



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Caracterización de la enfermedad proliferativa renal (PKD) en poblaciones de trucha común procedentes de una piscifactoría ubicada en el río Guadalaviar (Teruel).

Characterisation of Proliferative Kidney Disease (PKD) in brown trout populations from a fish farm located in the Guadalaviar river (Teruel)

Autora

Alba Expósito García

Directores

Imanol Ruiz Zarzuela y Miguel A. Peribáñez López

Facultad de Veterinaria

2017

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción y revisión bibliográfica	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. La enfermedad proliferativa renal.....	4
2.3. El agente causal del PKD: <i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	5
2.4. Epidemiología	5
2.4.1. Principales hospedadores	5
2.4.2. Ciclo biológico	7
2.5. Factores que influyen en la enfermedad	10
2.6. Patogenia, síntomas y lesiones.....	11
2.7. Diagnóstico, prevención y control.....	11
3. Objetivos	12
4. Material y métodos	13
4.1. Diseño del estudio	13
4.1.1. Origen de las muestras	13
4.1.2. Periodo de estudio.....	13
4.1.3. Seguimiento de la experiencia.....	14
4.1.4. Metodología de muestreo.....	14
4.2. Recogida de información	14
4.2.1. Recogida de datos <i>in situ</i>	14
4.2.2. Necropsia y toma de muestras.....	15
4.3. Metodología analítica	15
4.3.1. Diagnóstico molecular.....	15
4.3.2. Diagnóstico histopatológico	16
4.3.3. Análisis estadístico.....	17
5. Resultados	17
5.1. Sobre el diagnóstico de PKD en las muestras analizadas.....	17
5.2. Sobre la evolución de la temperatura del agua y la mortalidad registradas diariamente en las instalaciones piscícolas estudiadas.....	18
5.3. Sobre la correlación entre las distintas variables estudiadas.....	19
6. Discusión	21
7. Conclusiones	24
8. Valoración personal	25
9. Bibliografía	26

1. Resumen

La enfermedad proliferativa renal (PKD) es una enfermedad actualmente de gran importancia en poblaciones de salmónidos criados en cautividad o silvestres.

Con el fin de conocer el impacto de la temperatura en la mortalidad de alevines de trucha común de la piscifactoría de Los Pajares afectados por PKD, se llevó a cabo un estudio en dos instalaciones separadas de cultivo, la piscifactoría de Los Pajares y en el paraje de Barranco Hondo, ubicados en la provincia de Teruel. Para ello se realizó un muestreo mensual en el que se tomaron 30 alevines en cada instalación para el diagnóstico de PKD, tanto por qPCR como por histopatología.

En los Pajares, con mayor temperatura del agua, al incrementar ésta durante el verano, encontramos aumentos de mortalidad asociados a la presencia de *Tetracapsuloides bryosalmonae* y a la presencia de síntomas y lesiones de la enfermedad.

En Barranco Hondo, en aguas más frías, encontramos un incremento similar de mortalidad en verano, pero no se asocia a la enfermedad ni a la sintomatología ni a una presencia significativa del parásito. El traslado de alevines a esta piscifactoría no ha mejorado las tasas de mortalidad. La hipótesis más probable que explique estos resultados es que la infección detectada en esta instalación constituya un factor de confusión y que la mortalidad observada sea debida a otros factores.

Summary

Renal proliferative disease is in these days a very important disease in salmonids populations breed in captivity or wild.

To know the impact of temperature on the mortality of brown trout fingerlings from fish farm *Los Pajares* affected by PKD, this study was carried out in two separate places, *Los Pajares* fish farm and the area of *Barranco Hondo*, both located in the province of Teruel. Then, a monthly sample was made it, 30 fingerlings were taken in each sampling for the diagnosis of PKD, qPCR and histopathology was used.

In Barranco Hondo, in colder waters, we found a similar increase in mortality in summer, but it is not associated to the disease or to the symptomatology or to a significant presence of the parasite. The transfer of fingerlings to this place has not improved mortality rates. The most likely hypothesis to explain these results is that the infection detected in this fish farm is a confounding factor and the observed mortality is due to other factors.

2. Introducción y revisión bibliográfica

2.1. Antecedentes

Desde el año 2008, durante los meses más calurosos, se registran mortandades de los “stocks” de truchas común (*Salmo trutta*). Se veían perjudicadas principalmente dos líneas genéticas, la línea del río Pancrudo y la línea Atlántica estéril aunque desde el año 2013 se cría la línea autóctona del río Pancrudo y la línea del Guadalaviar. Los alevines menores de un año son los principales afectados.

En el río Guadalaviar, desde 500 metros aguas arriba de la piscifactoría hasta las proximidades de la ciudad de Teruel, se comprobó la presencia de *Tetracapsuloides bryosalmonae*, agente productor de la Enfermedad Proliferativa Renal, PKD por sus siglas en inglés (Laboratorio Ictiopatología, 2013), con una prevalencia del 100% en las poblaciones silvestres de trucha común.

Ante la posible transmisión de este parásito a otras cuencas como Albentosa, Mijares, Turia, etc., y considerando que se realizaron históricamente repoblaciones en dichas cuencas, en las que se está valorando la posibilidad de reforzar de nuevo las poblaciones salvajes con truchas criadas en la piscifactoría de Pajares, se cree imprescindible el análisis de su prevalencia en el medio natural, previo a cualquier propuesta de gestión por parte de la Administración que incluya los mencionados aportes de truchas.

Como posible solución se aconseja mantener a alevines de trucha nacidos en la piscifactoría, durante la fase crítica del verano, en aguas libres de PKD y más frescas que las disponibles en la piscifactoría.

2.2. La enfermedad proliferativa renal

La enfermedad proliferativa renal (PKD) es un enfermedad de gran importancia en el mundo piscícola, afectando de manera significativa a salmónidos salvajes y de piscifactorías tanto en Europa como América del Norte. Causa una elevada mortalidad en estos peces que pone en peligro las poblaciones naturales de salmónidos y ocasiona graves pérdidas económicas (Okamura et al., 2011).

El PKD está causado por un endoparásito multicelular obligado denominado, *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Schmidt-Posthaus et al., 2012b).

Para su desarrollo, en su ciclo incluye hospedadores invertebrados, briozoos de diferentes especies, y peces principalmente salmónidos (Okamura et al., 2011).

2.3. El agente causal del PKD: *Tetracapsuloides bryosalmonae* *Error! Marcador no definido.*

El origen de la enfermedad fue un misterio hasta 1999, cuando los briozoos de agua dulce se descubrieron como hospedadores invertebrados (Anderson et al., 1999). Este descubrimiento permitió describir al parásito.

Taxonómicamente *T. bryosalmonae* pertenece al filo *Cnidaria*, clase *Malacosporea*, orden *Malacovalvulida*, familia *Saccosporidae* (Okamura et al., 2015).

Según los datos obtenidos en el estudio de Henderson y Okamura (2004) se pueden distinguir linajes europeos y norteamericanos diferentes de *T. bryosalmonae*. Asimismo, se puede diferenciar dos linajes diferentes según al género de salmónidos que infectan, uno adaptado al género *Salmo* y otro al género *Oncorhynchus*.

2.4. Epidemiología

2.4.1. Principales hospedadores

Un amplio rango de especies de briozoos constituyen los hospedadores definitivos de *T. bryosalmonae* (Noga, 2010).

Dentro del filo *Bryozoa* la mayoría son briozoos de agua dulce que se agrupan dentro de la clase *Phylactolaemata* (Wood et al., 1998).

Los briozoos son pequeños invertebrados sésiles que viven en superficies sumergidas, los cuales, durante los meses cálidos se encuentran en cualquier lago o arroyo siempre que tengan un lugar de unión tales como ramas de árboles, raíces o rocas (Kumar et al., 2013b).

Son animales coloniales, consisten en subunidades zooides conectadas, cada una de ellas tiene su propia boca, intestino, músculos, sistemas nervioso y reproductor tentaculares independientes, pero los zooides adyacentes comparten ciertos tejidos y fluidos que unifican fisiológicamente creando una cavidad corporal común, el celoma (Okamura et al., 2011). Los briozoos se alimentan filtrando agua. Las colonias se reproducen asexualmente a través de dos rutas: fragmentación de colonias o formación de estatoblastos. Estos estatoblastos pueden formarse encapsulados, lo que les permite permanecer latentes y soportar el secado y la congelación. Cuando las condiciones son favorables, los estatoblastos germinan para formar una nueva colonia (Kumar et al., 2013b).

Uno de los briozoos de agua dulce más común es *Fredericella sultana* (Filippenko et al., 2014) (Figura 1) en Europa, Asia, Australia y Nueva Zelanda (Kumar et al., 2013a), por lo que se considera el principal hospedador definitivo de *T. bryosalmonae* y es el objetivo de múltiples estudios. Este briozoo crece por zooides que forman colonias tubulares y ramificadas (Figura 2). Además de la reproducción asexual *F. sultana* puede reproducirse sexualmente y produce larvas a principios del verano (Tops et al., 2009).



Figura 1- Dibujo de *Fredericella sultana* obtenida de (Ax, 2003).



Figura 2- *Fredericella sultana* obtenida de (Van der Waaij, 2005).

La mayoría de salmónidos, aunque presentan importantes alteraciones patológicas y elevada mortalidad al infectarse, epidemiológicamente se consideran fondos de saco o vías muertas, excepto la trucha común y el salvelino que son los únicos que actualmente se conoce que produzcan y liberen esporos (Tops et al., 2004) y por tanto son los únicos peces que transmiten la infección a los briozoos.

Las especies de salmónidos afectadas por *T. bryosalmonae* en Europa son la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), trucha común, salmón Atlántico (*Salmo salar*), trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) y timalo (*Thymallus thymallus*); en Norteamérica el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) y salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) (Feist y Longshaws, 2006). El lucio europeo (*Esox lucius*) es el único pez no salmónido que se conoce que sea susceptible (Morris et al., 2000). Por otro lado, el salvelino (*Salvelinus fontinalis*) puede ser infectado por el parásito y producir esporos que transmiten la enfermedad pero no muestra signos clínicos de la misma (Feist y Bucke, 1993).

Las formas juveniles de estos peces son más susceptibles a las infecciones que los peces adultos (Kristmundsson et al., 2010), pero no eso no descarta que se puedan llegar a infectar peces de cualquier edad (Mo et al., 2011).

2.4.2. Ciclo biológico

Tetracapsuloides bryosalmonae empieza su desarrollo dentro del briozoo (Figura 4), como células únicas asociadas con la pared del cuerpo del briozoo, produciendo una infección oculta (Okamura et al., 2011). Cuando las condiciones son favorables para el crecimiento del hospedador, por ejemplo, altas temperaturas y niveles de alimentos adecuados (Abd-Elfattah et al., 2014a) se inicia la infección visible, donde el parásito prolifera en la cavidad corporal formando sacos productores de esporos (Kumar et al., 2013a).

Los esporos-briozoo se producen dentro de los sacos maduros, cada uno de los cuales posee dos esporoplasmas haploides y cuatro cápsulas polares (Figura 3). Se estima que un solo saco puede contener entre 2800 y 4000 esporos (Okamura et al., 2011). La formación de estos esporos empieza por la formación del esporoplasto, anterior al

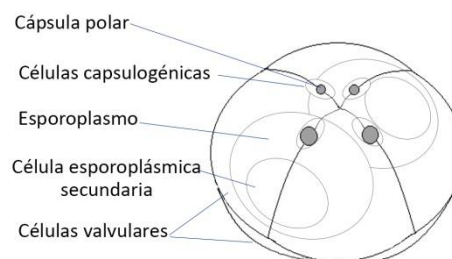


Figura 3- Representación de esporo-briozoo obtenida de Yokoyama et al. (2012).

esporoplasma. Esta estructura está compuesta por una célula germinal posicionada centralmente, encerrada por tres células esporogónicas que se conectan entre sí. Los dos tipos de células se encuentran separadas por un espacio lleno de líquido. A continuación, las células se dividen, llegando a formar como máximo un espora con dos células germinales rodeadas por cinco células esporogónicas. Al desarrollarse y aumentar el número de células, las células esporogónicas se agrupan en un polo y se diferencian en células cuboidales y distendidas. Debido a la naturaleza distintiva de los tipos celulares y sus papeles aparentemente diferentes durante el desarrollo, las células cuboidales pasan a denominarse células valvocapsulogénicas y las células distendidas, células esporoplasmogénicas. A continuación empieza el desarrollo del esporoplasma. El espora puede estar formado por un número diferente de células germinales, células valvocapsulogénicas y células esporoplasmogénicas. (Morris, 2010). Finalmente estas células acabarán formando el espora maduro. La meiosis durante el desarrollo de estos esporos (Canninget al., 2000) identifica a los briozoos como hospedadores definitivos.

Por un lado, existe una transmisión vertical entre los briozoos. Los estatoblastos de los briozoos, funcionan como cápsulas que les permiten persistir durante periodos desfavorables, estos estatoblastos pueden transmitir *T. bryosalmonae* que se dispersará en el espacio y/o el tiempo, evitando de este modo las condiciones desfavorables y logrando la colonización de la descendencia (Abd-Elfattah et al., 2014a).

Por otro lado, las esporos maduros, esporo-briozoo, son liberadas al agua donde son infectivas para los peces (Morris y Adams, 2006). El desarrollo y liberación de esporos no garantiza la pérdida de infección en los briozoos, y el parásito alterna entre la infección oculta y la infección visible (Okamura et al., 2011). Mientras que la infección oculta no causa un efecto detectable en el briozoo y se expresan cuando los hospedadores están en malas condiciones, las infecciones visibles castran temporalmente a los briozoos hospedadores (Tops et al., 2006).

Los esporos-briozoo entran en contacto con el pez y se unen a ellos a través del filamento reversible contenido dentro de las cápsulas polares (Okamura et al., 2011). Al entrar en contacto, los esporos infectivos son activados químicamente por estimulantes químicos que provienen del moco, y mecánicamente por el contacto con las branquias, la piel o la cavidad bucal, abren las valvas y liberan el esporoplasmo (Grabner y El-Matbouli, 2010). Éste entra en el pez a través del epitelio de la piel y las branquias, ya sea entre las células epiteliales o intracelularmente a través de las células de la mucosa (Feist y Longshaws, 2006). A continuación, el mixosporidio invade el sistema vascular donde se multiplica sin formar esporos (fase extraesporogónica) antes de alcanzar el riñón, lugar principal donde se desarrollan, pero los parásitos también pueden invadir y proliferar en otros órganos. Las fases extraesporogónicas proliferan en el intersticio del riñón causando una respuesta inflamatoria y daño a los tejidos renales (Okamura et al., 2011).

Estas etapas pueden eventualmente ser eliminadas y el daño causado ser reparado (Feist y Longshaws, 2006). Algunas de estas fases extraesporogónicas migran a la luz de los túbulos renales, donde se inicia la etapa de esporogonia (Feist y Longshaws, 2006), en la mayoría de hospedadores esta etapa de esporogénesis no llega a formar esporos, pero en el caso de la trucha común (Morris y Adams, 2006) y en el salvelino (Grabner y El-Matbouli, 2008), se forman esporos maduros (esporos-pezu), que se liberan con la orina al agua y son infectivas para los briozoos.

En resumen, el órgano diana es el riñón donde *T. bryosalmonae* sufre multiplicación y diferenciación de fase de extraesporogonia a esporogonia (Schmidt-Posthaus et al., 2012a). Un único espora es suficiente para infectar a un pez y causar síntomas clínicos de PKD (McGurk et al., 2006). La transmisión directa entre peces hasta la fecha no está demostrada.

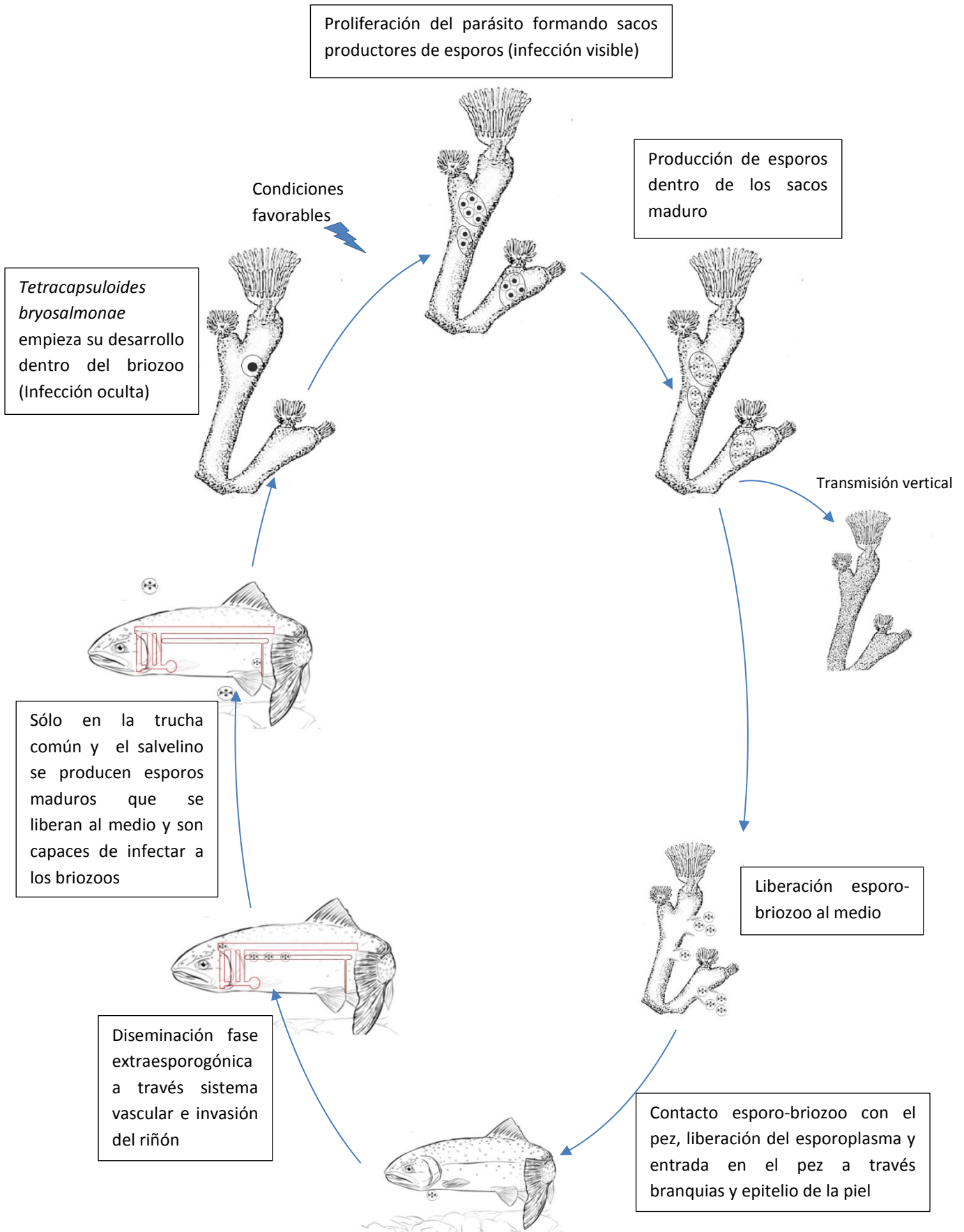


Figura 4- Imagen esquemática del ciclo biológico de *T. bryosalmonae*. Fuente: elaboración propia a partir de la edición de los dibujos de Ax (2003) y Znayduk (2015).

2.5. Factores que influyen en la enfermedad

Las principales características patológicas de cualquier infección parasitaria dependen de una variedad de factores, incluyendo el estado inmune del hospedador, la patogenicidad del parásito, el estado de desarrollo de la infección (Feist y Longshaws, 2006) y algunos parámetros medioambientales como la temperatura (Schmidt-Posthaus et al., 2012b). El PKD es una enfermedad estacional que ocurre desde la primavera hasta el final del verano (Noga, 2010).

La temperatura es un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. La severidad de los signos clínicos, las lesiones y las mortalidades de los peces infectados (Schmidt-Posthaus et al., 2012a) están asociadas a altas temperaturas generalmente superiores a 12°C (Noga, 2010).

Estas temperaturas también afectan al desarrollo de los briozoos, produciendo así mayor biomasa para que el parásito la explote y por lo tanto favorece la proliferación del parásito. El aumento de la temperatura reduce el tiempo de desarrollo de la infección visible en el briozoo y se mantiene durante más tiempo a una temperatura de 14°C, por lo que resulta una mayor liberación de esporos infectantes para los peces.

La temperatura influye en la fisiología del pez, por lo tanto, su alteración es el principal factor para incrementar la mortalidad en los salmónidos afectados por PKD a temperaturas de agua más altas. Al aumentar la temperatura, aumenta el metabolismo, aumenta la demanda osmótica y por tanto la excreción de agua, aumenta la demanda de oxígeno y aumenta el estrés generado por estar fuera del rango de temperatura óptima (Schmidt-Posthaus et al., 2012b). Además, factores distintos de la temperatura puede influir en el desarrollo de la infección y de la gravedad, incluyendo los niveles de oxígeno, movimientos de los peces y la eutrofización (Okamura et al., 2011).

Los efectos de la eutrofización sobre el desarrollo del parásito y las interacciones huésped-parásito se han evaluado en una serie de estudios basados en microcosmos. A niveles más altos de nutrientes promueven tanto el crecimiento del parásito como el del huésped (Hartikainen, 2007).

Así mismo hay que tener en cuenta factores de estrés adicionales que suceden en poblaciones de peces silvestres, como las enfermedades concurrentes, que pueden retardar el desarrollo del parásito en el riñón y el proceso de regeneración renal en la trucha común. La competencia alimentaria y la presencia de contaminantes químicos también puede considerarse como un factores estresantes adicionales en el medio (Burki et al., 2013; Schmidt-Posthaus et al., 2015).

2.6. Patogenia, síntomas y lesiones

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad proliferativa renal son exoftalmia bilateral moderada (Abd-Elfattah et al., 2014b), coloración corporal oscura (Noga, 2010), distensión abdominal (Skovgaard y Buchmann, 2012), ascitis, branquias pálidas, anemia, esplenomegalia, hepatitis y esplenitis granulomatosa (Schmidt-Posthaus et al., 2012b). Pero la lesión más característica de la enfermedad es la nefritis proliferativa granulomatosa (que le da un aspecto moteado), y la decoloración (carácter grisáceo) del tejido renal (Feist y Longshaws, 2006; Skovgaard y Buchmann, 2012). La anemia es un indicador de la infección y su intensidad varía según el grado de la misma (Braden et al., 2010).

A nivel histológico se produce una nefritis intersticial proliferativa y granulomatosa (Schmidt-Posthaus et al., 2012b), que consiste principalmente en macrófagos y linfocitos rodeando a los parásitos (células PKX) que induce a una vasculitis necrotizante y una atrofia tubular (Noga, 2010). Las células PKX pueden vivir y dividirse dentro de un fagocito circundante (Morris, 2012), pero estas células no se encuentran repartidas homogéneamente por el riñón (Bettge et al., 2009a). Se produce también una hiperplasia intersticial de las células hematopoyéticas con una cristalización de la hemoglobina. A nivel de la musculatura esquelética se puede observar miositis granulomatosa severa (Feist y Longshaws, 2006).

Es importante remarcar que de forma general los peces que han sobrevivido a un brote de PKD se convierten en peces resistentes y no vuelven a sufrir PKD otra vez (Mo et al., 2011).

Los peces son capaces de regenerar el tejido renal mediante la sustitución de nefronas lesionadas y la producción de novonefronas. Esto indica que los peces infectados con PKD pueden recuperarse de las lesiones. Esta regeneración sucede a una temperatura del agua de 12-15°C. La recuperación está desencadenada por la intensidad de respuesta del tejido del hospedador (Schmidt-Posthaus et al., 2012a).

2.7. Diagnóstico, prevención y control

El diagnóstico de esta enfermedad se lleva a cabo principalmente a través del análisis molecular, *qPCR* (Schmidt-Posthaus et al., 2015), y el diagnóstico histopatológico (Morris D., 2012).

En la actualidad no existe un tratamiento para eliminar la infección, anteriormente se usaba el verde malaquita pero, era muy poco efectivo, y además en la actualidad su uso se encuentra solo autorizado para peces ornamentales (*Directiva 96/23/CE*).

Por lo tanto, las estrategias de control y prevención están basadas en la biología del parásito.

En primer lugar, la reducción de la temperatura del agua, por debajo de 11°C, suprime los efectos de la enfermedad. Pero en la mayoría de piscifactorías es muy difícil o imposible controlar la temperatura de agua que entra y por lo tanto esta medida tiene un valor limitado (Feist y Longshaws, 2006).

Otra medida sería evitar el periodo infeccioso, es decir, que si la aparición de los esporobriozoo ocurre solo en una época del año y los peces más susceptibles son los juveniles, se podría retrasar la transferencia de estos peces a aguas endémicas hasta el otoño, cuando la temperatura es menor (Yokoyama et al., 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que el aumento de la salinidad del agua en un rango de 8-12 ppt ayuda a disminuir la morbilidad y la mortalidad por PKD (Noga, 2010).

Por último, una acción muy importante sería reducir el número o eliminar a los hospedadores invertebrados y así romper el ciclo biológico del parásito. Para ello la alteración del hábitat es un punto importante. La cría de peces en piscinas de hormigón reduce el número de hospedadores disponibles para transmitir el parásito (Feist y Longshaws, 2006). La eliminación de la vegetación aguas arriba de la entrada de agua a la piscifactoría con problemas de PKD es una posibilidad para la prevención de brotes, porque reduce el hábitat de los briozoos y la carga de esporos en el agua, pero esta medida no es factible en la mayoría de los casos (Yokoyama et al., 2012). *Fredericella sultana* crece de manera natural a unas concentraciones de calcio de 0,7-52,5 mg/L y de magnesio de 0,0-7,3 mg/L. Por encima de este rango *F.sultana* no puede crecer, así mismo, los valores altos y bajos del pH (4,0 y 9,0) no son adecuados para la proliferación de briozoos, por tanto la alteración de estos valores podría ayudar a reducir el número de hospedadores invertebrados (Kumar et al., 2013b).

3. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue determinar el impacto de la enfermedad proliferativa renal en poblaciones de trucha común criadas en cautividad en dos instalaciones piscícolas y evaluar el papel de la temperatura en la mortalidad de la misma.

Para alcanzar dicho objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la mortalidad registrada en ambas instalaciones.
- Poner en marcha un sistema de control y prevención de la enfermedad en la trucha común.

4. Material y métodos

4.1. Diseño del estudio

4.1.1. Origen de las muestras

Los peces objeto del presente estudio han sido alevines procedentes de las dos líneas genéticas de trucha autóctona que actualmente se crían en cautividad en la piscifactoría de Los Pajares (Albarracín, Teruel) (*Figura 5 y 6*). Estas líneas son, Pancrudo (mayoritaria en la explotación) y Guadalaviar, ambas originarias de los ríos que llevan el mismo nombre y que forman parte de las cuencas hidrográficas del Ebro y Júcar, respectivamente. Parte de estos alevines fueron trasladados (durante el mes de abril), desde esta piscifactoría a una pequeña instalación ubicada aguas arriba denominada El molino de Barranco Hondo (Tramacastilla, Teruel) (*Figura 7 y 8*). La gestión de ambas instalaciones corresponde al Departamento de Sostenibilidad y Desarrollo Rural del Gobierno de Aragón.



Figura 5- Piscifactoría Los Pajares



Figura 6- Pilas de Los Pajares



Figura 7- Paraje del "Molino del Barranco Hondo", donde se sitúan los alevines (caseta verde)



Figura 8- Pilas del paraje del "Molino del Barranco Hondo"

4.1.2. Periodo de estudio

Este trabajo se ha llevado a cabo durante los meses de febrero y septiembre del presente año.

4.1.3. Seguimiento de la experiencia

A parte del seguimiento de las bajas diarias en las dos ubicaciones mencionadas, se realizó un seguimiento mensual sobre la incidencia de la infección por *T. bryosalmonae*. Este control se realizó en el laboratorio de Ictiopatología ubicado en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

4.1.4. Metodología de muestreo


Se realizó un muestreo mensual que empezó en febrero con alevines posteclosionados y finalizó el 20 de septiembre. En cada uno de ellos se recogieron 3 lotes de 10 animales, en cada una de las explotaciones. Los peces se recogieron de manera aleatoria entre varios estanques y siempre de la cola del estanque. Todos los peces fueron eutanasiados mediante sobre dosis de anestésico con metanesulfonato de tricaina (MS-222) a una dosis de 500 mg/l (tamponado a pH de 7,5), durante al menos 20 minutos después del cese del movimiento opercular. Posteriormente, fueron trasladados al laboratorio mantenidos a temperaturas de refrigeración. En la realización de la PCR no se individualiza por animales, sino que se realizó por grupos de 10, es decir, cada lote.

4.2. Recogida de información

4.2.1. Recogida de datos *in situ*

Durante todo el periodo de estudio se tomó diariamente la temperatura media del agua de entrada en cada una de las instalaciones, así como las bajas diarias registradas en cada uno de los estanques de alevinaje. Dichos datos se reflejaron en una hoja de registro tal y como se puede observar en la *Figura 9*.

Este control lo contabilizaron todos los días los trabajadores de la piscifactoría, tanto en Los Pajares como en Barranco Hondo.

 **GOBIERNO DE ARAGÓN**
Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca

CENTRO DE PISCICULTURA DE "LOS PAJARES" ALBARRACIN (TERUEL)

TRUCHA LINEA GENETICA PANCRUDO

Mes de Junio de 2016

	ESTANQUE 1		ESTANQUE 2		ESTANQUE 3	
	TAMAÑO CMB: 40 PILAS OCUPADAS: 1	TAMAÑO CMB: 32 PILAS OCUPADAS: 2	TAMAÑO CMB: 20 PILAS OCUPADAS: 2	TAMAÑO CMB: 12 PILAS OCUPADAS: 3	TAMAÑO CMB: 30 m PILAS OCUPADAS: 12	TAMAÑO CMB: 17 PILAS OCUPADAS: 7
EXISTENCIAS AL EMPEZAR EL MES	42	202	232	2328	23435	23435
BAJAS (MUERTAS) DURANTE EL MES		19		11	44	
BAJAS POR RECUENTO UTILIZADAS PARA REPOBLACIONES						
INCORPORACIONES						
TRASLADOS						
EXISTENCIAS A FINAL DE MES	TAMAÑO CMB: 40 PILAS OCUPADAS: 1	TAMAÑO CMB: 32 PILAS OCUPADAS: 2	TAMAÑO CMB: 20 PILAS OCUPADAS: 2	TAMAÑO CMB: 12 PILAS OCUPADAS: 3	TAMAÑO CMB: 30 m PILAS OCUPADAS: 12	TAMAÑO CMB: 17 PILAS OCUPADAS: 7

OBSERVACIONES (Obras, Roturas, Incidencias):

Despejacion

Enfermedad

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
TEMPERATURA (°C)	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	13	13	13	13	13	13	13	12	12	12

Bca 14 11 11 11 11 11 12 12 12 12 12 12 13 13 13 13 13 13 13 13 13 12 12 12

Figura 9- Hoja de registro de temperaturas y bajas del mes de Junio

4.2.2. Necropsia y toma de muestras

Una vez los peces llegaron al laboratorio, primero, se observó la presencia de posibles alteraciones y lesiones relevantes que pudieran hacer sospechar la presencia algún tipo de proceso patológico. La necropsia de los peces recogidos se realizó mediante dos incisiones, la primera desde la zona anal hasta la zona bucal y la segunda desde la zona anal hasta el opérculo, formando así un arco. Una vez se retira la pared abdominal se puede acceder fácilmente a los órganos internos.

Tras la apertura, se procede a tomar las muestras necesarias para el diagnóstico de *T. bryosalmonae* (Figura 10). En este caso se tomaron muestras de riñón, hígado y bazo para la realización de *qPCR* (PCR real time) y en los peces que se observó engrosamiento macroscópico del riñón se realizaron improntas en fresco y preparaciones histopatológicas a partir de cortes de riñón medio y posterior (4 μm) para la identificación de formas extraesporogónicas del parásito (**ver apartado 4.3. Metodología analítica**)

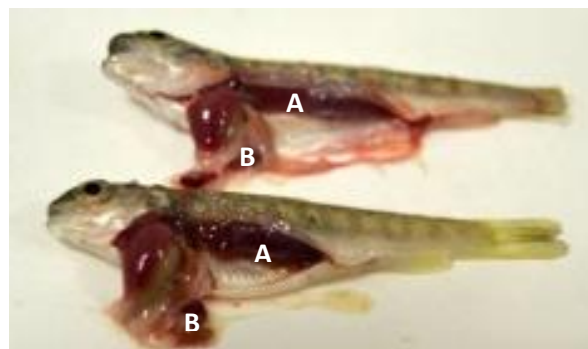


Figura 10- Necropsia de dos alevines.

Leyenda A: Riñón B: Bazo

4.3. Metodología analítica

4.3.1. Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular se basó en la determinación de una parte del genoma del parásito a estudiar, a partir de los tejidos obtenidos en la necropsia y gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la extracción del ADN se utilizó el Kit comercial de extracción *NucleoSpin® Tissue* (MACHEREY-NAGEL GmbH y Co. KG, Alemania).

En primer lugar, se extrae unos 25g de tejido de las muestras obtenidas anteriormente, mezclado todo el lote, y se siguen las instrucciones indicadas por el fabricante.

Los cebadores específicos usados en la *qPCR* (Tabla 1) han sido diseñados según la secuencia 18S rDNA de *T. bryosalmonae* de 166 pb (Grabner y El-Matbouli, 2009).

Tabla 1- Cebadores utilizados en *qPCR*

PKD-real F	5'-TGT CGA TTG GAC ACT GCA TG-3'	(Integrated DNA technologies, EEUU)
PKD-real R	5'-ACG TCC GCA AAC TTA CAG CT-3'	

Cada reacción utilizada en la *qPCR* contiene un volumen de 22 μL *Master mix*, que contiene 2,5 μL del fluoróforo *SYBER Green I* (*GoTaq® Hot Start Green Master Mix*, Promega, EEUU), 1,5 μL de MgCl_2 , 1,25 μL del cebador R, 1,25 μL del cebador F, ambos a una concentración 1 molar, 1,25 μL de dNTPs, 0,3 μL de la enzima Taq polimerasa y 13,95 μL de agua. Además esta reacción contiene 3 μL de ADN, con lo que el volumen de cada reacción es de 25 μL .

La *master-mix* se añade a cada pocillo correspondiente y posteriormente añadimos el ADN de cada muestra, cada muestra se realiza por duplicado y se tiene tanto un control positivo como negativo, por tanto si se tiene 5 muestras se necesitan 12 pocillos.

La determinación se lleva a cabo en un termociclador CFX Connect™ (Biorad).

Las condiciones de PCR a tiempo real fueron las siguientes, una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, seguida de 38 ciclos a 95°C durante 45 segundos, 61°C durante 45 segundos y 72°C durante 45 segundos. Después de ello se realizó un paso adicional desde 60°C a 95°C en un ratio de 0,5°C para observar la curva de fusión (*melting curve -Tm-*) (Grabner y El-Matbouli, 2009).

4.3.2. Diagnóstico histopatológico

Una vez fijadas las muestras (formol tamponado al 10%), fueron procesadas para su inclusión en parafina mediante un inductor de tejidos automático de ciclo continuo (Bavimed), donde se realizó la correspondiente deshidratación y aclaramiento a través de diferentes concentraciones crecientes de alcohol y xilol, respectivamente. Finalmente, para la realización de los bloques de parafina de los tejidos se utilizó una unidad formadora de bloques (Myr) a una temperatura de 58-60°C.

A partir de los bloques conservados a -20°C, se realizaron cortes de 4-5 μm de grosor mediante el empleo de un micrótopo automatizado (Microm).

Dichos cortes fueron recogidos en portaobjetos impregnados previamente en albúmina glicerada de Mayer que una vez secos se tiñeron mediante la técnica clásica de hematoxilina-eosina (Amin et al., 1992), y finalmente montados en DPX.

Todos los cortes histológicos fueron observados al microscopio óptico con el fin de valorar la presencia de posibles lesiones microscópicas en el tejido renal, así como de *T. bryosalmonae*.

Las muestras para histopatología fueron procesadas en el Laboratorio Autonómico de Aragón de *Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*.

4.3.3. Análisis estadístico

En primer lugar, se ha realizado la descripción de las variables cuantitativas estudiadas (temperatura y mortalidad diaria), teniendo en cuenta su distribución en la muestra.

Dado que dicha distribución ha sido no normal las pruebas escogidas han sido no paramétricas donde el parámetro de tendencia central utilizado ha sido el valor de la mediana y el intervalo intercuartílico (percentil 75 – percentil 25), con el fin de medir el grado de dispersión de los datos obtenidos.

Posteriormente, se ha realizado la inferencia estadística comparando las variables señaladas teniendo en cuenta la explotación piscícola y la presencia de PKD a partir de las pruebas de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para poder comparar los diferentes periodos de estudio. Para considerar significación estadística se ha tenido en cuenta el umbral de significancia $p < 0,05$.

Complementariamente, se ha calculado el coeficiente de Spearman (Rho), con el fin de estudiar el grado de correlación entre las variables analizadas y las diferentes explotaciones estudiadas, así como en función de la presencia o no de la infección por PKD.

5. Resultados

5.1. Sobre el diagnóstico de PKD en las muestras analizadas

A lo largo de todo el periodo de estudio se han analizado un total de 480 alevines de trucha común distribuidas uniformemente ($n=240$), entre las dos explotaciones piscícolas objeto del trabajo.

La presencia de *T. bryosalmonae* fue observada en Los Pajares a partir del mes de julio hasta el mes de septiembre (fin del estudio) tanto por *qPCR* como por histopatología. En dichos casos se observaron peces con sintomatología compatible con la enfermedad proliferativa renal,

puesta de manifiesto por la presencia de anemia branquial, melanosis, distensión abdominal y esplenomegalia. A nivel interno, algunos de los peces analizados manifestaban en diferentes grados, engrosamiento y decoloración del riñón medio y caudal (*Figura 11*). La histopatología de estas lesiones, tal como se puede observar en la *Figura 12*, mostró una nefritis intersticial de carácter granulomatoso e hiperplasia del tejido linfohematopoyético, con presencia del parásito (fase extraesporogónica) en el tejido intersticial y de forma aislada también en los túbulos renales.

El diagnóstico por *qPCR* confirmó los resultados anteriores, de los cuales se obtuvo un resultado positivo en las tres sub-muestras (de 10 alevines cada una) analizadas durante los 3 meses citados anteriormente.



Figura 11- Engrosamiento y decoloración de riñón medio y posterior en trucha común afectada por PKD.

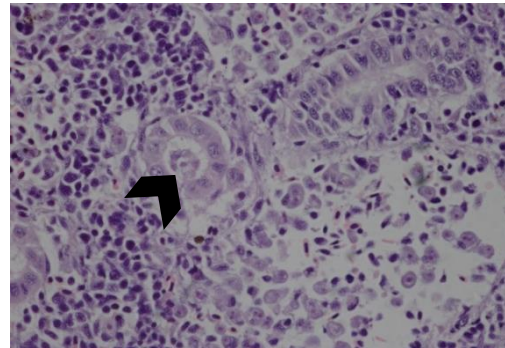


Figura 12- Sección histológica de riñón caudal. La flecha señala una célula PKX en el interior de un túbulo renal.

Debemos señalar que en la instalación de Barranco Hondo la presencia de *T. broysalmonae* sólo se observó por la técnica *qPCR* en dos sub-muestras recogidas durante el mes de agosto. En ningún caso se observaron síntomas y lesiones características de la enfermedad en los peces analizados.

5.2. Sobre la evolución de la temperatura del agua y la mortalidad registradas diariamente en las instalaciones piscícolas estudiadas

En la *Figura 13* se muestran gráficamente la evolución diaria de la temperatura y de la mortalidad obtenidas durante la realización de este trabajo. Así, se aprecia que los valores de la temperatura han sido superiores, en términos generales, durante la estación veraniega en la piscifactoría de Los Pajares (14-18°C) frente a los valores recogidos en Barranco Hondo (11-13°C). Mientras que la evolución de la mortalidad ha sido muy parecida entre ambas explotaciones piscícolas, observando los porcentajes más elevados en mayo y agosto, respectivamente.

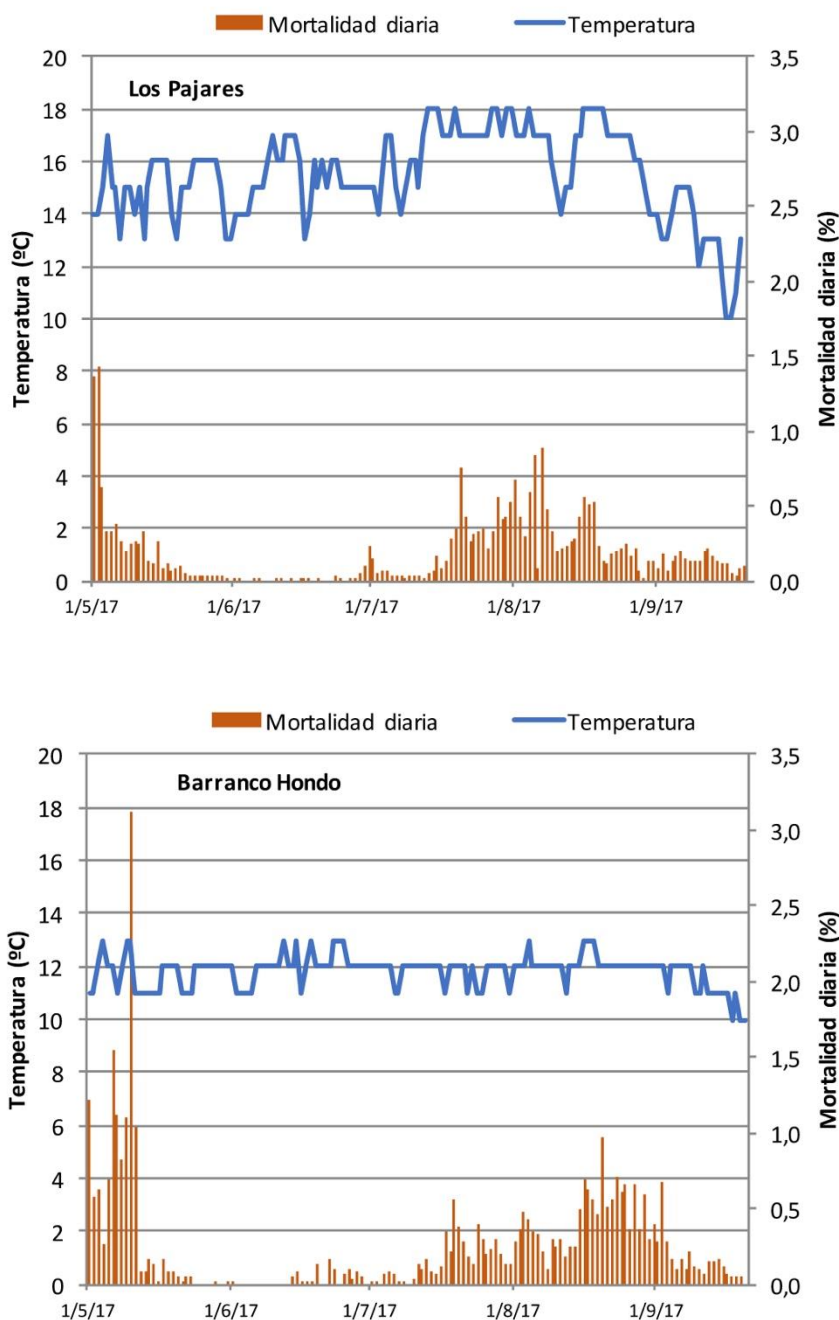


Figura 13- Valores de temperatura diaria del agua y porcentaje de mortalidad diario del 1 de mayo al 20 de septiembre de 2017 en las instalaciones de Los Pajares de Albarracín y Barranco Hondo.

5.3. Sobre la correlación entre las distintas variables estudiadas

La descripción de estas variables se presenta en las *Tablas 2 y 3*. Así, hemos encontrado que la temperatura ha variado significativamente según la piscifactoría y el mes en que fueron tomadas, siendo mayores en la piscifactoría de Los Pajares durante la estación estival.

Tabla 2- Descripción de la temperatura en función de la distribución mensual de las muestras en Los Pajares

Parámetro	Mes	Media ± DE	Mediana ± RQ	Valor p ^{KW}
Temperatura (°C)	Mayo	11,32 ± 1,86	13,00 ± 3,00	0,000*
	Junio	13,67 ± 1,85	13,00 ± 3,00	
	Julio	14,24 ± 2,64	13,00 ± 5,00	
	Agosto	14,32 ± 2,42	13,50 ± 5,00	
	Septiembre	12,18 ± 1,47	12,00 ± 2,00	

DE Desviación estándar; RQ: Rango intercuartílico; P^{MW} Grado de significación según prueba de Kruskal-Wallis; * Diferencias significativas (p < 0,05)

Con respecto a la mortalidad diaria, ésta ha sido ligeramente superior en la instalación de Barranco Hondo (Tabla 3), aunque en este caso los resultados obtenidos no han mostrado diferencias significativas.

Tabla 3- Descripción de la temperatura y la mortalidad diaria según las piscifactorías estudiadas.

Parámetro	Instalación	Media ± DS	Mediana	Valor p ^{MW}
Temperatura (°C)	Bco. Hondo	11,81 ± 0,62	12,00	0,000*
	Los Pajares	15,50 ± 1,69	16,00	
Mortalidad (%)	Bco. Hondo	0,25 ± 0,37	0,13	0,415
	Los Pajares	0,19 ± 0,23	0,12	

DS Desviación típica; P^{MW} Grado de significación según prueba de Mann-Whitney; * Diferencias significativas (p < 0,005)

Por otro lado, hemos observado como la temperatura y la mortalidad diarias han sido significativamente menores en ausencia de infección por *T. bryosalmonae* en comparación con la presencia del parásito (Tabla 4).

Tabla 4- Descripción de la temperatura y la mortalidad diaria según la ausencia o presencia de *T. bryosalmonae* en los peces analizados

Parámetro	PKD	Media ± DE	Mediana ± RQ	Valor p ^{MW}
Temperatura (°C)	Ausencia	12,46 ± 1,53	12,00 ± 1,25	0,000*
	Presencia	14,90 ± 2,19	15,00 ± 4,00	
Mortalidad (%)	Ausencia	0,20 ± 0,38	0,08 ± 0,18	0,000*
	Presencia	0,24 ± 0,22	0,19 ± 0,32	

DE Desviación estándar; RQ: Rango intercuartílico; P^{MW} Grado de significación según prueba de Mann-Whitney; * Diferencias significativas (p < 0,05)

Sin embargo, cuando comparamos estos valores de mortalidad teniendo en cuenta la ubicación de las explotaciones (Tabla 5), apreciamos como dicho incremento es significativamente mayor en Barranco Hondo (0,40%) en presencia de *T. bryosalmonae*.

Tabla 5- Mortalidad (%) obtenida en función de la piscifactoría y la presencia – ausencia de *T. bryosalmonae*

Piscifactoría	PKD	Mediana ± RQ	Valor p ^{MW}
Barranco Hondo	Ausencia	0,08 ± 0,15	0,000*
	Presencia	0,40 ± 0,31	
Los Pajares	Ausencia	0,09 ± 0,23	0,898
	Presencia	0,12 ± 0,22	

DE: Desviación estándar; RQ: Rango intercuartílico; P^{MW} Grado de significación según prueba de Mann-Whitney; * Diferencias significativas (p < 0,05)

Tal y como ya hemos señalado en apartados anteriores (**4.3.3. Análisis estadístico**), complementariamente a la descripción de las distintas variables estudiadas se calculó también el coeficiente de Spearman (Rho), con el fin de mostrar el grado de correlación entre las mismas en función de la ubicación de las piscifactorías y la existencia o no de infección por *T. bryosalmonae*.

Así, hemos observado una asociación positiva y significativa (Rho=0,31; p=0,000*), entre la temperatura y la mortalidad detectadas en la piscifactoría de Los Pajares. Mientras que también se observó esta correlación en presencia de infección por PKD, tanto en Los Pajares (Rho=0,42; p=0,000*), como en Barranco Hondo (Rho=0,41; p=0,002*).

6. Discusión

El estudio que estamos realizando pretende lograr una reducción de la mortalidad causada por PKD en trucha común en la piscifactoría de Los Pajares basándonos en dos características de la enfermedad, la influencia de la temperatura y el desarrollo de inmunidad.

El principal factor en la intensidad de parasitación y en el desarrollo clínico (tiempo de incubación, manifestación de signos y mortalidad) del PKD es la temperatura. A temperaturas inferiores a 9 °C no hay signos de enfermedad. Estos se empiezan a manifestar a partir de aproximadamente 12 °C y a temperaturas superiores a 15 °C hay un importante incremento de los signos clínicos y de la mortalidad (Bettge et al., 2009a,b; Okamura et al., 2011).

Estas diferencias observadas entre los 12 °C y los 15 °C no se basan únicamente en un incremento de la intensidad parasitaria que intensifique la respuesta inmune sino que está asociada a variaciones de la respuesta inmune en función de la temperatura del agua (Bailey et al., 2017).

Los juveniles de salmónidos son los peces con mayor riesgo de desarrollar un proceso clínico por PKD pero cualquier animal no expuesto previamente a *T. bryosalmonae* es también susceptible (Feist y Longshaw, 2006). Por contra, los animales supervivientes a una infección adquieren un grado de inmunidad que permite que el siguiente verano o bien no haya desarrollo clínico de la infección o bien los signos sean muy reducidos (Okamura et al., 2011).

Ante la falta de otras medidas, la única solución factible para evitar una mortalidad excesiva por PKD en una piscifactoría de salmónidos es mantener los alevines en aguas con una temperatura no superior a los 14°C durante el verano para ya en otoño, cuando las temperaturas son inferiores, exponerlos al parásito en aguas infectadas. Así es posible reducir la mortalidad de los alevines el primer verano manteniéndolos en aguas frías y posteriormente reducir la mortalidad al haber adquirido inmunidad en infecciones naturales de otoño.

Esta técnica de inmunización es la que queremos desarrollar para reducir sintomatología y mortalidad del PKD en las piscifactorías de salmónidos afectadas. Es la medida preventiva más ampliamente recomendada pero que conlleva una gran inversión en esfuerzo y tiempo por lo que antes de generalizarla es imprescindible valorarla en cada situación.

La primera fase del estudio, realizada en 2017, debe servir para reducir la mortalidad de los alevines manteniéndolos en aguas frías durante el verano y lograr su posterior inmunización natural en otoño.

La reducción de la mortalidad, nuestro primer objetivo, ha mostrado resultados diferentes a lo esperado si comparamos las dos instalaciones. La diferencia de temperatura entre ambas instalaciones es manifiesta, entre 3,7 y 4°C (media y mediana), con pocos días de temperatura superior a los 12°C en Barranco Hondo y la mayoría por encima de los 14°C en los Pajares, de Mayo a Septiembre, algo esperado por la ubicación de la piscifactoría de Los Pajares que se halla en el tramo medio del río Guadalaviar, a una menor altitud que la instalación de Barranco Hondo.

Sin embargo, si bien las diferencias no han resultado significativas, los valores diarios de mortalidad, media y mediana, han sido superiores en Barranco Hondo, es decir en el agua fría.

La distribución de la mortalidad, en ambas instalaciones, muestra algunas similitudes. En primer lugar, unos valores máximos durante el mes de mayo que achacamos a la presencia de ectoparásitos (*Ichthyobodo*) ya que ni se observó sintomatología de PKD ni hubo diagnósticos laboratoriales positivos. Es a mitad del mes de Julio cuando se aprecia un nuevo incremento de la mortalidad en ambas instalaciones que alcanza picos máximos, aunque no exactamente sincrónicos, durante el mes de agosto.

Y este pico, en ambas instalaciones, sí que lo asociamos al menos en parte con una infección por *T. bryosalmonae* aunque matizando las diferencias entre ambas instalaciones. En Los Pajares la mortalidad coincide con la aparición de sintomatología compatible con PKD (Schmidt-Posthaus et al., 2012b; Skovgaard y Buchmann, 2012) y lesiones macro y microscópicas típicas de la enfermedad (Braden et al., 2010; Noga, 2010; Schmidt-Posthaus et al., 2012b) confirmando el diagnóstico por medio de la *qPCR*. Tanto la mortalidad como la clínica y el diagnóstico se mantienen durante los 2 meses que todavía el estudio. En Barranco Hondo, sin embargo, Hondo el resultado es puntual en septiembre con solo positivo en dos de los tres lotes analizados y con una concentración baja en *qPCR*, además de no presentar manifestaciones clínicas.

Por tanto, la enfermedad, en Los Pajares, se corresponde con el patrón esperado en clínica y mortalidad diaria, la cual en presencia de *T. bryosalmonae* se incrementa x1,33 (de 0,09 a 0,12) respecto a la mortalidad en ausencia de infección. Sin embargo, en Barranco Hondo dónde a pesar de tener una temperatura de agua inferior, la mortalidad diaria en presencia de *T. bryosalmonae* se incrementa cinco veces (de 0,08 a 0,40) sin que se hayan observado síntomas y/o lesiones compatibles con la enfermedad en ningún momento.

La hipótesis más probable que explique estos resultados es que la infección detectada las instalaciones de Barranco Hondo constituya un factor de confusión y que la mortalidad observada sea debida a otros factores relacionados la calidad del medio acuático, el manejo o el movimiento de peces, factores que de momento no hemos podido identificar. El diagnóstico molecular positivo tendría también sus posibles explicaciones, empezando por una contaminación de la muestra y siguiendo por una presencia mínima en concentración de esporos de *T. bryosalmonae* en el agua. Es posible que los peces de esta instalación se hayan infectado, pero al mantenerse en aguas frías la multiplicación del parásito es mínima sin ni siquiera manifestarse en todos los grupos e indetectable en los siguientes meses. El proceso en este caso, y consecuencia de la temperatura del agua, cursa de forma subclínica.

7. Conclusiones

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

Primera. Ha quedado demostrado el papel de la temperatura en el desarrollo clínico y en la mortalidad en alevines de trucha común por Enfermedad Proliferativa Renal (PKD)

Segunda. El traslado de alevines a la instalación de Barranco Hondo no ha mejorado las tasas de mortalidad respecto a Los Pajares, si bien dicho incremento no ha sido atribuible al PKD

Conclusions

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

First. The role of temperature in clinical development and mortality of brown trout fingerlings in Proliferative Kidney Disease (PKD) has been demonstrated.

Second. The transfer of fingerlings to *Barranco Hondo* doesn't have improve the mortality rates in *Los Pajares*, although this increase has not been attributable to the PKD.

8. Valoración personal

Considero que haber podido realizar este trabajo ha sido una gran oportunidad. Gracias al TFG he aprendido mucho sobre el PKD, una enfermedad que cada año toma más importancia en nuestro país, y no solo eso, he conocido más a fondo el mundo piscícola, dado que en los años en la facultad de veterinaria el tiempo dedicado a la ictiopatología fue escaso comparado con otras especies.

Adicionalmente, he aprendido a desenvolverme en el mundo del análisis laboratorial, aprendiendo a realizar técnicas muy utilizadas actualmente en el diagnóstico de enfermedades. Igualmente, he aprendido a buscar y organizar la información en base de datos y desarrollar una metodología de estudio. Agregando a lo anterior nombrado, he aprendido a redactar formalmente un trabajo científico.

Cabe agregar que la ictiopatología cada vez va obteniendo más importancia en el mundo de la veterinaria por la expansión mundial que está teniendo el consumo de pescado y el aumento de la acuicultura. En síntesis, creo que la ictiopatología es un gran futuro profesional al que pocos deciden acceder.

Después de lo anterior expuesto me gustaría agradecer a la sección de Caza y Pesca del Servicio Provincial de Teruel; al APN Joaquín Pérez y a Asunción García de la empresa SARGA-DGA por su inestimable colaboración en todo momento tanto en el acceso a las piscifactorías como en la de proporcionarnos todos los datos necesarios. A los profesores Ana Muniesa y Nacho de Blas por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos. A la profesora Cristina Acín por la realización en el Laboratorio Autónomo de Aragón de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles de las muestras histopatológicas. Y por último, a mis tutores Miguel A. Peribáñez e Imanol Ruiz por su ayuda en el desarrollo y realización del trabajo.

9. Bibliografía

- Abd-Elfattah, A., Fontes, I., Kumar, G., Soliman, H., Hartikainen, H., Okamura, B. y El-Matbouli, M. (2014a). Vertical transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa), the causative agent of salmonid proliferative kidney disease. *Parasitology*, 141(4), 482-490.
- Abd-Elfattah, A., Kumar, G., Soliman, H. y El-Matbouli, M. (2014b). Persistence of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) in chronically infected brown trout *Salmo trutta*. *Diseases of aquatic organisms*, 111(1), 41-49.
- Amin, A.B., Mortesen, L. y Poppe, T. (1992). Histology Atlas. Normal structure of salmonids. APL, Oslo.
- Anderson, C., Canning, E. y Okamura, B. (1999). Molecular data implicate bryozoans as hosts for PKX (phylum Myxozoa) and identify a clade of bryozoan parasites within the Myxozoa. *Parasitology*, 119, 555-561.
- Ax, P. (2003). *Multicellular Animals: Order in Nature - System Made by Man* (Primera ed., Vol. 3). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bailey, C., Segner, H., Casanova-Nakayama, A. y Wahli, T. (2017). Who needs the hotspot? The effect of temperature on the fish host immune response to *Tetracapsuloides bryosalmonae* the causative agent of proliferative kidney disease. *Fish Shellfish Immunology*, 63, 424-437.
- Bettge, K., Senger, H., Burki, R., Schmidt-Posthaus, H. y Wahli, T. (2009a). Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature- and time-related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology*, 136(6), 615-625.
- Bettge, K., Wahli, T., Segner, H., y Schmidt-Posthaus, H. (2009b). Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83(1), 67-76.
- Borsuk, M. E., Reichert, P., Peter, A., Schager, E. y Burkhardt-Holm, P. (2006). Assessing the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers using a Bayesian probability network. *Ecological Modelling*, 192(1-2), 224-244.
- Braden, L., Prospero-Porta, G., Kim, E. y Jones, S. (2010). *Tetracapsuloides bryosalmonae* in spawning pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum), in the Quinsam River, British Columbia, Canada. *Journal of Fish Diseases*, 33(7), 617-621.

- Burki , R., Krasnov, A., Bettge , K., Rexroad , C., Afanasyev, S., Antikainen , M., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. y Segner , H (2013). Molecular crosstalk between a chemical and a biological stressor and consequences on disease manifestation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 127, 2-8.
- Canning, E., Curry , A., Feist , S., Longshaw , M. y Okamura, B. (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), 456–468.
- Canning, E., Tops, S., Curry, A. y Okamura, B. (2002). Ecology, Development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schroder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 280-295.
- Chilmonczyk, S., Monge, D. y De Kinkelin, P. (2002). Proliferative kidney disease: cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. 25(4), 217–226.
- De Kinkelin, P. y Loriot, B. (2001). A water temperature regime which prevents the occurrence of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 24(8), 489-493.
- Diep, C., Ma, D., Deo, R., Holm, T., Naylor, R., Arora, N. y Wingert, R. (2011). Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature*, 470(7332), 95-100.
- Directiva 96/23/CE. <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_control_substances_jme.pdf>. Consultado el 29 de Julio de 2017.
- Feist, S. y Bucke, D. (1993). Proliferative kidney disease in wild salmonids. *Fisheries Research*, 18, 51-58.
- Feist, S. y Longshaws, M. (2006). Phylum Myxozoa. En P. Woo, *Fish diseases and disorders*. (Segunda ed., Vol. Volume 1: protozoan and metazoan infections., Ontario: Cabi.org), págs. 260-277.

- Feist, S., Peeler, E., Gardiner, R., Smith, E. y Longshaw, M. (2002). Proliferative kidney disease and renal myxosporidiosis in juvenile salmonids from rivers in England and Wales. *Journal of Fish Diseases* volume 25, 25(8), 451-458.
- Filippenko, D., Hartikainen, H., Okamura, B. y Vasemägi, A. (2014). Characterisation of polymorphic microsatellite loci for the bryozoan *Fredericella sultana*, the primary host of the causative agent of salmonid proliferative kidney disease. *Conservation Genetics Resources*, 6(2), 481-482.
- GoTaq® Hot Start Green Master Mix Product Information. (Promega), <<https://www.promega.es/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-hot-start-green-master-mix-protocol/>>. Consultado el 15 de Octubre de 2017
- Grabner, D. y El-Matbouli, M. (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(2), 133-139.
- Grabner, D. y El-Matbouli, M. (2009). Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD). *Veterinary Parasitology* (165), 200-206.
- Grabner, D. y El-Matbouli, M. (2010). *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) portal of entry into the fish host. *Diseases of Aquatic Organisms*, 90 (3) , 197-206.
- Hartikainen, H. (2007). *Freshwater Bryozoan Abundance, Eutrophication and Salmonid Fish Disease*. Tesis doctoral, University of Reading, Reading.
- Hedrick, R., Baxa, D., De Kinkelin, P. y Okamura, B. (2003). Malacosporean-like spores in urine of rainbow trout react with antibody and DNA probes to *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Parasitology Research*, 92(2), 81-88.
- Henderson, M. y Okamura, B. (2004). The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271, 1729-1736.
- Holzer, A., Sommerville, C. y Wootten, R. (2006). Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed *Salmo trutta* L. *Parasitology*, 132(2), 193-205.

- Integrated DNA Technologies* (2017). <<https://eu.idtdna.com/site>>. Consultado el 10 de Octubre.
- Kent, M., Khattra, J., Hedrick, R. y Devlin, R. (2000). *Tetracapsula renicola* n. sp. (Myxozoa : Saccosporidae); the PKX myxozoan - the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *Journal of Parasitology*, 86(1), 103-111.
- Kristmundsson, A., Antonsson, T. y Árnason, F. (2010). First record of Proliferative Kidney Disease in Iceland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 30, 35-40.
- Kumar, G., Abd-Elfattah, A., Saleh, M. y El-Matbouli, M. (2013a). Fate of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) after infection of brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(1), 9-18.
- Kumar, G., Abd-Elfattah, A., Soliman, H. y El-Matbouli, M. (2013b). Establishment of medium for laboratory cultivation and maintenance of *Fredericella sultana* for in vivo experiments with *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Journal of Fish Diseases*, 36(2), 81-88.
- Laboratorio de Ictiopatología (2013), Resultados correspondientes al control zoonosario realizados en los ríos Piedra y Guadalaviar con especial relevancia en el estudio de la prevalencia de *Tetracapsuloides bryosalmonae* (PKD). Informe inédito no publicado del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza
- Massard, J. A. y Geimer, G. (2008). Global diversity of bryozoans (Bryozoa or Ectoprocta) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment. Hydrobiologia*, 595, 93-99.
- McGurk, C., Morris, D., Auchinachie, N. y Adams, A. (2006). Development of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) in bryozoan hosts (as examined by light microscopy) and quantitation of infective dose to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Parasitology*, 135(3-4).
- McGurk, C., Morris, D., Bron, J. y Adams, A. (2005). The morphology of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) spores released from *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Journal of Fish Diseases*, 28(5), 307-312.
- Mo, T., Kaada, I., Jøranlid, A. y Poppe, T. (2011). Occurrence of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the kidney of smolts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and sea trout (*S. trutta*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 31(4), 151-155.
- Morris, D. (2010). Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma. *Proceedings Biological sciences*, 277(1693), 2565-2570.

- Morris, D. (2012). Towards an in vitro culture method for the rainbow trout pathogen *Tetracapsuloides bryosalmonae*. *Journal of Fish Diseases*, 35(12), 941-944.
- Morris, D. y Adams, A. (2006). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea), the causative organism of salmonid proliferative kidney disease, to the freshwater bryozoan *Fredericella sultana*. *Parasitology*, 133(6), 701-709.
- Morris, D. y Adams, A. (2008). Sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the brown trout *Salmo trutta* and the role of the tertiary cell during the vertebrate phase of myxozoan life cycles. *Parasitology*, 135(9), 1075-1092.
- Morris, D., Adams, A., Feist, S., McGeorge, J. y Richards, R. (2000). Immunohistochemical and PCR studies of wild fish for *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX), the causative organism of proliferative kidney disease. *Journal of Fish Diseases*, 23(2), 129-135.
- Noga, E. J. (2010). Proliferative Kidney Disease (PKD; *Tetracapsuloides bryosalmonae* infección). En E. J. Noga, *Fish disease: Diagnosis and Treatment* (Second ed., Iowa, USA: Wiley-Blackwell), págs. 239-241.
- Okamura, B., Gruhl, A. y Bartholomew, J. L. (2015). *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing.
- Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H. y Wahli, T. (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology*, 56(4), 735-753.
- Schager, E., Peter, A. y Burkhardt-Holm, P. (2007). Status of young-of-the-year brown trout (*Salmo trutta fario*) in Swiss streams: factors influencing YOY trout recruitment. *Aquatic Sciences*, 69(1), 41-50.
- Schmidt-Posthaus, H., Bettge, K., Segner, H. y Wahli, T. (2012a). Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving proliferative kidney disease: time course and influence of temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 97, 207-218.
- Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T. y Strepparava, N. (2012b). *Universität Bern*. <http://www.vetsuisse.ch/wp-content/uploads/2015/06/Fish_PKD_temperature_1.pdf>. Consultado el 25 de Julio de 2017

- Schmidt-Posthaus, H., Hirschi, R. y Schneider, E. (2015). Proliferative kidney disease in brown trout: infection level, pathology and mortality under field conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, 114(2), 139-146.
- Skovgaard, A. y Buchmann, K. (2012). *Tetracapsuloides bryosalmonae* and PKD in juvenile wild salmonids in Denmark. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101(1), 33-42.
- Tops, S., Hartikainen, H. y Okamura, B. (2009). The effects of infection by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) and temperature on *Fredericella sultana* (Bryozoa). *International Journal for Parasitology*, 39(9), 1003–1010.
- Tops, S., Baxa, D. V., McDowell, T., Hedrick, R. y Okamura, B. (2004). Evaluation of malacosporean life cycles through. *Diseases of Aquatic Organisms*, 60(2), 109-121.
- Tops, S., Lockwood, W. y Okamura, B. (2006). Temperature-driven proliferation of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in bryozoan hosts portends salmonid declines. *Diseases of Aquatic Organisms*, 70(3), 227-236.
- Van der Waaij, M. (2005). *Bryozoans*. <http://www.bryozoans.nl/pictures/en/fredericella_sultana.html>. Consultado el 11 de Noviembre de 2017.
- Wahli, T., Bernet, D., Steiner, P. y Schmidt-Posthaus, H. (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fish in Swiss rivers: an update. *Aquatic Sciences*, 69(1), 3-10.
- Wahli, T., Knuesel, R., Bernet, D., Segner, H., Pugovkin, D., Burkhardt-Holm, P., Escher, M. y Schmidt-Posthaus, H. (2002). Proliferative kidney disease in Switzerland: current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 25(8), 491-500.
- Watanabe, N., Kato, M., Suzuki, N., Inoue, C., Fedorova, S., Hashimoto, H., Maruyama, S., Matsuo, S. y Wakamatsu, Y. (2009). Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Development, Growth y Differentiation*, 51(2), 135–143.
- Wood, T. S., Wood, L. J., Geimer, G. y Massard, J. (1998). Freshwater bryozoans of New Zealand: A preliminary survey. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32(4), 639-648.

- Yokoyama, H., Grabner, D. y Shirakashi, S. (2012). Transmission Biology of the Myxozoa. En E. Carvalho, G. David, y R. J. de Silva, *Health and Environment in Aquaculture*. págs. 1-41. (InTech).
- Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T. y Segner, H. (2007). Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Sciences*, 69(1), 11-25.
- Znayduk, Y. (2015). *Paint the world super coloring*. < <http://www.supercoloring.com/coloring-pages/greenback-cutthroat-trout>>. Consultado 15 de Noviembre de 2017.