



MINISTERIO  
DE AGRICULTURA,  
ALIMENTACIÓN Y MEDIO  
AMBIENTE

SECRETARÍA GENERAL DE AGRICULTURA  
Y ALIMENTACIÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA  
PRODUCCIÓN AGRARIA

SUBDIRECCIÓN GENERAL  
DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL  
Y TRAZABILIDAD

# **MANUAL PRÁCTICO DE OPERACIONES EN LA LUCHA CONTRA CONTRA LAS ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS**

Enero 2015

**DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN  
AGRARIA  
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y  
TRAZABILIDAD**

---



---

*El presente manual tiene por objeto servir como **guía de trabajo que permita** a los Servicios Veterinarios Oficiales ofrecer una respuesta rápida y eficaz en caso de Sospecha y de Confirmación de determinadas enfermedades en los animales de la acuicultura, con el fin de controlar y conseguir en última instancia su erradicación.*

*NOTA: Este manual debe ser utilizado junto con el Plan Coordinado Estatal de Alerta Sanitaria Veterinaria y la normativa vigente en materia de sanidad y bienestar animal.*

---



## INTRODUCCIÓN

El presente documento, denominado en adelante “Plan de Contingencia”, es el conjunto de actuaciones y medidas que se deben adoptar por parte de operadores y autoridades competentes ante la sospecha o aparición de determinadas enfermedades en los animales de la acuicultura, con el fin de controlar y conseguir en última instancia, su erradicación.

Establece los requisitos y las actuaciones a realizar por los agentes relacionados con los animales de la acuicultura y por los servicios veterinarios oficiales en caso de sospecha o aparición de un foco de enfermedad en los animales acuáticos o de la acuicultura incluida en el Anexo IV del RD1614/2008 o de una enfermedad emergente, quedando sujeta a disposiciones legales para su control.

Las medidas de control que deben aplicarse ante la aparición de un brote de estas enfermedades están legisladas en el ámbito comunitario por la Directiva 2006/88 y, en el ámbito nacional, por dicho Real Decreto cuando se presenten en las explotaciones de acuicultura, los centros de depuración y expedición de moluscos o similares (en adelante centros), en los establecimientos de transformación autorizados<sup>1</sup>, incluidos los centros de depuración de moluscos o de expedición, o en el medio natural.

En este manual se han incluido los aspectos más relevantes en cuanto a:

1. la política a seguir ante la sospecha y confirmación de un brote.
2. las medidas a adoptar ante una sospecha.
3. las medidas a adoptar ante un brote de enfermedades exóticas, no exóticas o emergentes.
4. la vacunación de emergencia.
5. el procedimiento para el vaciado sanitario, la limpieza y desinfección y la repoblación de explotaciones.
6. La eliminación de cadáveres y desperdicios de animales acuáticos ante la aparición de un foco de enfermedad

---

<sup>1</sup> Son los centros autorizados para el sacrificio de animales de acuicultura procedentes de medidas de policía sanitaria y que se encuentran afectados por el RD1614/2008.



## INDICE

<b>SECCIÓN 1ª</b> BASE LEGAL.....	5
<b>SECCIÓN 2ª</b> ACTUACIONES ANTE LA SOSPECHA DE ENFERMEDAD EN UNA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS.....	8
<b>SECCIÓN 3ª</b> CONFIRMACIÓN DE UNA ENFERMEDAD EXOTICA O EMERGENTE DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN UNA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS.....	13
<b>SECCIÓN 4ª</b> CONFIRMACIÓN DE UNA ENFERMEDAD NO EXÓTICA DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN UNA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS .....	19
<b>SECCIÓN 5ª</b> SOSPECHA Y CONFIRMACIÓN DE UNA ENFERMEDAD INCLUIDA EN EL ANEXO IV DEL RD1614/2008 O EMERGENTE EN ANIMALES ACUÁTICOS SILVESTRES.....	21
<b>SECCIÓN 5ª</b> MÉTODOS DE SACRIFICIO, DESTRUCCIÓN Y ELIMINACIÓN DE ANIMALES DE LA EXPLOTACIÓN.....	24
<b>SECCIÓN 7ª</b> SOSPECHA O DETECCIÓN DE ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN MEDIOS DE TRANSPORTE.....	30
<b>SECCIÓN 8ª</b> VACUNACIÓN DE EMERGENCIA.....	31
<b>SECCIÓN 9ª</b> FORMACIÓN Y CONCIENCIACIÓN.....	33
<b>SECCIÓN 10ª</b> REVISIÓN DEL PLAN DE ALERTA.....	34
<b>ANEXO I</b> MÉTODOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN EXPLOTACIONES DE ACUICULTURA.....	35
<b>ANEXO II.</b> LABORATORIOS DE REFERENCIA.....	47
<b>ANEXO III.</b> GRUPO DE EXPERTOS.....	48
<b>ANEXO IV.</b> ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA.....	49
<b>ANEXO V</b> RESEÑA DE LAS ENFERMEDADES INCLUIDAS EN EL ANEXO IV DEL RD1614/2008.....	54
<b>ANEXO VI</b> PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO EN PECES.....	66



## SECCIÓN 1ª

## BASE LEGAL

La base legal queda recogida en las siguientes normas:

- **Constitución española de 1978**
- **Real Decreto 1440/2001**, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria.
- **Ley 8/2003**, de 24 de abril de Sanidad Animal
- **Directiva 88/2006 del Consejo**, de 24 de octubre relativa a los requisitos zoonosológicos de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos.
- **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de enfermedades animales de declaración obligatoria y regula su notificación.
- **Real Decreto 1614/2008**, de 3 de octubre, relativo a los requisitos zoonosológicos de los animales y de los productos de la acuicultura, así como a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos.

### 1. Obligación de comunicación

Existen dos puntos de vista legales que es necesario considerar al hacer la notificación. Por una parte, el artículo 5 de la Ley 8/2003, de Sanidad Animal, señala que:

*“Toda persona física o jurídica, pública o privada, tiene la obligación de comunicar a la Autoridad Competente, de manera inmediata, en la forma y plazo establecidos, todos los focos de que tenga conocimiento de enfermedades de carácter epizootico, o que por su especial virulencia, extrema gravedad o rápida difusión impliquen un peligro potencial de contagio para la población animal, incluida la doméstica o silvestres, o un riesgo para la salud pública o el medio ambiente. En los supuestos en que no se prevea un plazo específico en la normativa aplicable, éste será de 24 horas como máximo para las enfermedades de declaración obligatoria”.*

Asimismo, el **RD1614/2008** de 3 de octubre, relativo a los requisitos zoonosológicos de los animales y de los productos de la acuicultura, así como a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos establece en su artículo 24 la obligación de informar a las autoridades competentes ante la sospecha de aparición o confirmación de las enfermedades enumeradas en el Anexo IV del RD1614/2008, de una enfermedad emergente así como de los aumentos de mortalidad por encima de lo normal cuya causa no hayan podido ser



suficientemente esclarecida por estos operadores. El responsable de la explotación o zona de cría de moluscos y la autoridad competente deberán decidir conjuntamente que se considera un aumento de mortalidad anormal.

La obligación de comunicación alcanzará las siguientes personas:

- a) propietario y cualquier persona que atienda a los animales acuáticos,
- b) cualquier persona que acompañe animales de acuicultura durante su transporte,
- c) los veterinarios y demás profesionales que trabajen en servicios de sanidad de los animales acuáticos,
- d) los veterinarios oficiales y el personal responsable de laboratorios veterinarios o de otros laboratorios oficiales o privados y
- e) cualquier otra persona con relación profesional con animales acuáticos de especies sensibles o con productos de dichos animales.

Por otro lado el **Real Decreto 526/2014**, de 20 de junio, por el que se establece la lista de enfermedades animales de declaración obligatoria y regula su notificación establece los plazos y la forma en la que tiene que llevarse a cabo esta comunicación.

## **2. Acceso a las instalaciones o capacidad para actuar.**

En aplicación del artículo 78 de la Ley 8/2003, de 24 de abril de Sanidad Animal, el personal funcionario al servicio de las administraciones públicas, en el ejercicio de las funciones inspectoras recogidas en la Ley de Sanidad Animal, tendrá el carácter de Agente de la Autoridad, pudiendo recabar la ayuda de las personas o instituciones recogidas en el artículo 78 de la Ley 8/2003, de Sanidad Animal. La autorización a que se refiere el párrafo anterior alcanza los siguientes ámbitos y actuaciones:

- Acceder libremente, sin previa notificación a las instalaciones y a los vehículos de transporte, incluyendo las embarcaciones, en los que se encuentren los animales sospechosos o a los vehículos que hubieran realizado recientemente una carga o descarga de animales en la instalación.
- Proceder a realizar las investigaciones oportunas, exámenes o pruebas necesarias para el ejercicio de sus funciones.
- Exigir la comparecencia del titular o responsable y de la información que precise.
- Realizar la toma de muestras siguiendo un procedimiento establecido.
- Revisar toda la documentación, libros de registros, etc.
- Adoptar las medidas cautelares previstas en el artículo 77 de la Ley 8/2003, Ley de Sanidad Animal.
- Incautar y en su caso ordenar el sacrificio en los términos del artículo 20 de la Ley 8/2003, de Sanidad Animal.



### **3. Recursos económicos y presupuestarios para cubrir los gastos ocasionados por la aplicación del presente Plan de Contingencia.**

Los gastos ocasionados en la aplicación de este Plan serán sufragados por los presupuestos de la Comunidad Autónoma y/o los presupuestos generales del Estado.

### **4. Autoridades competentes**

#### **4.1. Cadena de mando y toma de decisiones**

En el MAGRAMA, la competencia corresponde a la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, la cual elaborará la normativa estatal en materia de sanidad animal y desarrollará las actuaciones nacionales relacionadas con la prevención, la epidemiología y la gestión del sistema de alerta sanitaria de las enfermedades.

Las CCAA ejecutarán y desarrollarán el Plan de contingencia, correspondiendo a las actuaciones en materia de lucha contra las enfermedades recogida en este Plan.



## SECCIÓN 2ª

# ACTUACIONES ANTE LA SOSPECHA DE ENFERMEDAD EN UNA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS

### 2.1. COMUNICACIÓN Y NOTIFICACIÓN DE LA SOSPECHA

La comunicación oficial de la sospecha será realizada por los Servicios Veterinarios Oficiales de la Comunidad Autónoma en base a los criterios contemplados en el punto 2.2, que pondrán la explotación bajo vigilancia oficial.

Una vez recibida la comunicación, la autoridad competente además de realizar una serie de actuaciones, procederá a comunicarlo al MAGRAMA, a través del cauce correspondiente para que éste informe a los EEMM y a la Comisión en el plazo de:

-Antes de 24 horas:

- a) Una enfermedad exótica enumerada en el anexo IV del Real Decreto 1614/2008.
- b) Una enfermedad no exótica enumerada en el anexo IV del Real Decreto 1614/2008, en caso de que el territorio, zona o compartimento en cuestión haya sido declarado libre de dicha enfermedad.
- c) Una enfermedad emergente.

-De forma mensual en el resto de casos de las enfermedades incluidas en el RD526/2014 del que hayan sido declaradas endémicas de cara a la OIE.

-De forma semanal en el resto de casos de las enfermedades incluidas en el RD526/2014 que no hayan sido declaradas endémicas de cara a la OIE.

La notificación se efectuará en los términos establecidos en el artículo 17 de la Ley de Sanidad Animal y en el Real Decreto 526/2014.

### 2.2. DEFINICIÓN DE SOSPECHA

La variabilidad de los signos clínicos en función de la susceptibilidad de las diferentes especies a las diferentes enfermedades implica la imposibilidad de contar con unas orientaciones categóricas en caso de sospecha de un foco.

La decisión de considerar sospechosa una explotación o zona de cría de moluscos se basará en las siguientes observaciones y criterios:

- a) Observaciones clínicas y patológicas.
- b) Observaciones epidemiológicas.
  - o si los animales han estado en contacto directo o indirecto con animales de otra explotación, zona de cría de moluscos o con animales procedentes del medio natural que, según se haya demostrado, hayan estado infectados.
  - o si cabe la posibilidad de que los animales hayan estado expuestos al agente patógeno, por ejemplo, debido a la entrada en la explotación de personas, vehículos, etc.





c) Observaciones derivadas de los resultados de pruebas laboratoriales.

### 2.3. ACTUACIONES TRAS EL AVISO DE SOSPECHA

La determinación de una sospecha en una explotación dará lugar, a la puesta en marcha de las acciones de comprobación definidas en el Capítulo V del RD1614/2008, y que consisten en poner la explotación o zona de cría de moluscos bajo vigilancia oficial y poner en marcha una investigación, para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad.

Según el Plan Coordinado Estatal de la Red de Alerta Sanitaria Veterinaria, las actuaciones ante la sospecha se deberán hacer a tres niveles organizativos:

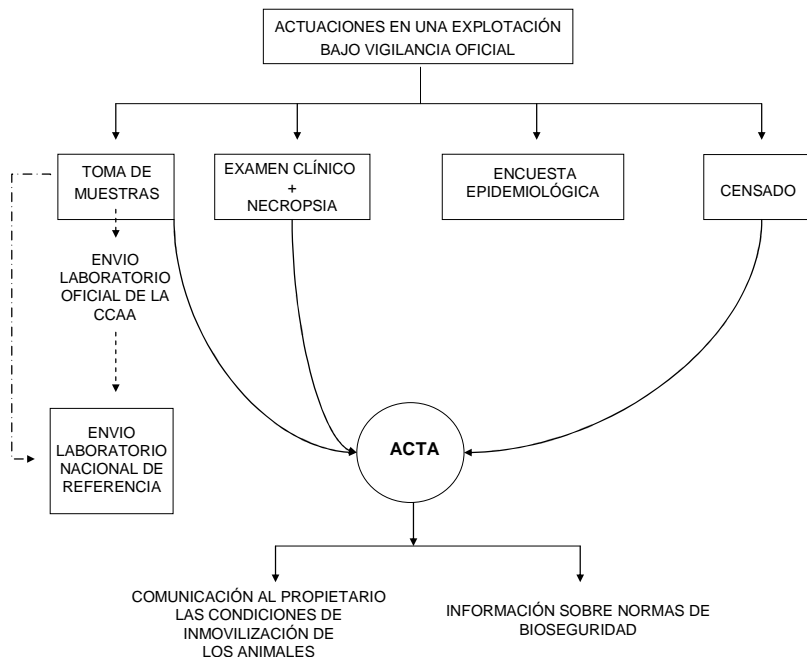
- ✓ Actuaciones del Inspector Veterinario (IV).
- ✓ Actuaciones del Centro Local (CL).
- ✓ Actuaciones del Centro Nacional (CN).

#### 2.3.1. Actuaciones del Inspector Veterinario

El Inspector Veterinario (IV) de la unidad veterinaria local (UVL) se personará en la explotación o zona de cría de moluscos de forma inmediata, y llevando consigo todos los elementos necesarios para realizar la toma de muestras, cumplimentar la hoja de remisión de las mismas, llevar a cabo una encuesta epidemiológica y levantar acta de inmovilización.

Se llevarán a cabo las actuaciones recogidas en el esquema 1.

**Esquema 1.** Diagrama de flujo con el protocolo de actuación del Veterinario Oficial en el caso de sospecha de enfermedades de los animales acuáticos en una explotación o zona de cría de moluscos.





Cada una de las actuaciones contempladas en el protocolo anterior, supone la realización de las siguientes intervenciones:

- a) *Examen clínico de los animales, necropsia y encuesta epidemiológica.*
- b) *Toma de muestras*
- c) *Censado*
- d) *Comunicación al propietario de las condiciones de inmovilización*
- e) *Comunicación de la sospecha*

**a) Examen clínico de los animales, necropsia y encuesta epidemiológica.**

La finalidad de esta investigación es establecer la situación clínica de los animales en la explotación o zona de cría de moluscos, así como las consideraciones epidemiológicas de la enfermedad. El examen clínico de los animales constará de una anamnesis, una inspección clínica y la realización de necropsias.

En primer lugar se realizará una **anamnesis** al propietario/responsable de la explotación o de las empresas de producción acuícola que ejerzan su actividad en la zona de cría de moluscos, y especialmente se incidirá en los siguientes puntos cuando procedan:

- ✓ Fecha de aparición de los primeros enfermos, nº de enfermos, fecha de la 1ª baja, nº de bajas, porcentajes de mortalidad,
- ✓ Especies susceptibles y vectores presentes en la explotación.
- ✓ Manejo: tipo de alimentación, cambios de alimentación, cambios en las condiciones del agua, condiciones de alojamiento, actuaciones realizadas en los últimos 30 días.
- ✓ Vacunaciones realizadas (tipo de vacuna y fecha).
- ✓ Entrada y salida de animales en los últimos 30 días. Movimientos de personas y vehículos en los últimos 30 días.

Los datos obtenidos en esta actuación se reflejarán en el modelo de **encuesta epidemiológica** recogida en el Anexo IV.

**b) Toma de muestras**

La toma de muestras se llevará a cabo según lo establecido en los protocolos para el muestreo de peces, moluscos y crustáceos recogidos en el Anexo VI

**c) Comunicación al propietario de las condiciones de inmovilización**

- Deberá comunicarse al propietario de la explotación o responsables de las empresas de producción acuícola que ejerzan su actividad en la zona de cría de moluscos mediante un **ACTA** que todo el efectivo de la explotación o zona de cría de moluscos quedará inmovilizado hasta que se confirme o descarte la enfermedad.
- La explotación o zona de cría de moluscos en la que se sospeche la presencia de enfermedad quedará bajo supervisión oficial y se aplicarán las



medidas de control pertinentes para evitar que se propague la enfermedad a otros animales acuáticos.

- No se permitirá a ningún animal de la acuicultura y productos de origen animal o subproductos salir o entrar de la explotación o zona de cría de moluscos en la que se sospeche la enfermedad a menos que así lo autorice la autoridad competente.
- La autoridad competente podrá aplicar también las siguientes medidas:
  - Limitar en la medida posible el vertido de efluentes de la instalación hacia el medio natural si no han sido sometidos a un tratamiento previo que garantice suficientemente que no pueden vehicular el agente infeccioso.
  - Suspensión cautelar de toda actividad pesquera o de marisqueo comercial, deportiva o con fines de repoblación en la proximidad de la instalación, especialmente de aquellas actividades que puedan conllevar el movimiento o traslocación de animales vivos a otras zonas y en especial, en aguas debajo en el caso de instalaciones de acuicultura continental.
  - Suspensión cautelar de las actividades pesqueras de las especies que puedan ser sensibles o portadoras del agente patógeno.
- En caso de que la investigación epidemiológica ponga de manifiesto que la enfermedad puede haberse introducido en una o varias explotaciones, zonas de cría de moluscos o en aguas no cerradas, la autoridad competente velará por la aplicación de estas medidas en dichas explotaciones, zonas de cría de moluscos o aguas no cerradas.
- En el caso de las cuencas hidrográficas o de las zonas costeras extensas, la autoridad competente podrá decidir que se limite la aplicación de estas medidas a una zona menos amplia en las inmediaciones de la explotación o zona de cría de moluscos de la que se sospeche que está infectada, cuando se considere que dicha zona menos extensa es lo suficientemente grande como para garantizar que la enfermedad no se propagará.
- En caso de que dichas medidas afecten o se refieran a una zona o compartimento compartido con otro Estado miembro de la Unión Europea, el MAGRAMA lo pondrá en conocimiento del EEMM en cuestión y solicitará a la Comisión Europea que determine las medidas que fueran necesarias. Hasta que la Comisión Europea decida cuales se han de adoptar, se podrán establecer provisionalmente las que se consideren imprescindibles.

#### ***d) Comunicación de la sospecha***

Una vez realizada la visita a la explotación o zona de cría de moluscos por parte de los Inspectores Veterinarios, estos deberán realizar las siguientes actuaciones:

- ✓ Notificación de la sospecha de la vigilancia oficial al Jefe Provincial de Sanidad Animal. La comunicación oficial de la sospecha será iniciada desde la Unidad Veterinaria donde radique la explotación.



### 2.3.2. Actuaciones del Centro Local (CL)

El Jefe Provincial de Sanidad Animal, máximo responsable del Centro Local, llevará a cabo las siguientes acciones:

- ✓ Informar de la situación y proponer acciones al Jefe de Servicio con competencias en Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma correspondiente a través del envío del documento de sospecha.
- ✓ Dar instrucciones a la UVL sobre las acciones a llevar a cabo.
- ✓ Poner en conocimiento de todos los veterinarios que trabajen en la zona, la existencia de sospecha de la enfermedad con el fin de extremar las medidas de bioseguridad.
- ✓ El Centro Local en coordinación con el Centro Nacional y el Jefe de Servicio con competencias en Sanidad Animal en el ámbito autonómico podrá decidir el **sacrificio preventivo** de todos los animales de la explotación en función de la evolución del cuadro clínico, de la mortalidad y de los riesgos epidemiológicos.
- ✓ El Centro Local en coordinación con el Centro Nacional, deberá establecer la trazabilidad de los animales que hayan abandonado la explotación durante el periodo de **incubación** de la enfermedad.

### 2.3.3. Actuaciones del Centro Nacional (CN)

Tras la notificación de la sospecha, por parte del Centro Nacional, se llevarán a cabo las siguientes acciones:

- ✓ En colaboración con el CL, se deberá estimar las necesidades de personal y material en caso de que la sospecha sea confirmada.
- ✓ Informar al Laboratorio Nacional de Referencia de la situación.
- ✓ Informar en el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y Sanidad Animal de la situación y al resto de Estados Miembros de la Unión Europea.



**SECCIÓN 3ª**

**CONFIRMACIÓN DE UNA ENFERMEDAD  
EXOTICA O EMERGENTE DE LOS  
ANIMALES ACUÁTICOS EN UNA  
EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE  
MOLUSCOS**

La confirmación de la enfermedad en la explotación será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) para las enfermedades de los peces o los crustáceos, que en este caso es el **Laboratorio Central de Veterinaria del MAGRAMA** en Algete (Madrid), o para las enfermedades de los moluscos el **Instituto de Investigaciones Marinas CSIC** en Vigo (Pontevedra)

La documentación emitida por el LNR, se hará llegar a las autoridades con competencia en Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma de la que procedan las muestras a través de la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad en el menor tiempo posible.

El Servicio competente en Sanidad de los animales acuáticos de la Comunidad Autónoma donde se encuentre la explotación elaborará un informe según los plazos y requisitos establecidos en el RD 526/2014, que será remitido a la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad.

Dicha comunicación podrá realizarse también a través del servicio de la página Web RASVE:

[http://rasve.magrama.es/Rasve\\_2008/Default.aspx](http://rasve.magrama.es/Rasve_2008/Default.aspx)

La Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad es la encargada de notificar cualquier foco a la Comisión de la Unión Europea, a los Estados Miembros y a la OIE, conforme a lo establecido en el RD 526/2014, así como a todas las Comunidades Autónomas y al Sector Acuícola.

Con el fin de garantizar la completa coordinación y eficacia de las medidas sanitarias para asegurar la erradicación de la enfermedad se dispone de:

- A.- Comité Nacional de Seguimiento.
- B.- Centro Nacional de Emergencia.
- C.- Centros Locales.
- D.- Gabinete de Crisis.
- E.- Unidad de Seguimiento.

Dichas unidades están definidas en el **Plan Coordinado Estatal de la Red de Alerta Sanitaria Veterinaria**:

[http://rasve.magrama.es/Recursos/Ficheros/Planes/MARM/99\\_99\\_PLAN%20COORDINADO%20ALERTA%20VETERINARIA%20actualiz%20Octubre%202012.pdf](http://rasve.magrama.es/Recursos/Ficheros/Planes/MARM/99_99_PLAN%20COORDINADO%20ALERTA%20VETERINARIA%20actualiz%20Octubre%202012.pdf)



### **3.1. ACTUACIONES EN LA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS AFECTADA**

El Inspector Veterinario (IV) de la unidad veterinaria local (UVL) se personará de nuevo en la explotación para comunicar al propietario mediante un **Acta Oficial** la existencia de una enfermedad de los animales acuáticos en la explotación o zona de cría de moluscos.

#### ***a) Notificación de la enfermedad***

- La notificación al propietario de la explotación o responsable de la zona de cría de moluscos se realizará mediante un **Acta Oficial**.
- Se declarará la explotación o la zona de cría de moluscos oficialmente infectada quedando bajo supervisión oficial.

#### ***b) Localización de animales y productos producidos en el periodo de incubación de las enfermedades***

- Será necesario realizar una búsqueda de los animales, expedidos desde la explotación o zona de cría de moluscos, al menos en el periodo de incubación previo a la fecha estimada de la infección.
- Con estos animales se procederá del mismo modo con los animales procedentes de la explotación o zona de cría de moluscos afectada que aún falten por comercializar.

#### ***c) Recogida y transformación complementaria***

- Los animales de la acuicultura que hayan alcanzado la talla comercial y que no presenten signo clínico alguno de enfermedad podrán recogerse bajo la supervisión de la autoridad competente de seguridad alimentaria para su transformación complementaria.
- La recogida, la introducción en centros de expedición o en centros de depuración, la transformación complementaria y cualquier otra operación relacionada con la preparación de los animales de acuicultura antes de su introducción en la cadena alimentaria se realizará en condiciones que eviten la propagación del agente patógeno que produce la enfermedad.
- Los centros de expedición, los centros de depuración o las empresas similares en los que vayan a tener entrada animales de la zona afectada deberán estar equipados con sistemas de tratamiento de efluentes que inactiven los agentes patógenos causantes de la enfermedad o bien el efluente estará sujeto a otro tipo de tratamiento que reduzca, hasta un nivel aceptable, el riesgo de transmitir enfermedades a las aguas naturales.
- La transformación complementaria se realizará en establecimientos de transformación autorizados.



#### **d) Extracción y eliminación**

- Los peces y crustáceos muertos, y aquéllos vivos que presenten signos clínicos de una enfermedad, se extraerán y se eliminarán lo antes posible bajo la supervisión del IV
- Los cadáveres de los animales, que son clasificados como material de categoría 1 ó 2 según el R (CE) 1069/2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) 1774/2002, deberán ser enviados a una planta adecuada para proceder a su eliminación, bien directa, bien con un proceso de transformación previo.
- La autoridad competente podrá autorizar la eliminación de los subproductos animales distintos de los cuerpos enteros o cualquiera de sus partes, mediante incineración o enterramiento in situ en condiciones que prevengan la transmisión de riesgos para la salud pública y la salud animal, en caso de brote de una enfermedad de declaración obligatoria, si el transporte a la planta autorizada para el procesamiento o la eliminación de los subproductos animales más cercana aumentara el peligro de propagación de los riesgos sanitarios o excediera la capacidad de eliminación de esas plantas debido a la amplia extensión de un brote de una enfermedad epizootica.

#### **e) Vacío o barbecho sanitario**

- Cuando sea posible, las explotaciones se someterán a un período apropiado de vacío o barbecho sanitario después de haberse vaciado y, en caso necesario, limpiado y desinfectado.
- Cuando se considere que alguna de las explotaciones relacionadas con la explotación afectada supone un alto riesgo para la diseminación de la enfermedad, se podrán aplicar el sacrificio sanitario preventivo de la misma.
- En el caso de las explotaciones o zonas de cría de moluscos en las que se críen animales de acuicultura que no sean sensibles a la enfermedad en cuestión, las decisiones sobre el barbecho sanitario se basarán en una evaluación del riesgo.
- La duración de un período reglamentario de *vacío sanitario* deberá basarse en pruebas científicas de la probabilidad de que un *agente patógeno* siga siendo infeccioso fuera de su(s) huésped(es) del medio de acuicultura, en el medio ambiente local, de manera que suponga un riesgo inaceptable de reinfección del *establecimiento de acuicultura*. Deberán tenerse en cuenta la extensión del *brote de enfermedad*, la existencia de huéspedes alternativos en el medio ambiente local, la capacidad de supervivencia y de infecciosidad del *agente patógeno*, y los factores climatológicos, geográficos e hidrográficos locales. A estos elementos se puede agregar el nivel de riesgo para la acuicultura local y para los recursos acuáticos a mayor escala.
- El *vacío sanitario* deberá comenzar inmediatamente después de:



- haber evacuado todas las especies de animales acuáticos susceptibles a la enfermedad considerada, y
  - haber evacuado todas las especies que pueden ser portadoras de la enfermedad considerada, y
  - haber evacuado, si aplica, otras especies, y
  - haber evacuado el agua en la que se encontraban los animales infectados, cuando sea posible, y
  - haber evacuado, o desinfectado según procedimientos aprobados por la Autoridad Competente, los equipos y el material contaminados o que pueden contener el agente infeccioso.
- Todas las explotaciones sometidas a un vacío sanitario obligatorio deberán ser sometidas a un período de rigurosa vigilancia oficial después de su repoblación con especies susceptibles. La duración y la intensidad de la vigilancia se ajustarán a la enfermedad considerada y a las condiciones locales

#### **f) Repoblación de explotaciones**

La introducción de animales acuáticos a la explotación se efectuará con el permiso previo de la oficina comarcal y nunca antes haber efectuado las operaciones completas de limpieza y desinfección conforme a la Anexo I de este Manual, y haber dejado transcurrir un periodo que la Autoridad Competente definirá en función de los datos científicos existentes para la enfermedad.

Para realizar la repoblación se utilizarán animales acuáticos procedentes de zonas libres, sensibles a las enfermedades listadas en el Real Decreto 1614/2008, en los que se establecerán las adecuadas inspecciones clínicas y análisis laboratoriales.

Se introducirán animales en todas las unidades de producción (hueva, alevinaje, preengorde, engorde), no pudiendo salir ningún animal hasta que se haya completado el proceso de repoblación en todas las unidades.

Los animales se someterán a una inspección clínica cada 3 días durante los primeros 14 días siguientes a la introducción, y una vez a la semana entre los días 15 y 28.

Transcurridos 28 días tras la última reintroducción, se realizará un último examen clínico y se tomarán muestras para comprobar la ausencia del agente patógeno, de modo que permita la detección de una prevalencia del 5% con un 95% de nivel de confianza. El proceso de repoblación se considerará concluido cuando finalice la última inspección clínica y los resultados del laboratorio hayan resultado negativos.

Los periodos de tiempo de la repoblación pueden variar teniendo en cuenta el sistema de producción de la explotación y sus medidas de bioseguridad, así como cuando hayan transcurrido 3 meses desde el último foco de enfermedad.





Las medidas establecidas en esta sección se mantendrán hasta que se hayan llevado a cabo las medidas de erradicación y en la zona de confinamiento se hayan efectuado con resultados negativos, el muestreo y la vigilancia adecuada para la enfermedad en cuestión.

### **3.2. ACTUACIONES EN EL ÁREA INMOVILIZADA, ZONA DE PROTECCIÓN Y ZONA DE VIGILANCIA.**

Se establecerá una zona de confinamiento adecuada para la enfermedad en cuestión, incluidas una zona de protección y una zona de vigilancia alrededor de la explotación o zona de cría de moluscos que se haya declarado infectada, teniendo en cuenta las relaciones hidrológicas entre las mismas<sup>1</sup>.

Las autoridades competentes podrán establecer otras zonas restringidas en torno a las de protección y vigilancia, o adyacentes a ellas, sobre la base de los criterios expuestos anteriormente.

Para la delimitación de estas zonas se podrán tener en cuenta los siguientes factores:

- Los resultados de los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento.
- La situación geográfica y, en particular, las relaciones hidrológicas.
- El emplazamiento y la proximidad de las explotaciones y el censo de especies susceptibles de éstas.
- Los patrones de los desplazamientos y del comercio de animales acuáticos vivos o destinados a un procesamiento previo al consumo y la disponibilidad de mataderos.

Una vez establecidas las zonas,

- Se elaborará un censo de todas las explotaciones o zonas de cría de moluscos incluidas en ellas.
- No se autorizará ninguna repoblación, ni se permitirá la entrada, la salida o el tránsito de animales de la acuicultura sensibles a la enfermedad en cuestión por la zona de confinamiento, salvo que lo autorice expresamente la autoridad competente.

En el caso de que una zona haya de incluir partes del territorio de más de una Comunidad Autónoma o de otro Estado Miembro, la autoridad competente de dicha Comunidad lo comunicará al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, para que éste coordine y establezca las oportunas vías de colaboración al objeto de que se establezcan las correspondientes zonas de protección y vigilancia.

---

<sup>1</sup> En el caso de cuencas hidrográficas o zonas costeras muy extensas, la autoridad competente de la comunidad autónoma podrá limitar las medidas previstas en este apartado a una zona menos amplia siempre que se considere que la zona menos extensa es lo suficientemente grande para evitar la propagación de la enfermedad.



Las medidas previstas en la presente sección se mantendrán hasta que se hayan llevado a cabo las medidas de erradicación, y en la zona de confinamiento se hayan efectuado, con resultados negativos, el muestreo y la vigilancia adecuados para la enfermedad en cuestión y para los tipos de explotaciones de acuicultura afectadas.



## SECCIÓN 4ª

# CONFIRMACIÓN DE UNA ENFERMEDAD NO EXÓTICA DE LOS ANIMALES ACUÁTICOS EN UNA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS

Cuando de conformidad con los procedimientos recogidos en este manual, los métodos de muestreo y los resultados de las pruebas de laboratorio, se confirme un foco de una enfermedad clasificada como no exótica de acuerdo con el Anexo IV del Real Decreto 1614/2008 se procederá de la siguiente manera:

La confirmación de la enfermedad en la explotación o zona de cría de moluscos será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), que en este caso es el **Laboratorio Central de Veterinaria del MAGRAMA** en Algete (Madrid) en el caso de las enfermedades de peces y crustáceos, o para las enfermedades de los moluscos el **Instituto de Investigaciones Marinas CSIC** en Vigo (Pontevedra).

La documentación emitida por el LNR, se hará llegar a las autoridades con competencia en Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma de la que procedan las muestras a través de la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad en el menor tiempo posible.

El Servicio competente en Sanidad Animal de la Comunidad Autónoma donde se encuentre la explotación elaborará un informe de acuerdo a lo establecido en el RD 526/2014, que será remitido a la Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad, Dicha comunicación podrá realizarse también a través del servicio de la página Web RASVE:

[http://rasve.magrama.es/Rasve\\_2008/Default.aspx](http://rasve.magrama.es/Rasve_2008/Default.aspx)

La Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad es la encargada de notificar cualquier a la Comisión de la Unión Europea, a los Estados Miembros y a la OIE, conforme a lo establecido en el Art. 4 del Real Decreto 2459/96, así como a todas las Comunidades Autónomas y al Sector acuícola.

### 4.1. ACTUACIONES EN LA EXPLOTACIÓN O ZONA DE CRÍA DE MOLUSCOS AFECTADA

El Inspector Veterinario (IV) de la unidad veterinaria local (UVL) se personará de nuevo en la explotación o zona de cría de moluscos para comunicar al propietario o responsable de la misma mediante un **Acta Oficial** la existencia de la enfermedad en la explotación o zona de cría de moluscos, quedando bajo vigilancia oficial.

En caso de foco de enfermedad no exótica, las medidas a implementar por el Inspector Veterinario (IV) de la unidad veterinaria local (UVL) en la explotación o zona de cría de moluscos afectada, serán decididas en base a un análisis de riesgo y teniendo en cuenta como mínimo los siguientes criterios:

- a. la especie de que se trate;



- b. la situación sanitaria previa del compartimento o zona en la que se ha detectado la enfermedad, especialmente si la zona o el compartimento estaba declarado libre frente a esa enfermedad.
- c. el número de explotaciones en la zona que rodea la explotación de expedición;
- d. las medidas de bioseguridad aplicables en las explotaciones y compartimentos durante el transporte y el sacrificio;
- e. la vía de transporte;
- f. los indicios de propagación;
- g. el posible riesgo para la salud pública;
- h. el ulterior tratamiento de los productos en cuestión;
- i. las repercusiones socioeconómicas u otras.

En función de este análisis de riesgo se llevarán a cabo una de las siguientes actuaciones:

- a) Se adoptarán las medidas de la sección 3ª de este manual para enfermedades exóticas, con el fin de recuperar la calificación. En el caso de los animales que no han alcanzado la talla comercial, se podrá recurrir a la excepción que establece la normativa vigente a efectos de permitir que alcancen la talla comercial.
- b) Se podrá establecer un programa de erradicación que deberá ser remitido al MAGRAMA para ser presentado al Comité Permanente Plantas, Animales, Alimentos y Alimentación animal (Comité PAFF) de la Comisión europea para su aprobación.
- c) En el supuesto de que la explotación o zona no estuviera declarada libre de la enfermedad en cuestión o no desee recuperar la calificación de libre, se adoptarán las medidas siguientes:
  - Declarar la explotación o zona infectada oficialmente.
  - Establecimiento de una zona de confinamiento conforme a lo previsto en la sección 3ª.
  - Restringir el desplazamiento de los animales a partir de la zona de confinamiento a otras con igual o inferior calificación sanitaria frente a la enfermedad en cuestión o permitir su sacrificio para el consumo humano.
  - Los animales muertos se eliminarán conforme a la normativa vigente en materia de subproductos de origen animal no destinados a consumo humano tal como se establece en la sección 3ª.



**SECCIÓN 5ª** **SOSPECHA Y CONFIRMACIÓN DE UNA ENFERMEDAD INCLUIDA EN EL ANEXO IV DEL RD1614/2008 O EMERGENTE EN ANIMALES ACUÁTICOS SILVESTRES.**

La confirmación de la enfermedad en animales acuáticos silvestres será realizada por el Laboratorio Nacional de Referencia, que en este caso es el **Laboratorio Central de Veterinaria del MAGRAMA** en Algete (Madrid) en el caso de las enfermedades de peces y crustáceos, o para las enfermedades de los moluscos el **Instituto de Investigaciones Marinas CSIC** en Vigo (Pontevedra)

En el artículo 38 del Real Decreto 1614/2008 se especifican las actuaciones a seguir para el control de las enfermedades en animales acuáticos silvestres:

*1. En caso de que los animales acuáticos silvestres estén infectados o se sospeche que están infectados con enfermedades exóticas enumeradas en el anexo IV, la autoridad competente hará un seguimiento de la situación y adoptará medidas para reducir y, en la medida de lo posible, evitar la propagación ulterior de la enfermedad.*

*2. Si los animales acuáticos silvestres están infectados, o se sospecha que lo están, con una enfermedad no exótica enumerada en el anexo IV en un territorio, una zona o un compartimento que haya sido declarado libre de esa enfermedad, la autoridad competente también hará un seguimiento de la situación y adoptará medidas para reducir y, en la medida de lo posible, evitar la propagación ulterior de la enfermedad.*

*3. Las autoridades competentes informarán al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de las medidas que hayan adoptado conforme a lo dispuesto en los apartados 1 y 2, para que por éste informe a la Comisión y a los demás Estados miembros.*

Asimismo, en el Artículo 39 establece:

*1. Las autoridades competentes adoptarán las medidas adecuadas para controlar una situación de enfermedad emergente y evitar su propagación, siempre que la enfermedad emergente en cuestión pueda comprometer la situación sanitaria de los animales acuáticos.*

### **ACTUACIONES A LLEVAR A CABO**

*En caso de encontrar animales acuáticos muertos con síntomas o lesiones compatibles con las enfermedades de declaración se procederá a la toma de*



*muestras y su envío al laboratorio siguiendo las pautas establecidas en el **Anexo III** de este Manual.*

Inmediatamente después de haber sido informados de la sospecha de infección en animales salvajes se adoptarán las medidas adecuadas para confirmar o descartar la presencia de la enfermedad, informando a los propietarios de las piscifactorías, pescadores o mariscadores, y sometiendo a examen clínico y laboratorial a todos los moluscos o peces salvajes pescados o hallados muertos. Para ello se tomarán muestras de estos animales de acuerdo con el **Anexo VI** del presente Manual.

El VO elaborará un informe de comunicación de sospecha y tan pronto como se haya confirmado la aparición de un caso de mortalidad en animales silvestres se notificará el caso primario, ambas actuaciones de conformidad con lo establecido en el RD526/2014.

Se podrá crear un grupo de expertos que incluirá veterinarios, pescadores, biólogos especialistas en fauna silvestre y epidemiólogos, y que tendrá como funciones:

- Efectuar un estudio de la situación epidemiológica y definir la zona infectada teniendo en cuenta:
  - Los resultados de la investigación epidemiológica y distribución geográfica de la enfermedad.
  - La población de animales silvestre en la zona.
  - La existencia de obstáculos naturales o artificiales que afecten al movimiento de los animales silvestres.
- Establecer medidas que ayuden a controlar la enfermedad e impedir su difusión, como puede ser la prohibición de la pesca o marisqueo.
- Elaborar el plan de erradicación
- Realizar controles para verificar la eficacia de las medidas adoptadas.
- Los animales silvestres abatidos o hallados muertos en la zona infectada serán inspeccionados por el VO y sometidos en su caso a la toma y envío de muestras de acuerdo con el **Anexo VI** del presente Manual. Los agentes aislados se someterán a estudios para su identificación en el laboratorio.

**Actuaciones en las explotaciones/zonas de cría de moluscos de especies sensibles de la zona infectada:**

- Se realizará un listado de las explotaciones situadas en la cuenca donde se haya encontrado el o los animales silvestres infectados.
- Se realizará un censo de todas las especies y categorías de animales de las especies sensibles que se encuentran en cada explotación o zona de cría de



moluscos. El censo será reflejado en el libro de explotación y se mantendrá actualizado mientras dure el período de sospecha.

- Se valorará el prohibir el movimiento de salida y entrada de animales de especies sensibles y vectores en la explotación.
- Se tomarán las medidas de bioseguridad adecuadas, especialmente el empleo de desinfectantes en la entrada y salida, medidas higiénicas del personal que haya estado en contacto con los animales silvestres, e incluso prohibición de su entrada en la explotación.
- Se realizará examen clínico y necropsia de los animales de especies sensibles muertos y enfermos en las explotaciones o zonas de cría de moluscos que presenten síntomas de la enfermedad, la toma de muestras de los mismos (**Anexo VI**) y su envío al laboratorio.



## SECCIÓN 6ª **MÉTODOS DE SACRIFICIO, DESTRUCCIÓN Y ELIMINACIÓN DE ANIMALES DE LA EXPLOTACIÓN**

### 6.1. CONDICIONANTES

En la UE se ha establecido para el control de algunas de las enfermedades de los animales acuáticos una política de erradicación, que se recoge en la SECCIÓN I de este Manual.

Esta política conlleva en algunas ocasiones el sacrificio inmediato de los animales sensibles de las explotaciones afectadas y su posterior eliminación para tratar de evitar la difusión de la enfermedad a las explotaciones colindantes o a los animales acuáticos silvestres.

El sacrificio sanitario de emergencia para el control de una epizootia está condicionado por los siguientes aspectos:

#### Bienestar de los animales

En este sentido existe una base legal que es preciso respetar, el Real Decreto 54/1995 *sobre la protección de los animales en el momento de su sacrificio*.

El método debe ser indoloro y reducir al mínimo el estrés. Debe garantizar un efecto rápido e irreversible.

#### Imperativos sanitarios

El vacío debe realizarse lo más rápidamente posible (24-48 horas) tras la confirmación de la enfermedad con el fin de detener la producción del agente patógeno y de prevenir su propagación.

No es recomendable que se produzca vertido de sangre ni otros fluidos corporales en las operaciones de sacrificio.

#### Seguridad

El método debe garantizar la seguridad de los operarios así como, para las otras especies animales que se encuentren en la explotación. Además, puede permanecer algún residuo o actividad residual en las naves después de la operación.

#### Criterios ecológicos

El método no debe tener ninguna consecuencia sobre el medio ambiente.





Durante el sacrificio se tendrán en cuenta los siguientes **factores higiénico-sanitarios**:

- ✓ En el sacrificio deben de participar exclusivamente el número de personas necesarias para el mismo, limitando la entrada de vehículos y personas ajenas a la explotación.
- ✓ El material utilizado no desechable será desinfectado rigurosamente dentro de la explotación con lejía o con sosa al 2%.
- ✓ Se dispondrá un punto de desinfección a la salida de la explotación (vehículos y calzado).
- ✓ Todo el vestuario, pienso, calzado, material desechable, desperdicio, etc., ha de ser eliminado junto con los cadáveres al final del sacrificio.
- ✓ Siempre que sea posible, la eliminación de los cadáveres se realizará dentro de la propia explotación.

## 6.2. PLANIFICACIÓN DEL SACRIFICIO.

El sacrificio de los animales acuáticos y su posterior eliminación supone el mayor reto en el control de una epizootia de alta difusibilidad por lo que es necesario que este aspecto sea planificado cuidadosamente. Esta planificación deberá ser realizada por los Servicios Veterinarios Oficiales en colaboración con los servicios de Medio Ambiente y Salud Pública.

En la planificación del sacrificio podemos diferenciar dos etapas:

- Planificación previa
- Organización *in situ*

### 6.2.1 Planificación previa

#### a. Visita previa a la explotación

- ✓ Determinar el número de animales y el tipo de sacrificio que es posible emplear.
- ✓ Asegurarse de que los accesos y las instalaciones de la explotación permiten la entrada de maquinaria y la realización del sacrificio.
- ✓ Contemplar los deseos del propietario o responsable de los animales.
- ✓ Emplear el conocimiento que tiene el propietario de sus animales y de las instalaciones.

#### b. Creación de Equipos de Sacrificio

- ✓ **Equipo Limpio:** Que será el encargado de llevar a cabo las inspecciones, la toma de muestras, la realización de la encuesta epidemiológica
- ✓ **Equipo Sucio:** Que será el encargado de la realización del sacrificio, y estará constituidos por: veterinario oficial, controladores pecuarios,



trabajadores contratados, técnico de medio ambiente y fuerzas de Orden Público

### **c. Preparación del sacrificio**

- ✓ Aviso y contratación de la maquinaria necesaria.
- ✓ Acopio del material necesario (de sacrificio, ropa, etc.)
- ✓ Determinación del modo de eliminación de los cadáveres:
- ✓ Planta de transformación y/o eliminación
- ✓ Fosa o Incineración (visto bueno de Medio Ambiente y Salud Pública)
- ✓ Determinación del número de equipos de limpieza y desinfección.
- ✓ Orden de sacrificio de los animales. Fecha y hora de inicio.

#### **6.2.2. Organización *in situ*.**

Esta etapa, que consiste en la organización del sacrificio en la explotación, deberá comprender las siguientes actuaciones:

- ✓ Organizar las condiciones del sacrificio
- ✓ Supervisar el sacrificio
- ✓ Control de las operaciones de limpieza y desinfección
- ✓ Cumplimentar el acta de tasación de los animales

### **6.3. METODOLOGÍA DE SACRIFICIO DE PECES.**

**Cumplimiento de los requisitos en materia de protección de los animales, de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1099/2009 del Consejo de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza**

A partir del 1 de enero de 2013 es de aplicación el Reglamento (CE) nº 1099/2009, del Consejo de 24 de septiembre de 2009, relativo a la protección de los animales en el momento de la matanza<sup>1</sup>.

Este reglamento establece que, en el caso de vaciado sanitario, las autoridades competentes deben actuar tanto para preservar el bienestar de los animales implicados como para, a posteriori, informar a la Comisión Europea y al público sobre las actuaciones realizadas.

La normativa citada entiende por vaciado sanitario no sólo las actuaciones en los casos de brotes de enfermedades animales, sino también las que haya que matar animales por motivos tales como la salud pública, el bienestar animal o el medio ambiente, siempre bajo la supervisión de la autoridad competente.

<sup>1</sup> <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:303:0001:0030:ES:PDF>



Cuando vaya a realizarse un vaciado sanitario por motivos de sanidad animal, y en aplicación del presente Manual, se usará, de forma complementaria, y simultánea al mismo, el documento “Protección de los animales durante la matanza en los vaciados sanitarios de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1099/2009, de 24 de septiembre”, que puede encontrarse en

<http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/bienestanimal/animales-de-granja/#para51>

Las Autoridades competentes de las Comunidades Autónomas completarán el documento de Protección de los animales citado con la información necesaria.

El documento “Protección de los animales durante la matanza en los vaciados sanitarios de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1099/2009, de 24 de septiembre”, forma parte de este Manual, al igual que los procedimientos normalizados de trabajo anexos al mismo.

#### 6.4 MÉTODOS DE DESTRUCCIÓN Y ELIMINACIÓN

Tras la realización del sacrificio in situ, los cadáveres (que se incluyen en la categoría II de subproductos animales) se deberán destruir de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 1774/2002

En su artículo 13, este Reglamento establece que la autoridad competente podrá autorizar la eliminación “de los subproductos animales distintos de los de la categoría 1 contemplados en el artículo 8, letra a), inciso i), *mediante incineración o enterramiento in situ en condiciones que prevengan la transmisión de riesgos para la salud pública y la salud animal, en caso de brote de una enfermedad de declaración obligatoria, si el transporte a la planta autorizada para el procesamiento o la eliminación de los subproductos animales más cercana aumentara el peligro de propagación de los riesgos sanitarios o excediera la capacidad de eliminación de esas plantas debido a la amplia extensión de un brote de una enfermedad epizootica*”

Los métodos autorizados de destrucción son:

- Eliminación directa sin procesamiento en planta autorizada.
- Eliminación en planta autorizada tras su procesamiento por esterilización a presión y marcado permanente del material resultante.
- Incineración ó enterramiento in situ.

El método de elección será, en primer lugar, el traslado de los cadáveres a una o varias plantas autorizadas, para lo cual es necesario considerar su distancia respecto a la o las explotaciones afectadas, así como la capacidad de dicha planta



y la disponibilidad de medio de transporte de los cadáveres adecuado.

Los animales enviados a una planta de transformación y/o eliminación directa, deben ir acompañados por un documento de autorización de traslado de cadáveres emitido por el VO. La destrucción de los animales en esta planta debe ser supervisada por los Servicios Veterinarios.

La lista de plantas de transformación y/o eliminación directa autorizadas existentes en España, se pueden consultar en la siguiente dirección de internet:

<http://www.sandach.com.es/Establecimientos/Estab.aspx>.

El Inspector Veterinario valorará y propondrá al Jefe Provincial de Sanidad, el método y lugar de destrucción más apropiado.

Si el método elegido es el **enterramiento**:

- ✓ Los cadáveres en la fosa deberán ser rociados con cal viva entre capa y capa que será distribuida uniformemente.
- ✓ Para cerrar la fosa se cubrirá, como mínimo, con 1,5 metros de tierra. Antes de cubrir la fosa totalmente se arrojará todo el material desechable, vestuarios, calzado, utilizado por el personal durante las operaciones.
- ✓ El área alrededor de la fosa será rociada con un desinfectante adecuado.
- ✓ La entrada a esta fosa será vallada y prohibido el acceso. Vigilar la entrada de perros, gatos, pájaros, etc. en las inmediaciones de la fosa.
- ✓ Todo el material y equipos empleados en estas operaciones serán apropiadamente desinfectados.
- ✓ Si la fosa de enterramiento está situada fuera de la explotación, se deberá tener en cuenta su situación lo más alejada posible de caminos públicos, viviendas y otras explotaciones.
- ✓ En la elección del lugar de enterramiento, hay que tener en cuenta el fácil acceso de los camiones y maquinas excavadoras.

Si el método de elección es la **incineración**, además de lo detallado anteriormente, se empleará una gran cantidad de material inflamable para la incineración de los cadáveres.

Los animales enviados a una **planta de transformación**, deben ir acompañados por un documento de autorización de traslado de cadáveres que avale el traslado emitido por el Inspector Veterinario.

La destrucción de los animales en esta planta debe ser supervisada por los Servicios Veterinarios.

En cualquier caso, los vehículos utilizados para el transporte, deberán ir precintados y ser a prueba de escapes para evitar las pérdidas de líquidos durante el transporte, para ello se podrán usar vehículos con cubetas estancas, que impidan la eliminación de material durante el transporte.



Los vehículos usados para el transporte serán sometidos a una completa limpieza y desinfección.



**SECCIÓN 7ª**                      **SOSPECHA O DETECCIÓN DE**  
**ENFERMEDADES DE LOS ANIMALES**  
**ACUÁTICOS EN MEDIOS DE TRANSPORTE**

Ante la sospecha en un medio de transporte el VO se pondrá en contacto con los SVO de la Comunidad Autónoma correspondiente, para que adopte las medidas cautelares en la partida en la que se sospeche la enfermedad, y ordenará que:

- Los Servicios Veterinarios Oficiales examinarán los animales sospechosos y elaborarán un informe de sospecha de acuerdo a lo establecido en el RD526/2014, cuyo resultado será remitido urgentemente al Jefe Provincial de Sanidad Animal para que inicie la coordinación de las actuaciones de investigación en la explotación o zona de cría de moluscos. En el examen clínico se procederá a la toma de muestras y a su envío al laboratorio.
- Los SVO podrán decidir el sacrificio preventivo de todos los animales que se hallen en el vehículo.
- Los cadáveres de los animales infectados y sospechosos serán destruidos bajo la supervisión oficial.
- No se introducirán animales acuáticos en el medio de transporte mientras no hayan transcurrido como mínimo 24 horas desde el final de las operaciones de limpieza y desinfección.
- Se cumplimentará el modelo de encuesta epidemiológica recogida en el ANEXO IV.
- Se aplicarán las directrices y procedimientos contemplados en la SECCIÓN 2, tanto en la explotación de procedencia como en aquellas explotaciones en las que pueda existir relación epidemiológica directa, especialmente en caso de que el vehículo de transporte de los animales haya realizado paradas en más explotaciones.
- En caso de que se confirme la presencia de una enfermedad exótica, no exótica o emergente se aplicarán las medidas establecidas en la SECCIÓN 3ª o 4ª según corresponde en la explotación de procedencia de los animales afectados.



## **SECCIÓN 8ª VACUNACIÓN DE EMERGENCIA**

La aplicación de programas de vacunación se debe ajustar al artículo 45 del RD1614/2008.

- Se prohíbe la vacunación contra las enfermedades exóticas enumeradas en el anexo IV, a menos que dicha vacunación se apruebe de conformidad con los artículos 39, 40 o 44. 2.
- Se prohíbe la vacunación contra las enfermedades no exóticas enumeradas en el anexo IV en cualquier parte de España que haya sido declarada libre de las enfermedades en cuestión con arreglo a los artículos 46 ó 47, o que esté cubierta por un programa de vigilancia aprobado de conformidad con el artículo 41.1.
- Las vacunas utilizadas estarán autorizadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, de acuerdo con el Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente, o autorizadas de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 726/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos, por la Comisión Europea.

Sólo se podrá recurrir a la vacunación (previa autorización por parte del MAGRAMA) en alguno de los siguientes supuestos:

- Aparición de enfermedades emergentes y exóticas que puedan comprometer la situación sanitaria de los animales acuáticos de la zona o territorio relacionado epidemiológicamente.
- Cuando las medidas para controlar la enfermedad no resulten eficaces y la enfermedad en cuestión se propague a otras explotaciones o zonas a pesar de las medidas adoptadas.
- Estará permitida dicha vacunación en las partes de España que no hayan sido declaradas libres de las enfermedades en cuestión, o cuando la vacunación forme parte de un programa de erradicación aprobado de conformidad con el artículo 41.2. 3. Del Real Decreto 1614/2008.



## **SECCIÓN 9ª                      FORMACIÓN Y CONCIENCIACIÓN**

Para una eficaz lucha frente a alguna de estas enfermedades es fundamental contar con personal altamente cualificado. Con este fin, el MAGRAMA, en colaboración con los servicios de Sanidad Animal de las CC.AA. realizarán de forma periódica cursos de formación específica destinados a técnicos tanto de la administración como del sector privado.

Estos cursos de formación se impartirán en colaboración con las Facultades de Veterinaria, Colegios Oficiales de Veterinaria, Centros de Investigación, etc., e incluirán formación en los ámbitos de signos clínicos, investigación epidemiológica, control de enfermedades, campañas de sensibilización para operadores y veterinarios relacionados con la acuicultura.

Por otra parte, al ser fundamental la implicación del sector en la lucha contra la enfermedad, se realizarán periódicamente campañas de divulgación a los productores a través de las A.D.S. u otras organizaciones.

Las CC.AA. en coordinación con el Comité de la RASVE y el MAGRAMA, podrán realizar ejercicios de simulación prácticos, que permitirán asegurar el correcto funcionamiento del sistema.

Los ejercicios de simulación tendrán como base este Manual y los Protocolos de actuación en la lucha las enfermedades de la acuicultura que se pudieran desarrollar.





## **SECCIÓN 10ª**

## **REVISIÓN DEL PLAN DE ALERTA**

El presente Plan de alerta podrá ser revisado y modificado cuando lo requiera la situación epidemiológica, los cambios en la normativa o los avances en la lucha contra la enfermedad. En cualquier caso este Plan de alerta será revisado, con el asesoramiento del grupo de expertos y en colaboración con las CC.AA. con una periodicidad mínima de cada 5 años. Las revisiones del Plan de Alerta tendrán en cuenta la compatibilidad con los planes de otros Estados miembros de la UE.



---

# **ANEXOS**

## **MANUAL PRÁCTICO DE OPERACIONES EN LA LUCHA CONTRA LAS ENFERMEDADES DE ANIMALES ACUÁTICOS**

---



# **ANEXO I**

## **MÉTODOS DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN EN EXPLOTACIONES DE ACUICULTURA**



## **1. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN PARA GRANJAS DE MOLUSCOS**

Hay muy poca información sobre los desinfectantes y las concentraciones adecuadas para la inactivación de los agentes patógenos que afectan a los moluscos. Se pueden establecer tres estadios de desinfección en los criaderos, basándose en la esterilización del agua con presencia de los agentes patógenos propios de los moluscos.

- Pretratamiento del agua afluente con filtrado (1  $\mu\text{m}$ -0,2  $\mu\text{m}$ ) o desinfección química para proteger los stocks.
- Tratamiento dentro de las instalaciones especialmente los sistemas de reciclado para proteger los stocks.
- Tratamiento del agua efluente para proteger el medio ambiente

### **DESINFECTANTES DE TANQUES Y TUBERÍAS**

- Según la densidad de población de moluscos se recomienda que se hagan desinfecciones rutinariamente en las tuberías y los tanques con agua con ozono o cloro que posteriormente debe neutralizarse. La desinfección se realizará siempre en el caso de que se introduzca un nuevo lote de moluscos.
- El detergente para limpiar, debe ser compatible con la superficie a tratar (p. e. los yodóforos son ácidos e incompatibles con los suelos de hormigón que son alcalinos) ya que es necesaria la limpieza de las superficies antes de la desinfección, se recomienda el uso de agua afluente filtrada para la limpieza.
- Los desechos producidos, deben desinfectarse antes de ser evacuados.
- Regularmente se deben secar las tuberías, tanques y otros equipos con aire seco.
- El cloro que se aplica es de uso doméstico. Llenado de las tuberías con 50 mg de cloro/litro dejar actuar al menos 30 minutos, esto es efectivo frente a la mayoría de los agentes patógenos incluidos los protozoos. La neutralización se realiza bien pasando el agua a través de carbón activo o bien utilizando componentes químicos ver último párrafo "Neutralización de Halógenos".
- El yodo se puede usar en forma de soluciones alcalinas a 200-250 mg/litro con un tiempo de contacto de al menos 10 minutos, éstos son efectivos frente a los parásitos protozoarios después del tratamiento con aire seco de los tanques y tuberías.

### **DESINFECCIÓN DE AGUA EFLUENTE**



- El **ozono** es el principal agente desinfectante que se ha usado para controlar el crecimiento de los microorganismos en el agua. Su acción se basa en la formación de residuos oxidantes; éstos después, deben ser neutralizados porque también son tóxicos para las larvas de las ostras. La neutralización se hace con carbón activo.
- El **cloro** se usa a una concentración de 50 mg de cloro/litro para realizar una esterilización completa posteriormente debe ser neutralizado. El operario debe llevar protección especial frente a los gases desprendidos.
- El **yodo** no es tan efectivo como a y b.

### **DESINFECCION DE ROPA Y EQUIPO**

- Los **yodóforos** a 200-250 mg yodo/litro pueden usarse como baño para los pies.
- El **cloro** a una concentración de 50 mg de cloro/litro puede usarse como baño para los pies y para la esterilización del equipo.
- **Hidróxido de sodio** para la limpieza de pies es adecuado para botas de goma.

### **PRÁCTICAS RECOMENDADAS EN EL MANEJO DE LAS INSTALACIONES DE MOLUSCOS**

1. Los cultivos de moluscos y algas deben permanecer libres de patógenos.
2. Filtrado de agua, desinfección de tanques, tuberías, equipo pediluvios y cambios de agua.
3. Aislamiento de los stocks infectados y del equipo que ha entrado en contacto en los primeros signos de enfermedad.
4. Desechar el stock infectado y esterilizar el equipo
5. Identificar la fuente de la infección para prevenir la infección en el futuro (stocks de algas, larvas, reproductores, agua de mar).

## **2. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN PARA GRANJAS DE CRUSTÁCEOS**

La elección del método depende de la razón de la desinfección

- Cuando ocurre una enfermedad de la lista de la OIE y se pretende su erradicación.
- Programas de Bioseguridad para excluir determinadas enfermedades.
- Medida sanitaria para reducir la incidencia de una enfermedad.

### **2.1 Desinfectantes**

Los más apropiados en las granjas de crustáceos son:

- 1.-Lejía (hipoclorito de calcio)
- 2.-Formaldehído.
- 3.-Yodo
- 4.-Luz UV
- 5.-Cal en forma de óxido de calcio e hidróxido de calcio.



- 6.-Ozono
- 7.-Vapor
- 8.-Agua caliente a 60°C
- 9.-Ácidos concentrados
- 10.-Desecación

## **2.2 Instalaciones de multiplicación y cría de reproductores y criaderos**

### **2.2.1-Desinfectado de larvas y huevos**

Es muy importante en el caso de muchas enfermedades en las que las heces contaminan los huevos y también las larvas, por ello es necesario hacer una desinfección rutinaria. Para los huevos y larvas se usan yodóforos y para las larvas también la formalina. En todos los casos tras el tratamiento, se han de lavar con agua de mar antes de introducirlos en tanques desinfectados.

### **2.2.2-Desinfectado de tanques, tuberías, equipos, etc.**

Deben ser lavados, desinfectados (siguiendo las pautas de la tabla “Métodos de desinfección de las instalaciones de acuicultura”) y secados entre cultivo y cultivo.

### **2.2.3-Desinfección de Estanques de crecimiento y maduración**

Después de recolectar una cosecha de crustáceos una vez hayan llegado a la madurez, rutinariamente se ha de prestar especial atención a los desechos que se han depositado en el fondo de los estanques o tanques utilizados. Éstos deben ser tratados y eliminados. Es fácil realizar estas operaciones en el caso de utilizarse tanques pero difícil si el fondo es de tierra.

#### **Cloración**

Tras retirar el agua se procede a rellenar parcialmente con agua a la que se añade lejía en una cantidad mínima de 100 kg / 10.000 m<sup>3</sup> de volumen del estanque, tras actuar por un periodo de 24-48 hr, hay que neutralizar con tiosulfato (285 kg) o por exposición al sol y aireación durante 48hrs.

#### **Encalado**

La cal en forma de óxido de calcio e hidróxido de calcio debe aplicarse al fondo húmedo en una concentración de 5000 kg/ha o 1500 kg/ha, respectivamente. Dejar actuar durante una semana.

#### **Secado y arado**

El arado de los estanques es un método muy usado además de los dos anteriores, normalmente tras el secado (esperar a que en la tierra se abran grietas de 10 cm. de profundidad) se realiza el arado (con una profundidad de 20 cm). El secado y arado en conjunto, tienen las siguientes virtudes: se reduce el contenido orgánico,



elimina los gérmenes nocivos, mejora el reciclado de nutrientes, efecto tampón etc. Los estanques deben dejarse así durante una semana antes de que se vuelvan a llenar.

#### **2.2.4-Desinfección del agua afluyente**

La desinfección del agua es muy importante y se puede realizar de diferentes formas.

- a) Por **filtración sucesiva en un sistema de canales** primero se retienen los animales acuáticos y la basura de gran tamaño en el primer tamiz formado por barras, luego pasa por **tamices** que reducen la luz progresivamente hasta el último con un poro de 150  $\mu\text{m}$ -250  $\mu\text{m}$ .
- b) En el canal se introducen distintas **matrices** para el filtrado primero la matriz será grava de gran tamaño, luego grava normal y así hasta llegar a la arena fina.
- c) **Reducir el intercambio de agua o llegar a suplemento cero** mediante el uso de aireación y la recirculación del agua

### **3. MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DE LAS INSTALACIONES DE PISCICULTURA**

El procedimiento de desinfección depende de muchos factores como: el tamaño del material y tipo que va a ser desinfectado, es más difícil en superficies permeables que en las impermeables, agentes a inactivar, etc. Previamente a la desinfección es necesario realizar una limpieza. Además, el operario debe seguir SIEMPRE las recomendaciones de precaución adecuadas antes de realizar la aplicación de los agentes desinfectantes (Tabla 1)

<b>Proceso</b>	<b>Indicaciones</b>	<b>Método</b>	<b>Comentarios</b>
<b>FISICOS</b>			
Desecación por luz solar	Patógenos en tierra depositada en los fondos	Secar durante 3 meses a una temperatura media de 18°C.	Se puede reducir el periodo si se usa un desinfectante
Calor seco	Patógenos sobre piedra, hierro superficies de cerámica	Soplete	
Calor húmedo	Los tanques de transporte de peces.	Vapor a 100°C o mas durante 5 minutos	
Rayos ultravioleta (254 nm)	Virus y bacterias	10 mJ/cm <sup>2</sup>	Dosis letal mínima



Rayos ultravioleta (254 nm)	Necrosis Infecciosa Pancreática (IPN) y nodavirus en agua (VNN /VER)	125-200 mJ/cm <sup>2</sup>	
<b>QUÍMICOS</b>			
Acido acético	Anemia Infecciosa del salmón	0,04-0,13%	
Amonio cuaternario	Virus bacterias manos y superficies de plástico	0,1-1g/litro durante 1-15 minutos	Virus IPN
Óxido de Calcio	Sobre tierra seca para todos los patógenos de peces	0,5 kg/m <sup>2</sup> durante 4 semanas	Cambiar el agua y vaciar las piscinas desinfectadas manteniendo los efluentes a pH 8,5
Hipoclorito de calcio	Bacterias y virus en las superficies limpias y agua	30 mg de cloro disponible/litro. Dejar para inactivar durante varios días o neutralizar con tiosulfato de sodio después de 3 hr	Puede neutralizarse con tiosulfato de sodio (ver recomendaciones especiales)
Cianamida de calcio	Esporas en los fondos de tierra	3000 kg/ha sobre superficies secas; dejar en contacto durante 1 mes	
Cloramina T	Destruye el virus Anemia Infecciosa del salmón	1% durante 5 minutos	
Cloramina T	Destruye el virus de la Necrosis Infecciosa Pancreática (IPN)	1% durante 30 minutos	
Dióxido de Cloramina	Anemia Infecciosa del salmón (ISA)	100 ppm durante 5 minutos	En agua con cargas orgánicas bajas
Acido fórmico	Desecho de peces para ensilado (IPN)	pH <4 después de al menos 24 hr	Destruye bacterias y virus ISA IPN
Formalina	En instalaciones cerradas con patógenos de peces	Liberado de sustancias formogénicas generalmente trioximetilene	Los nodavirus resistentes
Peróxido de hidrógeno	ISA virus		





Yodo (yodóforo)	Bacteria, virus en redes botas y ropa	200 mg/litro durante pocos segundos	Ver especiales recomendaciones
Yodo (yodóforo)	Manos, superficies lisas	200 mg/litro durante unos segundos	
Ozono	Esterilización del agua de patógenos de los peces	0.2-1 mg/litro durante 3 minutos	Costoso y muy tóxico para los peces y las personas
Ozono en agua de mar	Superficies y equipo	0.5-1 mg/litro durante 30-60 minutos <sup>1</sup>	
Componentes de poróxido Virkon	Virus IPN	1% durante 1 minuto	
Acido peracético	Virus ISA	0,08-0,25%	
Hidróxido de sodio <sup>2</sup>	Patógenos de peces en superficies resistentes con fisuras	30 mg/litro	El desinfectante más activo impregna las superficies Ca (OH) <sub>2</sub> tratadas; Teepol es un agente tensio-activo
Hipoclorito de sodio <sup>2</sup>	Bacterias virus sobre todas las superficies limpias y agua	30 mg de cloro disponible/litro. Dejar varios días para que inactive o neutralizar con tiosulfato de Na después de actuar durante 3 hrs	
Hipoclorito de sodio	Manos	Aclarar con agua limpia o neutralizar con tiosulfato	

## NEUTRALIZACIÓN DE HALÓGENOS

Los agentes halogenados son muy tóxicos para los animales acuáticos y por tanto después de su aplicación deben ser neutralizados; se realiza con tiosulfato de sodio según las proporciones moleculares:

$$\text{N}^{\circ} \text{ g de tiosulfato} = 2,85 \times \text{n}^{\circ} \text{ de g de cloro}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ g de tiosulfato} = 0,78 \times \text{n}^{\circ} \text{ de g de yodo}$$

<sup>1</sup> Residuo total oxidante (Total residual oxidant)

<sup>2</sup> Peligroso ver las precauciones en las indicaciones generales



Si el tiosulfato de sodio se prepara en % de peso los volúmenes de neutralización tienen que ser:

**Cloro**

$28,5 \times (\text{n}^\circ \text{ de litros de solución desinfectante} \times \text{concentración mg/litro})/100$

**Yodo**

$7,8 \times (\text{n}^\circ \text{ de litros de solución desinfectante} \times \text{concentración mg/litro})/100$

**4. Lista abierta de productos biocidas que se encuentran autorizados para su libre venta en España, de uso específicamente en acuicultura.**

Todos ellos están registrados y en vigor en el Registro Zoosanitario de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria.

**AQUAZIX PLUS**

Nº de registro: 01294-P

Titular: Biocidas Biodegradables Zix, s.l.

Indicaciones de Uso: biocida contra bacterias, virus, hongos, protozoos, coccidios, algas y otros organismos

Principales componentes del formulado: Peróxido de Hidrógeno y Cloruro de Plata  
BIOPLAGEN AQUA MAX (marca blanca del anterior)

Nº de registro: 01306-p

Titular: Biocidas Biodegradables Zix, s.l.

Indicaciones de Uso: biocida contra bacterias, virus, hongos, protozoos, coccidios, algas y otros organismos

Principales componentes del formulado: Peróxido de Hidrógeno y Cloruro de Plata.  
SANAQUA PLUS (marca blanca del primero)

Nº de registro: 01307-P

Titular: Biocidas Biodegradables Zix, s.l.

Indicaciones de Uso: biocida contra bacterias, virus, hongos, protozoos, coccidios, algas y otros organismos

Principales componentes del formulado: Peróxido de Hidrógeno y Cloruro de Plata.  
AQUAZIX E 12

Nº de registro: 01326-P

Titular: Biocidas Biodegradables Zix, s.l.

Indicaciones de Uso: biocida: bactericida contra virus, hongos algas y otros microorganismos

Principales componentes del formulado: Peróxido de Hidrógeno y Ácido Peracético  
AQUAZIX E 52

Nº de registro: 01343-P

Titular: Biocidas Biodegradables Zix, s.l.

Indicaciones de Uso: biocida: bactericida contra virus, hongos algas y otros microorganismos

Principales componentes del formulado: Peróxido de Hidrógeno.



## **ANEXO II. LABORATORIOS DE REFERENCIA**

### **Laboratorio Nacional de Peces y Crustáceos: Laboratorio Central de Veterinaria Algete (Madrid)**

Director: Dra. Montserrat Agüero

Laboratorio Central de Veterinaria de Algete  
Ctra. Algete, km 8  
28110 Algete (Madrid)  
ESPAÑA

**91 347 92 56/57** (LCV) (Horario 8-15h)

**91 347 92 59** (Vigilancia del LCV) (24 horas)

**Fax: +34 91 347 37 78**

**Email: [lcv@magrama.es](mailto:lcv@magrama.es)**

El LCV de Algete tiene servicio permanente de recepción de muestras, debiendo ser informado del envío previamente, bien telefónicamente (tel.: 91 347.92.56/57) o por fax (91 347.37.78). Se proporcionará información detallada, indicando el medio de transporte utilizado así como día y hora aproximada de llegada.

### **Laboratorio Nacional de Referencia de los Moluscos**

**Instituto de Investigaciones Marinas CSIC,**

Director: Dr. Antonio Figueras

Dirección: C/ Eduardo Cabello, 6

36208 Vigo (Pontevedra).

Teléfono 986-231930

España.



### ANEXO III

#### GRUPO DE EXPERTOS

Dra. Carolina Tafalla Piñeiro  
Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)  
Carretera de Algete a El Casar km. 8.1  
Valdeolmos 28130 (Madrid)  
Tel. 91 6202300  
Fax. 91 6202247  
Email: [tafalla@inia.es](mailto:tafalla@inia.es)

Dr. Antonio Figueras  
Instituto Investigaciones Marinas. CSIC.  
Spanish National Reference Laboratory for Mollusc Diseases  
Eduardo Cabello 6  
36208 Vigo  
Phone (Direct line) 34 986 21 44 62  
Phone 34 986 23 19 30  
FAX 34 986 29 27 62  
e mail: [antoniofigueras@iim.csic.es](mailto:antoniofigueras@iim.csic.es)

Dra. Raquel Aranguren Ruiz  
Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades de Moluscos Bivalvos  
Instituto de Investigaciones Marinas, CSIC  
C/ Eduardo Cabello nº6  
36208 Vigo, Pontevedra  
Tel: 986231930 ext 285  
e-mail: [arangur@iim.csic.es](mailto:arangur@iim.csic.es)

Dr. Ignacio de Blas Giral  
Licenciado y Doctor en Veterinaria Especialista en Epidemiología  
Profesor Titular del Departamento de Patología Animal  
Laboratorio de Ictiopatología  
Universidad de Zaragoza  
C/ Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza  
Tel: 976 761569  
[deblas@unizar.es](mailto:deblas@unizar.es)

Dr. Francesc Padrós Bover

Departamento de Biología Animal, de Biología Vegetal y de Ecología  
Edificio C Facultad de Biociencias  
08193 Bellaterra (Barcelona)

[Francesc.Padros@uab.cat](mailto:Francesc.Padros@uab.cat)



## ANEXO IV. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

### A. DATOS DE LA EXPLOTACIÓN/ZONA/COMPARTIMENTO

- 1) Nombre. o denominación:  
Localización: (si es posible, adjuntar mapa y croquis)
- 2) Nombre del propietario/responsable:  
Dirección:  
Teléfono de contacto:
- 3) Nombre del veterinario o técnico responsable:  
Teléfono de contacto:
- 4) Nombre del responsable/encargado de la explotación/zona o compartimento:  
Teléfono de contacto:

### B. DATOS DE PRODUCCIÓN Y MANEJO:

- 5) Especie:
  - Especie principal
  - Especie secundaria
  - Otras especies.
- 6) Sistema productivo
  - a) El objetivo de la producción:
    - Para explotaciones de acuicultura de peces:
      - Incubadora
      - Vivero
      - Población reproductora
      - Engorde para consumo humano
      - Pesquerías «de suelta y captura»
      - Otros
    - Para explotaciones de acuicultura de crustáceos y explotaciones de acuicultura de moluscos:
      - Incubadora
      - Vivero
      - Engorde
      - Otros
  - b) El tipo de instalaciones de la explotación:



- Para explotaciones de acuicultura de peces:
  - Jaulas/cercados/corrales de agua salada
  - Estanques de agua salada
  - Tanques/canales de agua salada
  - Sistema cerrado de agua salada (recirculación)
  - Jaulas/cercados/corrales de agua salobre
  - Estanques de agua salobre
  - Tanques/canales de agua salobre
  - Sistema cerrado de agua salobre (recirculación)
  - Jaulas/cercados/corrales de agua dulce
  - Estanques de agua dulce
  - Tanques/canales de agua dulce
  - Sistema cerrado de agua dulce (recirculación)
  - instalación de investigación
  - Instalación de cuarentena
  - Otros
  
- Para explotaciones de acuicultura de moluscos:
  - Sistema abierto
  - Sistema cerrado (recirculación)
  - Centro de expedición, centro de depuración
  - Zona de cría de moluscos
  - Instalación de investigación
  - Instalación de cuarentena
  - Otros
  
- Para explotaciones de acuicultura de crustáceos:
  - Lagunas/cercados/corrales
  - Estanques en tierra
  - Tanques/canales
  - Sistema cerrado en tierra (recirculación)
  - Instalación de investigación
  - Instalación de cuarentena
  - Otros

En el caso de *Alevines*:

- Porcentaje y viabilidad de alevines
- La reabsorción del saco vitelino, ha sido correcta?:  SÍ  NO

En el caso de los *Reproductores*:

- Fecha del desove:
- La producción de huevos, ha sido la esperada?:  SÍ  NO
- Fecha de eclosión:
- Porcentaje de viabilidad de los huevos:

6) Producción anual aproximada :



**C. DATOS DE LA ENFERMEDAD:**

7) Indicar número, clase y edad de los afectados:

- *Alevines:*
- *Juveniles:*
- *Engorde:*
- *Reproductores:*
  - ¿Hay algún problema en la incubación?:
  - ¿Existen problemas en el desove?

8) Fecha de aparición del proceso:

9) Porcentaje de mortalidad habitual antes del proceso:

Porcentaje de enfermos:

Porcentaje de muertos:

Número de bajas diarias: ¿va en aumento  SÍ  NO

10) Síntomas y lesiones observados en los animales enfermos:

11) Se ha diagnosticado algún otro proceso anteriormente:

SÍ ¿Cuál?  NO

¿Quién?:

¿Cuándo?

12) ¿Se ha realizado anteriormente al proceso actual algún análisis de laboratorio en el agua y/o en los animales?:

SÍ Laboratorio:  
Tipo de análisis:  
Fecha:  
Resultado

NO

13) ¿Se ha realizado algún tipo de tratamiento medicamentoso?

SÍ Tipo:  
Fecha:  
Dosis:  
Eficacia:

NO

14) Otras medidas:

**D. DATOS DE MOVIMIENTO:**

Entradas (Indicar datos de los últimos tres meses)

15) ¿Ha habido introducción en la explotación de:

Animales adultos/alevines/juveniles  Huevos



Fecha:

Procedencia:

Cantidad:

¿Posee calificación sanitaria?  SÍ  NO

17) Los animales introducidos, ¿han sido los primeros afectados?:  SÍ  NO

18) ¿Conoce si ha habido algún problema sanitario en la empresa origen de los huevos/animales?

Salida (Indicar datos de los últimos tres meses)

19) ¿Ha habido salida de la explotación de:

Animales vivos  Huevos

Fecha

Destino:

Cantidad:

#### **E. DATOS SOBRE BIOSEGURIDAD EN LA EXPLOTACIÓN:**

20) Explicar brevemente el método de limpieza y desinfección (vehículos, maquinaria, instalaciones...)

21) Indicar los productos utilizados y dosis

21) Explicar brevemente el método de eliminación de cadáveres y residuos

22) ¿Dispone la explotación de vado sanitario?  SÍ  NO

23) ¿Dispone la explotación de vestuario?  SÍ  NO

24) ¿Qué personal tiene habitualmente acceso a las instalaciones?

25) Los trabajadores, ¿utilizan indumentaria específica dentro de la explotación?  
 SÍ  NO

26) ¿Qué otro personal puede tener acceso a las instalaciones? (transportistas, veterinarios, etc.)

27) ¿Se dispone de indumentaria adicional para los visitantes de la explotación?

#### **F) DATOS DE INFRAESTRUCTURA:**

28) Origen del agua (río, pozo, manantial, zona costera) y distancia al punto de captación:

29) Caudal:





30) ¿Se hacen análisis periódicos del agua?

- SÍ    ¿Cuáles?                      Resultados:  
 NO

31) ¿Se realiza reciclaje del agua?

- SÍ    Explicar brevemente el sistema:  
 NO

32) ¿Tiene sistema de oxigenación?

- SÍ     NO

33) ¿En el caso de la acuicultura continental/marina, ¿se encuentran aguas arriba o en los estuarios?:

- Centros urbanos:  SÍ     NO  
Nº habitantes:
- ¿Explotaciones agropecuarias?  SÍ     NO  
¿De qué tipo?
- Industrias, fábricas:  SÍ     NO  
¿De qué tipo?:

34) Proximidad a otras piscifactorías o instalaciones: (poner distancia en metros)

*Aguas arriba:*

*Aguas abajo:*

*Polígonos*

35) Ha sufrido la explotación alguna situación anormal referente a:

- tormentas
- riadas
- frío excesivo
- calor excesivo
- contaminación
- otros:

NOTA: Este informe deberá ir acompañado del esquema de la explotación acuícola, distribución de los estanques y de las conducciones del agua, así como de los puntos de entrada y salida del agua y un croquis donde se señale la localización de los centros urbanos, explotaciones agropecuarias e industrias, con respecto a la piscifactoría y al curso del río.



## ANEXO V

### RESEÑA DE LAS ENFERMEDADES INCLUIDAS EN EL ANEXO IV DEL RD1614/2008

---

#### 1. Necrosis Hematopoyética Epizoótica:

##### 1.1 Etiología

- Clasificación del Agente causal: El virus de la necrosis hematopoyética epizoótica (EHN) pertenece a la familia Iridoviridae y al género Ranavirus.
- Resistencia a la acción física y química:

Temperatura: Inactivo a temperatura de 60°C durante 15 minutos y 40°C/24h.

pH: Inactivado a pH 4 durante 1 hora y a pH 12 durante 1 hora.

Desinfectantes: Inactivado con 200 mg/litro de hipoclorito de sodio, 2 horas.

- Supervivencia: Se mantiene viable en los tejidos de los peces almacenados congelados a una temperatura entre -20 y -70°C por un periodo de 2 años. También sigue viable durante 113 días (a 15°C) en cultivos de células desecadas. Se desconoce la persistencia del virus en los sedimentos procedentes de granjas, pero puede ser prolongada.

##### 1.2 Epidemiología

La necrosis hematopoyética epizoótica es una enfermedad viral altamente infecciosa de la perca (*Perca fluviatilis*) que también afecta a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Muchas otras especies son propensas al virus (EHN) de forma experimental. Estas especies incluyen a la *Macquaria australasica*, *Gambusia affinis*, *Bidyanus bidyanus*, y al *Galaxias olidus*.

Cabe suponer que una amplia variedad de teleósteos son propensos al virus de la necrosis hematopoyética epizoótica.

No se conocen con certeza los huéspedes naturales del EHN, pero como el virus está estrechamente relacionado con los virus que infectan a los anfibios (y a los reptiles) es posible que existan reservorios de infección fuera de las poblaciones de peces.

##### 1.3 Transmisión

El virus de la necrosis hematopoyética epizoótica se propaga rápidamente en el agua, pero la infección puede ser transmitida en los establecimientos de acuicultura debido a los movimientos de peces. En general, la prevalencia de la infección es muy baja en las truchas arco iris de manera que el virus puede ser transmitido fácilmente por inadvertencia a los bancos de peces.



Como el virus es muy resistente puede propagarse por medio de los aparejos de pesca y otros objetos inanimados, así como a través de las aves piscívoras. No se sabe con certeza si la trucha arco iris es un verdadero portador del virus. Tampoco se puede excluir la posibilidad de transmisión vertical asociada.

#### **1.4 Fuentes del Virus**

El virus se reproduce en un porcentaje muy alto en peces infectados y se propaga a través de los flujos corporales y de los cadáveres de peces a medida que se descomponen en el agua.

El virus se transmite también por el agua de transporte de los peces y por los equipos utilizados en las faenas.

#### **1.5 Distribución geográfica**

**La enfermedad de necrosis hematopoyética epizoótica sólo ha sido declarada en la región sudeste de Australia. Normalmente, los brotes que se han registrado en las percas o en las truchas tienen lugar durante el verano cuando la temperatura del agua puede estar por encima de los 11°C. En laboratorio, la trucha arco iris es susceptible a la enfermedad con temperaturas que oscilan entre 8°C y 21°C, mientras que la perca es resistente a las infecciones cuando las temperaturas están por debajo de los 12°C. Normalmente, los brotes naturales de enfermedad en las percas afectan a todos los grupos de edades cuando el virus se ha introducido por primera vez en una zona pero luego se producen epizoóticas anuales en los jóvenes. En cuanto a las truchas arco iris, la mortalidad puede ocurrir en cualquier grupo de edad, aunque se registra sobre todo en pececillos que tienen un tamaño de < 125 mm. Las aguas de mala calidad y las enfermedades intercaladas contribuyen al desarrollo de la infección y puede provocar un brote en las truchas.**

Para obtener una información más detallada sobre la distribución geográfica, véase los últimos números de Sanidad Animal Mundial y la página Web de la OIE.

#### **1.6 Diagnóstico**

Los síntomas clínicos que no son específicos a las truchas y que incluyen un aumento de la tasa de mortalidad, a menudo están asociados con la baja calidad del agua y signos generales de mala salud. Entre estos signos se pueden incluir erosiones de las aletas, decoloración de la piel y baja capacidad natatoria. En las percas se producirá un aumento repentino de la mortalidad que generalmente viene precedida por inapetencia e inactividad, pudiendo acompañarse también por hemorragias cutáneas en las fases terminales.

Lesiones:

No se producen lesiones patognomónicas. En cambio, se puede observar una hinchazón del bazo y del hígado, un exceso de flujo suerosanguíneo peritoneal y múltiples focos de necrosis blanca en el hígado.

Diagnóstico de Laboratorio:



El virus de la necrosis hematopoyética epizoótica puede identificarse en las lesiones mediante un cultivo de células predispuestas, como son las células BF-2, FHM o CHSE, seguido por:

Examen histopatológico. Coloración inmunofluorescente. Coloración inmunoperóxida. Ensayo inmunoenzimático (ELISA). Microscopía electrónica. Reacción en cadena de la polimerasa.

### 1.7 Prevención y control

No existe ningún tratamiento posible.

## **2-Síndrome Ulceroso Epizoótico:**

### 2.1 Etiología

El síndrome ulcerante epizoótico (SUE) se considera una infección por un oomiceto conocido como *Aphanomyces invadans* o *A. piscicida*. Es una condición epizoótica de los peces silvestres, cultivados de río o estuario.

El **Síndrome Ulceroso Epizoótico** (SUE) tiene una etiología infecciosa compleja y sus rasgos clínicos son la presencia de infección invasiva por *Aphanomyces* y de lesiones ulcerosas necróticas que producen granulomatosis. El SUE también se conoce como la enfermedad de las manchas rojas (EMR), granulomatosis micótica (GM) y micosis ulcerosa (MU). Recientemente, los científicos propusieron rebautizar el SUE con el nombre de afanomicosis granulomatosa epizoótica o AGE. En la actualidad, EMR, GM, MU y EGA son sinónimos de SUE. El oomiceto causante del SUE es *Aphanomyces invadans* o *A. piscicida*. También se ha asociado a los parásitos y los rhabdovirus con ciertos brotes de la enfermedad, y las bacterias Gram-negativas secundarias infectan sistemáticamente las lesiones del SUE. El género *Aphanomyces* es miembro de un grupo de organismos comúnmente conocido como hongos acuáticos. Aunque durante largo tiempo se le consideró un hongo debido al crecimiento filamentoso característico, este grupo, el de los Oomicetos, no es miembro de los Eumicotas pero se agrupa junto con los diatomos y las algas en un grupo denominado Estramenópilos o Cromistas.

### 2.2 Epidemiología.

El SUE se detectó por primera vez en el ayu cultivado de río (*Plecoglossus altivelis*) en la Prefectura de Oita, Isla Kyushu, Japón en 1971. Más tarde se descubrió en peces de estuario, (*Mugil cephalus*) en el este de Australia en 1972. El brote se ha extendido por Papúa, hasta el sureste y sur de Asia, y más recientemente al Asia Occidental, alcanzando a Pakistán y EEUU. El SUE causa mortalidad en peces silvestres y cultivados. En todas esas regiones, se ha confirmado por diagnóstico basado en histología que el SUE ha afectado a 50 especies de peces.

### 2.3 Transmisión.



El SUE se transmite de forma horizontal. Las zoosporas de *Aphanomyces* pueden transmitirse horizontalmente de un pez a otro a través del suministro de agua. Se cree que sólo las zoosporas son capaces de adherirse a la piel dañada de pez y de transformarse en hifas. Si las zoosporas no encuentran una especie susceptible o se topan con circunstancias desfavorables, pueden formar zoosporas secundarias. Las zoosporas secundarias pueden enquistarse en el entorno del agua o el estanque a la espera de condiciones que favorezcan la activación de las esporas. No está claro aún el modo en que el patógeno *Aphanomyces* o su espora sobrevive después de los brotes, teniendo en cuenta que estos se producen prácticamente anualmente en la misma época del año en zonas endémicas.

El SUE ocurre la mayoría de las veces en períodos de baja temperatura o a 18–22°C y después de los períodos de intensas lluvias. Estas condiciones favorecen la esporulación de *Aphanomyces invadans*, y se ha observado que las temperaturas propician un retraso en la respuesta inflamatoria de los peces a la infección por oomicetos. En algunos países, los brotes se dan primero entre los peces silvestres y luego se extienden a los estanques de las piscifactorías.

## 2.4 Diagnóstico

El diagnóstico del SUE se basa en la sintomatología clínica y se confirma mediante histopatología. Se puede lograr un diagnóstico del SUE mediante histopatología y aislamiento del oomiceto. El diagnóstico positivo del SUE se realiza mediante la demostración de la presencia de granulomas micóticos en los cortes de tejidos o por aislamiento de *Aphanomyces invadans* presente en los tejidos internos. Material del pez adecuado para examen histopatológico o para aislamiento de oomicetos:

Peces con afección clínica: riñones, hígados, tejido muscular (de peces de cualquier tamaño).

## 2.5 Control y prevención

Probablemente sea imposible el control del SUE en las aguas naturales. Para el caso de los brotes que tienen lugar en volúmenes de agua pequeños y cerrados, a menudo resulta efectivo, para reducir la mortalidad y controlar la enfermedad, tratar el agua con cal, mejorar la calidad del agua y retirar los peces infectados.

## **3-Septicemia Hemorrágica Vírica (SHV):**

### 3.1 Etiología

El virus de Egtved, o virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV), pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, y al género *Novirhabdovirus*.



#### Resistencia a la Acción Física y Química:

Temperatura: Inactivado a una temperatura de 50°C durante 10 minutos.

pH: Inactivado a pH 12.2 al cabo de 2 horas y a pH 2.5 durante 10 minutos.

Productos químicos: Inactivado por agentes oxidantes, sulfato de sodio y dodecilo, detergentes no iónicos, y disolventes lípidos (éter etílico y sensible al cloroformo).

Desinfectantes: Inactivado por formalina al 3% en 5 minutos; por hidróxido de sodio al 2% en 10 minutos; por cloro a razón de 540 mg/litro, durante 20 minutos, y por compuestos de yodo (I<sub>2</sub>, 100 ppm) en 5 minutos.

Supervivencia: Según la temperatura, la supervivencia puede ser larga a temperaturas por debajo de los 15°C. Se mantiene viable en el barro durante más de 10 días a una temperatura de 4°C. Después de 14 días sólo el 90% sigue inactivado en agua potable o de corriente a una temperatura de 10°C.

### 3.2 Epidemiología

#### Huéspedes

La septicemia hemorrágica viral (VHS) es una enfermedad viral altamente infecciosa que afecta principalmente a las truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en acuicultura.

Las infecciones naturales también se producen de forma espontánea en otras especies (especies afectadas que figuran en el Anexo IV del Real Decreto 1614/2008)

#### 3.3 Transmisión

En general, las infecciones naturales se producen por medio de la transmisión horizontal del virus propagado por las aguas o por un contacto directo con las secreciones (orina) procedentes de peces infectados.

El virus puede propagarse en la corriente a 10-20 km aguas abajo y llega a infectar a los bancos de truchas arco iris susceptibles a la enfermedad.

Las aves piscívoras (sobre todo las garzas) pueden actuar como vectores mecánicos de un establecimiento de acuicultura a otro.

El transporte de peces infectados en fase de incubación (por ejemplo antes del comienzo de los síntomas visibles) o el agua de transporte infectada son vías de infección conocida.

La transmisión vertical no se conoce o es extremadamente rara. Sin embargo, se consideran muy infecciosos los embriones de progenitores infectados.

#### 3.4 Fuentes del virus

El virus se expande a través de los peces infectados a través de la orina, y probablemente a través de los flujos sexuales y de los epitelios de la branquia y de la piel.

#### 3.5 Distribución geográfica

La septicemia hemorrágica viral (VHS) se produce en la región continental de Europa, incluyendo a Rusia. Fuera de esta área, las infecciones provocadas por el



virus de la VHS han causado una mortalidad importante entre los rodaballos criados en acuicultura.

Una mortalidad masiva del bacalao registrada a lo largo de la costa Pacífica de Washington, en Estados Unidos de América, Canadá y Alaska, EE.UU, ha sido asociada a las infecciones del virus de la septicemia hemorrágica viral.

La enfermedad no es endémica en todos los países en los que se ha declarado el virus. En general, la enfermedad se propaga cuando las temperaturas se sitúan entre 4°C y 14°C. La mayor parte del tiempo, las bajas temperaturas del agua (1–5°C) traen como consecuencia un periodo prolongado de baja mortalidad diaria, pero con una mortalidad acumulada alta. En cambio, cuando la temperatura del agua es elevada (15–18°C), la enfermedad se expande durante un breve período con una mortalidad diaria muy alta, aunque la mortalidad acumulada es moderada. Los brotes del virus de la septicemia hemorrágica viral se manifiestan en cualquier estación del año, pero es más frecuente que se declaren durante la primavera cuando las temperaturas del agua suben o tienden a variar.

Para obtener una información más detallada sobre la distribución geográfica, véase los últimos números de Sanidad Animal Mundial y la página Web de la OIE.

### **3.6 Diagnóstico**

Aumento de la mortalidad en la población. Los peces entran en un estado letárgico, se separan del cardumen y se concentran en las salidas o en los lados de un estanque. Los peces pueden experimentar una pérdida del equilibrio. Hemorragias de la piel, base de las aletas y el ano. Exoftalmia. Coloración oscura general. Branquias descoloridas

#### **Lesiones Internas**

No siempre aparecen lesiones en los casos de mortalidad súbita. El exceso de flujo ascítico en la cavidad abdominal generalmente contiene sangre. Los intestinos contienen mucosa en vez de comida. Recto flácido y descolorido. Hemorragias petequiales en los órganos viscerales. Hemorragias petequiales en los músculos y tejidos grasos. Hemorragias petequiales en la vejiga natatoria Para el diagnóstico final, hay que esperar el resultado de la identificación directa mediante inmunotécnicas o por aislamiento e identificación del virus

#### **Diagnóstico de Laboratorio**

Inoculación de líneas celulares susceptibles tales como BF-2 o RTG-2, seguido por un examen microscópico.

#### **Identificación del agente**

Neutralización del virus. Ensayos inmunofluorescentes. Ensayo inmunoenzimático (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), coloración inmunohistoquímica

Los métodos de identificación del agente la SHV se basan en métodos directos, i.e. el aislamiento del VHSV en cultivo celular seguido de la identificación mediante el uso de los métodos basados en los anticuerpos (prueba de inmunofluorescencia



indirecta (FAT),enzimoinmunoensayo (ELISA) o los métodos basados en el ácido nucleico (ej. reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

### **3.7 Tratamiento y control**

Solamente las medidas de manejo y control de los peces de las piscifactorías van a permitir evitar y controlar la presencia de estos virus.

El mecanismo de control de estas enfermedades es la prevención mediante la aplicación de medidas de carácter higiénico-sanitarias basadas en la limpieza de los estanques, el uso continuado de desinfectantes (amonios cuaternarios, formalina, clorados, organofosforados, yodóforos) medidas que eviten el estrés de los animales tales como manejo adecuado, el control de la excesiva densidad de población, anestesia a los animales en la manipulación de los mismos, etc.

La posibilidad de que la enfermedad se transmita de forma vertical, hace que el momento de la fecundación de los huevos pueda constituir un punto clave en la infección de los mismos, por ello, la fecundación deberá realizarse en presencia de yodóforos que inactivan el virus, lo que evitará (o reducirá) la posibilidad de que se produzca la transmisión vertical.

Del mismo modo, debemos controlar la entrada en la piscifactoría de potenciales portadores asintomáticos, de forma especial las especies ícticas de vida salvaje existentes en el río que pueden ser portadores de los virus y provocar de nuevo la infección en la piscifactoría, así como las aves ictiófagas y mamíferos que pueden entrar en las mismas, y que actúan como vehículos de los agentes víricos.

## **4-Necrosis Hematopoyetica Infecciosa (NHI)**

### **4.1 Etiología**

La enfermedad está producida por un virus englobado en la familia *Rhabdoviridae*, género *Lisavirus*. Posee la estructura típica de los Rhabdovirus con forma de proyectil (similar al virus de la rabia canina).Se han descrito diversas cepas del virus IHN en función del peso molecular de las proteínas que las constituyen, no obstante, parece que los estudios más recientes limitan a tres los serotipos existentes. La temperatura de multiplicación del virus se encuentra entre 4 y 20 °C, con el óptimo térmico alrededor de los 12°C. El virus es lábil a temperaturas superiores a 23-25°C. Frente al virus IHN, el pez produce anticuerpos neutralizantes, Inmunoglobulinas de actividad neutralizante está directamente relacionada con el número de proteínas G de la superficie viral. También se ha observado la producción de interferón por aquellos animales que han sufrido la infección por este virus.

Se ha observado una rápida pérdida de infectividad en el agua a temperatura ambiente. Los agentes inactivantes más eficaces frente al virus son: 6-mercaptapurina, Virazol, 5-fluorocytidina, 7-deazaadenosina, 5-fluorouridina, Cloroquina, Levamisol y 9-S-(2,3-dihidroxypropyl)-adenina.

Entre los inactivantes clásicos, el Ozono es más eficaz que el Cloro para inactivar el virus, si bien ambos son buenos virucidas. También es inactivado por el cloroformo y el éter. La conservación óptima del virus se realiza entre -70°C y -270°C, siendo inactivado en varias semanas a +4°C y en 15 minutos a 60°C.





La pérdida de infectividad del virus IHN depende también de la salinidad del agua, puesto que en el medio salino se inactiva más rápidamente. La estabilidad del virus disminuye a pH inferior a 5 y superior a 8. La deshidratación provoca la pérdida de la infectividad del virus en 7 días.

## 4.2 Epidemiología

Esta enfermedad se ha descrito tanto en especies de agua dulce como salada, no obstante, son los salmónidos los que presentan la enfermedad con mayor frecuencia, especialmente en Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y Trucha común (*Salmo trutta*) así como en diversas variedades de salmón de Norteamérica: Salmón Sockeye (*O. nerka*), Salmón Chinook (*O. tshawytscha*), Salmón Chumb (*O. keta*), Salmón Amago (*O. rhodurus*) y Salmón Yamane (*O. masou*). También el Lucio (*Esox lucius*) parece ser susceptible a la infección y a la enfermedad si bien la padece de forma leve.

Afecta a peces de todas las edades, jóvenes y adultos, si bien la mayor letalidad se observa en jóvenes, con especial gravedad en animales de 3 semanas a 6 meses de vida, debido posiblemente a que no han sido capaces de desarrollar todavía una respuesta inmune adecuada. Las tasas de morbilidad y la letalidad son muy elevadas, alcanzando en ocasiones el 100% de los peces sensibles, y siendo lo más frecuente un 70-90 % en ambos parámetros. No se ha observado diferencia entre sexo cuanto a la gravedad de la enfermedad clínica, sin embargo si se ha observado que el nivel de infección, y por tanto de portadores asintomáticos, es más elevado entre las hembras.

Un importante factor que afecta a la aparición de la enfermedad en su forma clínica y a las elevadas tasas de morbilidad y letalidad es la temperatura, puesto que en peces que se encuentran a temperaturas entorno a los 12°C, la manifestación de la enfermedad es más intensa, mientras que por encima de los 14°C la mortalidad se reduce hasta el punto de que por encima de 18°C la enfermedad no se ha detectado nunca y por debajo de los 6°C la mortalidad pasa a ser prácticamente nula, quedando esos animales como portadores asintomáticos.

Además de la importancia de la temperatura, existen otros factores que influyen en la presentación de la enfermedad, es el caso de las condiciones ambientales como el déficit de oxígeno, la mala alimentación y en general cualquier causa productora de estrés.

### Fuentes virulentas

La enfermedad se transmite a partir de los animales enfermos, tanto agudos como crónicos, así como a partir de los portadores asintomáticos, puesto que todos ellos actúan como portadores de los virus. La eliminación de los virus se produce por heces y orina así como los productos sexuales en los animales adultos en fase de freza, y en ocasiones incluso a través del mucus de la piel. En los animales infectados el virus se localiza en riñón, bazo, encéfalo y tracto digestivo.

### Vías de transmisión

Una vez eliminado el virus, los mecanismos de transmisión pueden ser "horizontales", tanto en forma "directa" como "indirecta", y "verticales".

### Distribución Geográfica



La enfermedad, que se describió por primera vez en salmón Sockeye del Pacífico (*Oncorhynchus nerka*) en 1944, es endémica en Estados Unidos, Canadá y Japón. En Europa la enfermedad no existía hasta hace algunos años en que fueron detectados los primeros focos en diversos países.

La IHN es originaria de América, si bien actualmente se localiza en un número importante de países Europeos, siendo junto a la Septicemia Hemorrágica Viral la enfermedad que mayores pérdidas de tipo económico produce.

La enfermedad, causada por un Rhabdovirus, afecta a salmónidos, especialmente a la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) así como a la mayoría de las especies de salmones: Salmón Atlántico (*Salmo salar*) o a las diversas variedades del Salmón del Pacífico (*Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus tsachwystcha*, *O. keta*, *O. masou*, *O. rhodurus*, *O. kisutch*).

### 4.3 Diagnóstico

En animales muy jóvenes la única manifestación de enfermedad que se observa es la repentina muerte de los animales, muerte que puede llegar a alcanzar el 100% de la población. En estos casos la mortalidad suele comenzar entre los 5 y 14 días postinfección.

En animales ya jóvenes o en adultos la enfermedad cursa de forma menos grave. El proceso comienza rápidamente, en un período que abarca desde las 24 a 72 horas postinfección, con la inapetencia del pez, eliminación de finas hebras de heces que son restos de descamación del epitelio intestinal.

El pez comienza a presentar un estado letárgico y natación anormal con pérdida del sentido de la orientación. Se observa oscurecimiento de la superficie corporal, distensión abdominal con ascitis, exoftalmos, en la base de las aletas y la cola se pueden observar fenómenos hemorrágicos en forma de petequias, y más esporádicamente las hemorragias se observan en la dermis, músculo, cabeza y boca, y finalmente los peces pierden totalmente el sentido de la orientación, nadan erráticos para finalmente morir.

En algunos casos, las branquias aparecen muy pálidas y en la boca, piel y musculatura se observan hemorragias. En los animales supervivientes puede observarse escoliosis y lordosis. En sangre se observa leucopenia, degeneración de leucocitos y trombocitos y acúmulo de restos celulares.

Las lesiones producidas por este virus se localizan en cavidad abdominal con acúmulo de material seroso y hemorrágico en algunas ocasiones. Este material también se presenta en el intestino. También afecta al tejido hepático, esplénico, renal e intestinal, así como a músculo esquelético y vejiga natatoria que en general se presentan anémicos y con petequias.

Ocasionalmente el páncreas presenta un intenso estado necrótico y en las fases más avanzadas de la enfermedad ese tejido necrótico se observa en hígado, que además sufre el acúmulo de tejido ceroide, y en los glomérulos y en los túbulos renales. Las células de estos órganos sufren intensos fenómenos de necrosis con picnosis, cariorraxis e infiltración intracitoplasmática.

El virus de la IHN se multiplica in vitro en diversas líneas celulares continuas de peces, especialmente en la línea EPC, recomendada para el diagnóstico, si bien puede aislarse en otras líneas como CHSE-214, RTG-2, FHM, STE-137, SSE-5,



AS, así como también en algunas células de mamíferos, BHK-21, WI-38 y de reptiles, GL-1, FH-2, pero con títulos más bajos y en todos los casos a temperaturas entre los 5 y los 20°C.

#### **4.4 Tratamiento y control**

Solamente las medidas de manejo y control de los peces de las piscifactorías van a permitir evitar y controlar la presencia de estos virus.

El mecanismo de control de estas enfermedades es la prevención mediante la aplicación de medidas de carácter higiénico-sanitarias basadas en la limpieza de los estanques, el uso continuado de desinfectantes (amonios cuaternarios, formalina, clorados, organofosforados, yodóforos) medidas que eviten el estrés de los animales tales como manejo adecuado, el control de la excesiva densidad de población, anestesia a los animales en la manipulación de los mismos, etc.

La posibilidad de que la enfermedad se transmita de forma vertical, hace que el momento de la fecundación de los huevos pueda constituir un punto clave en la infección de los mismos, por ello, la fecundación deberá realizarse en presencia de yodóforos que inactivan el virus, lo que evitará (o reducirá) la posibilidad de que se produzca la transmisión vertical.

Del mismo modo, debemos controlar la entrada en la piscifactoría de potenciales portadores asintomáticos, de forma especial las especies ícticas de vida salvaje existentes en el río que pueden ser portadores de los virus y provocar de nuevo la infección en la piscifactoría, así como las aves ictiófagas y mamíferos que pueden entrar en las mismas, y que actúan como vehículos de los agentes víricos.

### **5-Anemia Infecciosa del Salmón**

#### **5.1 Etiología**

La anemia infecciosa del salmón (AIS) es una enfermedad del salmón del Atlántico cultivado (*Salmo salar*) (47) causada por un ortomixovirus, el virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV). La AIS afecta fundamentalmente a peces en agua marina o expuestos al agua de mar.

Sin embargo, también se han descrito brotes en peces mantenidos en agua dulce. La enfermedad puede aparecer con carácter sistémico y letal, caracterizado por anemia grave y hemorragias en varios órganos. Los síntomas observables más llamativos son branquias pálidas, exoftalmos, abdomen dilatado y petequias en la cámara ocular; pueden ocurrir hemorragias en el abdomen y edemas en las escamas. Los principales hallazgos en un examen post-mortem son anomalías circulatorias en varios órganos. Estas manifestaciones clínicas de la AIS afectan a cuatro órganos: hígado, riñón, intestino y branquias. La manifestación hepática se caracteriza por el color oscuro del hígado causado por necrosis hemorrágica. En las branquias, además de estar pálidas, se observa en algunos casos acumulación de sangre, sobre todo en el seno venoso central de los filamentos de las branquias. Las lesiones en el hígado y en el intestino son fáciles de observar, mientras que las del hígado y las branquias son menos obvias. En algunos brotes de AIS puede dominar una de las manifestaciones en estos



órganos, mientras que en otros brotes se pueden encontrar las cuatro manifestaciones.

### **Mortalidad y morbilidad**

La morbilidad y la mortalidad varían mucho dentro de y entre las distintas jaulas de una piscifactoría de agua salada, y entre diferentes piscifactorías. La morbilidad y la mortalidad dentro de una jaula de producción pueden comenzar con niveles muy bajos. Típicamente, la mortalidad diaria varía de 0,5 a 1% en las jaulas infectadas. Sin intervención, la mortalidad aumenta y parece alcanzar el máximo a principios de verano y en el invierno. El margen de mortalidad acumulada durante un brote va desde un valor insignificante a moderado, pero en casos graves puede sobrepasar el 90%. Inicialmente, un brote de AIS puede estar limitado a una o dos jaulas de red durante un largo período de tiempo y la extensión a otras puede llevar meses.

### **Agentes etiológicos, cepas del agente**

El ISAV es un virus con envuelta, de 100-130 nm de diámetro, con un genoma que consta de 8 segmentos monocatenarios de ARN con polaridad negativa, y con actividad hemaglutinante, destructora de receptores y con capacidad de adsorción.

### **Supervivencia fuera del hospedador**

El ARN del ISAV se ha detectado mediante RT-PCR en agua de mar tomada de sitios de producción con salmones del Atlántico positivos para el ISAV. Los aislados del ISAV pueden sobrevivir semanas a temperatura baja, pero la capacidad infectiva se pierde en 30 minutos a 56°C (13, 48). La incubación de homogeneizados de tejidos de peces muertos de AIS a pH 4 o pH 12 durante 24 horas inactivó la capacidad infecciosa del ISAV. La incubación en presencia de cloro (100 mg/ml) durante 15 minutos también inactivó el virus.

### **Epidemiología**

Especies hospedadoras susceptibles:

Se han registrado brotes naturales de AIS solamente en el salmón del Atlántico cultivado, pero se han identificado por RT-PCR formas asilvestradas del salmón del Atlántico, trucha común y trucha marina (*S. trutta*) con infección subclínica. El ISAV se ha detectado asimismo en dos especies marinas, el carbonero (*Pollachius virens*) y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), pero sólo en peces recogidos en la proximidad de jaulas con salmón del Atlántico que manifestaban AIS.

Mediante infección experimental, se ha demostrado la replicación del ISAV en varias especies de peces, incluyendo la trucha común, la trucha marina, la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), y el arenque (*Clupea harengus*).

Fases susceptibles del hospedador:

Los brotes de enfermedad en el salmón del Atlántico se han descrito principalmente en jaulas marinas; solo se han descrito unos cuantos casos en las fases de agua dulce, incluyendo un caso de un alevín con saco vitelino.

### **Transmisión**



La enfermedad se transmite horizontalmente a través del agua como se ha demostrado en estudios de infección experimental. No hay evidencia clara de transmisión vertical por productos infectados de las gónadas.

### **Distribución geográfica**

Desde que se describió inicialmente, hacia mediados de los 1980s en Noruega, la AIS se ha descrito en Canadá (New Brunswick en 1996, Nova Scotia en 2000), el Reino Unido (Escocia en 1998 y posteriormente en las islas Shetland), las islas Faroe (2000) y EE.UU. (Maine en 2001). y de la trucha arco iris en Escocia en 2002. El virus causal se ha aislado del salmón coho en Salmón Atlántico en Chile (2007).

### **Diagnóstico**

El diagnóstico de la AIS se basaba inicialmente tan sólo en hallazgos clínicos y patológicos. Tras el aislamiento del agente causal, se han establecido varios métodos directos para la detección del virus y la confirmación del diagnóstico. Éstos incluyen el aislamiento del virus en cultivo celular seguido por su identificación inmunológica), la demostración inmunológica del antígeno del ISAV en tejidos y las técnicas de PCR.

### **Control y prevención**

#### **• Vacunación**

Se ha llevado a cabo vacunación contra la AIS en Norteamérica durante los últimos 5 años, pero las vacunas actualmente disponibles no parecen ofrecer una protección completa. Las vacunas, que son vacunas de virus completos inactivados no eliminan los virus en los peces inmunizados, que pueden por tanto hacerse portadores.

#### **• Prácticas generales de manejo**

La incidencia de la AIS puede reducirse notablemente aplicando medidas legislativas o prácticas generales de manejo en lo que respecta al movimiento de peces, controles sanitarios obligatorios y regulaciones de sacrificio y transporte. También pueden contribuir a reducir la incidencia de la enfermedad las medidas específicas que incluyan restricciones sobre piscifactorías afectadas, sospechosas o próximas, el sacrificio sanitario obligatorio, la segregación generacional, así como la desinfección de los desechos y el agua residual de las pesquerías y las plantas de procesamiento de peces.

---

## ANEXO VI

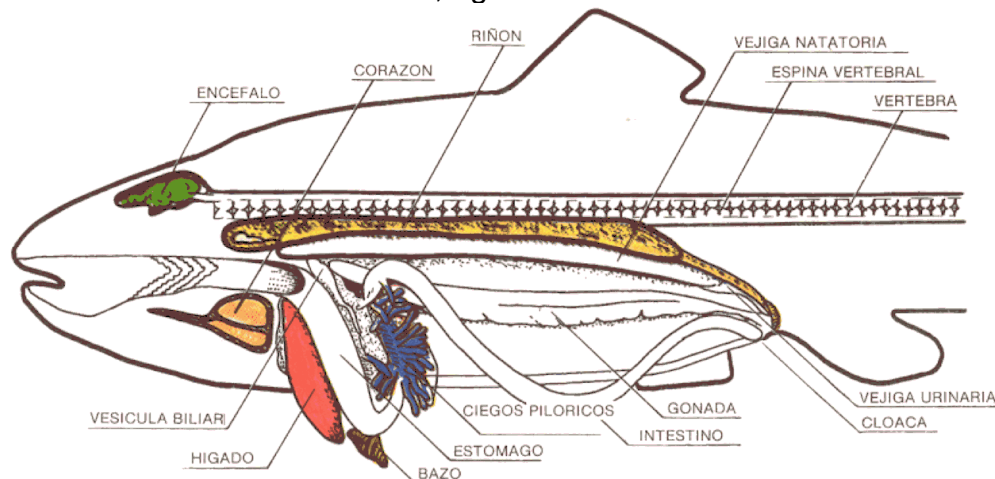
### 1-PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO EN PECES.

#### 1.1 PARA LA DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE SHV Y NHI

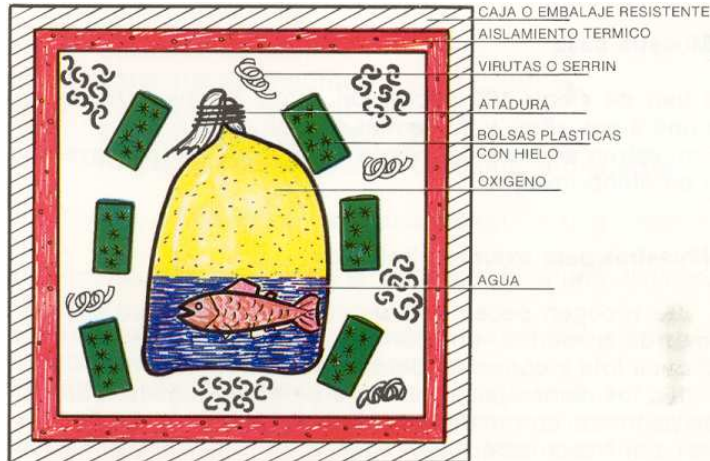
Se tendrán preparados tubos de plástico estériles que contengan 4 ml de medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con 10% de suero de ternera y antibióticos. Se recomienda la combinación de 200 UI de penicilina, 200 µg de estreptomicina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque podrán utilizarse asimismo otros antibióticos de eficacia probada.

Si los peces muestreados son inferiores a 6 cm. de longitud se pueden enviar enteros. Si los peces son mayores de 6 cm. de longitud se extraerán con material estéril partes de los órganos, abriendo el pez ventralmente desde un poco antes del ano hasta la parte anterior. Los tejidos que deben recogerse son bazo, la parte anterior del riñón y, además, bien el corazón o bien el encéfalo. En algunas ocasiones, deberá examinarse el fluido ovárico.

Los peces enteros, el fluido ovárico o las partes de órgano de un máximo de 10 peces podrán recogerse en un solo tubo estéril que contenga al menos 4 ml de medio de transporte; esto constituirá una muestra conjunta. El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 0,5 gramos como mínimo.



#### Envío



Los tubos con las muestras se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo caja de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de bloques de enfriamiento para garantizar la refrigeración de las muestras durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación. La temperatura de las muestras durante el transporte nunca deberá exceder de 10°C y en el momento de la recepción todavía deberá haber hielo en el recipiente de transporte o, alternativamente, uno o más bloques de enfriamiento deberán estar aún helados parcial o totalmente.

Las muestras deberán estar en el laboratorio lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido 48 horas desde la recogida de las muestras. Sólo en casos excepcionales (cuando las muestras se recojan en zonas muy remotas) se podrá iniciar el examen virológico en un plazo de 72 horas desde la recogida del material, siempre que éste quede protegido con medio de transporte y se cumplan los requisitos de temperatura durante el transporte.

## Identificación

Las muestras irán convenientemente identificadas y acompañadas de un informe en el que se registrarán:

- Nombre de la instalación
- Dirección de la instalación
- Propietario o Persona responsable
- Tipo de explotación: de agua continental, marina,
- Especie(s): Trucha arcoiris, trucha común, etc.
- Naturaleza de la muestra: vísceras, fluido ovárico, alevines, etc.
- Causa de la investigación: programa de vigilancia, diagnóstico, etc.
- Síntomas clínicos
- Análisis solicitados

## 1.2 PARA LA DETECCIÓN Y CONFIRMACIÓN DE AIS

### Toma de muestras



Si los signos clínicos se corresponden con la ISA o un inspector veterinario tiene cualquier otra razón para sospechar que el pez puede estar infectado, un mínimo de 10 peces tendrán que ser muestreados. Las muestras serán sobre las mortalidades recientes, ejemplares débiles o de conducta anormal, siempre que sea posible. Si no hay número suficiente de ejemplares clínicamente afectados, entonces el número de muestras se complementará con peces sanos de las jaulas, tanques o estanques que muestren el mayor índice de mortandad o con más signos clínicos de enfermedad.

### **Muestras para examen histológico**

Se tomarán de los peces recién muertos que presenten signos clínicos o hallazgos postmortem consecuentes con la presencia de la enfermedad. Se muestreará cualquier lesión interna o externa, y en cualquier caso, de cada pez se recogerán muestras de hígado, riñón medio, corazón y bazo usando un bisturí y transfiriéndolo a una solución salina tampón con formol al 8-10% (vol/vol). Para asegurar la satisfactoria conservación de los tejidos, la relación entre el líquido fijador y el tejido debe ser de al menos 20:1.

### **Muestras para examen virológico**

Se tomarán tejidos de todos los peces muestreados. Se recogerán de cada pez trozos de hígado, riñón anterior, corazón y bazo usando bisturí estéril y se transferirán a tubos de plástico conteniendo 9 ml de medio de transporte, por ejemplo medio de cultivo celular con antibióticos. Es apropiada una combinación de 12,5 µg de fungizona, 200 UI de polymixina B y 200 µg de kanamicina por ml, pero pueden utilizarse otras combinaciones de eficacia probada. Se pueden recoger tejidos de hasta 5 peces en un tubo conteniendo solución de transporte y representará una muestra conjunta. El peso de tejido en una muestra será de  $1,0 \pm 0,5$  gramos.

### **Muestras para exámenes de IFAT**

Se tomarán improntas de riñón de los peces 2 horas después de muertos. Se extraerá del pez un trozo de riñón medio usando pinzas y bisturí estériles. El tejido será desangrado en papel absorbente para eliminar el exceso de sangre, luego se presionará de manera repetida contra un porta de cristal cubierto de poli-L-lisina. Las impresiones individuales deben de estar colocadas adyacentes, pero nunca superpuestas, para conseguir una monocapa de células continua. La sangre y el tejido fluido son irrelevantes en esta prueba. Pero se debe evitar dejar la muestra de riñón drenar en el papel absorbente ya que esto puede producir una coagulación de sangre originando grandes cantidades de proteínas séricas depositadas en el porta. Las improntas deben dejarse secar al aire y luego conservarlas en lugar fresco y seco si no se van a fijar inmediatamente. La fijación de las improntas ha de realizarse dentro de las 72 horas de la toma de muestra. Alternativamente, las improntas pueden ser congeladas después del secado y almacenadas a  $-20^{\circ}$  C hasta un mes antes de la fijación.





## **Muestras para análisis hematológico**

Los peces que muestran síntomas de anemia pueden ser anestesiados y se toman inmediatamente muestras de sangre con heparina para exámenes hematológicos como la medida del hematocrito.

## **Muestras para análisis de RT-PCR**

Se deben tomar tejidos de todos los peces muestreados. Se recogerá del pez un trozo de riñón anterior o medio utilizando un bisturí estéril e introducirlo en un microtubo de centrifuga conteniendo 1 ml de solución conservante de RNA. El RNAlater (Ambion Inc.) es apropiado pero pueden utilizarse otras soluciones de eficacia probada. En un tubo con solución conservante se pueden recoger muestras de hasta 5 peces constituyendo una muestra conjunta. El peso del tejido en una muestra será aproximadamente de 0,5 g. Cuando los peces sean demasiado pequeños para obtener una muestra con el peso requerido se podrán recoger trozos de riñón, corazón, bazo, hígado o ciegos pilóricos, en este orden de preferencia, hasta alcanzar los 0,5 g.

## **Envío**

Las muestras de sangre y tubos conteniendo tejidos para examen virológico o para análisis de RT-PCR serán colocadas juntas en contenedores aislantes (por ejemplo cajas de poliestireno de paredes gruesas) con suficiente hielo o bloques refrigerantes para asegurar la refrigeración de las muestras durante el transporte al laboratorio. Se debe evitar la congelación y en el momento de la recepción todavía deberá haber hielo en el recipiente de transporte, o, alternativamente, uno o más bloques de enfriamiento deberán estar aún helados parcial o totalmente. En circunstancias excepcionales las muestras para RT-PCR y las de examen virológico pueden ser congeladas instantáneamente y transportadas al laboratorio a  $-20^{\circ}\text{C}$  o por debajo.

Los portas para IFAT serán enviados en contenedores de portas con suficiente desecante para mantener las improntas secas y refrigeradas como arriba se describe.

Si los tejidos del pez se transportan en líquido fijador para examen histológico, deberán enviarse en tubos a prueba de goteo y esos tubos dentro de contenedores a prueba de golpes como cajas de poliestireno de paredes gruesas.

## **Identificación**

La misma que en el epígrafe de identificación para muestras de SHV y NHI.

**www.mapa.es**  
**dgganade@mapya.es**  
**C/ Alfonso XII, 62**  
**28071 MADRID**



**TEL: 913476606**  
**FAX: 913475883**

## **2-PROTOCOLO DE MUESTREO DE LOS CRUSTÁCEOS**

Las enfermedades infecciosas de los crustáceos tienen un gran impacto económico sobre todo en el cultivo del camarón penaeoid muy extendido mundialmente. Para estas enfermedades no existe tratamiento.

### **PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO**

El muestreo se puede realizar con al menos tres propósitos: Vigilancia epidemiológica, diagnóstico de enfermedades subclínicas y certificación de explotación libre de la enfermedad.

Para poder obtener el estatus de explotación libre y sobre todo para el diagnóstico de enfermedades subclínicas el muestreo debe realizarse de tal forma que permita la detección de la enfermedad en los animales infectados con un nivel de confianza del 95%. Para aquellos test en los que la sensibilidad y especificidad es conocida, se pueden usar métodos como FreeCalc ([www.ausvet.com.au](http://www.ausvet.com.au)) o los que se relacionan en el capítulo 1. 1. 4 Requisitos de Vigilancia para el reconocimiento internacional de estatus *libre de infección* (Manual de Animales Acuáticos). Sin embargo, para aquellos tests de los que no se conozcan ni la sensibilidad ni la especificidad, el número de muestras que se han de tomar depende del tamaño de la población o lote.

Se pueden realizar pooles de 5 especímenes como máximo cuando las muestras que se toman están destinadas a realizar PCRs o tests de anticuerpos. Según el tipo de enfermedad son mejores unos estadios u otros de desarrollo de los crustáceos, por ejemplo, en el caso de los baculovirus es mejor muestrear larvas y postlarvas mientras que para el resto de enfermedades como cabeza amarilla, mancha blanca son mejores los jóvenes y subadultos.

Para el diagnóstico de la enfermedad se deben seleccionar los especímenes con lesiones representativas dentro de los vivos y moribundos, el número representativo mínimo debe ser

- 100 larvas
- 50 postlarvas
- 10 para jóvenes y adultos

### **TIPOS DE MUESTRA Y SU CONSERVACION**

#### **• Muestras para microscopía directa**

Para la observación microscópica se usarán animales vivos frescos refrigerados o fijados con formalina tamponada al 10%.



### • Muestras para histología

Las muestras destinadas al estudio histológico se deben recolectar y enviar al laboratorio con el mínimo estrés posible, por ejemplo en agua bien oxigenada. Si los animales no pueden llegar vivos al laboratorio, como norma general se incluirá una unidad de peso en 10 volúmenes de agente fijador.

Las muestras se fijan durante 24 horas en una solución fijadora de Davidson 2, con una relación máxima de 1:10 (volumen de muestra: solución fijadora) porque reduce la autólisis y decalcifica la cutícula. Transcurrido ese tiempo, las muestras se pasan a una solución conservante donde permanecerán hasta su posterior deshidratación e inclusión en parafina. También se pueden usar otros fijadores como Bouin, o Carson.

Si se va a usar la solución de Davidson no se debe fijar previamente con formalina al 10% y tampoco se pueden usar ácidos distintos al ácido acético como el CIH porque no es compatible con la prueba de la hematoxilina/eosina.

Algunos de los métodos para fijar en Davidson y enviar los especímenes son:

**a. Larvas y postlarvas pequeñas**, si los especímenes son muy pequeños como para ser sangrados con una jeringa de tuberculina, se introducirán directamente en el agente fijador durante 12-24 hr y se transferirán luego a alcohol etílico al 50%-70% para su almacenamiento.

**b. Postlarvas más grandes y juveniles**, se realizará una incisión en la cutícula con una aguja de punta fina y se procederá igual que en *a*

**c. Postlarvas grandes, juveniles y adultos**, se inyecta el agente fijador en el camarón vivo de la siguiente manera. Se inyecta en el hepatopancreas un volumen (5-10% del peso) de agente fijador en varios puntos hasta que pase de color naranja a pálido, también alrededor del encefalotorax y en la parte anterior y posterior de la región abdominal. Si la fijación ha sido adecuada, entonces todo signo de vida debe cesar inmediatamente y los tejidos deben cambiar de color visiblemente. Inmediatamente después de la inoculación se pasa a cortar la cutícula desde el sexto segmento abdominal hacia el rostro. También se realizará una incisión en el área cefalo torácica mediolateral.

### **d. Camarones u otros crustáceos mayores de 12 g**

Después de inyectar el agente fijador se debe biseccionar el cuerpo transversalmente justo detrás del cefalotórax y también puede seccionarse a mitad del abdomen.

**e. Crustáceos muy grandes** los órganos pueden diseccionarse después de realizar la inyección del agente fijador.

2 Se puede realizar con diferentes fórmulas y fases, se propone a modo de ejemplo realizarla en dos etapas.

La primera es la de fijador que incluye glicerina (mejora la flexibilidad y la morfología tisular). Esta se prepara a partir de la solución stock.

Las muestras se pueden mantener cubiertas ligeramente por solución stock durante 6 meses.

Solución stock:

Glicerina ..... 400 ml  
Formol.....800 ml  
95% Alcohol.....1200 ml

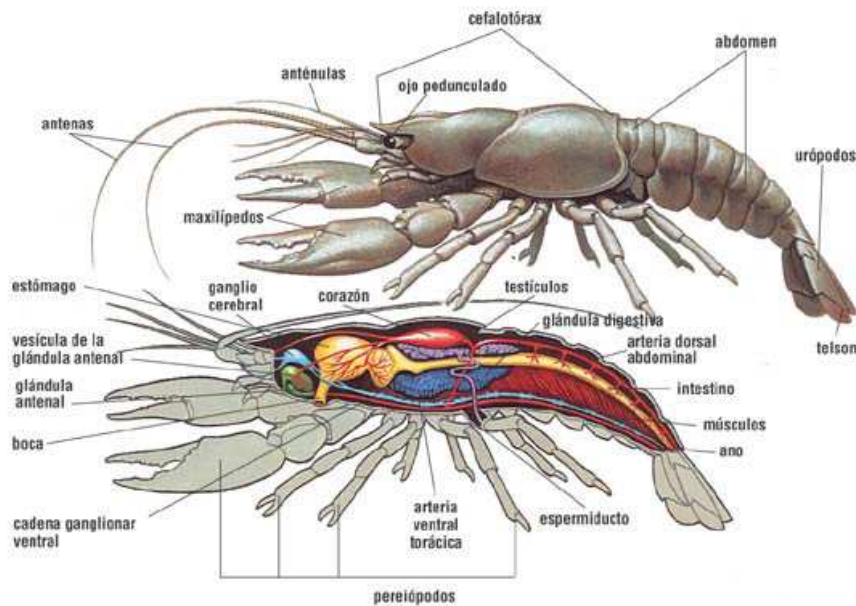
Agua de mar filtrada ..... 1200 ml

Mezclar bien

Solución fijadora: Mezclar 9 partes de solución stock con una parte de ácido acético.

El consenso es que es mejor eliminar el ácido acético después de unas 24 horas. El acético elimina los detalles del núcleo que en algunos casos pueden resultar interesante.

Después de realizar la inyección del agente fijador, las bi o tri secciones, se deben sumergir todos los órganos a razón de 1/10 en agente fijador (24-71 hr). Se pueden conservar indefinidamente una vez que se pasan al alcohol de 70%.



### Transporte y envío de muestras conservadas

Cuando se trate de larvas, post-larvas y formas juveniles de pequeño tamaño, se utilizarán viales herméticos de plástico y con tapón de rosca. Para enviar ejemplares grandes, se envuelven bien las muestras con toallas de papel blanco (no se debe usar algodón crudo). Se colocan los ejemplares envueltos con toallas en una bolsa hermética de plástico y se satura con alcohol etílico al 70%. Se inserta la etiqueta y se sella la bolsa. Se coloca ésta dentro de una segunda bolsa hermética. Se pueden poner muchas bolsas hermética en un recipiente de envío adecuadamente etiquetado, que sea resistente, y a prueba de aplastamiento (véase el capítulo 1.5.6 del *Código de animales acuáticos*).

#### • Muestras para Métodos Moleculares y pruebas con anticuerpos

Los métodos moleculares como PCR, RT-PCR, que ya están disponibles incluso en forma de kits comerciales, necesitan que el ácido nucleico se preserve adecuadamente. Lo mismo ocurre con el uso de las sondas ADN y la inmunohistoquímica que para detectar agentes patógenos en tejido fresco o muestras fijadas, éstas necesitan sitios reactivos antigénicamente. Hay que considerar que el conseguir una carga de agente patógeno suficiente se ve dificultada por el hecho de que no existen líneas celulares donde se puedan multiplicar estos virus.



Para que sean fiables los resultados de éstos análisis las fases previas de “preparación de las muestras” son de extraordinaria importancia, por ello las señalamos a continuación.

Se deben usar contenedores nuevos (botellas o bolsas de plástico) y marcar con rotuladores indelebles o lápices del nº 2 los datos más relevantes de la muestra en las etiquetas. Es conveniente recoger datos como especie, edad, peso, origen (silvestre o cultivado) etc.

### Métodos de Conservación y Transporte según tipo de muestra

o *Especímenes vivos* éstos pueden procesarse en el campo o enviarse al laboratorio para ser analizados.

o *Hemolinfa* este tejido constituye la muestra preferida para ciertas pruebas de diagnóstico moleculares o basadas en anticuerpos. Las muestras se pueden recoger con jeringuilla y aguja mediante punción cardiaca, a partir del hemocoel (i.e. el seno ventral de los peneidos), o de un apéndice cortado.

o *Especímenes en hielo vivos o refrigerados* si pueden llegar en 24 hr se meten en bolsas rodeadas de hielo húmedo, todo ello se enviará en nevera al laboratorio.

o *Ejemplares enteros congelados*: se seleccionan ejemplares vivos, según los criterios expuestos en la sección 3, se congelan rápidamente in situ a -20°C o menos utilizando hielo seco molido, o se congelan en los laboratorios de campo utilizando un congelador mecánico. Se prepara una etiqueta y se inserta en los recipientes con las muestras, se empaquetan las muestras con una cantidad adecuada de hielo seco en una caja aislada con espuma de estireno, y se envía al laboratorio.

o *Muestras conservadas en alcohol*: se puede utilizar etanol al 90–95% para conservar, guardar y transportar ciertos tipos de muestras. Con crustáceos enteros (en cualquier fase de su vida, siempre que no sean mayores de 2–3- g) pueden conservarse en etanol al 90-95% los tejidos extirpados (i.e. los pleópodos) de crustáceos grandes, o la hemolinfa; después se empaquetan para su envío de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección 4.2.v (para más detalles, véase el capítulo 1.5.6 del *Código de animales acuáticos*). o *Conservación de ARN y ADN tisulares utilizando RNA<sub>later</sub>*: se corta una porción de tejido de menos de 0.5 cm y se sumerge en 5 volúmenes de RNA<sub>later</sub> (por ejemplo, una muestra de 0.5 gramos de peso requiere unos 2.5 ml de RNA<sub>later</sub>). Los órganos pequeños, como el riñón, el hígado y el bazo pueden guardarse enteros en RNA<sub>later</sub>. Esas muestras pueden almacenarse a 4°C durante un mes, a 25°C durante una semana o a -20°C por tiempo indefinido. Los tejidos tratados con RNA<sub>later</sub> se guardan a -20°C.

## **3-PROTOCOLO DE MUESTREO DE LOS MOLUSCOS**

### **PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO**

El muestreo se puede realizar con al menos tres propósitos.

- Vigilancia epidemiológica
- Brote epizootico o sospecha
- Confirmación de diagnóstico



### Recolección de especímenes

El muestreo debe realizarse de tal forma que permita la detección de la enfermedad en los animales infectados con un nivel de confianza del 95%. Para aquellos tests en los que la sensibilidad y especificidad es conocida, se pueden usar métodos como FreeCalc ([www.ausvet.com.au](http://www.ausvet.com.au)) o los que se relacionan en el capítulo 1. 1. 4 Requisitos de Vigilancia para el reconocimiento internacional de estatus *libre de infección* (Manual de Diagnostic Test for Acuatric Animals).

Sin embargo, para aquellos tests de los que no se conozcan ni la sensibilidad ni la especificidad, el número de muestras que se han de tomar depende del tamaño de la población o lote.

### Recomendaciones específicas para el muestreo de moluscos

En aquellas enfermedades estacionales, es muy importante que el muestreo se programe en los periodos prepatencia o en los del ciclo de infección del agente patógeno. Se recomienda que el muestreo se realice en aquellos casos en los que la condición corporal disminuye p.e. después del desove porque es más fácil que se detecte el agente patógeno.

1. El muestreo debe cubrir todos los rangos de tamaños poblacionales o la población de edad más susceptible, si esto último se conoce.
2. Cualquier molusco con anomalías debe muestrearse (desarrollo anormal, huecos en las valvas, alta mortalidad y morbilidad). En los casos en los que la enfermedad curse de forma subclínica, se recomienda que los moluscos se pongan en cuarentena y que sean sometidos a diferentes agentes estresantes como p. e. superpoblación, cambios de temperatura o salinidad etc, porque así se aumenta la probabilidad de detectar la enfermedad.
3. Prevalencia.- Cuando se utilizan moluscos que están en el medio natural se necesita muestrear un gran número de animales porque ciertas enfermedades se presentan con una prevalencia muy baja p. e. 0,1% en la *Martelia Sydneyi*.
4. Tamaño de la zona donde están los moluscos .-El número de sitios a muestrear será mayor o menor dependiendo de si el área es grande o pequeña.
5. Otros factores también deben tenerse en cuenta como densidad población, flujo de agua etc.

### Envío de muestras

Las muestras de moluscos deben empaquetarse según los estándares que permitan que los moluscos permanezcan vivos y enviarse lo antes posible. Para ello, es necesaria una buena sincronización con el laboratorio, que además será informado del día de llegada con tiempo suficiente para preparar los materiales necesarios para el procesado de las muestras.

Como norma general, cuando los animales no puedan llegar vivos la fijación debe realizarse "in situ" si el estudio posterior es microscópico (óptico o electrónico).



Si han de realizarse estudios en los fluidos frescos, microbiológicos (micología, bacteriológica y virología) o del fluido de tioglicolato de Ray para cultivo de *Perkinsus spp*, no se puede enviar material fijado.

Las muestras deben ir acompañadas de la siguiente información:

- Razón por la que se envían
- Apariencia macroscópica
- Parámetros medioambientales o de manejo que pudieran estar asociados a la mortalidad.
- Origen y naturaleza de los moluscos (especie, edad si los moluscos son autóctonos o no).

### Examen Macroscópico

El examen macroscópico debe incluir, en la medida de lo posible, el estudio de:

- **Comportamiento animal** es muy difícil observar cambios en el comportamiento de los animales en aguas abiertas, pero esto es posible en **instalaciones de cría de larvas**. Signos anormales son: acumulación de alimento en los tanques, el pre-establecimiento de las larvas en el fondo de los tanques, acúmulos de tierra y detritus son signos de debilidad
- **Instalaciones de jóvenes y adultos** acumulación de detritus en las branquias y el manto, retracción del manto del borde de la concha, falta de actividad (las almejas dejan de enterrarse, las vieiras dejan de nadar con su forma peculiar, y la vuelta a la posición correcta del abalone se pierde al voltear el molusco es incapaz de ponerse de nuevo sobre la valva ventral etc).
- **Aspecto de la concha** en condiciones de cultivo también es normal que la superficie de la concha tenga otros organismos como esponjas, lombrices polychaete, larvas bivalvos y plantas. Sólo es alarmante si la cantidad hace que el bivalvo no pueda abrir las valvas y cuando va acompañado de debilidad. Las deformidades de la concha o su fragilidad no suelen ser signo de enfermedad pero un olor o color anormal si puede ser indicativo de una infección del tejido blando.
- **Interior de la concha y los tejidos blandos**. Los moluscos se abrirán intentando no dañar ni los tejidos blandos ni órganos (manto, branquias, corazón y glándula digestiva) la superficie interna ha de estar limpia y suave. El grado de perforación de la concha puede ser observado si se pone a sobre un foco de luz potente y deben estudiarse las causas de perforaciones o formaciones de burbujas. En los tejidos blandos se ha de prestar especial atención a los abscesos, pústulas, edemas, perlas etc.

Se deben anotar todos los hallazgos encontrados.

### Examen de los stocks cuando hay una mortalidad anormal

En el momento en el que se produzca una mortalidad elevada en los criaderos de moluscos es necesario realizar una investigación inmediata para esclarecer la etiología de la mortalidad.



Ejemplos en los que es fácil detectar una mortalidad anormalmente alta en un periodo corto de tiempo p. e. en las instalaciones localizadas en zonas intermareas se realizan inspecciones cada 15 días o cuando en los criaderos de larvas se paraliza la producción de éstas.

Se realizará la recolección, fijación y almacenaje tanto de animales sospechosos como de sanos para realizar estudios histológicos, microbiológicos y moleculares comparativos.

## 2.-MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Debido a que los moluscos no tienen suero y por tanto no tienen anticuerpos circulantes, los métodos de diagnóstico son directos y se limitan fundamentalmente a detectar el agente causal. Además de la citología e histología, es de destacar el uso de sondas de ácidos nucleicos y anticuerpos monoclonales para detectar los agentes productores de las enfermedades. El desarrollo de las técnicas de diagnóstico basadas en la detección de ácidos nucleicos de los agentes patógenos, se ha desarrollado mucho en los últimos años, aunque no se pueden obviar los problemas de validación inherentes a dichas técnicas.

Existen al menos cuatro posibles métodos de diagnóstico

1. La Histología se recomienda como método de screening estándar, aporta mucha información imprescindible dado que no existe ningún signo patognomónico que pueda detectarse macroscópicamente en las enfermedades de los moluscos.
2. Improntas de tejidos.
3. Medio de cultivo de tioglicolato de Ray.y microbiológicos siembra en placa para bacterias.
4. PCR (reacción de la polimerasa en cadena).

## TECNICAS HISTOLÓGICAS

Como en toda técnica histológica el estudio histológico de los moluscos implica los siguientes pasos:

1. **Toma de muestras** son los moribundos o muertos recientemente (sólo minutos tras morir) los que se deben seleccionar. Se recogerá parte de la glándula digestiva incluyendo las branquias, manto y palpo labial, cuando sea posible (Figura 1). En especímenes grandes habrá que muestrear varias veces.

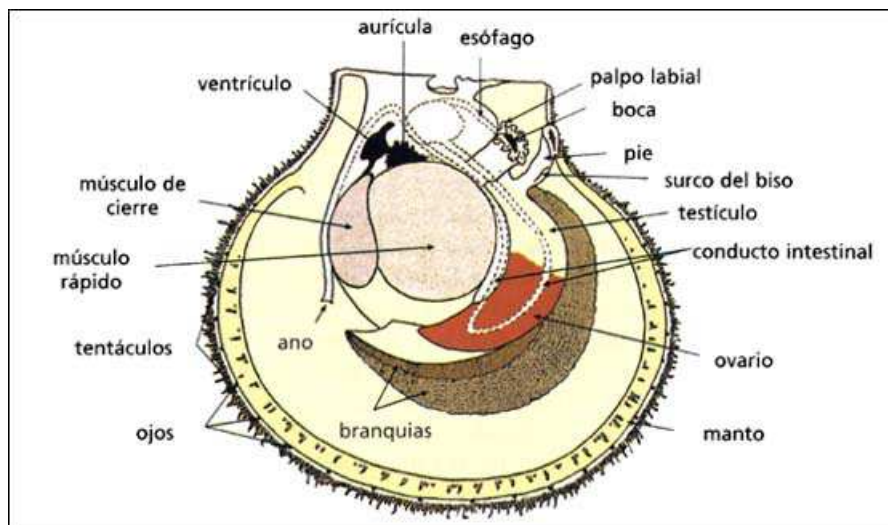
2. **Fijación de la muestra** en el caso de los moluscos es imprescindible abrir la concha para fijar los tejidos blandos. Se recomienda el uso de la solución de Davidson para histología porque preserva muy bien las estructuras de los tejidos y es la recomendada para la hibridación in situ con sonda de ADN. La solución de Carson es adecuada para microscopia electrónica. Como norma general se recomienda que una parte de los tejidos se use la de Davidson y para la otra la de Carson, si no se dispone de ninguna de las dos soluciones se puede usar agua de mar con 10% de formalina. Aunque las siguientes fases son realizadas en los laboratorios de análisis, se describen para aquellos sitios alejados en los que el envío de muestras es difícil.



3. **Deshidratación** generalmente se usan máquinas que realizan todo el proceso.

4. **Embeber en parafina y cortar en secciones** de aproximadamente 2-3  $\mu\text{m}$  se secan durante la noche a 60° C sobre los portas lo que hace que se elimine la humedad y que se adhieran las muestras a éstos.

5. **Teñir y montar en el porta**, antes de teñir, se realiza una inmersión en xileno para disolver la parafina (10-20 min) y después 10 min en etanol absoluto para quitar el disolvente, se rehidrata durante el mismo tiempo en agua. Tinción con hematoxilina eosina y observación en microscopio óptico (otras tinciones pueden realizarse como la de tricrómico para tejido conectivo etc).



La microscopía electrónica se usa con mucha frecuencia para confirmar las enfermedades en los moluscos por ello se señalan a modo indicativo las fases más importantes

1. **Toma de muestras** sólo se usarán muestras de los animales vivos. Los trozos no serán mayores de 1-2 cm

2. **Decalcificación** cuando sea necesario en larvas y juveniles de tamaño pequeño (500  $\mu\text{m}$ ).

3. **Fijación de la muestra** directamente con un 3% de glutaraldehído durante 1 hr lavar tres veces con bufer y fijar en ácido ósmico al 1%. Como norma general sirve cualquier formulación de tampón o ácido gutaraldehído con tal de que la osmolaridad de éstos sea la misma que los tejidos (1000 mOsm). Se puede realizar el glutaraldehído con agua de mar previamente filtrada por una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilizarla.

4. **Deshidratación** en etanol al 70% una vez, al 95% dos veces, tres veces en etanol absoluto. Por último dos baños en óxido de propileno para realizar la **impregnación** antes de **embeber** los tejidos en resina epon 60 °C durante 48 hrs para que polimerice.

5. Preparar las **secciones** de 0,5-1  $\mu\text{m}$  y colocar en los portas para en microscopio óptico localizar las zonas más interesantes que serán teñidas con 1% solución azul de toluidina a 90-100° C, secado, montado con una gota de resina y observar a microscopio óptico. Para el microscopio electrónico se cortarán ultrasecciones de



80-100 nm que se montan sobre rejillas de cobre y son teñidas con acetato de uranilo o citrato de plomo (específicos de microscopía electrónica).

## MÉTODOS MOLECULARES

Los métodos moleculares como PCR, PCR-RFLP, secuenciación, hibridación “in situ” e inmunohistoquímica. En general tienen más sensibilidad que los métodos indirectos pero es muy importante que se realicen las validaciones oportunas (controles positivos y negativos fiables para detectar los falsos) y los controles de calidad para garantizar su robustez.

Para que sean fiables los resultados de éstos análisis las fases previas de “preparación de las muestras” son de extraordinaria importancia, por ello las señalamos a continuación.

Se debe usar contenedores nuevos y marcar con rotuladores indelebles los datos más relevantes de la muestra.

Algunos de los métodos para **preservar** y enviar los especímenes son:

- **Especímenes en hielo vivos o refrigerados** si pueden llegar en 24 hr se meten en bolsas rodeadas de hielo húmedo todo ello se enviará en nevera
- **Especímenes congelados enteros** congelar lo más rápidamente posible en campo con hielo seco o en el laboratorio a una temperatura de  $-20^{\circ}$  C o inferior. En una caja corcho artificial aislante introducir las muestras rodeadas de hielo seco. Sólo cuando se empleen métodos de biología molecular.
- **Muestras preservadas en alcohol** cuando la congelación no se puede realizar tanto el molusco entero como trozos de éste se pueden conservar en etanol de 90-95%.
- **Tejidos fijados para hibridación in situ e inmunohistoquímica** los métodos clásicos de preservación son los adecuados como la solución de Davidson se debe evitar periodos de fijación superiores a 24-48 hrs.