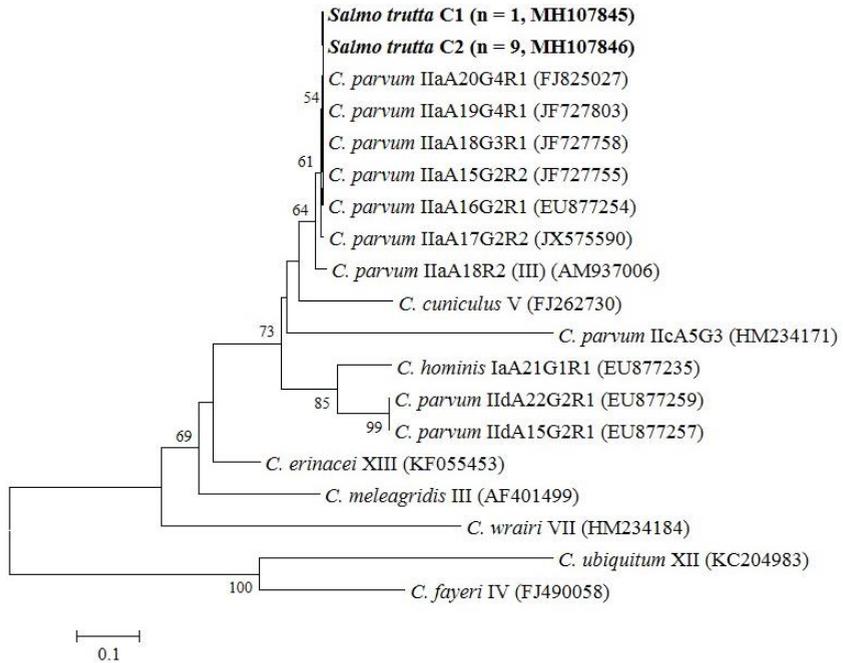


Figura 17. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la glicoproteína de 60 kDa (*gp60*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores "bootstrap" (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

Finalmente, se obtuvieron secuencias parciales del gen que codifica la actina en 7 de las 48 truchas positivas para la *SSU-rRNA* (número de acceso en la base de datos GenBank® MH107847), identificando *C. parvum* en todas ellas y mostrando una similitud del 100% con respecto a la secuencia de la misma especie obtenida de ganado bovino y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso AF382338. El análisis filogenético reveló que estos aislados eran 100% homólogos a *C. parvum* (Figura 18).

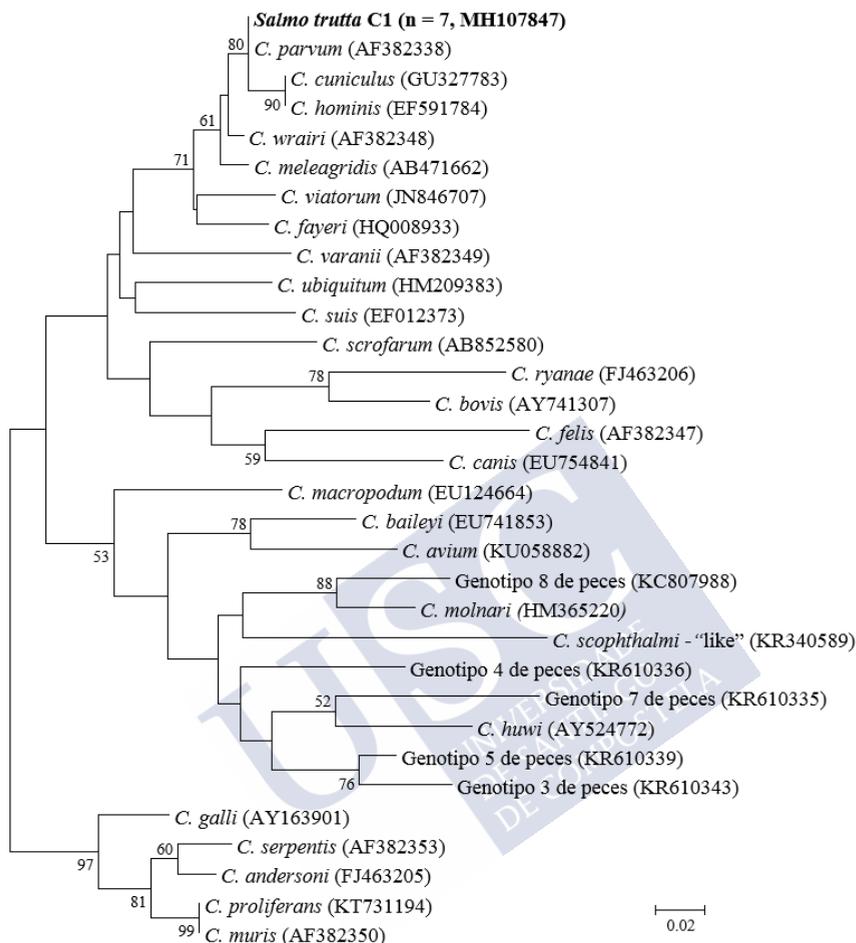


Figura 18. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la actina, mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies/genotipos del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores "bootstrap" (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

1.2 *Giardia*

De los 613 ejemplares de trucha común (*S. trutta*) analizados mediante la técnica de IFD, se observaron quistes de *Giardia* sp. en tan solo un ejemplar de 23 cm de longitud capturado en el río Barreiro perteneciente a la cuenca hidrográfica de los ríos Miño-Sil (0,16%). Los quistes se visualizaron tanto en la muestra de ciegos pilóricos como en el contenido intestinal, cuantificándose 6 y 13 quistes, respectivamente (Figura 19).

Todos los intentos de amplificar un fragmento del gen que codifica la *SSU-rRNA* de *Giardia*, con el fin de caracterizar molecularmente el aislado, fueron infructuosos.

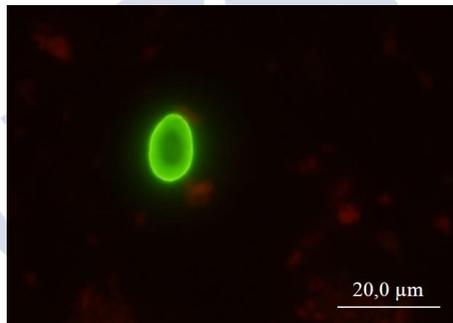


Figura 19. Microfotografía de un quiste de *Giardia* sp. detectado mediante microscopía de epifluorescencia en la muestra de ciegos pilóricos de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

1.3 *Eimeria*

1.3.1 Detección de ooquistes mediante microscopía óptica

El examen microscópico bajo campo claro y/o DIC de tres alícuotas de 10 μ L de cada uno de los sedimentos obtenidos a partir de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal de las 613 truchas analizadas, reveló la presencia de ooquistes de *Eimeria* sp. en 189 muestras, estableciéndose una prevalencia del 30,8% y una intensidad media de 2145,9 ooquistes/trucha (rango 60-53 550 ooquistes/trucha). Los ooquistes se encontraron en los ciegos pilóricos (164 truchas; 86,8%); en el contenido intestinal (9 truchas; 4,8%); y, en ambas localizaciones (16 truchas; 8,5%), comprobando la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las dos secciones anatómicas ($P < 0,01$). Las prevalencias, las intensidades medias y la localización anatómica de los ooquistes de *Eimeria* sp. obtenidas para cada grupo de edad, establecido de acuerdo con la longitud de los ejemplares, se muestran en la Tabla 10.

Teniendo en cuenta los grupos de edad, se observó que tanto los valores de prevalencia como de intensidad media se incrementan a medida que aumenta la longitud del pez, si bien no de forma estadísticamente significativa. Así, prevalencias de 28,1%; 31,5%; y, 32,7% e intensidades medias de 1085,8; 2275,7; y, 3182,5 ooquistes/trucha se establecieron para ejemplares de trucha menores de 2 años, entre 2 y 3 años y mayores de 3 años, respectivamente. Sin embargo, cuando se considera la localización anatómica se observó que la presencia de ooquistes de *Eimeria* sp. en los ciegos pilóricos aumentó con la edad de los peces (71,1% vs. 89,3% vs. 100%), siendo significativamente superior en los ejemplares mayores de 3 años ($P < 0,05$). De igual forma, las intensidades medias experimentaron esta tendencia, pero los incrementos no fueron estadísticamente significativos (1164,5; 2432,8; y, 3182,5 ooquistes/trucha) (Tabla 10).

Los ooquistes visualizados presentaban una forma esférica (10,3-11,8 μm de diámetro), una pared fina y estaban esporulados. En cada ooquiste se observaron 4 esporocistos (8,1-9,2 μm de largo y 4,3-5,2 μm de ancho) y un cuerpo de Stieda con forma de disco (2,2-3,0 μm de diámetro). Cada esporocisto mostró 2 esporozoítos flexionados (7,1-8,1 μm de largo y 1,1-1,9 μm de ancho) y un cuerpo residual granular (Figura 20). El tamaño de los ooquistes esporulados, esporocistos y otras características morfológicas permitieron identificarlos como ooquistes correspondientes a la especie *Eimeria truttae* (Léger y Hesse, 1919) de acuerdo con las descripciones realizadas por Molnar y Hanek (1974) y Álvarez-Pellitero y González-Lanza (1983) (Tabla 11).

1.3.2 Caracterización molecular

La amplificación y posterior secuenciación de un fragmento de ~420 pb del gen que codifica la *SSU-rRNA* de *Eimeria* permitió obtener secuencias parciales en 100 de las 189 muestras de trucha en las que previamente se identificaron ooquistes de *E. truttae* mediante microscopía óptica, hallándose la misma secuencia en la totalidad de las muestras (número de acceso en la base de datos GenBank® MK425194). Esta secuencia representativa mostró una similitud del 96% con respecto a la secuencia de *Eimeria nemethi* aislada del alburno (*Alburnus alburnus*) y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso GU479634.

Tabla 10. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de los ooquistes de *Eimeria* sp. en ejemplares de trucha común (*S. trutta*) capturados en ríos gallegos de acuerdo con el grupo de edad establecido.

Grupo de edad		Localización anatómica [■]			
		CP	INT	CP+INT	
19,0*-19,1 cm (<2 años) n = 160	Muestras positivas (n/%)	45 / 28,1	32 / 71,1	6 / 13,3	7 / 15,6
	Intensidad media	1085,8	1164,5	254,7	1438,3
	(rango, ooquistes/trucha)	(70-17384)	(70-17384)	(100-420)	(206-6069)
19,2-25,9 cm (2-3 años) n = 355	Muestras positivas (n/%)	112 / 31,5	100 / 89,3	3 / 2,7	9 / 8,0
	Intensidad media	2275,7	2432,8	108,7	1253,0
	(rango, ooquistes/trucha)	(63-53550)	(63-53550)	(80-130)	(293-2384)
26,0-50,0 cm (>3 años) n = 98	Muestras positivas (n/%)	32 / 32,7	32 / 100	0 / 0	0 / 0
	Intensidad media	3182,5	3182,5	-	-
	(rango, ooquistes/trucha)	(60-31372)	(60-31372)	-	-
Total n = 613	Muestras positivas (n/%)	189 / 30,8	164 / 86,8	9 / 4,8	16 / 8,5
	Intensidad media	2145,9	2331,6	206,0	1334,1
	(rango, ooquistes/trucha)	(60-53550)	(60-53550)	(80-420)	(206-6069)

■CP = ciegos pilóricos; INT = intestino; CP+INT = ciegos pilóricos e intestino; *Tamaño Mínimo legal.

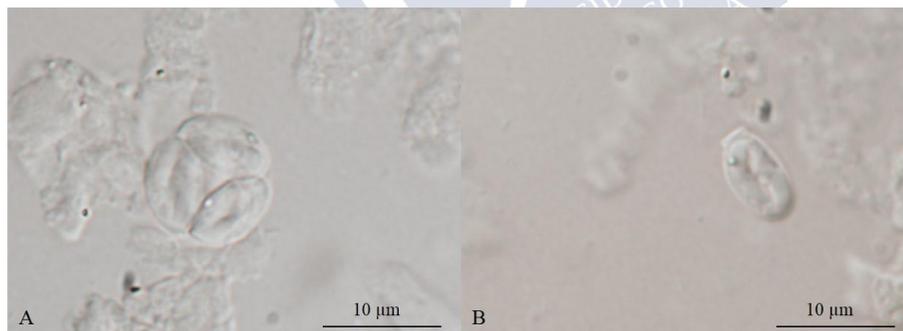


Figura 20. Microfotografías de ooquistes de *E. truttae* observados en una muestra de ciegos pilóricos de trucha común (*S. trutta*) bajo contraste diferencial de interferencia. (A) Ooquiste esporulado; (B) Esporocisto con dos esporozoítos en su interior.

Tabla 11. Comparación de los datos morfométricos (μm) de los ooquistes de *Eimeria* detectados en trucha común (*S. trutta*) capturada en varios ríos de Galicia con los publicados previamente para *E. truttae*.

	Molnar y Hanek (1974)	Álvarez-Pellitero y González-Lanza (1983)	Este estudio
Ooquiste			
Media (rango)	12,8 (12,3-13,0)	11,5 (10,5-12,0)	11,2 (10,3-11,8)
DS	-	-	0,4
Longitud esporocisto			
Media (rango)	10,1 (9,3-11,0)	8,4 (8,0-9,0)	8,6 (8,1-9,2)
DS	-	-	0,3
Ancho esporocisto			
Media (rango)	6,0 (5,0-6,5)	4,6 (4,5-5,0)	4,8 (4,3-5,2)
DS	-	-	0,2
Cuerpo Stieda			
Media (rango)	2,7 (2,6-2,8)	2,6 (2,4-2,8)	2,6 (2,2-3,0)
DS	-	-	0,3
Longitud esporozoíto			
Media (rango)	8,5 (7,8-9,0)	8,1 (7,0-9,0)	7,6 (7,1-8,1)
DS	-	-	0,2
Ancho esporozoíto			
Media (rango)	1,6 (1,3-2,0)	1,5 (1,0-1,8)	1,4 (1,1-1,9)
DS	-	-	0,2

DS = desviación estándar

Mediante la amplificación de un fragmento de mayor tamaño del mismo gen (~ 1300 pb), se obtuvieron dos secuencias parciales representativas que mostraron 5 diferencias nucleotídicas y una similitud genética del 99,6% entre ellas (números de acceso en la base de datos GenBank[®] MK425195 y MK425196). El análisis filogenético reveló que estas secuencias eran genéticamente distintas y se agrupaban dentro del clado de especies de *Eimeria* que infectan a peces, mostrando similitudes del 96,7% con *E. nemethi*; 91,1% con *Eimeria percae*; 90,8% con *Eimeria variabilis*; 88,5% con *Eimeria anguillae*; 87,5% con *Eimeria rutili*; y, 83,5% con *Eimeria daviesae* (Figura 21).

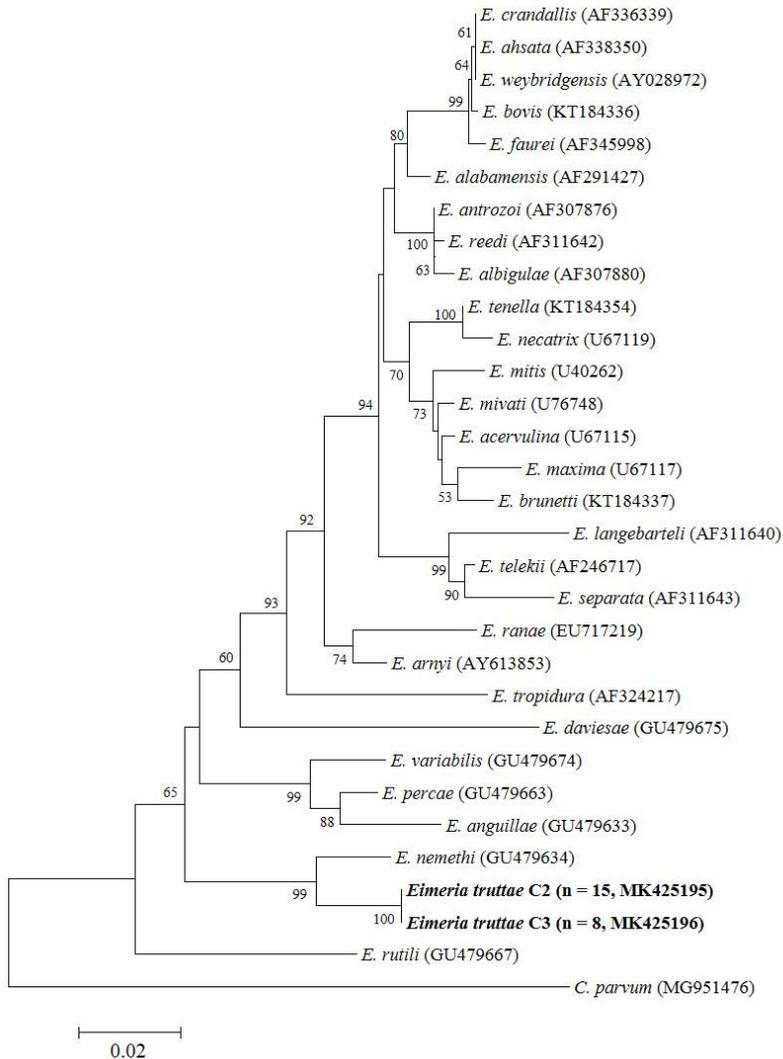


Figura 21. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento de ~1300 pb del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Eimeria* obtenidos de trucha común (*S. trutta*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores “bootstrap” (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

1.4 Mixosporidios

La observación microscópica realizada por triplicado bajo campo claro y/o DIC de alícuotas de 10 μ L de cada uno de los sedimentos obtenidos por concentración difásica de los homogeneizados de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal de las 613 truchas analizadas, reveló la presencia de esporas de mixosporidios en 46 ejemplares, estableciéndose una prevalencia del 7,5% y una intensidad media de 314,9 esporas/trucha (rango 50-3320 esporas/trucha). Las esporas se encontraron en los ciegos pilóricos (33 truchas; 71,7%); en el contenido intestinal (2 truchas; 4,4%); y, en ambas localizaciones (11 truchas; 23,9%), comprobándose la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las dos secciones anatómicas ($P < 0,01$). Considerando los grupos de edad, se observó una mayor prevalencia, aunque no de forma significativa, en las truchas menores de 2 años con respecto a los otros grupos de edad (10,0% vs. 6,2% vs. 8,2%). Por el contrario, las intensidades medias aumentaron con la edad del pez (243,9 vs. 333,0 vs. 415,5 esporas/trucha); sin embargo, este incremento no ofreció diferencias estadísticamente significativas. Las prevalencias, las intensidades medias y la localización gastrointestinal de las esporas de mixosporidios detectadas para cada grupo de edad, establecido de acuerdo con la longitud de los ejemplares, se muestran en la Tabla 15.

De acuerdo con la descripción morfológica realizada por Lom y Dyková (1992), se identificaron esporas de mixosporidios pertenecientes a los géneros *Myxobolus* y *Henneguya* (Figura 30).

Tabla 12. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de las esporas de mixosporidios detectadas en ejemplares de trucha común (*S. trutta*) capturados en ríos de Galicia de acuerdo con el grupo de edad establecido.

Grupo de edad		Localización anatómica [■]			
		CP	INT	CP+INT	
19,0*-19,1 cm (<2 años) n = 160	Muestras positivas (n/%)	16 / 10,0	12 / 75,0	1 / 6,2	3 / 18,8
	Intensidad media	243,9	217,3	93,0	400,7
	(rango, esporas/trucha)	(71-980)	(71-980)	(93)	(140-634)
19,2-25,9 cm (2-3 años) n = 355	Muestras positivas (n/%)	22 / 6,2	16 / 72,8	1 / 4,5	5 / 22,7
	Intensidad media	333,0	149,1	120,0	950,8
	(rango, esporas/trucha)	(50-3320)	(50-390)	(120)	(143-3320)
26,0-50,0 cm (>3 años) n = 98	Muestras positivas (n/%)	8 / 8,2	5 / 62,5	0 / 0	3 / 37,5
	Intensidad media	415,5	132,0	-	888,0
	(rango, esporas/trucha)	(55-1402)	(55-200)	-	(272-1402)
Total n = 613	Muestras positivas (n/%)	46 / 7,5	33 / 71,7	2 / 4,4	11 / 23,9
	Intensidad media	314,9	171,3	106,5	783,6
	(rango, esporas/trucha)	(50-3320)	(50-980)	(93-120)	(140-3320)

■CP = ciegos pilóricos; INT = intestino; CP+INT = ciegos pilóricos e intestino; *Tamaño Mínimo legal.

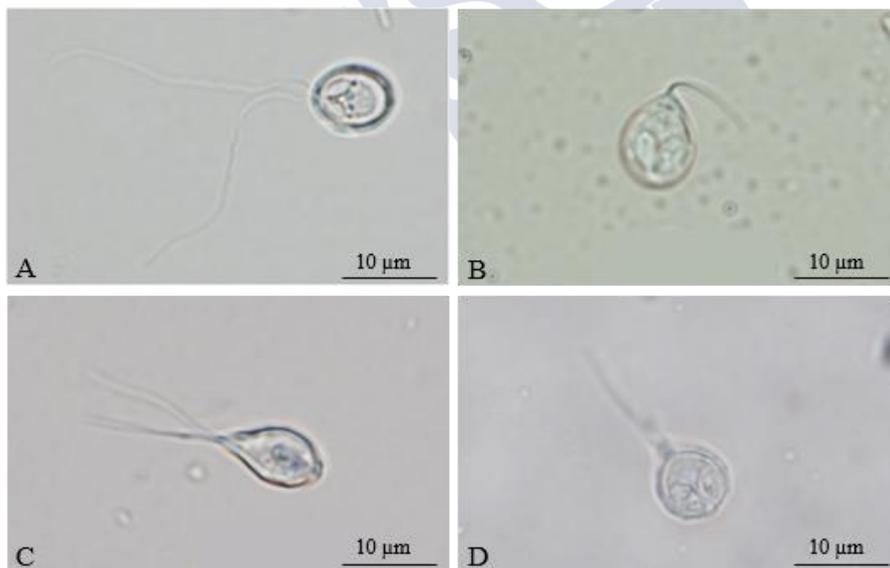


Figura 22. Microfotografías de esporas de mixosporidios de los géneros *Myxobolus* (A y B) y *Henneguya* (C y D) detectadas en muestras del tracto gastrointestinal de ejemplares de trucha común (*S. trutta*) bajo contraste diferencial de interferencia.

1.5 Helmintos

Durante la disección de los tractos gastrointestinales de los ejemplares de trucha común (*S. trutta*) capturados en 44 ríos gallegos pertenecientes a 10 cuencas hidrográficas y que forman parte del presente estudio, la inspección *de visu* y/o mediante estereomicroscopio permitió observar formas macroscópicas de helmintos que, una vez recogidas y lavadas con SSF, se almacenaron en etanol 70° para su posterior tinción con colorantes específicos, de forma que facilitasen su identificación siguiendo las descripciones reportadas por Moravec (1994, 2004), Gibson (1996) y Buchmann y Bresciani (2001). Paralelamente, el examen microscópico bajo campo claro de tres alícuotas de 10 µL de cada uno de los sedimentos obtenidos a partir de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal, permitió la observación de formas de diseminación de helmintos (huevos).

1.4.1 Especies gastrointestinales de helmintos

El análisis macroscópico de los tractos gastrointestinales de las 613 truchas reveló la presencia de formas parasitarias de helmintos en 282 ejemplares (46,0%), recogándose un total de 1479 adultos pertenecientes a seis especies: *Crepidostomum* spp. (Trematoda) (n = 55; 9,0%) (*Crepidostomum metoecus* y *Crepidostomum farionis* en 54 y una muestras, respectivamente); *Salmonema ephemeridarum* (syn. *Cystidicoloides tenuissima*) (Nematoda) (n = 104; 17,0%); *Raphidascaris acus* (Nematoda) (n = 58; 9,5%); *Pseudocapillaria salvelini* (syn. *Capillaria coregoni*) (Nematoda) (n = 13; 2,1%); y, *Echinorhynchus truttae* (Acanthocephala) (n = 52; 8,5%).

Los valores de prevalencia, intensidad media de infección y abundancia media de adultos para cada una de las especies de helmintos detectados en los diferentes grupos de edad de las truchas se muestran en la Tabla 12.

Tabla 13. Prevalencias, intensidades medias (rango) y abundancias medias (\pm DS) de formas adultas de helmintos detectadas en muestras gastrointestinales de trucha común (*S. trutta*) procedentes de ríos de Galicia de acuerdo con el grupo de edad establecido.

Helminto	Parámetro	<2 años	2-3 años	>3 años	Total
<i>Crepidostomum metoecus</i>	P	4,4	10,4*	10,2	8,8
	IM (rango)	2,9 (1-5)	5,0 (1-48)	3,6 (1-10)	4,5 (1-48)
	AM \pm DS	0,1 \pm 1,6	0,5 \pm 9,1	0,4 \pm 3,1	0,4 \pm 7,6
<i>Salmonema ephemeridarum</i>	P	17,5	18,9	9,2	17,0
	IM (rango)	4,3 (1-14)	6,8 (1-91)	4,2 (1-10)	5,9 (1-91)
	AM \pm DS	0,8 \pm 3,9	1,3 \pm 12,6	0,4 \pm 3,3	1,0 \pm 10,4
<i>Raphidascaris acus</i>	P	5,0	10,1	14,3	9,5
	IM (rango)	1,2 (1-2)	2,6 (1-10)	3,4 (1-10)	2,6 (1-10)
	AM \pm DS	0,1 \pm 0,5	0,3 \pm 2,3	0,5 \pm 3,0	0,2 \pm 2,4
<i>Pseudocapillaria salvelini</i>	P	3,8	1,7	1,0	2,1
	IM (rango)	1,0 (1)	1,0 (1)	2,0 (2)	1,1 (1-2)
	AM \pm DS	0,04 \pm 0,0	0,02 \pm 0,0	0,02 \pm 0,0	0,02 \pm 0,3
<i>Echinorhynchus truttae</i>	P	6,9	7,9	18,4	8,5
	IM (rango)	5,4 (1-16)	8,6 (1-45)	12,0 (5-90)	8,8 (1-90)
	AM \pm DS	0,4 \pm 5,2	0,7 \pm 10,3	1,6 \pm 24,3	0,8 \pm 14,4

P = prevalencia (%); IM = intensidad media (adultos/trucha); AM = abundancia media (adultos/trucha); DS = desviación estándar.
 **C. farionis*: un adulto en una trucha de 20.5 cm (0,2%).

Se comprobó que las prevalencias de infección aumentaron con la edad de las truchas, excepto para los parasitismos por *S. ephemeridarum* y *P. salvelini*. Sin embargo, este incremento solo fue estadísticamente significativo para *C. metoecus* (4,4% en truchas menores de 2 años vs. 10,4% en truchas de edad comprendida entre 2–3 años; $P = 0,02$) y para *R. acus* (5,0% en truchas menores de 2 años vs. 14,3% en truchas mayores de 3 años; $P = 0,01$). Por el contrario, una prevalencia significativamente menor se observó en ejemplares mayores de 3 años infectados con *S. ephemeridarum* con respecto a las truchas pertenecientes a los otros dos grupos de edad ($P = 0,02$). Teniendo en cuenta los valores de intensidad media y abundancia media, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas excepto para

el parasitismo por *R. acus*. Así, la intensidad media fue significativamente superior en peces mayores de 3 años con respecto a los ejemplares más jóvenes ($P < 0,01$). Además, la abundancia media fue significativamente más baja en el grupo de truchas menores de 2 años que en aquellas que superaban esta edad ($P < 0,05$).

Por otro lado, el análisis microscópico realizado sobre los sedimentos obtenidos de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal, demostró la presencia de huevos de helmintos en 485 ejemplares de trucha, revelando un porcentaje de muestras positivas del 79,2%. Se visualizaron huevos de: *Crepidostomum* spp. (n = 387; 63,1%); *Salmonema* sp. (n = 286; 46,7%); *Raphidascaris* sp. (n = 20; 3,3%); *Pseudocapillaria* sp. (n = 4; 0,7%); y, *Echinorhynchus* sp. (n = 47; 7,7%). El número de truchas positivas y los correspondientes porcentajes de parasitación obtenidos para cada helminto, de acuerdo con los grupos de edad establecidos, se reflejan en la Tabla 13.

De forma similar a las prevalencias determinadas por el hallazgo de formas adultas, los porcentajes de parasitación obtenidos mediante la observación microscópica de formas de diseminación tienden a incrementarse con la edad de las truchas, detectándose diferencias estadísticamente significativas para las infecciones por *Crepidostomum* spp. (51,2% vs. 65,1% vs. 75,4%; $P < 0,05$) y *Salmonema* sp. (35,6% vs. 49,3% y 55,1%; $P < 0,05$).

Se detectaron huevos de *Crepidostomum* spp. y *Salmonema* sp. en un mayor porcentaje de muestras con respecto a aquellas en las que se visualizaron las correspondientes formas adultas. Por el contrario, esta observación no fue comprobada para los parasitismos por *R. acus* y *P. salvelini*, en los que un mayor número de muestras gastrointestinales presentaron formas adultas en relación con aquellas en las que se detectaron sus correspondientes formas de diseminación ($P < 0,05$) (ver Tablas 12 y 13).

Tabla 14. Presencia de formas de diseminación de helmintos (huevos) en muestras del tracto gastrointestinal de ejemplares de trucha común (*S. trutta*) procedentes de ríos de Galicia de acuerdo con el grupo de edad establecido.

Grupo de edad	<i>Crepidostomum</i> spp. (n positivas/%)	<i>Salmonema</i> sp. (n positivas/%)	<i>Raphidascaris</i> sp. (n positivas/%)	<i>Pseudocapillaria</i> sp. (n positivas/%)	<i>Echinorhynchus</i> sp. (n positivas/%)
<2 años (n = 160)	82 / 51,2	57 / 35,6	3 / 1,9	0 / -	14 / 8,7
2-3 años (n = 355)	231 / 65,1	175 / 49,3	12 / 3,4	3 / 0,8	23 / 6,5
>3 años (n = 98)	74 / 75,4	54 / 55,1	5 / 5,1	1 / 1,0	10 / 10,2
Total (n = 613)	387 / 63,1	286 / 46,7	20 / 3,3	4 / 0,7	47 / 7,7

En consecuencia, teniendo en cuenta la presencia de adultos y/o huevos, se detectaron formas parasitarias de helmintos en un total de 512 de los 613 ejemplares analizados, representando un 83,5% de truchas positivas a alguna especie helmíntica. La Figuras 22-27 ilustran las formas adultas de especies de helmintos y detalles de las mismas, así como sus formas de diseminación (huevos), observados en muestras del tracto gastrointestinal de ejemplares de trucha común (*S. trutta*).



Figura 23. Microfotografías de *C. metoecus* procedente de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

(A) Huevo; (B) Adulto en posición dorsal; (C) Extremo anterior de un adulto en posición dorsal; (D) Extremo anterior de un adulto en posición ventral; y, (E) Detalle de la región central de un adulto.



Figura 24. Microfotografías de *C. farionis* procedente de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

(A) Huevo; (B) Adulto en posición ventral; (C) Extremo anterior de un adulto en posición ventral; y, (D) Extremo anterior de un adulto en posición dorsal.

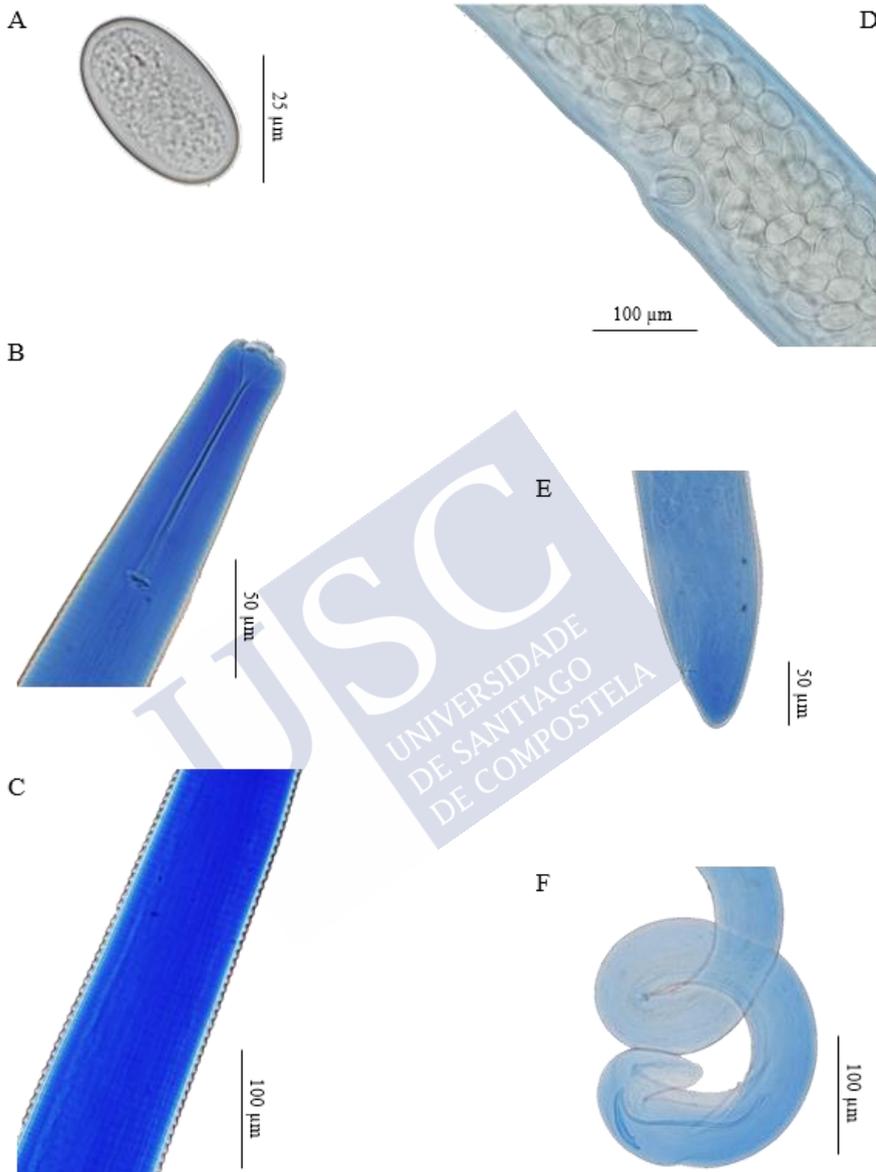


Figura 25. Microfotografías de *S. ephemeridarum* procedente de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

(A) Huevo; (B) Extremo anterior de un adulto; (C) Detalle de la cutícula de un adulto; (D) Detalle de los huevos en el interior de una hembra adulta; (E) Extremo caudal de un ejemplar hembra; y (F) Extremo caudal de un ejemplar macho.

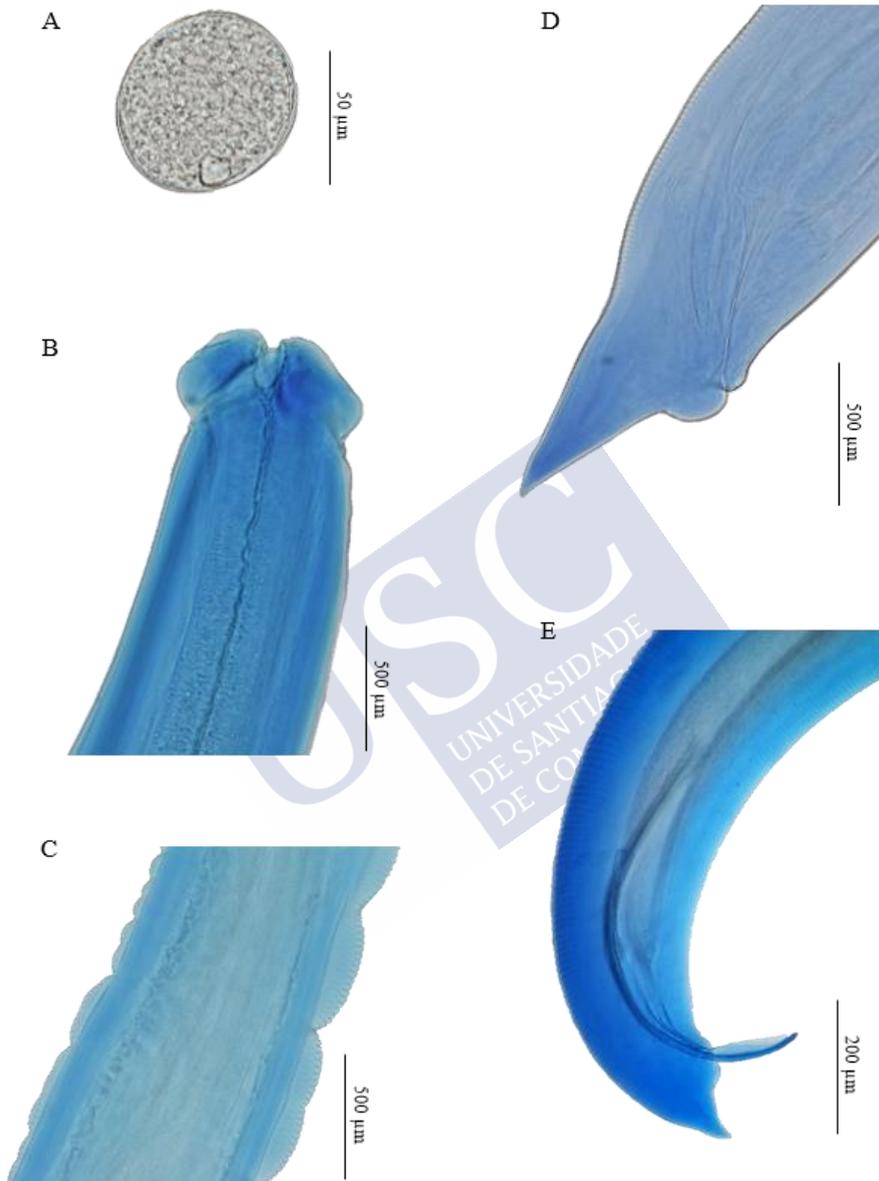


Figura 26. Microfotografías de *R. acus* procedente de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*). (A) Huevo; (B) Extremo anterior de un adulto; (C) Detalle de la cutícula de un adulto; (D) Extremo caudal de un ejemplar hembra; y, (E) Extremo caudal de un ejemplar macho.

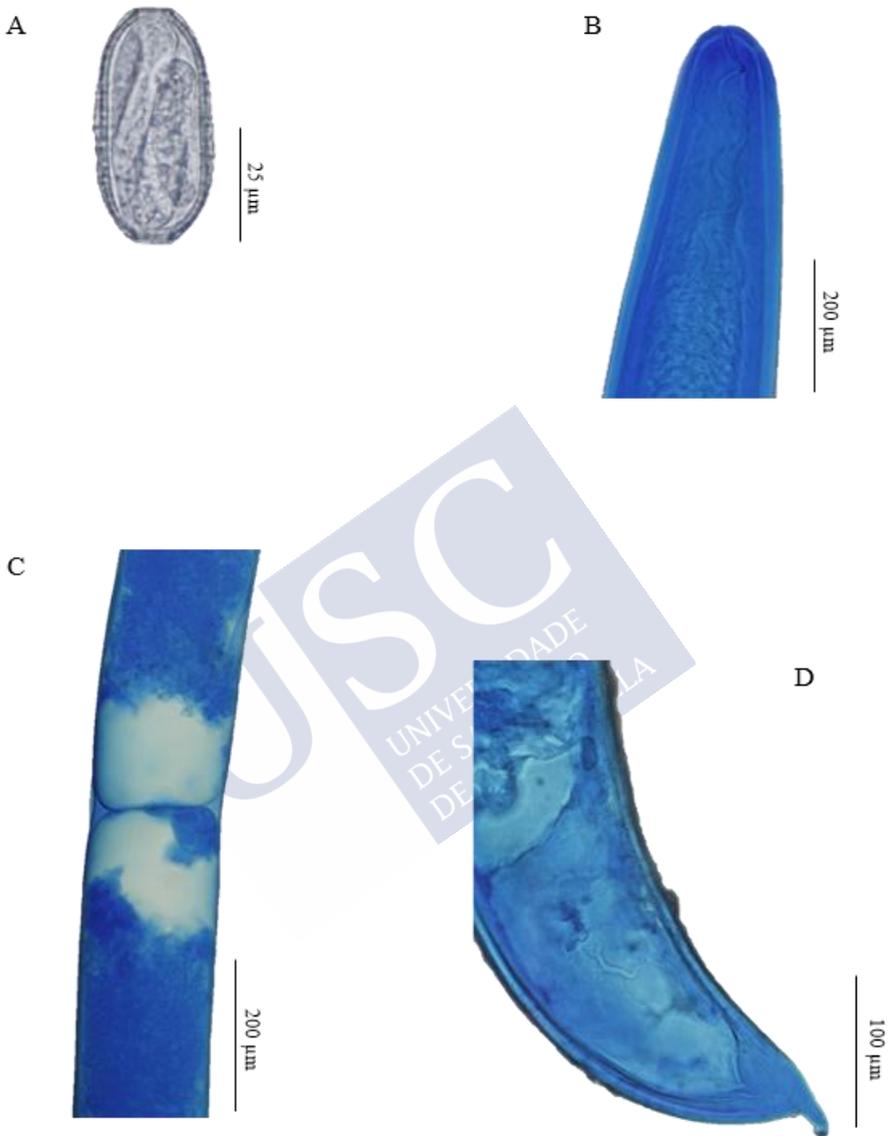


Figura 27. Microfotografías de *P. coregoni* procedente de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

(A) Huevo; (B) Extremo anterior de un adulto; (C) Detalle de la región central de un adulto; y, (D) Extremo caudal de un ejemplar hembra.

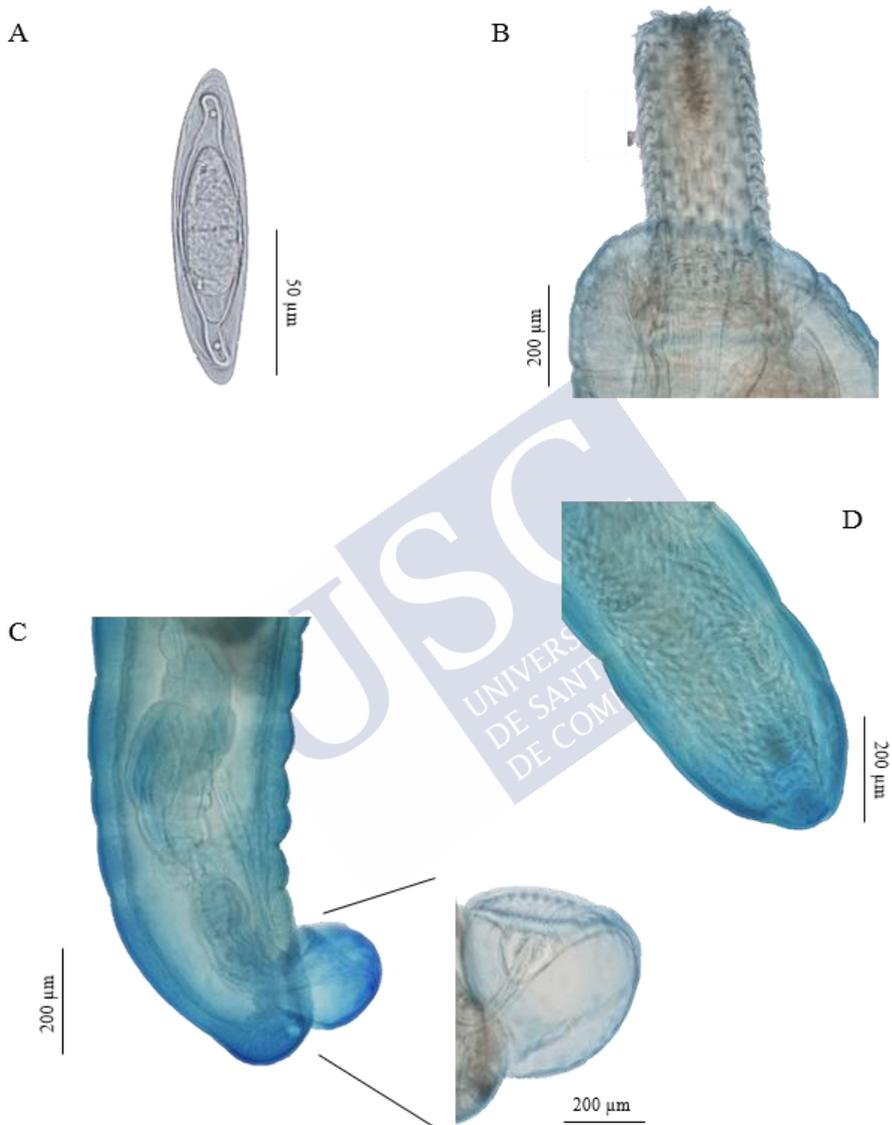


Figura 28. Microfotografías de *E. truttae* procedente de un ejemplar de trucha común (*S. trutta*).

(A) Huevo; (B) Extremo anterior de un adulto; (C) Extremo caudal de un ejemplar macho y detalle de la bolsa copuladora; y, (D) Extremo caudal de un ejemplar hembra.

Considerando el área de muestreo del presente estudio, se comprobó que las truchas capturadas en 41 de los 44 ríos muestreados (93,2%) estaban parasitadas por alguna especie de helminto, detectándose ejemplares positivos en las 10 cuencas hidrográficas analizadas. El porcentaje de truchas parasitadas fue de un 66,7% en las cuencas hidrográficas de los ríos Xallas y Grande de Baio; un 86,5% en la cuenca del río Lárez; un 93,8% en la cuenca hidrográfica de los ríos Verdugo-Oitavén; y, un 100% en las truchas procedentes de las cuencas de los ríos Anllóns, Mandeo y Xuvia. Sin embargo, estos valores se corresponden con cuencas hidrográficas de las que se dispuso de un escaso número de peces. En aquellas cuencas hidrográficas en las que se capturaron un número superior a 100 ejemplares de trucha común, los porcentajes de muestras positivas fueron del 73,2%; 85,5%; y, 86,5% correspondientes a las cuencas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil, respectivamente (Figura 23). Así, en truchas capturadas en ríos de estas tres cuencas se detectaron los cinco géneros de helmintos identificados, siendo las especies del género *Crepidostomum* las más prevalentes (44,7%; 73,2%; y, 70,2% en truchas de las cuencas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil, respectivamente). Comparando las prevalencias obtenidas para *Crepidostomum* spp., *Salmonema* sp. y *Raphidascaris* sp. en ejemplares de trucha de cada cuenca hidrográfica, se comprobó un patrón similar en las tres cuencas, estableciéndose los mayores valores para *Crepidostomum* sp. y los menores para *Raphidascaris* sp., si bien, los correspondientes porcentajes de parasitación fueron significativamente inferiores en las truchas procedentes de la cuenca del río Tambre ($P < 0,05$). Los menores valores de prevalencia correspondieron a *Pseudocapillaria* sp., no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos (2,4%; 4,1%; y, 2,9% en truchas de las cuencas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil, respectivamente). Por el contrario, el porcentaje de muestras en las que se detectaron tanto formas adultas como huevos del acantocéfalo *Echinorhynchus* sp. fue significativamente mayor en la cuenca hidrográfica del río Tambre (43,1%)

con respecto a las truchas procedentes de las cuencas hidrográficas del río Ulla (3,6%) y de los ríos Miño-Sil (3,4%) ($P < 0,01$) (Figura 28).

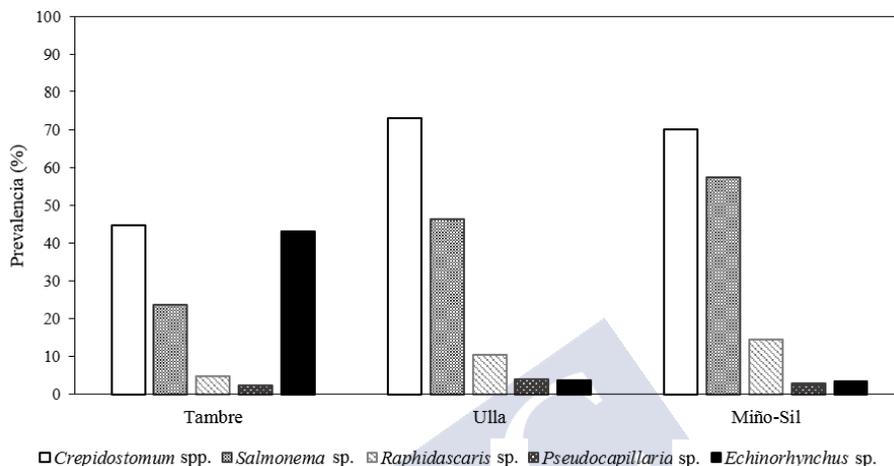


Figura 29. Prevalencias de helmintos gastrointestinales detectados en ejemplares de trucha común (*S. trutta*) procedentes de las cuencas hidrográficas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil.

1.4.2 Estudio de la comunidad helmíntica

El estudio de la comunidad helmíntica se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis de los tractos gastrointestinales de 521 ejemplares de trucha común capturados en ríos pertenecientes a las tres cuencas hidrográficas de las que se dispuso de más de 100 peces (cuencas hidrográficas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil).

De esta forma, la infracomunidad estuvo constituida por un máximo de cuatro helmintos, siendo la más frecuente aquella compuesta por *Crepidostomum* sp. y *Salmonema* sp., detectada en un total de 151 truchas, lo que representa un porcentaje de positividad del 29,0%. Del total de 521 ejemplares de trucha común analizados, 432 peces resultaron positivos (82,9%). Así, 172 truchas (39,8%) estaban parasitadas por un único helminto; 204 peces (47,2%) presentaron dos helmintos; en 51 truchas (11,8%) se

detectaron tres helmintos; y, tan solo 5 especímenes (1,2%) estaban parasitados por 4 helmintos. La complejidad de la infracomunidad helmíntica aumentó con la edad de las truchas. De esta forma, los parasitismos únicos disminuyeron con la edad de los ejemplares, determinándose un porcentaje significativamente menor en las truchas de mayor edad ($P < 0,01$). Por el contrario, las asociaciones constituidas por dos y tres helmintos se incrementaron significativamente a medida que aumentó la edad de los peces ($P < 0,01$). Con respecto a los parasitismos por cuatro helmintos, también se observó un incremento en el número de muestras positivas con la edad de los ejemplares, aunque no de forma estadísticamente significativa (Figura 29).

Los parámetros relacionados con la comunidad helmíntica determinados en las tres cuencas hidrográficas consideradas se muestran en la Tabla 14. Los porcentajes de parasitación de los ejemplares capturados en las cuencas hidrográficas de los ríos Ulla y Miño-Sil (85,5% y 86,5%, respectivamente) fueron estadísticamente superiores al determinado en la cuenca del río Tambre (73,2%; $P < 0,01$). Las truchas capturadas en ríos de la cuenca hidrográfica del Miño-Sil presentaron la mayor riqueza de especies ($S = 6$), así como la mayor diversidad (H') y homogeneidad ($H' E$) de acuerdo con el índice de Shannon-Wiener ($H' \pm$ varianza $H' = 1,26 \pm 0,97$ y $H' E = 0,70$, respectivamente) y de Simpson ($D = 0,33$). Sin embargo, el valor correspondiente al número medio de formas adultas por trucha fue superior en ejemplares procedentes de la cuenca hidrográfica del río Ulla, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los obtenidos en peces de las otras dos cuencas estudiadas. De forma similar, tampoco se detectaron diferencias significativas entre el número medio de formas adultas identificadas en las tres cuencas hidrográficas.

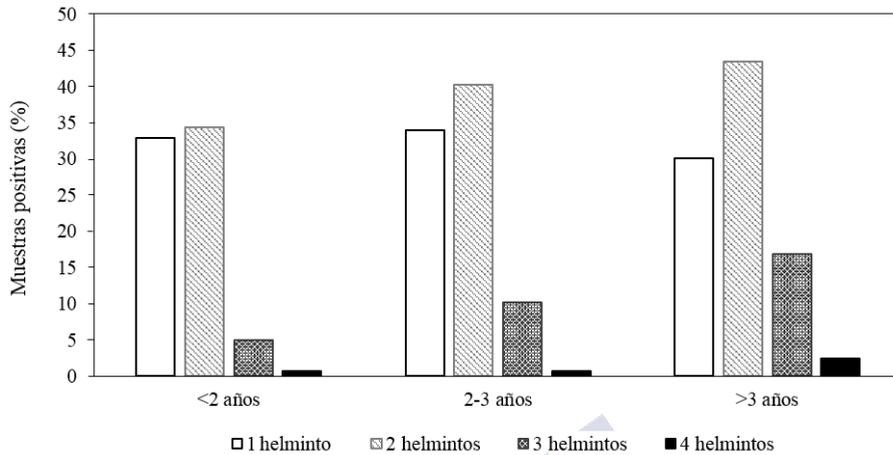


Figura 30. Porcentaje de muestras gastrointestinales positivas correspondientes a cada infracomunidad de helmintos detectada en ejemplares de trucha común (*S. trutta*) capturados en ríos de Galicia de acuerdo con la edad estimada de los peces.

Tabla 15. Comunidad de helmintos gastrointestinales de tres poblaciones de trucha común (*S. trutta*) capturadas en ríos pertenecientes a las cuencas hidrográficas del Tambre, Ulla y Miño-Sil.

	Tambre	Ulla	Miño-Sil
Datos de captura			
Área (km ²)	1530,0	2803,0	12307,0
Ríos (n/%)	10 / 100	9 / 77,8	9 / 88,9
Peces (n/%)	123 / 73,2	220 / 85,5	178 / 86,5
Longitud media de los peces (cm±DS)	21,0±5,0	21,7±3,6	24,0±5,7
Parámetros de la comunidad			
Número de adultos total	390	562	256
Riqueza de especies (<i>S</i>)	5	5	6
Índice Shannon-Wiener (<i>H'</i>) ± Varianza <i>H'</i>	0,88±0,16	0,67±0,34	1,26±0,97
Índice homogeneidad de Shannon-Wiener (<i>H'E</i>)	0,64	0,41	0,70
Índice de Simpson (<i>D</i>)	0,52	0,69	0,33
Infracomunidad			
Número medio de adultos (rango)	5,7 (1-45)	9,5 (1-91)	4,3 (1-48)
Número medio de especies (rango)	1,36 (1-3)	1,31 (1-3)	1,21 (1-4)

2 RESULTADOS DEL ESTUDIO EN LA TRUCHA ARCOÍRIS (*O. MYKISS*)

Durante el año hidrológico comprendido entre octubre de 2015 y septiembre de 2016 se visitó mensualmente una piscifactoría de trucha arcoíris (*O. mykiss*) ubicada en el lugar de Besteiros, municipio de A Estrada, en las cercanías de Santiago de Compostela. En cada visita, se recogieron 30 ejemplares, sin signos clínicos de enfermedad, clasificados según su longitud corporal en tres grupos (10 truchas/grupo). Paralelamente, se tomaron muestras de agua (20 L) del influente (agua de río) y del efluente de la piscifactoría.

2.1 *Cryptosporidium* en muestras de peces

2.1.1 Detección de ooquistes mediante microscopía de epifluorescencia

Mediante la técnica de IFD y la tinción con DAPI aplicadas sobre los sedimentos obtenidos de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal de un total de 360 ejemplares de trucha arcoíris analizados a lo largo del año hidrológico, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 33 muestras, estableciéndose una prevalencia del 9,2% y una intensidad media de 35,4 ooquistes/trucha. Los valores de prevalencia, de intensidad media, así como la localización gastrointestinal de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectados para cada grupo de trucha arcoíris, establecido de acuerdo con la longitud de los ejemplares, se muestran en la Tabla 16.

La prevalencia más alta (14,2%) se detectó en los ejemplares de menor tamaño (grupo T1), siendo este porcentaje significativamente superior al correspondiente determinado en el grupo T2 (5,0%; $P = 0,01$), pero no al hallado en las truchas de mayor tamaño o grupo T3 (8,3%). La intensidad osciló entre un mínimo de 4 y un máximo de 550 ooquistes/trucha, si bien no

se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de intensidad determinados en los tres grupos de peces considerados.

Tabla 16. Prevalencias, intensidades medias y localización anatómica de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. detectados en trucha arcoíris (*O. mykiss*) de acuerdo con la longitud y el peso de los ejemplares.

Grupo de trucha		Localización anatómica [■]			
		CP	INT	CP+INT	
T1 (n = 120) (11,5 ± 0,9 cm) (17,2 ± 4,0 g)	Muestras positivas (n/%)	17 / 14,2	10* / 58,8	3 / 17,6	4 / 23,5
	Intensidad media	25,4	34,4	11,2	13,4
	(rango, ooquistes/trucha)	(6-105)	(6-105)	(7-14)	(7-17)
T2 (n = 120) (16,0 ± 1,2 cm) (44,9 ± 10,3 g)	Muestras positivas (n/%)	6 / 5,0	3 / 50,0	2 / 33,3	1 / 16,7
	Intensidad media	101,0	188,4	11,5	17,0
	(rango, ooquistes/trucha)	(6-550)	(6-550)	(8-14)	(17)
T3 (n = 120) (20,0 ± 0,9 cm) (81,3 ± 11,8 g)	Muestras positivas (n/%)	10 / 8,3	1 / 10,0	8 / 80,0	1 / 10,0
	Intensidad media	12,9	4,0	14,3	10,0
	(rango, ooquistes/trucha)	(4-23)	(4)	(5-23)	(10)
Total n = 360	Muestras positivas (n/%)	33 / 9,2	14 / 42,4	13 / 39,4	6 / 18,2
	Intensidad media	35,4	67,6	13,2	13,6
	(rango, ooquistes/trucha)	(4-550)	(4-550)	(5-23)	(7-17)

[■]CP = ciegos pilóricos; INT = intestino; CP+INT = ciegos pilóricos e intestino; *Grupo de ooquistes observado en un ejemplar.

Teniendo en cuenta la localización anatómica, los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. se encontraron en los ciegos pilóricos (14 truchas; 42,4%); en el contenido intestinal (13 truchas; 39,4%); y, en ambas secciones anatómicas (6 truchas; 18,2%), aunque no se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas localizaciones. Sin embargo, en los ciegos pilóricos de las truchas pertenecientes al grupo T1 se detectó un mayor número de muestras positivas en relación con la ubicación intestinal (58,8% vs. 17,6%; $P = 0,01$). Es destacable la observación microscópica de un grupo constituido por más de 10 estructuras compatibles con ooquistes en los ciegos pilóricos de un ejemplar perteneciente a este grupo. La fluorescencia verde brillante, el tamaño y la forma de las estructuras teñidas y la pared claramente visible, confirmó que dicho grupo estaba formado por ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Figura 31). En el grupo T2 se observó también un

mayor porcentaje de muestras positivas en los ciegos pilóricos (50,0%) que en el intestino (33,3%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por el contrario, en el grupo compuesto por los ejemplares de mayor tamaño (grupo T3), el porcentaje de muestras positivas fue significativamente mayor en el intestino que en los ciegos pilóricos (80,0% vs. 10,0%; $P = 0,01$). Con respecto a las intensidades medias, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos localizaciones anatómicas de las truchas pertenecientes a los tres grupos establecidos.

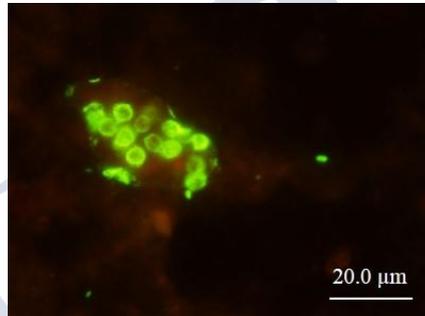


Figura 31. Microfotografía de un grupo de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. detectado en los ciegos pilóricos de un ejemplar de trucha arcoíris (*O. mykiss*) mediante la técnica de inmunofluorescencia directa.

Considerando el mes de muestreo en el que se realizó el estudio, llevado a cabo a lo largo de un año hidrológico, los mayores valores de prevalencia se detectaron en ejemplares de trucha arcoíris recogidos durante los meses de octubre de 2015 y agosto de 2016 (60,0% y 20,0%, respectivamente), mientras que ninguno de los peces recogidos en los meses de febrero, abril, mayo, julio y septiembre de 2016 ofrecieron resultados positivos.

A pesar de que sobre las muestras se aplicó una técnica de IFD que incluye anticuerpos monoclonales frente a epítomos de la pared quística de

Giardia, en ninguno de los ejemplares de trucha arcoíris analizados se detectaron quistes de este flagelado.

2.1.2 Caracterización molecular

De las 33 ejemplares en los que se detectó la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* mediante la técnica de IFD, se consiguió amplificar un fragmento del gen que codifica la *SSU-rRNA* de *Cryptosporidium* en 9 truchas: ciegos pilóricos de 3 ejemplares; contenido intestinal de 5 ejemplares; y, muestras de ambas localizaciones de un ejemplar. La especie *C. parvum* se identificó en 7 peces, incluida la muestra de ciegos pilóricos en la que se observó el grupo de ooquistes mediante microscopía de epifluorescencia, obteniéndose dos secuencias parciales representativas (números de acceso en la base de datos GenBank® MG951476 y MG951478). Dichas secuencias exhibieron tres diferencias nucleotídicas entre sí, mostrando una similitud del 99% y del 100% con respecto a la secuencia de *C. parvum* aislada de niños y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso KY066486. Además, una secuencia parcial próxima a *C. molnari* se identificó en los dos ejemplares de trucha arcoíris restantes (número de acceso en la base de datos GenBank® MG951477), con una similitud del 92% con respecto a la secuencia de la misma especie aislada de la dorada (*S. aurata*) y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso HM243550. El análisis filogenético reveló que 8 de las 10 secuencias parciales obtenidas se agruparon con *C. parvum*, siendo 6 de ellas 100% homólogas a esta especie, mientras que las otras dos secuencias exhibieron un 0,3% de distancia genética. Las dos secuencias restantes se agruparon más estrechamente con *C. molnari*, pero fueron genéticamente distintas al mostrar una distancia genética del 9,9% con dicha especie (Figuras 32 y 33).

Para el gen *hsp70*, se obtuvieron secuencias parciales en 3 de las 33 ejemplares de trucha arcoíris positivos mediante la técnica de IFD, siendo todas ellas idénticas entre sí (número de acceso en la base de datos GenBank® MG951479). El análisis filogenético reveló que las secuencias mostraban una homología del 100% con respecto a la secuencia de *C. parvum* aislada de muestras humanas y depositada en la base de datos GenBank® con el número de acceso DQ388383 (Figura 34).

Desafortunadamente, todos los intentos de amplificar los fragmentos correspondientes a los genes que codifican la *gp60* y la actina de *Cryptosporidium* fueron infructuosos.



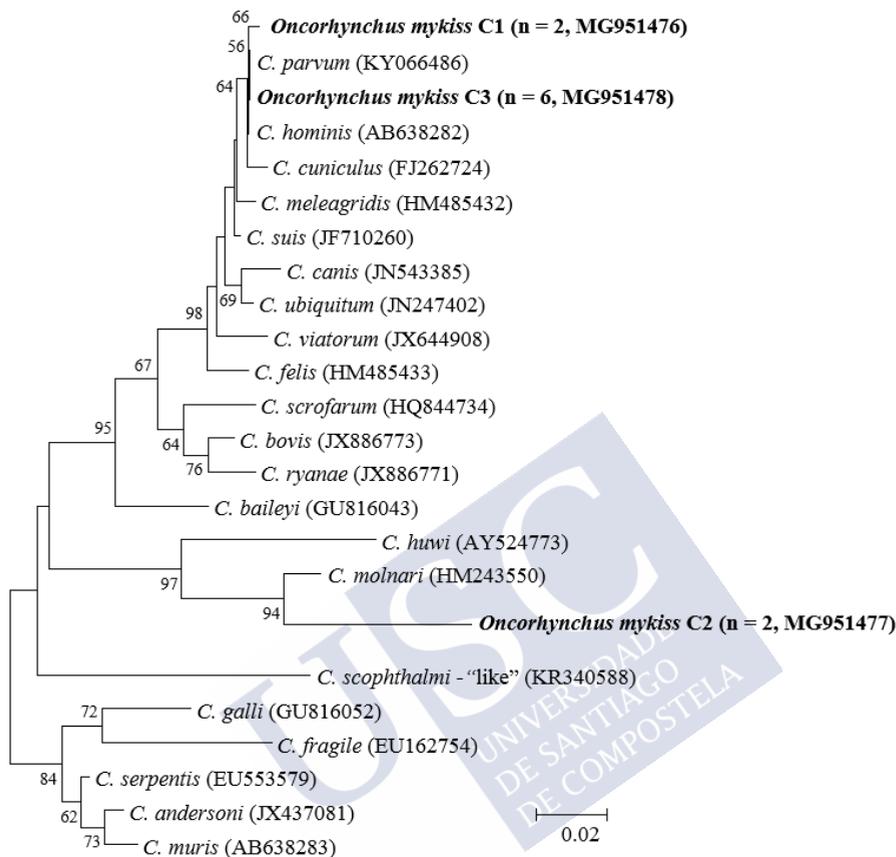


Figura 32. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores “bootstrap” (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de aislados positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

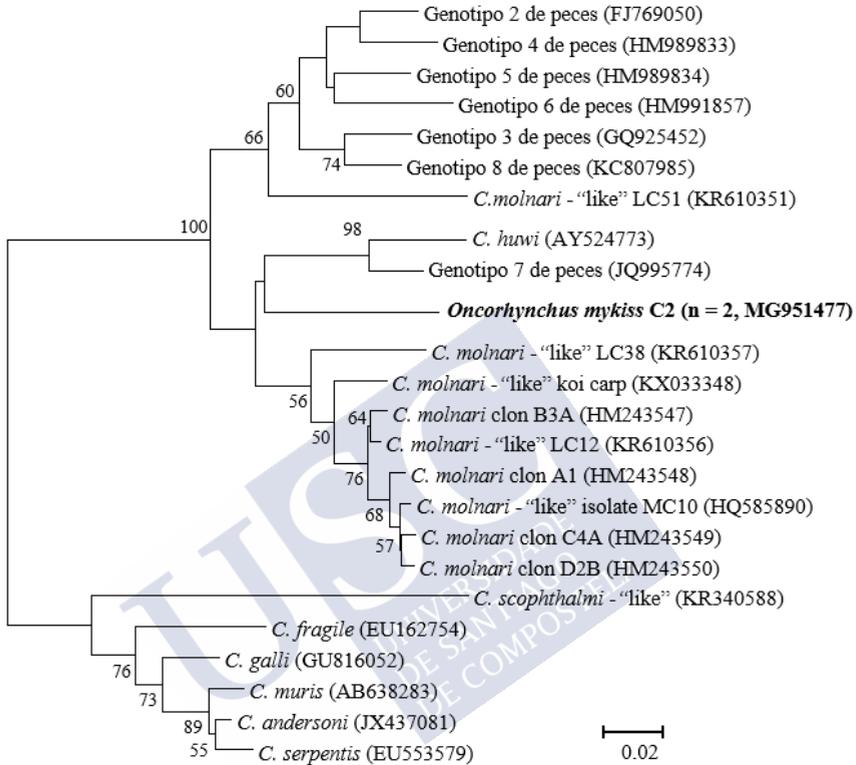


Figura 33. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña del ARN (*SSU-rRNA*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y otras especies/genotipos del género reconocidos en peces, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores “bootstrap” (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

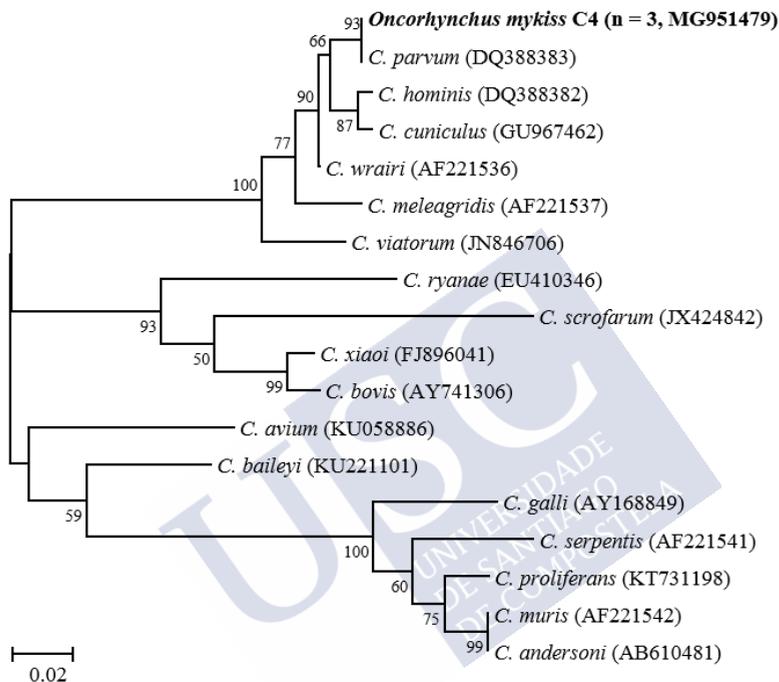


Figura 34. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor-Joining a partir del análisis de un fragmento del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*), mostrando las relaciones filogenéticas existentes entre los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y otras especies del género, en base a las distancias genéticas calculadas por el modelo de 2 parámetros de Kimura.

Se indican los porcentajes de los valores “bootstrap” (>50%) para 1000 réplicas. Los aislados del presente estudio se resaltan en negrita. El número de ejemplares positivos y los números de acceso en la base de datos GenBank® se muestran entre paréntesis.

2.2 Detección de *Cryptosporidium* y *Giardia* en muestras hídricas

Del total de las 24 muestras de agua recogidas en la piscifactoría a lo largo del año hidrológico en el que se realizó el estudio (2 muestras/mes), la aplicación de una técnica de IFD, permitió detectar ooquistes de *Cryptosporidium* en 5 muestras (41,7%) del influente (agua de río) y en 2 muestras (16,7%) del efluente de las instalaciones. Las concentraciones ooquisticas oscilaron entre 0,2-1,7 ooquistes/L en muestras del influente y 0,1-0,2 ooquistes/L en las correspondientes al efluente. De manera similar, quistes de *Giardia* se detectaron en 6 muestras (50,0%) de agua del influente y 4 del efluente (33,3%), oscilando las concentraciones quísticas entre 0,1-1,7 quistes/L en muestras del influente y 0,1-0,6 quistes/L en las correspondientes al efluente. Las mayores concentraciones de ooquistes de *Cryptosporidium* y de quistes *Giardia* se determinaron en muestras del influente recogidas durante el muestreo realizado en el mes de febrero de 2016 (1,7 oo/quistes por litro), mientras que en ninguna de las muestras hídricas recogidas en los meses de diciembre de 2015 y enero, abril y agosto de 2016 se detectaron formas de resistencia de ambos parásitos. En la Figura 35 se reflejan, para cada mes del año hidrológico en el que se realizó el estudio, las concentraciones de oo/quistes de *Cryptosporidium* y *Giardia* cuantificadas en las muestras hídricas, así como los porcentajes de parasitación por *Cryptosporidium* spp. determinados en los ejemplares de trucha arcoíris, comentados previamente en el Apartado 2.1.1.

Todos los intentos de amplificar los genes que codifican la SSU-rRNA de *Cryptosporidium* y *Giardia* en las muestras de agua analizadas resultaron infructuosos.

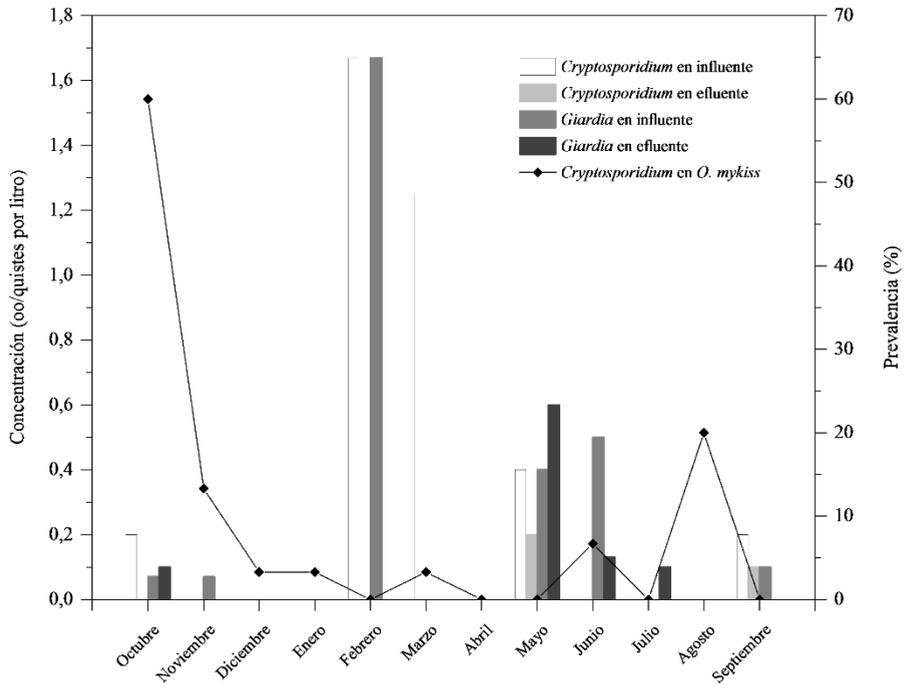


Figura 35. Presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en ejemplares de trucha arcoíris (*O. mykiss*) y en muestras hídricas del influente y efluente de una piscifactoría analizados mensualmente a lo largo de un año hidrológico.



DISCUSIÓN



Los ecosistemas de agua dulce son de vital importancia para la supervivencia de la mayoría de los seres vivos, tanto para los que forman parte de la fauna como de la flora o vegetación. Entre estos ecosistemas, los ríos –sistemas dinámicos y complejos en los que se produce un flujo de materia y energía– albergan una gran biodiversidad constituida por distintas y particulares comunidades de organismos entre las que se establece una relación trófica: productores primarios como bacterias, hongos y algas; invertebrados bentónicos; y, peces (Sabater *et al.*, 2009).

Los ríos se ven afectados por numerosas perturbaciones naturales (sequías, inundaciones, desprendimientos, incendios...) a las que responden dinámicamente (Margalef, 1983). Sin embargo, aquellas relacionadas con la actividad humana pueden llegar a ser permanentes y ocasionar efectos irreversibles. Así, la producción industrial y agropecuaria, junto con el desarrollo de nuevas áreas urbanizadas, generan una gran variedad de residuos que, de una forma u otra, alcanzan los cursos fluviales, comprometiendo la salud de los ríos al reducir la biodiversidad de los organismos que habitan en ellos (Kilpatrick *et al.*, 2017).

Considerando que los organismos parásitos son ubicuos y que se han descrito más especies parásitas que de vida libre (Windsor, 1998), en las poblaciones naturales de animales y plantas, los parásitos están siempre presentes. Por tanto, los peces de agua dulce pueden albergar un amplio conjunto de especies parásitas entre las que se incluyen aquellas transmitidas directamente o bien las adquiridas a través de la cadena alimentaria al estar situados, los peces, en un nivel trófico superior. El conocimiento integral de los parasitismos que tienen lugar en los peces salvajes repercutirá favorablemente en la prevención y en el control de las enfermedades parasitarias que afecten a las especies de cultivo.

Cryptosporidium es un protozoo parásito que infecta el tracto gastrointestinal de un amplio rango de hospedadores vertebrados, entre los que

se incluyen el hombre, los animales domésticos y salvajes. Sus formas infectantes (ooquistes) fueron detectadas en diversos cuerpos de agua, circunstancia que, asociada a su alta resistencia a las condiciones ambientales y a los desinfectantes, responsabilizó a *Cryptosporidium* en numerosos brotes hídricos (Castro-Hermida *et al.*, 2010; Efstratiou *et al.*, 2017; Adeyemo *et al.*, 2019). A pesar de su conocida dispersión en ambientes acuáticos, son muy escasos los estudios realizados en peces, tanto salvajes como de cultivo.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal estudiar la presencia de *Cryptosporidium* en truchas de Galicia, en la trucha común (*S. trutta*) y en la trucha arcoíris (*O. mykiss*), y caracterizar molecularmente los aislados obtenidos con el fin de identificar las especies/genotipos presentes, contribuyendo así al conocimiento de este protozoo parásito en organismos de agua dulce.

Para ello, se dispuso de los tractos gastrointestinales de 613 ejemplares de trucha común capturados por pescadores locales durante la temporada de pesca del año 2015 (15 de marzo - 15 de agosto) en 44 ríos gallegos pertenecientes a 10 cuencas hidrográficas. De igual forma y durante un año hidrológico (septiembre 2015 - agosto 2016), se recogieron 360 ejemplares de trucha arcoíris en una piscifactoría situada en las proximidades de Santiago de Compostela. Paralelamente, se analizaron muestras hídricas del influente (agua de río) y del efluente de las citadas instalaciones.

La metodología aplicada para la realización de estos estudios se seleccionó de acuerdo con las técnicas comúnmente utilizadas en la concentración, detección y posterior caracterización molecular de *Cryptosporidium* en muestras fecales e hídricas. En la literatura científica, se reportan los métodos difásicos como los más adecuados para la concentración de las formas parasitarias de este protozoo en muestras fecales, ya que permiten eliminar los residuos de la materia fecal que pueden dificultar su correcta detección (Fayer *et al.*, 2000a; Ahmed y Karanis, 2018).

Para la observación microscópica de los ooquistes de *Cryptosporidium*, la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales frente a epitopos de la pared ooquistica es un método específico y sensible. La posterior tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) permite confirmar que las estructuras teñidas con un tamaño y forma compatibles son ooquistes, ya que este colorante se une fuertemente a regiones del ADN ricas en adenina y timina, haciendo que los núcleos de este protozoo adquieran una fluorescencia azul cielo (Chalmers *et al.*, 2011; USEPA, 2012). Además, la detección de este enteropatógeno también se puede llevar a cabo empleando un método automatizado y repetible que ofrece una gran sensibilidad y especificidad mediante la amplificación del ADN del parásito, como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de la secuenciación del ADN amplificado, permitiendo identificar las especies/genotipos de *Cryptosporidium* presentes. La caracterización a nivel de especie/genotipo es importante porque permite determinar la fuente de infección y comprender la dinámica de la transmisión, especialmente cuando se trata de especies zoonóticas (Ryan *et al.*, 2016b).

En el presente estudio, se empleó un protocolo de PCR-anidada, que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad, al utilizar dos conjuntos de cebadores, de forma que, si tiene lugar una unión no específica al ADN con el primer conjunto de cebadores, es improbable que esto mismo ocurra con el segundo conjunto empleado (Sadek, 2014; Ahmed y Karanis, 2018). Para identificar las especies/genotipos de *Cryptosporidium* presentes en los aislados obtenidos a partir del tracto gastrointestinal de las truchas se utilizaron los marcadores genéticos más comúnmente empleados. Entre ellos se incluyen el gen que codifica el ARN de la subunidad ribosomal pequeña (*SSU-rRNA*) (Ryan *et al.*, 2003), un marcador bien conocido y muy utilizado en la clasificación de parásitos apicomplejos, y también los genes que codifican la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*), la glicoproteína

de 60 kDa (*gp60*) y la actina (Sulaiman *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2014).

A pesar de que se considera que la metodología de PCR tiene una mayor sensibilidad que la ofrecen los procedimientos de IFD, la aplicación de la técnica de PCR a muestras positivas mediante microscopía de epifluorescencia no ofreció una mayor sensibilidad puesto que no se consiguió amplificar ADN de *Cryptosporidium* en todas aquellas muestras en las que previamente se habían visualizado ooquistes. Esta circunstancia podría ser debida a que la pureza y calidad del ADN puede estar muy afectada en muestras fecales, además de la limitación que supone la existencia de un número reducido de formas parasitarias como se comprobó en algunas ocasiones (Checkley *et al.*, 2015)

La primera descripción de estados de desarrollo compatibles con la parasitación por *Cryptosporidium* en peces salvajes de agua dulce se reportó en la carpa (*C. carpio*) por Pavlasek (1983) en Checoslovaquia. Más tarde, en un estudio en el que se investigó el origen de un brote hídrico de cryptosporidiosis humana en Sheffield (Reino Unido), Rush *et al.* (1990) comprobaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de ganado bovino de granjas situadas en el área afectada y de formas similares e indistinguibles de estos ooquistes en el contenido intestinal de 5 ejemplares de trucha común.

En nuestro estudio, la aplicación de la técnica de IFD sobre las muestras del tracto gastrointestinal de 613 ejemplares de trucha común permitió la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 103 ejemplares, estableciéndose una prevalencia del 16,8% y una intensidad media de 326,7 ooquistes/trucha. Este porcentaje de parasitación es similar a los detectados en estudios previos realizados en este hospedador en la misma región geográfica y que revelaron prevalencias del 11,2%, en muestras fecales obtenidas de 300 especímenes capturados mediante la práctica de pesca sin

muerte, y del 10,0%, en el contenido intestinal de 50 truchas salvajes (Llovo Taboada, 1990; Freire-Santos *et al.*, 1998). En los escasos estudios realizados en otras especies de agua dulce, las prevalencias de *Cryptosporidium* variaron notablemente. Desde la ausencia de *Cryptosporidium* tras el estudio de 227 ejemplares pertenecientes a 8 especies de peces salvajes del oeste Australia (Reid *et al.*, 2010) y la identificación de este protozoo en tan solo uno de los 205 ejemplares de barbo plateado (0,5%) analizados en Papúa Nueva Guinea (Koinari *et al.*, 2013) hasta el hallazgo de un porcentaje de parasitación del 36,6% en distintos peces capturados en el lago Lemán (Francia) (Certad *et al.*, 2015).

De igual forma, la aplicación de la técnica de IFD sobre las muestras del tracto gastrointestinal de 360 ejemplares de trucha arcoíris recogidos en una piscifactoría, permitió la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* en 33 especímenes, estableciéndose una prevalencia del 9,2% y una intensidad media de 35,4 ooquistes/trucha. Los porcentajes reportados en los dos únicos estudios sobre *Cryptosporidium* realizados en peces de agua dulce cultivados son notablemente inferiores. De nuevo, Reid *et al.* (2010) no detectaron *Cryptosporidium* en el mismo número de especímenes (227 ejemplares) que, en esta ocasión, pertenecían a varias especies de peces de cultivo de agua dulce del oeste de Australia, mientras que Koinari *et al.* (2013) identificaron este protozoo en tan solo 2 de los 83 (2,4%) ejemplares analizados de tilapia del Nilo.

Sin embargo, en peces de cultivo de agua salada, las porcentajes de parasitación aportados son considerablemente superiores. Mediante estudios histológicos se detectaron prevalencias para *C. molnari* del 94,7% y del 50,0% en los criaderos y del 65,0% y del 57,9% en los tanques de crecimiento de dorada y lubina, respectivamente (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005). Utilizando la misma metodología, también se detectaron prevalencias que alcanzaron

incluso el 100% para *C. scophthalmi* en ejemplares juveniles de rodaballo (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004, 2009).

Estudios previos demostraron la influencia de la edad/peso de los peces en la infección por *Cryptosporidium*. Así, se observaron mayores prevalencias de la parasitación por *C. molnari* en ejemplares de dorada y de lubina procedentes de tanques de pre-engorde y de *C. scophthalmi* en juveniles de rodaballo de cultivo, las cuales tendieron a disminuir con el aumento del tamaño/peso de los peces (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004, 2009; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2005). Además, en un estudio sobre cryptosporidiosis gástrica en el pez ángel de agua dulce, Murphy *et al.* (2009) reportaron una mayor morbilidad y mortalidad en la cohorte constituida por los ejemplares más jóvenes.

De forma similar, en el presente estudio realizado en trucha común, se observó que la prevalencia de la parasitación por *Cryptosporidium* está inversamente relacionada con el tamaño/edad de los peces, siendo significativamente mayor en truchas menores de 2 años que en el grupo constituido por ejemplares de edad comprendida entre 2-3 años (23,1% vs. 13,5%; $P < 0,01$). Aunque los datos sobre la parasitación por *Cryptosporidium* en peces son muy escasos, este hallazgo podría explicarse por la inmadurez del sistema inmunitario de los mismos, como ocurre en los rumiantes domésticos, en los que la infección incide principalmente en animales neonatos y es menos prevalente en adultos (Robertson *et al.*, 2014). Los porcentajes de parasitación detectados para los ejemplares de trucha de edad comprendía entre 2 y 3 y los mayores de 3 años (13,5% y 18,4%, respectivamente) pueden estar relacionados con la ingesta de alimentos, que, a su vez, está condicionada por la disponibilidad de presas y la ontogenia (Knutsen *et al.*, 2001; Lehane *et al.*, 2001; Lagarrigue *et al.*, 2002). La dieta de los peces salvajes cambia tanto cualitativa como cuantitativamente a medida que crecen. Los ejemplares juveniles se alimentan principalmente de

macroinvertebrados bentónicos, mientras que los adultos ingieren también moluscos, crustáceos e, incluso, pequeños peces, pudiendo adquirir la infección a través de la cadena alimentaria (Mladineo *et al.*, 2009). La participación de diferentes organismos eucariotas presentes en el ambiente acuático en la transmisión de *Cryptosporidium* está demostrada. Varios rotíferos (especies de los géneros *Epiphanes* y *Euchlanis*) y amebas de vida libre (*Acanthamoeba* spp.) pueden captar ooquistes de *C. parvum* cuando coexisten en aguas contaminadas (Fayer *et al.*, 2000b; Gómez-Couso *et al.*, 2007). Recientemente, Reboredo-Fernández *et al.* (2014) comprobaron la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* en macroinvertebrados bentónicos recogidos en varios de los ríos muestreados en el presente trabajo, concluyendo que los invertebrados bentónicos, no solo podrían ser utilizados como bioindicadores de la contaminación hídrica por este protozoo parásito, sino que también podrían desempeñar un papel en la diseminación de *Cryptosporidium*, al ser esta comunidad biótica un eslabón fundamental en la cadena trófica acuática. Además, el canibalismo es común en las comunidades piscícolas y podría contribuir, como plantean Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005), a la propagación de la cryptosporidiosis.

De igual forma, en el estudio realizado en la trucha arcoíris, se observó que los valores de prevalencia de *Cryptosporidium* fueron mayores en los ejemplares más jóvenes, siguiendo una tendencia similar a la obtenida en la trucha común (14,2%; 5,0%; y, 8,3% para las truchas de los grupos T1; T2; y, T3, respectivamente, establecidos en función del tamaño). La prevalencia determinada en las truchas de mayor tamaño (grupo T3) podría ser consecuencia de una mayor exposición al agua contaminada, ya que los sistemas de recirculación empleados en muchas de las instalaciones pueden favorecer la entrada, la concentración y la dispersión de ooquistes como sugieren Sitjà-Bobadilla *et al.* (2005) y Ryan (2010), sin descartar el canibalismo, un fenómeno también muy común entre los peces de cultivo.

Además, se comprobó que el crustáceo *Artemia*, empleado en las piscifactorías para alimentar larvas de peces, puede dispersar ooquistes de *Cryptosporidium*, por lo que Méndez-Hermida *et al.* (2007) sugirieron su participación en la trasmisión de la cryptosporidiosis en peces de cultivo.

Por otra parte, estudios previos realizados bajo microscopía electrónica demostraron que las especies de *Cryptosporidium* que parasitan a los peces difieren tanto ultraestructuralmente como en el desarrollo con respecto a las especies que infectan a mamíferos y aves. Landsberg y Paperna (1986) comprobaron, en peces cíclidos cultivados, que las etapas de merogonia y gamogonia se ubican en la superficie de las microvellosidades de las células del epitelio estomacal, mientras que las etapas de oogonia y esporogonia se localizan intracelularmente en el interior del epitelio gástrico. En consecuencia, los ooquistes totalmente esporulados se encuentran en el interior de vacuolas parasitóforas. De manera similar, Camus y López (1996) observaron, en secciones histológicas del estómago de ejemplares juveniles de la corvina roja, organismos esféricos recubriendo el borde de las microvellosidades y agrupaciones de estructuras cuyo tamaño osciló entre 4-7 μm en vacuolas situadas en el citoplasma de las células epiteliales. En estudios más recientes, Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla (2002) y Álvarez-Pellitero *et al.* (2004) detectaron, respectivamente, grupos de ooquistes localizados en la porción basal del epitelio del estómago en ejemplares de dorada infectados por *C. molnari* y en el epitelio intestinal de rodaballos parasitados por *C. scophthalmi*. De igual forma, etapas de los procesos de oogonia y esporogonia de *C. huwi* se encontraron agrupadas en el estómago del pez ornamental guppy (Ryan *et al.*, 2015).

Un hallazgo importante en nuestro estudio fue la observación de grupos constituidos por 4-20 estructuras en los ciegos pilóricos de 5 ejemplares de trucha común y de una trucha arcoíris. Cada una de las citadas estructuras se identificó como un ooquiste de *Cryptosporidium* sp. de acuerdo con los

criterios comentados anteriormente y propuestos por la USEPA (USEPA, 2005, 2012). Teniendo en cuenta que en los peces los ooquistes totalmente esporulados solo se encuentran dentro de vacuolas parasitóforas localizadas intracelularmente en el epitelio gástrico (Landsberg y Paperna, 1986; Camus y López, 1996; Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 2002; Álvarez-Pellitero *et al.*, 2004), los grupos de ooquistes observados podrían haber sido liberados de las células epiteliales como consecuencia del proceso de homogeneización al que se sometieron los ciegos pilóricos. El protocolo aplicado podría justificar también la detección de un mayor número de muestras positivas en los ciegos pilóricos que en el contenido intestinal, así como las mayores intensidades de parasitación cuantificadas en la primera sección anatómica. De esta forma, en un 69,9% de las muestras de ciegos pilóricos de trucha común se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* con una intensidad que alcanzó un máximo de 8148 ooquistes/trucha, mientras que el porcentaje de muestras positivas en el contenido intestinal fue de un 14,6% y la intensidad máxima de 450 ooquistes/trucha.

Por otra parte, mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación de un fragmento del gen que codifica la *SSU-rRNA*, se caracterizaron molecularmente los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de los 103 ejemplares de trucha común positivos por la técnica de IFD. Se identificó una secuencia próxima a *C. molnari* en los ciegos pilóricos de un ejemplar y la especie *C. parvum* en 47 peces, correspondiendo a 7 muestras de contenido intestinal y a 40 muestras de ciegos pilóricos, entre las que se incluyen aquellas 5 truchas en las que se detectaron grupos de ooquistes.

La aplicación de la misma metodología para caracterizar molecularmente, a nivel de la *SSU-rRNA*, los aislados de *Cryptosporidium* obtenidos de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal de las 33 truchas arcoíris clasificadas como positivas mediante la técnica de IFD, permitió identificar secuencias próximas a *C. molnari* en 2 ejemplares y, de nuevo,

C. parvum en 7 truchas, incluyendo también aquella en la que se detectó un grupo de ooquistes en los ciegos pilóricos.

Estudios moleculares realizados en diferentes especies de peces ornamentales, marinos y de agua dulce revelaron que *Cryptosporidium* puede presentar una amplia diversidad genética en estos hospedadores. Zanguee *et al.* (2010) investigaron, mediante la amplificación de un fragmento del *locus SSU-rRNA*, la presencia de *Cryptosporidium* en 200 ejemplares de 39 especies de peces de acuario en Australia Occidental e identificaron especies/genotipos de *Cryptosporidium* similares o idénticos a los existentes además de 3 nuevos genotipos, denominados genotipos 4, 5 y 6 de peces. De igual forma, Yang *et al.* (2015) analizaron 775 especímenes pertenecientes a 46 especies de peces ornamentales, marinos y de agua dulce e identificaron una secuencia similar a *C. molnari*, *C. huwi*, los genotipos 2, 3, 4 y 5 de peces, una secuencia similar al genotipo 5 de peces, además de 5 nuevos genotipos. Por el contrario, Koinari *et al.* (2013), al estudiar la prevalencia de *Cryptosporidium* en 25 especies de peces de cultivo de agua dulce y salada, identificaron *C. parvum* y un nuevo genotipo, que denominaron genotipo 8 de peces. Más recientemente, Certad *et al.* (2015) solo detectaron, en 5 especies de peces de agua dulce del lago Lemán (Francia), *C. parvum* y *C. molnari* en un 87% y un 7% de las muestras analizadas, respectivamente. En el presente estudio, mediante amplificación por PCR y secuenciación de fragmentos del gen que codifica la SSU-rRNA, solo se identificaron la especie *C. parvum* (95%) y secuencias próximas a *C. molnari* (5%) en ejemplares de las dos especies de trucha objeto de estudio.

Por lo que respecta a las 3 secuencias próximas a *C. molnari* obtenidas en el presente trabajo y teniendo en cuenta las distancias genéticas determinadas, denominamos 2 nuevos genotipos de *Cryptosporidium* propios de peces, de acuerdo con los diferentes autores que identificaron los genotipos 2-8 de peces y para los que se establecieron distancias genéticas comprendidas

entre un mínimo de 3,5% y un máximo de 13,0% (Reid *et al.*, 2010; Zanguee *et al.*, 2010; Morine *et al.*, 2012; Koinari *et al.*, 2013). Así, las secuencias identificadas en dos truchas arcoíris representan el nuevo genotipo 9 de peces (MG951477), al exhibir una distancia genética del 9,9% con respecto a *C. molnari* (HM243550) y entre un 10,9% y un 30,8% con respecto a otras especies/genotipos de *Cryptosporidium*. De forma similar, la secuencia obtenida en una trucha común representa el nuevo genotipo 10 de peces (MH074869), al exhibir una distancia genética del 12,6% con respecto a *C. molnari* (HM243547) y entre un 13,6% y un 24,2% con respecto a otras especies/genotipos de *Cryptosporidium* (ver Tabla 17). Estos nuevos genotipos de peces (9 y 10) podrían tratarse de nuevas especies de *Cryptosporidium*, aunque, evidentemente, se requieren futuras investigaciones que incluyan no solo la caracterización molecular de otros *loci*, sino también estudios histológicos y morfológicos, para confirmar el estatus de especie de los nuevos genotipos.

Tabla 17. Distancias genéticas (%) entre los genotipos 9 y 10 de peces descritos en trucha arcoíris (*O. mykiss*) y trucha común (*S. trutta*), respectivamente, y otras especies/genotipos de *Cryptosporidium* determinadas para un fragmento del gen *SSU-rRNA*.

Especie/genotipo	Genotipo 9	Genotipo 10
<i>C. molnari</i>	9,9	12,6
<i>C. scophthalmi</i> -“like”	30,8	24,2
<i>C. huwi</i>	12,5	13,6
Genotipo 2 de peces	16,3	16,1
Genotipo 3 de peces	13,5	19,3
Genotipo 4 de peces	13,0	15,6
Genotipo 5 de peces	16,9	17,2
Genotipo 6 de peces	15,8	16,6
Genotipo 7 de peces	10,9	14,0
Genotipo 8 de peces	13,0	18,2
<i>C. muris</i>	23,5	16,3
<i>C. parvum</i>	23,8	16,7

Como se comentó anteriormente, diversos estudios reportaron la presencia de la especie zoonótica *C. parvum* en distintos peces, tanto de agua dulce como salada (Reid *et al.*, 2010; Koinari *et al.*, 2013; Certad *et al.*, 2015). Además, varios autores sugieren que esta especie puede desarrollarse y multiplicarse en estos hospedadores acuáticos. Certad *et al.* (2015) realizaron un análisis histológico de los tejidos digestivos de peces de agua dulce que fueron positivos a *C. parvum* mediante PCR, el cual reveló la presencia de estructuras redondeadas dispuestas en el borde apical de las células del estómago e intestino compatibles con las etapas de desarrollo de *C. parvum*. En consecuencia, los autores sugirieron que esta especie infecta activamente a los peces, en lugar de ser transmitida pasivamente. Por el contrario, en un estudio inicial sobre la transmisión experimental de *C. parvum* a la trucha arcoíris, no se observaron etapas del ciclo de vida de *Cryptosporidium* en el borde apical de las células del tracto digestivo durante el examen histológico de las secciones gastrointestinales teñidas con hematoxilina-eosina. Sin embargo, la observación microscópica de secciones del estómago y de la región pilórica de los peces expuestos a *C. parvum* reveló un gran número de estructuras esféricas de 5-7 μm localizadas profundamente en el tejido epitelial, visualizándose un mayor número de estas estructuras en peces sometidos a condiciones de estrés. Además, la aplicación de una técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgM e IgG anti-*Cryptosporidium*, reveló una fluorescencia en estas estructuras (Freire-Santos *et al.*, 1998).

En el presente trabajo, la caracterización molecular de los aislados obtenidos de las muestras gastrointestinales en las que se visualizaron ooquistes de *Cryptosporidium* mediante IFD, permitió identificar la especie *C. parvum*, incluidas aquellas truchas en cuyos ciegos pilóricos se detectaron grupos de ooquistes. Aunque el análisis histológico de las muestras no se llevó a cabo debido al deterioro del tejido por autólisis, sin descartar la posibilidad

de que en algunas ocasiones la presencia de ooquistes se deba a una contaminación o tránsito pasivo, los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que es posible la infección natural por *C. parvum* en trucha común y de cultivo, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: (i) la observación de grupos de ooquistes identificados molecularmente como pertenecientes a *C. parvum* en los ciegos pilóricos de 6 truchas; (ii) la notable cuantificación ooquistica en esta región anatómica (hasta 8148 ooquistes/trucha); en ausencia de una verdadera infección, es improbable que las truchas acumulen valores tan elevados, considerando que el tiempo necesario para el vaciamiento del contenido intestinal tras la ingestión de alimento oscila entre 36-48 horas (Huet, 1983) y que la concentración media de ooquistes en cursos fluviales está establecida entre 10^{-6} y 10^2 ooquistes/L (Vermeulen *et al.*, 2019); y, (iii) la observación de ooquistes libres en muestras obtenidas mediante raspado intestinal y no sobre materia fecal de acuerdo con las consideraciones realizadas por Zanguee *et al.* (2010).

La identificación de la especie zoonósica *C. parvum* en la trucha común y en la arcoíris puede representar un riesgo para la salud pública, ya que los peces son una potencial fuente de infección para el ser humano, como sugieren Roberts *et al.* (2007). Los pescadores y manipuladores de alimentos podrían infectarse directamente mientras evisceran los ejemplares o indirectamente a través del contacto con superficies contaminadas o fómites durante el almacenamiento de los peces. Por tanto, las dos especies de trucha consideradas amplían la gama de alimentos implicados en la transmisión de la cryptosporidiosis, cuyo agente etiológico es responsable de más de 8 millones de casos de enfermedad transmitida por alimentos cada año (Ryan *et al.*, 2018).

Por otra parte, para conocer el origen de la infección y comprender mejor la transmisión de la cryptosporidiosis es esencial subtipar los aislados de la

especie zoonósica *C. parvum*. Uno de los marcadores más utilizados por su carácter polimórfico es el análisis de la secuencia de ADN correspondiente al gen *gp60*. Aunque desafortunadamente todos los intentos de subtipar los aislados de *C. parvum* obtenidos de la trucha arcoíris fueron infructuosos, la amplificación y posterior secuenciación de un fragmento del citado gen, permitió identificar los subtipos IIAA15G2R1 y IIAA18G3R1 de *C. parvum* en muestras de trucha común. Estudios previos realizados en la misma área geográfica de la que proceden las truchas analizadas, revelaron que el subtipo hipertransmisible IIAA15G2R1 es prevalente en los rumiantes domésticos (Díaz *et al.*, 2010, 2015) y que el subtipo IIAA18G3R1 se presenta también en terneros (Soilán López, 2014). Además, ambos subtipos han sido frecuentemente aislados en casos de cryptosporidiosis humana en Portugal, Eslovenia, Países Bajos e Irlanda del Norte (ver Khan *et al.*, 2018). Como las truchas salvajes son ubicuas en los ecosistemas de agua dulce, este hallazgo puede deberse a la escorrentía a partir de superficies contaminadas y/o a la descarga de aguas residuales. El área donde se realizó el estudio es, en gran parte, agrícola y ganadera, estando demostrado que tanto los rumiantes domésticos como la fauna salvaje contribuyen a la contaminación ambiental, principalmente de las aguas superficiales. Además, la alta precipitación característica de la región y el uso continuado de ciertas prácticas agrícolas (como la aplicación de purines sin tratar a las tierras de cultivo) favorecen la dispersión de los ooquistes a los cuerpos de agua, sin descartar otras actividades de origen humano (Gómez-Couso *et al.*, 2006; Castro-Hermida *et al.*, 2006, 2008b, 2010; Reboredo-Fernández *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2018).

En este sentido, los organismos acuáticos, entre los que se encuentran los moluscos bivalvos, se consideran excelentes bioindicadores de la contaminación por protozoos parásitos de las aguas dulce y salada (Gómez-Couso *et al.*, 2003; Gómez-Couso y Ares-Mazás, 2012; Robertson y Fayer,

2012; Palos-Ladeiro *et al.*, 2013). De manera similar y como sugieren Certad *et al.* (2015), los peces pueden ser buenos indicadores de la contaminación microbiológica de los cuerpos de agua. En el presente estudio, se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* en truchas salvajes capturadas en 27 de los 44 ríos muestreados en Galicia (61,4%), que pertenecen a 9 de las 10 cuencas hidrográficas consideradas. Estos hallazgos confirman la presencia de este protozoo parásito en aguas de los ríos gallegos, previamente denunciada por Gómez-Couso *et al.* (2006) y por Castro-Hermida *et al.* (2008b, 2010), demostrando, una vez más, la amplia dispersión de *Cryptosporidium* en ambientes acuáticos de agua dulce.

En muestras hídricas, la detección de formas infectantes de protozoos parásitos con importancia en salud pública requiere el empleo de una metodología específica y laboriosa que implica la filtración de grandes volúmenes de agua, la elución de las formas parasitarias retenidas en el filtro, la concentración y posterior purificación mediante técnicas de inmunoseparación magnética (IMS), para finalmente detectar y confirmar la identificación de las formas de resistencia mediante la técnica de IFD y posterior tinción con DAPI (USEPA, 2005, 2012).

De esta forma, el análisis realizado en las muestras del influente (agua de río) y del efluente de la piscifactoría de trucha arcoíris en la que se llevó a cabo el estudio reveló la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* y de quistes de *Giardia* en ambas muestras. Las concentraciones máximas de oo/quistes se detectaron en la muestra del influente de agua recogida en febrero de 2016 (1,7 oo/quistes por litro). Desafortunadamente, la caracterización molecular de ambos protozoos a partir de las muestras hídricas no fue posible, quizá debido a la baja concentración de formas parasitarias, a la presencia de inhibidores y/o a la interferencia con ácidos nucleicos de otros organismos acuáticos microscópicos.

Evidentemente, la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* en las piscifactorías está íntimamente relacionada con la calidad del agua utilizada para el abastecimiento de estas instalaciones. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de estos protozoos parásitos en los cursos fluviales de la misma zona geográfica ya fue reportada, detectándose quistes de *Giardia* con mayor frecuencia y en concentraciones más altas que las correspondientes a ooquistes de *Cryptosporidium* (Gómez-Couso *et al.*, 2005; Castro-Hermida *et al.*, 2008a; b). De forma similar, en nuestro estudio, los quistes de *Giardia* se detectaron en un mayor número de muestras de agua que los ooquistes de *Cryptosporidium* (7 y 5 muestras, respectivamente).

En este sentido, es sorprendente que del total de las 973 truchas analizadas (incluyendo ambas especies), tan solo se detectasen quistes de *Giardia* mediante la técnica de IFD en un ejemplar de trucha común (0,1%), siendo infructuosos los intentos de amplificar el gen *SSU-rRNA* de *Giardia*. Esta baja prevalencia podría justificarse utilizando los argumentos empleados para avalar la infección por *C. parvum* en estos hospedadores como son: (i) las bajas concentraciones de quistes detectadas en los cursos fluviales; (ii) el tiempo necesario para el vaciamiento del contenido intestinal; y, (iii) la posibilidad de que en el tracto gastrointestinal de estos salmónidos existan enzimas que puedan alterar la composición de la pared de los quistes, impidiendo que se fijen los anticuerpos monoclonales empleados en la técnica de IFD o faciliten su desenquistamiento. Sin embargo, aunque escasos, algunos estudios describen la presencia de *Giardia microti* y *Giardia duodenalis* (genotipos A, B y E) en peces de agua dulce, tanto de cultivo como salvajes, con prevalencias comprendidas entre 0,4-8,4%, concluyendo que estos peces pueden desempeñar un importante papel en la epidemiología de la giardiosis humana (Yang *et al.*, 2010; Ghoneim *et al.*, 2012). Además, el hallazgo mediante estudios histológicos de un gran número de trofozoítos y

quistes en algunos ejemplares sugiere que la infección es posible en estos hospedadores acuáticos (Yang *et al.*, 2010).

Como se ha comentado al inicio de esta Sección, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es contribuir al conocimiento de *Cryptosporidium* en organismos acuáticos, concretamente en dos especies de salmónidos, la trucha común y la trucha arcoíris. Sin embargo, la disponibilidad de los tractos gastrointestinales y de los sedimentos obtenidos mediante concentración difásica de las dos secciones anatómicas analizadas (ciegos pilóricos y contenido intestinal) nos permitió detectar la presencia de formas macro y microscópicas de otros parásitos gastrointestinales en la trucha común, ampliando así el estudio de la parasitofauna gastrointestinal de estos peces de agua dulce.

De esta forma, mediante la observación microscópica bajo campo claro y/o DIC de tres alícuotas de 10 μ L de cada uno de los sedimentos obtenidos a partir de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal de las 613 truchas analizadas, se detectaron ooquistes esporulados de *Eimeria* en 189 ejemplares, estableciéndose una prevalencia del 30,8%. Un valor de prevalencia similar (32,8%) fue reportado por Llovo Taboada (1990) tras el examen de 300 muestras fecales obtenidas de ejemplares de trucha común capturados en la misma región geográfica. El análisis morfométrico de los ooquistes visualizados en el presente estudio permitió identificarlos como pertenecientes a la especie *E. truttae*. En estudios previos realizados en este mismo hospedador en España y Rusia, se establecieron valores de prevalencia para este coccidio notablemente más bajos (16,3% y 12,3%, respectivamente) (Álvarez-Pellitero y González-Lanza, 1983; Pugachev *et al.*, 2010).

El apicomplejo *E. truttae* fue identificado por primera vez por Léger y Hesse en 1919 a partir de ejemplares de trucha común procedentes del río Furon situado al sureste de Francia. Estos autores describieron la existencia, en los ciegos pilóricos, de unos ooquistes esféricos de 12 μ m de diámetro, con

una pared delgada, ya esporulados, conteniendo 4 esporocistos ovalados de $8 \times 4 \mu\text{m}$ con un extremo aplanado y sin residuo ooquistico (Léger y Hesse, 1919). En 1974, Molnar y Hanek informaron de la presencia de ooquistes de *E. truttae* en la porción anterior del intestino de ejemplares de la especie de trucha *Salvelinus fontinalis* capturada en el río Matamek (Canadá), describiendo, además, las características morfológicas del esporocisto, que presentaba un cuerpo de Stieda en forma de disco ($2,7 \mu\text{m}$ de diámetro) y contenía 2 esporozoítos flexionados y de aspecto alargado ($8,5 \times 1,6 \mu\text{m}$) (Molnar y Hanek, 1974). Este coccidio también fue detectado por Álvarez-Pellitero y González-Lanza en especímenes de trucha común del río Porma (España). Los autores observaron ooquistes que mostraban forma esférica ($11,5 \mu\text{m}$ de diámetro) y una pared delgada; con cuatro esporocistos ovalados ($8,4 \times 4,6 \mu\text{m}$); un cuerpo de Stieda en forma de disco ($2,6 \mu\text{m}$ de diámetro); y, en el interior de cada esporocisto, 2 esporozoítos alargados y ligeramente arqueados ($8,1 \times 1,5 \mu\text{m}$) (Álvarez-Pellitero y González-Lanza, 1983).

Las características morfométricas de los ooquistes de *E. truttae* identificados en la presente Tesis Doctoral son consistentes con los datos previamente publicados, aunque se observan ligeras variaciones. El tamaño de los ooquistes esporulados para una determinada especie de *Eimeria* puede variar, ya que está descrita la existencia de un polimorfismo morfométrico tanto en un único hospedador como entre diferentes hospedadores procedentes de distintas localizaciones geográficas (Duszynski, 1971; Gardner y Duszynski, 1990). Además, es conocido que algunos miembros de la familia Eimeriidae presentan un polimorfismo morfológico durante el período de patencia, pudiendo aumentar el tamaño de los ooquistes esporulados hasta un 40% (Duszynski, 1971). Así, estudios publicados recientemente sobre especies de *Eimeria* que parasitan a hospedadores marsupiales, y en los que también se llevó a cabo un análisis molecular, varios autores observaron una plasticidad morfométrica en ooquistes de las especies *Eimeria trichosuri*,

Eimeria quokka y *Eimeria setonicis* (Power *et al.*, 2009; Austen *et al.*, 2014). De igual forma, Afonso *et al.* (2014) informaron sobre estas variaciones morfométricas en los ooquistes de *Eimeria hessei* detectados en murciélagos. Desafortunadamente, no existen estudios que identifiquen tanto morfológica como molecularmente *E. truttae* y que permitan confirmar las variaciones morfológicas observadas en los ooquistes visualizados en distintas especies de trucha procedentes de diferentes zonas geográficas, siendo el presente estudio el primero que incluye ambas caracterizaciones.

Considerando que la especie *E. truttae* no había sido caracterizada genéticamente y con el fin de realizar un cribado de las muestras positivas por microscopía, se llevó a cabo la puesta a punto de una técnica de PCR semi-anidada, que incluyó el diseño de unos cebadores que permitieron la amplificación de un fragmento de ~420 pb del gen que codifica la SSU-rRNA de numerosas especies de *Eimeria* que parasitan tanto a peces, como a anfibios, reptiles, aves y mamíferos. A continuación, siguiendo el protocolo descrito por Yang *et al.* (2012), se amplificó un fragmento de mayor tamaño (~1300 pb) del mismo marcador genético que proporcionó una mayor fiabilidad para el posterior análisis filogenético de las secuencias obtenidas.

El análisis molecular del gen *SSU-rRNA* permitió identificar una única secuencia de ~420 pb en 100 muestras de trucha común. No obstante, la amplificación del fragmento de ~1300 pb del mismo gen reveló 2 secuencias representativas que mostraron 5 diferencias nucleotídicas entre sí. El posterior análisis filogenético agrupó estas secuencias dentro del clado de las especies de *Eimeria* que parasitan a peces, próximas a *E. nemethi* al exhibir una similitud del 96,7% con esta especie.

La secuenciación del gen que codifica la SSU-rRNA es actualmente la técnica molecular más ampliamente utilizada en la caracterización de las especies de *Eimeria* y en el análisis de sus relaciones filogenéticas (Zhao y Duszynski, 2001; Power *et al.*, 2009; Gibson-Kueh *et al.*, 2011b; Yang *et al.*,

2012; Afonso *et al.*, 2014; Austen *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2018). La amplificación de otros *loci* menos conservados puede aportar información adicional sobre la posición evolutiva de las especies de *Eimeria* que parasitan a los peces en relación con otras especies del género. Sin embargo, en el caso de las especies de *Eimeria* que infectan a estos organismos acuáticos, las secuencias para otros genes más variables no están disponibles. No obstante, los resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con los hallazgos filogenéticos reportados en estudios previos (Molnár *et al.*, 2012; Rosenthal *et al.*, 2016; Xavier *et al.*, 2018).

Varios autores sugirieron que los peces pudieron haber sido los primeros animales vertebrados parasitados por especies de *Eimeria*. El análisis filogenético de este género reveló que estos parásitos y sus hospedadores co-evolucionaron a lo largo del tiempo, indicando que las especies de *Eimeria* que infectan a peces son más primitivas que aquellas que parasitan a vertebrados terrestres (Power *et al.*, 2009; Rosenthal *et al.*, 2016). Así, el único análisis filogenético existente sobre las especies de *Eimeria* propias de peces, realizado por Molnár *et al.* (2012) mostró que estas especies forman un clado basal en relación con otras de la familia Eimeriidae, separándose notoriamente de los clados que incluyen especies de *Eimeria* que parasitan a anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Además, los datos filogenéticos aportados por estos autores indican que las especies de *Eimeria* con localización intestinal (*E. anguillae*, *E. percae*, *E. daviesae* y *E. variabilis*) evolucionaron independientemente de aquellas que se ubican en los ciegos pilóricos o en los tejidos extraintestinales (*E. rutili* y *E. nemethi*). También, observaron diferencias morfológicas entre estos dos grupos. De esta forma, en aquellas especies de *Eimeria* que parasitan el intestino, el cuerpo de Stieda tiene forma de tapón, mientras que los esporocistos de *E. rutili* y *E. nemethi* muestran un cuerpo de Stieda en forma de disco. Los resultados obtenidos en el presente estudio (detección de ooquistes esporulados en los ciegos pilóricos,

presencia de un cuerpo de Stieda en forma de disco y la posición filogenética de *E. truttae*) son coherentes con las observaciones anteriormente mencionadas sobre las especies de *Eimeria* que parasitan a los peces.

También, durante el examen microscópico de los sedimentos a los que se ha hecho referencia, se observaron esporas de mixosporidios en 46 de los 613 ejemplares de trucha común analizados, estableciéndose una prevalencia del 7,5%. La presencia de estos parásitos en trucha común ya fue descrita en España (González-Lanza y Álvarez-Pellitero, 1984) y también observada en el mismo hospedador procedente de en ríos gallegos (Freire Santos, comunicación personal). Los mixozoos son un grupo muy diverso de metazoos parásitos microscópicos compuesto por más de 2000 especies pertenecientes a 55 géneros (Canning y Okamura, 2004), siendo un grupo en continua revisión, de forma que en los últimos 5 años (periodo 2014-2018) se han descrito más de 130 nuevas especies. Aunque están descritas especies que infectan a anfibios, reptiles, aves e incluso a mamíferos, los mixosporidios son principalmente endoparásitos obligados de los peces (Holzer *et al.*, 2018).

Con respecto a los salmónidos, las especies de mixozoos con importancia ecológica y económica, tanto en ejemplares salvajes como en peces de cultivo, son *Myxobolus cerebralis* y *Tetracapsuloides bryosalmonae* que causan la enfermedad del torneo y la enfermedad proliferativa del riñón, respectivamente, consideradas, en la actualidad, como enfermedades emergentes en Europa y América del Norte (Sarker *et al.*, 2015; Kotob *et al.*, 2017; Bailey *et al.*, 2018). Ambas especies presentan unos ciclos biológicos complejos en los que se incluyen un hospedador vertebrado (la trucha) y un hospedador invertebrado (oligoquetos y briozoos para *M. cerebralis* y *T. bryosalmonae*, respectivamente) (Canning y Okamura, 2004).

En el presente estudio se visualizaron esporas de mixosporidios pertenecientes a los géneros *Myxobolus* y *Henneguya*. Sin embargo, debido a la similitud morfológica, es necesario realizar estudios de biología molecular

para confirmar las especies identificadas mediante microscopía óptica. De todas formas, los resultados obtenidos evidencian la amplia dispersión de este grupo de parásitos en los ríos gallegos (truchas capturadas en 12 de los 44 ríos muestreados en el presente estudio presentaban esporas, datos no mostrados), por lo que sería de gran interés valorar tanto cualitativa como cuantitativamente su presencia en cursos fluviales ante las posibles repercusiones en acuicultura e incluso en salud pública (Kotob *et al.*, 2017; Lee, 2017).

Por otra parte, desde el último cuarto del siglo XX, cuando Álvarez Pellitero en 1979 publicó los resultados de un amplio estudio realizado en 1205 truchas capturadas en 9 ríos de León (Álvarez Pellitero, 1979) y salvo observaciones puntuales, no se dispone de datos sobre la helmintofauna gastrointestinal de la trucha común en España. Además, una revisión de la literatura científica reveló que la mayoría de los estudios que aportan información sobre helmintos en este salmónido no son recientes y los actuales son muy escasos. Como se comentó anteriormente, al disponer de los tractos gastrointestinales de los ejemplares de trucha común objeto de estudio, se realizó un análisis macroscópico cuyos resultados, junto con las observaciones derivadas del examen microscópico de los sedimentos obtenidos a partir de los ciegos pilóricos y del contenido intestinal, procedemos a comentar en la última parte de esta Sección.

El examen macroscópico de los tractos gastrointestinales de las 613 truchas capturadas en 44 ríos gallegos de 10 cuencas hidrográficas reveló la presencia de formas adultas de helmintos en 282 ejemplares, ofreciendo una prevalencia del 46,0%, valor mucho más bajo que el reportado por Álvarez Pellitero (1979) para el mismo hospedador (98,5%). Las posibles razones de esta gran diferencia pueden ser, entre otras, el tiempo transcurrido entre la evisceración de los peces por parte de los pescadores locales y el procesamiento de las muestras, período que pudo provocar el deterioro de las

formas parasitarias más delicadas, sin descartar, por supuesto, las diferencias geográficas y/o temporales en la distribución de los helmintos parásitos y de sus hospedadores, circunstancias probablemente debidas a las variaciones ambientales ocasionadas por el desarrollo agrícola e industrial y al cambio climático experimentados durante los últimos 40 años. Sin embargo, el análisis microscópico de los sedimentos obtenidos tras la aplicación de una concentración difásica permitió detectar un mayor número de muestras positivas, ya que se observaron huevos de distintas especies de helmintos en un total de 485 ejemplares de trucha común, incrementando, así, el valor de prevalencia hasta el 79,2%. De esta forma, es destacable que en un significativo número de muestras se encontraron huevos pertenecientes a los helmintos de menor tamaño y más frágiles, con respecto a las muestras en las que se visualizaron las correspondientes formas adultas (*i.e.* *Crepidostomum* spp.). Por lo tanto, aunque el análisis microscópico no permite en muchas ocasiones identificar la especie, en el presente trabajo proporcionó datos epidemiológicos adicionales.

Se identificaron seis especies de helmintos gastrointestinales: dos especies de trematodos (*C. metoecus* y *C. farionis*), tres especies de nematodos (*S. ephemeridarum*, *R. acus* y *P. salvelini*) y una especie de acantocéfalo (*E. truttae*), todas ellas descritas previamente en este hospedador (Álvarez Pellitero, 1979; Dezfuli *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2002; Quilichini *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque García Pérez *et al.* (1993) hallaron una especie de cestodo perteneciente al género *Cyatocephalus* en truchas salvajes de ríos del norte de España, tanto en el estudio realizado por Álvarez Pellitero (1979) como en el presente, no se encontraron especies de esta clase, lo que sugiere, que, a pesar del tiempo transcurrido, estos helmintos son poco frecuentes en la trucha común del noroeste de España.

La prevalencia detectada para la parasitación por especies del género *Crepidostomum* (*C. metoecus* y *C. farionis*) mediante la identificación de

formas adultas fue del 9,0%. Sin embargo, la observación microscópica de huevos reveló una mayor prevalencia (63,1%). Además, se comprobó que la parasitación tiende a aumentar significativamente con la longitud/edad de la trucha. De igual forma, Álvarez Pellitero (1979) reportó esta misma tendencia y prevalencias similares (79,0% y 63,0% para *C. metoecus* y *C. farionis*, respectivamente). Es conocido que la prevalencia y/o la intensidad de las infecciones parasitarias está correlacionada positivamente con la longitud estándar de los peces. Los peces más grandes, como consecuencia de un prolongado tiempo de exposición, de la ingestión de más presas parasitadas y de ofrecer una mayor área de superficie, albergan una carga parasitaria superior (Shotter, 1973; Betterton, 1974; Chandler *et al.*, 1995; Poulin, 2000). A pesar de que Dezfuli *et al.* (2001) no detectaron ningún trematodo en truchas capturadas en ríos del norte de Italia, estas especies se encontraron, con distintos valores de prevalencia, en la trucha común de varios países europeos, demostrando que están ampliamente distribuidas, aunque *C. metoecus* es más prevalente que *C. farionis* (Byrne *et al.*, 2002; Quilichini *et al.*, 2007).

En el presente estudio, el helminto más prevalente mediante la observación de formas adultas fue *S. ephemeridarum* (17,0%). Al igual que se comprobó con las especies de trematodos, la prevalencia aumentó tras el examen microscópico (46,7%), siendo significativamente superior en las truchas mayores de dos años. Aunque este nematodo fue descrito en la península ibérica por Álvarez Pellitero (1979), apenas está reportado en otras partes de Europa (Hartvigsen y Kennedy, 1993; Byrne *et al.*, 2002).

Los valores de prevalencia e intensidad media obtenidos para *R. acus* (9,5%; 2,6 adultos/trucha) son similares a los descritos por Dorucu *et al.* (1995) y Dezfuli *et al.* (2001) para esta especie de salmónido capturada en ríos de Escocia e Italia, respectivamente. Sin embargo, en el citado estudio de Álvarez Pellitero (1979), los valores correspondientes fueron superiores (44,1%; 8,3 adultos/trucha), comprobando una tendencia a aumentar con la

longitud/edad del pez. Este mismo patrón se observó en el presente estudio, ya que las prevalencias e intensidades medias halladas en ejemplares menores de 2 años fueron significativamente inferiores a las obtenidas en las truchas de mayor edad. Este hecho podría explicarse por la ingestión de pequeños peces parasitados (hospedadores paraténicos) u oligoquetos y crustáceos (hospedadores intermediarios) involucrados, como sugiere Moravec (1970, 1996), en el ciclo biológico de este nematodo y que forman parte de la cadena alimentaria de la trucha.

El nematodo *P. salvelini* fue el helminto menos prevalente, tanto en el análisis macroscópico como en el microscópico (2,1% y 0,7%, respectivamente), lo que le confiere a esta especie, de acuerdo con los términos definidos por Valtonen *et al.* (1997), una categoría de “rara” en la comunidad de helmintos de la trucha común gallega. Este parásito no se considera frecuente en la trucha salvaje (Byrne *et al.*, 2000, 2002; Kennedy y Hartvigsen, 2000; Dezfuli *et al.*, 2001; Quilichini *et al.*, 2007), aunque Álvarez Pellitero (1979) reportó una prevalencia del 25,9%.

Formas adultas y huevos del acantocéfalo *E. truttae* se determinaron en el 8,5% y el 7,7% de las truchas analizadas, respectivamente. Aunque Álvarez Pellitero (1979), en el amplio estudio realizado, no detectó ningún acantocéfalo, previamente Cordero del Campillo y Álvarez Pellitero (1976) mencionaron la presencia de especies de este grupo en ejemplares de trucha común capturados en ríos gallegos. La prevalencia obtenida en el presente estudio se encuentra en el rango descrito para este hospedador en diferentes áreas de Escocia Central (Dorucu *et al.*, 1995) y en el norte de Italia (Dezfuli *et al.*, 2001). Sin embargo, no se detectaron especies de acantocéfalos en truchas capturadas en cuatro lagos irlandeses (Byrne *et al.*, 2000) ni en ejemplares de diez cuencas hidrográficas de la isla mediterránea de Córcega (Quilichini *et al.*, 2010).

Por otra parte, considerando que las truchas analizadas fueron proporcionadas por pescadores locales quienes participaron voluntaria y desinteresadamente en el presente estudio, el número de ejemplares varió notablemente entre las distintas cuencas hidrográficas. Por tanto, el análisis de la comunidad helmíntica se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ejemplares procedentes de aquellas cuencas de las que se dispuso de un mayor número de muestras (más de 100 truchas), concretamente las cuencas hidrográficas de los ríos Tambre, Ulla, y Miño-Sil.

Nuestros resultados demuestran que las truchas de las tres cuencas hidrográficas consideradas están parasitadas por especies de los 5 géneros identificados y que la infracomunidad helmíntica está constituida por un máximo de 4 helmintos, siendo la asociación entre el trematodo *Crepidostomum* y el nematodo *Salmonema* la más frecuente (29,0%). La dieta, supeditada al hábitat y a las preferencias alimentarias, desempeña un papel importante en la composición de las comunidades de parásitos intestinales de los peces, los cuales se alimentan de presas que pueden actuar como hospedadores intermediarios o paraténicos de especies de helmintos parásitos con ciclos de vida complejos, determinando variaciones en el grado de la asociación parasitaria (Dogiel, 1966, 1970; Bowen *et al.*, 2002; Guidelli *et al.*, 2003; Moravec, 2003; Poulin, 2013; Cirtwill *et al.*, 2016). La asociación *Crepidostomum-Salmonema* podría ser consecuencia de que ambos parásitos, en sus ciclos biológicos, tienen hospedadores intermediarios comunes, insectos del orden Ephemeroptera que, a su vez, forman parte de la cadena alimentaria de la trucha común. Además, se comprobó que la complejidad de la infracomunidad de helmintos aumentó con la edad de la trucha, ya que los parasitismos por un helminto disminuyeron, mientras que los que implicaron a dos, tres o cuatro helmintos aumentaron. La repercusión del tamaño de los peces tanto en la abundancia como en la riqueza de parásitos helmintos está bien documentada. Además, los valores más altos de prevalencia, intensidad

y/o abundancia medias de helmintos hallados en truchas de mayor edad puede atribuirse a un incremento en el riesgo de infección con respecto a los especímenes más jóvenes, ya que los peces de mayor edad pueden ingerir cantidades superiores de presas infectadas durante un período de tiempo más largo (Guégan y Hugueny, 1994).

Teniendo en cuenta los parámetros ecológicos analizados, la comunidad de helmintos gastrointestinales de las truchas salvajes capturadas en las 3 cuencas hidrográficas consideradas se caracteriza por su baja riqueza de especies y baja diversidad, mostrando la cuenca de los ríos Miño-Sil los valores más altos para ambos parámetros ($S = 6$; $H' = 1,26$). Estas diferencias podrían ser consecuencia de la mayor superficie de esta cuenca en comparación con las de los ríos Tambre y Ulla o tal vez, por una menor alteración ambiental provocada por la actividad humana. Valores similares de riqueza y diversidad de especies se describieron para ejemplares de *S. trutta* capturados en ríos de Alemania ($S = 5$; $H' = 0,76$), aunque estos valores aumentaron para aquellos procedentes de la costa alemana del Mar Báltico ($S = 12$; $H' = 1,04$), lo que demuestra que la vida anádroma facilita la adquisición de nuevos taxones parasitarios (Unger y Palm, 2016).

Una observación destacable fue la significativa diferencia en la prevalencia del acantocéfalo *E. truttae* hallada en ejemplares de trucha común capturados en las tres cuencas hidrográficas analizadas (43,1%; 3,6%; y, 3,4% en truchas de las cuencas de los ríos Tambre, Ulla y Miño-Sil, respectivamente). La parasitación de *S. trutta* por *E. truttae* implica la ingestión de anfípodos gammáridos que actúan como hospedadores intermediarios y que albergan la forma cistacanto (Crompton y Nickol, 1985). Esta forma infectante puede modificar el comportamiento de los crustáceos que reaccionan de manera diferente a la luz, se vuelven fototrópicamente más activos y nadan más cerca de la superficie del agua. Como consecuencia son más visibles y vulnerables a la depredación por parte del hospedador

definitivo (MacNeil *et al.*, 2003; Fielding *et al.*, 2003; Lagrue *et al.*, 2013). Las diferentes prevalencias de *E. truttae* determinadas sugieren que la presencia/abundancia del crustáceo que actúa como hospedador intermediario puede ser diferente en las tres cuencas hidrográficas. Esta posibilidad está respaldada por la información aportada por la Red de Observación Ambiental de Galicia, Laboratorio de Medio Ambiente de Galicia (ROAGA-LMAG, Xunta de Galicia) (<http://siam.xunta.gal/roaga-lma-descripcion>) sobre la fauna de macroinvertebrados bentónicos que habitan varios ríos de las cuencas del Tambre y del Ulla, indicando una mayor abundancia de gammáridos en la cuenca del Tambre (datos no mostrados). También, la citada observación, podría justificarse por la selección de presas por parte de las truchas, pudiendo desempeñar un papel en el patrón de la infección por *E. truttae*. De esta forma, Sánchez Hernández (2009), tras el estudio del contenido estomacal de la trucha común capturada en ríos de las cuencas del Tambre y del Ulla, concluyó que la alimentación de este salmónido en la citada área geográfica está determinada por la presa más abundante y ampliamente distribuida a través del río.

Los anfípodos involucrados en el ciclo biológico de *E. truttae* son especies del género *Gammarus*, específicamente *Gammarus pulex* (Crompton y Nickol, 1985; Kennedy y Hartvigsen, 2000). Aunque no encontramos ninguna referencia sobre la presencia de esta especie en ambientes de agua dulce de la península ibérica, al menos otras 10 especies de este género están descritas en España (García y Jaume, 2008). La familia Gammaridae es el grupo más común de crustáceos en ecosistemas de agua dulce en Galicia, siendo *Echinogammarus lusitanicus* la especie más abundante, aunque *Echinogammarus beriyoni* también está presente en los tramos medios y bajos de los ríos (González González y Cobo Gradín, 2006). Al igual que ocurre en Irlanda con el crustáceo autóctono *Gammarus duebeni* (MacNeil *et al.*, 2000; Prenter *et al.*, 2004), nuestros hallazgos sugieren que las especies de

gammáridos gallegos pueden actuar como hospedadores intermediarios de *E. truttae*, aunque son necesarios estudios que confirmen esta observación.

Finalmente, las condiciones biológicas, físicas y químicas de los ecosistemas de agua dulce se alteran como consecuencia de la contaminación originada por las actividades antropogénicas (Uherek y Pinto Gouveia, 2014). Esta contaminación afecta a la biodiversidad local, a la estructura de la comunidad y a las etapas de desarrollo de los helmintos intestinales de los peces, los cuales se consideran bioindicadores de la calidad de los cuerpos de agua (Lafferty, 1997; Marcogliese, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Vidal-Martínez *et al.*, 2010; Shea *et al.*, 2012; Vidal-Martínez y Wunderlich, 2017). Además, si los parásitos con ciclos de vida complejos y transmitidos a través de la cadena trófica están presentes en un ecosistema, se puede inferir que sus respectivos hospedadores también deben estar presentes (Sures y Streit, 2001; Thielen *et al.*, 2007). Los resultados de este trabajo demuestran que la comunidad de helmintos gastrointestinales de la trucha común capturada en los ríos gallegos está constituida principalmente por especies de helmintos con ciclos biológicos que dependen de la fauna de invertebrados bentónicos, comunidad considerada, a su vez, uno de los bioindicadores más importantes del estado ecológico de los cuerpos de agua por la Directiva Marco del Agua de la Unión Europea (Directiva 2000/60/CE). Por tanto, y aunque son necesarios posteriores estudios sobre otros parámetros ambientales, la diversidad de los helmintos gastrointestinales de este pez salmónido puede proporcionar información sobre la calidad del agua de los ríos en los que habita.





CONCLUSIONES



Primera

La presencia de grupos de ooquistes en los ciegos pilóricos de la trucha común (*S. trutta*) y de la trucha arcoíris (*O. mykiss*) identificados como pertenecientes a *C. parvum*, junto con la elevada carga parasitaria observada en la misma sección anatómica de algunos ejemplares, sugiere que la infección natural por esta especie de *Cryptosporidium* propia de mamíferos es posible en estos salmónidos.

Segunda

La identificación de la especie zoonótica *C. parvum* en la trucha común y en la trucha arcoíris representa un riesgo de infección para los pescadores y los manipuladores de alimentos, repercutiendo, por tanto, en salud pública.

Tercera

La identificación en ejemplares de trucha común de los subtipos IIaA15G2R1 y IIaA18G3R1 de *C. parvum*, comúnmente detectados en la población humana y en los rumiantes domésticos, confirma que la contaminación de los cursos fluviales por este protozoo parásito es consecuencia de las actividades antropogénicas.

Cuarta

Considerando las distancias genéticas determinadas para los aislados ooquisticos identificados como próximos a *C. molnari*, se establecen dos nuevos genotipos de *Cryptosporidium* que parasitan a peces: el genotipo 9 en la trucha arcoíris (*O. mykiss*) (distancia genética 9,9%) y el genotipo 10 en la trucha común (*S. trutta*) (distancia genética 12,6%).

Quinta

Aunque se desconoce la importancia de la cryptosporidiosis en el cultivo de la trucha arcoíris, el hallazgo de ooquistes en ejemplares de esta especie y en el agua de las instalaciones de una piscifactoría, plantea la necesidad de considerar la presencia de *Cryptosporidium* en brotes de enfermedad ante su carácter oportunista, favorecido por las condiciones de la producción intensiva.

Sexta

La identificación morfológica de ooquistes de *E. truttae* (Léger y Hesse, 1919) en la trucha común permitió, un siglo después de su descripción, caracterizar molecularmente y analizar la filogenia de esta especie.

Séptima

La observación de esporas de mixosporidios pertenecientes a los géneros *Myxobolus* y *Henneguya* en la trucha común evidencia la amplia dispersión de este grupo de parásitos en los ríos gallegos, por lo que sería de gran interés identificar las especies y valorar su presencia en los cursos fluviales, ante las posibles repercusiones en acuicultura e, incluso, en salud pública.

Octava

El estudio sobre la helmintofauna gastrointestinal de la trucha común es el más completo realizado en España, tanto por el área geográfica abarcada, como por los parámetros epidemiológicos y ecológicos analizados. Los resultados obtenidos demuestran prevalencias e intensidades de infección muy variables, así como una comunidad helmíntica caracterizada por una baja riqueza y diversidad de especies.

Novena

La presencia del acantocéfalo *E. truttae* en la trucha común sugiere que las especies nativas de gammáridos (*E. lusitanicus* y *E. beriyoni*) pueden actuar como hospedadores intermediarios de este helminto, ante la ausencia en los ríos gallegos del anfípodo involucrado en su ciclo biológico, *G. pulex*, aunque es necesario confirmar esta observación.

Décima

Teniendo en cuenta que la mayoría de los helmintos observados en el tracto gastrointestinal de la trucha común son especies con ciclos biológicos dependientes de la comunidad de macroinvertebrados bentónicos, considerada uno de los mejores bioindicadores del estado ecológico de los cuerpos de agua, la diversidad de los helmintos presentes en este salmónido puede aportar información complementaria sobre la calidad del agua de los ríos.





REFERENCIAS



- Ade, R.** (1989). *The trout and salmon handbook*. Facts on File, Nueva York, 122 pp.
- Adeyemo, F.E., Singh, G., Reddy, P., Bux, F. y Stenström, T.A.** (2019). Efficiency of chlorine and UV in the inactivation of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater. *Plos One* **14**, e0216040.
- Afonso, E., Baurand, P.-E., Tournant, P. y Capelli, N.** (2014). First amplification of *Eimeria hessei* DNA from the lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) and its phylogenetic relationships with *Eimeria* species from other bats and rodents. *Experimental Parasitology* **139**, 58-62.
- Ahmed, S.A. y Karanis, P.** (2018). Comparison of current methods used to detect *Cryptosporidium* oocysts in stools. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **221**, 743-763.
- Ahmed, W., Goonetilleke, A. y Gardner, T.** (2010). Human and bovine adenoviruses for the detection of source-specific fecal pollution in coastal waters in Australia. *Water Research* **44**, 4662-4673.
- Ahmed, W., Sritharan, T., Palmer, A., Sidhu, J.P.S. y Toze, S.** (2013). Evaluation of bovine feces-associated microbial source tracking markers and their correlations with fecal indicators and zoonotic pathogens in a Brisbane, Australia, reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 2682-2691.
- Aldeyarbi, H.M. y Karanis, P.** (2016). The ultra-structural similarities between *Cryptosporidium parvum* and the gregarines. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **63**, 79-85.
- Almodóvar, A.** (2002). La trucha común hacia una nueva estrategia de conservación. En *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España* (Ed. Doadrio, I.). Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Museo Nacional de Ciencias, Madrid, pp. 303-311.
- Almodóvar, A. y Nicola, G.G.** (1998). Assessment of a brown trout *Salmo trutta* population in the River Gallo (central Spain): angling effects and management implications (Salmonidae). *Italian Journal of Zoology* **65**, 539-543.

Almodóvar, A. y Nicola, G.G. (1999). Effects of a small hydropower station upon brown trout *Salmo trutta* L. in the River Hoz Seca (Tagus Basin, Spain) one year after regulation. *Regulated Rivers: Research and Management* **15**, 477-484.

Almodóvar, A., Suárez, J., Nicola, G.G. y Nuevo, M. (2001). Genetic introgression between wild and stocked brown trout in the Douro River basin, Spain. *Journal of Fish Biology* **59**, 68-74.

Alonso-González, C., Gortázar, J., Baeza Sanz, D. y García de Jalón, D. (2008). Dam function rules based on brown trout flow requirements: design of environmental flow regimes in regulated streams. *Hydrobiologia* **609**, 253-262.

Alonso, C., Gortázar, J. y García de Jalón, D. (2017). Trucha común-*Salmo trutta* Linnaeus, 1758. En *Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles* (Eds. Sanz, J. J. y García-Berthou, E.). Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN), Madrid, 42 pp.

Álvarez Pellitero, P. (1979). Helminthocenosis del tracto digestivo de la trucha en los ríos de León. Tesis Doctoral. Universidad de León, 264 pp.

Álvarez-Pellitero, M.P. y González-Lanza, M.C. (1983). Observaciones sobre la presencia de *Eimeria truttae* en *Salmo* spp. de León (NO. de España). *Revista Ibérica de Parasitología* **43**, 111-112.

Álvarez-Pellitero, P. y Sitjà-Bobadilla, A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology* **32**, 1007-1021.

Álvarez-Pellitero, P., Quiroga, M.I., Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M.J., Palenzuela, O., Padrós, F., Vázquez, S. y Nieto, J.M. (2004). *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Diseases of Aquatic Organisms* **62**, 133-145.

- Álvarez-Pellitero, P., Pérez, A., Quiroga, M.I., Redondo, M.J., Vázquez, S., Riaza, A., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A. y Nieto, J.M. (2009). Host and environmental risk factors associated with *Cryptosporidium scophthalmi* (Apicomplexa) infection in cultured turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces, Teleostei). *Veterinary Parasitology* **165**, 207-215.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O. y Antunes, F. (2003). Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 2744-2747.
- Appelbee, A.J., Frederick, L.M., Heitman, T.L. y Olson, M.E. (2003). Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. *Veterinary Parasitology* **112**, 289-294.
- APROMAR (2018). *La acuicultura en España*. Asociación Empresarial de la Acuicultura de España (APROMAR), Cádiz, 94 pp.
- Arregui Maraver, L. (2013). *Cuadernos de Acuicultura. El cultivo de la trucha arcoíris* (*Oncorhynchus mykiss*). Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, 106 pp.
- Austen, J.M., Friend, J.A., Yang, R. y Ryan, U.M. (2014). Further characterisation of two *Eimeria* species (*Eimeria quokka* and *Eimeria setonicis*) in quokkas (*Setonix brachyurus*). *Experimental Parasitology* **138**, 48-54.
- Ayllón, D., Almodóvar, A., Nicola, G.G. y Elvira, B. (2009). Interactive effects of cover and hydraulics on brown trout habitat selection patterns. *River Research and Applications* **25**, 1051-1065.
- Bailey, C., Schmidt-Posthaus, H., Segner, H., Wahli, T. y Strepparava, N. (2018). Are brown trout *Salmo trutta fario* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* two of a kind? A comparative study of salmonids to temperature-influenced *Tetracapsuloides bryosalmonae* infection. *Journal of Fish Diseases* **41**, 191-198.
- Barugahare, R., Michelle, M.D., Becker, J.A. y Šlapeta, J. (2011). Detection of *Cryptosporidium molnari* oocysts from fish by fluorescent-antibody staining assays for *Cryptosporidium* spp. affecting humans. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 1878-1880.

Betancourt, W.Q. y Rose, J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology* **126**, 219-234.

Betterton, C. (1974). Studies on the host specificity of the eyefluke, *Diplostomum spathaceum*, in brown and rainbow trout. *Parasitology* **69**, 11-29.

Bhalchandra, S., Cardenas, D., Ward, H.D. y Chen, X.-M. (2018). Recent breakthroughs and ongoing limitations in research *Cryptosporidium*. *F1000 Research* **7**, 1-9.

Blagburn, B.L. y Soave, R. (1997). Prophylaxis and chemotherapy: human and animal. En *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* (Ed. Fayer, R.). CRC Press, Florida, pp. 111-128.

Bowen, W.D., Read, A.J. y Estes, J.A. (2002). Feeding ecology. En *Marine mammal biology and evolutionary approach* (Ed. Hoelzel, A. R.). Blackwell Publishing, Oxford, pp. 217-246.

Breton, B. (2007). *El cultivo de la trucha. Principales especies de cría, infraestructura, técnicas de alevinaje, genética, alimentación, gestión de la producción, higiene y comercialización*. Ediciones Omega, S. A., Madrid, 420 pp.

Buchmann, K. y Bresciani, J. (2001). *Parasitic diseases of freshwater trout*. DSR Publishers, Frederiksberg, 76 pp.

Bull, S., Chalmers, R., Sturdee, A.P., Curry, A. y Kennaugh, J. (1998). Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology* **77**, 195-197.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. y Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* **83**, 575-583.

Byrne, C.J., Grey, C., Holland, C. y Poole, R. (2000). Parasite community similarity between four Irish lakes. *Journal of Helminthology* **74**, 301-305.

Byrne, C.J., Holland, C., Poole, R. y Kennedy, C.R. (2002). Comparison of the macroparasite communities of wild and stocked brown trout (*Salmo trutta* L.) in the west of Ireland. *Parasitology* **124**, 435-445.

- Cabada, M.M. y White, A.C.** (2010). Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? *Current Opinion in Infectious Diseases* **23**, 494-499.
- Cacciò, S.M. y Putignani, L.** (2014). Epidemiology of human cryptosporidiosis. En *Cryptosporidium: parasite and disease* (Eds. Cacciò, S. M. y Widmer, G.). Springer-Verlag, Vienna, pp. 43-79.
- Camus, A.C. y López, M.K.** (1996). Gastric cryptosporidiosis in juvenile red drum. *Journal of Aquatic Animal Health* **8**, 167-172.
- Canning, E.U. y Okamura, B.** (2004). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology* **56**, 43-131.
- Carmena, D.** (2010). Waterborne transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia*: detection, surveillance and implications for public health. En *Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* (Ed. Méndez-Vilas, A.). Formatex Research Center, Badajoz, pp. 3-14.
- Carreno, R.A., Martin, D.S. y Barta, J.R.** (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* **85**, 899-904.
- Castro-Hermida, J.A., Carro-Corral, C., González-Warleta, M. y Mezo, M.** (2006). Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Journal of Veterinary Medicine* **53**, 244-246.
- Castro-Hermida, J.A., García-Prevedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M. y Mezo, M.** (2008a). Contribution of treated wastewater to the contamination of recreational river areas with *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Water Research* **42**, 3528-3538.
- Castro-Hermida, J.A., García-Prevedo, I., Almeida, A., González-Warleta, M., Correia Da Costa, J.M. y Mezo, M.** (2008b). Presence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* through drinking water. *Science of the Total Environment* **405**, 45-53.

Castro-Hermida, J.A., García-Preledo, I., González-Warleta, M. y Mezo, M. (2010). *Cryptosporidium* and *Giardia* detection in water bodies of Galicia, Spain. *Water Research* **44**, 5887-5896.

Cavalier-Smith, T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology* **50**, 472-495.

Certad, G., Dupouy-Camet, J., Gantois, N., Hammouma-Ghelboun, O., Pottier, M., Guyot, K., Benamrouz, S., Osman, M., Delaire, B., Creusy, C., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Aliouat-Denis, C.M. y Follet, J. (2015). Identification of *Cryptosporidium* species in fish from Lake Geneva (Lac Lemán) in France. *Plos One* **10**, e0133047.

Chalmers, R.M., Campbell, B.M., Crouch, N., Charlett, A. y Davies, A.P. (2011). Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *Journal of Medical Microbiology* **60**, 1598-1604.

Chalmers, R.M., Pérez-Cordón, G., Cacció, S.M., Klotz, C. y Robertson, L.J. (2018). *Cryptosporidium* genotyping in Europe: the current status and processes for a harmonised multi-locus genotyping scheme. *Experimental Parasitology* **191**, 25-30.

Chandler, M., Chapman, L.J. y Chapman, C.A. (1995). Patchiness in the abundance of metacercariae parasitizing *Poecilia gillii* (Poeciliidae) isolated in pools of an intermittent tropical stream. *Environmental Biology of Fishes* **42**, 313-321.

Checkley, W., White, A.C., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X.-M., Fayer, R., Griffiths, J.K., Guerrant, R.L., Hedstrom, L., Huston, C.D., Kotloff, K.L., Kang, G., Mead, J.R., Miller, M., Petri, W.A., Priest, J.W., Roos, D.S., Striepen, B., Thompson, R.C.A., Ward, H.D., Van Voorhis, W.A., Xiao, L., Zhu, G. y Houpt, E.R. (2015). A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases* **15**, 85-94.

- Cirtwill, A.R., Stouffer, D.B., Poulin, R. y Lagrue, C.** (2016). Are parasite richness and abundance linked to prey species richness and individual feeding preferences in fish hosts? *Parasitology* **143**, 75-86.
- Clarke, J.** (1895). A study of coccidia wet with in mice. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **2**, 277-283.
- Cobo, F., Vieira, R., Barca, S., Sánchez, J., Silva, S., Nachón, D., Gómez, P., Morquecho, C., Lago, L., Couto, M.T., Servia, M.J. y Cobo, M.C.** (2015). *La trucha en la pesca con mosca*. Sekotia S. L., Madrid, 213 pp.
- Cordero del Campillo, M. y Álvarez Pellitero, P.** (1976). Los parásitos de las truchas en España. En *I Jornadas Nacionales de la Trucha*. Grupo Sindical de Piscicultores (SINA), León, pp. 507-523.
- Costa, J.F. y Saraiva, A.** (2015a). *Cryptosporidium* cf. *scophthalmi* JFC-2015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR340588.1>. (Último acceso: 17 de junio de 2019)
- Costa, J.F. y Saraiva, A.** (2015b). *Cryptosporidium* cf. *scophthalmi* JFC-2015 actin gene, partial cds. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KR340589.1>. (Último acceso: 17 de junio de 2019)
- Crisp, D.T.** (2000). *Trout and salmon: ecology, conservation and rehabilitation*. Fishing News Books, Blackwell Science, Oxford, 217 pp.
- Crompton, D.W. y Nickol, B.B.** (1985). *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, Cambridge, 519 pp.
- Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V., Bailey, W.S., Heyman, M.B. y Weinstein, W.M.** (1983). Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *New England Journal of Medicine* **308**, 1252-1257.
- de Sostoa, A. y Lobon-Cervia, J.** (1989). Observations on feeding relationships between fish predators and fish assemblages in a Mediterranean stream. *Regulated Rivers: Research and Management* **4**, 157-163.

Dezfuli, B.S., Giari, L., De Biaggi, S. y Poulin, R. (2001). Associations and interactions among intestinal helminths of the brown trout, *Salmo trutta*, in northern Italy. *Journal of Helminthology* **75**, 331-336.

Díaz, P., Quílez, J., Chalmers, R.M., Panadero, R., López, C., Sánchez-Acedo, C., Morrondo, P. y Díez-Baños, P. (2010). Genotype and subtype analysis of *Cryptosporidium* isolates from calves and lambs in Galicia (NW Spain). *Parasitology* **137**, 1187-1193.

Díaz, P., Quílez, J., Prieto, A., Navarro, E., Pérez-Creo, A., Fernández, G., Panadero, R., López, C., Díez-Baños, P. y Morrondo, P. (2015). *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitology Research* **114**, 4099-4105.

Directiva 2000/60/CE. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L* **327**, 1-73.

Directiva 2008/105/CE. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 , relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L* **348**, 84-97.

Directiva 2013/39/UE. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013 , por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas L* **226**, 1-17.

Doadrio, I. (2002). *Atlas y libro rojo de los peces continentales de España*. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 358 pp.

- Doadrio Villarejo, I., Fernández Delgado, C., García de Jalón Lastra, D., García Marín, J.L. y González-Antón Álvarez, C.** (2013). *Truchas fuera de lo común. Los perjuicios ambientales provocados por las sueltas ilegales para la pesca fluvial de ejemplares alóctonos de trucha común*. Asociación para el Estudio y Mejora de los Salmónidos-Ríos con vida, Madrid, 22 pp.
- Dogiel, V.A.** (1966). *General Parasitology*. Academic Press, New York, 516 pp.
- Dogiel, V.A.** (1970). Ecology of the parasites of freshwater fishes. En *Parasitology of fishes*. Olivier and Boyd, London, pp. 1-47.
- Dorucu, M., Crompton, D., Huntingford, F. y Walters, D.** (1995). The ecology of endoparasitic helminth infections of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Scotland. *Folia Parasitologica* **42**, 29-35.
- DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B. y Jakubowski, W.** (1995). The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine* **332**, 855-859.
- Duszynski, D.W.** (1971). Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *Journal of Parasitology* **57**, 948-952.
- Efstratiou, A., Ongerth, J.E. y Karanis, P.** (2017). Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2011–2016. *Water Research* **114**, 14-22.
- Eillot, J. M.** (1994). *Quantitative ecology and the brown trout*. Oxford University Press, Oxford, 298 pp.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø. y Martins, C.I.M.** (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 163-188.
- Eschmeyer, W.N.** (2019). Catalog of fishes online database. California Academy of Sciences. <https://www.calacademy.org/scientists/projects/eschmeyers-catalog-of-fishes>. (Último acceso: 17 de junio de 2019)

FAO (2009). *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Cultured aquatic species facts sheets*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), Roma, 12 pp.

FAO (2011). *Small-scale rainbow trout farming*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). Roma, 92 pp.

FAO (2017). *Visión general del sector acuícola nacional. España*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura (FAO), Roma, 13 pp.

FAO (2019). Acuicultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO). <http://www.fao.org/aquaculture/es/>. (Último acceso: 17 de junio de 2019)

Fayer, R. (2004). *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* **126**, 37-56.

Fayer, R. y Santín, M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Veterinary Parasitology* **164**, 192-200.

Fayer, R., Morgan, U. y Upton, S.J. (2000a). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology* **30**, 1305-1322.

Fayer, R., Trout, J. M., Walsh, E. y Cole, R. (2000b). Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**, 161-163.

Fayer, R., Santín, M. y Xiao, L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology* **91**, 624-629.

Fernández Casal, J. (2013). Acuicultura en Galicia: balance de 25 años y perspectivas para los siguientes 25. *AquaTIC, Revista Científica de la Sociedad Española de Acuicultura* **39**, 11-12.

Fielding, N.J., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Riddell, G.E. y Dunn, A.M. (2003). Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology* **261**, 321-325.

Freire-Santos, F., Vergara-Castiblanco, C.A., Tojo-Rodríguez, J.L., Santamarina-Fernández, T. y Ares-Mazás, E. (1998). *Cryptosporidium parvum*: an attempt at experimental infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Parasitology* **84**, 935-938.

Freyhof, J. (2011). *Salmo trutta*. The IUCN red list of threatened species 2011. <https://www.iucnredlist.org/species/19861/9050312>. (Último acceso: 17 de junio de 2019).

Gall, G.A.E. y Crandell, P.A. (1992). The rainbow trout. *Aquaculture* **100**, 1-10.

García, L. y Jaume, D. (2008). Fauna ibérica. Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN), Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO). España. <http://www.fauna-iberica.mncn.csic.es/faunaib/arthropoda/crustacea/amphipoda.php>. (Último acceso: 17 de junio de 2019).

García Pérez, A.L., Juste Jordan, R.A. y Povedano Fernández, I. (1993). Diez años de parasitología en el SIMA (1982-1992): relación de especies y hospedadores. Informe para el Índice-Catálogo de zooparásitos ibéricos.

Gardner, S.L. y Duszynski, D.W. (1990). Polymorphism of eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: an example from subterranean rodents in Bolivia. *Journal of Parasitology* **76**, 805-811.

Ghoneim, N.H., Abdel-Moein, K.A. y Saeed, H. (2012). Fish as a possible reservoir for zoonotic *Giardia duodenalis* assemblages. *Parasitology Research* **110**, 2193-2196.

Gibson-Kueh, S., Yang, R., Thuy, N.T.N., Jones, J.B., Nicholls, P.K. y Ryan, U. (2011a). The molecular characterization of an *Eimeria* and *Cryptosporidium* detected in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *Veterinary Parasitology* **181**, 91-96.

Gibson-Kueh, S., Thuy, N.T.N., Elliot, A., Jones, J.B., Nicholls, P.K. y Thompson, R.C.A. (2011b). An intestinal *Eimeria* infection in juvenile Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam - a first report. *Veterinary Parasitology* **181**, 106-112.

Gibson, D.I. (1996). Trematoda. En *Guide to the parasites of fishes of Canada. Part IV* (Eds. Margolis, L. y Kabata, Z.). NRC Research Press, Ottawa, pp. 1-373.

Glazebrook, J.S. y Campbell, S.R. (1987). Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. En *Management of wild and cultured sea bass/barramundi (Lates calcarifer): proceedings of an international workshop, Darwin, N. T. Australia, 24-30 September 1986* (Eds. Copland, J. W. y Grey, D. L.). Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, pp. 204-206.

Gómez-Couso, H. y Ares-Mazás, E. (2012). *Giardia duodenalis*. Part 2: contamination of bivalve molluscs. En *Foodborne protozoan parasites* (Eds. Robertson, L. J. y Smith, H. V). Nova, Nueva York, pp. 133-150.

Gómez-Couso, H., Freire-Santos, F., Martínez-Urtaza, J., García-Martín, O. y Ares-Mazás, M.E. (2003). Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 97-105.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, E. (2005). *Giardia* in shellfish-farming areas: detection in mussels, river water and waste waters. *Veterinary Parasitology* **133**, 13-18.

Gómez-Couso, H., Méndez-Hermida, F., Castro-Hermida, J.A. y Ares-Mazás, E. (2006). *Cryptosporidium* contamination in harvesting areas of bivalve molluscs. *Journal of Food Protection* **69**, 185-190.

Gómez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E. y Ares-Mazás, E. (2007). *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitology Research* **100**, 1151-1154.

González-Lanza, C. y Álvarez-Pellitero, P. (1984). *Myxobolus farionis* n. sp. and *M. ibericus* n. sp. of *Salmo trutta* f. *fario* from the Duero basin (NW Spain). Description and population dynamics. *Angewandte Parasitologie* **25**, 181.

González González, M.A. y Cobo Gradín, F. (2006). *Macroinvertebrados de las aguas dulces de Galicia*. Hércules de Ediciones, A Coruña, 173 pp.

Gortázar, J., García de Jalón, D., Alonso-González, C., Vizcaíno, P., Baeza, D. y Marchamalo, M. (2007). Spawning period of a southern brown trout population in a highly unpredictable stream. *Ecology of Freshwater Fish* **16**, 515-527.

Gratzek, J.B. (1993). Parasites associated with freshwater tropical fishes. En *Fish Medicine* (Ed. Stoskopf MK). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 576-577.

Guégan, J.F. y Hugueny, B. (1994). A nested parasite species subset pattern in tropical fish: host as major determinant of parasite infracommunity structure. *Oecologia* **100**, 184-189.

Guidelli, G.M., Isaac, A., Takemoto, R.M. y Pavanelli, G.C. (2003). Endoparasite infracommunities of *Hemisorubim platyrhynchus* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) of the Baía river, upper Panama. *Brazilian Journal of Biology* **63**, 261-268.

Gutiérrez, F. de P. y Urbina, J.C. (2012). *Oncorhynchus mykiss*. En *VI Catálogo de la biodiversidad acuática exótica y trasplantada en Colombia: moluscos, crustáceos, peces, anfibios, reptiles y aves* (Ed. Gutiérrez, F. de P., Lasso, C. A., Baptiste, M. P., Sánchez-Duarte, P., y Díaz, A. M.). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Serie recursos hidrobiológicos y pesqueros continentales de Colombia, Bogotá, pp. 116-118.

Hamilton, K.A., Waso, M., Reyneke, B., Saiedi, N., Levine, A., Lalancette, C., Besner, M.-C., Khan, W. y Ahmed, W. (2018). *Cryptosporidium* and *Giardia* in wastewater and surface water environments. *Journal of Environment Quality* **47**, 1006-1023.

Hartvigsen, R. y Kennedy, C.R. (1993). Patterns in the composition and richness of helminth communities in brown trout, *Salmo trutta*, in a group of reservoirs. *Journal of Fish Biology* **43**, 603-615.

Héland, M. (1999). Social organization and territoriality in brown trout juveniles during ontogeny. En *Biology and ecology of the brown and sea trout*. Springer London, London, pp. 115-143.

Hijjawi, N., Meloni, B., Ryan, U., Olson, M. y Thompson, R.C. (2002). Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* **32**, 1719-1726.

Holubová, N., Zikmundová, V., Limpouchová, Z., Sak, B., Konečný, R., Hlášková, L., Rajský, D., Kopacz, Z., McEvoy, J. y Kváč, M. (2019). *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology* **69**, 70-87.

Holzer, A.S., Bartošová-Sojková, P., Born-Torrijos, A., Lövy, A., Hartigan, A. y Fiala, I. (2018). The joint evolution of the myxozoa and their alternate hosts: a cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology* **27**, 1651-1666.

Hong, S.-H., Anu, D., Jeong, Y., Ahmed, D., Cho, S.-H., Lee, W.-J. y Lee, S.-E. (2014). Molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples of individuals in Mongolia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **90**, 43-47.

Hoover, D.M., Hoerr, F.J., Carlton, W.W., Hinsman, E.J. y Ferguson, H.W. (1981). Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus* Bloch and Schneider. *Journal of Fish Diseases* **4**, 425-428.

Huang, B.Q., Chen, X.-M. y LaRusso, N.F. (2004). *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia *in vitro*: a morphologic study. *Journal of Parasitology* **90**, 212-221.

Hudson, P.J., Dobson, A.P. y Lafferty, K.D. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution* **21**, 381-385.

Huet, M. (1983). *Tratado de piscicultura*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 753 pp.

Ives, R.L., Kamarainen, A.M., John, D.E. y Rose, J.B. (2007). Use of cell culture to assess *Cryptosporidium parvum* survival rates in natural groundwaters and surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5968-5970.

- Karanis, P. y Aldeyarbi, H.M.** (2011). Evolution of *Cryptosporidium* *in vitro* culture. *International Journal for Parasitology* **41**, 1231-1242.
- Keeley, E.R. y Grant, J.W.** (2001). Prey size of salmonid fishes in streams, lakes, and oceans. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**, 1122-1132.
- Kennedy, C.R. y Hartvigsen, R.A.** (2000). Richness and diversity of intestinal metazoan communities in brown trout *Salmo trutta* compared to those of eels *Anguilla anguilla* in their European heartlands. *Parasitology* **121**, 55-64.
- Khan, A., Shaik, J.S. y Grigg, M.E.** (2018). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica* **184**, 1-14.
- Kilpatrick, A.M., Salkeld, D.J., Titcomb, G. y Hahn, M.B.** (2017). Conservation of biodiversity as a strategy for improving human health and well-being. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **372**, 1-31.
- Kimura, M.** (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**, 111-120.
- King, B.J. y Monis, P.T.** (2007). Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology* **134**, 309-323.
- Klemetsen, A., Amundsen, P.A., Dempson, J.B., Jonsson, B., Jonsson, N., O'Connell, M.F. y Mortensen, E.** (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* L.: a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* **12**, 1-59.
- Knutsen, J. A., Knutsen, H., Gjosaeter, J. y Jonsson, B.** (2001). Food of anadromous brown trout at sea. *Journal of Fish Biology* **59**, 533-543.
- Koinari, M., Karl, S., Ng-Hublin, J., Lymbery, A.J. y Ryan, U.M.** (2013). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in fish from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology* **198**, 1-9.
- Kotob, M.H., Gorgoglione, B., Kumar, G., Abdelzaher, M., Saleh, M. y El-Matbouli, M.** (2017). The impact of *Tetracapsuloides bryosalmonae* and *Myxobolus cerebralis* co-infections on pathology in rainbow trout. *Parasites and Vectors* **10**, 442.

Kottelat, M. y Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Delémont, 646 pp.

Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870-1874.

Lafferty, K.D. (1997). Environmental parasitology: what can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitology Today* **13**, 251-255.

Lagarrigue, T., Céréghino, R., Lim, P., Reyes-Marchant, P., Chappaz, R., Lavandier, P. y Belaud, A. (2002). Diel and seasonal variations in brown trout (*Salmo trutta*) feeding patterns and relationship with invertebrate drift under natural and hydropeaking conditions in a mountain stream. *Aquatic Living Resources* **15**, 129-137.

Lagrué, C., Guvenatam, A. y Bollache, L. (2013). Manipulative parasites may not alter intermediate host distribution but still enhance their transmission: field evidence for increased vulnerability to definitive hosts and non-host predator avoidance. *Parasitology* **140**, 258-265.

Landsberg, J.H. y Paperna, I. (1986). Ultrastructural study of the coccidian *Cryptosporidium* sp. from stomachs of juvenile cichlid fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **2**, 13-20.

Leander, B.S., Clopton, R.E. y Keeling, P.J. (2003). Phylogeny ofregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 345-354.

Lee, S.U. (2017). Analysis of *Kudoa septempunctata* as a cause of foodborne illness and its associated differential diagnosis. *Epidemiology and Health* **39**, e2017014.

Léger, L. y Hesse, E. (1919). Sur une nouvelle coccidie parasite de la truite indigène. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences* **168**, 904-906.

Lehane, B.M., Walsh, B., Giller, P.S. y O'Halloran, J. (2001). The influence of small-scale variation in habitat on winter trout distribution and diet in an afforested catchment. *Aquatic Ecology* **35**, 61-71.

- Levine, N.D.** (1984). Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *Journal of Protozoology* **31**, 94-98.
- Levine, N.D.** (1988). Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *Journal of Protozoology* **35**, 518-520.
- Linde, A.R., Sánchez-Galán, S., Klein, D., García-Vázquez, E. y Summer, K.H.** (1999). Metallothionein and heavy metals in brown trout (*Salmo trutta*) and European eel (*Anguilla anguilla*): a comparative study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 168-173.
- Llovo Taboada, J.** (1990). *Cryptosporidium*-criptosporidiosis: diagnóstico, incidencia, epidemiología, clínica y respuesta inmunológica. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 250 pp.
- Lom, J. y Dyková, I.** (1992). *Protozoan parasites of fishes*. Elsevier, Amsterdam, 315 pp.
- Lozano Rey, L.** (1935). *Los peces fluviales de España*. Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid 390 pp.
- Lu, J., Ryu, H., Hill, S., Schoen, M., Ashbolt, N., Edge, T.A. y Domingo, J.S.** (2011). Distribution and potential significance of a gull fecal marker in urban coastal and riverine areas of southern Ontario, Canada. *Water Research* **45**, 3960-3968.
- Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B. y Davis, J.P.** (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* **331**, 161-167.
- MacCrimmon, H.R. y Marshall, T.L.** (1968). World distribution of brown trout, *Salmo trutta*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **25**, 2527-2548.
- MacNeil, C., Dick, J.T.A. y Elwood, R.W.** (2000). Differential physico-chemical tolerances of amphipod species revealed by field transplantations. *Oecologia* **124**, 1-7.

MacNeil, C., Fielding, N.J., Hume, K.D., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Hatcher, M.J. y Dunn, A.M. (2003). Parasite altered micro-distribution of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *International Journal for Parasitology* **33**, 57-64.

Magurran, A. E. (1988). *Ecological diversity and its measurement*. Croom Helm Limited, London, 179 pp.

Marcogliese, D.J. (2005). Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology* **35**, 705-716.

Margalef, R. (1983). *Limnología*. Editorial Omega, Barcelona, 1010 pp.

Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F. y Havelaar, A.H. (1998). Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4460-4466.

Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. y Rubin, C.E. (1976). Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* **70**, 1156-1160.

Méndez-Hermida, F., Gómez-Couso, H. y Ares-Mazás, E. (2007). Possible involvement of *Artemia* as live diet in the transmission of cryptosporidiosis in cultured fish. *Parasitology Research* **101**, 823-827.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2019). El turismo pesquero o marineroy acuícola. <https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/diversificacion/turismo.aspx>. (Último acceso: 17 de junio de 2019)

Mladineo, I., Zrnčić, S. y Oraić, D. (2009). Severe helminthic infection of the wild brown trout (*Salmo trutta*) in Cetina River, Croatia; Preliminary observation. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* **29**, 86-91.

Molina García, A. (2013). *Diagnóstico estratégico de la actividad de pescaturismo en España*. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 142 pp.

Molnar, K. y Hanek, G. (1974). Seven new *Eimeria* spp. (Protozoa, Coccidia) from freshwater fishes of Canada. *Journal of Protozoology* **21**, 489-493.

Molnár, K., Ostoros, G., Dunams-Morel, D. y Rosenthal, B.M. (2012). *Eimeria* that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 1810-1815.

Moravec, F. (1970). On the life history of the nematode *Raphidascaris acus* (Bloch, 1779) in the natural environment of the River Bystrice, Czechoslovakia. *Journal of Fish Biology* **2**, 313-322.

Moravec, F. (1994). *Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe*. Kluwer Academic Publishers, Praga, 476 pp.

Moravec, F. (1996). The amphipod *Gammarus fossarum* as a natural true intermediate host of the nematode *Raphidascaris acus*. *Journal of Parasitology* **82**, 668-669.

Moravec, F. (2003). Observations on the metazoan parasites of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) after its reintroduction into the Elbe River basin in the Czech Republic. *Folia Parasitologica* **50**, 298-304.

Moravec, F. (2004). *Metazoan parasites of salmonid fishes of Europe*. Academia, Praga, 510 pp.

Morgan-Ryan, U.M., Fall, A., Ward, L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C.A., Olson, M., Lal, A. y Xiao, L. (2002). *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **49**, 433-440.

Morine, M., Yang, R., Ng, J., Kueh, S., Lymbery, A.J. y Ryan, U.M. (2012). Additional novel *Cryptosporidium* genotypes in ornamental fishes. *Veterinary Parasitology* **190**, 578-582.

Murphy, B.G., Bradway, D., Walsh, T., Sanders, G.E. y Snekvik, K. (2009). Gastric cryptosporidiosis in freshwater angelfish (*Pterophyllum scalare*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **21**, 722-727.

Nakano, T., Kameda, M., Yamaguchi, T., Sato, M., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K. y Devlin, R.H. (2015). Effects of thermal stressors on growth-related gene expressions in cultured fish. En *Marine productivity: perturbations and resilience of socio-ecosystems* (Ed. Ceccaldi, H. J., Hénocque, Y., Koike, Y., Komatsu, T., Stora, G., y Tusseau-Vuillemin, M. H.). Springer International Publishing, Cham, pp. 147-157.

Nasser, A.M. (2016). Removal of *Cryptosporidium* by wastewater treatment processes: a review. *Journal of Water and Health* **14**, 1-13.

Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. y Yardley, J.H. (1976). Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* **70**, 592-598.

OIE (2012). *Código sanitario para los animales acuáticos*. Organización Mundial de Sanidad Animal. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), París, 334 pp.

Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R. y DuPont, H.L. (1999). Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases* **180**, 1275-1281.

OMS (2009). *Risk assessment of Cryptosporidium in drinking-water*. Organización Mundial de la Salud (OMS), Ginebra, 143 pp.

Oscoz, J., Escala, C. y Campos, E. (2000). La alimentación de la trucha común (*Salmo trutta* L., 1758) en un río de Navarra (N. España). *Limnética* **18**, 29-35.

Oscoz, J., Leunda, P.M., Campos, F., Escala, M.C. y Miranda, R. (2005). Diet of 0+ brown trout (*Salmo trutta* L., 1758) from the River Erro (Navarra, north of Spain). *Limnética* **24**, 319-326.

Page, L.M. y Burr, B.M. (2011). *A field guide to freshwater fishes of North America, North of Mexico*. Houghton Mifflin Harcourt, Boston, 663 pp.

Pakkasmaa, S. y Piironen, J. (2001). Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* **72**, 231-239.

- Palenzuela, O., Álvarez-Pellitero, P. y Sitjà-Bobadilla, A.** (2010). Molecular characterization of *Cryptosporidium molnari* reveals a distinct piscine clade. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 7646-7649.
- Palermo, C.** (2016). *Cryptosporidium* in fish: morphological and molecular characterisation. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Murdoch, 94 pp.
- Palos-Ladeiro, M., Bigot, A., Aubert, D., Hohweyer, J., Favennec, L., Villena, I. y Geffard, A.** (2013). Protozoa interaction with aquatic invertebrate: interest for watercourses biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research* **20**, 778-789.
- Panciera, R.J., Thomassen, R.W. y Garner, F.M.** (1971). Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology* **8**, 479-484.
- Paperna, I. y Vilenkin, M.** (1996). Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. *Diseases of Aquatic Organisms* **27**, 95-101.
- Pavlásek, I.** (1983). *Cryptosporidium* sp. in *Cyprinus carpio* Linné, 1758 in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* **30**, 248.
- Petry, F.** (2004). Structural analysis of *Cryptosporidium parvum*. *Microscopy and Microanalysis* **10**, 586-601.
- Poulin, R.** (2000). Variation in the intraspecific relationship between fish length and intensity of parasitic infection: biological and statistical causes. *Journal of Fish Biology* **56**, 123-137.
- Poulin, R.** (2013). Explaining variability in parasite aggregation levels among host samples. *Parasitology* **140**, 541-546.
- Power, M.L., Richter, C., Emery, S., Hufschmid, J. y Gillings, M.R.** (2009). *Eimeria trichosuri*: phylogenetic position of a marsupial coccidium, based on 18S rDNA sequences. *Experimental Parasitology* **122**, 165-168.
- Prenter, J., Macneil, C., Dick, J.T.A., Riddell, G.E. y Dunn, A.M.** (2004). Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive, and parasitised freshwater amphipods. *Water Research* **38**, 2847-2850.

Pugachev, O.N., Krylov, M.V. y Belova, L.M. (2010). The finding of coccidia in the trout *Salmo trutta* from continental waters of Russia. *Parazitologiya* **44**, 191-193.

Putignani, L. y Menichella, D. (2010). Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* **2010**, 1-39.

Quilchini, Y., Foata, J., Mouillot, D., Mattei, J. y Marchand, B. (2010). The influence of altitude, hydrographic network and season on brown trout parasites in Corsica using indicator species analysis. *Journal of Helminthology* **84**, 13-19.

Quilchini, Y., Foata, J., Orsini, A., Mattéi, J. y Marchand, B. (2007). Parasitofauna study of the brown trout, *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei) from Corsica (Mediterranean island) rivers. *Parasite* **14**, 257-260.

Reboredo-Fernández, A., Prado-Merini, O., García-Bernadal, T., Gómez-Couso, H. y Ares-Mazás, E. (2014). Benthic macroinvertebrate communities as aquatic bioindicators of contamination by *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Parasitology Research* **113**, 1625-1628.

Reboredo-Fernández, A., Ares-Mazás, E., Cacciò, S.M. y Gómez-Couso, H. (2015). Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology* **142**, 917-925.

Reid, A., Lymbery, A., Ng, J., Tweedle, S. y Ryan, U. (2010). Identification of novel and zoonotic *Cryptosporidium* species in marine fish. *Veterinary Parasitology* **168**, 190-195.

Roberts, J.D., Silbergeld, E.K. y Graczyk, T. (2007). A probabilistic risk assessment of *Cryptosporidium* exposure among Baltimore urban anglers. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **70**, 1568-1576.

Robertson, L.J. y Fayer, R. (2012). *Cryptosporidium*. En *Foodborne protozoan parasites* (Eds. Robertson, L. J. y Smith, H. V). Nova, Nueva York, pp. 33-64.

- Robertson, L.J., Björkman, C., Axén, C. y Fayer, R.** (2014). Cryptosporidiosis in farmed animals. En *Cryptosporidium: parasite and disease* (Eds. Cacciò, S.M. y Widmer, G.). Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 149-236.
- Rosales, M.J., Cordón, G.P., Moreno, M.S., Sánchez, C.M. y Mascaró, C.** (2005). Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica* **95**, 74-78.
- Rose, J.B.** (1997). Environmental ecology of *Cryptosporidium* and public health implications. *Annual Review of Public Health* **18**, 135-161.
- Rosenthal, B.M., Dunams-Morel, D., Ostoros, G. y Molnár, K.** (2016). Coccidian parasites of fish encompass profound phylogenetic diversity and gave rise to each of the major parasitic groups in terrestrial vertebrates. *Infection, Genetics and Evolution* **40**, 219-227.
- Rush, B.A., Chapman, P.A. y Ineson, R.W.** (1990). A probable waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the Sheffield area. *Journal of Medical Microbiology* **32**, 239-242.
- Ryan, U.** (2010). *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology* **124**, 113-120.
- Ryan, U. y Hijjawi, N.** (2015). New developments in *Cryptosporidium* research. *International Journal for Parasitology* **45**, 367-373.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A. y Pavlasek, I.** (2003). Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4302-4307.
- Ryan, U., O'Hara, A. y Xiao, L.** (2004). Molecular and biological characterization of a *Cryptosporidium molnari*-like isolate from a guppy (*Poecilia reticulata*). *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3761-3765.
- Ryan, U., Fayer, R. y Xiao, L.** (2014). *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* **141**, 1667-1685.

Ryan, U., Paparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'hara, A., Lybery, A. y Xiao, L. (2015). *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology* **150**, 31-35.

Ryan, U., Paparini, A., Monis, P. y Hijjawi, N. (2016a). It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: what are the implications for the water industry? *Water Research* **105**, 305-313.

Ryan, U., Zahedi, A. y Paparini, A. (2016b). *Cryptosporidium* in humans and animals - a one health approach to prophylaxis. *Parasite Immunology* **38**, 535-547.

Ryan, U., Hijjawi, N. y Xiao, L. (2018). Foodborne cryptosporidiosis. *International Journal for Parasitology* **48**, 1-12.

Sabater, S., Donato, J.C., Giorgi, A. y Elosegí, A. (2009). El río como ecosistema. En *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* (Eds. Elosegí, A. y Sabater, S.). Fundación BBVA, Bilbao, pp. 23-37.

Sabater, S., Bregoli, F., Acuña, V., Barceló, D., Elosegí, A., Ginebreda, A., Marcé, R., Muñoz, I., Sabater-Liesa, L. y Ferreira, V. (2018). Effects of human-driven water stress on river ecosystems: a meta-analysis. *Scientific Reports* **8**, 11462.

Sadek, G. (2014). Use of nested PCR-RFLP for genotyping of *Cryptosporidium* parasites isolated from calves and children suffering from diarrhea. *Journal of the Egyptian Parasitologists United* **7**, 129-137.

Sáez-Gómez, P. (2010). Análisis de la distribución histórica de la trucha común (*Salmo trutta*, Linnaeus, 1958) en Andalucía. Datos prelimiarios. *Asociación para el Estudio y Mejora de los Salmónidos (AEMS)-Ríos con vida* **85**, 16-19.

Sánchez Hernández, J. (2009). Biología de la alimentación de la trucha común (*Salmo trutta* Linné, 1758) en los ríos de Galicia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 581 pp.

Sánchez-Hernández, J., Servia, M.J., Vieira, R., Barca-Bravo, S. y Cobo, F. (2012). References data on the growth and population parameters of brown trout in siliceous rivers of Galicia (NW Spain). *Limnetica* **31**, 273-288.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.

Sarker, S., Kallert, D., Hedrick, R. y El-Matbouli, M. (2015). Whirling disease revisited: pathogenesis, parasite biology and disease intervention. *Diseases of Aquatic Organisms* **114**, 155-175.

Savioli, L., Smith, H. y Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the «Neglected Diseases Initiative». *Trends in Parasitology* **22**, 203-208.

Schneeberger, C.L., O'Driscoll, M., Humphrey, C., Henry, K., Deal, N., Seiber, K., Hill, V.R. y Zarate-Bermudez, M. (2015). Fate and transport of enteric microbes from septic systems in a coastal watershed. *Journal of Environmental Health* **77**, 22-30.

Schneider, B. (2000). Spawning microhabitat selection by brown trout in the Linthkanal, a mid-sized river. *Journal of Freshwater Ecology* **15**, 181-187.

Schwarz, S., Schmieg, H., Scheurer, M., Köhler, H.-R. y Triebkorn, R. (2017). Impact of the NSAID diclofenac on survival, development, behaviour and health of embryonic and juvenile stages of brown trout, *Salmo trutta* f. *fario*. *Science of the Total Environment* **607-608**, 1026-1036.

Sharma, D., Singh, N.K., Singh, H., Joachim, A., Rath, S.S. y Blake, D.P. (2018). Discrimination, molecular characterisation and phylogenetic comparison of porcine *Eimeria* spp. in India. *Veterinary Parasitology* **255**, 43-48.

Shea, J., Kersten, G.J., Puccia, C.M., Stanton, A.T., Stiso, S.N., Helgeson, E.S. y Back, E.J. (2012). The use of parasites as indicators of ecosystem health as compared to insects in freshwater lakes of the Inland Northwest. *Ecological Indicators* **13**, 184-188.

Shotter, R.A. (1973). Changes in the parasite fauna of whiting *Odontogadus merlangus* L. with age and sex of host, season, and from different areas in the vicinity of the Isle of Man. *Journal of Fish Biology* **5**, 559-573.

Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Gernjak, W., Aryal, R., McCarthy, D., Palmer, A., Kolotelo, P. y Toze, S. (2013). Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Science of the Total Environment* **463-464**, 488-496.

Sitjà-Bobadilla, A., Padrós, F., Aguilera, C. y Álvarez-Pellitero, P. (2005). Epidemiology of *Cryptosporidium molnari* in Spanish gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cultures: from hatchery to market size. *Applied of Environmental Microbiology* **71**, 131-139.

Slavin, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* **65**, 262-6.

Smith, H.V., Cacciò, S.M., Tait, A., McLauchlin, J. y Thompsom, R.C.A. (2008). Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology* **22**, 160-167.

Soilán López, M. (2014). Cryptosporidiosis en rumiantes domésticos de Galicia: análisis genotípico y subgenotípico. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 158 pp.

Sulaiman, I.M., Lal, A.A. y Xiao, L. (2002). Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology* **88**, 388-394.

Sures, B. y Streit, B. (2001). Eel parasite diversity and intermediate host abundance in the River Rhine, Germany. *Parasitology* **123**, 185-191.

Thielen, F., Münderle, M., Taraschewski, H. y Sures, B. (2007). Do eel parasites reflect the local crustacean community? A case study from the Rhine river system. *Journal of Helminthology* **81**, 179-189.

Thompson, R.C.A., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S. y Hijjawi, N.S. (2005). *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* **59**, 77-158.

Torrent Bravo, F. (2015). Reflexiones sobre la gestión de pesca deportiva actual en España. *Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales* **39**, 197-203.

- Tyzzar, E.E.** (1907). A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Society for Experimental Biology and Medicine* **5**, 12-13.
- Tyzzar, E.E.** (1910). An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (*gen. et sp. nov.*), of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research* **23**, 487-509.
- Tyzzar, E.E.** (1912). *Cryptosporidium parvum* (*sp. nov.*) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv der Protistenkunde* **26**, 394-418.
- Tzipori, S. y Widmer, G.** (2000). The biology of *Cryptosporidium*. *Contributions to Microbiology* **6**, 1-32.
- Uherek, C.B. y Pinto Gouveia, F.B.** (2014). Biological monitoring using macroinvertebrates as bioindicators of water quality of Maroaga Stream in the Maroaga Cave System, Presidente Figueiredo, Amazon, Brazil. *International Journal of Ecology* **2014**, 1-7.
- Unger, P. y Palm, H.W.** (2016). Parasitization of sea trout (*Salmo trutta trutta* L.) from the spawning ground and German coastal waters off Mecklenburg-Western Pomerania, Baltic Sea. *Parasitology Research* **115**, 165-174.
- USEPA** (2005). *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. United States Environmental Agency (USEPA), Washington, 52 pp.
- USEPA** (2012). *Method 1623.1: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. United States Environmental Agency (USEPA), Washington, 83 pp.
- Valtonen, E., Holmes, J. y Koskivaara, M.** (1997). Eutrophication, pollution and fragmentation: effects on parasite communities in roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*) in four lakes in central Finland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **54**, 572-585.
- Vermeulen, L.C., van Hengel, M., Kroeze, C., Medema, G., Spanier, J.E., van Vliet, M.T.H. y Hofstra, N.** (2019). *Cryptosporidium* concentrations in rivers worldwide. *Water Research* **149**, 202-214.

Vidal-Martínez, V.M. y Wunderlich, A.C. (2017). Parasites as bioindicators of environmental degradation in Latin America: a meta-analysis. *Journal of Helminthology* **91**, 165-173.

Vidal-Martínez, V.M., Pech, D., Sures, B., Purucker, S.T. y Poulin, R. (2010). Can parasites really reveal environmental impact? *Trends in Parasitology* **26**, 44-51.

Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P. y David Sibley, L. (2005). Gliding motility leads to active cellular invasion by *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *Infection and Immunity* **73**, 5379-5387.

Widmer, G., Klein, P. y Bonilla, R. (2007). Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology* **134**, 1583-1588.

Windsor, D.A. (1998). Controversies in parasitology. Most of the species on Earth are parasites. *International Journal for Parasitology* **28**, 1939-1941.

Xavier, R., Severino, R., Pérez-Losada, M., Gestal, C., Freitas, R., Harris, D. J., Veríssimo, A., Rosado, D. y Cable, J. (2018). Phylogenetic analysis of apicomplexan parasites infecting commercially valuable species from the North-East Atlantic reveals high levels of diversity and insights into the evolution of the group. *Parasites and Vectors* **11**, 1-12.

Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U. y Upton, S.J. (2004). *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 72-97.

Yang, R., Reid, A., Lymbery, A. y Ryan, U. (2010). Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. *International Journal for Parasitology* **40**, 779-785.

Yang, R., Fenwick, S., Potter, A., Elliot, A., Power, M., Beveridge, I. y Ryan, U. (2012). Molecular characterization of *Eimeria* species in macropods. *Experimental Parasitology* **132**, 216-221.

Yang, R., Palermo, C., Chen, L., Edwards, A., Papparini, A., Tong, K., Gibson-Kueh, S., Lymbery, A. y Ryan, U. (2015). Genetic diversity of *Cryptosporidium* in fish at the 18S and actin loci and high levels of mixed infections. *Veterinary Parasitology* **214**, 255-263.

Yang, R., Dorrestein, G.M. y Ryan, U. (2016). Molecular characterisation of a disseminated *Cryptosporidium* infection in a Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Parasitology* **226**, 53-56.

Zanguee, N., Lymbery, J.A., Lau, J., Suzuki, A., Yang, R., Ng, J. y Ryan, U. (2010). Identification of novel *Cryptosporidium* species in aquarium fish. *Veterinary Parasitology* **174**, 43-48.

Zhao, X. y Duszynski, D.W. (2001). Molecular phylogenies suggest the oocyst residuum can be used to distinguish two independent lineages of *Eimeria* spp. in rodents. *Parasitology Research* **87**, 638-643.







APÉNDICE



Solución salina fisiológica (SSF)

Cloruro sódico (Acros Organics Inc., Geel, Belgium)	0,9 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

Tampón fosfato salino (PBS) 0,04 M pH 7,2

Fosfato monopotásico (Acros Organics Inc.)	5,65 g
Fosfato disódico (Acros Organics Inc.)	5,44 g
Cloruro sódico (Acros Organics Inc.)	2,34 g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Ajustar a pH 7,2 y conservar a temperatura ambiente.

Solución de trabajo de Poli-L-lisina

Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, Co.)	100 µL
Agua destilada	900 µL

Solución de trabajo de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

DAPI (Waterborne Inc.)	10 µL
PBS 0,04 M pH 7,2	50 mL

Contracolorante azul de Evans

Azul de Evans (Merk KGaA, Darmstad, Alemania)	0,1 g
Acida sódica (Sigma-Aldrich, Co.)	0,04 g
PBS 0,04 M pH 7,2 c.s.p.	100 mL

Medio de montaje para inmunofluorescencia directa (IFD)

Trietilendiamina (DABCO) (Sigma-Aldrich, Co.)	0,3 g
PBS 0,2 M pH 8,5	1 mL
Glicerina (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España)	9 mL
Acida sódica	0,04 g

Tampón TAE 1× (Bio-Rad Laboratories)

Tris 40 mM	}	
Ácido acético 20 mM		20 mL
EDTA 1 mM, pH 8,3		
Agua destilada		980 mL

Carmín clorhídrico

Carmín (Sigma-Aldrich, Co.)	5 g
Ácido clorhídrico concentrado (Acros Organics Inc.)	5 mL
Agua destilada	5 mL
Etanol 90° c.s.p.	200 mL

Mezclar el carmín, el ácido clorhídrico y el agua destilada durante 1 hora. Añadir 100 mL de etanol 90° y hervir al baño maría hasta disolver totalmente. Completar con etanol 90° hasta 200 mL y conservar en un recipiente tapado a temperatura ambiente.

Lactofenol-azul de algodón

Azul de anilina (Merk KGaA.)	0,5 g
Fenol (Panreac Química S.L.U.)	0,1 g
Ácido láctico (Sigma-Aldrich, Co.)	8 mL
Glicerina (Panreac Química S.L.U.)	20 mL
Agua destilada	10 mL

Mezclar el fenol, el ácido láctico, la glicerina y el agua destilada. Disolver calentando ligeramente. Enfriar y añadir el azul de anilina. Reposar durante 24 horas, filtrar y conservar en un recipiente tapado a temperatura ambiente.

