

Estado sanitario del Salmón atlántico en Cantabria: desarrollo y aplicación de métodos moleculares

• S. CONSUEGRA, C. GARCÍA DE LEÁNIZ & A. SERDIO •



RESUMEN

Se ha examinado el estado sanitario de las poblaciones de salmón atlántico de las cuencas de los ríos Asón, Pas-Pisueña, Nansa y Deva (Cantabria) durante el período 1996-2002. Los análisis hematológicos realizados indican la presencia de ejemplares adultos con valores extremos de hematocrito, leucocrito, hemoglobina, proteína plasmática y glucosa, resultados que resultan indicativos en algunos casos de un sistema inmune debilitado y de un deficiente estado sanitario. Los patógenos detectados en estas poblaciones incluyen las bacterias *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophilla*, *Yersinia ruckeri* y *Photobacterium damsela*, así como hongos oportunistas del género *Saprolegnia* y parásitos internos del género *Anisakis*. En general las poblaciones de salmón más mermadas son las que habitan las cuencas con una mayor alteración del hábitat y son a su vez las poblaciones que presentan un peor estado sanitario, una mayor incidencia de enfermedades infecciosas y una mayor mortalidad de adultos antes del desove. Se ha comenzado así mismo a desarrollar y aplicar técnicas moleculares de detección rápida de enfermedades infecciosas, basadas en la amplificación del genoma de diversos patógenos por medio de PCR. Las ventajas de las nuevas técnicas moleculares sobre los métodos de diagnóstico tradicionales incluyen una mayor sensibilidad y rapidez de detección, así como la posibilidad de realizar los análisis de manera no destructiva y antes de que existan manifestaciones clínicas de las enfermedades. Otra línea de trabajo que se ha comenzado recientemente a investigar es el estudio de la variabilidad genética a nivel del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Ello podría abrir en el futuro la posibilidad de mejorar la resistencia de los salmones a los procesos infecciosos en los programas de cría en cautividad y recuperación de esta especie.

ABSTRACT

We have examined the health status of adult Atlantic salmon returning to the rivers Asón, Pas-Pisueña, Nansa and Deva (Cantabria) during the period 1996-2002. Extreme values of hematocrit, leukocrit, haemoglobin, plasma protein and glucose were detected in some individuals, reflecting their poor health and, in some cases, their depressed immune system. The main pathogens detected in the wild populations include the bacteria *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophilla*, *Yersinia ruckeri* and *Photobacterium damsela*, as well as the opportunistic fungus *Saprolegnia* sp. and the internal marine parasite *Anisakis*. In general, the most depressed salmon populations were those located in the most altered watersheds; these showed in turn the poorest health condition, the highest incidence of infectious diseases, and the greatest extent of pre-spawning mortalities. We begun recently to apply molecular methods for the detection of infectious diseases, based on PCR-amplification of target pathogenic genomes. The advantages of molecular methods over traditional diagnostic techniques include greater sensitivity and faster results, as well as the possibility to carry out the analysis non-destructively, before there are any clinical symptoms of the disease. Another molecular approach we have recently undertaken is the analysis of genetic variation at the MHC. This may allow us to improve the resistance of salmon to infectious diseases in the future, which should prove useful in captive breeding programmes and in the restoration of wild populations.



Introducción

Las poblaciones de salmón de Cantabria han sufrido desde comienzos de los años 70 un progresivo deterioro de su estado sanitario, lo que ha dado lugar desde entonces a mortalidades más o menos importantes de adultos, que no llegan por tanto a desovar (García de Leániz *et al.*, 2001). Aunque inicialmente se atribuyeron dichas mortalidades a la enfermedad conocida como UDN (Canales, 1983), la aparición de los primeros salmones enfermos en Cantabria y en otros lugares coincide con las repoblaciones a finales de los años 60 de juveniles infectados con la bacteria *Aeromonas salmonicida*. La primera incidencia importante de ejemplares moribundos y enfermos se detecta en los ríos asturianos en 1969 (Martín Ventura, 1988), y al año siguiente (1970) en los ríos de Cantabria (Canales, 1983). De hecho, la primera detección de *Aeromonas salmonicida* en los salmones y truchas de Cantabria se produce ya en 1974. primero en salmones del río Pas y luego en truchas del río Híjar, afluente del Ebro (De Miguel, 1976).

Desde Diciembre de 1997 se vienen realizando en el Centro Ictiológico de Arredondo diversos análisis y estudios encaminados a determinar el estado sanitario de las poblaciones de salmón, así como a estudiar posibles vías de tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas. Se procede así mismo a vacunar todos los juveniles de salmón antes de las repoblaciones y a intentar recuperar el mayor número posible de zancadas y reproductores enfermos o moribundos para que sobrevivan hasta el desove. Se han realizado hasta la fecha 764 análisis hematológicos, 222 análisis histopatológicos y 81 análisis bacteriológicos, tanto de ejemplares adultos procedentes de las pesquerías como de reproductores, algunos de cuyos resultados se resumen en este trabajo.

Material y Métodos

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar el estado sanitario de las poblaciones de salmón de los ríos Asón, Pas, Nansa y Deva en Cantabria.
- Identificar los principales patógenos causantes de mortalidades y enfermedades infecciosas en estas poblaciones.
- Desarrollar y aplicar métodos moleculares no destructivos para la detección precoz de enfermedades infecciosas, su tratamiento, y prevención.

Resultados

Analisis hematológicos

El análisis de ciertos parámetros hematológicos permite evaluar el estado sanitario de los salmones adultos y detectar situaciones de stress y supresión del sistema inmune que pueden desencadenar más tarde en la aparición de enfermedades infecciosas (McDonald & Milligan, 1997; Iwama & Farrell, 1998; Kubokawa *et al.*, 1999). Los parámetros que hemos medido han sido los siguientes (Morgan & Iwama, 1997):

- **Hematocrito:** El hematocrito representa la relación entre el volumen de eritrocitos (glóbulos rojos) y el volumen total de sangre, expresado como porcentaje. En salmonidos los valores normales de hematocrito oscilan entre 30% y 50%, dependiendo del tamaño del pez. Valores altos de hematocrito pueden resultar indicativos de stress y anoxia, mientras que valores bajos pueden indicar anemia o ser el

Tabla 1.- Valores medios de diferentes parámetros hematológicos en los salmones adultos de Cantabria. El número de ejemplares analizados para cada parámetro se muestra entre paréntesis.

PARÁMETRO	ASÓN	PAS	NANSA	DEVA	TOTAL
HEMATOCRITO (%)	37.5 (6)	41.6 (19)	44.1 (33)	41.8 (4)	42.5 (62)
LEUCOCRITO (%)	0.70 (6)	0.52 (18)	0.77 (33)	0.33 (4)	0.66 (61)
HEMOGLOBINA (gr/dl)	11.3 (63)	12.2 (267)	12.1 (238)	11.9 (196)	12.0 (764)
PROTEÍNA TOTAL PLASMÁTICA (µg/ml)	500.5 (3)	536.4 (24)	523.3 (11)	535.5 (4)	530.3 (42)
GLUCOSA PLASMÁTICA (mg/dl)	62.7 (3)	115.0 (24)	81.6 (11)	137.8 (4)	104.7 (42)

resultado de infecciones. En las poblaciones de Cantabria el valor medio de hematocrito entre los salmones adultos es de 42.5%, oscilando entre un mínimo de 12% y un máximo de 55% (Figura 1). Aunque parecen existir diferencias significativas entre ríos (KW=11.04, P=0.011, N=62), siendo la población del Asón la que presenta los valores más bajos y la población del Nansa los más altos (Tabla 1), el tamaño de la muestra es todavía pequeño.

- **Leucocrito:** El leucocrito representa la relación entre el volumen de leucocitos (glóbulos blancos) y el volumen total de sangre, expresado como porcentaje. En los salmónidos los valores normales de leucocrito oscilan entre 1% y 2%. Valores altos pueden indicar una respuesta a una infección subcrónica mientras que valores bajos pueden indicar una supresión del sistema inmune. Los adultos de Cantabria muestran un valor medio de leucocrito del 0.66% (Tabla 1) y un rango que va desde 0% hasta 6% (Figura 2), sin que se detecten diferencias significativas entre ríos (KW=2.431, P=0.488, N=61).

- **Hemoglobina:** La concentración de hemoglobina en la sangre puede aumentar debido a un stress agudo que cause un desequilibrio en la capacidad de osmoregular, o también debido a un incremento en el número de glóbulos rojos como respuesta a condiciones de anoxia que obligan al pez a aumentar su capacidad de intercambio gaseoso. Su disminución puede indicar anemia o una infección. En salmónidos adultos los valores normales de hemoglobina en sangre tienden a oscilar entre 5 y 11 gr/dl. En Cantabria, el valor medio encontrado es de 12.0 gr/dl (Tabla 1), sin que se aprecien diferencias significativas entre ríos (KW=4.67, P=0.198, N=764). En conjunto (Figura 3), los resultados revelan la existencia de un 3-4% de adultos posiblemente anémicos, caracterizados por concentraciones de hemoglobi-

Figura 1.- Distribución de los valores de hematocrito entre los salmones adultos de los ríos de Cantabria (N=62).

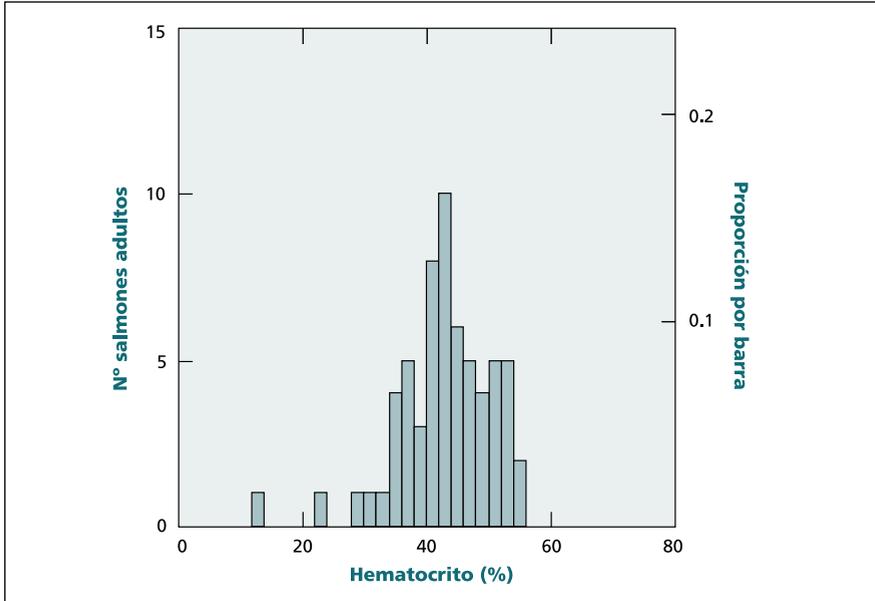


Figura 2.- Distribución de los valores de leucocrito entre los salmones adultos de los ríos de Cantabria (N= 61).

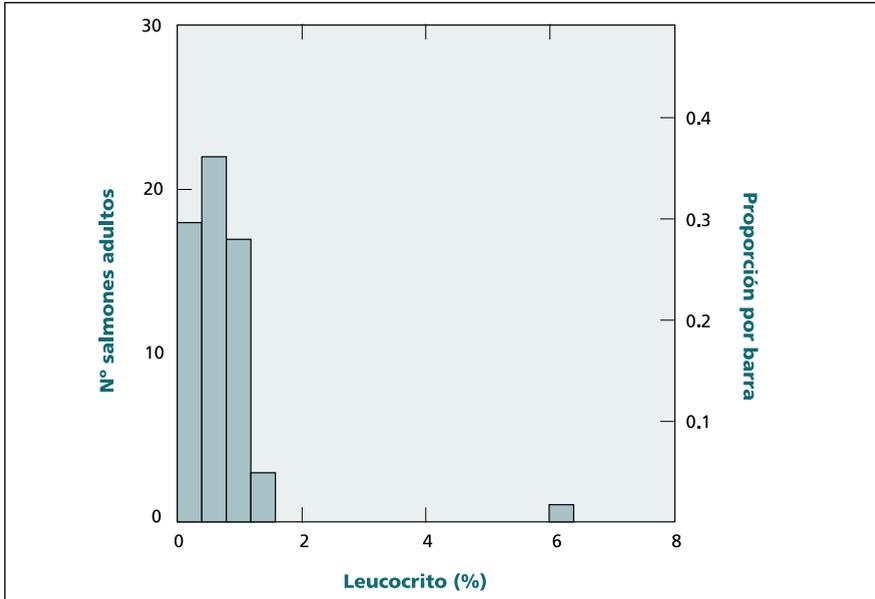
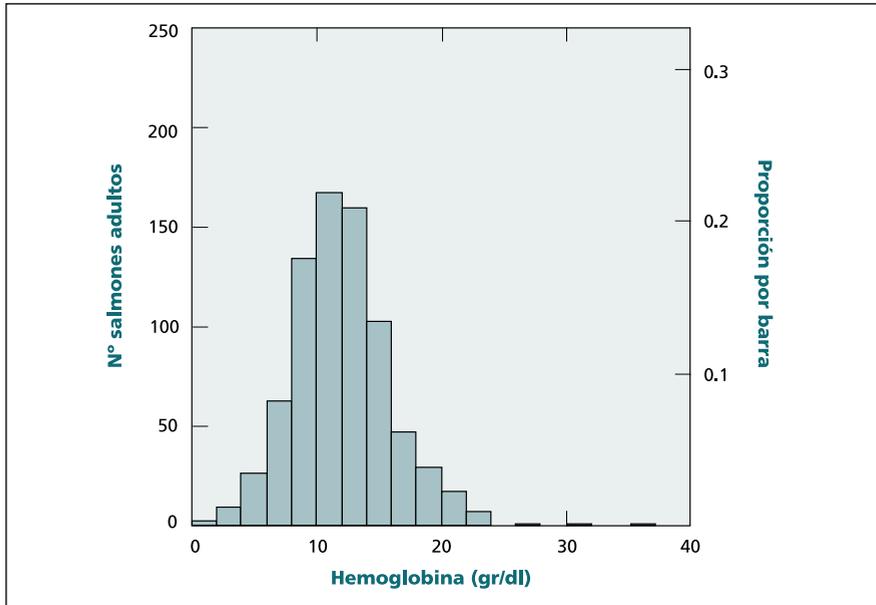


Figura 3.- Distribución de los valores de hemoglobina en sangre entre los salmones adultos de los ríos de Cantabria (N=764).



na en sangre muy bajas, típicas de procesos infecciosos y de un sistema inmune alterado. También encontramos un 20-25% de adultos con concentraciones de hemoglobina excesivamente altas, que podrían resultar indicativas de un stress prolongado.

- **Proteína plasmática total:** Los cambios en la concentración de proteína plasmática pueden resultar indicativos de un desequilibrio en el balance hídrico o nutricional, ocasionados por niveles crónicos de stress. El valor medio encontrado para los adultos de los ríos de Cantabria es de 530.3 mg/ml (Tabla 1), oscilando entre un mínimo de 220.4 y un máximo de 786.8 mg/ml (Figura 4). No se detectan diferencias significativas entre ríos (KW=0.549, P=0.908, N=42).

- **Glucosa:** Los niveles de glucosa en sangre aumentan en respuesta a un episodio agudo de stress debido a la acción de dos hormonas, la epinefrina en el hígado y el cortisol en el músculo, de las que la glucosa es una medida indirecta. La medición de los niveles de glucosa proporciona por tanto una medida indirecta y fácil de realizar de los niveles de stress, así como del estado nutricional de los salmones adultos. El valor medio encontrado en las poblaciones de Cantabria ha sido de 104.7 mg/dl (Tabla 1), si bien parecen existir diferencias altamente significativas entre ríos (KW=20.32, P=0.000, N=42). La variación encontrada entre individuos es muy alta ya que osciló entre un mínimo de 17.3 mg/dl hasta un máximo de 198.8 mg/dl (Figura 5).

Figura 4.- Distribución de los valores de proteína total en plasma entre los salmones adultos de los ríos de Cantabria (N= 42).

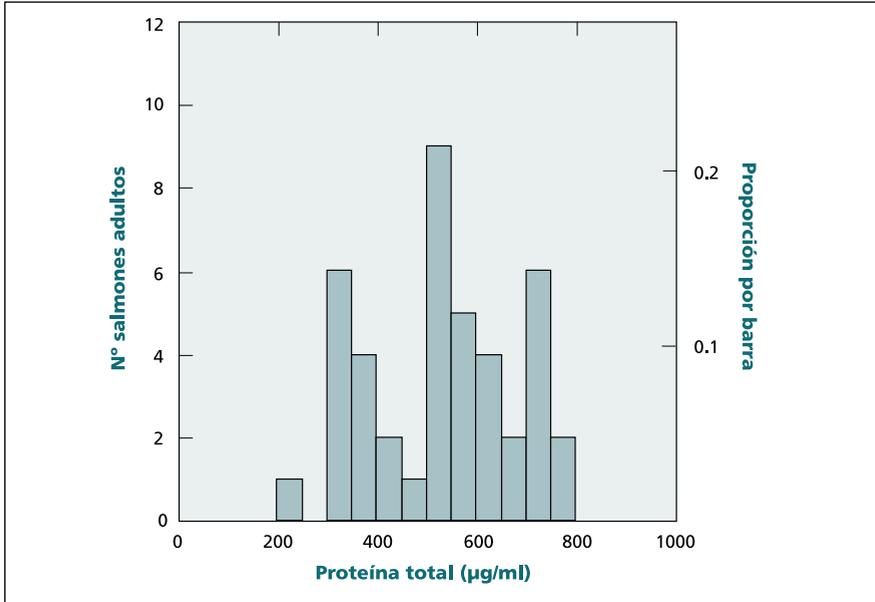


Figura 5.- Distribución de los valores de glucosa en plasma entre los salmones adultos de los ríos de Cantabria (N= 41).

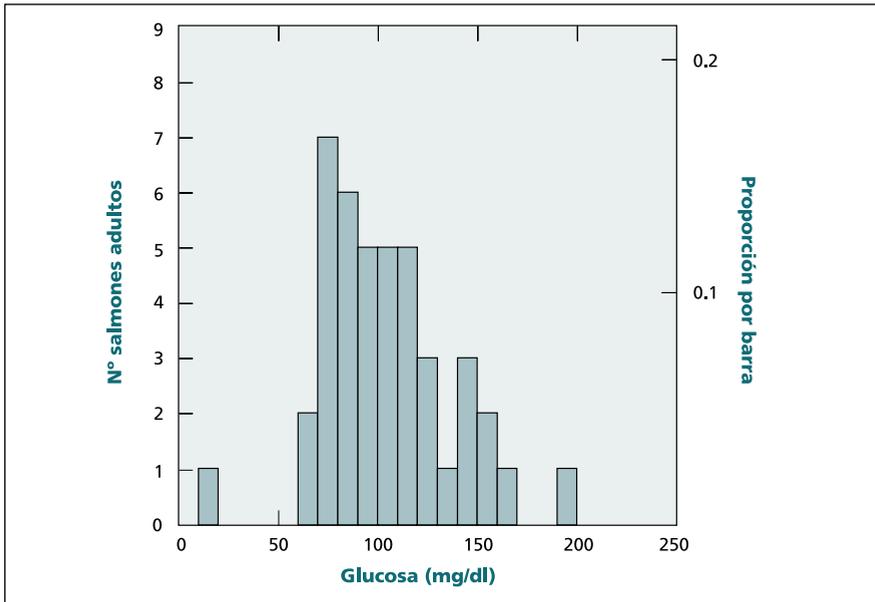


Tabla 2.- Patógenos detectados entre los salmones adultos de Cantabria.

PATÓGENO	ASÓN	PAS	NANSA	DEVA
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	sd	sd
<i>Aeromonas salmonicida</i>	+	+	-	+
<i>Yersinia ruckeri</i>	+	+	-	+
<i>Photobacterium damsela piscicida</i>	+	-	-	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	-	-	-	-
<i>Anisakis simplex</i>	+	+	+	+
<i>Saprolegnia</i> sp.	+	+	+	+

Patógenos detectados en las poblaciones de Cantabria

Hasta la fecha hemos detectado la presencia de las bacterias *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* y *Photobacterium damsela piscicida* entre los salmones adultos de los ríos de Cantabria, además del hongo *Saprolegnia* sp. y el parásito interno de origen marino *Anisakis simplex* (Tabla 2). Los síntomas externos más comunes que encontramos entre los salmones adultos enfermos o moribundos incluyen erosión de la boca y aletas, un hígado pálido y friable, hipertrofia del bazo, necrosis del riñón, y la presencia de hemorragias y petequias, síntomas todos ellos que se asocian en general con las septicemias de origen bacteriano, si bien el papel de agentes víricos no puede descartarse.

Programa de vacunación

Desde 1998 se ha seguido un programa de vacunación de todos los juveniles que se crían en el Centro antes de su repoblación, así como de los adultos que se estabulan como reproductores y de los zancados después del desove. Inicialmente se comenzó vacunando únicamente contra *Aeromonas salmonicida*, para ampliarlo a *Yersinia ruckeri* y *Vibrio anguillarum* más tarde.

Los juveniles se vacunan por inmersión normalmente cuando son marcados y posteriormente se les administra un recuerdo oral en el pienso varias semanas antes de ser repoblados. Los reproductores y zancados se vacunan por inyección intraperitoneal.

Los resultados obtenidos hasta ahora indican que la vacunación tiene un efecto positivo en la supervivencia tanto de los adultos en condiciones de cría en cautividad como de los juveniles después de ser repoblados en el medio natural. Así, la supervivencia de las zancadas estabuladas aumentó desde el 41% cuando se comenzó con el programa de vacunación en 1998 hasta el 90-98% en la actualidad.

En cuanto a los efectos de la vacunación de juveniles y su posterior efecto en la supervivencia de los adultos de retorno, los primeros resultados indican que la inci-

dencia de enfermedades infecciosas es aproximadamente 2.7 veces menor entre los adultos que fueron vacunados como juveniles que entre aquellos que no fueron vacunados. La protección que proporcionan las vacunas, sin embargo, parece ser mayor entre los adultos que retornaron como añales que entre aquellos que retornaron después de varios inviernos de mar, lo que podría indicar que la efectividad de la vacunación disminuye con el tiempo.

Desarrollo y aplicación de métodos moleculares

Además de la aplicación de técnicas de diagnóstico tradicionales, se han comenzado a aplicar técnicas moleculares basadas en la PCR tanto para la identificación rápida de patógenos de manera no destructiva, como para el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la caracterización de genotipos resistentes a diversas enfermedades.

- **Identificación no destructiva de patógenos mediante PCR.** La detección de patógenos por métodos moleculares presenta las siguientes ventajas con respecto a los métodos clásicos:

- 1.- Los análisis pueden realizarse en muestras de sangre o mucus, por lo tanto de manera no destructiva.
- 2.- Permiten detectar la existencia de portadores asintomáticos, antes de que manifiesten ninguna sintomatología, y cuando todavía pueden tratarse de manera preventiva.
- 3.- Los análisis son más sensibles al tener un mayor poder de detección y ser más específicos. Son también más rápidos.

Hasta la fecha hemos aplicado estas técnicas para detectar en salmones adultos la presencia de *Aeromonas salmonicida*, causante de la furunculosis y *Yersinia ruckeri*, causante de la enfermedad de la boca roja o ERM, utilizando los primers descritos en Mooney *et al.*, (1995) y Gibello *et al.* (1999), respectivamente.

Los primeros resultados indican que el 90% de las extracciones pudieron ser amplificadas con primers de salmón. En el caso de *Aeromonas salmonicida*, y sobre una muestra de 46 ejemplares adultos, los resultados indican que un 10% de los adultos se trataría de portadores asintomáticos, que no presentaban ningún síntoma de la enfermedad y que no hubieran podido ser detectados por métodos convencionales.

- **Caracterización genética a nivel del MHC.** El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se trata de un complejo de genes involucrado en la resistencia a las enfermedades y en la respuesta del sistema inmune. Ha sido estudiado en varios organismos, inicialmente en mamíferos y más adelante en peces. En muchas especies, incluido el salmón atlántico, se observa una elevada variabilidad genética,

debida probablemente a la existencia de numerosos patógenos diferentes y al efecto acumulado de la selección natural.

En el caso del salmón atlántico, el MHC se ha relacionado con la resistencia a la bacteria *Aeromonas salmonicida* (causante de la furunculosis) y al parásito *Gyrodactylus salaris* (causante en algunas poblaciones de elevadas mortalidades entre los juveniles en agua dulce). Con respecto a la furunculosis, se sabe que la resistencia natural a esta enfermedad es hereditaria (Lund *et al.*, 1995; Gjedrem, 1997) y que dicha resistencia está asociada con diversos alelos del MHC clase II (Langefors *et al.*, 2001; Lohm *et al.*, 2002). Por esta razón, la caracterización genética a nivel del MHC abre un vía para la selección de individuos resistentes a las enfermedades infecciosas, algo que podría resultar muy útil en los programas de cría en cautividad y en la recuperación de poblaciones de salmón amenazadas.

Conclusiones

De los estudios y trabajos realizados en el laboratorio del Centro Ictiológico de Arredondo durante el período 1997-2002, se desprenden las siguientes conclusiones sobre el estado sanitario de las poblaciones de salmón atlántico de los ríos Asón, Pas, Nansa y Deva en Cantabria :

- 1.- Las enfermedades infecciosas constituyen una causa importante de mortalidad entre los salmones adultos de estas poblaciones, si bien su incidencia varía de año en año y también de río a río.
- 2.- Los síntomas más comunes que encontramos entre los salmones adultos enfermos incluyen erosión de la boca y aletas, necrosis del riñón, alteraciones hepáticas, hipertrofia del bazo y presencia de hemorragias y petequias, síntomas todos ellos que se asocian en general con septicemias de origen bacteriano. Los análisis hematológicos, por otra parte, revelan la existencia de un porcentaje de salmones adultos con síntomas de anemia, stress agudo, anoxia, y depresión del sistema inmune.
- 3.- Los patógenos detectados entre los salmones adultos incluyen las bacterias *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* y *Photobacterium damsela piscicida*, además del hongo oportunista *Saprolegnia* sp. y del parásito interno de origen marino *Anisakis simplex*. No se puede descartar la presencia de agentes víricos, que no fueron estudiados.
- 4.- En general las poblaciones que presentan el peor estado sanitario y la mayor incidencia de enfermedades infecciosas (Asón y Pas) son aquellas que habitan los ríos con peor calidad del agua y mayor alteración del hábitat.

- 5.- El programa de vacunación emprendido aumenta la supervivencia de los salmones adultos, tanto en el programa de cría en cautividad y recuperación de zancados como entre los adultos de retorno procedentes de repoblación.
- 6.- La aplicación de métodos moleculares está permitiendo la detección precoz de enfermedades infecciosas de manera no destructiva, así como la caracterización e identificación de genotipos resistentes a dichas enfermedades.

Recomendaciones

De los estudios efectuados se desprende que las principales causas de enfermedades entre los adultos de salmón de las poblaciones estudiadas incluyen las siguientes:

- 1.- Una deficiente calidad del agua, motivada por la ausencia generalizada de depuradoras en los ríos salmoneros, y el vertido directo de contaminantes.
- 2.- Una fuerte alteración de la calidad de los ríos salmoneros, sobre todo en los ríos Asón y Pas, motivado por la construcción de encauzamientos y escolleras, la tala de vegetación de ribera, la erosión de las cuencas y un caudal de agua a menudo insuficiente.
- 3.- La presencia de obstáculos que impiden la migración aguas arriba de los salmones y que resultan desencadenantes de la aparición y contagio de procesos infecciosos.

Por todo ello, resulta recomendable:

- Mejorar la calidad del agua.
- Establecer caudales mínimos.
- Restaurar las riberas, manteniendo franjas verdes en las márgenes de los ríos salmoneros.
- Limitar el stress, estableciendo reservas en los puntos donde los salmones son más vulnerables.
- Eliminar los obstáculos a la migración de los reproductores.
- Continuar con los programas de vacunación.

Referencias

- CANALES, J. (1983). El salmón: un poco de historia. *Anal. Inst. Est. Agropecuarios* **5**, 139-151.
- DE MIGUEL, A. (1976). *Aeromonas salmonicida* en los ríos de Santander. *Anal. Inst. Est. Agropecuarios* **2**, 213-223.
- GARCÍA DE LEÁNIZ, C., SERDIO, A., & CONSUEGRA, S. (2001). Situación actual del salmón atlántico en Cantabria. In *El Salmón, Joya de Nuestros Ríos* (C. García de Leániz, A. Serdio, & S. Consuegra, eds), pp. 55-82. Santander: Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Montes y Conservación de la Naturaleza.
- GIBELLO, A., BLANCO, M.M., MORENO, M.A., CUTULI, M.T., DOMENECH, A., DOMÍNGUEZ, L. & FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. (1999). Development of a PCR assay for detection of *Yersinia ruckeri* in tissues of inoculated and naturally infected trout. *Appl. Env. Microbiol.* **65**: 346-350.
- GJEDREM, T. (1997). Breeding to raise resistance. In *Furunculosis* (E. V. Bernoth, A. E. Ellis, P. J. Midtlyng, G. Olivier, & P. Smith, eds), pp. 405-418. London: Academic Press.
- IWAMA, G. K. & FARRELL, A. P. (1998). Disorders of the cardiovascular and respiratory systems. In *Fish Diseases and Disorders. Volume 2. Non-infectious Disorders* (J. F. Leatherland & P. T. K. Woo, eds), pp. 245-278. Wallingford: CABI Publishing.
- KUBOKAWA, K., WATANABE, T., YOSHIOKA, M., & IWATA, M. (1999). Effects of acute stress on plasma cortisol, sex steroid hormone and glucose levels in male and female sockeye salmon during the breeding season. *Aquaculture* **172**, 335-349.
- LANGFORS, Å., LOHM, J., GRAHN, M., ANDERSEN, Ø., & VON SCHANTZ, T. (2001). Association between major histocompatibility complex class IIb alleles and resistance to *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **268**, 479-485.
- LOHM, J., GRAHN, M., LANGFORS, Å., ANDERSEN, Ø., STORSET, A., & VON SCHANTZ, T. (2002). Experimental evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **269**, 2029-2033.
- LUND, T., GJEDREM, T., BENTSEN, H. B., EIDE, D. M., LARSEN, H. J. S., & RØED, K. H. (1995). Genetic variation in immune parameters and associations to survival in Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* **46**, 748-758.
- MARTIN VENTURA, J.A. (1988). The Atlantic salmon in Asturias, Spain: analysis of catches, 1985-86. Inventory of juvenile densities. En D. Mills y D. Piggins (eds.) *The Atlantic Salmon: planning for the future*. Capítulo 11: pp. 210-227. Croom Helm and Timber Press, London.
- McDONALD, G. & MILLIGAN, L. (1997). Ionic, osmotic and acid - base regulation in stress. In *Fish Stress and Health in Aquaculture* (G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, & C. B. Schreck, eds), pp. 119-144. Cambridge: Cambridge University Press.
- MOONEY, J., POWELL, E., CLABBY, C. & POWELL, R. (1995). Detection of *Aeromonas salmonicida* in wild Atlantic salmon using a specific DNA probe test. *Dis. Aquat. Org.* **21**: 131-135.
- MORGAN, J. D. & IWAMA, G. K. (1997). Measurements of stressed states in the field. In *Fish Stress and Health in Aquaculture* (G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, & C. B. Schreck, eds), pp. 247-268. Cambridge: Cambridge University Press.