

PROYECTO PARAPEZ 3 CONVOCATORIA PLEAMAR 2020

ACTIVIDAD.2 ESTUDIO PARASITOLÓGICO DE ESPECIES CULTIVADAS Y SALVAJES

F.2.1.1 INFORME SOBRE LOS PARÁSITOS ENCONTRADOS TANTO EN ESPECIES SALVAJES COMO EN ESPECIES DE ACUICULTURA



“Acción gratuita cofinanciada por el FEMP”

“Este informe/presentación se produce enmarcado/a dentro de un proyecto cofinanciado por el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca”.

“Las opiniones y documentación aportadas en esta publicación son de exclusiva responsabilidad del autor o autores de las mismas, y no reflejan necesariamente los puntos de vista de las entidades que apoyan económicamente el proyecto”.

Firma del director del proyecto



Facultad de Veterinaria UCHCEU, a 30 de noviembre de 2021.

ÍNDICE

Tabla de contenido

1. Introducción:	6
2. Actividades y colaboradores	6
3. Objetivos:	8
4. Material y métodos	8
4.1. BLOQUE I: Formación del equipo PARAPEZ3	8
4.2. BLOQUE II. Toma de muestras	9
4.3. BLOQUE III. Procesado de las muestras y conservación de las especies parásitas ..	17
4.3.1. Necropsias y toma de muestras	18
4.3.2. Recolección, identificación y conservación parasitaria	28
4.4. BLOQUE V. Anatomía patológica	30
4.4.1. Identificación y corte de tejidos	30
4.4.2. Deshidratación e infiltración en parafina	31
4.4.3. Inclusión de tejidos en bloques de parafina.....	31
4.4.4. Corte y secado de las muestras.....	32
4.4.5. Desparafinado, tinción y montaje	32
4.4.6. Almacenado de muestras.....	33
4.4.7. Eliminación de residuos	33
5. Resultados	34
5.1. Resultados de parasitación branquial por región de estudio	34
5.2. Resultados de parasitación intestinal por región de estudio.	46
5.3. Resultados de parasitación branquial de las explotaciones de Comunidad Valenciana	47
5.3.1. Explotación acuícola CV-A.	48
5.3.2. Explotación acuícola CV-B.	49
5.3.3. Explotación acuícola CV-C	50
5.4. Resultados de la parasitación branquial en Lonjas de la Comunidad Valenciana ...	51
5.4.1. Lonja de LA	51
5.4.2. Lonja de LB/LC.....	52
5.4.3. Lonja de LD.....	52
5.5. Resultados de parasitación branquial en las explotaciones de las Islas Canarias ...	53
5.5.1. Resultados de la explotación acuícola IC-B.	53
5.5.2. Resultados de la explotación acuícola IC-A.	55
5.6. Resultados del estudio anatomopatológico	55

5.7. Resultados de presencia de <i>Cryptosporidium spp.</i> en peces obtenidos de Comunidad Valenciana	59
6. Anexos.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Acciones relativas a la actividad nº2 "Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes"	7
Tabla 2: Fuentes de verificación relativas a la acción 2.1: "Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes"	7
Tabla 3 Organización de las visitas a las lonjas de la Comunidad Valenciana.....	15
Tabla 4: Estructura seguida para la asignación del número de muestras.....	19
Tabla 5: Conservantes utilizados dependiendo del grupo parasitario.	29
Tabla 6: Taxonomía de los principales grupos parasitarios.	29
Tabla 7: Resultados del test estadístico Chi cuadrado comparando las prevalencias de parásitos branquiales entre los distintos grupos de estudio (según región y origen).	34
Tabla 8: Prevalencia global de parásitos branquiales, para monogeneas y para crustáceos en Comunidad Valenciana e Islas Canarias, dentro y fuera de las jaulas de acuicultura y de peces obtenidos en lonja.	35
Tabla 9: Porcentajes de riqueza parasitaria para especies cultivadas y salvajes en ambas regiones de estudio. (Comunidad Valenciana e Islas Canarias).	39
Tabla 10: Especies de monogénidos identificados en especies salvajes junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.....	43
Tabla 11: Especies de crustáceos identificados en especies salvajes junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.....	44
Tabla 12: Especies de monogénidos identificados en especies de lonja junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.....	44
Tabla 13: Especies de crustáceos identificados en especies de lonja junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.....	44
Tabla 14: Prevalencia de crustáceos branquiales por región de estudio.	45
Tabla 15: Prevalencia media global de parasitismo gastrointestinal por región de estudio.	46
Tabla 16: Prevalencia media global y su error estadístico por grupo de estudio en las instalaciones de CV-A.....	48
Tabla 17: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-B.....	49
Tabla 18: Prevalencia media global y su error estadístico de la parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-C.....	50
Tabla 19: Prevalencia media global y error estadístico de la parasitación branquial hallada en los peces obtenidos de la Lonja de LA.	51

Tabla 20: Prevalencia media global y error estadístico de la parasitación branquial hallada en los peces obtenidos de la Lonja de LB y LC	52
Tabla 21: Prevalencia media global y error estadístico de la parasitación branquial hallada en los peces obtenidos de la Lonja de LD.	53
Tabla 22: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de IC-B.	54
Tabla 23: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de IC-A.	55
Tabla 24: Ejemplares positivos, grupo al que pertenecen y localización geográfica.	60
Tabla 25: Material utilizado durante el procesado y conservación de muestras.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación de las 3 localizaciones geográficas visitadas en la Comunidad Valenciana. ...	9
Figura 2: Ubicación geográfica de las 2 localizaciones visitadas en el Archipiélago Canario.	9
Figura 3: Incidencia en la calibración del pHímetro.	11
Figura 4: Personal de la granja obteniendo mediante salabre los individuos cultivados del interior de los viveros.	14
Figura 5: Dr Jordi López y D ^a Candela Domenech pescando en las instalaciones de IC-A.	14
Figura 6: Imagen de las cubas de pesca de la lonja de LA en una de las visitas realizadas por los investigadores de SAIGAS.	16
Figura 7: Doctoranda Samantha Moratal con el personal responsable de la lonja de LA.	17
Figura 8: Ejemplar obtenido en la lonja de LD el 30/03/2021. Véase el código de identificación asignado (3LV04).	20
Figura 9: Investigadora D ^a Elena Corcuera llevando a cabo el pesaje de las muestras en las instalaciones de IC-B.	21
Figura 10: Pesaje de los ejemplares obtenidos.	21
Figura 11: Ejemplar de isópodo. hallado durante la inspección del opérculo.	22
Figura 12: La doctoranda Samantha Moratal en una de las disecciones.	24
Figura 13: Proceso de inspección de las muestras branquiales y gastrointestinales bajo la lupa binocular.	25
Figura 14: Procesado de muestras en las instalaciones cedidas por IC-B.	25
Figura 15 Base de datos Excel del proyecto PARAPEZ3 en el que destacan las especies obtenidas en Lonjas de la Comunidad Valenciana muestreadas por los investigadores de SAIGAS.	27
Figura 16: Investigadora D ^a Candela Domenech Zapata llevando a cabo las disecciones en el espacio habilitado en las instalaciones de IC-A.	27
Figura 17: Investigadora Elena Corcuera llevando a cabo la correspondiente desinfección de la nevera de transporte tras finalizar las disecciones.	28
Figura 18: Gráfica de Prevalencia media global de parasitación branquial por localización y grupo estudiado.	35

Figura 19: % Parasitación branquial por grupo de estudio de Comunidad Valenciana e Islas Canarias.....	36
Figura 20: Prevalencia global a nivel branquial por grupo de estudio en Comunidad Valenciana.	37
Figura 21: Parasitación branquial global por grupo de estudio y zona geográfica dentro de la Comunidad Valenciana.Granja CV-A. Granja CV-B. Granja CV-C.	38
Figura 22: parasitación branquial por grupo estudiado en el Archipiélago Canario.....	39
Figura 23: % de Riqueza parasitaria por grupo de estudio.	40
Figura 24: Parasitación branquial por especie estudiada en Comunidad Valenciana.....	41
Figura 25: Porcentajes de parasitación branquial global en Sparus aurata tanto en CV (naranja) como en IC (azul), por prevalencia de parásitos.	42
Figura 26: Porcentaje global de parasitación branquial de Lubina (Dicentrarchus labrax) junto con la parasitación branquial hallada por región de estudio y especie parasitaria. % Naranja: Parasitación en CV. % Azul: Parasitación en IC.	43
Figura 27: Prevalencia media global de parásitos intestinales en las especies salvajes.	46
Figura 28: Parasitación branquial por zona geográfica dentro de Comunidad Valenciana.	47
Figura 29: Parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-A.	48
Figura 30:Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-B.....	49
Figura 31: Ejemplares obtenidos en la Lonja de LA tras su identificación.	51
Figura 32: Parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones del archipiélago canario. Granja A: IC-A; Granja B: IC-B.....	53
Figura 33: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las explotaciones de IC-B.....	54
Figura 34: % Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las explotaciones de IC-A.....	55
Figura 35. I20-121. Tinción H-E. Branquia. A.- Branquias con fusión de lamelas y atrofia lamelar. B.- Infiltrado inflamatorio con restos de necrosis en zona basal de las lamelas. C.-Infiltrado inflamatorio con restos de necrosis. D.- Hiperplasia de células mucosas y presencia de células descamadas	56
Figura 36 I20-139. Tinción H-E. Cortes histológicos de branquias con fusión de lamelas, inflamación y presencia de hemorragias (fecha roja).	57
Figura 37. I20-137. Tinción H-E. Corte histológico de branquias con elevado número de heterófilos con gránulos acidófilos (flecha roja).....	57
Figura 38. I20-112. Tinción H-E. Cortes histológicos de branquias. Se pueden observar heterófilos con sus gránulos acidófilos característicos (flecha roja), y estructuras compatibles con parásitos (flecha negra).....	57
Figura 39. I20-129 (A y B) I20-130 (C y D). Tinción H-E. Cortes histológicos de branquias con parásitos adheridos a la superficie (rodeado por círculo).....	58
Figura 40. I20-96. Tinción H-E. Cortes histológicos de mucosa intestinal. En figura B, dentro algunos enterocitos se pueden observar estructuras compatibles con una forma parasitaria (Punta de flecha).	58
Figura 41. I20-104 (A-D). Tinción H-E. Cortes transversales de fibras musculares con presencia de quistes.	59

ACTIVIDAD 2: ESTUDIO PARASITOLÓGICO DE ESPECIES CULTIVADAS Y SALVAJES

F.2.1: INFORME SOBRE LOS PARÁSITOS ENCONTRADOS TANTO EN ESPECIES

SALVAJES COMO EN ESPECIES DE ACUICULTURA

1. Introducción:

La siguiente actividad está enmarcada dentro del proyecto PARAPEZ 3: “Evaluación de la transmisión de formas parasitarias entre peces salvajes y cultivados”, llevado a cabo por el equipo de investigación SAIGAS de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

El proyecto PARAPEZ 3 cuenta con la colaboración de la Fundación Biodiversidad, del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del programa PLEAMAR convocatoria 2020 cofinanciado por el Fondo Europeo Marítimo y de pesca (FEMP).

2. Actividades y colaboradores

La actividad nº 2 “Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes” tiene por objetivo (0.2) “Conocer los parásitos que comparten las especies salvajes asociadas a las granjas de acuicultura y las especies criadas en ellas”. Para ello, fue imprescindible contar con los conocimientos y la experiencia adquiridos previamente en Parapez 1 y Parapez 2 durante la identificación y catalogación parasitológica llevada a cabo previamente, así como la formación adicional en dicha materia.

Para alcanzar el objetivo, la actividad 2 se desglosa en 2 acciones (A.2.1, A.2.2), cada una de ellas dotada de un presupuesto diferente. Si bien la actividad requiere el estudio parasitológico de las diferentes especies ícticas, cada acción recoge una forma de muestreo diferente. Mientras que la acción A.2.1 es relativa a la captura de especies cultivadas y salvajes (intrajaula y extrajaula respectivamente), así como de especies recogidas en lonjas de la Comunidad Valenciana, la acción A.2.2 refiere el estudio de especies salvajes intrajaula. Es decir, aquellos individuos de especies salvajes que han quedado confinados accidentalmente dentro de las jaulas durante los cambios de redes, estableciéndose de esta forma un contacto directo con las

especies cultivadas y aumentando así la posibilidad de transferencia de parásitos entre poblaciones. La recogida de especies de las lonjas se realiza como novedad a años anteriores puesto que se considera que este muestreo corresponde a zonas de captura no próximas a las instalaciones de acuicultura, de forma que permita la comparativa entre la parasitación de poblaciones asociadas a granjas de acuicultura y aquella de las poblaciones más alejadas. (Véase Tabla 1).

Tabla 1: Acciones relativas a la actividad nº2 "Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes".

Actividad 2. Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes
A.2.1. Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes
A.2.2. Estudio de individuos de especies salvajes presentes en el interior de los viveros

Tabla 2: Fuentes de verificación relativas a la acción 2.1: "Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes".

Acción 2.1. Estudio parasitológico de las especies cultivadas y salvajes
F.2.1.1. Informe sobre los parásitos encontrados tanto en especies salvajes como en especies de acuicultura.
F.0.2. Actas de reuniones del equipo investigador del CEU.

La actividad 2 corresponde a la actividad con mayor financiación dentro del proyecto, pues recoge múltiples tareas y desplazamientos para poder completarse.

Para comprender mejor su desarrollo, dicha acción se ha dividido en cinco bloques siguiendo el orden cronológico llevado a cabo a lo largo del año de estudio:

- BLOQUE I. Formación del equipo PARAPEZ
- BLOQUE II. Toma de muestras.
- BLOQUE III. Procesado de las muestras y conservación de las especies parásitas.

- BLOQUE IV. Anatomía patológica
- BLOQUE V. Manejo de resultados y elaboración de informe

3. Objetivos:

Los objetivos de la realización de estas acciones son:

- Identificar las especies parásitas que afectan a las especies salvajes en cada una de las explotaciones del estudio.
- Identificar las especies parásitas que afectan a las especies cultivadas en cada una de las explotaciones del estudio.
- Identificar las especies parásitas que afectan a las especies salvajes que se encuentran presentes en el interior de las jaulas de acuicultura.
- Identificar las especies parásitas que afectan a especies salvajes en zonas distantes a las explotaciones acuícolas.

4. Material y métodos

4.1. BLOQUE I: Formación del equipo PARAPEZ3

A pesar de no detallarse en el marco lógico, para el desarrollo de las debidas acciones de identificación parasitaria fue requerida la formación previa del equipo a través de la búsqueda y análisis de la documentación bibliográfica específica. Los primeros meses los miembros del proyecto PARAPEZ3 repartieron su jornada entre el diseño del sistema de fototrampeo y de captación de formas parásitas libres y la formación parasitológica requerida. Aunque todo el equipo participó activamente en el aprendizaje, durante las primeras reuniones se asignaron las personas responsables de cada actividad, basándose en su formación previa. Para el estudio parasitológico, la coordinadora Patricia González y la doctoranda Alejandra Escudero fueron quienes se responsabilizaron de liderar y de gestionar la actividad y centrar sus horas de dedicación a esta acción del proyecto. Asimismo, las investigadoras en formación Candela Domenech Zapata, Elena Corcuera y Naima María Marco fueron quienes dedicaron mayor parte del tiempo a la búsqueda bibliográfica, así como en la elaboración de tablas y anexos para estructurar y gestionar dicha información. Para esta formación fueron de gran ayuda los conocimientos y documentación desarrollados durante los anteriores proyectos de PARAPEZ1 y PARAPEZ2.

Paralelamente a la formación parasitaria, Patricia González, experta en parasitología, amplió sus conocimientos sobre lesiones histopatológicas en organismos acuáticos para el correcto análisis de muestras histopatológicas.

4.2. BLOQUE II. Toma de muestras

Tal y como se muestra en el marco lógico del proyecto: *“El estudio parasitológico se realizará en un total de 3 instalaciones ubicadas en la Comunidad Valenciana y 2 instalaciones en las Islas Canarias. Las instalaciones de Comunidad Valenciana se visitarán 3 veces a lo largo de todo el proyecto, y 2 veces las situadas en las Islas Canarias.”* A continuación, en la figura 1 y 2, se muestra la localización de las cada una de las 3 instalaciones en las que se ha trabajado.



Figura 1: Ubicación de las 3 localizaciones geográficas visitadas en la Comunidad Valenciana.



Figura 2: Ubicación geográfica de las 2 localizaciones visitadas en el Archipiélago Canario.

Asimismo, respecto al número de visitas realizadas el indicador para verificar el objetivo de la actividad (R.2.1) específica: *“Captura y estudio de entre 15 y 20 individuos de*

diferentes especies de peces tanto de acuicultura como salvajes, y determinación de los parásitos presentes en estas especies.”.

Además: *“Para la captura de los peces extrajaula, se utilizarán los métodos validados durante la ACTIVIDAD 2.1. Del Proyecto PARAPEZ 1 (2018).”*

El director del proyecto Dr. Jordi López, e investigador principal, fue el encargado de organizar junto con los gerentes de las explotaciones de acuicultura, las salidas de campo. Una vez acordada y confirmada la fecha de visita, el equipo se distribuyó las tareas previas necesarias para tener todo el material listo con el fin de conseguir que la visita fuera un éxito. Entre éstas destacan:

Valoración del material de pesca útil disponible así como la compra de cebo vivo si la explotación lo requiere y de los artejos de pesca necesarios.

El material de pesca son utensilios que se desgastan, rompen o pierden con facilidad durante las capturas. Al pescar junto a las jaulas de acuicultura se corre el riesgo de cavar los anzuelos en los cabos de los viveros, así como en las redes de las propias jaulas.

Es por ello que el día anterior a las salidas y después de estas, el equipo investigador procede a la revisión e inventario del material disponible, teniendo en cuenta en todo momento la posible necesidad de compra de más material, si el estado del actual así lo requiere.

Se revisa por última vez la viabilidad de los artejos de pesca, cañas de pesca, revisión de las cámaras de fototrampeo y calibrado definitivo de todas las sondas del medidor multiparamétrico.

Durante el calibrado del sistema multiparamétrico el equipo de SAIGAS sumergió las sondas en distintas soluciones de parámetros concretos conocidos, tales como agua destilada, solución tampón de ph 4... poniendo en valor la fiabilidad y repetitividad de las sondas.

A pesar de haber realizado este último paso anteriormente con resultados correctos, durante la jornada previa de la primera salida a la granja CV-B, (5/05/2021) se detectó

una incidencia en la sonda de PH del multiparamétrico, la cual expresaba valores por encima de los reales (8,23), medidos varias veces en solución tampón de pH4. Las sondas de estos sistemas multiparamétricos son materiales muy delicados que, independientemente de su uso o no, tienen una vida útil que varía entre el año y el año y medio, teniendo que reponerlos como parte del mantenimiento normal de dichos sistemas. A pesar de los esfuerzos y el mantenimiento realizado, tuvo que prescindirse del medidor de pH en la primera visita a dicha explotación hasta la restitución de la sonda de pH, puesto que no se encontró una solución tan temprana.

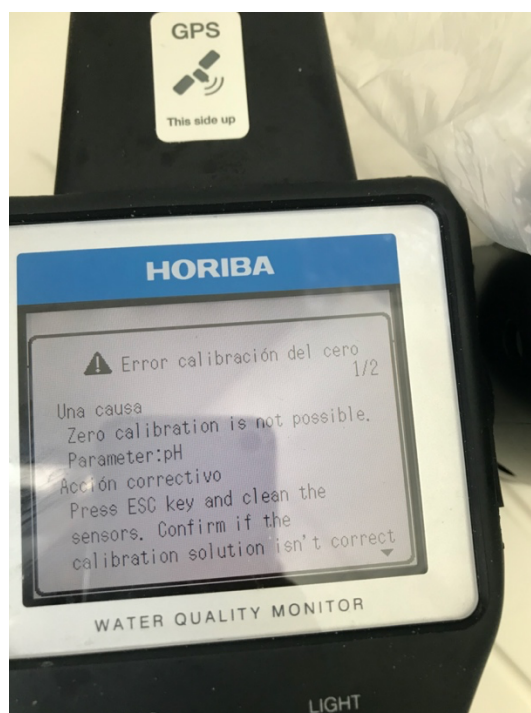


Figura 3: Incidencia en la calibración del pHímetro.

Preparación del material para las necropsias

Con el fin de realizar las necropsias lo antes posible y evitar la contaminación y descomposición del pescado, todo el material necesario a utilizar durante las necropsias es preparado el día previo a su desarrollo. El pescado capturado va acompañado de un número de referencia, tal y como se detallará en el bloque de material y métodos. Es por ello, que el día de antes de cada salida en la Comunidad Valenciana, la persona encargada del material de necropsias identifica, con los números de referencia

correspondientes, un mínimo de treinta botes de Histofix[®] al 4 % (marca comercial de formaldehído utilizado como fijador y conservante en anatomía patológica en el que se introducen las muestras tomadas por animal para su estudio histopatológico) y treinta placas Petri (pequeñas cajas circulares transparentes compuestas por dos piezas en las que se introducen las branquias para su posterior estudio en fresco bajo la lupa binocular).

Además, se dejan preparadas las bancadas del laboratorio con todo el material necesario para completar las necropsias. Asimismo, se imprimen las hojas de ictiopatología, las de “registro interno de anatomía patológica” y se crean las etiquetas con las que se identificarán y se fotografiará el pescado. Generalmente, la persona encargada de llevar a cabo dicha tarea fueron Elena Corcuera, Naima Marco y Candela Domenech.

El material utilizado durante el procesado y conservación de las muestras se enumera y detalla en la Tabla 25 del anexo 1 de este mismo documento.

Preparar la maleta de trabajo y neveras para el transporte de las muestras

En relación a las capturas a realizar por el personal investigador, entre la acción A.2.1 y A.2.2 suman un total de tres las poblaciones o grupos a estudiar.

El primer grupo es el formado por los peces de cultivo o intrajaula y los peces salvajes o extrajaula, descrito en el marco lógico de la acción A.2.1 como: “(...)se tomará una muestra de entre 15 y 20 ejemplares que se sacrificarán mediante métodos humanitarios y se conservarán en refrigeración hasta su llegada a los laboratorios de la Universidad CEU Cardenal Herrera, donde serán analizados. (...)” Respecto a los peces extrajaula “se capturarán entre 15 y 20 ejemplares que se sacrificarán entre métodos humanitarios y se conservarán en conservación hasta su llegada a los laboratorios de la Universidad CEU Cardenal Herrera, donde serán analizados”. Asimismo, esta actividad comprende también el segundo grupo o población a estudiar: las especies obtenidas de lonjas “Se realizarán al menos dos visitas a dos lonjas de la Comunidad Valenciana, cuyas capturas no hayan sido realizadas en zonas cercanas a las explotaciones de acuicultura. De esta forma, se podrá analizar si existen diferencias en la presencia de parásitos entre las

poblaciones de peces salvajes asociadas a las granjas de acuicultura y las poblaciones de peces más alejadas. Se muestrearán un mínimo de 80 ejemplares (en total), que serán trasladados en refrigeración hasta su llegada a los laboratorios de la Universidad CEU Cardenal Herrera. Dichos ejemplares serán procesados y analizados según lo descrito para los peces intrajaula y extrajaula en el apartado A.2.”

“Para la captura de los peces extrajaula, se utilizarán los métodos validados durante la ACTIVIDAD 2.1. Del Proyecto PARAPEZ 1 (2018).”

El tercer grupo de peces son aquellos que corresponden a las especies salvajes presentes en el interior de las jaulas. Aunque se detallará mejor en el informe F.2.2.1, relativo a la acción A.2.2, durante los cambios de redes, al igual que se producen pequeñas fugas de peces de cultivo también consiguen introducirse en el interior de los viveros especies salvajes, como las lisas (*Liza aurata*), bogas (*Boops boops*), u otros. Estos individuos mantienen un contacto directo con los ejemplares cultivados por lo que suponen un alto y potencial riesgo de transmisión. No obstante, no resultó sencillo conseguir muestras de estos. Todos los aspectos relativos a este grupo poblacional se detallarán en el informe F.2.2.1.

Toma de muestras

Durante las jornadas de salida al mar, para la obtención del primer grupo de peces capturados (peces del interior y del exterior de las explotaciones de acuicultura), las investigadoras en formación Candela Domenech y Elena Corcuera, en compañía de otros miembros del equipo SAIGAS, acuden a las instalaciones de la explotación y, junto con el barco de faenado, realizan las tareas descritas en la actividad A.2.1.

La obtención de los individuos cultivados se realiza gracias al personal de la propia granja, quienes obtienen el número de ejemplares necesario durante las labores de faenado de la propia granja.

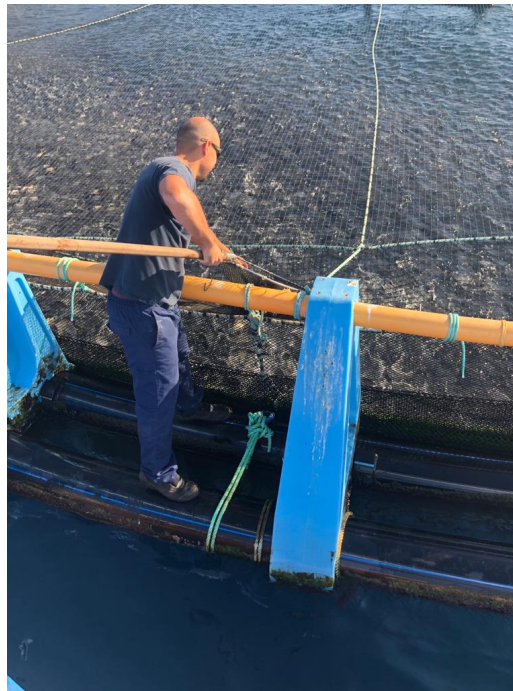


Figura 4: Personal de la granja obteniendo mediante salabre los individuos cultivados del interior de los viveros.

Mientras tanto, durante toda la jornada de mar, el personal investigador se dedica a la obtención, mediante pesca con caña, de los ejemplares salvajes cerca de las instalaciones de acuicultura.



Figura 5: Dr Jordi López y D^a Candela Domenech pescando en las instalaciones de IC-A.

Tras la obtención, los ejemplares son sacrificados mediante métodos humanitarios e introducidos en bolsas de plástico para evitar su contaminación o deterioro al conservarlos en la nevera con hielo.

Sin embargo, la toma de muestras difiere en la obtención de los individuos de las lonjas.

En estas, 2 integrantes del equipo SAIGAS, acuden a la lonja donde, tras inspección visual de las cubas, recogen una cuba de manera aleatoria de entre 15-20 ejemplares, capturados lejos de las inmediaciones de granjas de cultivo, de forma que se pudiesen obtener datos de las parasitaciones correspondientes a dichas poblaciones, contrastándose así tanto con las de las poblaciones cultivadas como de las poblaciones salvajes de especies sinantrópicas (especies asociadas a las granjas de acuicultura). Los peces obtenidos se recogieron en bolsas herméticas de plástico, separados por especies, y se depositaron en una cuba limpia y vacía, en la que previamente se había introducido hielo, de forma que se evitase la contaminación o deterioro de las muestras hasta su traslado a las instalaciones de la Universidad CEU Cardenal Herrera para su correspondiente procesamiento.

Tabla 3 Organización de las visitas a las lonjas de la Comunidad Valenciana

Número de visita	Localización geográfica	Fecha de las visitas realizadas	Personal investigador
Visita 1	Lonja de LA	09/03/2021	Dr. Jordi López y doctoranda Samantha Moratal
	Lonja de LD	09/03/2021	Colaboradora Marta Muñoz
	Lonja de LB	16/03/2021	Dr. Jordi López y doctoranda Samantha Moratal
Visita 2	Lonja de LD	30/03/2021	Dr. Jordi López y doctoranda Samantha Moratal
	Lonja de LA	02/06/2021	Doctoranda Samantha Moratal y la

		investigadora Elena Corcuera
Lonja de LC	14/06/2021	Doctoranda Samantha Moratal y D ^a Elena Corcuera
Lonja de LD	29/06/2021	Doctoranda Samantha Moratal y D ^a Elena Corcuera



Figura 6: Imagen de las cubas de pesca de la lonja de LA en una de las visitas realizadas por los investigadores de SAIGAS.

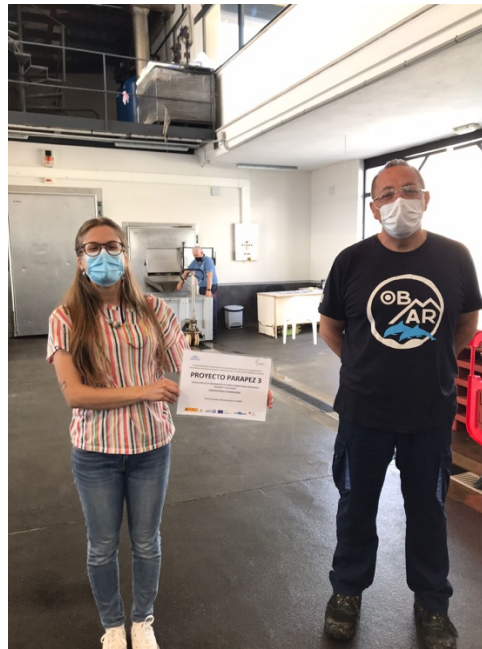


Figura 7: Doctoranda Samantha Moratal con el personal responsable de la lonja de LA.

4.3. BLOQUE III. Procesado de las muestras y conservación de las especies parásitas

Tras la pesca de las especies salvajes y la captura de los peces de cultivo, se llevó a cabo el procesado de las muestras y la conservación de las especies parásitas encontradas. El procesado de muestras corresponde con las necropsias de los ejemplares de las tres poblaciones de estudio capturados por cada salida. En la Comunidad Valenciana, las investigadoras en formación Elena Corcuera, Naima Marco y Candela Domenech, junto con la doctoranda Samantha Moratal dedicaron una jornada completa al procesado de los mismos.

El estudio parasitológico se compone de dos actuaciones. La primera se basa en la inspección macroscópica en los tejidos y aparatos externos del animal tales como piel, aletas, boca, opérculos. La segunda es la llevada a cabo durante el examen en fresco de las branquias y el aparato gastrointestinal bajo la lupa binocular.

Se tomará muestra de músculo y piel, intestino y branquias y se introducirán en formaldehído (glixal) al 4 % para su estudio histopatológico. La branquia derecha y el resto del tracto intestinal (desde esófago hasta el recto), se extraerá para su examen

bajo la lupa binocular en fresco, en busca de parásitos que se conservarán en formaldehído o etanol.

Una jornada completa de las investigadoras en formación es necesaria para examinar cada uno de los arcos branquiales y paquetes gastrointestinales y recolectar los parásitos para conservarlos. Finalmente, una media de dos días extra es necesarios para identificarlos, fijarlos e incluso teñirlos si estos lo requieren.

Todo lo relativo a la toma de muestras para el posterior análisis en el departamento de anatomía patológica, la investigadora Patricia González fue el encargado de capitanear las tareas. Por lo que respecta al estudio parasitario, Alejandra Escudero y Patricia González, especialistas del departamento de parasitología, fueron los responsables de la coordinación de dichos trabajos del bloque III.

4.3.1. Necropsias y toma de muestras

A continuación se procede a detallar la metodología de disección que se lleva a cabo:

Identificación y biometría

Se realiza la identificación de la especie, asignación del número de muestra individual y su fotografiado. Por lo que respecta al código asignado por ejemplar, en la tabla VII aparece de forma esquemática la estructura llevada a cabo. Antes que nada, se identifica con el número "3", referente al número de proyecto (Parapez 3). Cada granja se identificó con dos letras vinculadas a su localización geográfica. Por ejemplo, la granja CV-B se apodó como "XX". Seguida de éstas aparece el código de origen poblacional del pescado. Cabe recordar que son cuatro los grupos poblacionales a estudiar: animales intrajaula o de cultivo, salvajes o extrajaula, especies salvajes presentes en el interior de las jaulas de acuicultura o especies procedentes de lonjas. Los peces intrajaula se identificaron con la letra "D" (dentro), los salvajes como "F" (fuera). el tercer grupo como "DF" (dentro-fuera) y los procedentes de Lonjas como LA (Lonja de A), LB (Lonja

de B) o LC (Lonja de C). Finalmente, se les asigna un número, siendo estos acumulativos por cada salida y explotación.

Tabla 4: Estructura seguida para la asignación del número de muestras

Código identificativo del proyecto	Código de localización	Código de origen	Número de ejemplar
3	LA-(Lonja de A)		01 02
	LB-(Lonja de B)		03
	LC-(Lonja de C)		04
	LD-(Lonja de D)		...
	XA- CV-A.	D –Dentro (intrajaula)	01 02
	XB- CV-B.		03
	XC-CV-C	F – Fuera (salvajes)	04 ...
	XD- IC-A.		
	XE- IC-B.	DF- Dentro-fuera	

Tras la identificación de la especie, se identifica con el correspondiente código, se fotografía y se toman las medidas biométricas del animal con el ictiómetro y la balanza. Para la medición de la longitud del pescado, el equipo investigador se basó en la metodología utilizada para determinar la talla mínima de los peces. En el apartado dos, artículo 5 del Reglamento (CEE) n.º3094/86 del consejo de 7 de octubre de 1986 por el

que establecen determinadas medidas técnicas de conservación de los recursos pesqueros, detalla que para la determinar la talla del ejemplar se valora la longitud total de este: “en los pescados se medirá de la punta de la cabeza al extremo de la aleta caudal” (Figura 8).



Figura 8: Ejemplar obtenido en la lonja de LD el 30/03/2021. Véase el código de identificación asignado (3LV04).



Figura 9: Investigadora D^a Elena Corcuera llevando a cabo el pesaje de las muestras en las instalaciones de IC-B.

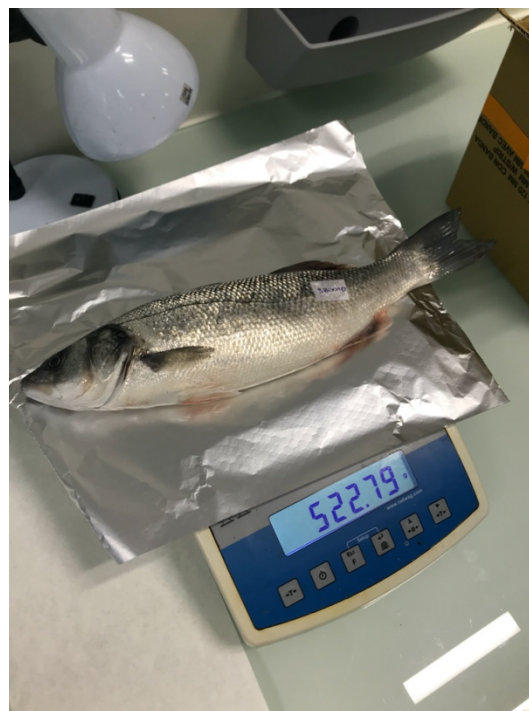


Figura 10: Pesaje de los ejemplares obtenidos.

Identificación macroscópica externa

Durante la necropsia de los peces se hará una inspección externa de manera ordenada y sistematizada, en busca de ectoparásitos y/o de sus lesiones.

Se abre manualmente la cavidad bucal y el opérculo, con cuidado de no dañar ni contaminar la estructura branquial y se examina dicha cavidad para poder determinar la presencia de parásitos de gran tamaño como *Lernanthropus spp.*, *Ceratothoa spp.* por ejemplo, o los trematodos monogenea (*Sparicotyle*, *Sciaenicotyle*, *Zeuxapta*, etc), importantes en la producción acuícola.



Figura 11: Ejemplar de isópodo. hallado durante la inspección del opérculo

Se examina cuidadosamente la condición corporal del animal comparándola con la talla y peso de los animales de cultivo pertenecientes al mismo lote a fin de encontrar anomalías del tamaño o la deposición de grasa que puedan revelar una enfermedad subyacente. El aspecto de las escamas, aletas y branquias, así como el de los ojos y el examen de la cavidad bucal y de la apertura cloacal son examinados en búsqueda de parásitos de mayor tamaño perceptibles a la vista.

Toma de muestra branquial y muscular

Tras la inspección externa del animal se tomarán todos los arcos branquiales y se depositarán en una placa Petri. También se tomarán para estudio anatomopatológico aquellas áreas de lesiones, en caso que no se encuentren áreas de lesiones se tomara una porción de branquia sana, que se introduce en el bote de conservante identificado con el número de referencia del animal para su posterior estudio histopatológico, mientras el resto se deposita en la placa Petri mencionada para su examen en fresco con la lupa binocular.

Apertura de cavidad abdominal y toma de muestras de paquete gastrointestinal

Finalizada la primera parte del examen se procede a la apertura de la cavidad abdominal incidiendo con las tijeras o el bisturí unos centímetros cranealmente a la apertura cloacal, a fin de no dañar el recto y se continua por la línea media hacia los opérculos. Este corte permite la exposición de los órganos internos.

Se examinó el aspecto de los estos (color, forma, consistencia, tamaño, etc). Se prestó especial atención en la búsqueda de nematodos localizados en dicha cavidad.

Antes de realizar cualquier inspección sobre el tubo digestivo se toma muestra de este con ayuda de material estéril, y se introduce en un criotubo también estéril para el análisis molecular en busca de protozoos.

(Para más información consultar informe F.2.1.2 relativo a la búsqueda de *Cryptosporidium* sp. en peces de Comunidad Valenciana).

Tras ello, se toma una muestra de tubo digestivo para el análisis histopatológico, introduciéndose en uno de los criotubos debidamente identificado con el ejemplar de origen.

Finalmente, se coloca el paquete gastrointestinal sobre una placa Petri y se realiza una incisión a lo largo de todo el sistema digestivo en búsqueda de lesiones y/o parásitos

macroscópicos. Cabe destacar que este último no se pudo llevar a cabo este en aquellos animales de dimensiones reducidas.



Figura 12: La doctoranda Samantha Moratal en una de las disecciones.

Inspección bajo la lupa binocular

Para la inspección del aparato digestivo, se tomará durante la necropsia y se examinará bajo la lupa binocular. Se abrirá longitudinalmente el mismo y se hará una inspección macroscópica. Se tomarán muestras para estudio histopatológico de las lesiones encontradas. A parte de los nematodos (Anisakidos (en cavidad visceral), *Capillaria*, *Rhabdochona*, etc.) que se pueden encontrar durante la inspección macroscópica del intestino, se pueden encontrar protozoos de los géneros *Eimeria*, *Hexamita*, *Ichtyobodo*, *Philasterides*, etc. Así como la presencia de acantocefalos.

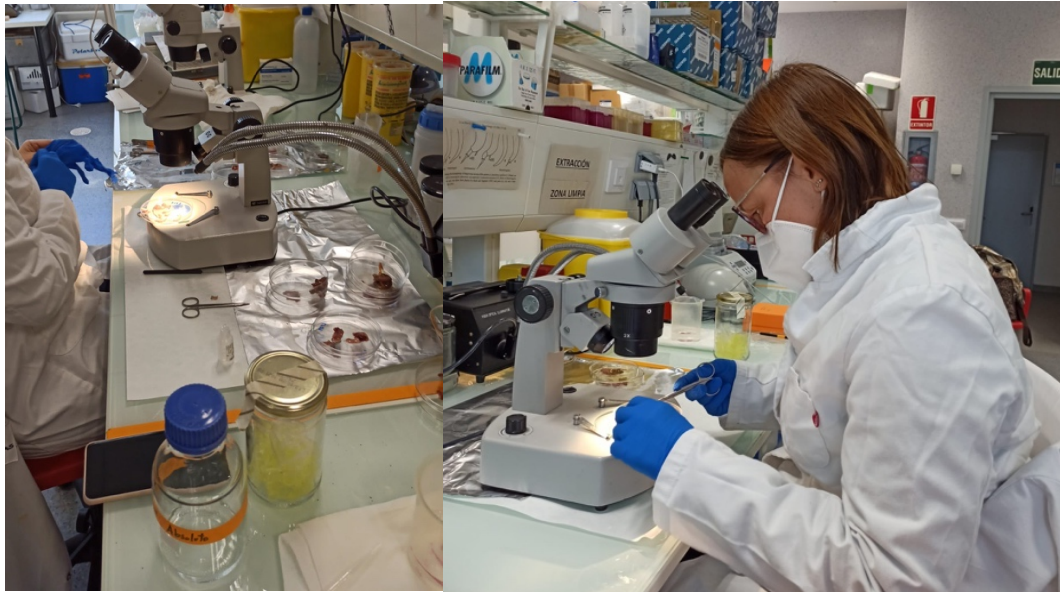


Figura 13: Proceso de inspección de las muestras branquiales y gastrointestinales bajo la lupa binocular



Figura 14: Procesado de muestras en las instalaciones cedidas por IC-B.

Las branquias colocadas sobre la placa Petri también se analizan bajo la lupa binocular, con ayuda de un punzón para la separación correcta de las lamelas branquiales (filamentos que componen la branquia). Los principales parásitos susceptibles de ser

Figura 15 Base de datos Excel del proyecto PARAPEZ3 en el que destacan las especies obtenidas en Lonjas de la Comunidad Valenciana muestreadas por los investigadores de SAIGAS.

El procedimiento es similar en las explotaciones del Archipiélago Canario. Previamente a la visita el equipo de SAIGAS envía todo el material necesario para las disecciones a cada una de las instalaciones. Las muestras son procesadas en la zona habilitada y las muestras de interés son enviadas de nuevo a la península tras la visita del equipo investigador.



Figura 16: Investigadora D^ª Candela Domenech Zapata llevando a cabo las disecciones en el espacio habilitado en las instalaciones de IC-A.



Figura 17: Investigadora Elena Corcuera llevando a cabo la correspondiente desinfección de la nevera de transporte tras finalizar las disecciones.

4.3.2. Recolección, identificación y conservación parasitaria

Para la recolección parasitaria se colocaron las muestras en unas placas Petri debidamente identificadas para su inspección bajo la lupa binocular.

Para las branquias se contó con la ayuda de pinzas y una aguja o punzón, usado para separar cuidadosamente las lamelas branquiales (filamentos que componen la branquia) en busca de parásitos anclados a ellas. Tras la localización de los mismos se lleva a cabo el desprendimiento del mismo, ya con las mismas pinzas o con la aguja de solución salina. El parásito desprendido es recogido en una pipeta graduada e introducido en un Eppendorf con el debido conservante.

El conservante es específico del grupo parasitario por lo que este ha de ser identificado antes de almacenar el ejemplar. Los principales grupos a tener en cuenta en la inspección branquial son parásitos de la clase monogenea, crustáceos del orden isópoda o de la subclase copepoda. Su identificación es sencilla y permite el correcto almacenaje del ejemplar en perfectas condiciones para su posterior identificación bajo el microscopio óptico y su almacenaje.

Tabla 5: Conservantes utilizados dependiendo del grupo parasitario.

Monogeneas	Copepodos	Isópodos
Histofix 4%	Etanol al 70%	Etanol al 70%

Tabla 6: Taxonomía de los principales grupos parasitarios.

Clasificación Taxonómica		
Reino Animalia		
Filo		
Platyhelminthes	Arthropoda	
Subfilo - Rhabditophora	Subfilo - Crustacea	
Clase Monogenea	Subclase Copepoda	Orden Isopoda

Para la identificación morfológica de los individuos se extraen del conservante y se estudian bajo el microscopio óptico. Si los individuos son de mayor tamaño (ectoparásitos, isópodos) se pueden estudiar bajo la lupa binocular. Todo ello con el objetivo de identificar la especie parasitada (muchos parásitos son especie específicos facilitando su identificación) o las estructuras morfológicas características. Existen estructuras con gran valor taxonómico como son el opisthaptor en monogénidos (órgano de fijación), atrio genital, morfología de los huevos...

Para ello, se fijan los parásitos al portaobjetos con la ayuda de una resina sintética conocida por su marca comercial como DpeX para la conservación a medio plazo, la realización de fotografías y el estudio morfológico parasitario.

4.4. BLOQUE V. Anatomía patológica

La investigadora Patricia González experta en parasitología llevó a cabo todo lo relativo a las lesiones histopatológicas causadas por parásitos.

4.4.1. Identificación y corte de tejidos

Las muestras se fijaron en formaldehído al 4%. Se cortaron y ordenaron dentro de los casets de procesado histológico. Se procesaron alrededor de 2 casetes de cada caso.

Trabajadas bajo una campana de tallado de la marca DIAPATH, siguiendo las medidas de prevención de riesgos.



Figura 15. Campana de tallado con filtro de carbono

Las muestras se iban cortando en finas láminas de aproximadamente 3 mm de grosor, con una cuchilla de micrótopo, para su posterior introducción en los casetes

4.4.2. Deshidratación e infiltración en parafina

Las muestras talladas son introducidas en parafina, para así facilitar su corte. Para la inclusión en parafina se ha utilizado el procesador automático de tejidos Donatello de la marca DIAPATH.

Permanecen alrededor de 1 hora en formol al 10%, tras ello en agua destilada y pasando por una concentración de alcohol ascendente de forma que la muestra se deshidratase. Después de los alcoholes, las muestras sufrían dos pasos de dos horas cada una por xilol. Por último, las muestras sufrían tres pasos por parafina, siendo los tiempos de una hora, una hora y media y dos horas, produciéndose la infiltración en parafina.

Todos estos pasos se realizan mediante el procesador automático de tejidos ya que es un aparato estanco y evita exposiciones frente a formol o xilol.

4.4.3. Inclusión de tejidos en bloques de parafina

La inclusión en parafina consistió en introducir el tejido ya infiltrado en parafina, en un bloque de parafina para su posterior corte. Para la realización de la inclusión en bloques de parafina se ha utilizado el centro de inclusión modular modelo TES VALIDA de la marca MEDITE.

Una vez finalizado el procesador automático de tejidos, se extrajeron las muestras del procesador y se depositaron en el baño de parafina del centro de inclusión (Figura 42. A). Se extrajeron los casetes del baño y seguidamente se abrieron para poder sacar el tejido de su interior y tejido que se colocó en un molde metálico.

Seguidamente, se rellenó de parafina líquida utilizando el dispensador de parafina del centro de inclusión modular, se desechó la tapa del casete y la caja del casete se colocó sobre el molde metálico. Posteriormente se situó este molde metálico en la placa de frío del centro de inclusión modular, para que la parafina se solidificara. Cuando la parafina estuvo completamente sólida, se retiró el molde metálico para obtener el bloque de parafina.

4.4.4. Corte y secado de las muestras

Para el corte de muestras histológicas se usó un micrótomo rotativo manual de Leica, equipado con cuchillas de micrótomo, que se cambiaban cada vez empezaban a salir cortes con defectos.

Primero el bloque de parafina se desbastó (se retiró el exceso de parafina con cortes gruesos hasta llegar al tejido). A continuación, se realizaron cortes seriados de unas 3- 4 micras, que colocaron un baño de flotación para cortes de parafina lleno de agua destilada. Estas muestras en flotación se recogieron con un portaobjetos previamente rotulado con el número de caso, y se almacenaron alrededor de 40 minutos en una estufa de secado.

4.4.5. Desparafinado, tinción y montaje

Una vez secas las muestras, se pasaron por dos recipientes de xilol en los que permanecerán diez minutos en cada uno para desparafinarse. A continuación, se hidratan las muestras con pasos consecutivos en cuatro recipientes de alcoholes con una gradación descendente (desde alcohol al 100%, 100%, 96% y hasta alcohol al 60%) para terminar en agua corriente (5 minutos en cada uno).

A continuación, se pasaron las muestras por Hematoxilina de Harris (5 minutos), y se limpió el exceso de hematoxilina con un lavado con agua corriente. Después de este lavado, se pasaron por Eosina Alcohólica (unos segundos), pasándolos posteriormente por agua corriente.

El paso siguiente, fue rehidratar las muestras, sumergiéndolas en cuatro recipientes con una gradación de alcoholes ascendente, (siendo sus concentraciones de 96%, 96%, 100% y 100%) (cinco segundos), para terminar en xilol diez minutos.

Todos estos pasos se realizaron dentro de una campana de extracción para minimizar el contacto con el xilol.

Posteriormente, las muestras se montaron con una gota de medio de montaje para preparaciones sobre el portaobjetos y sobre éste un cubreobjetos. Dejamos secar.

4.4.6. Almacenado de muestras

El almacenado de los botes, al contener formol, debe realizarse en estancias preparadas para ello. En nuestro caso se guardaron en almacenes con extractores y/o en armarios con sus propios extractores de filtro de carbono. Las muestras se almacenaron en esos lugares hasta que se tallaron. Posteriormente al tallado los portaobjetos con las muestras se almacenaron en archivadores de muestras, para su posterior estudio histopatológico, y los bloques de parafina con los restos de muestras se almacenaron en armarios de bloques de parafina, por si hubiera que realizar cortes nuevos o tinciones especiales.

4.4.7. Eliminación de residuos

Tanto el formol, como otros productos usados en el laboratorio de histopatología, son residuos sujetos a normativa específica, ya que requieren de requisitos especiales en su gestión desde el punto de vista sanitario y medioambiental. La eliminación de estos residuos está regulada en la comunidad Valenciana por el Decreto 240/1994 de 22/11 y la Ley 10/2000.

Estos residuos generados son recogidos regularmente por una empresa contratada por la Universidad (CONSEUR), que lleva a cabo la gestión externa de eliminación de los residuos químicos y biológicos.

Debido a lo comentado anteriormente los botes con residuos del procesamiento de las muestras del proyecto se eliminaron 15 días después de su tallado, en los contenedores suministrados por la empresa CONSEUR para la eliminación de los mismos.

5. Resultados

5.1. Resultados de parasitación branquial por región de estudio

Considerando la prevalencia de parasitación global, sin discriminar por procedencia de las especies estudiadas (cultivo o salvajes) podemos observar las siguientes comparaciones regionales. Revisando los datos podemos observar que si hay diferencias significativas entre ambas regiones de estudio (IC y CV). Asimismo, los peces extraídos de lonjas de la CV se han comparado con las poblaciones obtenidas en dicha comunidad (cultivados y salvajes en Comunidad Valenciana), observándose diferencias significativas respecto a los animales cultivados, pero no a los salvajes. (Tabla 7). En la tabla 8 se muestran los resultados de parasitación branquial global de los grupos estudiados. Podemos observar que los parásitos del tipo monogénicos mantienen un predominio frente a los parásitos del tipo Crustacea. Además también existen diferencias significativas entre los peces cultivados dentro de las jaulas y los de fuera (tanto de lonja como especies sinantrópicas).

Los resultados de la prevalencia media de parásitos branquiales global, para monogénicos y para crustáceos y el error estándar (e.e.) se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 7: Resultados del test estadístico Chi cuadrado comparando las prevalencias de parásitos branquiales entre los distintos grupos de estudio (según región y origen).

	χ^2	<i>p</i>
Prevalencia global (monogénicos + crustáceos)		
CV_D - CV_F	17.683	0.000
CV_F - CV_L	0.848	0.357
CV_D - CV_L	25.610	0.000
IC_D - IC_F	5.502	0.019
CV_D - IC_D	13.352	0.000
CV_F - IC_F	5.701	0.017
Prevalencia monogénicos		
CV_D - CV_F	32.637	0.000
CV_F - CV_L	0.909	0.340
CV_D - CV_L	41.860	0.000
IC_D - IC_F	0.891	0.345
CV_D - IC_D	13.352	0.000

CV_F - IC_F	4.552	0.033
Prevalencia crustáceos		
CV_D - CV_F	11.624	0.001
CV_F - CV_L	0.000	0.985
CV_D - CV_L	11.526	0.001
IC_D - IC_F	10.909	0.001
CV_D - IC_D	---	----
CV_F - IC_F	2.813	0.094

Para un valor de $p < 0,05$ existen diferencias significativas. D:Dentro. F:Fuera; CV_D:Comunidad Valenciana dentro; CV_F: Comunidad Valenciana fuera; CV_L: Lonjas de Comunidad Valenciana; IC_D: Islas Canarias dentro; IC_F: Islas Canarias fuera; CV: Comunidad.

Tabla 8: Prevalencia global de parásitos branquiales, para monogéneas y para crustáceos en Comunidad Valenciana e Islas Canarias, dentro y fuera de las jaulas de acuicultura y de peces obtenidos en lonja.

	Prevalencia global (media + e.e)	Prevalencia monogéneas (media + e.e)	Prevalencia crustáceos (media + e.e)
CV_DENTRO	42 ± 4.3	42 ± 4.3	0
CV_FUERA	18 ± 3.5	10 ± 2.8	8 ± 2.5
CV_LONJA	13 ± 3.1	7 ± 2.3	8 ± 2.5
IC_DENTRO	15 ± 4.6	15 ± 4.6	0
IC_FUERA	33 ± 6.1	22 ± 5.4	17 ± 4.9

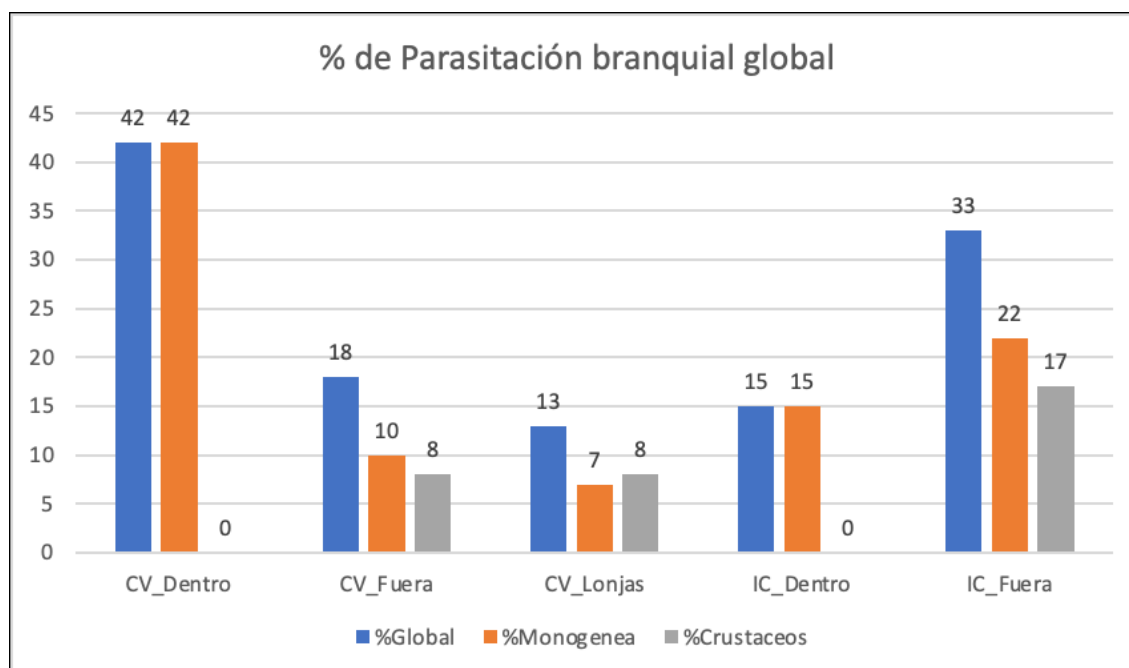


Figura 18: Gráfica de Prevalencia media global de parasitación branquial por localización y grupo estudiado.

Las poblaciones recogidas en lonjas de la Comunidad Valenciana contienen una parasitación branquial menor que la del resto de grupos estudiados, similar a la de los peces obtenidos fuera de las instalaciones de Comunidad Valenciana, pero estadísticamente significativa si la comparamos con las poblaciones cultivadas de la misma comunidad. Es de destacar que se observó gran cantidad de material intestinal en tejido branquial de los individuos recogidos en lonjas, probablemente debido a la regurgitación sufrida por los animales durante su pesca (animales procedentes de pesca extractiva de arrastre). Es posible que este fenómeno provocase el daño o desprendimiento de parásitos branquiales.

Podemos observar en la siguiente gráfica que existe diferencia significativa entre la prevalencia de CV e IC, encontrándose una mayor parasitación branquial en las especies cultivadas de IC y salvajes del Archipiélago canario.

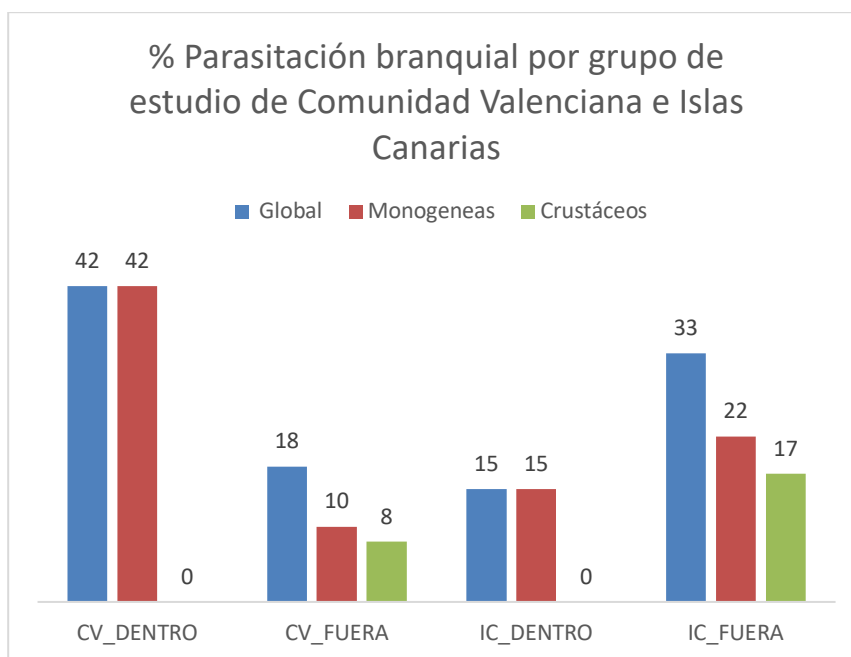


Figura 19: % Parasitación branquial por grupo de estudio de Comunidad Valenciana e Islas Canarias.

Tal y como podemos observar en la siguiente gráfica, en especies cultivadas no se halló presencia de especies pertenecientes al grupo crustáceos, si encontradas en especies

salvajes. Sin embargo, es de destacar que la prevalencia de estas especies es generalmente menor que la prevalencia de monogénidos en branquias. Como muestra el test de Chi cuadrado, existe una diferencia significativa entre la parasitación de las poblaciones obtenidas en viveros de acuicultura con las especies obtenidas en lonja, siendo estas últimas menos parasitadas a nivel branquial, sin embargo, la diferencia no es suficientemente significativa entre las especies salvajes y las especies obtenidas en lonja.

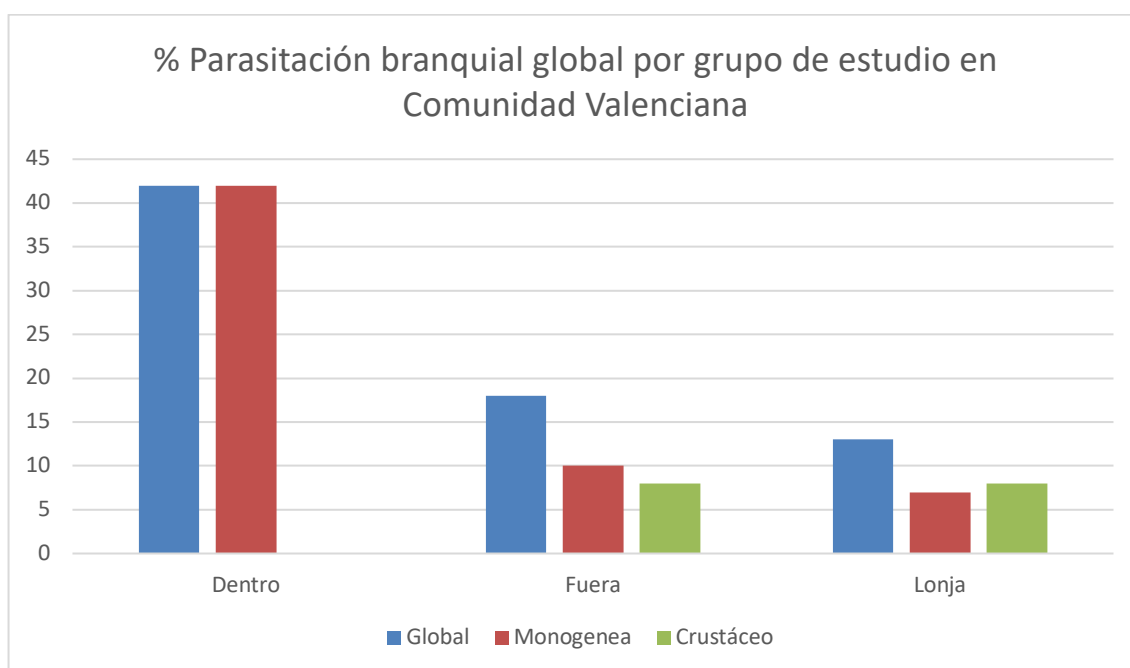


Figura 20: Prevalencia global a nivel branquial por grupo de estudio en Comunidad Valenciana.

Tal y como se muestra por localizaciones geográficas dentro de la Comunidad Valenciana los datos son similares en todas las instalaciones estudiadas: Una mayor prevalencia de monogéneas en los peces cultivados que en las especies salvajes, mientras que parásitos crustáceos solo se encuentran en las poblaciones salvajes.

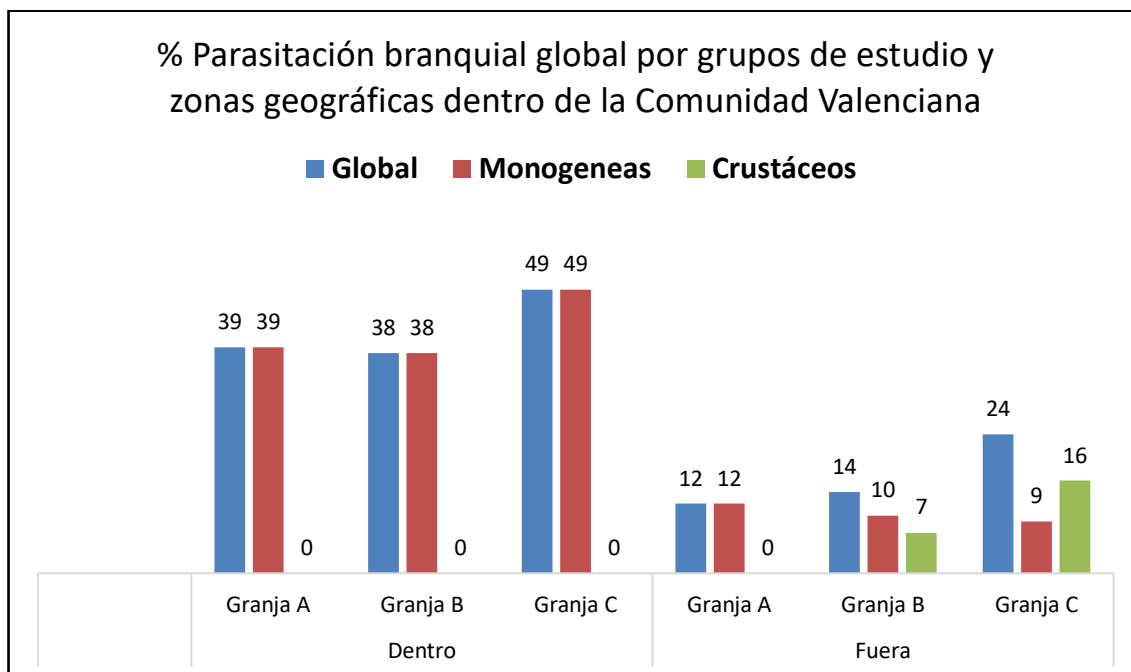


Figura 21: Parasitación branquial global por grupo de estudio y zona geográfica dentro de la Comunidad Valenciana. Granja CV-A. Granja CV-B. Granja CV-C.

Atendiendo al archipiélago canario, el Test Chi Cuadrado no muestra diferencias significativas entre la parasitación de monogénidos dentro y fuera de las instalaciones de las Islas Canarias. Sin embargo, sí que existe diferencia significativa en cuanto a la prevalencia global y prevalencia de crustáceos, siendo mayor en las poblaciones salvajes.

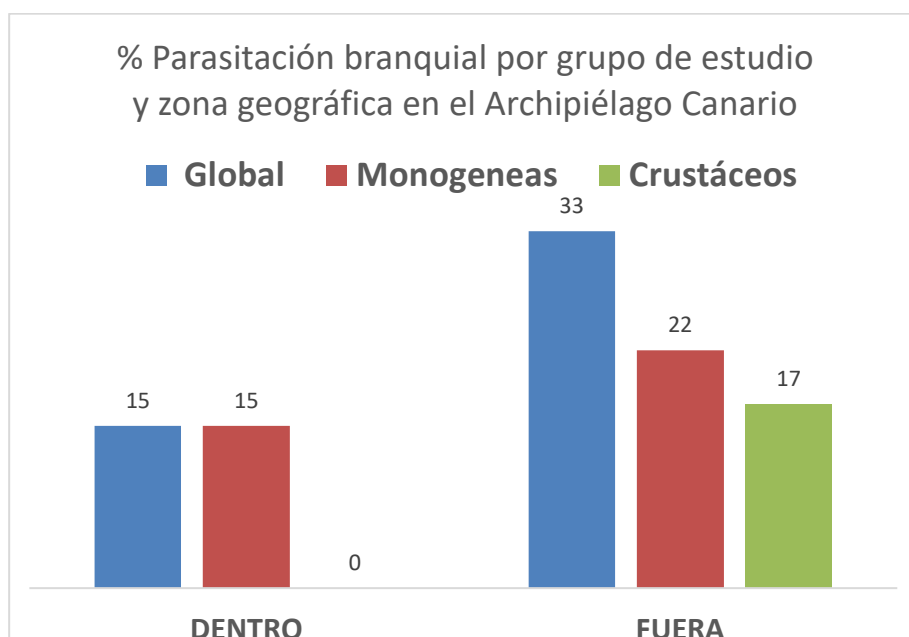


Figura 22: parasitación branquial por grupo estudiado en el Archipiélago Canario.

Se ha estudiado, asimismo, la riqueza parasitaria. Es decir, el número de especies parásitas halladas en cada ejemplar. En la Tabla 9 y la gráfica correspondiente se muestran los resultados obtenidos por grupos de estudio y localizaciones. Podemos observar que la riqueza parasitaria es mayor en especies salvajes que en especies cultivadas, en especial, en las poblaciones obtenidas de lonjas de la Comunidad Valenciana, es decir, en zonas alejadas de las instalaciones de acuicultura. En especies cultivadas, casi el 100% de las especies contenían sólo un tipo de especie parasitaria; en especies salvajes, alrededor de un 20% de especies estaban parasitadas por 2 tipos diferentes de parásitos. Sin embargo, en especies obtenidas de lonja, el 37,5% de los peces estudiados contenía 2 especies de parásitos diferentes.

Tabla 9: Porcentajes de riqueza parasitaria para especies cultivadas y salvajes en ambas regiones de estudio. (Comunidad Valenciana e Islas Canarias).

	1 tipo	2 tipos
CV_DENTRO	96.43	3.57
CV_FUERA	85.71	14.29
CV_LONJA	62.5	37.5
IC_DENTRO	100	0
IC_FUERA	80	20

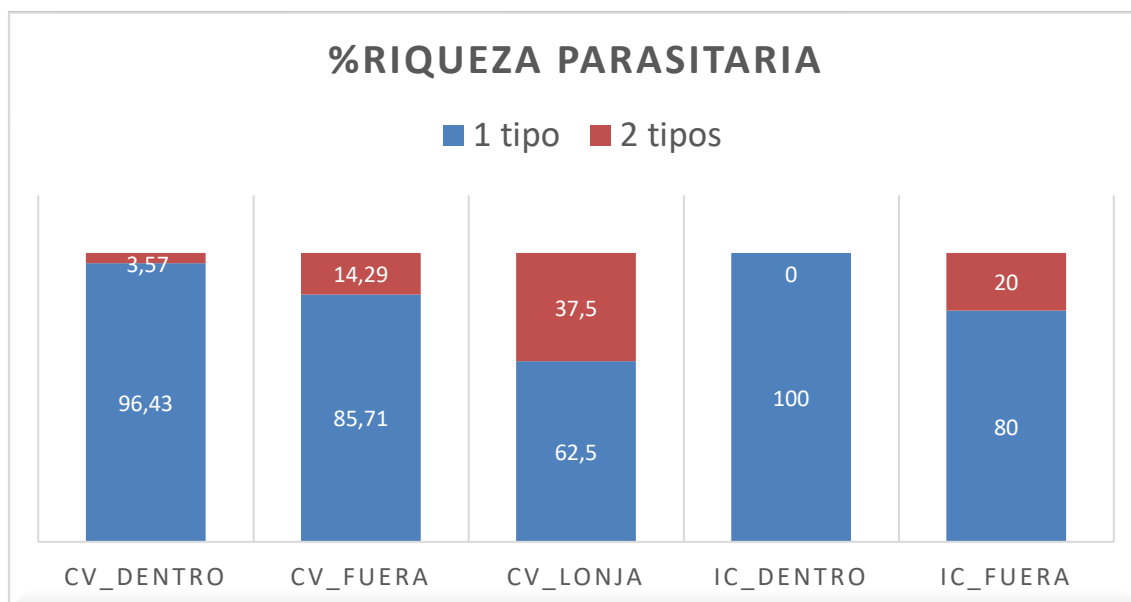


Figura 23: % de Riqueza parasitaria por grupo de estudio.

A continuación, la Figura 24 detalla la prevalencia de parasitación branquial por hospedador. Sobre las barras de la gráfica se indica el tamaño muestral que se ha obtenido de dicha especie. Tal y como indica la leyenda, las franjas naranjas corresponden a peces cultivados, las moradas a peces salvajes y las franjas azules corresponden a peces de lonja.

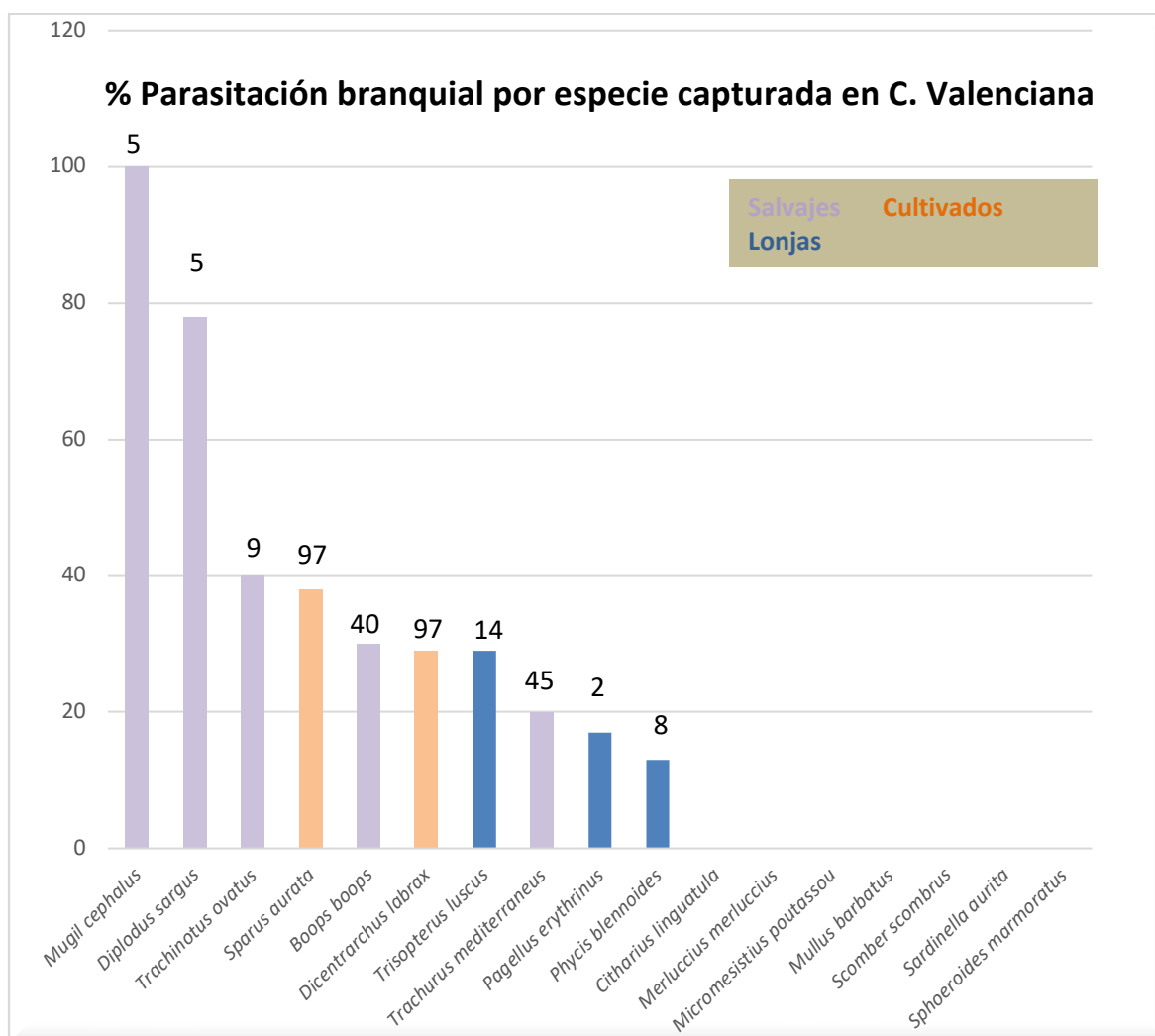


Figura 24: Parasitación branquial por especie estudiada en Comunidad Valenciana.

En cuanto a las especies salvajes, la repetibilidad de la especie resulta complicada debido al tipo de muestreo y tipo de especie. Por ejemplo, las especies más frecuentes alrededor de los viveros (*Trachurus mediterraneus*, *Boops boops*, *Trachinotus ovatus*) son las especies más capturadas, mientras que especies como *Spondyliosoma cantharus* son más difíciles de obtener.

El mayor número de ejemplares estudiados corresponden a los peces cultivados obtenidos del interior de los viveros. Se examinaron 97 ejemplares de dorada, (*Sparus aurata*) con una prevalencia de parasitación branquial de un 38%; y 97 ejemplares de Lubina (*Dicentrarchus labrax*), obteniendo una parasitación branquial media de 29% de los ejemplares.

Las diferencias en la parasitación branquial de lubinas y doradas son notablemente más altas en los ejemplares obtenidos en los viveros de la Comunidad Valenciana. Tal y como se muestra en la Figura 25) y Figura 26 podemos observar los porcentajes de parasitación en dorada y lubina, por región de estudio (Comunidad Valenciana e Islas Canarias), junto con las especies parásitas que se hallaron y sus correspondientes porcentajes de prevalencia.

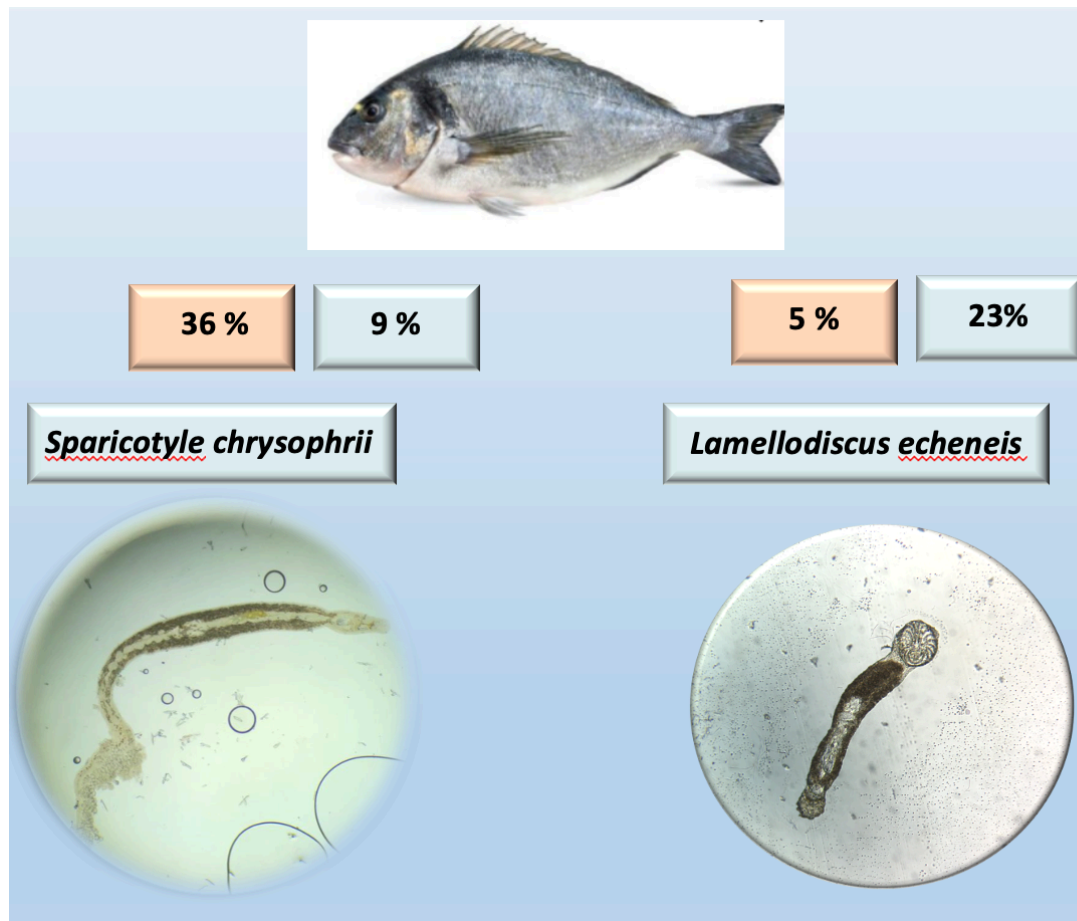


Figura 25: Porcentajes de parasitación branquial global en *Sparus aurata* tanto en CV (naranja) como en IC (azul), por prevalencia de parásitos.

Por ejemplo, sabemos que un 36% de las doradas muestreadas en CV poseían parasitación por *Sparicotyle chrysophrii*, frente al 9% en las Islas Canarias.

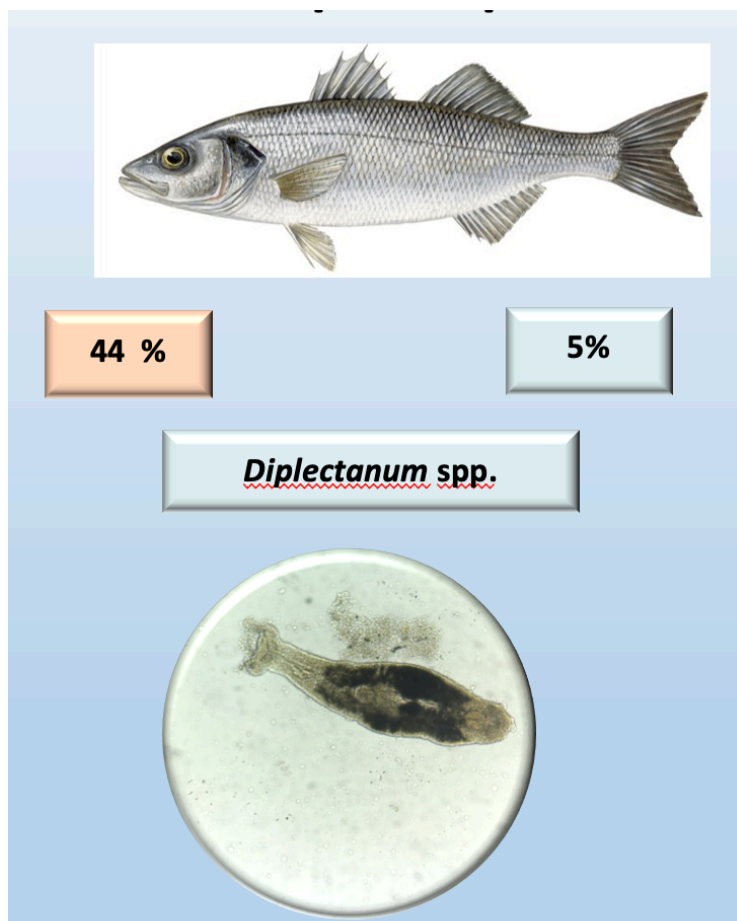


Figura 26: Porcentaje global de parasitación branquial de Lubina (*Dicentrarchus labrax*) junto con la parasitación branquial hallada por región de estudio y especie parasitaria. % Naranja: Parasitación en CV. % Azul: Parasitación en IC.

En las siguientes tablas se muestran las especies parasitarias identificadas según especie de hospedador, y grupo de estudio junto con el número de ejemplares de peces estudiados y el porcentaje de parasitación.

Tabla 10: Especies de monogénidos identificados en especies salvajes junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.

HOSPEDADOR	N	n	MONOGENEA IDENTIFICADO	% PARASITACIÓN BRANQUIAL
<i>Boops boops</i>	40	1	Microcotylidae	2.5
		1	<i>Microcotyle isyebi</i>	2.5
		1	NI	2.5
		3	<i>Pseudaxine trachuri</i>	7.5
<i>Diplodus sargus</i>	9	1	<i>Pyragraphorus hollisae</i>	11.11
		1	<i>Atraster</i> sp.	11.11

	2	<i>Atraster heterodus</i>	22.22
	2	NI	22.22
<i>Diplodus vulgaris</i>	4	Gastrocotylidae	25
<i>Scomber japonicus</i>	2	<i>Grubea pneumatophori</i>	50
<i>Sparus aurata</i>	1	<i>Sparicotyle chrysophrii</i>	100
<i>Trachinotus ovatus</i>	5	<i>Pyragraphorus hollisae</i>	20
	1	<i>Pseudaxine sp.</i>	20
	1	NI	20
<i>Trachurus mediterraneus</i>	45	<i>Pseudaxine trachuri</i>	6.67
	4	Microcotylidae	8.89
	1	<i>Allogastrocotyle bivaginale</i>	2.22
	1	<i>Gastrocotyle trachuri</i>	2.22

Tabla 11: Especies de crustáceos identificados en especies salvajes junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.

HOSPEDADOR	N	n	CRUSTÁCEO IDENTIFICADO	% PARASITACIÓN
<i>Diplodus annularis</i>	3	2	<i>Hatchekia sp.</i>	66.67
<i>Diplodus vulgaris</i>	2	2	<i>Hatchekia sp.</i>	100
<i>Diplodus sargus</i>	9	4	<i>Hatchekia sp.</i>	44.44
<i>Mugil cephalus</i>	5	2	<i>Hatchekia sp.</i>	40
		5	<i>Lernanthropus sp.</i>	100
<i>Boops boops</i>	40	6	<i>Hatchekia sp.</i>	15
<i>Trachurus mediterraneus</i>	45	1	<i>Lernanthropus sp.</i>	2.22

Tabla 12: Especies de monogénidos identificados en especies de lonja junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.

HOSPEDADOR	N	n	MONOGENEA IDENTIFICADO	% PARASITACIÓN BRANQUIAL
<i>Chelidonichthys cuculus</i>	1	1	<i>Plectanocotyle spp.</i>	100
<i>Helicolenus dactylopterus</i>	1	1	NI	100
<i>Pagellus erythrinus</i>	6	1	<i>Microcotyle erithrini</i>	16.67
<i>Phycis blennoides</i>	8	1	<i>Atrispinum acarne</i>	12.5
<i>Phycis phycis</i>	1	1	<i>Microcotyle erithrini</i>	100
<i>Sarpa salpa</i>	1	1	<i>Atrispinum acarne</i>	100
<i>Trisopterus luscus</i>	14	2	<i>Diclidophora sp.</i>	14.29

Tabla 13: Especies de crustáceos identificados en especies de lonja junto con el tamaño muestral y el porcentaje de parasitación.

HOSPEDADOR	N	n	CRUSTÁCEO IDENTIFICADO	% PARASITACIÓN
<i>Boops boops</i>	4	1	NI	25

<i>Diplodus vulgaris</i>	1	1	<i>Hatchekia</i> sp.	100
		1	<i>Gnathia</i> sp.	100
<i>Labrus merula</i>	1	1	<i>Hatchekia</i> sp.	100
		1	<i>Gnathia vorax</i>	100
<i>Lepidotrigla cavillone</i>	2	1	<i>Hatchekia</i> sp.	50
		1	<i>Gnathia vorax</i>	50
<i>Mullus surmuletus</i>	3	1	<i>Hatchekia</i> sp.	33.33
<i>Phycis phycis</i>	1	1	<i>Hatchekia</i> sp.	100
<i>Sarpa salpa</i>	1	1	<i>Gnathia vorax</i>	100
<i>Trisopterus luscus</i>	14	1	<i>Ceratothoa</i> sp.	7.14
		1	NI	7.14
<i>Uranoscopus scaber</i>	1	1	NI	100

La especie de crustáceo más frecuente en tejido branquial fue *Hatchekia spp.*, con una mayor población en las Islas Canarias.

Tabla 14: Prevalencia de crustáceos branquiales por región de estudio.

	<i>Hatchekia</i> spp.	<i>Gnathia</i> spp.	<i>Ceratothoa</i> spp.	<i>Lernanthropus</i> spp.
CV	5 ± 2	0	0	5 ± 2
Lonjas CV	4 ± 1.8	1 ± 0.8	3 ± 0.16	0
IC	17 ± 4.9	0	0	0

A continuación, se muestra la intensidad de parasitación de *Hatchekia* spp. por región de estudio. Esto quiere decir que en CV, de media se encontraron 4.67 ejemplares de *Hatchekia* spp por arco branquial.

Intensidad *Hatchekia* spp. :

- CV : 4.67 ± 2.5
- Lonjas CV : 10.4 ± 5.16
- IC : 2.1 ± 0.41

5.2. Resultados de parasitación intestinal por región de estudio.

En los resultados obtenidos no se han encontrado especies de parásitos en las poblaciones de acuicultura, por lo que la tabla siguiente no incluye este grupo poblacional.

Tabla 15: Prevalencia media global de parasitismo gastrointestinal por región de estudio.

	Nematodos	Anisakidae	Acantocéfalos
CV fuera	3 ± 1.4	1 ± 0.8	0
CV lonja	14 ± 3.2	7 ± 2.3	3 ± 1.6
IC fuera	2 ± 1.7	2 ± 1.7	2 ± 1.7

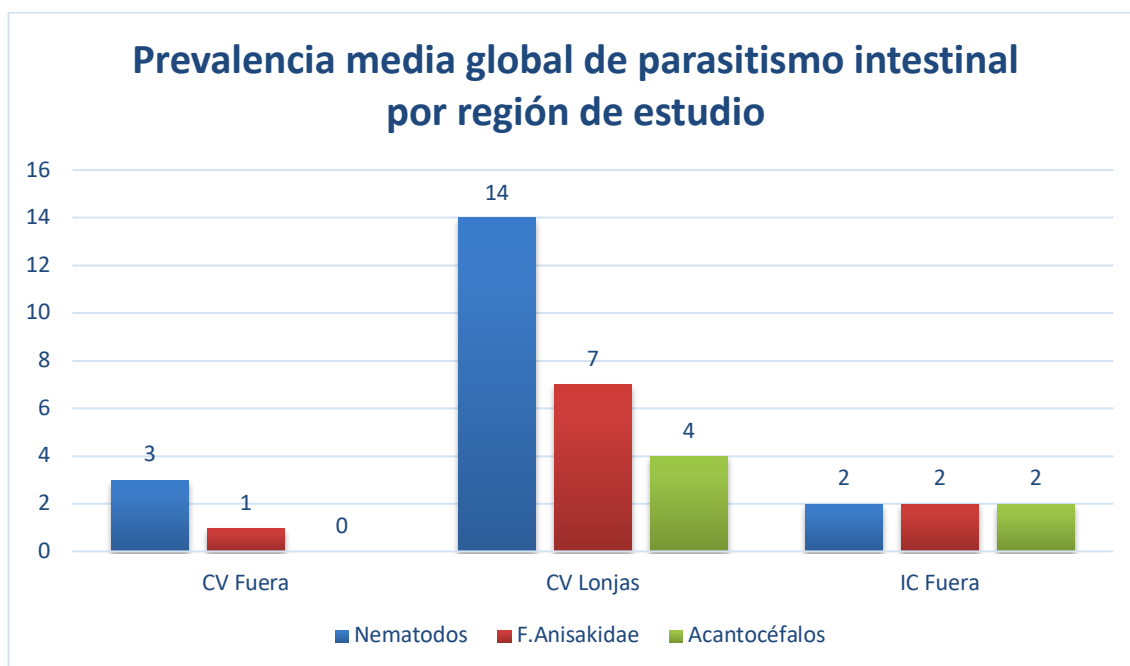


Figura 27: Prevalencia media global de parásitos intestinales en las especies salvajes.

A lo largo de este estudio se ha encontrado mayor prevalencia de nematodos intestinales en el exterior de las instalaciones de Comunidad Valenciana que en el exterior de los viveros del Archipiélago Canario. Al contrario, en CV no se han encontrado acantocéfalos.

Asimismo, podemos observar en la figura 28 como la mayor prevalencia de parásitos intestinales se han encontrado en las poblaciones de peces obtenidas de pesca extractiva y recogidas en lonjas de CV. Es decir, en poblaciones alejadas de las instalaciones de acuicultura. En estas poblaciones encontramos hasta un 14% de peces parasitados por nematodos gastrointestinales, y 7% del total parasitados por larvas de la Familia Anisakidae.

Esta familia es la más importante dentro de los nematodos gastrointestinales por su potencial zoonótico, siendo *Anisakis simplex* la especie más destacada en salud pública. Algunos ejemplares no pudieron ser identificados puesto que se necesitan técnicas morfológicas más avanzadas. Sin embargo, de entre los ejemplares recolectados consiguió aislarse un ejemplar de *Anisakis spp.* de una de las lonjas estudiadas en la Comunidad Valenciana.

5.3. Resultados de parasitación branquial de las explotaciones de Comunidad Valenciana

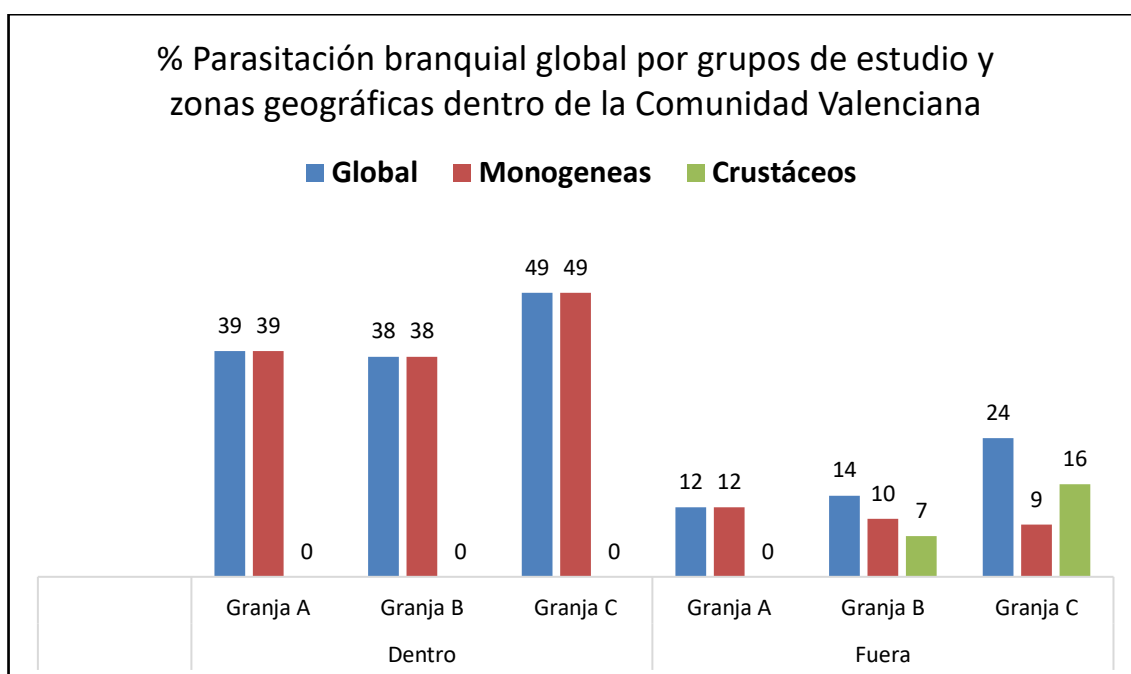


Figura 28: Parasitación branquial por zona geográfica dentro de Comunidad Valenciana.

5.3.1. Explotación acuícola CV-A.

En los peces de la explotación acuícola de CV-A, la parasitación media global de los peces cultivados es mayor que la prevalencia hallada en las poblaciones salvajes.

Los monogénidos son los principales parásitos hallados en tejido branquial, mientras que no se hallaron crustáceos en ninguna de las poblaciones de esta localización.

Tabla 16: Prevalencia media global y su error estadístico por grupo de estudio en las instalaciones de CV-A.

		Prev. global (media + e.e)	Prev. monogéneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
CV-A	D	39 ± 7.4	39 ± 7.4	0
	F	12 ± 5.8	12 ± 5.8	0

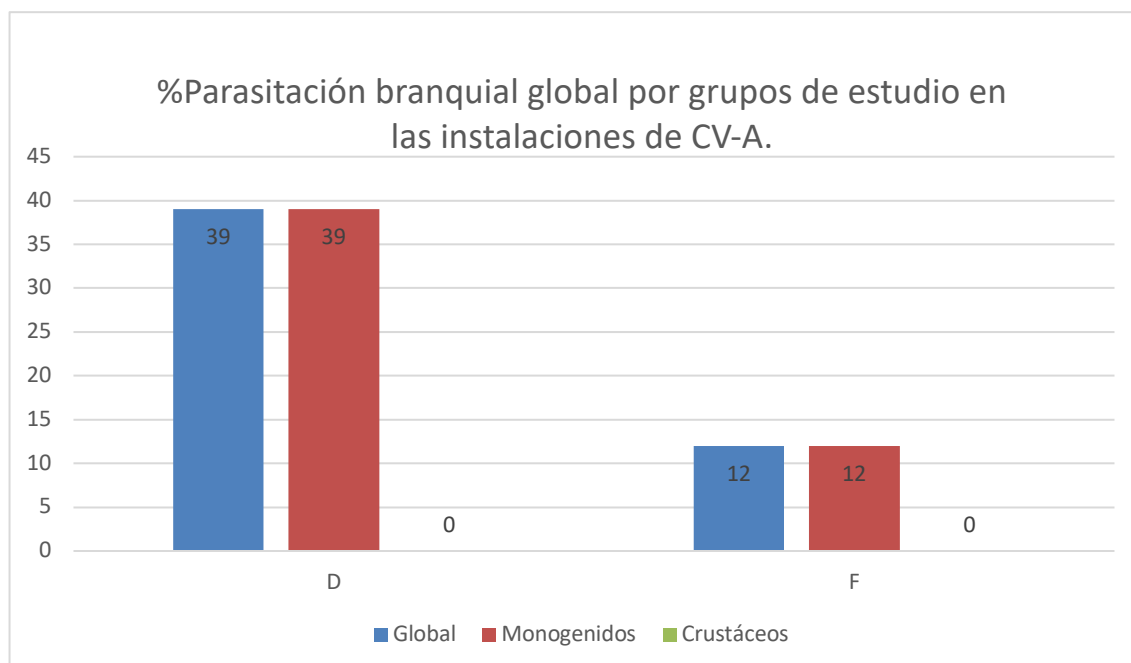


Figura 29: Parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-A.

Respecto a *Sparicotyle chrisophrii*, se encontró una prevalencia de 27% de este parásito en tejido branquial de las Doradas (*Sparus aurata*) recogidas en los viveros de CV-A. Asimismo, de las lubinas recogidas en esta misma instalación (*Dicentrarchus labrax*) se encontraron parasitadas por *Diplectanum spp.* en un 64%.

5.3.2. Explotación acuícola CV-B.

En las instalaciones acuícolas de CV-B se mantuvo la tendencia de una mayor parasitación branquial por monogénidos en el interior de los viveros, sin presentar especies de parásitos crustáceos. Sin embargo, las poblaciones salvajes estudiadas si presentaron especies crustáceas a nivel branquial, casi con la misma prevalencia que los monogénidos.

Tabla 17: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-B.

		Prev. global (media + e.e)	Prev. monogéneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
CV-B	D	38 ± 7.3	38 ± 7.3	0
	F	14 ± 5.5	10 ± 4.6	7 ± 4

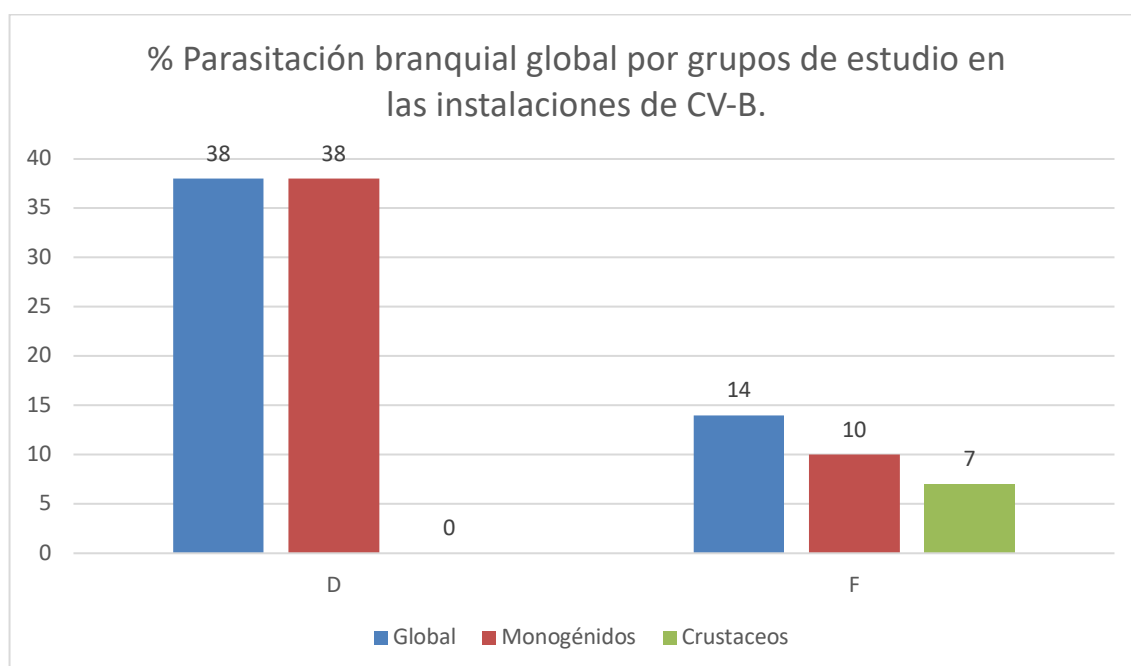


Figura 30: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-B.

Las especies muestreadas de Lubina (*Dicentrarchus labrax*) de cultivo presentaban una prevalencia media de parasitación branquial del 38 siendo *Diplectanum spp.* el único parásito encontrado.

Respecto a las especies halladas en los peces salvajes, se encontró un ejemplar de *S. chrisophrii* en una dorada salvaje, especie principal en las doradas de cultivo. Sin embargo, en esta instalación no pudieron muestrearse peces de cultivo de dicha especie, por lo que no pudo determinarse si el parásito se encuentra presente en los ejemplares del interior de los viveros de CV-B y por tanto plantear una posible transmisión.

5.3.3. Explotación acuícola CV-C

En las instalaciones acuícolas de CV-C la prevalencia e intensidad media global de los peces cultivados es mayor que la prevalencia de parasitación media global de las especies salvajes. Destacan las especies monogénidas en los peces de viveros, muy por encima de su prevalencia en especies salvajes. Sin embargo, las especies del subfilo crustácea solo han sido halladas en las poblaciones salvajes, con un 16% de prevalencia. En este caso podemos observar una mayor prevalencia de estas últimas especies en peces salvajes parásitas frente al 9% de prevalencia media de monogénidos encontrados en estas mismas poblaciones.

Tabla 18: Prevalencia media global y su error estadístico de la parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de CV-C.

		Prev. global (media + e.e)	Prev. monogéneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
CV-C	D	49 ± 7.5	49 ± 7.5	0
	F	24 ± 6.5	9 ± 4.3	16 ± 5.5

Las doradas (*Sparus aurata*) de cultivo estudiadas poseían 2 especies parásitas diferentes de tipo monogenidos. *Lamellodiscus echeneis* con una prevalencia media y su

error de 9 ± 4.3 ; y *S.Chrisophrii*, con una prevalencia media global y error estadístico de 42 ± 7.4 , destacando esta ultima como principal parásito de los peces de cultivo estudiados.

5.4. Resultados de la parasitación branquial en Lonjas de la Comunidad

Valenciana

5.4.1. Lonja de LA

En la siguiente tabla se resumen los resultados estadísticos de parasitación media global a nivel branquial de los peces obtenidos en la lonja de LA. En la parasitación media, de un 25%, ha destacado la presencia de especies del subfilo Crustacea, con un 18% de prevalencia media, frente a un 13% de presencia de parásitos de tipo monogénidos.



Figura 31: Ejemplares obtenidos en la Lonja de LA tras su identificación.

Tabla 19: Prevalencia media global y error estadístico de la parasitación branquial hallada en los peces obtenidos de la Lonja de LA.

	Prev. global (media + e.e)	Prev. monogéneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
LA	25 ± 6.9	13 ± 5.3	18 ± 6.1

Las especies de peces obtenidos en lonjas difieren ampliamente de las especies obtenidas en el exterior de los viveros, por lo que no puede ser comparada la prevalencia de sus parasitaciones. Sin embargo, si se encuentra una parasitación común de

Atrispinum acarne en dos ejemplares obtenidos en la lonja de LA (concretamente *Sarpa salpa* y *Phycis blennoides*), con un ejemplar de dorada de cultivo obtenido en las instalaciones de CV-C.

5.4.2. Lonja de LB/LC

La siguiente tabla muestra la prevalencia media global con su error estadístico de parasitación en los peces obtenidos de las lonjas de LB y LC. Debido a la imposibilidad de realizarse una segunda visita a la Lonja de LB decidió realizarse en las instalaciones de la Lonja de LC, debido a su proximidad geográfica, y agruparse los resultados.

Tabla 20: Prevalencia media global y error estadístico de la parasitación branquial hallada en los peces obtenidos de la Lonja de LB y LC

	Prev. global (media + e.e)	Prev. monogéneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
LB+LC	3 ± 2.5	0	3 ± 2.5

La parasitación branquial hallada es muy baja, con solo un 3% de los ejemplares muestreados parasitados, destacando las especies del subfilo Crustacea como el 100% de las especies identificadas.

5.4.3. Lonja de LD

En la siguiente tabla y gráfica se representa la prevalencia de parasitación media global de las especies muestreadas procedentes de la lonja de LD.

De nuevo, en la parasitación media destacan la presencia de especies parasitas del tipo monogénidos con un 7%, por encima de las especies del subfilo Crustacea, con un 5%, aunque sin una diferencia significativa.

Tabla 21: Prevalencia media global y error estadístico de la parasitación branquial hallada en los peces obtenidos de la Lonja de LD.

	Prev. global (media + e.e)	Prev. monogéneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
LD	12 ± 5.2	7 ± 4.1	5 ± 3.4

5.5. Resultados de parasitación branquial en las explotaciones de las Islas

Canarias

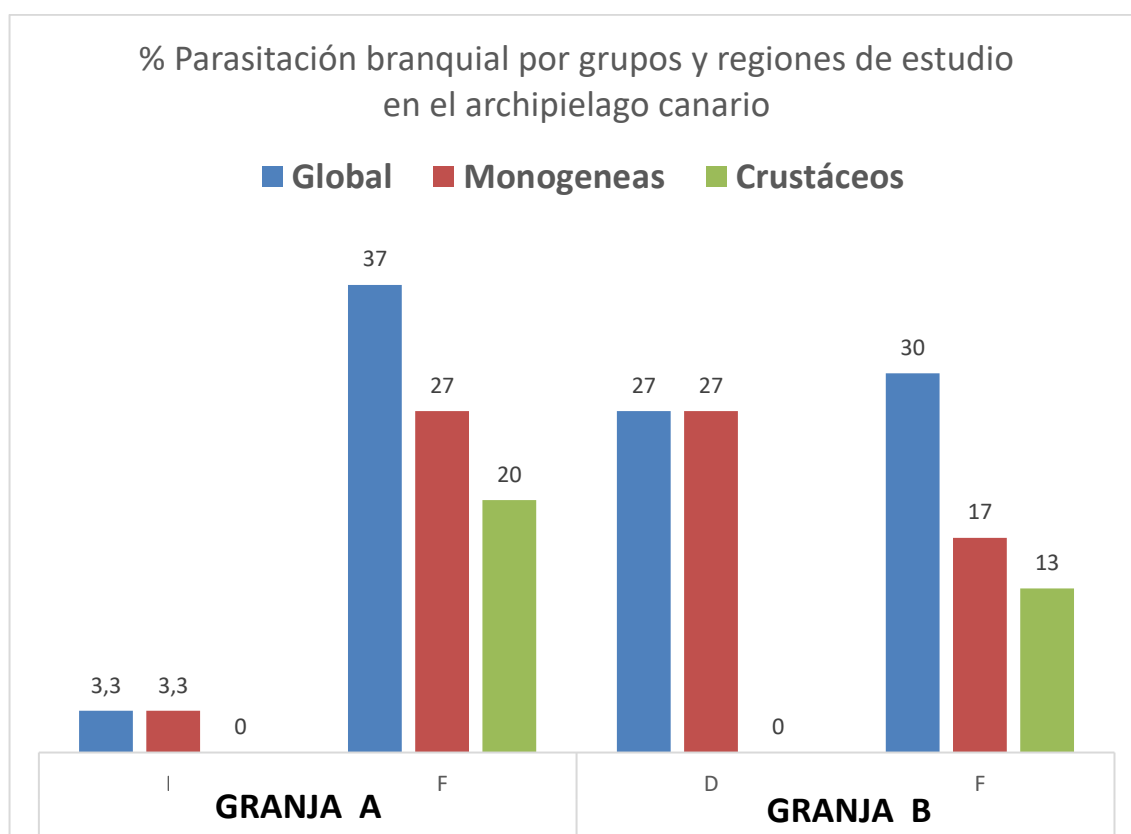


Figura 32: Parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones del archipiélago canario. Granja A: IC-A; Granja B: IC-B.

5.5.1. Resultados de la explotación acuícola IC-B.

En la gráfica se resume la parasitación branquial por grupos de estudio en el archipiélago canario, correspondiendo la granja A con las instalaciones de IC-A y Granja B con las instalaciones acuícolas de IC-B.

Estas últimas se muestran detalladas en la tabla 22 y la gráfica siguiente. Se pudo observar una mayor prevalencia global de parásitos branquiales en las especies sinantrópicas, con una menor prevalencia en peces cultivados. Los parásitos de tipo monogenidos mantienen una mayor presencia en ambos grupos de estudio sin presencia de parásitos del subfilo crustacea, y, los cuales solo son encontrados en peces salvajes.

Tabla 22: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de IC-B.

		Prev. global (media + e.e)	Prev. monogeneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
IC-B	D	27 ± 8.2	27 ± 8.2	0
	F	30 ± 8.5	17 ± 6.9	13 ± 6.3

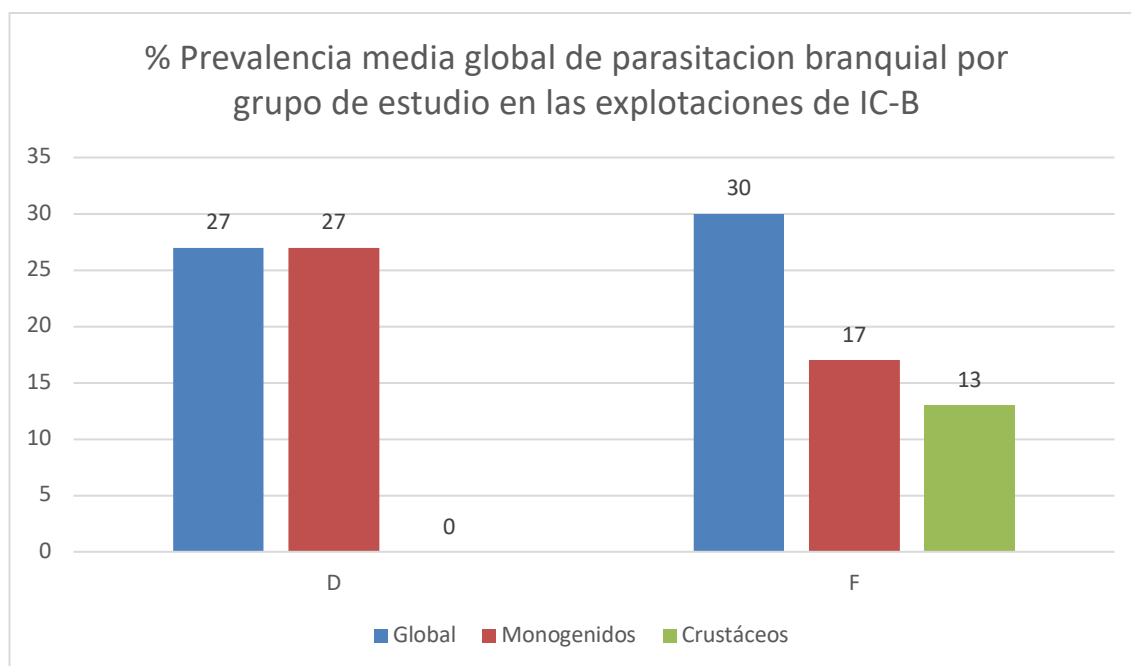


Figura 33: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las explotaciones de IC-B

Dentro de las doradas (*Sparus aurata*) de cultivo estudiadas en estas instalaciones, se encontró una prevalencia de 9% de *S.Chrisophrii*, frente a un 23% de *Lamelodiscus sp.*

Por otro lado, las lubinas de cultivo estudiadas (*Dicentrarchus labrax*) presentaron una prevalencia media de *Diplectanum sp* a nivel branquial de 13%.

5.5.2. Resultados de la explotación acuícola IC-A.

En las instalaciones de IC-A se encontró muy baja prevalencia de parasitación branquial en peces cultivados, con tan solo un 3,3% de los ejemplares estudiados. El 100% de esta parasitación venía dada por parásitos del tipo monogénidos, concretamente *Diplectanum sp* (estas instalaciones no cultivan ejemplares de dorada (*Sparus aurata*)).

Tabla 23: Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las instalaciones de IC-A.

		Prev. global (media + e.e)	Prev. monogeneas (media + e.e)	Prev. crustáceos (media + e.e)
IC-A	D	3.3 ± 3.3	3.3 ± 3.3	0
	F	37 ± 8.9	27 ± 8.2	20 ± 7.4

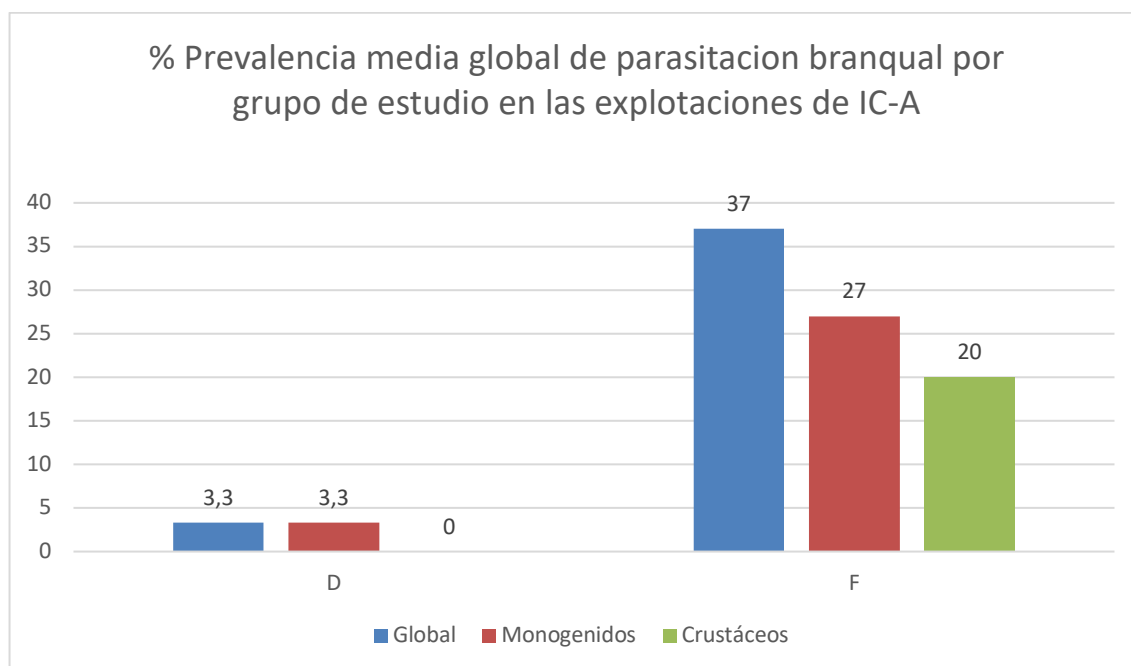


Figura 34: % Prevalencia media global de parasitación branquial por grupo de estudio en las explotaciones de IC-A.

Mientras, en las especies sinantrópicas la parasitación media global rondó un 37%, con un 27% correspondiente a parásitos de tipo monogénidos.

5.6. Resultados del estudio anatomopatológico

Se revisaron muestras de branquias, intestino y músculo.

En el examen histológico de las branquias, se vieron varios cambios patológicos. Se observó la pérdida de la estructura normal de las lamelas, con fusión de algunas lamelas y atrofia de otras (Figura 1A). En algunas porciones de las lamelas se observó gran cantidad de leucocitos, con restos de necrosis (Figura 1, B y C). En algunas de estas lamelas se observó, hiperplasia del epitelio braquial normal e hiperplasia de células mucosas, además de células descamadas (Figura 1D).

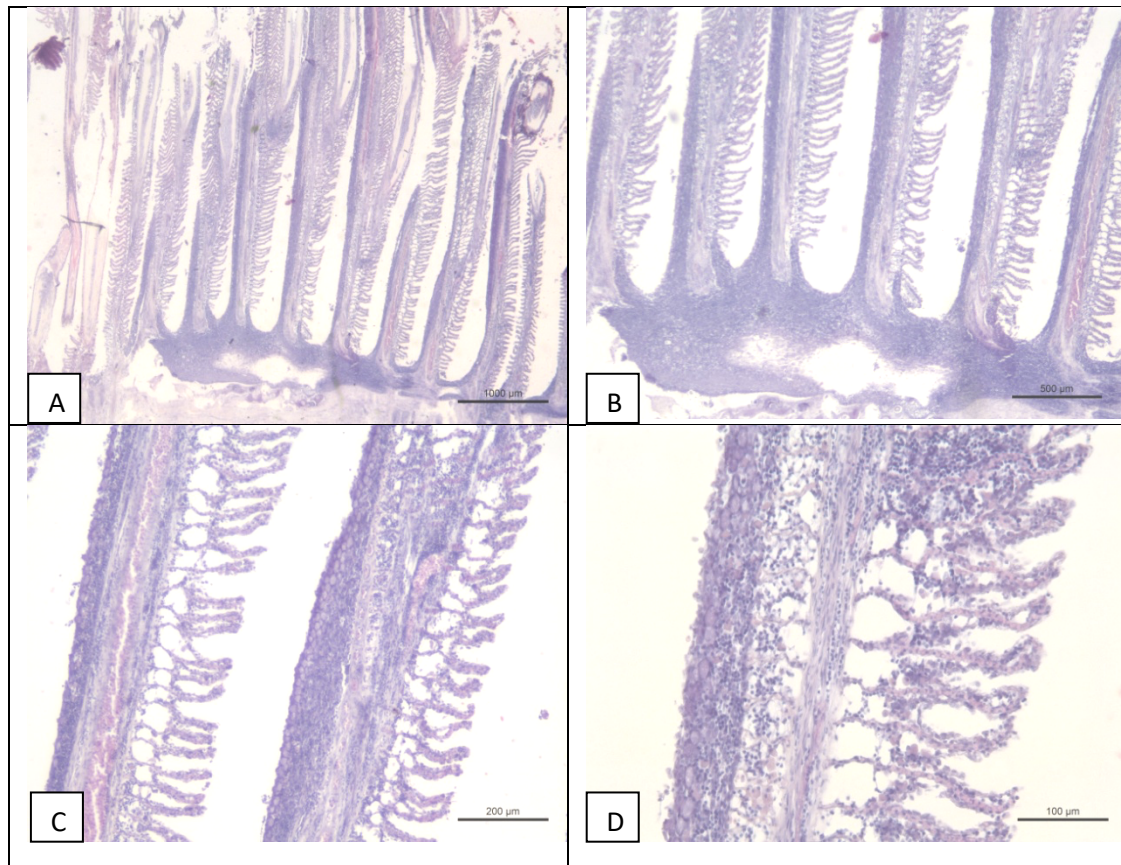


Figura 35. I20-121. Tinción H-E. Branquia. A.- Branquias con fusión de lamelas y atrofia lamelar. B.- Infiltrado inflamatorio con restos de necrosis en zona basal de las lamelas. C.-Infiltrado inflamatorio con restos de necrosis. D.- Hiperplasia de células mucosas y presencia de células descamadas

En algunos casos, las branquias observadas presentaban lesiones muy severas incluso con presencia de hemorragias (Figura 2, A y B).

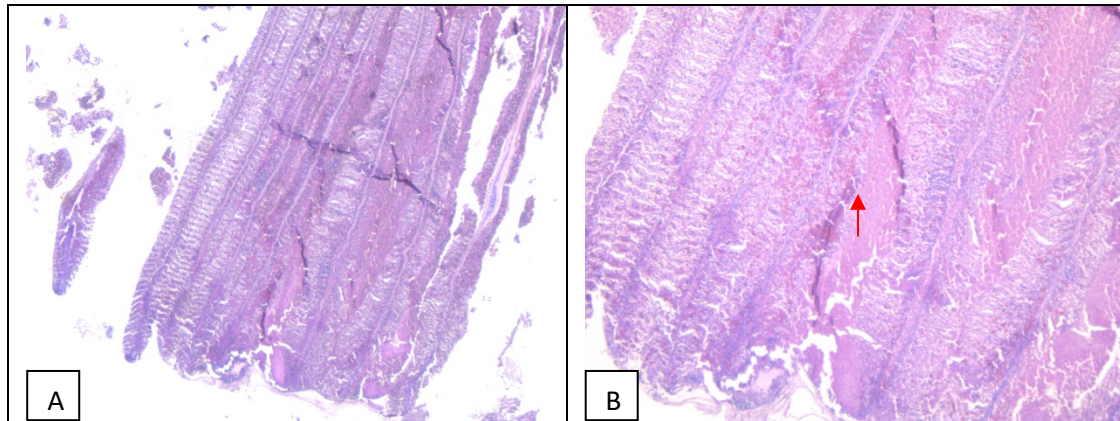


Figura 36 I20-139. Tinción H-E. Cortes histológicos de branquias con fusión de lamelas, inflamación y presencia de hemorragias (flecha roja).

En algunas de las branquias observadas, el número de heterófilos era muy elevado (Figura 3).

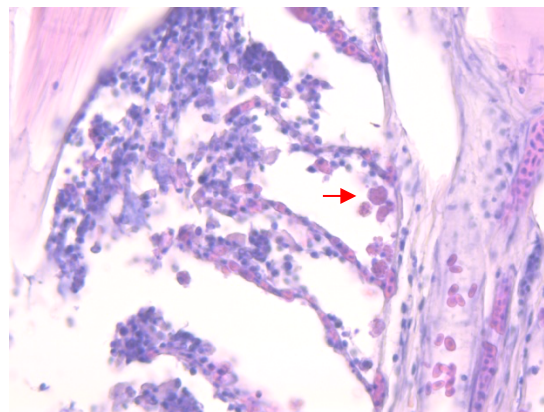


Figura 37. I20-137. Tinción H-E. Corte histológico de branquias con elevado número de heterófilos con gránulos acidófilos (flecha roja).

En las branquias de una caballa (*Scomber scombrus*), se observaron estructuras eosinófilas, con un núcleo sin presencia de gránulos, lo que lo diferenciaba de los heterófilos, ya que estos presentaban gránulos acidófilos en su interior (Figura 4, A y B). Estas estructuras eran compatibles con *Amyloodinium* spp (Yemmen y Bahri, 2017).

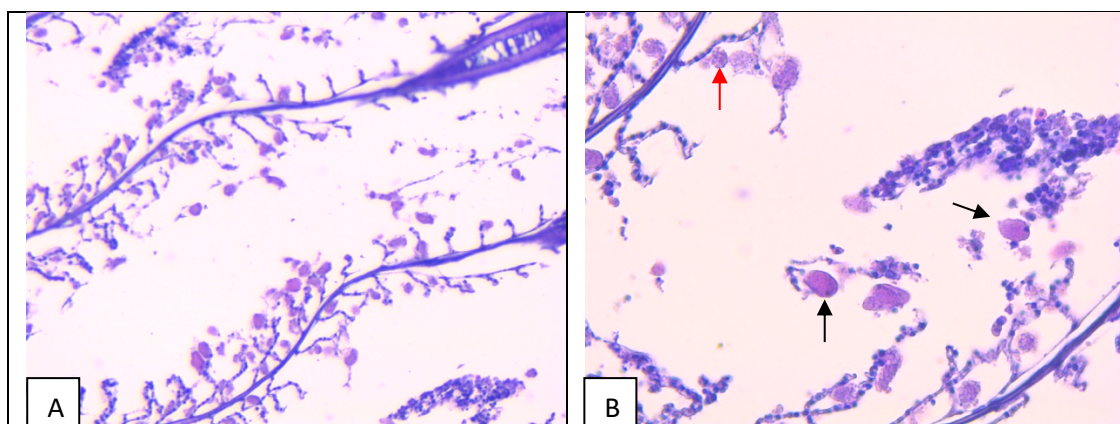


Figura 38. I20-112. Tinción H-E. Cortes histológicos de branquias. Se pueden observar heterófilos con sus gránulos acidófilos característicos (flecha roja), y estructuras compatibles con parásitos (flecha negra).

En algunas branquias, que presentaban las lesiones anteriormente descritas, se observó la presencia de estructuras compatibles con parásitos monogéas (Figura 5, A-D).

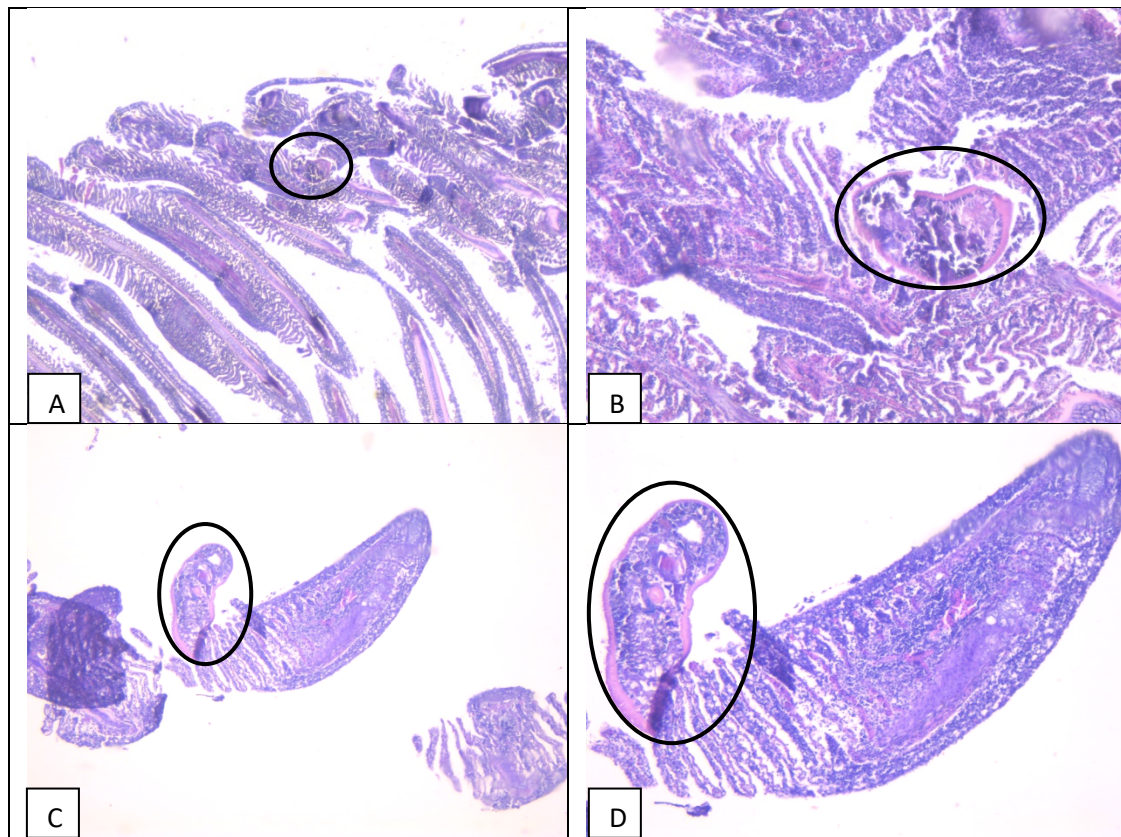


Figura 39. I20-129 (A y B) I20-130 (C y D). Tinción H-E. Cortes histológicos de branquias con parásitos adheridos a la superficie (rodeado por círculo).

Respecto a las muestras de intestino, no se observó nada destacable, salvo en una muestra de dorada (*Sparus aurata*) donde se observó la presencia de infiltrado inflamatorio submucoso y pérdida parcial del epitelio (Figura 6A). Dentro del epitelio intestinal, se observó pequeñas estructuras aparentemente quísticas con material algo más eosinófilo en su interior (Figura 6 B, punta de flecha). Estas estructuras podrían ser compatibles con algún tipo de microsporidium (Palenzuela *et al.* 2014).

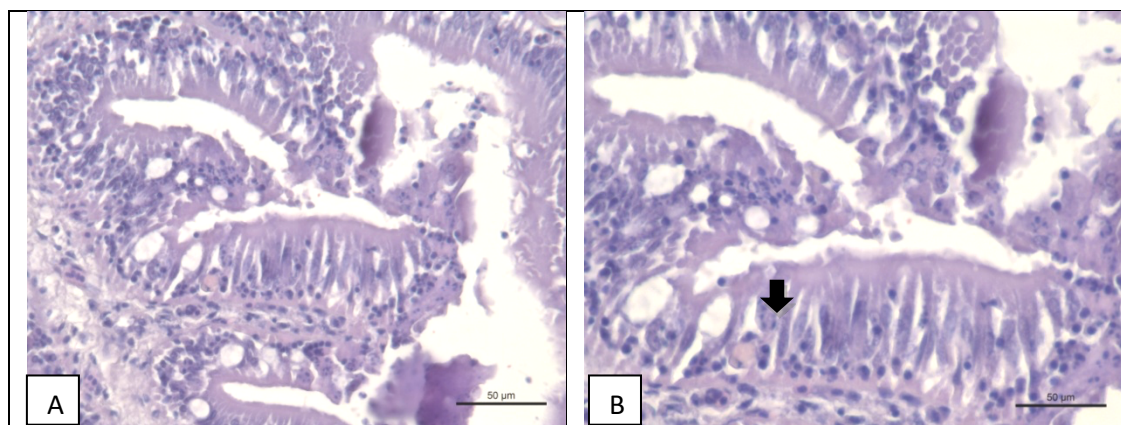


Figura 40. I20-96. Tinción H-E. Cortes histológicos de mucosa intestinal. En figura B, dentro algunos enterocitos se pueden observar estructuras compatibles con una forma parasitaria (Punta de flecha).

Histológicamente, en las muestras de músculo no se observaron muchas lesiones. En algún ejemplar de Chucla (*Spicara maena*), si se observaron cambios destacables. Se observó la presencia de estructuras quísticas multifocales localizadas dentro de las fibras musculares cuyo tamaño aproximado variaba entre 100-150 micras con ausencia de reacción inflamatoria (Figura 3). La estructuras quísticas eran compatibles con myxosporidios (Molnár y Székely, 2014).

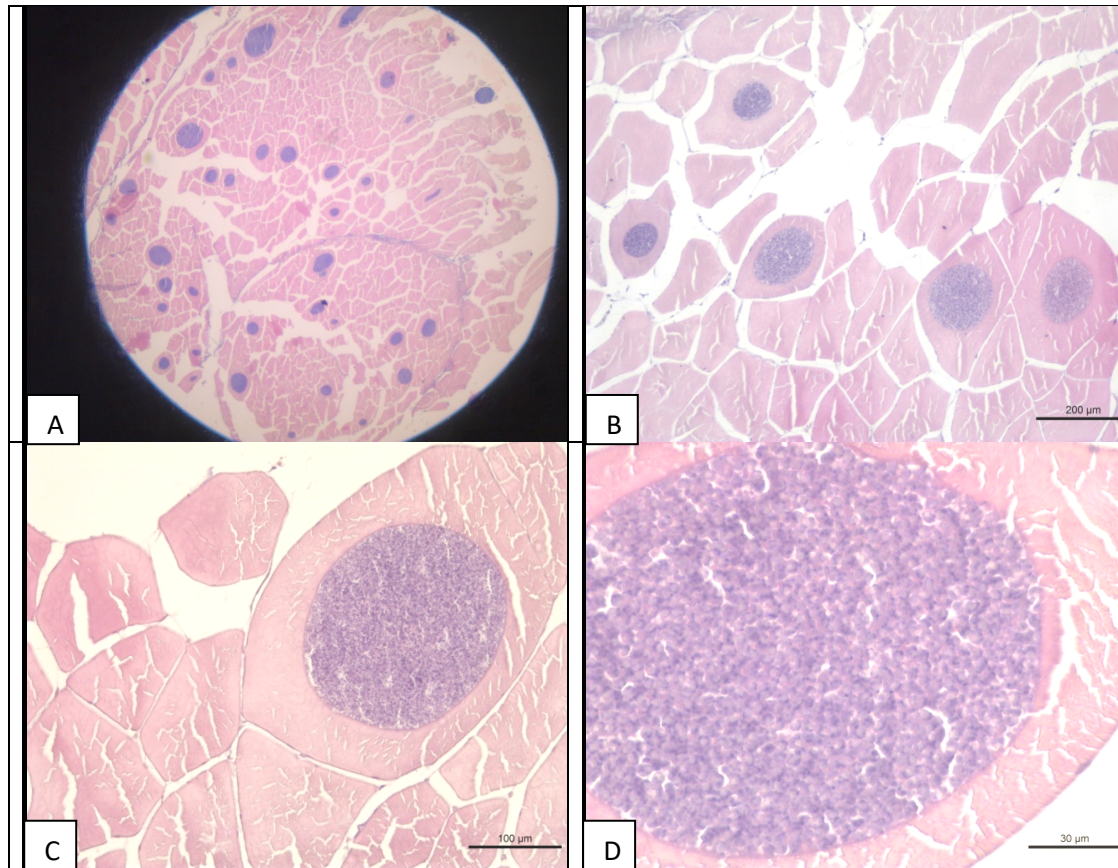


Figura 41. I20-104 (A-D). Tinción H-E. Cortes transversales de fibras musculares con presencia de quistes.

5.7. Resultados de presencia de *Cryptosporidium spp.* en peces obtenidos de Comunidad Valenciana

Los ejemplares estudiados para la detección molecular de *Cryptosporidium spp.* procedían tanto de poblaciones sinantrópicas como cultivadas de las instalaciones de CV-A y CV-B, así como de ejemplares de pesca extractiva y recogidos en las 4 lonjas de estudio.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el estudio molecular:

Tabla 24: Ejemplares positivos, grupo al que pertenecen y localización geográfica.

Ejemplar positivo	Especie de hospedador	Grupo	Localización	Identificación molecular
1	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Cultivo	CV-A	<i>Cryptosporidium molnari</i>
2	Alacha (<i>Sardinella aurita</i>)	Sinantrópico	CV-B	<i>Cryptosporidium molnari</i>
3	Alacha (<i>Sardinella aurita</i>)	Sinantrópico	CV-B	<i>Cryptosporidium molnari</i>
4	Boga (<i>Boops boops</i>)	Lonja	LB	<i>Cryptosporidium molnari</i>

La ampliación de la información relativa a la identificación de *Cryptosporidium spp.* en ejemplares de Comunidad Valenciana se realiza en el Anexo.2.1.1.1.

6. Anexos

ANEXO I: Descripción del material utilizado durante el procesado y conservación de las muestras en laboratorio

Tabla 25: Material utilizado durante el procesado y conservación de muestras.

Material utilizado durante el procesado y conservación de muestras

Balanza de precisión o Báscula	Instrumento de pesaje
Ictiómetro	Instrumento utilizado para medir la longitud y/o anchura de los peces
Papel de aluminio	Lámina de aluminio de muy poco grosor utilizado, en este caso, como cubre superficies para realizar las necropsias sobre éstas.
Hojas de ictiopatología	Documento impreso en el que aparece una tabla modelo con el número de identificación de cada animal, fecha de captura, granja, medidas biométricas (peso y longitud) así como una recopilación de las posibles lesiones que pueden observarse con mayor frecuencia. Además, dispone de un apartado de comentarios y otro de la identificación parasitaria realizada. En el anexo X se adjunta dicha hoja modelo.
Hojas de solicitud de Anatomía patológica	Documento de registro y solicitud propio del departamento de anatomía patológica.
Histofix?	Solución de formaldehído al 3,7-4% utilizada como conservante fijador en anatomía patológica y para tremátodos.
Placas de petri	Instrumento de laboratorio redondo de plástico o vidrio que consta de una base y una cubierta. Muy utilizado en microbiología, pero en el presente estudio fue utilizado como recipiente en el que se introdujeron las branquias para ser conservadas en fresco hasta su estudio bajo la lupa binocular.
Criotubos	Tubos de polietileno con capacidad para X ml diseñados para el almacenamiento de material orgánico. En el presente estudio fueron utilizados para almacenar parásitos de pequeño tamaño.
Botes tapa verde 5 ml	Recipientes cilíndricos con tapa autoenroscable de polietileno con capacidad para 5 mililitros en los que se conservan las

Hojas de bisturi

especies parásitas como copépodos o isópodos de mayor tamaño.

Instrumento desechable en forma de cuchillo pequeño y de punta fina de acero inoxidable utilizado para realizar incisiones sobre tejidos.

Mango de bisturi

Instrumento quirúrgico utilizado como soporte de la hoja de bisturí.

Tijeras de varios tamaños

Instrumento utilizado para cortar objetos, tejidos, entre otros. Dependiendo del tamaño del pescado se utilizaron de un tamaño u otro.

Pinzas quirúrgicas sin dientes

Herramienta quirúrgica utilizada para sostener, separar o recoger tejidos, entre otros, sin dañarlos.

Aguja para disección de punta recta y mango de plástico o punzón

Instrumento compuesto de una aguja y un mango de plástico utilizado, en este caso, para separar de forma cautelosa las lamelas de las branquias y desprender parásitos localizados en éstas.

Lupa binocular

Instrumento óptico con capacidad de aumentar y observar muestras en tres dimensiones.

Micropipetas de volumen variable

Instrumento de laboratorio utilizado para recoger y expulsar pequeñas cantidades de solución líquida con gran precisión.

Microscopio

Instrumento óptico de gran aumento que permite visualizar muestras, entre otros, no perceptibles para el ojo humano.

Portaobjetos

Lámina de vidrio transparente y rectangular utilizada como soporte de pequeñas

muestras para poder ser observadas bajo el microscopio o lupa binocular.

Cubreobjetos

Hoja de plástico o cristal transparente, muy fina y forma variable. Se coloca sobre una muestra para ser observada al microscopio.

ANEXO II: Referencias bibliográficas

- Dezfuli, B.S.; Giari, L.; Simoni, E.; Menegatti, R.; Shinn, A.P.; Manera, M. (2007). Gill Histopathology of Cultured European Sea Bass, *Dicentrarchus Labrax* (L.), Infected With *Diplectanum Aequans* (Wagener 1857) Diesing 1958 (Diplectanidae: Monogenea). *Parasitol Res.* 100(4):707-13. doi: 10.1007/s00436-006-0343-4.
- Molnár, K. and Székely, C. (2014). Tissue preference of some myxobolids (Myxozoa: Myxosporea) from the musculature of European freshwater fishes. *Dis Aquat Organ* 107(3):191-8. doi: 10.3354/dao02688.
- Palenzuela, O.; Redondo, M.J.; Cali, A.; Takvorian, P.M.; Alonso-Naveiro, M.; Alvarez-Pellitero, P.; Sitjà-Bobadilla, A. (2014). A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family *Enterocytozoonidae*. *Int J Parasitol* 44(3-4):189-203. doi: 10.1016/j.ijpara.2013.10.005.
- Yemmen, C. and Bahri, S. (2017). Seasonality of *Amyloodinium ocellatum* Brown 1931 (Dinophyceae) infesting the Senegalese sole *Solea senegalensis* from Bizerte lagoon, Tunisia. *J Fish Dis* 40 (6):853-857. doi: 10.1111/jfd.12551.