



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



Índice

1. Resumen/Abstract.....	2
2. Justificación y objetivos.....	2
3. Metodología	3
4. Introducción	3
5. Resultados y discusión	5
5.1 Generalidades	5
5.1.1 Etiología.....	5
5.1.2 Patogenia.....	6
5.1.3 Cuadro clínico.....	6
5.1.4 Consecuencias económicas.....	8
5.2 Estrategias de prevención	9
5.2.1 Prevención inmunológica.....	9
5.2.2 Selección genética.....	11
5.2.3 Control de la densidad	13
5.2.4 Control de reservorios.....	14
5.3 Estrategias de control.....	17
5.3.1 Baños de agua dulce.....	17
5.3.2 Desinfectantes.....	18
5.3.3 Levamisol.....	21
5.3.4 Extracto de ajo	21
6. Conclusiones/Conclusions.....	22
7. Valoración personal.....	23
8. Bibliografía	23

1. Resumen

La enfermedad branquial amebiana (AGD, por sus siglas en inglés), es, posiblemente, una de las enfermedades infecciosas de mayor importancia en el sector de la acuicultura de salmónidos por las pérdidas que puede llegar a ocasionar (hasta el 50% de bajas en jaulas no tratadas) en la fase marina. Esta enfermedad afecta principalmente al salmón atlántico (*Salmo salar*), y también a otras especies cultivables de la misma familia, como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*). El agente causal de esta enfermedad es el protozoo *Neoparamoeba perurans*, aunque también pueden intervenir otras especies de amebas pertenecientes al mismo o a otros géneros (*Paramoeba*, *Vexillifera*, *Vannella*...), que actúan como agentes oportunistas.

Para evitar los problemas que puede llegar a dar esta enfermedad, tienen una especial importancia las distintas estrategias de prevención que se pueden tomar; que hoy en día, además de unas buenas medidas generales de higiene y manejo, pasan por la selección genética de los animales, así como el control de otros factores como la densidad de población o los reservorios.

Una vez instaurada la enfermedad, la importancia recae en los métodos de control, que tradicionalmente han pasado por el baño de los peces en agua dulce, aunque cada vez hay mayor variedad de estrategias. Para el veterinario dedicado a la producción piscícola es muy importante conocer las ventajas e inconvenientes de estas estrategias de prevención y control.

1. Abstract

Amoebic gill disease (or AGD) is, probably, one of the most important infectious diseases in salmonid aquaculture sector due to the losses it can cause (up to 50% in non-treated cages) in the marine phase. This disease mainly affects Atlantic salmon (*Salmo salar*), and also other farmable species of the same family, like rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). The causative agent of this disease is the protozoan *Neoparamoeba perurans*, although other species of amoeba belonging to the same or to other genera (*Paramoeba*, *Vexillifera*, *Vannella*...) can also participate, acting like opportunist agents.

In order to avoid the problems that this disease can produce, strategies in prevention are especially important; and, now a days, besides maintaining a good state of hygiene and management, they include genetic selection and control of other factors like population density or reservoirs.

Once the disease is established, control methods become important. Traditionally they have consisted in fresh water bathing, although there are more and more strategies being developed. For the veterinarian who works in fish farming, is very important to know the advantages and disadvantages of these prevention and control strategies.

2. Justificación y objetivos

Debido a la importancia creciente de la producción piscícola, resulta interesante la elaboración de un trabajo que trate en profundidad una de las patologías que más problemas pueden dar a

este sector, la enfermedad branquial amebiana (AGD); así como los métodos seguidos para hacerle frente.

El objetivo principal de este trabajo es la realización de una revisión bibliográfica que caracterice las distintas estrategias que se siguen para la prevención y el control de la AGD, diferenciando cuáles tienen una mayor eficacia y en función de qué circunstancias. El trabajo también pretende realizar una buena determinación de la importancia actual de la enfermedad así como de su distribución, patogenia, etc. y del propio agente responsable.

3. Metodología

El trabajo consiste en una revisión bibliográfica. La información en él presente proviene de artículos científicos sobre el tema, así como libros especializados.

Los artículos empleados proceden de bases de datos especializadas, como PubMed o Inter-Research Science Publisher; y de revistas científicas on-line, como Aquaculture Research. He utilizado palabras clave como: amebiasis branquial, *Neoparamoeba perurans*, prevención inmunológica, selección genética de resistencia, control ambiental, *reservoirs*, *disease control* o *fresh water bathing*, entre otras.

El diseño del trabajo sigue las directrices del Plan Docente de la asignatura Trabajo de Fin de Grado del grado de Veterinaria en el curso académico 2018/2019. Las fuentes bibliográficas de las que se ha obtenido la información para el trabajo, han sido referenciadas mediante el estilo de citación “APA”, que nombra autor/es, fecha de publicación; permitiendo identificar la fuente posteriormente en el apartado “bibliografía” y localizarla.

4. Introducción

Las enfermedades parásitarias tienen una gran importancia en la producción acuícola. La mayoría de los parásitos están asociados a un nicho ecológico y una dieta específicos (Marcogliese, 2002); y la acuicultura altera ambas. Debido a esto, los parásitos que afectan a los peces en esta industria frecuentemente difieren a los que afectan a las mismas especies en estado salvaje (Nowak, 2007). La acuicultura ha propiciado la aparición de nuevas enfermedades parásitarias, especialmente las causadas por parásitos oportunistas; y las condiciones de explotación favorecen especialmente a los ectoparásitos (Nowak, 2007). Es por esto que la gestión de la bioseguridad en las explotaciones, así como la búsqueda de herramientas eficaces de prevención y control cobran cada vez más relevancia en esta industria.

La enfermedad de la amebiasis branquial es una enfermedad protozoaria que ha cobrado gran importancia en la producción de peces de agua salada. Fue descrita por primera vez, en el salmón atlántico (*Salmo salar*), en la década de los 80 (Munday, 1986). Esta enfermedad también se ha descrito en otras especies salmonícolas como el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Kent *et al.* 1988) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Munday *et al.* 2001).

También existen especies no salmonidas que pueden contraer la enfermedad, como el rodaballo (*Psetta maxima*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), o el ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Nowak, 2012). La AGD es un problema global que actualmente está en aumento. Se han producido brotes que han causado hasta el momento cuantiosas pérdidas económicas en catorce países, repartidos en los cinco continentes, siendo Islandia el único país con una producción importante de salmón atlántico que no ha declarado ningún brote de esta enfermedad.

Aunque la AGD se ha considerado como una enfermedad típica del verano (Roubal *et al.*, 1989), recientemente han aparecido brotes en invierno, con temperaturas del agua por debajo de los 10°C, lo que cuestiona el rol de las altas temperaturas como principal factor desencadenante de la enfermedad (Douglas-Helders *et al.*, 2001). Posteriormente, se ha demostrado que la densidad de amebas del género *Neoparamoeba* spp. no está asociada significativamente con la turbidez, temperatura o recuentos bacterianos del agua (Douglas-Helders *et al.*, 2003). Por el contrario, sí que hay una correlación importante entre la aparición de la enfermedad y la salinidad del agua, apareciendo infecciones en aguas con salinidades mayores a 32 psu (unidades prácticas de salinidad), y desapareciendo de los peces a salinidades inferiores a 22 psu (Zilberg & Munday, 2006). Además de estos factores, las altas densidades de peces, la falta de higiene y el intercambio de agua escaso contribuyen a la aparición de brotes de AGD (Langdon, 1990).



Figura 1. Jaulas de producción de salmón atlántico. (Wilkinson *et al.*, 2005).

5. Resultados y discusión

5.1 Generalidades

5.1.1 Etiología

El agente causal de la AGD, denominado *Neoparamoeba perurans*, es un protozoo del orden *Dactylopodida*, incluido en la familia *Vexilliferidae*. Se trata, por tanto, de una ameba marina anfizoica, es decir, que puede presentarse tanto como organismo de vida libre en el medio marino, como parasitando animales que lo habitan. Este agente no fue descubierto hasta 2007, cuando Young *et al.* (2007), lo detectaron asociada a animales enfermos de AGD en los cuales no se encontraron otras amebas. En este mismo estudio, se realizó un análisis filogenético basándose en las secuencias de genes del rRNA 18S y el rRNA 28S que demostró que *N. perurans* constituía una especie aparte dentro del género *Neoparamoeba*. Hasta entonces, se pensaba que el agente causal de la AGD era *N. pemaquidensis*, ya que se consiguió aislar de forma consistente en peces enfermos (Kent *et al.*, 1988, Munday *et al.*, 2001); pero los intentos de recrear la enfermedad en el laboratorio usando este parásito no tuvieron éxito (Kent *et al.*, 1988; Morrison *et al.*, 2005).

Morfológicamente, se trata de una ameba desnuda, sin estructuras organizadas en su superficie celular. Presenta, en su citoplasma, uno o varios *Perkinsela amoebae*, protozoos flagelados endosimbiontes. Todas las especies del género *Neoparamoeba* presentan características estructurales similares, como membrana plasmática bien definida, fagosomas, y presencia de endosimbiontes (Kent *et al.*, 1988); por lo que *Neoparamoeba perurans* no puede ser diferenciada en base a su morfología. Respecto a la forma de las células, suelen tener conformación amebiana con pseudópodos, pero en situaciones de estrés, como presencia de agua dulce o exposición a dimetilsulfóxido (DMSO), adoptan una forma esférica, que suele volver a la normalidad cuando la situación adversa remite (Lima *et al.*, 2015).

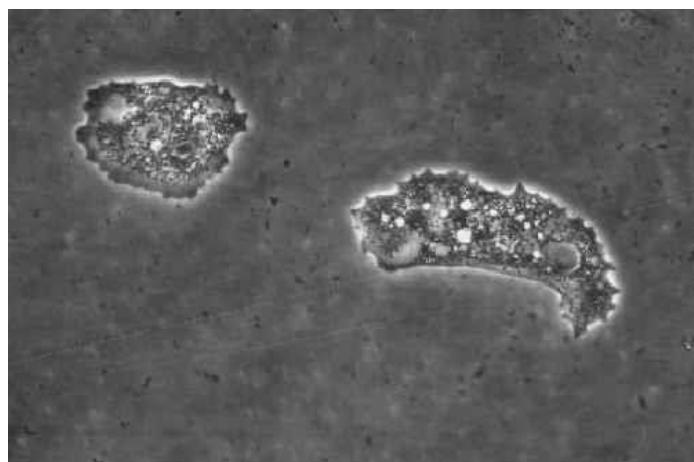


Figura 2 . *N. perurans* aislada de las branquias de un salmón atlántico con AGD. (Nowak, 2012).

N. perurans se considera asexual, ya que no se ha observado diferenciación sexual en esta especie. Esta asunción no es definitiva, debido a la dificultad de cultivarla y observarla. La reproducción sexual ha sido confirmada en 7 de los 13 órdenes de *Amoebozoa*, pero no en *Dactylopodida*, a la que *N. perurans* pertenece.

Además de *N. perurans*, se han detectado otras once especies de amebas en las branquias de salmones atlánticos enfermos de AGD, aunque *N. perurans* es la más abundante (English *et al.*, 2018). Algunas de estas especies, como las del género *Vannella* spp. han sido halladas también en salmones sanos (Nowak *et al.* 2004), por lo que no están asociadas a lesiones branquiales. De otras especies, sin embargo, aún no se sabe si su rol es de agente comensal o de parásito oportunista, ni tampoco se conoce la influencia que puede tener la disbiosis de las especies amebianas presentes en branquias sanas en la aparición o el desarrollo de la AGD (English *et al.*, 2018).

Se ha detectado en las fases iniciales de la enfermedad pequeñas lesiones nodulares con fusión de 2 a 10 láminas de etiología desconocida (Nowak & Munday, 1994); lo que ha llevado a pensar que la infestación por *N. perurans* puede estar influenciada por la presencia de lesiones previas, que estarían producidas por otros protozoos, bacterias, etc. (Kent *et. al.*, 1988; Nowak & Munday, 1994; Munday & Zilberg, 2000; Dykova & Novoa, 2001; Munday *et. al.*, 2001).

5.1.2 Patogenia

Los signos clínicos de la enfermedad están asociados con distrés respiratorio, pérdida de apetito, movimientos operculares rápidos y fuerte inflamación mucosa de las branquias (Munday *et. al.*, 1990). Los animales se muestran apáticos y con poca tolerancia al estrés en transportes y operaciones similares. Sin embargo, a pesar de la dificultad respiratoria que se aprecia, no se han detectado signos de privación de oxígeno en esta enfermedad, excepto una aparente acidosis respiratoria, con un aumento de lactato en el plasma (Powell *et. al.* 2000). Otros signos detectables en los animales afectados por AGD son hipernatremia (Munday *et. al.* 1990), hipertensión (Powell *et. al.* 2002a) y morfología cardíaca alterada (Powell *et. al.* 2002b). Los síntomas asociados a la dificultad respiratoria son debidos a la pérdida de funcionalidad de las branquias, como consecuencia de una reducción de la superficie del epitelio y un aumento de la distancia de difusión en la barrera hemato-acuática (Hvas *et. al.* 2017). Los peces enfermos de AGD muestran elevados valores de cortisol e iones en el plasma, lo que sugiere que padecen estrés crónico y dificultades para mantener el equilibrio osmótico (Hvas *et. al.* 2017). Un aumento de cortisol como respuesta al estrés crónico produce un incremento en la permeabilidad del epitelio branquial, aumentando el intercambio de gaseoso y la captación de iones (Wendelaar, 1997); esto deriva en el desequilibrio iónico que se aprecia en los animales enfermos. La pérdida o movimiento de “células de cloruro” que se observa en la enfermedad también contribuye al fracaso de la osmorregulación (Findlay, 2000).

5.1.3 Cuadro clínico

La infestación por *Neoparamoeba perurans* produce lesiones características en las branquias, que pueden servir para un primer diagnóstico presuntivo. Se observa, microscópicamente, hiperplasia focal y multifocal del epitelio de las laminillas primarias y secundarias. Esta lesión puede progresar hasta producir la fusión de dichas laminillas. Se forman también vesículas interlamelares que contienen en su interior al parásito (Kent *et. al.* 1988, Roubal *et. al.* 1989; Munday *et. al.* 1990; Dykova *et. al.* 1995). En estadios tardíos de la enfermedad hay un descenso del número de amebas (Dykova *et. al.* 1995, 2001).

A nivel macroscópico, la hiperplasia multifocal se ve en forma de manchas blancas mucoides, junto con producción profusa de mucus, cuya cantidad puede ser indicativa de la severidad del proceso (Figura2).

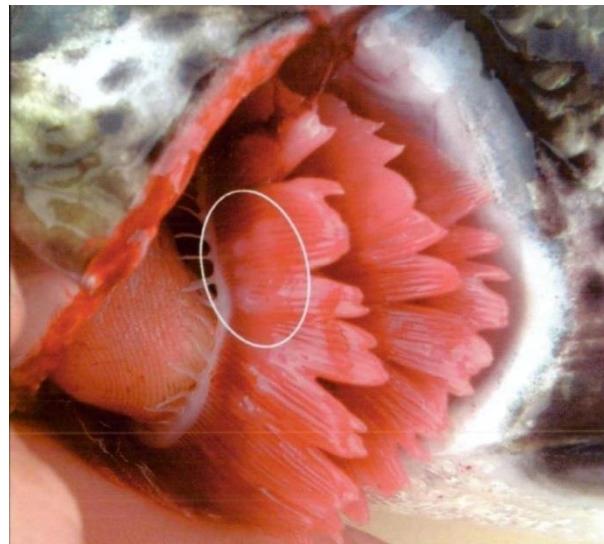


Figura 3. Las manchas blancas mucoides (rodeadas) son una lesión típica de la AGD. (Adams, 2003)

Histológicamente, en relación a las zonas de hiperplasia, se observa una pérdida de “células de cloruro” (que intervienen en la osmorregulación), y un aumento de células productoras de mucus (Roubal *et. al.* 1989). En estas zonas, también son visibles leucocitos, asociados a filamentos de tejido conectivo y vascular (Roubal *et. al.* 1989).

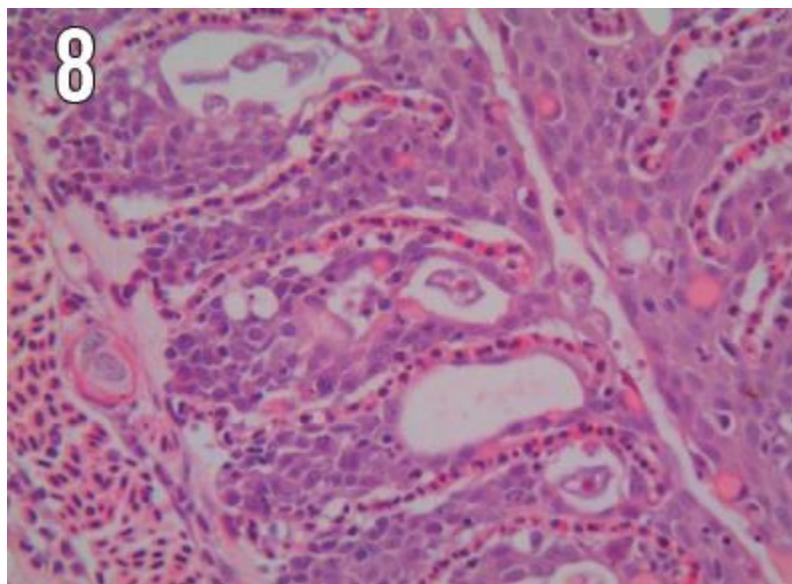


Figura 4. Hiperplasia epitelial interlamelar con formación de vesículas en cuyo interior se observa la presencia de *N. perurans*. (Tinción H&E). (Sandoval & Paredes, 2014)

A partir de la observación macroscópica de las branquias de una muestra de peces, buscando las lesiones características de la AGD, se ha establecido un sistema de puntuación del grado de afección de éstas, que sirve como indicador rápido y barato del nivel de severidad de la enfermedad que se presenta en la explotación. Esta escala puede usarse para definir las

estrategias de tratamiento a seguir, así como realizar un seguimiento de éste; comprobar si la prevención está siendo efectiva; o estimar qué mortalidad se espera si se deja a los animales sin tratar. La escala tiene valores de 1 a 5; en una explotación piscícola con una buena monitorización sanitaria, los valores detectados en los animales no deberían ser superiores a 3, aunque en ese valor las funciones fisiológicas ya se encuentran alteradas. Este método de vigilancia de la AGD presenta el problema de la subjetividad de los observadores en su valoración, así como la selección de una muestra representativa de animales (Adams *et al.*, 2004).

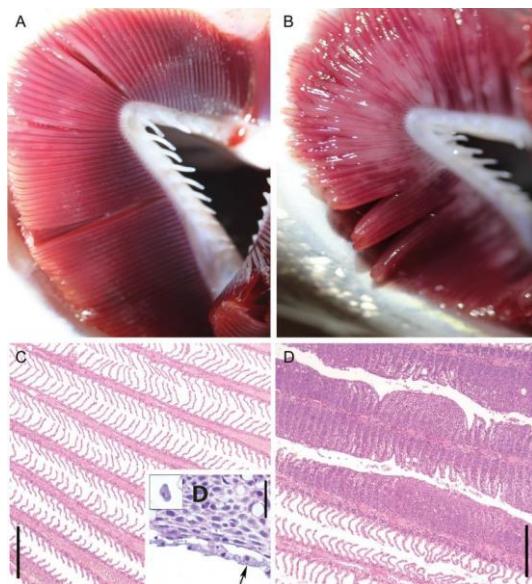


Figura 5. Fotografía representativa de un arco branquial normal (A) y uno infectado por *N. perurans*, con valores 1 y 5, respectivamente. Histología representativa de branquias normales (C) y branquias afectadas por *N. perurans* (D). Los filamentos afectados presentan hiperplasia interlamelar; la ameba se encuentra asociada a la parte

5.1.4 Consecuencias económicas

La producción de salmón atlántico es la más afectada por la AGD, pero también es la industria acuícola de agua salada que más valor genera, produciendo 1.711.455 de toneladas de pescado (según datos de 2011), que se han valorado en 9.628.336 x 1.000 USD. Noruega es actualmente el principal productor, poseyendo el 61,93% de la producción (FAO, 2011). Esta elevada potencia económica de la industria productora de salmón atlántico hace que las enfermedades, entre las que la AGD tiene gran importancia, causen grandes pérdidas de recursos, y su prevención y control sea una prioridad en el sector, y, por otra parte, que el salmón atlántico sea la especie en la que la AGD haya sido más estudiada.

La AGD se ha convertido en un problema sanitario de primer orden en la producción de salmón debido a las pérdidas que genera, tanto por sí misma como las derivadas por prevención y control de la enfermedad. Por ejemplo, se ha estimado que, en el cultivo de salmón en Tasmania, la AGD aumenta el coste de la producción en un 20%, debido al descenso de crecimiento de los animales, las bajas y el coste de los tratamientos (Kube *et al.*, 2012). En

la industria de la acuacultura del salmón en Europa, esta enfermedad también se está convirtiendo en una preocupación de primer orden (Rodger, 2014).

En el caso del cultivo de salmón atlántico en Tasmania, la mortalidad debida a la AGD puede alcanzar el 10% a la semana en smolts infectados, 2-4% semanal en la fase de 1-2kg y 1-2% a la semana en peces por encima de los 2kg (Foster & Percival, 1988). La mortalidad es variable, pero puede alcanzar el 2% diario, y hasta el 5% diario en jaulas sin tratar.

A modo de ejemplos de las pérdidas que puede llegar a ocasionar la AGD; en brotes que duraron 7-12 semanas en cuatro explotaciones de salmón atlántico en Noruega en 2006, teniendo mortalidades de 12-20% tres de ellas y del 80% la cuarta; y basándose en su nivel de producción y el precio de 3 USD el kg de salmón atlántico noruego ese año, las pérdidas se estiman en 12-55M USD (Steinum *et al.*, 2008). En Escocia, la primera pérdida de salmón atlántico debido a la AGD reportada fue en octubre de 2011, con 279.000 peces muertos (Vass, 2013). Desde entonces, las mortalidades típicas en Escocia son del 10-20%, aunque alcanzan el 70% en algunas zonas (Marine Scotland, 2012); lo que supone unas pérdidas estimadas de 48M USD (Vass, 2013).

5.2 Estrategias de prevención

5.2.1 Prevención inmunológica

Hasta ahora no se ha encontrado ninguna evidencia de que exista una respuesta inmune efectiva innata (Bridle *et al.*, 2006a, b) o adquirida (Findlay and Munday, 1998) a la AGD. Esto puede deberse a la capacidad de *N. perurans* para evadir la respuesta inmune del hospedador (Young *et al.*, 2008). Sin embargo, sí que se ha detectado una resistencia de los animales que han superado la enfermedad a posteriores reinfecciones (Munday *et al.*, 1990). Este hecho es lo que sugiere que la vacunación y el uso de inmunoestimulantes pueden ser estrategias exitosas para prevenir la aparición de brotes de AGD y para su control (Nowak, 2012).

No se sabe si lo que inicia la respuesta inmune del hospedador es el contacto de la ameba con el epitelio branquial, la unión del parásito a las mucinas del pez o alguna sustancia secretada por la ameba (Nowak *et al.*, 2013). Esta respuesta tiene un componente de anticuerpos contra *N. perurans* que es, a su vez, de dos tipos: sistémica (Vincent *et al.*, 2008, 2009) y mucosa (Villavedra *et al.*, 2010), aunque no hay evidencias de que estos anticuerpos tengan efectividad en la protección (Vincent *et al.*, 2009;). Los eosinófilos son las células infiltrativas principales en la AGD (Lovy *et al.*, 2007), mientras que los linfocitos T y B se encuentran en bajo número en las lesiones (Gross, 2007).

Mediante el estudio de infectados por primera vez, se ha demostrado una regulación al alza de varios marcadores de células inmunes, como MHC-I, MHC-II, IgM, IgT, TCR, CD4 y CD8 en la periferia del epitelio branquial hiperplásico por la AGD, a los 10 días post-infección (Pennacchi *et al.*, 2014). Respecto a la transcripción de la respuesta inmune en las branquias de salmones afectados por AGD, se ha detectado un aumento en la transcripción de IgM; y, concretamente, un aumento de la expresión de IgM en branquias afectadas con lesiones de AGD, pero no en las que no presentan lesiones, aunque estuvieran afectadas por la enfermedad (Valdenegro-Vega *et al.*, 2015). Según este mismo estudio, después de cuatro infecciones experimentales con *N. perurans*, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgM en plasma o en el mucus de la piel. En otros genes relacionados con la

respuesta inmune, como IgT, TCR y CD8, no se han detectado cambios en la expresión en AGD (Valdenegro-Vega *et al.*, 2015).

Durante la fase marina de la producción del salmón atlántico, los animales están expuestos a múltiples reinfecciones por *N. perurans*. Estudiando dichas reinfecciones, el único gen marcador de inflamación que muestra una regulación al alza es la citocina IL-1 β , en las branquias con lesiones de AGD (Pennacchi *et al.*, 2016). Esto puede explicar la hiperplasia de células productoras de mucus y el aumento de producción de mucus, ya que estas células, equivalentes a las células caliciformes de los mamíferos, expresan la citocina IL-1 β (Bridle *et al.*, 2006b). Hay evidencias de un debilitamiento de la expresión de la respuesta inmune en estadios tardíos de la infección (Morrison *et al.*, 2006a,b); sin embargo, los intentos de estimular la respuesta inmune han tenido poco éxito, y los inmunoestimulantes y vacunas experimentales hasta ahora han tenido poco efecto en la supervivencia de los animales que padecen AGD. Respecto a los inmunoestimulantes, se han conseguido de forma experimental, por ejemplo, un aumento de la protección en un 38% (Bridle *et al.*, 2003), o un aumento de la supervivencia del 27% (Dick, 2012). En lo relativo a las vacunas (aplicadas en baño, intraperitoneal, por intubación anal o intramuscular), no se ha conseguido un aumento de la protección de los animales vacunados, habiéndose hecho intentos con antígenos de DNA (Cook *et al.*, 2008), con amebas vivas y con amebas desactivadas por ultrasonidos (Zilberg & Munday, 2001).

Sin embargo, sí que hay resultados prometedores respecto a dietas protectoras. La dieta comercial Protec Gill, desarrollada por Skretting Aquaculture Research Centre ha demostrado eficacia en distintos parámetros *in vitro* e *in vivo*, incluyendo la disminución significativa de la mortalidad (Nexus, 2015). Esta dieta funciona gracias a una combinación de ingredientes funcionales que ejercen influencia sobre las propiedades inherentes del mucus branquial. La administración debe hacerse de forma preventiva, es decir, antes de que aparezcan signos de la enfermedad.

Hay una resistencia aparente de los animales que han sobrevivido a la AGD o que han tenido infecciones subclínicas que favorece que puedan recuperarse de posteriores reinfecciones (Munday *et al.*, 1990). Se ha intentado relacionar esta “resistencia” a anticuerpos sistémicos o mucoides (Findlay *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 2004), pero, como se ha mencionado anteriormente, no hay evidencias de que los anticuerpos proporcionen una protección eficaz frente a *N. perurans*, y varios estudios parecen confirmar este hecho (Gross *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2010). Identificar un anticuerpo efectivo frente a AGD es un asunto central en el desarrollo de una vacuna eficaz (Vincent *et al.*, 2006). Se especula que esta falta de efectividad puede deberse a que los anticuerpos son incapaces de actuar en un ambiente de alta osmolaridad como es el de las branquias (Gross *et al.*, 2004), pero esta teoría no ha sido totalmente confirmada.

Hay evidencias de que la colonización de *N. perurans* está mediada por lectinas, que se unen a glicoconjungados específicos del hospedador (Vincent, 2008). Si esto se demostrara, se podrían desarrollar vacunas que actuaran sobre ese proceso de unión.

5.2.2 Selección genética

La selección genética para la resistencia a enfermedades es una herramienta muy utilizada en la ganadería e igualmente tiene utilidad en la piscicultura del salmón atlántico. De hecho, existen programas de selección bien establecidos en la cría de salmón atlántico aplicados a la resistencia a algunas enfermedades, como la furunculosis, o la enfermedad bacteriana renal (Gjedrem & Gjoen, 1995).

Como se ha desarrollado en el apartado anterior, se han establecido dos tipos de resistencia bien diferenciadas, en el salmón atlántico, frente a la AGD. La resistencia a la primoinfección y la resistencia a la reinfección, que no parecen tener relación con el título de anticuerpos anti-*N. perurans*, sino más bien un fenómeno multifactorial (Taylor *et al.*, 2010). Este segundo tipo de resistencia ha demostrado tener una mayor heredabilidad y valor económico, por lo que ya está siendo incorporado en programas de selección de salmón atlántico en algunos países (Kube *et al.*, 2012).

Para poder hacer predicciones sobre la resistencia a la AGD que se puede obtener mediante selección, es necesario estimar la heredabilidad de ésta, es decir, qué proporción de la variabilidad observada corresponde a la genética. A su vez, para determinar esta magnitud, es necesario seleccionar el carácter concreto de la resistencia a la enfermedad cuya heredabilidad se va a medir. Algunas propuestas de caracteres medibles son a saber: la escala de puntuación de las branquias por un observador (mencionado ya en el apartado cuadro-clínico), la puntuación de las branquias por imagen (mediante software que analiza imágenes de branquias afectadas y las interpreta contabilizando las lesiones), y la histopatología (Taylor *et al.*, 2007). Según este mismo estudio, la puntuación de las branquias por imagen y la histopatología tienen unas heredabilidades mayores ($H^2=0,35$ y $H^2=0,30$; respectivamente), pero son métodos destructivos y costosos en tiempo y dinero; mientras que la escala de puntuación de las branquias tiene una heredabilidad bastante inferior ($H^2=0,16$). Sin embargo, este último método es mucho más rápido y barato de aplicar y no es destructivo; la heredabilidad, en este caso, aunque es más baja, es suficiente para un sistema de cruzamientos selectivos adecuado (Taylor *et al.*, 2007).

El tiempo necesario para desarrollar esta inmunidad adaptativa es corto, habiéndose detectado un aumento de la inmunidad con una distancia de 50 días entre la primera infección y la segunda. Sin embargo, no hay un aumento de inmunidad entre la segunda infección y las siguientes (Kube *et al.*, 2012).

Con este sistema de cruzamiento, se estima que se puede aumentar el intervalo entre baños de agua dulce (tratamiento del que más adelante se hablará en profundidad) un 3% al año (Elliott & Kube, 2009). Otro factor que hay que tener en cuenta a la hora de tomar decisiones en las estrategias de selección es la correlación genética entre la resistencia a la AGD y el índice de crecimiento. Esta correlación se ha medido como significativa y favorable, pero estos datos probablemente están sesgados por el efecto negativo que supone la enfermedad sobre

el crecimiento. Los datos parecen indicar que la correlación genética entre ambos caracteres en un entorno libre de AGD sería cercana a cero (Kube *et al.*, 2012), lo cual no es perjudicial para la selección.

Una limitación importante para medir las ganancias genéticas es que no se puede medir la resistencia a AGD de forma directa en los reproductores por razones de bioseguridad (Kube *et al.*, 2012). Por tanto, el uso de métodos de selección moleculares podría tener un gran potencial para aumentar las ganancias genéticas (teóricamente podría doblarlas); y se ha mostrado que el uso de dichas tecnologías reportaría beneficios técnicos y económicos aunque las ganancias obtenidas fueran inferiores a las teóricas (Dominik *et al.*, 2010). Esta alta tasa de beneficios se debe a que el beneficio de un programa de selección genómica se determina por el valor de los reproductores, que a su vez depende de los valores reproductivos de éstos y del valor del carácter que se selecciona, el cual influencia el valor de la descendencia. En un carácter que tiene tanto impacto económico como la resistencia a la AGD, la mejora genética rápida por selección genómica reporta un elevado beneficio (Dominik *et al.*, 2010). Sin embargo, uno de los problemas de este sistema es la baja cantidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) útiles que se han encontrado en el chip del salmón atlántico (20% frente al 99,6% de SNPs que se han llegado a utilizar en el ganado bovino), y que son la base de la selección genómica, ya que señalan las regiones asociadas a caracteres de interés (Dominik *et al.*, 2010). Este porcentaje sigue siendo útil para estimar valores genéticos moleculares (MBVs), pero sería necesario aumentarlo para mejorar la aplicabilidad del sistema. En los próximos años es muy posible que se encuentren nuevos SNPs, como parte del proyecto de secuenciación del salmón, ya que el bajo porcentaje se debe en gran parte al escaso tamaño de la muestra estudiada hasta ahora (Genome British Columbia, 2009).

En la acuicultura es común el uso de hibridación inter-específica para mejorar caracteres productivos, obtener resistencia a enfermedades o controlar la maduración (Bartley *et al.*, 2001). En el caso del salmón atlántico, el híbrido más estudiado es salmón atlántico x trucha común (*Salmo trutta*), debido a su alta viabilidad (Galbreath & Thorgaard, 1997). Además, la trucha común tiene una elevada resistencia varios parásitos externos respecto a los demás salmonídeos (Moody & Gaten, 1982). Respecto a la AGD, se ha reportado una mayor resistencia de los híbridos, tanto salmón atlántico ♀ x trucha común ♂ como trucha común ♀ x salmón atlántico ♂; mostrando estos últimos unas tasas de supervivencia y crecimiento mejores (comparable el crecimiento con el del salmón atlántico) (Maynard *et al.*, 2016). En el mismo estudio se comprobó que en un periodo de 177 días, ambos híbridos sólo necesitaron un baño de agua dulce, mientras que los salmones atlánticos necesitaron cuatro. Sin embargo, aún es necesario explorar otros caracteres de los híbridos y sus implicaciones comerciales para aplicar la hibridación a gran escala. Otro sistema que es comúnmente usado en la producción de salmón atlántico, y en otras especies piscícolas, es la formación de individuos triploides para maximizar su crecimiento y ejercer un control reproductivo. Pero respecto a la AGD, no se han encontrado ventajas en los peces triploides frente a los diploides, ni al revés (Chalmers *et al.*, 2017).

5.2.3 Control de la densidad

Los factores que hacen que *N. perurans*, que habitualmente tiene una forma de vida libre en el medio, se convierta en parásito se comprenden hoy en día de forma incompleta, pero están relacionados con condiciones ambientales adversas y su impacto en el hospedador (Nowak *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que una mayor densidad de animales resulta en un comienzo más temprano de la morbilidad, y un porcentaje de morbilidad total mayor al final del brote de AGD (Crosbie *et al.*, 2010). Esta observación puede deberse a varios factores. Además de un aumento de la transmisión horizontal, debido a la mayor proximidad entre los animales sanos y los infectados; la mayor densidad de peces afecta a la dinámica del agua en los tanques, aumentando la mezcla de ésta con la biomasa (Lunger *et al.*, 2006), lo que a su vez aumenta la probabilidad de que las amebas patógenas entren en contacto con las branquias de los peces. Las consecuencias indirectas que pueda tener una alta densidad de cría respecto a la severidad de la AGD, como las que podrían derivarse de un empobrecimiento de la calidad del agua por un aumento de nitratos y amoníaco ionizado, producto de esta alta densidad, aún no han sido estudiados (Crosbie *et al.*, 2010).

Otra estrategia que se ha estudiado es la rotación de las jaulas flotantes en las que se crían los peces. Las jaulas son remolcadas con los animales dentro hacia zonas en barbecho (Douglas-Helders *et al.*, 2004). Con este sistema se consigue un aumento en el periodo necesario entre baños de agua dulce (los cuales implican un gasto económico importante) debido a un descenso de la prevalencia de AGD, y, a su vez, se logra un mayor crecimiento de los peces (Douglas-Helders *et al.*, 2004). Según este mismo estudio, esta bajada de la prevalencia en las jaulas que son rotadas puede deberse a una menor abundancia de *Neoparamoeba*, ya que en las zonas en barbecho hay una menor cantidad de sedimentos en el medio acuático, en los que puedan habitar los parásitos, debido a la falta de peces enfermos (Crosbie *et al.*, 2003). La duración del transporte de las jaulas no parece tener relevancia, por lo que parece que los resultados de menor prevalencia observados se deben a su instalación en zonas en barbecho (Douglas-Helders *et al.*, 2004).

El conocimiento de las distribuciones espacio-temporales de los salmones atlánticos y de los parásitos en las jaulas ha servido para desarrollar estrategias preventivas frente a algunos de ellos, como *Lepeophtheirus salmonis*, el piojo del salmón (Dempster *et al.*, 2009). En condiciones de heterogeneidad en la jaula, los salmones atlánticos tienden a nadar en franjas concretas de profundidad, dirigidos sobre todo por termo y foto-regulación (Oppedal *et al.*, 2007). Si los peces están hambrientos, suelen concentrarse en las zonas donde el alimento es dispensado, normalmente en la superficie (Oppedal *et al.*, 2011). Los animales tienden a ocupar las aguas superficiales durante la noche y moverse a zonas más profundas durante el día (Oppedal *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2017). En periodos de estatificación térmica, los peces prefieren nadar a profundidades a las que haya temperaturas más cercanas a su temperatura de confort (16–18°C) (Johansson *et al.*, 2006), sin importar el fotoperiodo (Oppedal *et al.*, 2007). Respecto a *N. perurans*, no se han detectado patrones en su presencia respecto a la profundidad (Wright *et al.*, 2017). Sin embargo, sí se ha detectado una falta de presencia de células de *N. perurans* en las aguas superficiales tras épocas de fuertes lluvias (Wright *et al.*, 2015, 2017). Esta tendencia puede deberse a la escasa salinidad del agua producida por las

precipitaciones (Wright *et al.*, 2017), ya que, en estas condiciones adversas para las amebas, éstas adoptan una forma vacuolar (Lima *et al.*, 2016), que al ser más densas que el agua de baja salinidad que las rodea, tienden a hundirse por debajo de las capas de agua superficiales (Wright *et al.*, 2017). El hecho de que *N. perurans* sea ubicua de todas las profundidades de las jaulas significa que no se puede diseñar una estrategia preventiva basada en excluir a los animales de ciertas capas (Wright *et al.*, 2017), como sí se hace con *Lepeophtheirus salmonis* (Dempster *et al.*, 2009). Por otro lado, el conocimiento de las tendencias de los salmones atlánticos a nadar en determinadas capas de profundidad en base a factores extrínsecos e intrínsecos, sí puede derivar en sistemas para evitar la concentración extrema de animales a la que son propensos; lo cual dificultaría el avance de la AGD durante un brote y mejoraría el bienestar animal (Wright *et al.*, 2017), así como mantener a los animales en zonas de baja salinidad, lo que puede ayudar a eliminar a *N. perurans* y a otros ectoparásitos sensibles (Bricknell *et al.*, 2006; Parsons *et al.*, 2001); es decir, como un método de control de la enfermedad. Uno de los sistemas utilizados para esto, con un enfoque comportamental, es la colocación de luces distribuidas de forma vertical, ya que los salmones atlánticos siguen de forma instantánea los movimientos verticales de luz durante la noche, siempre que la temperatura del agua sea adecuada (Wright *et al.*, 2015b).

5.2.4 Control de reservorios

N. perurans es un agente ubicuitario del medio marino, encontrándose en altas concentraciones en una amplia variedad de hábitats, desde el océano abierto hasta los estuarios costeros (Rogerson & Laybourn-Parry, 1992). Algunos reservorios de *N. perurans* que se han propuesto son: peces muertos infectados con AGD (Douglas-Helders *et al.*, 2000), las redes de las jaulas marinas (Roubal *et al.*, 1989), la bioincrustación en las redes y en el sedimento (Tan *et al.*, 2002), la columna de agua (Elliott *et al.*, 2001) y los sedimentos (Cann & Page, 1982). Para desarrollar programas de gestión de riesgos en la enfermedad de la AGD, es necesario determinar los reservorios, así como los procesos de transmisión e infección (Douglas-Helders *et al.*, 2002).

La unión a distintos sustratos es una condición importante para el crecimiento de la población de *N. perurans* (Martin, 1985). Este sustrato no debe ser una superficie inerte, como la superficie del tanque o la jaula, o la concha de animales; si no superficies donde las amebas puedan encontrar alimento, como las branquias de los peces, pero también los biofiltros presentes en sistemas acuícolas de tanques con recirculación de agua, en los que proliferan bacterias aerobias nitrificantes que eliminan los compuestos nitrogenados (González, 2016). Por otro lado, en estos sistemas con recirculación, hay unidades de esterilización mediante radiación UV, que, sin embargo, no han demostrado afectar a la viabilidad de *N. perurans* (González, 2016), por lo que no son, por sí solos, un método eficaz para prevenir brotes de AGD.

Los crustáceos parásitarios del salmón atlántico podrían tener un papel como reservorio y vector de la AGD, ya que sus formas larvarias (posiblemente infectadas con el agente) suelen viajar de un pez afectado a otro para infestarlo. *N. perurans* ha sido detectada asociada al isópodo parásitario *Ceratothoa banksii*, que infesta las branquias de los salmones atlánticos, así como la cavidad bucal. La ameba se ha encontrado tanto en su superficie como en el

interior (menos frecuente), pero no se ha hallado relación entre la presencia de la ameba en el isópodo y el estatus de AGD en la población de salmones, siendo las amebas generalmente escasas en los crustáceos, y encontrándose a veces en isópodos y no en los peces (González, 2015). Esto indica que los ectoparásitos del salmón no son reservorios significativos para la infección (Oldham *et al.*, 2016).

Por otra parte, los baños químicos que se dan a los peces afectados por piojo de mar (calígidos), si se aplican con excesiva frecuencia, les causan un gran estrés y pueden favorecer la aparición de AGD y otras enfermedades. Estos baños pueden, además, disparar la mortalidad en peces que tienen el epitelio branquial dañado por AGD, por lo que no se recomienda tratar el piojo de mar en peces afectados por la enfermedad amebiana (González, 2015).

Durante la cría del salmón atlántico en jaulas, es frecuente que algunas especies silvestres queden atrapadas en ellas (Adams *et al.*, 2008). La probabilidad de que un patógeno se transmita de una especie de pez a otra con la que convive en el mismo cuerpo de agua depende de la especificidad del agente (Hammell, 1999), de la susceptibilidad del hospedador y de factores ambientales que influyen en la cantidad de patógeno y en su movimiento y supervivencia en el medio marino (Bakke & Harris, 1998). Hasta ahora, no se han encontrado evidencias de que los peces silvestres sean reservorios de *N. perurans* (Oldham *et al.*, 2016). En un estudio, realizado por Douglas-Helders *et al.* (2002), en el que se analizaron las branquias de 325 peces silvestres de 12 especies distintas capturados en aguas cercanas a las explotaciones de salmón atlántico y a zonas control, a más de 10km de cualquier explotación salmonícola, no se detectó en ninguna muestra la presencia de *N. perurans*, ni lesiones relacionadas con la enfermedad. En otro estudio, que examinó las branquias de 2969 peces silvestres, de los cuales 742 fueron capturados en zonas cercanas a explotaciones de salmón, tampoco se encontró ninguna evidencia de AGD (Kent *et al.*, 1998) y posteriormente, Stagg *et al* (2015) solamente detectaron la presencia de *N. perurans*, en una única muestra (sobre una muestra de 2348 peces), procedente de una caballa (*Trachurus trachurus*). En el caso concreto de la cría de salmón atlántico en Tasmania, la única especie silvestre endémica que se ha demostrado susceptible a la AGD es *Seriola brama*, cuya importancia como reservorio está aún por determinar (Adams *et al.*, 2008). Estas evidencias indican que los peces silvestres no son un reservorio significativo de *N. perurans*.

La maragota (*Labrus bergylta*) es un lábrido que se utiliza como pez limpiador en la cría de salmón atlántico para el control del piojo de mar (Kvenseth, 1996). Estudiando una población de maragotas criadas para este fin, se observó una mortalidad moderada en relación con el desove. Si bien el propio desove fue la principal causa de mortalidad entre las hembras, también se observaron machos moribundos que presentaban lesiones típicas de AGD y en los que más tarde se detectó la presencia de *N. perurans*, incluso en individuos clínicamente sanos (Karlsbakk *et al.*, 2013). La fuente de las amebas en los tanques estudiados fue posiblemente la propia población de maragotas, de origen silvestre, que habían sido capturadas 2-3 años antes, lo que sugiere que la infección abría persistido en el tanque durante años. Otra posible fuente es el agua que entra al tanque, ya que es filtrada a 20 µm, lo que no excluye a *N. perurans*. Dado que la maragota es utilizada a menudo como pez limpiador en explotaciones salmonícolas, las poblaciones de origen silvestre introducidas podrían ser una

fuente de AGD, y podrían dificultar el control de la enfermedad, actuando como portadores (Karlsbakk *et al.*, 2013).

Si bien *N. perurans* es una ameba de vida libre y, por tanto, se puede encontrar presente en la columna de agua (Bridle *et al.*, 2010), las concentraciones en las que aparece son muy bajas (13 ± 7 células/L), en comparación con las más de 1000 células/hisopo encontradas en los peces afectados por AGD (González, 2015). Esto parece indicar dos cosas: que el agua no es un reservorio importante, aunque puede actuar como transmisor entre individuos afectados, pero no entre explotaciones afectadas; y que el principal reservorio de la ameba patógena es el salmón (González, 2015). Como se ha indicado anteriormente, *N. perurans* necesita de un sustrato para que su población aumente, por lo que en el agua se encuentra en una forma “latente” hasta que coloniza un epitelio branquial o un biofilm (Martin, 1985), donde se reproduce. Por otro lado, los bioagregados que se encuentran en suspensión en el agua sí pueden facilitar la transmisión y reproducción de la ameba (Tan *et al.*, 2002).

Douglas-Helders *et al.* (2000), demostraron en un estudio que *N. perurans* no sólo puede perdurar en salmones muertos si no también reproducirse en ellos, lo que indica que los animales muertos por AGD son un reservorio importante de la enfermedad. El mismo estudio también sugiere que las amebas pueden colonizar peces muertos no infectados. Estos resultados indican que la retirada rápida de cadáveres es una medida esencial en la bioseguridad de las instalaciones que reduce la cantidad de amebas totales en las jaulas y limita la severidad de los brotes.

La bioinrustación es el conjunto de flora y fauna formado por el sucesivo crecimiento de organismos en superficies sólidas (Tan *et al.*, 2002). Se ha especulado que éste podría actuar como reservorio de AGD (Alexander, 1991). Este proceso de crecimiento comienza con la microinrustación con la que se forma una película de microorganismos de distinta naturaleza en la superficie (Corpe, 1976; Dempsey, 1981a,b; Hodson & Burke, 1994). Entre los micoorganismos se encuentran un gran número de protozoos (Hodson & Burke, 1994), entre los que podría encontrarse *N. perurans*. Efectivamente, en las redes de las jaulas con bioinrustación se ha detectado *N. pemaquidensis* (Tan *et al.*, 2002), que, actualmente, se sabe que no es el agente causal de la AGD, pero este hallazgo indica que también es posible que la bioinrustación pueda constituir un reservorio de *N. perurans*. De hecho, se ha encontrado una relación negativa significativa entre el número de veces que las redes de las jaulas son cambiadas y la prevalencia de AGD (Clark & Nowak, 1999). Sin embargo, no es logísticamente posible cambiar las redes con la suficiente frecuencia para evitar la formación de bioinrustaciones (Tan *et al.*, 2002). Por otro lado, la proliferación de protozoos en un biofilm ocurre después de que se hayan establecido bacterias y diatomeas, lo que sucede 2-3 semanas post-inmersión (Cundell & Mitchell, 1977; Hodson & Burke, 1994); y la dosis infectiva de la AGD es de 230 células/L (Zilberg *et al.*, 2001), por lo que parece que se necesita un estadio muy avanzado de bioinrustación para que las amebas allí presentes puedan llegar a causar la enfermedad en los peces por sí solas, aunque la bioinrustación sea un reservorio importante y contribuya a la propagación y persistencia de la AGD (Tan *et al.*, 2002).

A pesar de que las redes son tratadas para evitar su colonización, las bacterias que se instalan en ellas inicialmente producen una capa de polisacáridos que las protege (Marszalek *et al.*, 1979), junto a los organismos que se asientan después. Para reducir la microinrustación

existen pinturas anti-incrustación (Balls, 1987; Hodson & Burke, 1994), que liberan biocidas en el agua circundante (Balls, 1987). Sin embargo, este sistema puede tener el efecto desfavorable de potenciar el crecimiento de organismos resistentes a la pintura, creando un ambiente no competitivo para ellos (Dempsey, 1981). En un experimento llevado a cabo por Douglas-Helders *et al.* (2003), se midió la prevalencia de *N. pemaquidensis* en relación al uso de pintura anti-incrustación elaborada a base de cobre. Se observó que en las redes tratadas con este producto había una prevalencia mayor de la ameba. A pesar de este resultado negativo, el uso de pinturas anti-incrustación puede ser una línea de investigación interesante para reducir la carga de patógenos en las jaulas de producción.

Los microorganismos que forman la bioincrustación tienen también una gran afinidad por las superficies de animales invertebrados (Carman & Dobbs, 1997), por lo que éstos también podrían actuar como reservorio. Además, muchos invertebrados son filtradores y, en consecuencia, podrían ingerir e incorporar *N. perurans* (Ruppert & Barnes, 1994), aunque la ingestión de patógenos no implica que el organismo sea viable (Paclibare *et al.*, 1994).

5.3 Estrategias de control

5.3.1 Baños de agua dulce

Los baños de agua dulce son la estrategia de control de los brotes de AGD más utilizada actualmente y hay una tendencia a aumentarlos, dado que la frecuencia con la que se aplican en los meses de verano ha aumentado y, a su vez, se ha extendido su uso a otras épocas el año (Parsons *et al.*, 2001).

En el tratamiento, los peces son sometidos a baños de agua dulce en un barco durante 2-6 horas (Munday, 1988; Clark & Nowak, 1999), al que son transferidos desde sus jaulas mediante una bomba para peces (Parsons *et al.*, 2001). Posteriormente, son devueltos al agua salada (Parsons *et al.*, 2001). Los baños de agua dulce, además de reducir el número de amebas, también reducen drásticamente las lesiones branquiales, así como el exceso de mucus y la hipernatremia o deshidratación que haya podido causar la AGD (Zilberg & Munday, 2006). Estos baños, además, no causan efectos adversos en los animales (Powell *et al.*, 2001). Las amebas que sobreviven, muchas de ellas en forma de quistes en las lesiones branquiales, lo que indica que el tejido del hospedador las protege de los baños, pueden actuar como fuente de reinfección (Parsons *et al.*, 2001). La reducción de la población de amebas tras 3 horas de baño suele ser del 85-90% (Clark *et al.*, 2003).

En un estudio (Clark & Nowak, 1999) en el que se medía la eficacia de los sucesivos baños de agua dulce aplicados a lo largo del año en distintas explotaciones, se observó que, mientras que el primer baño era efectivo frente a la AGD sólo durante tres semanas, el segundo baño y los siguientes tenían un efecto más prolongado en la prevalencia de las lesiones típicas de la enfermedad. Este aumento de la efectividad del tratamiento a partir del segundo baño probablemente se debe a la estimulación de la respuesta inmune no-específica (Findlay *et al.*, 1995).

Las principales desventajas de este tratamiento son el aumento importante de trabajo que conlleva, el estrés causado a los animales, y la necesidad de grandes cantidades de agua dulce (Howard & Carson, 1991) que a veces no están disponibles y es necesario comprarla de suministros municipales y transportarla hasta la explotación. Es, en resumen, un tratamiento

muy costoso y reducir su frecuencia implica reducir las pérdidas relacionadas con la AGD. Desde que los brotes de AGD fueron reportados por primera vez, en Tasmania, la frecuencia de baños de agua dulce para tratar la enfermedad ha ido aumentando, primero, durante los meses de verano, y se ha ido extendiendo al resto del año (Parsons *et al.*, 2001). Dado que los baños de agua dulce mitigan la enfermedad pero no eliminan completamente al patógeno, es necesario repetirlos varias veces a lo largo del año (González, 2015). Este aumento en la frecuencia de los baños, aumenta la presión de selección de amebas resistentes al agua dulce, y esto se agudiza si se usan aguas de elevada dureza y si los baños son de duración insuficiente (menos de 3h), como es frecuente en la práctica (Powell & Clark, 2003). Por tanto, la aparición de amebas resistentes al agua dulce podría convertirse en un problema a largo plazo. También es algo a tener en cuenta, que la dependencia para la producción de fuentes de agua dulce limita la expansión de ésta a zonas de mar abierto (Adams *et al.*, 2012).

Se ha propuesto utilizar los baños de agua dulce antes de que aparezca la enfermedad, de forma profiláctica. Sin embargo, se ha demostrado que esta práctica no reporta ventajas sobre la prevalencia de la AGD ni sobre el periodo entre baños necesario; y, además, se ha visto que los peces que reciben este tratamiento preventivo presentan una tendencia a una menor ganancia de peso. Todo esto significa que no es una estrategia de prevención útil (Douglas-Helders *et al.*, 2004).

Los baños de agua dulce también tienen eficacia reduciendo el número crustáceos parásitarios que infestan a los peces, y que pueden actuar como vector de *N. perurans*, o favorecer la infección por los daños que ocasionan (González, 2015).

El agua dulce en la que son introducidos los peces tiene, al menos inicialmente, una saturación de oxígeno del 200%, y la densidad a la que éstos pueden ser mantenidos en el agua es de hasta 40 kg m⁻³ (Parsons *et al.*, 2001). Se han hecho experimentos sobre variaciones en la composición del agua dulce para incrementar la eficacia de los baños. Así, por ejemplo, Powell & Clark (2003) investigaron sobre los cationes divalentes y observaron que la supervivencia de las amebas era mayor en aguas con Ca^{2+} y Mg^{2+} que en aguas desionizadas. Este aumento de la supervivencia podría deberse a que en un medio rico en cationes, aumenta el potencial de membrana de la ameba (Bruce & Marshall, 1965; Martin, 1987), lo que facilita su paso a la forma vacuolar, en la que es más resistente (Powell & Clark, 2003). Un estudio posterior (Roberts & Powell, 2003), demuestra, en esta línea, que las aguas de menor dureza (19.3–37.4 mg L⁻¹ CaCO₃) tienen mayor eficacia aliviando los signos patológicos de la AGD, así como el número de amebas viables en las branquias, que las aguas de dureza mayor (173–236.3 mg L⁻¹ CaCO₃). Este aumento de la eficacia podría deberse, al menos en parte, al potencial de Donnan (Gupta, 1989), que hace que, en un medio bajo en cationes, el mucus pierda viscosidad, lo que aumentaría la exposición de las amebas al agua dulce (Roberts & Powell, 2003). Además, en este estudio, no sólo no se encontraron signos fisiológicos negativos en los peces bañados en agua dulce de menor dureza, sino que además de encontró una mayor restauración del equilibrio iónico de $[Cl^-]$ y $[K^+]$ perdido en sangre. Por tanto, esta mejora en el tratamiento con agua dulce podría reducir la frecuencia con la que es necesario aplicarlo.

5.3.2 Desinfectantes

En la industria acuícola es común el uso de desinfectantes para el tratamiento de parásitos externos, como, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno y el organofosfato para tratar

Lepioptherius salmonis y *Caligus elongatus* (Roth *et al.*, 1993), o la cloramina-T para *Ichthyophthirius multifiliis* e *Ichthyobodo necator* (Cross & Hursey, 1973). Para el caso de la AGD, estos productos están aún en fase de estudio, y algunos de ellos muestran un gran potencial comercial, ya que, además de reducir los costes que actualmente conllevan los baños de agua dulce, podrían permitir tratamientos simultáneos de AGD y otras enfermedades parasitarias.

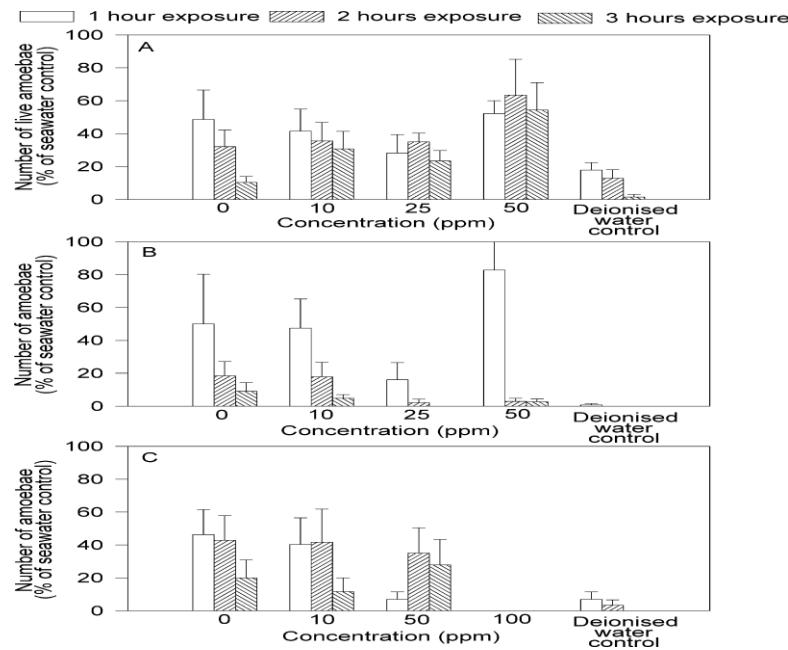


Figura 6. Efectos del dióxido de cloro (A), cloramina-T (B) y peróxido de hidrógeno (C) en la supervivencia relativa (número de amebas) en amebas aisladas de branquias *in vitro* tras 1 hora (barras lisas), 2 horas (barras con líneas de izquierda a derecha) y 3 horas (barras con líneas de derecha a izquierda). (Powell & Clark, 2003).

Un experimento de Powell & Clark (2003) estudió el efecto *in vitro* de varios desinfectantes oxidativos sobre la supervivencia de *N. pemaquidensis* aisladas de las branquias. Estos desinfectantes fueron: dióxido de cloro, cloramina-T y peróxido de hidrógeno; disueltos en agua dulce con distintos grados de dureza. Los dos últimos son los que mejores resultados dieron, eliminando a todas las amebas en 3h. En el mismo tiempo, el dióxido de cloro redujo el número de amebas, pero no eliminó a todas. Estos tratamientos funcionaron mejor en agua dulce desionizada. La efectividad de la cloramina-T se debe a que libera iones de hipoclorito (Booth & McDonald, 1988), que producen una peroxidación lipídica en la membrana plasmática, alterando su permeabilidad (Venkobacker *et al.*, 1977). El hipoclorito también irrita el epitelio branquial (Powell & Perry, 1998), lo que causa una hipersecreción de mucus que, potencialmente, puede ayudar a la eliminación de los parásitos. Por otro lado, los efectos de los desinfectantes sobre las amebas pueden verse mitigados por la presencia de mucus (Powell & Clark, 2002). Este estudio demostró que los tres desinfectantes probados, pero sobre todo la cloramina-T y el peróxido de hidrógeno, tienen un gran potencial en el tratamiento de la AGD, pero es necesario que se realicen estudios *in vivo* para sostener estos indicios (Powell & Clark, 2003).

Estudiando las toxicidades *in vivo* de los tres desinfectantes anteriores, Powell & Clark (2004), demostraron la efectividad de la cloramina-T y el dióxido de cloro añadidos a baños de agua dulce en la eliminación de amebas en salmones atlánticos enfermos de AGD; mientras que el peróxido de hidrógeno, aun siendo efectivo en este respecto, presenta un uso más limitado debido a su mayor toxicidad para los animales. La toxicidad de estos compuestos se debe al aumento de permeabilidad a iones que producen en el tejido branquial, lo que causa desequilibrios iónicos en los peces. Además, se ha observado que la toxicidad aumenta con la saturación de oxígeno del agua, especialmente en el caso de la cloramina-T, agudizando el daño sobre el epitelio branquial y llegando al compromiso osmótico. También hay una fuerte correlación entre mortalidad y temperatura; observándose en las bajas en tanques con altas dosis de tratamiento daños muy severos en el epitelio branquial debidos al oxígeno y al cloro reactivos (derivados de los compuestos desinfectantes), mientras que en las bajas ocurridas en tanques con menores concentraciones de tratamiento no se vio apenas daño tisular en las branquias y la mortalidad estaba relacionada con elevaciones agudas de la temperatura durante la exposición a los químicos (Powell & Clark, 2004).

En dos experimentos en los que se añadió cloramina-T a un baño de agua dulce (Harris *et al.*, 2004; Powell & Clark, 2004) se consiguieron densidades de amebas del 50% y del 52,9% de los niveles pre-baño, respectivamente. Según Bowker & Erdahl (1998), en un experimento hecho sobre la BGD (una enfermedad bacteriana que también afecta a las branquias del salmón atlántico), la dosis de cloramina-T más efectiva es 10 mg L^{-1} . La efectividad de este desinfectante (también con datos respecto a la BGD), aumenta de forma inversa al pH y a la dureza del agua, y, a su vez, disminuye conforme aumenta la materia orgánica en el agua (Bills *et al.*, 1998b). En el experimento de Harris *et al.* (2004), en el que se trabajó con cloramina-T a concentraciones de 10 mg L^{-1} (ya que las primeramente utilizadas concentraciones de 25 mg L^{-1} causaron mortalidad en los peces), los animales tratados con el desinfectante mostraron una mayor cantidad de lesiones branquiales dos semanas tras el baño; aunque no se sabe si esto es debido a que la cloramina-T inhibe la reparación del tejido dañado por las amebas o a que, aún a concentraciones terapéuticas, daña el tejido branquial. Por otro lado, la cloramina-T no tiene efecto sobre los indicadores de estrés de los peces, como, por ejemplo, el lactato en plasma (Harris *et al.*, 2004).

Respecto al tratamiento con peróxido de hidrógeno añadido al agua marina, éste ha demostrado tener una eficacia similar respecto a los baños de agua dulce, al menos en el tratamiento de AGD de baja severidad (Adams *et al.*, 2012). También al igual que el agua dulce, la AGD puede reaparecer en animales tratados con peróxido (Hytterød *et al.*, 2017). El H_2O_2 tiene un estrecho margen de seguridad, muy influenciado por la temperatura (Thomassen, 1993), más que por la dosis (Martinsen *et al.*, 2018). El tamaño de los peces, la severidad de la AGD, el estrés y la capacidad osmorreguladora también tienen influencia sobre las mortalidades observadas en tratamientos con este producto (Cameron, 1994). El tratamiento con peróxido de hidrógeno muestra más eficacia a temperaturas bajas, aumentando el tiempo hasta que reaparece la enfermedad en varias semanas (Adams *et al.*, 2012; Martinsen *et al.*, 2018). En resumen, el H_2O_2 no cura la enfermedad pero sí retrasa su desarrollo y el crecimiento de las amebas, siendo un tratamiento interesante especialmente en aguas frías, ya que su temperatura de máxima eficacia son los 8°C (Martinsen *et al.*, 2018).

5.3.3 Levamisol

El levamisol es un inmunoestimulante de la respuesta inmune no específica (Siwicki, 1987, 1989; Findlay & Munday, 2000). Su potencial como tratamiento de la AGD radica en la resistencia de los salmones a la reinfección con *N. perurans*, debido al aumento de la respuesta inmune no específica (Findlay & Munday, 1998). El levamisol debe administrarse a la vez o después que el antígeno, ya que si se administra antes produce inmunosupresión (Anderson, 1992).

Según el estudio de Clark & Nowak (1999), en las jaulas tratadas con levamisol hay una mayor prevalencia de amebas en las branquias, pero una menor prevalencia de lesiones, en particular de las de grado 3. Esto puede indicar que el levamisol no es eficaz eliminando al parásito pero sí reduce la reacción del tejido branquial. Hay que tener en cuenta que este estudio se realizó examinando las amebas del género *Paramoeba*, que, a día de hoy, se sabe que no son el agente etiológico de la AGD, por lo que estas conclusiones podrían estar desactualizadas.

Un experimento realizado por Zilberg *et al.* (2000), estudió la eficacia del levamisol y los β -glucanos, otro estimulante de la respuesta inmune no específica en peces (Robertson *et al.*, 1990; Nikl *et al.*, 1991; Raa *et al.*, 1996), administrados de forma oral para el tratamiento de AGD. En el estudio, se observó cierta eficacia de ambos productos. Sin embargo, respecto al levamisol, ésta es menor que cuando se usa directamente en el agua (como se apreció en el experimento de Clark & Nowak, 1999); ya que de esta forma el inmunoestimulante actúa directamente sobre el tejido branquial. Respecto a los β -glucanos, no se han publicado estudios que atiendan a la eficacia de éstos aplicados en baños; pero una investigación de Findlay sin publicar parece indicar que los glucanos también serían más eficientes por esta vía (Zilberg *et al.*, 2000).

5.3.4 Extracto de ajo

El ajo (*Allium sativum*) es conocido por tener diversas propiedades medicinales, que van desde antibacterianas y antiparasitarias, hasta anticancerígenas y anticoagulantes (Harris *et al.*, 2001; Ankri & Mirelman, 2001). Las rodajas recién cortadas del bulbo son ricas en compuestos azufrados, como la alicina, el principal responsable de las propiedades medicinales del ajo (Ankri & Mirelman, 2001). Un ajo entero contiene de media un 1% de aliina, el precursor de la alicina. La alinasa es una enzima presente también en el ajo, pero compartimentada y separada de su sustrato, que, al triturar el bulbo entra en contacto con la aliina y la transforma en alicina, biológicamente activa (Langa *et al.*, 2004). Otros compuestos azufrados importantes presentes en el ajo homogeneizado son: el alil metil tiosulfonato, 1-propenil alil tiosulfonato y L-glutamil-S-alquil-L-cisteína. El aceite de ajo consta de (desde mono a hexa) sulfuros de dialilo (57%), alil metil (37%) y de dimetilo (6%). Todos los polisulfuros han mostrado efectos antioxidantes *in vitro*, pero esto se tiene que confirmar aún *in vivo* (Peyghan *et al.*, 2008).

En un estudio de Peyghan *et al.* (2008), se comprobó que el extracto de ajo fresco tiene un claro efecto anti-amebiano. La dosis que mostró mejores resultados fue 10 g L^{-1} , durante 8 horas de exposición. Hay que tener en cuenta que este estudio se realizó midiendo una población de *N. pemaquidensis* *in vitro*, por lo que para estudiar su aplicación real como

tratamiento de la AGD sería necesario realizar estudios *in vivo* sobre *N. perurans*, el verdadero agente causal de la enfermedad. Este producto tiene un amplio rango de seguridad para los peces y, además, no presenta problemas medioambientales. Por esto, la posibilidad de implementar tratamientos basados en extracto de ajo, o bien en su principio activo más importante, la alicina, ya sea solo o en combinación con otros tratamientos, es un campo de estudio interesante. En este experimento, también se examinó la eficacia frente a *N. pemaquidensis* del metronidazol, un importante producto antiparasitario. El resultado fue favorable *in vitro*, demostrando eficacia a concentraciones superiores a 100 mg L^{-1} . La toxicidad que ejerce este producto en los peces aún debe ser estudiada.

6. Conclusiones

Tras realizar esta revisión bibliográfica, y con un conocimiento más profundo sobre el tema, las conclusiones obtenidas son las siguientes:

- La amebiasis branquial es una enfermedad mundial causada por *Neoparamoeba perurans* que afecta a numerosas especies salmonícolas y no salmonícolas en la producción marina.
- La aparición de la enfermedad está condicionada por numerosos factores ambientales, algunos de ellos difícilmente controlables, como la temperatura del agua o la salinidad.
- Se ha demostrado una respuesta adaptativa de los salmones a la enfermedad que les otorga un aumento de su resistencia en el caso de reinfecciones, abriendo una vía esperanzadora en la investigación de vacunas e inmunoestimulantes, y la selección de individuos genéticamente resistentes.
- Los principales reservorios del agente son el agua, los peces infectados y muertos por la enfermedad y la bioincrustación, pero no parece que los invertebrados y los peces silvestres jueguen un papel importante como vectores.
- El tratamiento más utilizado actualmente son los baños de agua dulce, que, pese a su contrastada eficacia, tiene algunos inconvenientes relevantes como su incapacidad para eliminar totalmente al agente o su elevado coste; esto hace que la utilización de desinfectantes como tratamiento alternativo esté cobrando un mayor interés.

6. Conclusions

After carrying out this bibliographic review, and with a deeper knowledge about the subject, the obtained conclusions are the following:

- Amoebic gill disease is a global disease caused by *Neoparamoeba perurans* and it affects numerous species of salmonids and no-salmonids in the marine production.
- The emergence of the disease is determined by numerous environmental factors, some of them are hardly controllable, like the water temperature or salinity.
- There has been demonstrated an adaptive response of the salmons to the disease that gives them an increase of their resistance in case of reinfections, what opens an encouraging way for the investigation with vaccines and immunostimulants, and with selection of genetically resistant individuals.
- The main reservoirs for the agent are water, infected fish and dead due to the disease and bio-fouling, but it does not seem that invertebrates and wild fish have an important role as vectors.
- The most used treatment now a days is fresh water bathing, that, although its contrasted effectiveness, has some disadvantages, like its incapability to completely

remove the agent or its high cost; due to this, the utilization of desinfectants as an alternative treatment is receiving grater interest.

7. Valoración personal

La elección del tema de este trabajo se debe a mi interés por la acuicultura, dado su potencial para la producción de pescado de una forma más eficiente, tanto económica como medioambientalmente, que la pesca; y por las especies acuáticas. La realización del mismo, me ha permitido aumentar mis conocimientos sobre cómo se aborda actualmente uno de los problemas sanitarios de mayor importancia en esta industria, y sobre cuáles son las principales líneas de investigación al respecto para el futuro.

Además de estos conocimientos, también he adquirido competencias en la búsqueda y gestión de información, acudiendo a fuentes científicas y siendo riguroso en la redacción; así como en la citación y elaboración de la bibliografía. Por último, he logrado una mayor familiarización con el lenguaje científico inglés y una mayor fluidez a la hora de interpretar artículos en esa lengua.

8. Bibliografía

- Adams, M. (2003). Pathology of amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). PhD thesis. University of Tasmania.
- Adams, M.B., Nowak, B.F. (2003). Amoebic gill disease: sequential pathology in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 26, 601-614.
- Adams, M.B., Ellard, K., Nowak, B.F. (2004). Gross pathology and its relationship with histopathology of amoebic gill disease (AGD) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 27, 151-161.
- Adams, M., Villavedra, M., Nowak, B.F. (2008). An opportunistic detection of amoebic gill disease in blue warehou, *Seriola brama* Günther, collected from an Atlantic salmon, *Salmo salar* L., production cage in south eastern Tasmania. *J. Fish Dis.*, 31, 713-717.
- Adams, M., Crosbie, P., Nowak, B.F. (2012). Preliminary success using hydrogen peroxide to treat Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with experimentally induced amoebic gill disease (AGD). *J. Fish Dis.*, 35, 839-848.
- Alexander, J.M. (1991). Treatment of amoebic gill disease. En: Valentine, P., Percival, S., Dix, T., Jungalwalla, P., Foster, C., Dodd, R. (Eds.), *Proceedings of the SALTAS Research Review Seminar* (51-102). SALTAS: Australia.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 2, 281-307.
- Ankri, S., Mirelman, D. (2001). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microb. Infect.*, 1, 125-129.
- Bakke, T.A., Harris, P.D. (1998). Diseases and parasites in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55, 247-266.
- Balls, P.W. (1987). Tributyltin (TBT) in the waters of a Scottish Sea Loch arising from the use of antifoulant treated netting by salmon farms. *Aquaculture*, 65, 227-237.
- Bartley, D.M., Rana, K., Immink, A.J. (2001). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 10, 325-337.

- Bills, T.D., Marking, L.L., Dawson V.K., Rach J.J. (1988b). Effects of environmental factors on the toxicity of chloramine-T to fish. U.S. *Invest. fish control*, 96, 1-6.
- Booth, N.H., McDonald, L.E. (1988). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6th ed., Iowa State Press, USA.
- Bowker, J., Erdahl, D. (1998). Observations on the efficacy of chloramine-T treatment to control mortality in a variety of salmonids. *Prog. fish-cult.*, 60, 63-66.
- Bricknell, I.R., Dalesman, S.J., O'Shea, B., Pert, C.C., Mordue Luntz, A.J. (2006). Effect of environmental salinity on sea lice *Lepeophtheirus salmonis* settlement success. *Dis. Aquat. Org.*, 71, 201-212.
- Bridle, A.R., Butler, R., Nowak, B.F. (2003). Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides increase resistance against amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. *J. Fish Dis.*, 26, 367-371.
- Bridle, A.R., Morrison, R.N., Nowak, B.F. (2006a). The expression of immunoregulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during amoebic gill disease (AGD). *Fish Shellfish Immunol.*, 20, 346-364.
- Bridle, A., Morrison, R., Cupit Cunningham, P.M., Nowak, B. (2006b). Quantitation of immune response gene expression and cellular localisation of interleukin-1b mRNA in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected by amoebic gill disease (AGD). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 114, 121-134.
- Bridle, A., Crosbie, P., Cadoret, K., Nowak, B.F. (2010). Rapid detection and quantification of *Neoparamoeba perurans* in the marine environment. *Aquaculture*, 309, 56-61.
- Bruce, D.L., Marshall, J.M. (1965.) Some ionic and bioelectric properties of the ameba *Chaos chaos*. *J. Gen. Physiol.*, 49, 151-178.
- Bustos, P.A., Young, N.D., Rozas, M.A., Bohle, H.M., Ildefonso, R.S., Morrison, R.N., Nowak, B.F. (2011). Amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon (*Salmo salar*) farmed in Chile. *Aquaculture*, 310, 281-288.
- Cameron, D.E. (1994). AGD Field Research 1993/94 II. Evaluation of toxicity of hydrogen peroxide to Atlantic salmon. *SALTAS*, 105-118.
- Cann, J.P., Page, F.C. (1982). Fine structure of small free-living *Paramoeba* (*Paramoebida*) and taxonomy of the genus. *Journal of the Annu. Rep. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 62, 25-43.
- Carman, K.R., Dobbs, F.C. (1997). Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microsc. Res. Tech.*, 37, 116-135.
- Chalmers, L., Taylor, J.F., Roy, W., Preston, A.C., Migaud, H., Adams, A. (2017). A comparison of disease susceptibility and innate immune response between diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) siblings following experimental infection with *Neoparamoeba perurans*, causative agent of amoebic gill disease. *Parasitology*, 114, 1-14.
- Clark, A., Nowak, B.F. (1999). Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *J. Fish Dis.*, 22, 433-443.
- Clark, G., Powell, M., Nowak, B.F. (2003). Effects of commercial freshwater bathing on reinfection of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with Amoebic Gill Disease. *Aquaculture*, 219, 135-142.

- Corpe, W.A. (1976). Primary bacterial films and marine microfouling. En: *Centre de Recherches et d'Etudes Oceanographiques* (Eds). *Proceedings of the 4th International Congress on Marine Corrosion and Fouling* (105-108). CREO: Francia.
- Crosbie, P.B.B., Nowak, B.F., Carson, J. (2003). Isolation of *Neoparamoeba pemaquidensis* Page, 1987 from marine and estuarine sediments in Tasmania. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, 23, 241-244.
- Crosbie, P.B.B., Bridle, A.R., Leef, M.J., Nowak, B.F. (2010). Effects of different batches of *Neoparamoeba perurans* and fish stocking densities on the severity of amoebic gill disease in experimental infection of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*. *Aquac. Res.*, 41, 505-516.
- Cross, D.G., Hursey, P.A. (1973). Chloramine-T for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). *J. Fish Biol.*, 5, 789-798.
- Cundell, A.M., Mitchell, R. (1977). Microbial succession on a wooden surface exposed to the sea. *Int. Biodeterior. Bull.*, 13 (3), 67-73.
- Dempsey, M.J. (1981a). Colonisation of antifoulant paints by marine bacteria. *Bot. Mar.*, 24, 185-191.
- Dempsey, M.J. (1981b). Marine bacterial fouling: a scanning electron microscope study. *Mar. Biol.*, 61, 305-315.
- Dempster, T., Korsøen, Ø., Folkedal, O., Juell, J.E., Oppedal, F. (2009). Submergence of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in commercial scale sea-cages: a potential short-term solution to poor surface conditions. *Aquaculture* 288, 254-263.
- Dick, S.I. (2012). *The effect of immunostimulating diets on the response of Atlantic salmon (Salmo salar L.) to amoebic gill disease (AGD)*. Master of Applied Science with Honours Thesis, University of Tasmania, Tasmania.
- Dominik, S., Kube, P.D., Henshall, J.M., Elliott, N.G. (2010). *Whole Genome Selection to Improve Selection Efficiency for AGD Resistance*. FRDC Project 2008/221 CSIRO and Fisheries Research and Development Corporation, Australia. 55 pp.
- Douglas-Helders, M., Nowak, B., Zilberg, D., Carson, J. (2000). Survival of *Paramoeba pemaquidensis* on dead salmon: implications for management of cage hygiene. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 20, 167-169.
- Douglas-Helders, M., Saksida, S., Raverty, S., Nowak, B.F. (2001). Temperature as a risk factor for outbreaks of Amoebic Gill Disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21(3), 114.
- Douglas-Helders, G.M., Dawson, D., Carson, J., Nowak, B. (2002). Wild fish are not a significant reservoir for *Neoparamoeba pemaquidensis* (Page, 1987). *J. Fish Dis.*, 25, 569-574.
- Douglas-Helders, G.M., O'Brien, D., McCorkell, B., Zilberg, D., Gross, A., Carson, J., Nowak, B. (2003). Temporal and spatial distribution of paramoebae in the water column—a pilot study. *J. Fish Dis.*, 26, 231-240.
- Douglas-Helders, G.M., Tan, C., Carson, J., Nowak, B.F. (2003). Effects of copper-based antifouling treatment on the presence of *Neoparamoeba pemaquidensis* Page, 1987 on nets and gills of reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 221, 13-22.

- Douglas-Helders, G.M., Weir, I.J., O'Brien, D.P., Carson, J., Nowak, B.F. (2004). Effects of husbandry on prevalence of amoebic gill disease and performance of reared Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture*, 241, 21-30.
- Dyková, I., Figueras, A., Novoa, B. (1995). Amoebic gill infection of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol.*, 42, 91-96.
- Dyková, I., Novoa, B. (2001). Comments on diagnosis of amoebic gill in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21, 40-44.
- Dyková, I., Nowak, B.F., Crosbie, P.B.B., Fiala, I., Pecková, H., Adams, M., Macháčkova, B., Dvořáková (2005). *Neoparamoeba branchiphila* n. sp. and related species of genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterisation of selected strains. *J. Fish Dis.*, 28, 49-64.
- Dyková, I., Fiala, I., Pecková, H. (2008). *Neoparamoeba spp.* and their eukaryotic endosymbionts similar to *Perkinsela amoebae* (Hollande, 1980): Coevolution demonstrated by SSU rRNA gene phylogenies. *Eur. J. Protistol.*, 44, 269-277.
- Elliott N., Wong F., Carson J. (2001). *Detection and Abundance of Paramoeba Species in the Environment*. FRDC project 98/209. National Library of Australia, Hobart.
- Elliott, N.G., Kube, P.D. (2009). *Development and early results of the Tasmanian Atlantic salmon breeding program*. Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics. Barossa Valley, South Australia.
- English, C.J., Tyml, T., Botwright, N.A., Barnes, A.C., Wynne, J.W., Lima, P.C., Cook, M.T. (2018). A diversity of amoebae colonise the gills of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) with amoebic gill disease (AGD). *Eur. J. Protistol.*, 67, 27-45.
- FAO FishStatJ databases (2011).
- Findlay, V., Helders, M., Munday, B.L., Gurney, R. (1995). Demonstration of resistance to reinfection with *Paramoeba sp.* by Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *J. Fish Dis.*, 18, 639-642.
- Findlay V.L. (2000). *Demonstration and Manipulation of Acquired Resistance to Amoebic Gill Disease in Atlantic salmon, Salmo salar L.* PhD thesis. University of Tasmania.
- Findlay, V.L., Munday, B.L. (2000). The immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *J. Fish Dis.*, 23, 369-378.
- Fisk, D.M., Powell, M.D., Nowak, B.F. (2002). The effect of amoebic gill disease and hypoxia on survival and metabolic rate of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *B. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22, 190-194.
- Foster, C., Percival, S. (1988). Paramoebic gill disease. Occurrence of *Paramoeba* in Tasmania. Saltas Aquanote No. 15, May Salmon Enterprises of Tasmania Pty Ltd, Dover, Tasmania, Australia.
- Galbreath, P.F., Thorgaard, G.H. (1997). Saltwater performance of triploid Atlantic salmon *Salmo salar L.* brown trout *Salmo trutta L.* hybrids. *Aquacult. Res.*, 28 (1), 1-8.
- Genome British Columbia (2009). Genome BC collaborates with Chile and Norway to sequence salmon genome. Press release, December 7, 2009. <http://www.aquafeed.com/read-article.php?id=3055>

- Gjedrem, T., Gjoen, H.M. (1995). Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, to furunculosis, BKD and cold water vibriosis. *Aquac. Res.*, 26, 129-134.
- González, L. (2015). *Ectoparasites and Associated Pathogens Affecting Farmed Salmon During Marine Grow out in Chile and Australia*. Institute for Marine and Antarctic Studies. University of Tasmania, Launceston, 128 pp.
- González, L. (2016). Spatial and temporal distribution of *Neoparamoeba perurans* in a tank recirculation system during experimental AGD challenge. *Aquaculture*, 45, 363-368.
- Gross, K., Carson, J., Nowak, B.F. (2004). The presence of anti-*Neoparamoeba* sp. antibodies in Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *J. Fish Dis.*, 27, 81-88.
- Gross, K.A. (2007). *Interactions between Neoparamoeba spp. and Atlantic salmon (Salmo salar L.) immune system components*. PhD thesis, University of Tasmania.
- Gupta B.J. (1989). The relationship of mucoid substances and ion and water transport, with new data on intestinal goblet cells and a model for gastric secretion. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 43, 81-110.
- Hammell, K.L. (1999). Methods of disease transmission in aquaculture. En: *Aquaculture Epidemiology*, 10 pp. Canadian Aquaculture Institute, International Education in Aquaculture Medicine and Management, Sydney.
- Harris, J.C., Cottrell, S.L., Plummer, D.L. (2001). Antigiardial drugs. *Applied Microbial. Biotechnol.*, 57, 614-619.
- Harris, J.O., Powell, M.D., Attard, M., Green, T.J. (2004). Efficacy of chloramine-T as a treatment for amoebic gill disease (AGD) in marine Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquac. Res.*, 35, 1448-1456.
- Hodson, S.L., Burke, C. (1994). Microfouling of salmon-cage netting: a preliminary investigation. *Biofouling*, 8, 93-105.
- Howard, T., Carson, J. (1991). *AGD—in vitro studies of Paramoeba species*. Proceedings of the Saltas Research Review Seminar (1-24). Salmon Enterprises of Tasmania, Dover, Tasmania.
- Hvas, M., Karlsbakk, E., Mæhle, S., Wright, D.W., Oppedal, F. (2017). The gill parasite *Paramoeba perurans* compromises aerobic scope, swimming capacity and ion balance in Atlantic salmon. *Conserv. Physiol.*, Vol. 5, cox066.
- Hytterød, S., Andersen, L., Hansen, H., Blindheim, S. H., Poppe, T. T., Kristoffersen, A. B., Mo, T. A. (2017). AGD-behandlingsstrategier- Dose-respons-studier med hydrogenperoksid og ferskvann. *Veterinærinstituttetets rapportserie* 10, (In Norwegian) 30p.
- Johansson, D., Ruohonen, K., Kiessling, A., Oppedal, F., Stiansen, J.E., Kelly, M., Juell, J.E. (2006). Effect of environmental factors on swimming depth preferences of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and temporal and spatial variations in oxygen levels in sea cages at a fjord site. *Aquaculture*, 254, 594-605.
- Karlsbakk, E., Olsen, A.B., Einen, A.C.B., Mo, T.A., Fiksdal, I.U., Aase, H., Kalgraff, C., Skår, S.Å., Hansen, H. (2013). Amoebic gill disease due to *Paramoeba perurans* in ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Aquaculture*, 412-413, 41-44.

- Kent, M., Sawyer, T., Hedrick, R. (1988). *Paramoeba pemaquidensis* (*Sarcomastigophora: Paramoebidae*) infestation of the gills of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* reared in sea water. *Dis. Aquat. Org.*, 5, 163-169.
- Kent, M.L., Traxler, G.S., Kieser, D., Richard, S.C., Dawe, R.W., Shaw, G., Prosperi-Porta, G., Ketcheson, J., Evelyn, T.P.T. (1998). Survey of salmonid pathogens in ocean-caught fishes in British Columbia. *J. Aquat. Anim. Health*, 10, 211-219.
- Kube, P.D., Taylor, R.S., Elliott, N.G. (2012). Genetic variation in parasite resistance of Atlantic salmon to amoebic gill disease over multiple infections. *Aquaculture*, 364-365, 165-172.
- Kvænseth, P.G. (1996). Large-scale use of wrasse to control sea lice and net fouling in salmon farms in Norway. En: Sayer, M.D.J., Treasurer, J.W., Costello, M.J. (Eds.), *Wrasse: biology and use in aquaculture*. Fishing News Books, Oxford, pp. 196-203.
- Langa, A., Lahava, M., Saklrrninia, E., Barshackb, I., Fidder, H., Avidana, B., Bardana, E., Hershkovitz, R., Bar-Meira, S., Chowersa, Y. (2004). Allicin inhibits spontaneous and INF- α induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clin. Nutr.*, 23, 1199-1208.
- Langdon, J.S. (1990). *Major parasitic diseases of Australian fin fish*. Fin Fish Diseases: Refresher Course for Veterinarians. Proceedings, vol. 128. Univ. of Tasmania, pp. 233-255.
- Lima, P.C., Taylor, R.S., Cook, M. (2015). Involvement of contractile vacuoles in the osmoregulation process of the marine parasitic amoeba *Neoparamoeba perurans*. *J. Fish Dis.*, (in press).
- Lima, P.C., Taylor, R.S., Cook, M. (2016). Involvement of contractile vacuoles in the osmoregulation process of the marine parasitic amoeba *Neoparamoeba perurans*. *J. Fish Dis.*, 39, 629-633.
- Lovy, J., Becker, J.A., Speare, D.J., Wadowska, D.W., Wright, G.M., Powell, M.D. (2007). Ultrastructural examination of the host cellular response in the gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, with amoebic gill disease. *Vet. Pathol.*, 44, 663-671.
- Lunger, A., Rasmussen, M.R., Laursen, J., McLean, E. (2006). Fish stocking density impacts tank hydrodynamics. *Aquaculture*, 254, 370-375.
- Marcogliese, D.J. (2002). Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology*, 124, S83-S99.
- Marine Scotland, The Scottish Government (2012). *Amoebic Gill Disease*. Topic Sheet No. 96 V1.
- Marszalek, D.S., Gerchakov, S.M., Udey, L.R. (1979). Influence of substrate composition on marine biofouling. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38 (5), 987-995.
- Martin, R.E. (1985). Population growth in stationary and suspension culture of *Paramoeba pemaquidensis* page (*Amoebida, Paramoebidae*). *J. Protozool.*, 32 (4), 738-739.
- Martin, R.E. (1987). Adhesion, morphology, and locomotion of *Paramoeba pemaquidensis* Page (*Amoebida, Paramoebidae*): effects of substrate charge density and external cations. *J. Protozool.*, 34, 345-349.

- Martinsen, K.H., Thorisdottir, A., Lillehammer, M. (2018). Effect of hydrogen peroxide as treatment for amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in different temperatures. *Aquac. Res.*, 49, 1733-1739.
- Maynard, B.T., Taylor, R.S., Kube, P.D., Cook, M.T., Elliott, N.G. (2016). Salmonid heterosis for resistance to amoebic gill disease (AGD). *Aquaculture*, 451, 106-112.
- Moody, J., Gaten, E., (1982). The population dynamics of eyeflukes *Diplostomumspathaceum* and *Tylodelphys clavata* (Digenea: Diplostomatidae) in rainbow and brown trout in Rutland Water: 1974-1978. *Hydrobiologia*, 88, 207-209.
- Morrison, R., Crosbie, P., Cook, M., Adams, M., Nowak, B. (2005). Cultured gill-derived *Neoparamoeba pemaquidensis* fails to elicit amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org.*, 66, 135-144.
- Morrison, R.N., Koppang, E.O., Hordvik, I., Nowak, B.F. (2006). MHC class II+ cells in the gills of salmon experimentally infected with amoebic gill disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 109, 297-303.
- Munday, B.L. (1986). Diseases of salmonids. En: Humphrey, J.D., Langdon, J.S. (Eds.), *Proceedings of the Workshop on Diseases of Australian Fish and Shellfish*. Benalla, Victoria.
- Munday, B.L. (1988). *Fish Diseases: Refresher Course for Veterinarians*. Proceedings, vol. 106. Univ. Of Sydney, pp. 111-112.
- Munday, B.L., Foster, C.K., Roubal, F.R., Lester, R.J.G. (1990). Paramoebic gill infection and associated pathology of Atlantic salmon, *Salmo salar*, and rainbow trout, *Salmo gairdneri*, in Tasmania. En: *Pathology in marine science*. Perkins, F.O., Cheng, T.C. (eds.) Academic Press. pp. 215-222.
- Munday, B.L., Zilberg, D. (2000). Pathology of experimental amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) and the effect of pre-maintenance of fish in seawater on the infection. *J. Fish Dis.*, 23, 401-407.
- Munday, B., Zilberg, D., Findlay, V. (2001). Gill disease of marine fish caused by infection with *Neoparamoeba pemaquidensis*. *J. Fish Dis.*, 24, 497-507.
- Nexus (2015). *Skretting Nexus* – Winter 2015 – The Magazine of Skretting Australia 21,9 pp.
- Nikl, L., Albright, L.J., Evelyn, T.P.T. (1991). Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. *Dis. Aquat. Org.*, 12, 7-12.
- Nowak B.F., Munday B.L. (1994). Histology of gills of Atlantic salmon during the first few months following transfer to sea water. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 14, 77±81.
- Nowak, B. (2001). Qualitative evaluation of risk factors for Amoebic Gill Disease in Atlantic salmon. 18 pp. En: Rodgers, C.J. (Ed.), *Proceedings of the OIE International Conference on Risk Analysis in Aquatic Animal Health* (148-155). Office International des Epizooties (O.I.E.), Paris, France.
- Nowak, B.F., Morrison, R., Crosbie, P., Adams, M., Butler, R., Bridle, A., Gross, K., Vincent, B., Embar-Gopinath, S., Carson, J., Raison, R., Villavedra, M., McCarthy, K., Broady, K., Wallach, M. (2004). *Host-Pathogen Interaction in Amoebic Gill Disease*. Aquafin CRC Project 3.4.2 (FRDC project No. 2001/244). University of Tasmania, Launceston. ISBN: 1-86295-222-1, 141 pp.

- Nowak, B.F. (2007). Parasitic diseases in marine cage culture – An example of experimental evolution of parasites?. *Int. J. Parasitol.*, 37, 581-588.
- Nowak, B.F. (2012). En: Woo, Patrick T.K., Buchmann, Kurt (Eds.), *Fish Parasites, Pathobiology and Protection*. CAB International, pp. 1-18.
- Nowak, B.F., Cadoret, K., Feist, S.W., Bean, T.P. (2013). Laser-capture dissection and immunohistochemistry reveals chloride and mucous-cell specific gene expression in gills of seawater acclimated Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 83, 1459-1467.
- Nowak, B.F., Valdenegro-Vega, V., Crosbie, P., Bridle, A. (2014). Immunity to Amoeba. *Dev. Comp. Immunol.*, 43, 257-267.
- Oldham, T., Rodger, H., Nowak, B.F. (2016). Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD) — An epidemiological review. *Aquaculture*, 457, 35-42.
- Oppedal, F., Juell, J.E., Johansson, D. (2007). Thermo- and photoregulatory swimming behaviour of caged Atlantic salmon: implications for photoperiod management and fish welfare. *Aquaculture*, 265: 70-81.
- Oppedal, F., Dempster, T., Stien, L.H. (2011). Environmental drivers of Atlantic salmon behaviour in sea-cages: a review. *Aquaculture*, 311: 1-18.
- Paclibare, J.O., Evelyn, T.P.T., Albright, L.J., Prosperi-Porta, L. (1994). Clearing of the kidney disease bacterium *Renibacterium salmoninarum* from seawater by the blue mussel *Mytilus edulis*, and the status of the mussel as a reservoir of the bacterium. *Dis. Aquat. Org.*, 18, 129-133.
- Parsons, H., Nowak, B.F., Fisk, D., Powell, M. (2001). Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 195, 205-210.
- Pennacchi, Y., Leef, M.J., Crosbie, P.B.B., Nowak, B.F., Bridle, A.R. (2014). Evidence of immune and inflammatory processes in the gills of AGD-affected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 36, 563-570.
- Pennacchi, Y., Adams, M.B., Nowak, B.F., Bridle, A.R. (2016). Immune gene expression in the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following experimental reinfection with *Neoparamoeba perurans*. *Aquaculture*, 464, 410-419.
- Peyghan, R., Powell, M.D., Zadkarami, M.R. (2008). In vivo effect of garlic extract and metronidazole against *Neoparamoeba pemaquidensis*, and isolated amoebae from Atlantic salmon. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11 (1), 41-47.
- Powell, M., Fisk, D. and Nowak, B. (2000). Effects of graded hypoxia on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) infected with amoebic gill disease (AGD). *J. Fish Biol.*, 57, 1047-1057.
- Powell, M.D., Parsons, H.J., Nowak, B.F. (2001). Physiological effects of freshwater bathing of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a treatment for Amoebic Gill Disease. *Aquaculture*, 199, 259-266.
- Powell, M.D., Forster, M.E., Nowak, B.F. (2002a). Apparent vascular hypertension associated with amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Tasmania. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 22 (5), 328-333.
- Powell, M., Harris, J., Attard, M., Green, T., Sadler J. (2002b). Chloramine-T as a treatment for the removal of gill amoebae in seawater. En: *The second scientific conference of the Atlantic salmon subprogram handbook* (Ed. by S.C. Battaglene, J.M.Cobcroft), pp. 58-61,. CSIRO Marine laboratories, Hobart, Tasmania.

- Powell, M.D., Clark, G.A. (2003). In vitro survival and the effect of water chemistry and oxidative chemical treatments on isolated gill amoebae from AGD-affected Atlantic salmon. *Aquaculture*, 220, 135-144.
- Powell, M.D., Nowak, B.N. (2003). Acid-base and respiratory effects of confinement in Atlantic salmon affected with amoebic gill disease. *J. Fish Biol.*, 62, 51- 63.
- Powell, M.D., Clark. G.A., (2004). Efficacy and toxicity of oxidative disinfectants for the removal of gill amoebae from the gills of amoebic gill disease affected Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in freshwater. *Aquac. Res.*, 35, 112-123.
- Powell, M.D., Becker, J.A., Ransome, J., Florent, R.L., Jones, M. (2007). *Atlantic salmon aquaculture subprogram: commercial AGD and salmon health*. University of Tasmania, Launceston, ISBN 978-1-86295-378-9.
- Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Rev. Fish Sci.*, 4, 229-228.
- Roberts S.D., Powell M.D. (2003). Reduced total hardness of fresh water enhances the efficacy of bathing as a treatment for amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar L.* *J. Fish Dis.*, 26, 591-599.
- Robertson, B., Rorstad, G., Engstad, R., Raa, J. (1990). Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13, 391-400.
- Rodger, H.D. (2014). Amoebic gill disease (AGD) in farmed salmon (*Salmo salar*) in Europe. *Fish Vet.*, 1, 16-27.
- Rogerson, A., Laybourn-Parry, J. (1992). The abundance of marine naked amoebae in the water column of the Clyde Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 34, 187-196.
- Roth, M., Richards, R., Sommerville, C. (1993). Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations. *J. Fish Dis.*, 16, 1-26.
- Roubal, F.R., Lester, R.J.G., Foster, C.K. (1989). Studies on cultured and gill-attached *Paramoeba* sp. (*Gymnamoeba*: *Paramoebidae*) and the cytopathology of paramoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, from Tasmania. *J. Fish Dis.*, 12, 481-492.
- Ruppert, E.E., Barnes, R.D. (1994). *Invertebrate Zoology*. Saunders College Publishing, San Diego, pp. 423-436.
- Sandoval, C., Paredes, E. (2014). *Patologías branquiales en salmónidos*. Veterinary Histopathology Center.
- Siwicki, A.K. (1987). Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio L.* *J. Fish Biol.*, 31 (Supp A), 245-246.
- Siwicki, A.K. (1989). Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.*, 13, 87-91.
- Stagg, H.E.B., Hall, M., Wallace, I.S., Pert, C.C., Garcia Perez, S., Collins, C. (2015). Detection of *Paramoeba perurans* in Scottish marine wild fish populations. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 35, 217-226.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Rønneberg, L. B., Nilsen, H., Asheim, A., Fjell, K., Nygård, S. M. R., Olsen, A. B. and Dale, O. B. (2008). First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *J. Fish Dis.*, 31, 205-214.

- Tan, C.K., Nowak, B.F., Hodson, S.L. (2002). Biofouling as a reservoir of *Neoparamoeba pemaquidensis* (page, 1970), the causative agent of amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 210, 49-58.
- Taylor, R.S., Wynne, J.W., Kube, P.D., Elliott, N.G. (2007). Genetic variation of resistance to amoebic gill disease in Atlantic salmon (*Salmo salar*) assessed in a challenge system. *Aquaculture*, 272S1, S94-S99.
- Taylor, R.S., Crosbie, P.B., Cook, M.T. (2010). Amoebic gill disease resistance is not related to the systemic antibody response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 33, 1-14.
- Thomassen, J. M. (1993). Hydrogen peroxide as a delousing agent for Atlantic salmon. En G. A. Boxshall, D. Defaye (Eds.), *Pathogens of wild and farmed fish: Sea lice* (pp. 290-295). Chichester, England: Ellis Horwood.
- Valdenegro-Vega, V.A., Polinski, M., Bridle, A., Crosbie, P., Leef, M., Nowak, B.F. (2015). Effects of single and repeated infections with *Neoparamoeba perurans* on antibody levels and immune gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 42, 522-529.
- Vass, S. (2013). *Gill disease to cost salmon farmers £30 m.* Herald Scotland (online), 19th January 2013.
- Venkobacker, C., Iyengar, L., Prabhakara Rao, A.V.S. (1977). Mechanism of disinfection: effects of chlorine on cell membrane functions. *Water Res.*, 11, 72-729.
- Villavedra, M., To, J., Lemke, S., Birch, D., Crosbie, P., Adams, M., Broady, K., Nowak, B., Raison, R.L., Wallach, M. (2010). Characterisation of an immunodominant, high molecular weight glycoprotein on the surface of infectious *Neoparamoeba* spp., causative agent of amoebic gill disease (AGD) in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol.*, 29, 946-955.
- Vincent, B.N., Morrison, R.N., Nowak, B.F. (2006). Amoebic gill disease (AGD)-affected Atlantic salmon *Salmo salar* L. are resistant to subsequent AGD challenge. *J. Fish Dis.*, 29, 549-559.
- Vincent, B.N. (2008). *Amoebic gill disease of Atlantic salmon: resistance, serum antibody response and factors that may influence disease severity.* PhD thesis, University of Tasmania, Launceston.
- Vincent, B.N., Adams, M.B., Nowak, B.F. and Morrison, R.N. (2009). Cell surface carbohydrate antigen(s) of wild type *Neoparamoeba* spp are immunodominant in sea-cage cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) affected by amoebic gill disease (AGD). *Aquaculture*, 288, 153-158.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response of fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591-625.
- Wiik-Nielsen, J., Mo, T.A., Kolstad, H., Mohammad, S.N., Hytterod, S., Powell, M.D. (2016). Morphological diversity of *Paramoeba perurans* trophozoites and their interaction with Atlantic salmon, *Salmo salar* L., gills. *J. Fish Dis.*, 39, 1113-1123.
- Wright, D.W., Nowak, B.F., Oppedal, F., Bridle, A., Dempster, T. (2015). Depth distribution of the amoebic gill disease agent, *Neoparamoeba perurans*, in salmon sea-cages. *Aquacult. Environ. Interact.*, 7, 67-74.
- Wright, D.W., Nowak, B.F., Oppedal, F., Bridle, A., Dempster, T. (2017). Free-living *Neoparamoeba perurans* depth distribution is mostly uniform in salmon cages, but

reshaped by stratification and potentially extreme fish crowding. *Aquac. Environ. Interact.*, Vol. 9, 269-279.

- Young, N.D., Crosbie, P.B.B., Adams, M.B., Nowak, B.F., Morrison, R.N. (2007). *Neoparamoeba peruransn. sp.*, an agent of amoebic gill disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int. J. Parasitol.*, 37, 1469-1481.
- Young, N.D., Cooper, G.A., Nowak, B.F., Koop, B.F. and Morrison, R.N. (2008). Coordinated down-regulation of the antigen processing machinery in the gills of amoebic gill disease-affected Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Immunol.*, 45, 1469-1481.
- Young, N.D., Dyková, I., Crosbie, P.B., Wolf, M., Morrison, R.N., Bridle, A.R., Nowak, B.F. (2014). Support for the coevolution of *Neoparamoeba* and their endosymbionts, *Perkinsela amoebae*-like organisms. *Eur. J. Protistol.*, 50, 509-523.
- Zilberg, D., Findlay, V.L., Girling, P., Munday, B.L. (2000). Effects of Treatment with Levamisole and Glucans on Mortality Rates in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) Suffering from Amoebic Gill Disease. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 20, 23-27.
- Zilberg, D., Gross, A., Munday, B. (2001). Production of salmonid amoebic gill disease by exposure to *Paramoeba* sp. harvested from the gills of infected fish. *J. Fish Dis.*, 24, 79- 82.
- Zilberg, D., Munday, B.L. (2001). Responses of Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, to *Paramoeba* antigens administered by a variety of routes. *J. Fish Dis.*, 24, 181-183.
- Zilberg, D., Munday, B.L. (2006). Phylum amoebozoa en: Woo, P.T.K. (Ed.), *Fish diseases and disorders. Volume1: Protozan and metazoan infections*. CAB International, London, pp. 1-15.