

# **AUTODECLARACION DE ZONA LIBRE DE NECROSIS HEMATOPOYÉTICA INFECCIOSA, NECROSIS HEMATOPOYÉTICA EPIZOOTICA, ANEMIA INFECCIOSA DEL SALMON, NECROSIS PANCREATICA INFECCIOSA, SEPTICEMIA HEMORRAGICA VIRAL, ENFERMEDAD BACTERIANA RENAL Y PISCIRICKETTSIOSIS EN LA CUENCA ALTA DE RIO LIMAY QUE INCLUYE AL EMBALSE DE ALICURA, EN LA REPUBLICA ARGENTINA.**

## **1. INTRODUCCIÓN**

El Objetivo del presente informe es presentar las evidencias de la ausencia de infección de Necrosis Hematopoyética Epizoótica (EHNV), Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV), Septicemia Hemorrágica Viral (VHS), Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), Anemia Infecciosa del Salmón (ISA), Enfermedad Bacteriana Renal (BKD) y Piscirickettsiosis en base al Capítulo 1.4 del Código Sanitario para los Animales Acuáticos 2009 y el Capítulo 1.1.4 del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los animales acuáticos 2006 de la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE), en la Zona Cuenca Alta de Río Limay que incluye al Embalse de Alicura hasta la presa hidroeléctrica en la República Argentina.

La zona libre, se ubica en la Región Patagónica de nuestro país, abarcando parte de las provincias de Neuquén y Río Negro. La misma está delimitada por el Lago Nahuel Huapi y sus afluentes que dan origen al Río Limay hasta la presa del Embalse Alicura, lo que dio lugar a la formación del lago del mismo nombre. La elección de este Embalse en la zonificación se debe a la importancia productiva que representa, con una producción que actualmente alcanza aproximadamente las 1200 tn de truchas arco iris, y un potencial futuro de producción cercano a 4000 tn, estimadas en forma conservadora. La producción total de salmónidos en todo el país es de 1600 tn/2009, representando el 58% de la producción total de su acuicultura.

El sustento en que se basa la declaración de esta zona como “Zona Libre de Necrosis Hematopoyética Epizoótica, Necrosis Hematopoyética Infecciosa, Septicemia Hemorrágica Viral, Necrosis Pancreática Infecciosa, Anemia Infecciosa del Salmón, Enfermedad Bacteriana Renal y Piscirickettsiosis”, son las acciones citadas a continuación.

Por medio de la Ley N° 3959 de Policía Sanitaria de los Animales, reglamentada por el Decreto de fecha 8 de noviembre de 1906, se declara la obligatoriedad de notificación ante la sospecha de presencia de enfermedades animales. La misma contempla a las enfermedades Necrosis Hematopoyética Epizoótica, Necrosis Hematopoyética Infecciosa, Septicemia Hemorrágica Viral, como de notificación obligatoria para la República Argentina. Las enfermedades Necrosis Pancreática Infecciosa, Anemia Infecciosa del Salmón, Enfermedad Bacteriana Renal y Piscirickettsiosis se encuentran en trámite de incorporación.

## **2. SERVICIO VETERINARIO**

El Servicio Veterinario de Argentina es el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, **SENASA**. Se trata de un organismo autárquico que depende del actual Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación.

Dicho Servicio se mantiene actualizado sobre los nuevos estándares, guías y recomendaciones internacionales en los temas de su incumbencia y armoniza su política y normativa de acuerdo a ellas, e inclusive en algunos de los temas participa como país miembro en discusiones para las actualizaciones (Código y Manual de OIE, Codex Alimentario y otros).

La capacidad o competencia técnica de su personal como la capacidad financiera de recursos a su disposición (otorgados por medio de los instrumentos legales correspondientes: leyes, decretos y resoluciones) permiten un correcto funcionamiento del Servicio para mantener un sistema de vigilancia eficaz y la certificación de calidad en los alimentos, como así también, la posibilidad de enfrentar situaciones sanitarias de emergencia.

Las políticas sanitarias están orientadas a la interacción con el sector privado para el cumplimiento de actividades que lleven al objetivo común de mejorar o mantener los estándares sanitarios actuales.

### Capacidad técnica

El servicio posee:

- Capacidad constante para incorporar los últimos avances científicos reflejados en la actualización de las normas y medidas dictadas por los organismos internacionales como OIE, Codex Alimentarius y el acuerdo de medidas SPS de la Organización Mundial de Comercio.
- Capacidad diagnóstica propia y disponibilidad para acceder, en caso de necesidad por emergencias sanitarias, a redes internacionales de laboratorios de referencia.
- Promueve la acreditación y auditoría de sus laboratorios para certificar la calidad de los diagnósticos, la toma de muestras y los procedimientos de envío.
- Capacidad para detectar y enfrentar eficientemente una emergencia sanitaria. A través del análisis de riesgo y la vigilancia epidemiológica, monitorea el estado sanitario en las poblaciones de riesgo de las enfermedades de importancia para la salud humana o de alto impacto económico. Evalúa el status sanitario de los países limítrofes o con los que tiene intercambio comercial, especialmente en lo que se refiere al Comité Veterinario Permanente (CVP) del Cono Sur, y de acuerdos bilaterales con los países que mantiene relaciones comerciales.

A través de la Resolución 848/1998 se crea el Documento de Transito Animal (DTA), quién reemplaza al Permiso Sanitario para el Tránsito de Animales. Todo animal que transite por el territorio argentino debe estar acompañado de su correspondiente DTA y documentado en el Sistema de Gestión Sanitaria.

En el año 2008 el SENASA desarrolló el Sistema Integrado de Gestión de Sanidad Animal (SIGSA), establecido por la Resolución N° 356/2008, el cual reemplaza al Sistema de Gestión Sanitaria (SGS). Es un sistema informático en red con el fin de administrar el Registro de Establecimientos con existencia de animales bajo Programas Sanitarios, el registro de eventos sanitarios, el registro de los movimientos de animales entre establecimientos, y el tránsito de mercancías en general, mediante la emisión del Documento de Tránsito Electrónico (DT-e).

Actualmente conviven ambos sistemas (SGS-SIGSA), encontrándose en un período de transición.

## 2.1. DESCENTRALIZACIÓN

La descentralización administrativa por medio de la regionalización forma parte de la estrategia del cambio actual institucional del Senasa enfocada al fortalecimiento de las políticas nacionales en materia de sanidad animal y vegetal e inocuidad agroalimentaria. La Regionalización plantea la descentralización de las decisiones operativas. Es un avance hacia la delegación de acciones operativas del SENASA a nivel local. Permite al organismo contar con un ámbito adecuado para una más amplia y permanente articulación con los actores locales públicos y privados, mejorar la atención a los productores y ciudadanos, coordinar las acciones de campo y realizar el seguimiento de procesos y evaluación de impactos.

Este organismo sanitario tiene en función 14 centros regionales cuyo accionar abarca la totalidad del territorio nacional.

En este nuevo contexto, el nivel central con responsabilidad nacional se encargará de cumplir las funciones de normar, orientar, capacitar y auditar. Por tanto, la regionalización apunta a crear, de manera gradual y sustentada en el consenso de los actores institucionales, un Senasa centralizado para las cuestiones normativas y de control y federal en cuanto a su estructura de gestión.

La Resolución 225/2006 del Senasa y sus modificatorias redefine la jurisdicción de las cinco regiones (Noreste, Noroeste, Nuevo Cuyo, Pampeana y Patagonia) integradas por un total de catorce (14) centros regionales.

La Región NEA está integrada por los Centros Regionales de Misiones-Corrientes, Entre Ríos y Chaco-Formosa.

La Región NOA tiene dos centros regionales, NOA-Norte (Salta, Jujuy) y NOA-Sur (Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero).

La Región Nuevo Cuyo también está dividida en dos centros regionales, Cuyo (La Rioja, San Juan, Mendoza) y La Pampa-San Luis.

La Región Pampeana por su parte está integrada por cuatro centros regionales: Metropolitana, Buenos Aires Norte, Buenos Aires Sur, Santa Fe y Córdoba.

Finalmente, la Región Patagonia incluye la regional Patagonia Norte (Río Negro, Neuquén) y Patagonia Sur (Chubut, Santa Cruz, Tierra del Fuego).



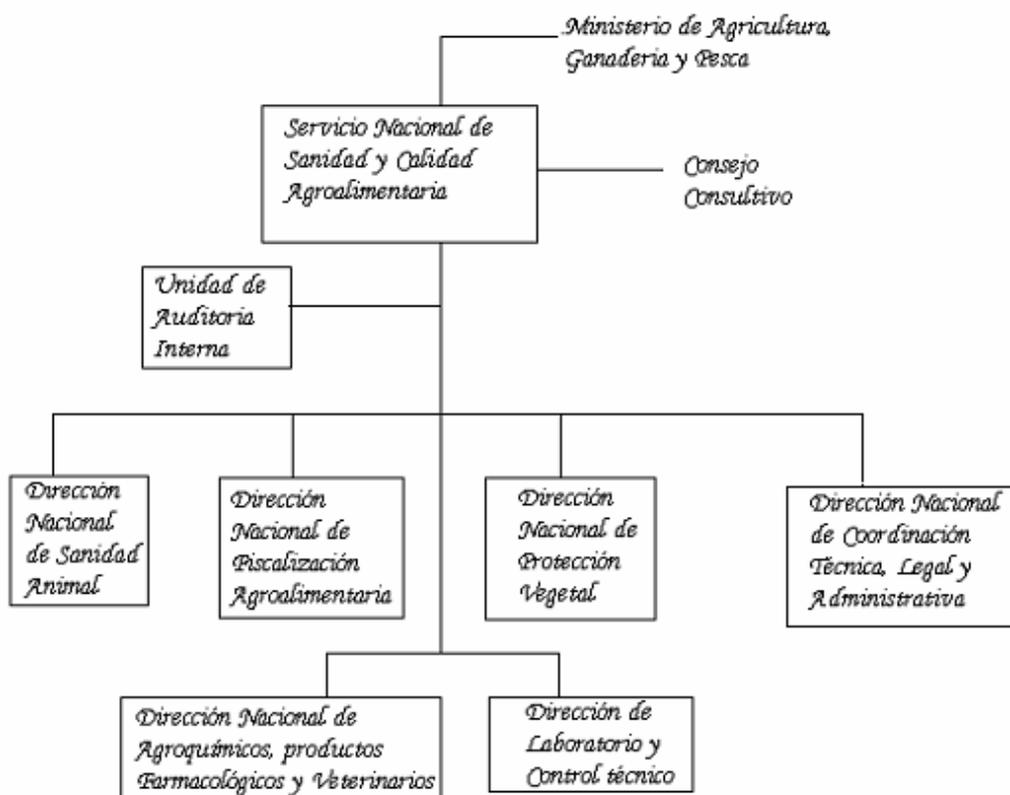
La estructura funcional de las Regionales comprende:

- Unidad Regional Operativa (URO) a nivel central, con una Coordinación de Desarrollo Regional y Apoyo Operativo y una Coordinación de Seguimiento y Evaluación Regional
- Coordinación General Regional
- Coordinación Temática Regional (una por cada área temática: Sanidad Animal, Protección vegetal, Fiscalización Agroalimentaria, Administración, Capacitación y Laboratorio)

## 2.2. ORGANIZACIÓN

El SENASA es responsable de la implementación de las políticas con relación a la sanidad y calidad animal y vegetal, supervisando el cumplimiento de las regulaciones vigentes en relación a esos temas. Al mismo tiempo, es responsable por el tráfico nacional y el control de los animales que se importan y exportan, como así también de los productos animales y vegetales y sus derivados, los agroproductos, productos farmacológicos y veterinarios, agroquímicos y fertilizantes.

El personal del SENASA está integrado por 5.000 funcionarios distribuidos entre todas sus áreas.



#### REGIONALIZACION

Centro Regional Misiones-Corrientes	Centro Regional Cuyo	Centro Regional Santa Fe
Centro Regional Entre Ríos	Centro Regional La Pampa-San Luis	Centro Regional Córdoba
Centro Regional Chaco-Formosa	Centro Regional Metropolitano	Centro Regional Patagónica Norte
Centro Regional NOA-Norte	Centro Regional Buenos Aires Norte	Centro Regional Patagónica Sur
Centro Regional NOA-Sur	Centro Regional Buenos Aires Sur	

Las áreas principales dedicadas a la Sanidad Animal son:

- DIRECCION NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL (DNSA)
- DIRECCION NACIONAL DE FISCALIZACION AGROALIMENTARIA (DNFA)
- DIRECCION DE LABORATORIOS Y CONTROL TÉCNICO (DILACOT)

## **DIRECCION NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL (DNSA)**

Responsabilidad primaria:

Desarrollar las acciones de prevención, control y erradicación de las enfermedades de los animales, asegurando el cumplimiento de las normas legales vigentes.

Objetivos generales:

- Formula, propone y evalúa programas de lucha contra las enfermedades infecciosas y parasitarias de los animales y las zoonosis
- Programa, ejecuta y audita planes sanitarios de lucha
- Coordina las acciones epidemiológicas en enfermedades endémicas y exóticas o emergentes en el país.
- Planifica y ejecuta acciones de vigilancia para determinar prevalencias o ausencias de las principales enfermedades que afectan a los animales
- Fiscaliza el movimiento de animales, en los aspectos higiénico sanitarios, y otorga las certificaciones correspondientes.

Su estructura funcional comprende las siguientes áreas:

- DIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA
- DIRECCIÓN DE CUARENTENA ANIMAL
- DIRECCIÓN DE LUCHAS SANITARIAS
- COORDINACIÓN GENERAL DE CAMPO
- COORDINACIONES TEMÁTICAS REGIONALES DE SANIDAD ANIMAL
- SUPERVISIONES REGIONALES
- OFICINAS LOCALES

Dirección de Cuarentena Animal tiene como instancia asesora la Comisión Técnica Asesora de Cuarentena. Asimismo, la Dirección de Epidemiología cuenta con un órgano asesor, la Comisión Técnica Asesora de Epidemiología, formada por representantes del Instituto Nacional de Tecnología Agroalimentaria (INTA), Centro de Virología Animal (CEVAN), de distintas Facultades y del SENASA, creada por Resolución SENASA N° 369/2001.

### **DIRECCIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA**

Acciones:

- Análisis epidemiológico de la situación sanitaria, control de casos y focos de enfermedad.
- Coordinación de las acciones necesarias para el mantenimiento del sistema nacional de vigilancia epidemiológica.
- Supervisión de la fiscalización del movimiento de animales en sus aspectos higiénico sanitarios.
- Planificación de encuestas, muestreos diagnósticos y monitoreo serológico.
- Análisis bioestadísticos
- Contingencias sanitarias

### **DIRECCION DE CUARENTENA ANIMAL**

- Intervenir o proponer planes, programas y normas sanitarias de prevención de enfermedades exóticas.
- Formular, proponer y evaluar las acciones para la erradicación de enfermedades exóticas.
- Desarrollar la investigación permanente sobre enfermedades exóticas e inexistentes en el país y difundir la legislación que regula su control sanitario y proponer las modificaciones vigentes en la materia.

- Elaborar o intervenir en las propuestas de normas sanitarias de prevención del ingreso de enfermedades exóticas y/o de alto riesgo.
- Coordinar la evaluación permanente de factores de riesgo de introducción o propagación de enfermedades notificables.
- Intervenir en la modificación de los protocolos y convenios sanitarios internacionales respecto de los requisitos y certificaciones acordadas.
- Proponer las pautas sanitarias tendientes a minimizar el riesgo de introducción de enfermedades exóticas y/o de alto riesgo en la importación de animales, material de reproducción, productos y subproductos de origen animal capaces de vehiculizar y/o favorecer la propagación de las citadas enfermedades.
- Elaborar y mantener actualizada una base de datos con la información sobre la situación zoonosológica mundial.
- Organizar y mantener actualizados los Registros de competencia de la Dirección

## **DIRECCIÓN DE LUCHAS SANITARIAS**

Acciones:

- Planificación y diseño de campañas de prevención, de lucha y erradicación de enfermedades animales
- Desarrollo de la investigación permanente sobre las enfermedades endémicas y propuesta de las modificaciones a la normativa vigente
- Coordinación y asistencia técnica del proceso de implantación, control y auditoría de los diferentes programas de lucha

## **COORDINACIÓN GENERAL DE CAMPO**

Acciones:

- Coordinación y gestión del cumplimiento de las acciones de prevención, control y erradicación de enfermedades de los animales bajo programas de lucha
- Control del cumplimiento de las acciones sanitarias, en aplicación de la ley de Policía Sanitaria y las normas legales en la materia
- Fiscalización de los movimientos de animales, habilitación de instalaciones y certificaciones.

## **COORDINADORES GENERALES REGIONALES**

Responsabilidades:

- Coordinar, planificar y dirigir la ejecución de las acciones contempladas en los planes, programas y actividades de las diferentes Direcciones del SENASA a fin de asegurar el cumplimiento de la normativa aplicable en materia de sanidad animal y vegetal e inocuidad y calidad agroalimentaria.
- Ejercer las acciones específicas de fiscalización y toda otra función delegada por la Dirección Nacional de Fiscalización Agroalimentaria en el ámbito de su jurisdicción.
- Elaborar el presupuesto anual en forma conjunta con los coordinadores regionales temáticos y las Direcciones Nacionales, verificando su ejecución.
- Intervenir en el área de su jurisdicción, en las relaciones institucionales y, ejercer la representación del SENASA ante organismos públicos y privados.
- Entender en la administración y desarrollo de los recursos humanos disponibles, así como elevar las necesidades de personal, en concordancia con los coordinadores regionales temáticos.
- Disponer las acciones técnico-administrativas correctivas que pudieran corresponder.
- Proponer a la autoridad central las necesidades de capacitación del personal.
- Mantener actualizados los registros técnicos y administrativos requeridos por las Direcciones del Organismo.

- Mantener actualizado el registro de los bienes patrimoniales existentes en su jurisdicción.
- Promover la difusión de las actividades en materia sanitaria y calidad agroalimentaria.

## **COORDINADORES REGIONALES TEMATICOS**

Responsabilidades:

- Planificar y Coordinar la ejecución de las acciones correspondientes a su área dentro de la jurisdicción, garantizando su implementación y seguimiento.
- Entender en la elaboración y ejecución del presupuesto anual acorde a las necesidades de recursos operativos del área a su cargo y la proyección de los ingresos.
- Controlar en el ámbito jurisdiccional la correcta aplicación de las normas legales vigentes que rigen en su área temática, interviniendo en la tramitación de las actuaciones originadas por infracciones a las mismas.
- Entender en la planificación, coordinación y ejecución de tareas preventivas y de atención de emergencias sanitarias.
- Calificar el personal a su cargo.
- Elaborar y proponer a la autoridad regional las necesidades anuales de capacitación del personal.
- Coordinar las tareas de gestión administrativa, los recursos humanos y bienes patrimoniales del área temática a su cargo.
- Elevar en forma periódica o a requerimiento del Responsable del Centro Regional las novedades relacionadas a las actividades de su área.
- Asistir al Responsable del Centro Regional, en las comisiones regionales y/o provinciales que ya estén conformadas o que se conformen en el futuro.

## **SUPERVISORES REGIONALES**

Responsabilidades:

- Supervisión de las acciones de prevención, control y erradicación de enfermedades en su jurisdicción y las acciones de vigilancia epidemiológicas
- Supervisión y fiscalización del cumplimiento de las normas legales vigentes y la organización y funcionamiento de las oficinas locales.
- Ejecución y evaluación del desempeño del personal de campo afectado a las mismas
- Representación oficial del SENASA en su zona.

## **VETERINARIOS LOCALES**

Responsabilidades:

- Ejecución de las acciones de prevención, control y erradicación de los programas de lucha de su jurisdicción
- Atención de las notificaciones, sospechas y focos de enfermedades y tareas de vigilancia epidemiológica y monitoreo permanente
- Ejecución de acciones de policía sanitaria y cumplimiento de la normativa vigente
- Control y fiscalización de los movimientos y transporte de ganado y emisión de las certificaciones correspondientes
- Actualización de los registros documentales de productores, establecimientos, existencias ganaderas, movimientos, controles sanitarios y administrativos de su jurisdicción.

Las Delegaciones son oficinas ubicadas en pequeñas localidades, dependientes de las Oficinas Locales y su función es facilitar ciertos trámites al productor.

La implementación de las acciones en las jurisdicciones correspondientes se efectúa a través de los Veterinarios Locales, ubicados en 353 Oficinas Locales distribuidas estratégicamente en todo el Territorio Nacional, dependientes de 30 Supervisiones

Regionales. Las Supervisiones Regionales dependen de las Coordinaciones Regionales Temáticas de cada Regional.

### **DIRECCION NACIONAL DE FISCALIZACION AGROALIMENTARIA (DNFA).**

Interviene en el control, a nivel federal, del cumplimiento de las regulaciones higiénico-sanitarias de los frigoríficos, plantas elaboradoras y/o depósitos de productos y subproductos de origen animal y vegetal, ya sean comestibles o de uso industrial. Asimismo, tiene a su cargo la aprobación de plantas faenadoras y/o procesadoras de productos y subproductos derivados de los animales domésticos. Los Servicios de Inspección Veterinaria son responsables de implementar dichos controles en plantas nacionales de faena aprobadas para exportación y consumo interno. Dentro de su estructura se encuentra la DIRECCIÓN DE TRÁFICO INTERNACIONAL con la COORDINACIÓN DE FRONTERAS Y TRÁFICO FEDERAL.

### **DIRECCION DE LABORATORIOS Y CONTROL TECNICO (DILACOT)**

Es el Laboratorio Nacional de Referencia en la inocuidad de alimentos y la sanidad animal y vegetal; consta de dos Coordinaciones Generales: Laboratorio Animal y Laboratorio Vegetal; además cuenta con Laboratorios Regionales y una Red de Laboratorios Nacionales habilitados por el SENASA y distribuidos en todo el país. Como tal:

- Establece los métodos y protocolos de análisis utilizados por él y por los laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios del SENASA.
- Interviene en la resolución de controversias.
- Confirma los resultados positivos emitidos por los laboratorios de la Red Nacional.
- Produce e interviene en ensayos interlaboratorios.
- Ejerce el control periódico de la Red de Laboratorios.
- Asiste a las otras direcciones del SENASA en la evaluación de los resultados analíticos.
- Interviene en la actualización de la legislación de su incumbencia y participa en Foros Internacionales (Codex Alimentarius, MERCOSUR, OIE, etc.).

El Laboratorio Animal de SENASA, ubicado en la localidad de Martínez, provincia de Buenos Aires, es el único autorizado a efectuar diagnósticos en la vigilancia de las enfermedades de los peces en estudio.

## **2.3. LEGISLACIÓN**

- Ley N° 3959 de Policía Sanitaria de los Animales, reglamentada por el Decreto de fecha 8 de noviembre de 1906. Por medio de la cual se declara la obligatoriedad de notificación ante la sospecha de presencia de enfermedades animales. La actualización de incorporación de enfermedades se encuentra en trámite avanzado bajo el exp. N° 492332/2009.
- Resolución SENASA N° 1354/1994 Requisitos de importación: Operatoria para autorizar la importación de animales vivos o su material reproductivo.
- Predios de Cuarentena de Importación para Salmónidos: Proyecto de Resolución en trámite. Exp. N° 404167/2009.

- Resolución SAGPyA N° 417/1997 crea el Registro Nacional Sanitario de Productores Agropecuarios (RENSPA) y sus modificatorias.
- Resolución SENASA N° 848/1998 Documento de Transito (DTA) aprueba el Documento de Tránsito Animal el cual sustituirá el Permiso Sanitario para Tránsito de Animales (PSTA), creado por la Resolución N° 473 del 12 de julio de 1995.
- Resolución SENASA N° 299/1999 Indica los procedimientos de control en los pasos de frontera, terrestres, aéreos, marítimos, etc. que deben aplicarse a través del tránsito de personas, equipajes y vehículos. Su objetivo está dirigido expresamente a la prevención.
- Resolución SENASA N° 779/1999 Aprueba el Sistema Nacional de Emergencias Sanitarias (SINAESA).
- Requisitos para Importación (m1062) de 2000 Circular de la Dirección de Cuarentena Animal de SENASA. Requisitos Zoonosológicos para amparar las operaciones de importación y tránsito de peces vivos y/o su material reproductivo a la República Argentina.
- Requisitos Sanitarios de Importación de Material Acuícola Vivo: Proyecto de Resolución en trámite (reemplazará m1062).Exp. N° 282509/2007
- Resolución SENASA N° 21/2001 que crea el Programa de Enfermedades de los Animales Acuáticos en Argentina donde se determinan las patologías ictícolas presentes en el territorio nacional, se elaboran normas y se planifica y diseña la vigilancia activa de las enfermedades.
- Resolución SENASA N° 501/01 Establece los procedimientos operativos para el control en los puestos de frontera habilitados para el ingreso al país de animales, productos, subproductos, etc. de competencia del Servicio en el ámbito animal.
- Resolución SENASA N° 895/2002 Plan Nacional de Prevención del Ingreso de Plagas y Enfermedades a través de residuos orgánicos.
- Resolución SENASA N° 422/2003 que establece en el SENASA la adecuación a la normativa internacional vigente en cada materia sobre los sistemas de: notificación de enfermedades animales, de vigilancia epidemiológica y seguimiento epidemiológico continuo, análisis de riesgo, emergencias sanitarias y un dispositivo reglamentario que contemple todos los aspectos de protección y lucha contra las epizootias.
- Resolución SAGPyA N° 1314/2004 Establece Normas que regulan la producción de Organismos Acuáticos Vivos en los emprendimientos/ establecimientos que se dediquen a la actividad de acuicultura, dentro del Territorio de la REPUBLICA ARGENTINA.
- Colectiva de la Coordinación General de Campo N° 58/2007: Inscripción al RENSPA y movimiento con DTA para establecimientos acuícolas.
- MEMORANDO Dirección de Luchas Sanitarias N° 12/2009: Comunica a los Centros Regionales la Acreditación de los Inspectores Sanitarios Acuícolas.

- Colectiva de la Coordinación General de Campo N° 54/2009: Toma de muestras y envío al laboratorio. En la misma se describe el procedimiento ante la solicitud de muestreo previo a traslados u otros eventos que lo requieran.

En los siguientes sitios web se puede encontrar la legislación citada anteriormente  
<http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/mostrarBusquedaNormas.do>

### **3. DESCRIPCIÓN DEL PAÍS Y DE LA ZONA**

#### **3.1. FRONTERAS ARGENTINAS**

Caracterización geográfica de las fronteras argentinas.

La frontera terrestre argentina se puede dividir de la siguiente manera:

Frontera con CHILE (Oeste y Sur).

Frontera con BOLIVIA (Norte).

Frontera con PARAGUAY (Norte).

Frontera con BRASIL (Noreste y Este).

Frontera con URUGUAY (Este).

El único país que limita con la zona bajo estudio es la República de Chile, la cual se encuentra al OESTE, con un total de kilómetros de frontera (seca) de 4.591 Km. La Cordillera de los Andes acompaña todo el límite como frontera natural.

#### **3.2. DESCRIPCIÓN GEOGRÁFICA DEL PAÍS**

La Argentina tiene una superficie total de 2.780.400 km<sup>2</sup> comprende un territorio muy variado que incluye altas montañas, desiertos, vastas llanuras y bosques palustres.

Las escarpadas montañas de los Andes se extienden a lo largo de la frontera occidental del país. Una meseta árida y azotada por vientos, la Patagonia, se extiende hacia el sur. La Pampa, una llanura herbosa y fértil cubre mitad del territorio. El extremo sur de la Argentina se encuentra a sólo 970 km de distancia de la Antártida en el Polo sur, mientras que el extremo norte tiene un clima subtropical.

La frontera occidental del país sigue el relieve de los Andes, comenzando a partir de los Andes de la Patagonia en el sur, y continuando hacia la cordillera andina en la frontera norte con Bolivia. En el sur la altitud no sobrepasa los 3 600 m, mientras que en el norte esta supera los 6 400 m.

Al este de los Andes, el terreno es generalmente plano o suavemente ondulado, y desciende gradualmente desde una elevación de 600 m, hasta el nivel del mar. La región del Chaco se sitúa entre el río Paraná al este, y las montañas más bajas de los Andes, al oeste. La región, cubierta sobre todo de matorrales, es seca durante la mayor parte del año, pero a menudo es objeto de fuertes lluvias durante el verano.

La región denominada Mesopotamia se sitúa entre los ríos Paraná y Uruguay. Esta región tiene un clima cálido y húmedo, y posee tierra agrícola productiva en casi toda su extensión.

La Pampa es una llanura sin árboles y alberga las regiones agrícolas más productivas del país. Esta llanura cubre un quinto del territorio nacional.

En Patagonia, situada al sur de la Pampa, el terreno es una estepa árida y desolada, azotada por los vientos. Aunque ocupa más de un cuarto del territorio nacional, los suelos pobres y las escasas precipitaciones hacen de la Patagonia una tierra poco apropiada para la agricultura. Sus llanuras se usan sobre todo como pastos para el ganado ovino.

La isla de Tierra del Fuego se sitúa en el extremo sur de América y el estrecho de Magallanes la separa de la tierra firme. Argentina y Chile comparten este territorio.

La Argentina tiene un clima templado en casi todo el territorio, a excepción de una reducida área subtropical situada en el noreste, el noroeste.

(Fuente: FAO 2009)

El Sector Cordillerano Austral, tiene una altura promedio de 2.500 metros sobre el nivel del mar, con profusión de lagos, que tienen gran importancia en la regulación de

las cuencas hídricas. La altura va disminuyendo progresivamente desde la cordillera hasta la costa atlántica, constituyendo una extensa meseta semidesértica en la parte central. La zona de montaña (parte suroccidental) es húmeda o subhúmeda.

En la Patagonia Andina las precipitaciones superan los 2.000 mm por año, disminuyendo hacia la zona atlántica, donde el promedio anual es de sólo 200 mm.

Las grandes variaciones climáticas a lo largo del territorio nacional limitan la producción de salmónidos a las regiones frías del país así como también la distribución de los ejemplares silvestres introducidos a las diferentes cuencas hidrográficas.

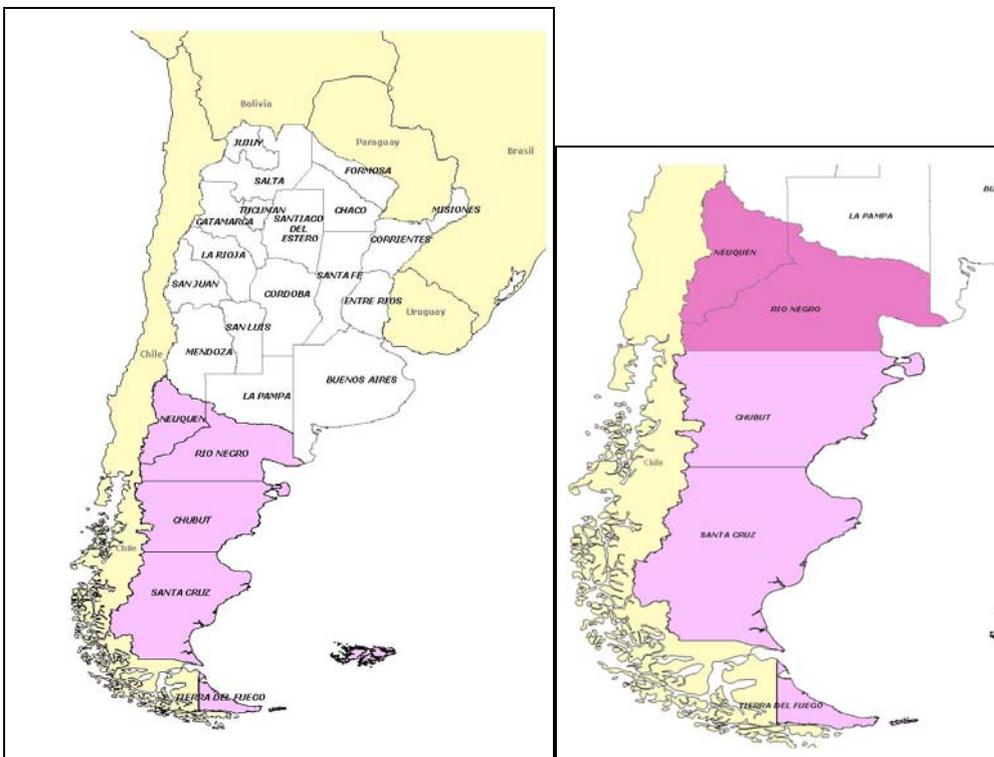
Mapa de climas de la Argentina



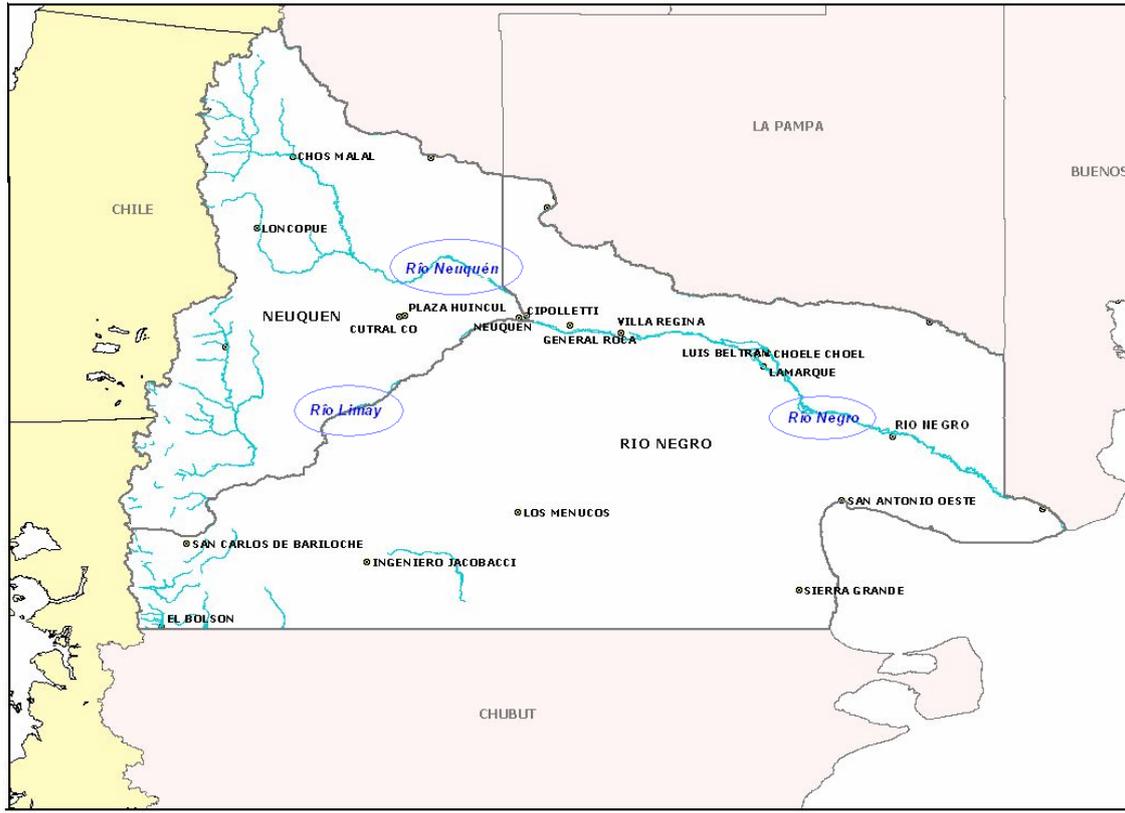
SENASA-DNPV-SINAVIMO-AREA CARTIGRAFIA

### 3.3. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA LIBRE

La zona bajo estudio se encuentra en la región patagónica de nuestro país. Abarca parte de las provincias de Neuquén y Río Negro.



Entre las provincias nombradas anteriormente existen dos cuencas hidrográficas importantes: la cuenca del Río Neuquén y la cuenca del Río Limay, que con la anterior forman parte de la cuenca del Río Negro que desagua en el Océano Atlántico. Las cuencas de los ríos Limay y Neuquén suman una superficie de aproximadamente 70.000 km<sup>2</sup> (Hidronor, 1978)



El lago Nahuel Huapi, de origen glacial fue formado por el endicamiento de una morena frontal (Cordini, 1939) y se ubica a los 764 msnm, presentando una superficie de 529 km<sup>2</sup>. El área total que abarca su cuenca, es de 2951 km<sup>2</sup>. Se trata de un cuerpo de agua que posee una cubeta central, con siete áreas bien definidas, denominadas “brazos”, cada uno de ellos, con características propias. Tales brazos ubicados transversalmente (y también de origen glacial), se ocasionaron debido al desplazamiento de diferentes morenas, a partir de la Cordillera de los Andes, siendo los principales el del Campanario, de la Tristeza, Blest y Huemul. El agua del lago es de carácter **OLIGOTRÓFICO** (Luchini, L., 2004).

La profundidad máxima del lago ha sido registrada a los 438 m y la media se considera de 157 m. El perímetro es de 357 km, presentando una forma muy irregular y su volumen alcanza los 83.053 hm<sup>3</sup>, con un recambio de agua total que se produce cada 11,6 años.

Debido a su historia geológica, sus aguas son de bajo contenido mineral, con una conductividad media de 31,5 micro S/cm, respondiendo sus mayores iones a una relación bicarbonatada – cálcica. Su pH promedio es de 7,5, con un mínimo de 6,9 y un máximo, excepcional, de 8,1.

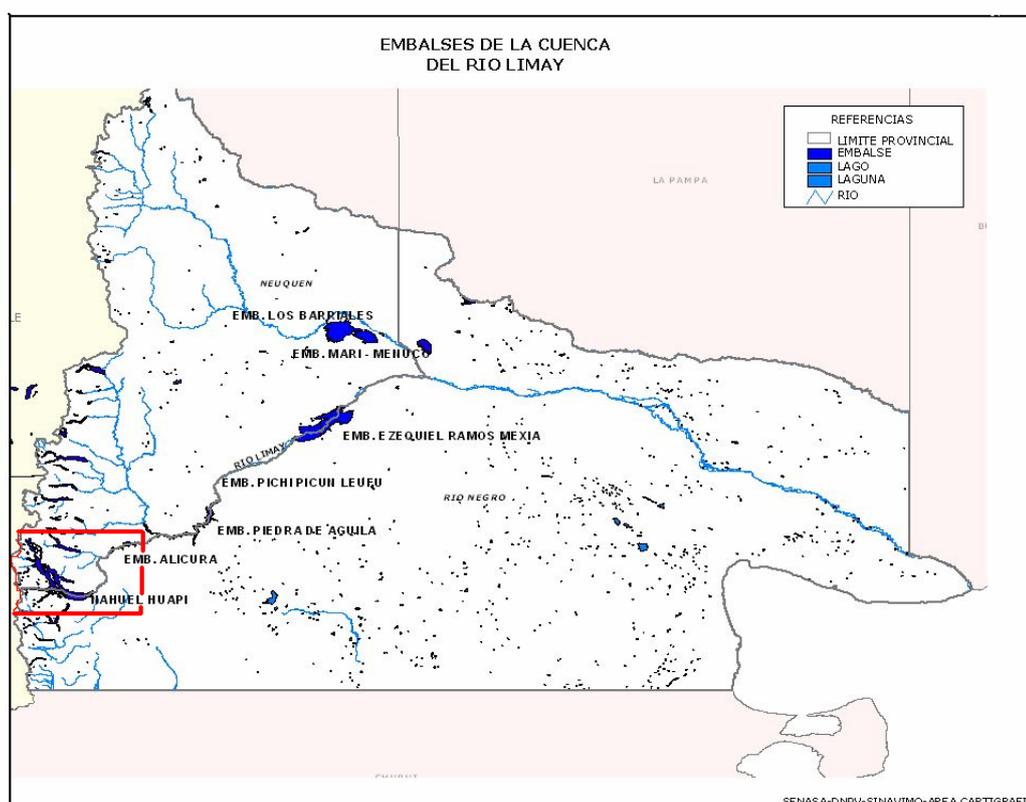
En esta área, las precipitaciones anuales se presentan con un marcado gradiente de Oeste a Este, alcanzando más de 2000 mm en el sector plenamente cordillerano y hasta unos 700 mm en el sector oriental hacia la meseta patagónica, en el denominado “ecotono bosque-estepa”. Las temperaturas anuales del agua, oscilan entre los 8° C en invierno y hasta los 15° C en verano. Desde el punto de vista de su limnología, se lo considera como un lago monomíctico cálido (su temperatura no desciende por debajo de los 4° C). Muestra circulación invernal y presenta estratificación térmica directa en verano; ubicándose la termoclina entre los 40-55 m de profundidad (Pedrozo et al., 1997). En todas las áreas monitoreas sobre base

anual, el Oxígeno Disuelto (OD) presentó concentraciones cercanas a la saturación en superficie y valores algo menores en profundidad (AIC-DPA, 2001-2002).

De este lago nace el río Limay que marca el límite entre ambas provincias (Neuquén y Río Negro). Al represarse el río en varios tramos, quedaron constituidos una serie de embalses con determinadas características según sus tiempos de maduración, prácticas de manejo y uso.

Los grandes embalses se denominan **ALICURA (único dentro de la zona libre), PIEDRA del AGUILA, PICHICUN LEUFU y EZEQUIEL RAMOS MEXÍA**. La finalidad fundamental de estos embalses es la producción de energía hidroeléctrica y como secundaria, la de regulación de los caudales para posibilitar el uso de tierras sujetas a la acción de los picos de crecientes de los ríos. Actualmente, diferentes empresas explotan las represas, siendo la cuenca del Limay sometida a la vigilancia medioambiental por la Autoridad Interjurisdiccional de Cuenca (AIC).

La construcción de los embalses actuales fue llevada a cabo por la empresa Hidronor S.A., de carácter mixto, que fuera posteriormente privatizada.



El primero en construirse fue el Chocón (1974) y el último, el de Pichi Picún Leufú (1999).

**Al ser la piscicultura en jaulas suspendidas, dentro de nuestro país de incipiente data, solamente el embalse de Alicura (con 18 años de haber sido construido) es el único de la serie que registra, actualmente, instalaciones de cultivos de muy diferente porte (desde 6 y hasta 700 TM de producción por productor) que producen en conjunto, un volumen aproximado de 1000 a 1200 tn en peces vivos, de la especie *Oncorhynchus mykiss* o trucha arco-iris. (Luchini, L., 2004).**

El río LIMAY próximo a su nacimiento en el paraje Rincón Chico, recibe desde el oeste al arroyo Newbery, el arroyo Chacabuco y por la margen derecha el arroyo La Fragua. En la zona denominada “el Anfiteatro” lo alcanza el arroyo del Corral. El río describe luego una curva hacia el este hasta la zona conocida como “Bajada de Mena”, sitio al que arriba el arroyo Carbón por margen izquierda y el arroyo Chacay por la derecha.

El río Limay continua hasta el lugar llamado Confluencia, donde desemboca el río TRAFUL, el cual nace de los aportes que origina el río Pichileufú en la cordillera y que escurre hasta el lago Trafal. A la salida del lago, el río Trafal recibe los aportes de los ríos Mineros, Cuyin Manzano, Arroyo Blanco y Córdoba. (Alvarez, M., 2004)

### EMBALSE ALICURA

El Embalse de Alicura es el primero de los cuatro localizados sobre el río Limay y el único incluido dentro de la zona libre, fue inaugurado en 1985. Su coronamiento se localiza en plena meseta patagónica (meseta de Alicurá), mientras que la zona correspondiente a la llamada “cola de embalse”, se encuentra situada en pleno ecotono, entre la estepa y el bosque andino-patagónico, donde desemboca el río Trafal (Confluencia) proveniente del lago homónimo. El clima de la zona donde se encuentra el mayor porcentaje del espejo de agua, es de carácter semiárido. Las precipitaciones medias anuales alcanzan a 500 mm. Las temperaturas en enero muestran un promedio de 18° C, mientras que en julio oscilan cercanas a los 4°C (Alvarez, 2004) Dista 100 km. de la ciudad de San Carlos de Bariloche aproximadamente a los 40°35'S 70°45'O, y está ubicado a 705 msnm.

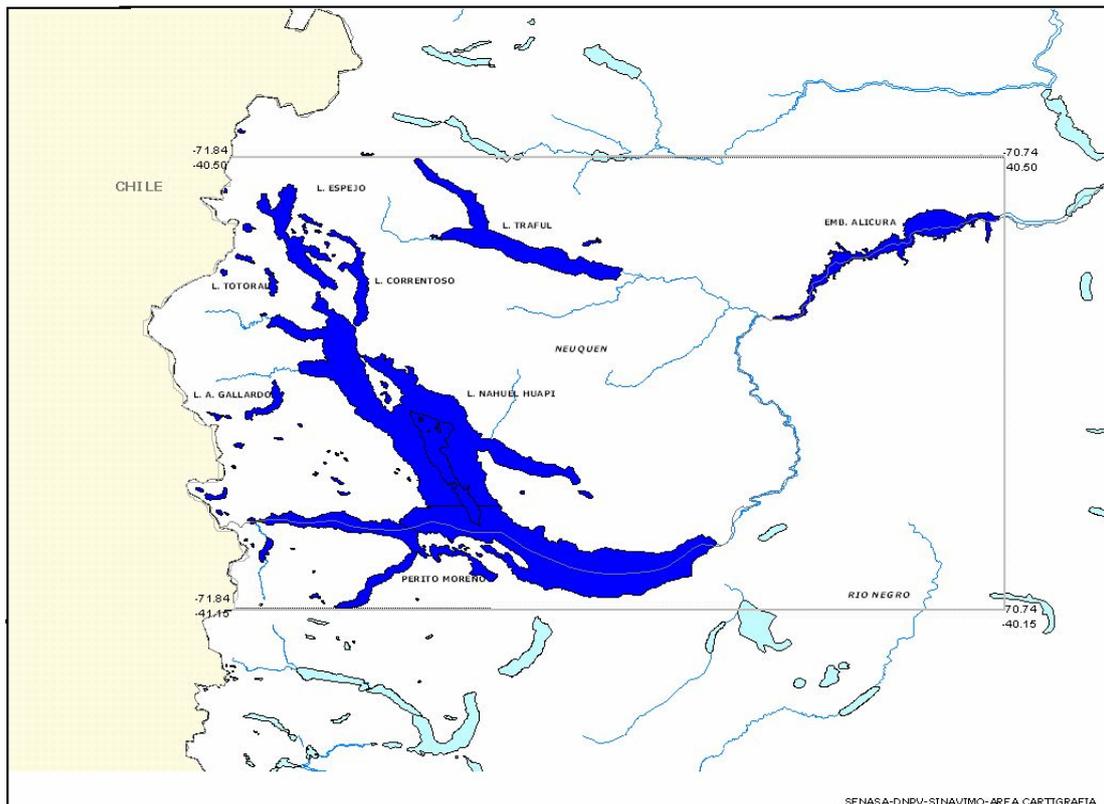
Por sus características limnológicas es considerado un lago Oligotrófico u oligomesotrófico (Dir. Rec. Hídricos, 1995; Alonso, 2003; Diaz, et al 2007).

La ubicación y características generales del embalse son las siguientes:

Parámetro	Valor
<b>Latitud</b>	<b>40°40'S</b>
<b>Longitud</b>	<b>71°00 'W</b>
<b>Altitud</b>	<b>705 msnm</b>
<b>Área km<sup>2</sup></b>	<b>65</b>
<b>Volumen Km<sup>3</sup></b>	<b>3.27</b>
<b>Z media (m)</b>	<b>48.3</b>
<b>Cota max (msnm)</b>	<b>705</b>
<b>Variación max nivel (m)</b>	<b>13</b>
<b>Area ep %</b>	<b>17.6</b>
<b>Tw año</b>	<b>0.36</b>
<b>r (año-1)</b>	<b>2.8</b>
<b>Lo (km)</b>	<b>183</b>
<b>Z max (m)</b>	<b>115</b>

**Z media:** profundidad media, **Tw:** Tiempo de residencia, **r:** Tasa de renovación, **Z max:** profundidad máxima (Fte: AIC, Alvarez 2004)

MAPA DE LA ZONA LIBRE (en azul oscuro se muestra delimitada la parte de la cuenca que se declara libre y en gris se marca el límite terrestre)



**La zona libre se encuentra comprendida por la Cuenca Alta del Río Limay y el Embalse Alicura, actuando como barrera física la represa de Alicura.**

### 3.4. POBLACIÓN SILVESTRE DE LA REGIÓN PATAGÓNICA

La comunidad de peces en la Patagonia continental se caracteriza por tener una muy baja riqueza específica autóctona, que incluye especies de distintos orígenes tales como el neotropical, circumpolar y un grupo importante de endemismo (Arratia et al 1983). Las especies autóctonas presentes en la región se encuentran representadas por siete Ordenes, diez Familias y un total de veintiún especies. A principio del año 1900 hubo una fuerte política de introducción de salmónidos provenientes de Estados Unidos de Norteamérica e Inglaterra impulsada por el gobierno nacional, en zonas consideradas con valor para la pesca deportiva.

La trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), introducida, ha sido la que se ambientó y diseminó con mayor éxito en gran parte de los ambientes acuáticos del territorio argentino, Ha contribuido en un alto porcentaje al turismo relacionado a la pesca deportiva, especialmente en los lagos cordilleranos patagónicos, junto a otras especies como la *Salmo trutta* o “trucha marrón”, la *Salvelinus fontinalis* o “trucha de arroyo” y el salmón *Salmo salar*. A diferencia del norte patagónico, en el sur de la provincia de Santa Cruz y en Tierra del Fuego, la especie que mejor se adaptó fue la trucha marrón que en parte es residente y en parte, migrante al mar. (Luchini, L., 2004)

Dentro de las cuencas descritas anteriormente, además de las especies exóticas enumeradas, existen especies autóctonas, como las percas: la criolla *Percichthys trucha* y *P. vinciguerrai*, la perca bocona (*P. colhuapiensis*); puyen pequeño (*Galaxias maculatus*), el pejerrey patagónico (*Odontheisthis hatcheri*), el bagre otuno y el bagre del torrente (*Diplomystes viedmensis* y *Hatcheria macraei*, respectivamente).

## **4. ACTIVIDAD ACUÍCOLA EN LA ZONA**

### **4.1. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUÍCOLA DE LA ZONA**

La acuicultura comercial de orden semi-industrial, es de muy reciente inicio en Argentina, tanto en aguas continentales templado-frías, como en aguas cálido-templadas y marinas. La rama de la "piscicultura de aguas frías" (específicamente referida al cultivo de trucha arco-iris) que es la más antigua, posee su mayor expresión en la amplia región nordpatagónica. A nivel artesanal, los cultivos se iniciaron aproximadamente, entre las décadas del '70 al '80 y a partir de la apertura de los embalses situados en dicha región (circa 1992) se incrementó la producción con el advenimiento de producciones generadas en jaulas flotantes, ya que estos cuerpos de agua presentan características ambientales ideales para un desarrollo intensivo, pudiendo aumentarse el volumen de los cultivos en peces Salmónidos y de hecho, su factibilidad de exportación con producto de excelente calidad.(Luchini, L., 2004)

A partir de 1990, se instalaron en el Embalse de Alicurá las primeras jaulas flotantes para el cultivo intensivo de la trucha arco-iris, debido a las características favorables del ambiente para esta actividad (del Valle, 1996). Actualmente, la producción de trucha arco iris por cultivo, abarca once concesiones otorgadas, ocho de las cuales se encuentran en producción, con un volumen total estimado de 1000 ton a 1200 ton anuales promedio (Dirección de Acuicultura, 2009). Estos emprendimientos se encuentran localizados sobre la margen izquierda del embalse (margen de Neuquén), dado el acceso directo por la ruta nacional N° 237, por lo que responden a las normativas para acuicultura a la provincia del Neuquén. En el Embalse se realiza la fase de pre-engorde y engorde final de los animales en los 8 establecimientos de cultivo.

La capacidad de producción sólo de este embalse, fue estimada en forma conservadora en alrededor de 3500 a 5000 tn/año (Wicki y Luchini, 1996). Actualmente, se encuentra en revisión.

Las hatcheries que proveen alevines a estos establecimientos de engorde se encuentran distribuidas en su mayoría en la región nordpatagónica. Estas hatcheries iniciaron su producción de alevines a partir de reproductores capturados en la zona bajo estudio. Por su parte, las ovas importadas se mantienen bajo cuarentena en establecimientos de ubicación extrazonal, a más de 1000km de distancia (ver importación y cuarentena).

### **4.2. REGISTROS DE ESTABLECIMIENTOS ACUÍCOLAS**

#### **4.2.1. RENSPA**

A través de la Resolución SENASA N° 417/97 se crea el Registro Nacional Sanitario de Productores Agropecuarios (RENSPA) en el ámbito de la Dirección Nacional de Sanidad Animal de SENASA, el cual es obligatorio para todos los productores pecuarios del país. Este registro incorpora datos del productor, características de la producción y ubicación geográfica del establecimiento, entre otros. De esta manera el servicio ubica al establecimiento y a los responsables de la sanidad de los mismos y fortalece a través de los datos, el control sanitario y epidemiológico así como los métodos de prevención y vigilancia diseñados por los programas sanitarios.

En la zona existen 8 establecimientos de engorde y 3 hatcheries que abastecen alevines los cuales se encuentran inscriptos a este registro, en las oficinas locales de

SENASA de la jurisdicción correspondiente. Además existen 8 hatcheries extrazona que abastecen alvinos a los establecimientos de engorde dentro de la zona libre, los cuales también se encuentran inscriptos en este registro.

#### 4.2.2. RENACUA

La Resolución N° 1314 del 2004 de la ex Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos crea el único Registro Nacional de Emprendimientos de Acuicultura en el ámbito de la Dirección de Acuicultura del actual Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. El mismo es de carácter obligatorio y en la resolución se establecen las normas que regulan la producción de organismos acuáticos vivos en los establecimientos/emprendimientos de acuicultura. Los 19 establecimientos descriptos anteriormente también se encuentran inscriptos en este registro. En el país el 70% de los productores de salmónidos se encuentran ubicados en la región patagónica.

Mapa satelital con los 8 establecimientos de engorde georeferenciados.



### 4.3. CONTROL DE DESPLAZAMIENTOS

Para poder movilizar animales vivos desde una hatchery a establecimientos de engorde, éstos deben estar acompañados de los siguientes documentos:

- El Documento de Tránsito de Animales (DTA) que es extendido por las oficinas del SENASA, se encuentra reglamentado por la Resolución SENASA N° 848/98.
- La Guía de Traslado extendida por la autoridad competente de cada provincia, previa presentación del DTA.
- Certificado de lavado y desinfección del transporte expedido en los lavaderos habilitados por el SENASA

El entorno de controles se complementa con un registro de camiones habilitados para el transporte de animales de acuerdo a lo establecido en la Resolución SENASA N° 97/99, y una forma de identificación que se efectúa por lote en la hatchery de procedencia.

Además de esos requisitos, todo movimiento de animales hacia la zona libre debe ir acompañado de un Certificado sanitario, otorgado por la oficina local de origen de SENASA, en relación a las enfermedades de notificación obligatoria. Por este motivo se muestrean animales de los establecimientos y se les realiza análisis por PCR en el laboratorio oficial de SENASA.

Como acción de policía sanitaria se realizan controles e inspecciones en puntos estratégicos

- Control de la documentación.
- Control de la identificación, categoría, especie, etc.

Los controles y fiscalización los efectúa también el SENASA, por aplicación de la Resolución SENASA N° 178/2001 de control de tránsito.

Cualquier animal que transite sin el DTA correspondiente, es sometido a sacrificio sanitario en forma inmediata, de acuerdo a las reglamentaciones vigentes.

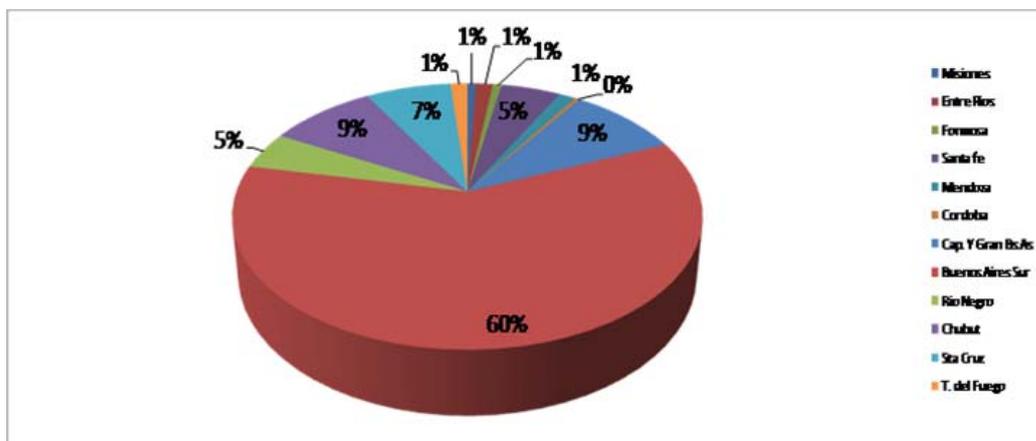
Arribados los animales a su lugar de destino el productor debe denunciar el ingreso con el DTA correspondiente en la oficina local de destino dentro de las 48hs.

### 4.4. INDUSTRIA

En el país existen 284 plantas frigoríficas para procesamiento de pescado proveniente de la pesca continental y marítima, los cuales pueden ser utilizados para procesamientos de pescado provenientes de la acuicultura. Las mismas cuentan con una habilitación otorgada por la Coordinación Temática de Fiscalización Agroalimentaria correspondiente, siguiendo las indicaciones de la Decreto N° 4238/1968 Capítulos 23 y 31. Además deben contar con habilitación provincial y municipal.

A través de la Resolución SENASA N° 685/2005 de la Dirección Nacional de Fiscalización Agroalimentaria, se establecen auditorías sobre estas plantas.

Gráfico de porcentaje de frigoríficos de productos de la pesca por provincia (República Argentina)



Actualmente solo cinco plantas frigoríficas procesan los animales provenientes de la zona monitoreada, estas son:

- Ahumados Patagónicos: Habilitación N° 4370
- Manila: Habilitación N° 4413
- Establecimiento Los Lagos: Habilitación N° 4618
- Río Manso: Habilitación N° 2878
- Harengus S.A.: Habilitación N° 2265

Las primeras cuatro plantas faenadoras se encuentran en la provincia de Río Negro y la última en la provincia de Chubut.

En la siguiente tabla se detalla la cantidad de kilos de pescado enviados a faena a los establecimientos enumerados anteriormente durante los años 2007, 2008 y 2009 desde los establecimientos de la zona libre.

**Año 2007 - Ingresos de Materia Prima Rubro XLVI A**

E. Of.	Establecimiento	Total	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
		<b>1.470.715</b>	136.457	121.455	146.215	86.590	127.382	99.028	118.224	122.722	116.328	153.766	141.205	101.344
4370	Ahumados Patagónicos	1.065.903	88.731	82.865	97.223	65.053	86.131	71.685	91.267	97.385	91.192	116.309	107.058	71.004
2878	Río Manso SA	404.812	47.726	38.590	48.992	21.537	41.251	27.343	26.957	25.337	25.136	37.457	34.147	30.340

**Año 2008 - Ingresos de Materia Prima Rubro XLVI A**

E. Of.	Establecimiento	Total	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
		<b>1.164.775</b>	112.404	129.677	114.303	111.648	97.179	82.173	66.234	58.566	96.644	109.120	107.995	78.832
4370	Ahumados Patagónicos	896.169	68.133	104.239	92.873	84.624	80.859	65.416	57.978	41.659	72.468	85.024	86.049	56.847
2878	Río Manso SA	268.606	44.271	25.438	21.430	27.024	16.320	16.757	8.256	16.907	24.176	24.096	21.946	21.985

**Año 2009 - Ingresos de Materia Prima Rubro XLVI A**

E. Of.	Establecimiento	Total	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
		<b>1.223.114</b>	131.468	118.222	145.788	119.371	121.216	105.649	76.674	95.975	76.076	72.169	70.891	89.615
4370	Ahumados Patagónicos	787.828	104.424	78.967	102.479	103.080	90.561	83.127	60.183	80.046	38.945	10.474	19.545	15.997
4618	Los Lagos SA	209.533				6.519	30.655	22.522	16.491	15.929	19.531	29.849	31.601	36.436
2878	Río Manso SA	119.380	27.044	39.255	43.309	9.772								
4413	Manila SA	106.373									17.600	31.846	19.745	37.182

Ref: E. Of: Establecimiento Oficial

(Fuente: Centro Regional Patagonia Norte, Coordinación Temática de Fiscalización Agroalimentaria, Supervisión Bariloche)

Estas plantas son supervisadas por veterinarios de SENASA pertenecientes a la Coordinación Temática de Fiscalización Agroalimentaria de la Regional Patagonia Norte y Sur, los cuales participaron en los cursos de capacitación de patologías de salmónidos, y son quienes inspeccionan los animales al ingreso de la planta, por lo que son una fuente importante de notificación en la vigilancia epidemiológica de las enfermedades de declaración obligatoria.

## **5. CAPACITACIÓN**

### Programas de Capacitación e Información a la Comunidad

La capacitación es uno de los ejes estratégicos del SENASA. Una Comisión Asesora de Capacitación integrada por referentes de cada una de las direcciones del organismo, por consejeros gremiales y por la Coordinación Técnica de Capacitación del SENASA elaboró el Plan Institucional de Capacitación que se desarrolla en el centro de capacitación del SENASA. Además, en el año 2006, SENASA y el INTA crearon el Centro Buenos Aires para la Capacitación de los Servicios Veterinarios (CEBASEV), el cual fue recientemente reconocido como centro colaborador de la OIE para la capacitación de los Servicios Veterinarios de habla hispana.

El plan de Capacitación se desarrolla permanentemente a través, de cursos, charlas y talleres, que mantienen actualizado el conocimiento, dan entrenamiento y sensibilizan a los agentes de SENASA vinculados a la actividad.

En línea directa con la Presidencia del SENASA la Unidad de Información y Comunicación Institucional realiza las actividades de prensa, relaciones públicas e institucionales, publicidad, comunicaciones internas, administración de los contenidos de la página web y centro de documentación. Esta Coordinación gestiona una política de comunicación y difusión por distintos medios acerca de las actividades de los programas de control, prevención y erradicación de las enfermedades animales.

Su accionar incluye el asesoramiento y apoyo a los Veterinarios Locales para que a ese nivel se logre una comunicación homogénea y efectiva con los productores agropecuarios y público en general.

Especialmente en acuicultura, se han realizado distintos cursos de entrenamiento para profesionales y de capacitación para productores por parte de la Dirección de Luchas Sanitarias, Dirección de Laboratorio y Control Técnico del SENASA junto a la Dirección de Acuicultura del Ministerio-MINAGRI:

- Curso de Histopatología y PCR: Total 5 días, del 17 al 21 de septiembre del 2006 en la Dirección de Laboratorio y Control Técnico de SENASA. Asistieron al mismo 12 profesionales del SENASA, 2 del INIDEP (Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero), 2 de la Provincia de Neuquén y 1 de la Provincia de Río Negro.
- Curso práctico histopatología, dictado por profesionales de la Dirección de Acuicultura y del INIDEP. Total 4 días del 6 al 9 de Febrero del 2007 en el INIDEP Mar del Plata. Asistieron al mismo 3 profesionales del área de patología de la DILACOT- SENASA y 1 del CEAN de Neuquén.
- Capacitación continua en PCR por profesionales de la Dirección de Acuicultura, a los profesionales del DILACOT. Asistió en tres oportunidades para su capacitación una profesional del INIDEP para las siete enfermedades; y un técnico del CEAN asistió a una pasantía de una semana en el DILACOT para entrenamiento en Diagnóstico Molecular de ISA, SRS e IPN
- Capacitación continua en histopatología a los profesionales del Departamento de Patología de la DILACOT y un técnico del CEAN quién asistió en dos oportunidades por profesionales de la Dirección de Acuicultura.
- Seminario sobre Aspectos Sanitarios en producción de salmónidos en el año 2007 en el Centro Regional Universitario Bariloche organizado en forma conjunta con el Consejo Federal de Inversiones (CFI). Participaron un total de

70 personas. Se trataron temas que abarcaron la ejecución del Plan Sanitario, aspectos clínicos de las enfermedades bajo estudio, técnicas de histopatología, biología molecular y manejo sanitario de los cultivos; además de los aspectos legales brindadas por las provincias.

- Curso para Inspectores Sanitarios Acuícolas, ofrecido en Diciembre del 2008, organizado en forma conjunta con el CFI en el Centro Regional Universitario Bariloche. Participaron un total de 46 personas que incluyo a productores, profesionales y técnicos en acuicultura, agentes del SENASA y agentes provinciales. A través de una evaluación, se acreditaron un total de 30 técnicos autorizados como inspectores honorarios.
- Curso de Vigilancia Epidemiológica: organizado por el CEBASEV. Total de días 5, del 24 al 28 de Noviembre de 2008 en la Dirección de Laboratorios del SENASA. Participó y aprobó el curso un agente del Programa de Enfermedades de los Animales Acuáticos.
- Taller de Discusión sobre Buenas Prácticas en producción de Trucha Arco Iris, 19 de Abril de 2010, Centro Regional Universitario Bariloche. Participaron 60 personas. Se elaboró una Guía de Buenas Prácticas en producción de Trucha Arco Iris a través de la contratación de un consultor externo por el Programa de Apoyo y Fortalecimiento Institucional de Senasa-UE (PAFIS). En el Taller se presentó esta Guía a los productores, técnicos, agentes provinciales y agentes de Senasa.

Se entrego material de consulta durante los eventos, como manual de Aspectos Sanitarios del Cultivo de Salmónidos (Bariloche, 2007) Manual para la recolección de Muestras y procedimientos para Laboratorio en el diagnóstico de Enfermedades de peces (Bariloche, 2008) y Manual para Inspectores Sanitarios Acuícolas (Bariloche, 2008) y la Guía de Buenas Prácticas en producción de Trucha Arco Iris (Bariloche, 2010).

En los siguientes sitios web se puede encontrar parte de la información sobre las actividades: [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar) en el área de capacitación y en [www.minagri.gov.ar](http://www.minagri.gov.ar) en la página de Acuicultura.

## **6. SISTEMA DE VIGILANCIA**

### **6.1. ANTECEDENTES SANITARIOS**

El estado sanitario de los peces silvestres y los de cultivo del embalse de Alicurá, a partir del momento de la instalación de los primeros criaderos in situ y hasta el momento del inicio del relevamiento sanitario por parte de organismos nacionales, se conocía gracias a los informes referidos a los estudios de investigación llevados a cabo por el Laboratorio de Ictiopatología de la misma Universidad Nacional del Comahue (Centro Regional Universitario Bariloche - CRUB) o bien, por el Laboratorio de Patología del Centro de Ecología Aplicada del Neuquén - CEAN; durante los cuales no se registraron episodios sanitarios en peces Salmónidos provenientes de los establecimientos, en su mayoría a través de visitas periódicas de inspección efectuadas o bien, estudiados a partir de solicitudes de los mismos acuicultores asentados en dicho embalse.

El CEAN, que depende de la Autoridad de Aplicación de la provincia del Neuquén, es el encargado de vigilar y regular a su vez la producción de acuicultura de los embalses en Neuquén, mediante la Ley Provincial de Acuicultura (N° 1996) y sus disposiciones reglamentarias. Además de realizar visitas de inspección trimestrales a los establecimientos, el CEAN efectuó numerosos análisis referidos a las condiciones sanitarias (microbiológicos y virales) de los stocks de peces bajo cultivo. En las primeras investigaciones realizadas por este Centro en 1990, fueron detectadas solo la “enfermedad bacteriana de las branquias”, ataques por hongos y trastornos nutricionales; estas últimas debidas a la ausencia inicial de alimento adecuado a nivel comercial. A partir de 1991, la provincia normó sobre la introducción de huevos, que debían obligatoriamente provenir de padres certificados como exentos de VHS, IHN, IPN, BKD y del myxozoo *Myxobolus cerebralis*. En 1995, el personal del CEAN, efectuó una serie de inspecciones sobre trucha arco-iris (silvestre y de cultivo) y salmón del Atlántico, así como trucha marrón y de arroyo, de origen silvestre, empleando células CHSE-214 para detección de virus IHN, IPN y virus de herpes en Salmónidos, siendo los resultados **NEGATIVOS** en el sur de la provincia del Neuquén y el noroeste de la provincia de Río Negro, zona que abarcó en sus investigaciones preliminares. Las pruebas virales se efectuaron sobre peces juveniles y adultos y sobre partidas de huevos que debían ser liberados en la región. Las inspecciones abarcaron cultivos en tierra y en jaulas, todos ellos abastecidos por agua de diferentes ríos de la zona o del embalse de Alicurá. (Luchini, L., 2004).

### **6.2. IMPORTACIÓN Y CUARENTENA**

La normativa que rige para las importaciones de animales vivos y material reproductivo es la Resolución ex –Senasa N° 1354/94.

Las importaciones de ovas de salmónidos se realizan principalmente desde los Estados Unidos. Previo a la aprobación de la importación se realiza un estudio de la hatchery interesada en realizar la exportación de esas ovas a nuestro país. A través de la normativa vigente el país de origen debe certificar al establecimiento como “libre” para aquellas enfermedades estudiadas en nuestro país y son motivo del presente informe; asimismo, entre otras medidas, se solicita la desinfección de las ovas por algún método recomendado a nivel internacional.

En la siguiente tabla se detalla cantidad de ovas importadas por año desde 2005 a 2009 y origen:

<b>AÑO</b>	<b>CANTIDAD DE OVAS</b>	<b>ORIGEN</b>
2005	215.000	Irlanda/ U.S.A
2006	260.000	U.S.A
2007	2.450.000	U.S.A
2008	800.000	U.S.A
2009	735.000	Dinamarca

Actualmente, una vez que llegan las ovas a nuestro país, se realiza una inspección física y su correspondencia con la certificación de origen. Si supera favorablemente esa instancia, el personal oficial sella el contenedor de la mercancía e informa al veterinario oficial con jurisdicción en la zona a la que será destinada la mercancía y emite el Permiso de desembarque y el Permiso de Tránsito Restringido para el traslado de la misma, hasta el establecimiento de cuarentena. Actualmente los establecimientos de cuarentena se encuentran ubicados extrazona a más de 1000km de distancia de la zona bajo estudio.

Una vez en el predio de cuarentena se realiza un muestreo sobre las ovas para ser analizadas por PCR en el laboratorio central de SENASA (ensayo no estandarizado internacionalmente) y previo a la liberación de la cuarentena se analizan los alevinos, ambos análisis para ratificar la ausencia de infección de las patologías estudiadas. Se muestrearon todos los lotes de importación, los cuales se analizan por las técnicas de Histopatología y PCR para las 7 (siete) enfermedades estudiadas en nuestro país.

Aquellos que no superen satisfactoriamente las pruebas sanitarias a que fueran sometidos durante el período cuarentenario, no serán autorizados a moverse a cualquier destino dentro del País. En estos casos, se cita al interesado para la firma de las actas correspondientes, otorgándosele en la misma un plazo perentorio, que no podrá ser mayor de ocho (8) días corridos, para proceder a la reexportación del o de los animales.

Vencido dicho plazo, y sin necesidad de nuevo aviso, el SENASA podrá proceder al sacrificio sanitario.

Cabe señalar que hasta el momento no se han detectado ninguna de las enfermedades mencionadas en los lotes importados.

### 6.3. SISTEMA DE VIGILANCIA

El sistema de vigilancia que se implementa en relación a las enfermedades de los animales acuáticos se basa tanto en actividades de vigilancia pasiva como activa. Dentro de la vigilancia pasiva, se incluye la denuncia de casos compatibles con enfermedades de notificación obligatoria por parte de productores, profesionales o toda persona relacionada con la tenencia o cuidado de animales en cautiverio o así como la ciudadanía en general en los casos de animales silvestres.

En el caso de la vigilancia activa, las acciones más relevantes consisten en los muestreos llevados a cabo para la demostración de la ausencia de las enfermedades de denuncia obligatoria en la zona en estudio.

Otras fuentes de información incluyen: inspecciones a los establecimientos productores e importadores, inspecciones en plantas de faena, estudios de investigación llevados a cabo por otras instituciones, etc.

#### 6.4. SISTEMA DE NOTIFICACIÓN DE ENFERMEDADES

La obligatoriedad de la notificación de enfermedades de importancia para los animales, exóticas y endémicas incluidas las zoonosis, está enmarcada en la Ley 3959 de Policía Sanitaria, y actualizada periódicamente por el Servicio Oficial.

A través de la Resolución SENASA N° 422/2003, se establece la adecuación a la normativa internacional vigente sobre los sistemas de notificación de enfermedades animales, de vigilancia epidemiológica y seguimiento epidemiológico continuo, así como análisis de riesgo; a la vez que actualiza la lista de enfermedades de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.

La norma establece que cada propietario o persona encargada de cuidar o asistir animales que tengan síntomas de alguna de las enfermedades listadas, tiene la obligación de comunicarlo al Servicio Oficial. Éste a su vez, tomará las medidas sanitarias que correspondan y efectuará las comunicaciones pertinentes.

El veterinario oficial interviniente confecciona un protocolo de enfermedad denunciado en el que detalla todos los aspectos relacionados con la explotación afectada y los animales presentes en la misma. A su vez, en caso de ser necesario, toma muestras para diagnóstico y las envía al laboratorio de referencia nacional, de acuerdo a la especie y enfermedad que se trate.

Si se confirma el caso, el protocolo elaborado luego de la intervención es enviado desde las oficinas locales al nivel Central (Dirección Nacional de Sanidad Animal), quien es el encargado de hacer las comunicaciones nacionales e internacionales que correspondan de acuerdo a la enfermedad detectada.

En el caso de acuicultura, como fuente primaria de información y notificación de enfermedades se encuentran los productores, profesionales ligados a la actividad, Inspectores Sanitarios Acuícolas, Laboratorios, Plantas Frigoríficas, etc.

#### 6.5. PAPEL DE LOS PRODUCTORES Y DE OTROS GRUPOS IMPORTANTES EN LA VIGILANCIA.

##### 6.5.1. Asociación de productores

Existe conformada con inscripción en trámite, una Asociación de Productores de Salmónidos (PROSALMON), sin fines de lucro, creada en el año 2005.

Los fines de la misma son:

a) Promover, fomentar, mejorar y desarrollar todo lo relacionado con la investigación, estudio y aplicación práctica de la acuicultura;

- b) Para cumplir el fin precedente, asociar a los profesionales que estén interesados en el objeto de la asociación y a quienes desarrollen actividades que los relacionen con esta disciplina ;
- c) Realizar actividades de orden científico y extensión universitaria tendientes al objeto mencionado en el inciso "a" del presente estatuto;
- d) Reunir y destinar fondos a dichos propósitos;
- e) Establecer relaciones e intercambio cultural y científico con otras entidades afines nacionales y extranjeras;
- f) Mantener relaciones con las autoridades científicas y técnicas nacionales, provinciales, municipales y universitarias.
- g) Gestionar el apoyo de las autoridades Nacionales, Provinciales, Municipales o Universitarias para la consecución de los fines;
- h) Reunir, adquirir y obtener instrumentos destinados a sus fines específicos;
- i) Contratar y emplear personal profesional, técnico o administrativo.

Tanto los productores como los técnicos acuícolas han participado de los cursos dictados por SENASA y fueron capacitados para la detección de las principales patologías de los salmónidos, por lo que se encuentran preparados para realizar denuncias ante eventos sanitarios, toma de muestras y aparición de signos clínicos de algunas de las enfermedades de notificación obligatoria.

Otros organismos tales como Guardapesca y Asociación de Pescadores Deportivos han sido comunicados para la eventual notificación de signos clínicos relacionados con las enfermedades estudiadas, colaborando de esta manera con la vigilancia Epidemiológica.

#### 6.5.2. Organismos Nacionales y Provinciales intervinientes en el sistema de vigilancia

A nivel nacional la Dirección de Acuicultura del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, trabaja en conjunto con el SENASA desde al año 2006 a través de un Acuerdo de Cooperación Técnica donde en una primer acta se definieron pautas de trabajo conjunto, estableciendo en una primera etapa el diseño y ejecución del Relevamiento Sanitario de Salmónidos en el Embalse Alicura. Dicho relevamiento tuvo como objetivo lograr la caracterización sanitaria del Embalse, en relación a las principales enfermedades ictícolas de mayor impacto económico y productivo.

La Dirección de Acuicultura tiene entre sus funciones el seguimiento del RENACUA, que es el Registro Nacional de Acuicultura, en el cual deben inscribirse todos los productores a nivel Nacional. El mismo es de carácter obligatorio y a través de la Resolución 1314/2004, se indica cuales son los requisitos para su inscripción.

A nivel provincial, Neuquén y Río Negro participan activamente en la normatización y control de la actividad. A través de sus instituciones provinciales, el Centro de Ecología Aplicada de Neuquén (CEAN) y la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas (AIC) y la Dirección de Pesca de la Provincia de Río Negro, llevan a cabo controles sobre calidad del agua y aspectos sanitarios de los peces de cultivo, entre otros.

Las provincias otorgan las concesiones para cultivo en el embalse a los emprendimientos acuícolas y realiza controles sobre calidad del agua, capacidad de carga y control bacteriano y parasitario de los peces bajo cultivo.

Las normativas de las provincias de la zona regulan tanto la actividad de producción de ovas y alevines (*hatchery*) como el engorde. Las leyes provinciales que regulan la actividad son las siguientes:

- Ley N° 1.996 de Acuicultura, Decreto Reglamentario N° 1.548/93 y Disposiciones Reglamentarias. Provincia del Neuquén.
- Ley N° 1.875 (T. O. Ley N° 2.267) de Medio Ambiente y Decreto Reglamentario N° 2.267/99. Provincia del Neuquén.
- Ley N° 899 Código de Aguas y Decreto Reglamentario 790/99. Provincia del Neuquén.
- Ley N° 2829 de Acuicultura, Decreto 751 y Resolución 671. Provincia de Río Negro.
- Ley N° 3266 de Procedimiento de Evaluación de Impacto Ambiental. Provincia de Río Negro.
- Ley N° 2391. Régimen de Control de Calidad y Protección de los Recursos Hídricos Provinciales. Provincia de Río Negro.

Las instituciones provinciales junto con el SENASA y la Dirección de Acuicultura de la Nación, han desarrollado las actividades de muestreo de peces y fueron capacitados para el acondicionamiento de muestras para envío al laboratorio del Senasa.

### 6.5.3. Inspectores Sanitarios Acuícolas

Para complementar los alcances en los controles de la administración veterinaria en la República Argentina y debido a las características particulares de la actividad, fue necesario dar participación en las tareas de inspección sanitaria de las pisciculturas, a técnicos e idóneos especializados y con experiencia en producción piscícola.

La figura técnica denominada Inspector Sanitario Acuícola (ISAc) fue creada a partir de la necesidad de incrementar las actividades para intensificar los controles sanitarios de los establecimientos de producción ictíca y la vigilancia epidemiológica. La acreditación otorgada por Senasa, es un aval del Organismo ante la idoneidad técnica del Inspector determinada mediante sucesivos encuentros teóricos y prácticos.

Los Inspectores Sanitarios Acuícolas están autorizados a realizar las siguientes tareas:

- a) Inspección Sanitaria General de los establecimientos de producción.
- b) Asesoramiento sanitario y de buenas prácticas al productor respetando las Normas Técnicas establecidas.
- c) Actualización y suscripción de los registros sanitarios de los establecimientos.
- d) Recolección y acondicionamiento de muestras con validez oficial en los establecimientos de cría de salmónidos registrados.
- e) Concurrir inmediatamente a cualquier establecimiento dentro de la zona ante el conocimiento de novedades sanitarias y colaboración con la autoridad sanitaria nacional en la inspección oficial de establecimientos ante denuncias o sospecha de enfermedades y en otras actividades surgidas de las necesidades del momento.

Actualmente hay acreditados 30 (treinta) Inspectores Sanitarios Acuícolas

## 6.6. VIGILANCIA ACTIVA

### 6.6.1. Relevamiento sanitario de Salmónidos

En base a las recomendaciones de la Sección 2. 1. Capítulo I. 1. de Enfermedades de los peces y cumpliendo con el Capítulo 1.1.4 del Manual de Pruebas de Diagnóstico de Animales Acuáticos 2006 y el Capítulo 1.4, Artículo 1.4.6 punto 3 del Código Sanitario para los Animales Acuáticos 2009, se diseñó la vigilancia sobre los salmónidos de la zona bajo estudio.

La Resolución SENASA N° 21/2001 crea el Programa de Enfermedades de los Animales Acuáticos en el ámbito de la Dirección de Luchas Sanitarias de la Dirección Nacional de Sanidad Animal, estableciendo acciones sanitarias para todos los animales acuáticos y en cuya etapa inicial se establecieron acciones para determinar la existencia o no de enfermedades ícticas de importancia en la acuicultura de salmónidos.

Para dar cumplimiento a este objetivo se llevó a cabo un relevamiento sanitario de salmónidos en la zona descrita anteriormente, para la determinación del estatus sanitario del mismo, respecto de enfermedades que afectan a estas especies.

Ante el desconocimiento de la situación sanitaria de la zona, se diseñó un sistema de monitoreo continuo durante dos años (Noviembre 2006 a Diciembre 2008), realizando muestreos cada tres meses abarcando las cuatro estaciones del año. Actualmente se mantiene una vigilancia activa con un muestreo anual.

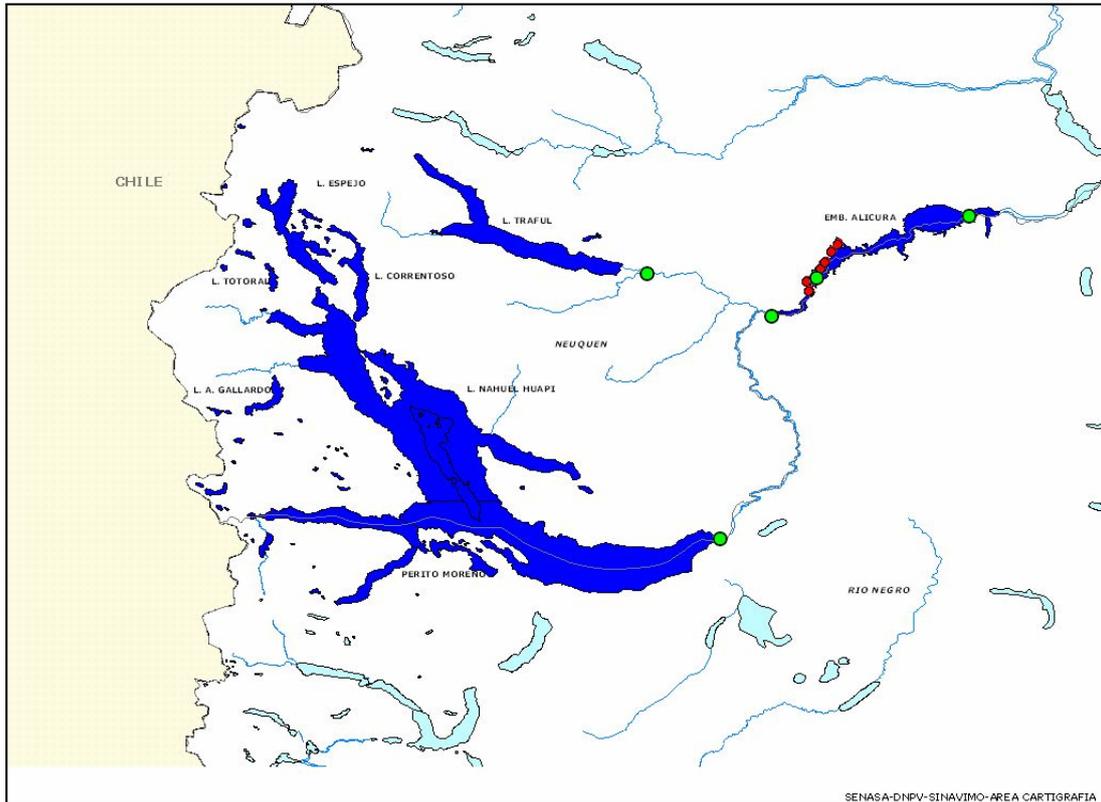
A los fines de calcular el tamaño de la muestra se tomaron en cuenta los siguientes supuestos: Asegurar con un 95% de confianza que es posible detectar al menos un individuo positivo si la prevalencia esperada es igual o inferior al 2% para cada una de las enfermedades. Se muestrearon 150 animales por campaña entre animales silvestres y de cultivo. (Manual de diagnóstico para los animales acuáticos 2006)

La zona bajo vigilancia fue descrita anteriormente.

Dentro de la zona se seleccionó el embalse Alicura y sus principales afluentes, los ríos Limay y Traful para la toma de muestras de los peces.

Debido a la cercanía de los establecimientos y al hecho de que comparten un mismo cuerpo de agua, se tomó la población como homogénea dividiendo en partes iguales las muestras de animales de cultivo y animales silvestres.

Se muestrearon los ocho establecimientos que se encuentran actualmente en producción dentro del embalse Alicura y se establecieron 5 (cinco) puntos de muestreo para animales silvestres. Para esto se definieron 3 (tres) puntos dentro del embalse cabecera (Las Coloradas), medio (Malal Huaca) y Cola del Embalse y 2 (dos) por fuera del mismo, uno sobre el río Limay y otro sobre el río Traful.



Ref: los puntos en rojo corresponden a los establecimientos de cultivo y los puntos verdes corresponden a los puntos de muestreo silvestres

Esta elección se debió a la importancia productiva que presenta el embalse, con una producción que actualmente alcanza aproximadamente las 1200 tn de truchas arco iris, por lo que la densidad de peces en este embalse es mayor que en el resto de la zona bajo estudio. Así mismo los ríos Limay y Traful se toman como representativos de la población de peces silvestres susceptibles de los ambientes acuáticos, ya que existen migraciones de estos animales río abajo, por lo que los eventos sanitarios que sucedan en los lagos y sus afluentes, deberían ser detectados en estos puntos.

La captura de los ejemplares silvestres fue realizada por personal de la autoridad de aplicación de las provincias de Río Negro y Neuquén, y de la Autoridad Interjurisdiccional de Cuencas, utilizando como artes de pesca la modalidad de spinning, trolling y flycast, en algunos casos, por lo cual el número de animales silvestres muestreado por campaña varía del indicado según el diseño. En cuanto a los animales de cultivo, la captura fue realizada por personal de SENASA, dejando constancia de la misma en los establecimientos con actas de toma de muestras.

**Para complementar la vigilancia epidemiológica de la zona se incluyeron en el muestreo a las hatcheries (intra y extrazona) proveedoras de alevinos al embalse de alicurá para su engorde final.**

## 6.6.1.1. TOMA DE MUESTRAS Y ENVÍO AL LABORATORIO

### 6.6.1.1.1. Anatomopatología: procedimientos y toma de muestras

- Al momento de la toma de la muestra los peces se encuentran vivos y se los sacrifica con dosis anestésicas letales de Benzocaína en polvo, diluida en sol. sobresaturada con Acetona o Alcohol 96°.
- Una vez muerto el animal se procede al pesaje y toma de medidas de LT (largo total) y LS (largo estándar).
- Se realiza una inspección externa del animal y se registra en el protocolo de toma de muestra.
- Luego se procede a la necropsia del mismo, posicionando al pez en decúbito dorsal y practicando una incisión desde delante del ano hasta delante de la aleta pectoral siguiendo la línea media del abdomen, y otro corte en forma semicircular hacia lateral y dorsal del pez que una los mismos puntos de la incisión anterior; exponiendo, de este modo, todos los órganos abdominales del animal y permitiendo la visualización e inspección de los mismos in situ. En el caso de ser alevinos se muestrearan enteros, pudiéndose realizar un corte pequeño en zona abdominal para favorecer la penetración del fijador.
- En forma rutinaria se colectan muestras de lo siguientes órganos: Bazo, Hígado, Pronefros, Metanefros, Corazón. También se muestrean otros órganos o tejido en caso de visualizarse alguna alteración macroscópica.

### 6.6.1.1.2. Procedimiento de toma de muestras para Histopatología

Para el diagnóstico histopatológico se utilizan órganos conservados en formol al 20% bufferado. Los recipientes utilizados pueden ser plásticos o de vidrio y son de boca ancha y cierre hermético (para evitar derrames), con tapa a rosca o a presión pero para esto se coloca cinta adhesiva entorno a la unión tapa recipiente. Una vez muestreados todos los peces, todos los frascos son colocados en cajas de telgopor cerradas y rotuladas adecuadamente para su envío al laboratorio central del Dilab.

En el caso de trozos muy pequeños (biopsias) se utilizan tubos de ensayo con tapón de goma. Las muestras procedentes de un mismo animal o necropsia se contienen en un mismo frasco. Excepto que requieran una individualización especial.

### 6.6.1.1.3. Procedimiento de toma de muestra para PCR

En el mismo momento de la toma de muestras para histopatología, se procede a tomar muestras para PCR, de: Bazo, Hígado, Pronefros, Corazón, tomando las medidas de asepsia y esterilidad (limpieza con alcohol y flameado de instrumental) necesarias para minimizar las contaminaciones. Los trozos de órganos son colocados en crioviales (1 por cada órgano) debidamente rotulados y luego colocados en varillas metálicas (1 por animal), para finalmente ser colocados en termos con Nitrógeno Líquido, los que son transportados hasta el laboratorio de análisis en el DILAB. Una vez en el laboratorio las muestras son almacenadas en un Freezer de  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el análisis de PCR.

### 6.6.1.2. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de Laboratorio de las enfermedades de Salmónidos estudiadas se realiza en el país en el Laboratorio Central de SENASA –Laboratorio Nacional de Referencia (LNR); sito en la Localidad de Martínez, Provincia de Bs.As, único Laboratorio autorizado actualmente. El laboratorio cuenta con instalaciones adecuadas para el diagnóstico de enfermedades por las técnicas de Histopatología y PCR convencional y PCR Real Time.

El LNR está acreditado en su gestión bajo la Norma ISO 17025 (el alcance de esta norma no cubre los ensayos para la realización del presente estudio).

Se cuenta con un Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 Agricultura (NBS3A), que cumple con los requisitos de Bioseguridad de la O.I.E, el mismo puede ser utilizado ante la eventual detección de alguna enfermedad exótica.

#### 6.6.1.2.1. Tipo de pruebas realizadas

Para determinación del estatus sanitario de la zona se seleccionaron métodos de diagnóstico aplicados en serie: Histopatología (como prueba tamiz) y PCR, Inmunohistoquímica y Secuenciación (como confirmatorios).

Durante los 2 primeros años (nov. 2006 a Dic. 2008) se realizó el análisis histopatológico de todas las muestras y se analizaron por PCR aquellos ejemplares que presentaban lesiones macroscópicas y/o microscópicas compatibles con una enfermedad infecciosa. De no hallarse alteraciones, se seleccionaron 10 ejemplares de cultivo y 10 ejemplares silvestres al azar en cada muestreo, para PCR.

Para el muestreo 2009 Histopatología y PCR se aplicaron en paralelo para todas las muestras. Inmunohistoquímica y Secuenciación (como confirmatorios).

##### 6.6.1.2.1.1. Métodos de análisis histopatológico

- Las muestras fijadas en Formol Bufferado al 20 % durante 3 a 5 días como mínimo, son separadas del fijador, cortadas en trozos de 0,5 a 1,5 cm, colocadas en canastillas plásticas (cassetes) identificados con el número de muestra y pez.
- Los cassetes con las muestras de tejidos son colocados en una máquina procesadora automática de tejidos, programable, la que 24 horas después entrega las muestras deshidratadas e incluidas en parafina.
- Se confeccionan los tacos, utilizando los mismos cassetes ya identificados.
- Los tacos con las muestras de tejidos se cortan en micrótopo rotatorio a 1 micra de espesor (los alevinos se procesan enteros y se cortan a 2,5 micras)
- Los cortes son fijados a los portaobjetos y luego coloreados por la técnica de rutina de Hematoxilina y Eosina, montados con bálsamo sintético.
- Todos los cortes son examinados al microscopio de luz transmitida y las lecturas registradas en las planillas de trabajo confeccionadas ad-hoc con la identificación del n° de muestra, n° de pez, lugar de origen del pez, tejidos examinados, etc, de tal forma que se mantenga la trazabilidad de los análisis y poder correlacionar estos con los análisis por Biología Molecular.

- Todos los resultados son registrados en el sistema informático de mesa de entrada de muestras e informados a la DNSA-Programa de Enfermedades de los Animales Acuáticos.

#### 6.6.1.2.1.2. Diagnóstico molecular por PCR

##### Extracción de Ácidos Nucleicos ADN y ARN de tejidos de órganos blanco:

##### Extracción de ADN:

Para la extracción de ADN genómico total de los tejidos a analizar en las determinaciones de BKD, SRS, y EHNV: se procedió de acuerdo al protocolo de purificación, usando el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen), el kit Wizard SV Genomic DNA purification system (Promega), o el kit Purelink Genomic DNA purification Kit (Invitrogen), según las recomendaciones del manual de diagnóstico de organismos acuáticos de la OIE 2006 y el NWFHS USA laboratory procedures manual 3.1 edition, Marzo 2006.

##### Extracción de ARN:

Para la extracción de ARN en las determinaciones de IPN, ISA, IHN, VHS, se procedió de acuerdo al protocolo de purificación de ARN total de tejidos animales usando el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), o SV Total RNA Isolation System (Promega). Según las recomendaciones del manual de diagnóstico de organismos acuáticos de la OIE 2006.

En cada muestreo 2006-2008 se procedió de la siguiente manera para la extracción de ácidos nucleicos:

Se procesaron, 40 extracciones de ADN de 2 órganos, bazo y pronefros, procedentes de 20 especímenes previamente estudiados por el tamizaje histopatológico + 10 % de Ctls Negativos (2 extracciones de bazo y 2 de pronefros de animales libres de patógenos certificados).

60 extracciones de ARN de 3 órganos, bazo, pronefros, y corazón, procedentes de 20 especímenes previamente estudiados por el tamizaje histopatológico + 10 % de Ctls Negativos (2 extracciones de bazo y 2 de pronefros de animales libres de patógenos certificados).

Durante la campaña de vigilancia sanitaria realizada en el 2009 se extrajeron los ácidos nucleicos de los tejidos de los órganos blanco en pools de tres individuos muestreados. Procesando en paralelo al análisis histopatológico los órganos blanco de los 171 individuos muestreados.

Se procesaron, 57 extracciones de ADN (pools de 3 pronefros, 171 individuos totales) + 10 % de Ctls Negativos (pronefros de animales libres de patógenos certificados).

114 extracciones de ARN (pools de 3 pronefros, pools de 3 corazones, 171 individuos totales) + 10% Ctls Negativos (órganos de pronefros y corazón de animales libres de patógenos certificados).

##### Controles de extracción e inhibición:

Las extracciones de ADN total y ARN total de los órganos blanco (target), son controladas para determinar la integridad del ácido nucleico purificado, verificar si es amplificable y poder detectar posibles inhibiciones que pudiesen alterar las reacciones diagnósticas posteriores. En los dos primeros años de monitoreo, cada extracción de ADN y ARN procedentes de órganos blanco de 20 individuos previamente estudiados por el tamizaje histopatológico fue controlada.

Durante la campaña de vigilancia sanitaria realizada en el 2009 se controlaron todas las extracciones de los tejidos de los órganos blanco (pronefros y corazón) en pools, provenientes de tres individuos muestreados.

En el caso de las extracciones de ADN total, estas fueron verificadas a través un control genómico de amplificación del gen constitutivo conservado de *Salmo salar* 5S rADN que contiene repeticiones en tándem. Primers 5S-1 forward 5' TAC-GCC-CGA-TCT-CGT-CCG-ATC 3' y reverse 5S-2 5' CAG-GCT-GGT-ATG-GCC-GTA-AGC 3', (14) dichos primers generan según la especie diferentes fragmentos de amplificación. En el caso de *Oncorhynchus mykiss* los fragmentos son de 294 bp y 350 bp, en el caso de *Salmo salar* 256bp y 525bp. La presencia de dichas bandas en el resultado, es indicativo que las muestras son aptas para ser procesadas por las PCR diagnósticas. Las muestras que no presenten este patrón son descartadas y se procede a una nueva purificación, para eliminar cualquier inhibición.

Cada muestra de RNA total extraída fue verificada mediante una reacción de RT-PCR con primers conservados del ARN mensajero del gen  $\beta$  Actina de *Salmo salar*. A saber:  $\beta$  Actina forward 5'-CAG CCC TCC TTC CTC GGT AT-3 y  $\beta$  Actina reverse 5'-GAT GTC CAC GTC ACA CTT CAT GAT-3 cuyo amplicón es de 80 bp.(2) La presencia de dicha banda en el resultado es indicativo que las muestras son aptas para ser procesadas por las RT-PCR diagnósticas; las muestras que no presenten este patrón son descartadas y se procede a una nueva purificación, para eliminar cualquier inhibición.

En cada muestreo 2006-2008 se controlaron las extracciones de ADN:

40 extracciones de ADN total provenientes de 20 bazos, 20 pronefros. 20 individuos totales. A través de 40 determinaciones de PCR Ctl genómicos 5S rADN (Protocolo Go Taq polimerasa, Promega).

Extracciones de de ARN:

60 extracciones de ARN total, provenientes de 20 bazos, 20 pronefros, 20 corazones. 20 individuos totales. A través de 60 determinaciones de RT-PCR de ARNm de  $\beta$  Actina, (Se utilizó el esquema general del protocolo del kit Access one step RT-PCR System, Promega Corp).

En el 2009 se controlaron las extracciones de ADN de la siguiente manera:

57 extracciones de pronefros en pools de 3. (171 individuos totales). Mediante 57 reacciones de PCR 5S rADN, como controles de amplificación de ADN genómico total. (Protocolo Go Taq polimerasa, Promega).

ARN: 114 extracciones de ARN total provenientes de 57 pronefros y 57 corazones en pools de 3. (171 individuos totales). Mediante 114 determinaciones de RT-PCR de ARNm de  $\beta$  Actina, (Se utilizó el esquema general del protocolo del kit Access one step RT-PCR System, Promega Corp).

Todas las extracciones de ADN y ARN que se controlaron y resultaron aptas, fueron analizadas mediante las técnicas de PCR diagnósticas de las enfermedades estudiadas.

#### **Técnicas moleculares aplicadas (Nested PCR, PCR, RT-PCR):**

En la aplicación de los métodos moleculares se siguieron las recomendaciones sugeridas por los protocolos establecidos por la OIE con las siguientes modificaciones.

Nested PCR o PCR anidada en la detección de SRS *Piscirickettsia salmonis* y BKD *Renibacterium salmoninarum* (Protocolo Go Taq polimerasa, Promega).

PCR en la detección del Virus de la Necrosis Hematopoyética Epizootica (EHNV) (Protocolo Go Taq polimerasa, Promega).

Reacción de RT-PCR en un paso para la detección de IPNV, IHNV, ISAV, VHSV (Se utilizó el esquema general del protocolo del kit Access one step RT-PCR System, Promega Corp).

### **Criterios de aceptación e interpretación de resultados de PCR:**

#### Análisis de los resultados:

Los productos de amplificación de cada determinación de PCR, RT-PCR se analizaron en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio. Posteriormente el gel es transiluminado con luz ultravioleta para visualizar las bandas de amplificación específicas.

#### Aceptación e interpretación de resultados de PCR:

No se deben observar bandas específicas en los controles negativos de SPF ni en el blanco de reacción. Por otra parte deben detectarse las bandas específicas correspondientes a los controles positivos de la reacción. Si se cumplen todas estas condiciones se considera que el ensayo se ha efectuado correctamente.

La detección de una banda correspondiente al producto de la amplificación del agente etiológico estudiado, cumpliendo con los criterios anteriormente mencionados, son confirmatorios de la presencia de las secuencias específicas del mismo y se considera el resultado como POSITIVO.

La falta de detección de estas bandas específicas en un ensayo efectuado correctamente es considerada como NEGATIVO.

En caso de detección positiva se confirma por repetición de la misma muestra y nueva extracción de la muestra de tejido original en conservación. Además se analiza el caso con primers, o iniciadores confirmatorios accesorios.

En los casos de SRS y EHN se confirma asimismo por análisis de restricción REA (Restriction endonuclease analysis). En todos los casos de detección se confirma identidad por secuenciación molecular y análisis de las secuencias obtenidas a través de métodos bioinformáticos (alineación de secuencias, BLAST).

#### CONTROLES UTILIZADOS:

##### Controles positivos:

Los controles positivos para las determinaciones de PCR de las enfermedades que se encuentran bajo estudio, fueron solicitados por DILAB SENASA a los centros de referencia internacionales OIE, publicados en el manual de diagnóstico de organismos acuáticos OIE 2006 (anexo I). En el caso de la patología IPN que no figura en el capítulo 1.2.3. del código acuático OIE, los controles se obtuvieron del laboratorio CEFAS (Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science, UK,) del Dr. Dixon y de un laboratorio local productor de vacunas. Con respecto a SRS que representa el mismo caso; los controles fueron provistos por el mismo laboratorio local. Todos los controles obtenidos fueron conservados a -80°C.

##### Controles negativos:

Los controles negativos se obtuvieron de peces SPF (specific pathogens free) libres de patógenos certificados, (anexo I) de las especies *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*, utilizando la misma metodología anteriormente descrita para la toma de muestras de

los individuos a estudiar. Los órganos de los peces SPF extraídos se conservaron a -80° C.

### **Selección de Iniciadores o Primers diagnósticos:**

Los primers o iniciadores utilizados en todas las enfermedades a monitorear salvo para el IPN, se seleccionaron de las secuencias publicadas en el manual de diagnóstico de organismos acuáticos de la OIE 2006.

Los iniciadores para IPN se seleccionaron según Williams, K. Et al y Blake, S.L. et al.(3 & 15).

### **Enfermedades producidas por bacterias:**

#### **Bacterial Kidney disease (BKD) enfermedad bacteriana del riñón:**

Agente etiológico: (*Renibacterium salmoninarum*).

Dos pares de primers se utilizan en un protocolo de reacción de PCR anidada o nested PCR, los mismos amplifican la secuencia publicada de la proteína p57 de *R. salmoninarum* (4 & 5). Primer round forward 75-93 5'-AGCTTC-GCA-AGG-TGA-AGG-G-3'; P3 y reverse 438-458 5'-GCA-ACA-GGT-TTA-TTT-GCC-GGG-3'; M21. Segundo round de amplificación: forward 95-119 5'-ATT-CTT-CCA-CTT-CAA-CAG-TACAAG-G-3', P4 y reverse 394-415 5'-CAT-TAT-CGT-TACACC-CGA-AAC-C-3'; M38. El producto de amplificación con los primers del segundo round es de 320 bp (pares de base).

#### **SRS (Salmon Rickettsial Syndrome/Septicaemia),**

#### **Piscirickettsiosis, o Síndrome/Septicemia, rickettsial del salmón:**

Agente etiológico: (*Piscirickettsia salmonis*).

Se utiliza una reacción de nested pcr para detectar el ADN genómico de *P. salmonis*, (12) por medio de la amplificación del gen conservado 16S rADN de Eubacterias, durante el primer round, y los primers específicos de *P. salmonis* en el segundo round. Primer round; EubA (1518R) 5'-AAG-GAG-GTG-ATC-CAN-CCR-CA-3' y EubB (27F) 5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3'. Los específicos de *P. salmonis* 2do round tienen la siguientes secuencias: PS2S (223F) y PS2AS (690R): 5'-CTA-GGAGAT-GAG-CCC-GCG-TTG-3' y 5'-GCTAC-CCTGAA-ATT-CCA-CTT-3', respectivamente que generan un producto de amplificación de 476 bp (pares de base).

Para confirmar la detección, los productos de amplificación del primer round se pueden analizar por restricción (REA) con *EcoRI* y *Pst1* para identificar la cepa de *P. salmonis*. Primers confirmatorios complementarios: Recomendados por Marshall S., Heath S., Henriquez V. & Orrego C.(11)

### **Enfermedades producidas por virus:**

#### **Epizootic haematopoietic necrosis (EHN) Necrosis hematopoyetica epizoótica:**

Agente etiológico: (EHNV) (Fam: *Iridoviridae* gen: *Ranavirus* ADN doble cadena).

La detección del Virus (EHNV) se realizó mediante el uso de la técnica de PCR directa. Se utilizaron dos juegos de primers específicos para la proteína mayor del cápside (MCP) de EHNV: MCP1 M151 forward 5'-AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA-3', y M152 reverse 5'-CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT-3' y un segundo juego de primers MCP2 M153 forward 5'-ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC-3' y M154 reverse 5'-CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG-3'. Los productos de amplificación son 321 bp y 625 bp respectivamente. Estos productos de amplificación se pueden seguir analizando por REA (restriction endonuclease analysis) con diferentes enzimas de restricción (*PfM I*, *Hinc II*, *Acc I*, *Fnu4H I*.) para diferenciar los subtipos de EHNV (10).

**Infectious haematopoietic necrosis (IHN) Necrosis hematopoyética infecciosa:**

Agente etiológico: (IHNV) (Fam: *Rhabdoviridae* gen: *Novirhabdovirus* ARN simple cadena). En la detección del virus (IHNV) se utilizó la técnica de RT-PCR (transcripción reversa -PCR) en un paso (one step) en un primer round y una PCR convencional con primers internos para el segundo round. Ambos primers son específicos de la nucleoproteína de IHNV y conservados para la mayoría de los aislamientos del virus (16). El par de primers del primer round son: forward 5'-TCA-AGG-GGG-GAG-TCC-TCG-A-3' y reverse 5'-CAC-CGT-ACT-TTG-CTG-CTA-C-3'; que generan un producto de amplificación de 786 bp. Los primers del segundo round de amplificación son: forward 5'-TTC-GCA-GAT-CCC-AAC-AAC-AA-3'; y reverse 5'-GCG-CAC-AGT-GCC-TTG-GCT-3'; cuyo producto de amplificación es de 323 bp.

Durante el 2009 se incorporan al diagnóstico por RT-PCR los nuevos primers sugeridos en la nueva edición del manual de diagnóstico de organismos acuáticos de la OIE 2009 recomendados Dr J.R. Winton dirigidos a la región mid de la glicoproteína de IHNV que comprende todos los subtipos conocidos.

Los primers confirmatorios complementarios son IHN3 & IHN4 según: Williams, K., Blake, A., Sweeney, A. (15).

**Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) Septicemia hemorrágica viral:**

Agente etiológico: (VHSV) (Fam: *Rhabdoviridae* gen: *Novirhabdovirus* ARN simple cadena). Para identificar específicamente el Virus (VHSV) se utilizó la técnica de RT-PCR (Transcripción reversa - PCR) en un paso. Utilizando un juego de primers conservados para la nucleoproteína de VHSV (16) forward 5'-GGG-GAC-CCC-AGA-CTG-T-3' y reverse 5'-TCT-CTG-TCA-CCT-TGA-TCC-3' el amplicón producto es de 811 bp. Primers confirmatorios complementarios: VHS3 & VHS4 según Williams, K., Blake, A., Sweeney, A.(15).

**Infectious pancreatic necrosis (IPN) Necrosis pancreática infecciosa:**

Agente etiológico: (IPNV) (Fam: *Birnaviridae* gen: *Aquabirnavirus* ARN doble cadena frag.). Los primers WB1 y WB2 específicos de birnavirus acuáticos (15) se utilizaron para la detección del virus IPNV a través de la técnica de RT-PCR one step. Los primers WB1, forward 5'CCG-CAA-CTT-ACT-TGA-GAT-CCA-TTA-TGC3' y reverse WB2 5' CGT-CTG-GTT-CAG-ATT-CCA-CCT-GTA-GTG3'reconocen un fragmento de cADN de 206 bp de gen VP2 que se mantienen conservados entre los 9 serotipos del grupo A.

Primers confirmatorios complementarios: PrD1 & PrD2 según Blake, S.L., Schill, W.B., Mcallister, P.E., Lee, M-K, Singer, J.T. y Nicholson, B.L.(3).

**Infectious salmon anaemia (ISA) Anemia infecciosa del salmón:**

Agente etiológico: (ISAV) (Fam: *Orthomyxoviridae* gen: *Isavirus* ARN simple cadena frag.). En el caso de la detección del Virus (ISAV) varios sets de primers son recomendados por la OIE; en este diagnóstico se seleccionó el juego de primers ILA1 forward 5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C3' & ILA 2 5'- GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3'que amplifican una región del segmento 8 del virus generando un amplicón de 155 bp (13) y como primers confirmatorios un set de primers diseñados por el laboratorio de referencia de OIE Seg 6U forward 5'GGA-ATC-TAC-AAG-GTC-TGC-ATT-G-3'& Seg 6L reverse 5'CTT-CAA-AGG-TGT-CTG-ACA-CGT-A-3'que amplifican una región del segmento 6, cuyo producto de amplificación es de 130 bp.

Primers confirmatorios complementarios: FA-3 & RA-3 según Devold M., Krossoy B., Aspehaug V. & Nylund A. (7).

### 6.6.1.3. RESULTADOS

El relevamiento sanitario de Salmónidos comenzó en el mes de Octubre de 2006 y finalizó en Octubre de 2008.

Se muestrearon los ocho establecimientos que se encuentran actualmente en producción dentro del Embalse Alicura y se establecieron 5 (cinco) puntos de muestreo para animales silvestres. Para esto se definieron 3 (tres) puntos dentro del embalse cabecera (Las Coloradas), medio (Malal Huaca) y Cola del Embalse y 2 (dos) por fuera del mismo, uno sobre el río Limay y otro sobre el río Traful.

#### RESUMEN DE MUESTRAS POR AÑO

	CAMPAÑA	Estación	MUESTRAS TOTAL	MUESTRAS CULTIVO	MUESTRAS SILVESTRES
AÑO I	Oct-06	verano	173	82	91
	Mar-07	otoño	151	86	65
	Jun-07	Invierno	153	87	66
	Sep-07	primavera	153	83	70
			<b>630</b>		
AÑO II	Dic-07	verano	150	75	75
	Mar-08	otoño	151	83	68
	Jul-08	invierno	159	80	79
	Oct-08	primavera	159	84	75
			<b>619</b>		

Se analizaron un total de **1249** individuos durante los dos años de muestreos.

En el primer año se realizaron 4 campañas analizándose un total de 630 ejemplares correspondiendo 338 a establecimientos de cultivo y 292 a las obtenidas por captura de animales silvestres y durante el segundo año se realizaron otras 4 campañas analizándose un total de 619 ejemplares, correspondiendo 322 a las obtenidas en los establecimientos de cultivo y 297 a captura de animales silvestres.

En cada muestreo se capturaron como mínimo 150 animales.

Detalle de cantidad de animales muestreados por especie en cada campaña:

Muestreo	Fecha	N° Total Muestrado	Tai* Pisciculturas	Tai* Silvestres	Marrón * Silvestres	Ss* Silvestres
1°	Oct-06	173	82	85	6	
2°	Mar-07	151	86	56	9	-
3°	Jun-07	153	87	53	12	1
4°	Sep-07	153	83	66	4	-
5°	Dic-07	150	75	71	4	-
6°	Mar-08	151	83	61	5	2
7°	Jul-08	159	80	69	10	-
8°	Oct-08	159	84	71	4	-
<b>Totales</b>	-	<b>1249</b>	<b>660</b>	<b>532</b>	<b>54</b>	<b>3</b>

**Referencias:** \*Tai: Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) \*Marrón: Trucha marrón (*Salmo trutta*) \*Ss: Salmon encerrado (*Salmo salar* var. sebago).

Sobre el muestreo se indica que:

1. De cada muestreo se realizó el análisis histopatológico de TODAS las muestras y se analizaron por PCR aquellos ejemplares que presentaban lesiones macro o microscópicas compatibles con enfermedad infecciosa, de no hallarse alteraciones específicas, se seleccionan 10 ejemplares de cultivo y 10 ejemplares silvestres al azar.
2. El análisis histopatológico de los dos primeros muestreos se efectuaron en el INIDEP, el resto en la DILAB.
3. A partir del tercer muestreo se incorporó al diagnóstico la determinación de ISAV muestreándose además el corazón de cada individuo.

#### 6.6.1.3.1. Resultados del Laboratorio:

##### **I- Análisis anatomopatológicos sobre muestras de 2006-2008**

Sobre los 1249 individuos analizados por examen macroscópico y microscópico (histopatología) se observaron las siguientes lesiones expresadas en la siguiente tabla:

**Tabla de lesiones anatomopatológicas observadas**

<b>Tipo de lesión observada</b>	<b>cantidad</b>	<b>Tasa %</b>	<b>Observaciones</b>
Reacción fibrosa de mesotelio	1	0,08	
Necrosis focal hepática	17	1,36	
Infiltrado inflamatorio periductal	5	0,12	
Degeneración grasa de hepatocitos	5	0,12	
Engrosamiento capsula hepática	2	0,16	
Fibrosis hepática peri focal	11	0,88	
Nódulos regenerativos de parénquima hepático	3	0,24	
Focos de linfohematopoyesis con megaloblastia	1	0,08	
Hiperplasia capsulara esplénica	37	2,96	
Congestión esplénica	5	0,12	
Fibrosis esplénica	23	4,24	
Hemorragias focales esplénicas	6	0,48	
Pliegue de la capsula esplénica	1	0,08	
Hiperplasia capsular de pronefros	2	0,16	
Infiltrado inflamatorio en grasa peri renal	1	0,08	
Congestión y hemorragias focales en pronefros	6	0,48	
Formaciones basófilas esféricas pequeñas en pronefros	1	0,08	
Proliferación eosinófila peri vascular y células con estructuras basófilas en pronefros	4	0,32	
Aumento de melanomacrófagos en pronefros	1	0,08	
Material hialino en capsula de Bowman en metanefros	1	0,08	
Quistes parasitarios (Eimeria) en metanefros	1	0,08	
Mixosporidium en glomérulo renal en metanefro	1	0,08	
Infiltrado de eosinófilos en túbulos del metanefro	4	0,32	
Aumento de melanomacrófagos en metanefros	1	0,08	

Depósitos de calcio en vías túbulos y lesión granulomatosa proliferativa en el intersticio del metanefro	1	0,08	Sospecha de BKD, que resultó Negativo a PCR
Granuloma focal intersticial en matanefro	1	0,08	
Deposito de calcio en túbulos renales de metanefro	1	0,08	
Edema pericárdico	2	0,16	
Exudado pericárdico con infiltración linfoidea	1	0,08	
Miocarditis focal con infiltración linfoidea crónica	5	0,12	
Congestión de vasos coronarios	1	0,08	
Pericarditis	6	0,48	
Hemorragia pericárdica	4	0,32	
Necrosis focal de miocardio	1	0,08	
Infiltración linfoidea difusa	5		
Parásitos en miocardio	1	0,08	<i>Diphylobotrium ssp</i>
Branquias con hiperplasia de laminillas primarias y secundarias con metaplasia escamosa y mucinosa sectorial.	1	0,08	Caso 172504
Hiperplasia distal de laminillas primarias y secundarias, en branquias,	3	0,24	
Parásitos macroscópicos en Bazo e Hígado	2	0,16	<i>Diphylobotrium ssp</i>
Fibrosis focal en músculo esquelético	1	0,08	
Enteritis necrótica en intestino delgado	1	0,08	
Piel con lesiones fúngicas	1	0,08	Saproliniasis

### Conclusión:

En 1249 peces analizados por anatomopatología no se observaron lesiones específicas o compatibles con ninguna de las enfermedades denunciadas para la OIE. Solamente se observó un caso con lesiones microscópicas sospechosas de BKD, la cual se descartó por los análisis mediante las técnicas moleculares descritas.

## **II- Resultados de análisis por Técnicas moleculares sobre muestras de 2006-2008**

A continuación se presentan las tablas que resumen las cantidades de muestras procesadas por análisis moleculares y sus correspondientes resultados, discriminados por enfermedad, agente etiológico investigado, órganos procesados y resultados obtenidos:

**Tabla N° 1**

Pruebas Diagnosticas de PCR sobre Bacterias y Virus ADN								
Enfermedad	SRS		BKD		EHN		N°TOTAL	RESULTADOS
Agente Etiologico	<i>P.Salmonis</i>		<i>R. Salmoninarum</i>		EHNV		Determinaciones	
Organos ext.ADN	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	por muestreo	
Muestreo								
1°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
2°	22	22	22	22	22	22	132	Negativo
3°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
4°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
5°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
6°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
7°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
8°	20	20	20	20	20	20	120	Negativo
<b>N°TOTAL</b>								
Determinaciones por enfermedad y organos blanco	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>972</b>	<b>Negativo</b>

**Tabla N° 2**

Pruebas Diagnosticas RT-PCR sobre Virus ARN											
Enfermedad	IHN		VHS		IPN		ISA			N°TOTAL	RESULTADOS
Agente Etiologico	IHNV		VHSV		IPNV		ISAV			Determinaciones	
Organos ext.ARN	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Corazon	por muestreo	
Muestreo											
1°	20	20	20	20	20	20	20	20		160	Negativo
2°	22	22	22	22	22	22	22	22		176	Negativo
3°	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180	Negativo
4°	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180	Negativo
5°	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180	Negativo
6°	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180	Negativo
7°	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180	Negativo
8°	20	20	20	20	20	20	20	20	20	180	Negativo
<b>N°TOTAL</b>											
Determinaciones por enfermedad y organos blanco	<b>162</b>	<b>120</b>	<b>1416</b>	<b>Negativo</b>							

Sobre lo expresado en las tablas se indica lo siguiente:

1. Se analizaron 7 enfermedades de declaración obligatoria e importancia epidemiológica según las recomendaciones de manual OIE, para SRS, BKD, EHN, IPN, IHN, VHS, e ISA\* Para cada diagnóstico se trabajo con tejido de los siguientes órganos; bazo, pronefros y además corazón (para los casos de ISAV) como material a procesar.
2. \*Se evaluaron los dos primeros muestreos para ISAV sobre contra muestras de bazo y pronefros conservadas a - 80°C.

Tabla N° 3

Controles de Extraccion de ADN y ARN sobre organos blanco						
Prueba de control	PCR 5S rADN 5S <i>Salmo salar</i>		RT- PCR ARNm gen $\beta$ Actina <i>Salmo salar</i>			N°TOTAL
Organos	Bazo	Pronefros	Bazo	Pronefros	Corazon	Controles por muestreo
Muestreo						
1°	20	20	20	20		80
2°	22	22	22	22		88
3°	20	20	20	20	20	100
4°	20	20	20	20	20	100
5°	20	20	20	20	20	100
6°	20	20	20	20	20	100
7°	20	20	20	20	20	100
8°	20	20	20	20	20	100
<b>N°TOTAL</b>						
<b>Controles</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>162</b>	<b>120</b>	<b>768</b>
<b>ADN, ARN por organo</b>						

Se indica que:

- En cada muestreo se controlaron: 60 determinaciones por RT-PCR mARN  $\beta$  Actina de *Salmo salar* como controles de extracción, de ARN total e inhibición, de bazo, pronefros, y corazón. Además de 40 determinaciones como controles genómicos de ADN total de 5S rADN, bazo y pronefros.

#### Resumen de los resultados por PCR durante 2006-2008:

Campaña de Muestreo	N° de individuos analizados por muestreo por PCR, RT-PCR	N° total de determinaciones diagnosticas sobre los órganos blanco por individuo PCR, y RT-PCR	N° de Controles por órganos blanco por individuo PCR, y RT-PCR (ADN=2organos, ARN3=órganos)	TOTAL de determinaciones	RESULTADOS
1°	20	280	80	360	Negativo
2°	22	308	88	396	Negativo
3°	20	300	100	400	Negativo
4°	20	300	100	400	Negativo
5°	20	300	100	400	Negativo
6°	20	300	100	400	Negativo
7°	20	300	100	400	Negativo
8°	20	300	100	400	Negativo
<b>TOTAL</b>	<b>162</b>	<b>2388</b>	<b>768</b>	<b>3156</b>	<b>-</b>

A través de las metodologías de amplificación molecular aplicadas, NO se han detectado las secuencias específicas de los agentes etiológicos responsables de las patologías estudiadas.

## 6.7. MANTENIMIENTO DEL ESTATUS

Habiendo cumplimentado las directrices del Capítulo 1.1.4 del Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 2006 para la demostración de ausencia de infección, y siguiendo las recomendaciones del punto 3 del mismo capítulo, durante el año 2009 se realizó un nuevo muestreo para mantenimiento del estatus.

El mismo se llevó a cabo en el mes de noviembre donde se muestrearon los 8 establecimientos de engorde presentes dentro del embalse y se muestrearon los 5 puntos de captura de animales silvestres, establecidos en los muestreos de los años anteriores.

El muestreo se diseñó con un 95% de nivel de confianza y un 2% de prevalencia para una población mayor a 100.000 animales, determinando un tamaño muestral de 170 individuos entre animales silvestres y de cultivo.

En esta ocasión se estableció una nueva estrategia de screening diagnóstico de las enfermedades de declaración obligatoria, e importancia epidemiológica, mediante las técnicas de biología molecular, con el objeto de abarcar a través de los diagnósticos de PCR y RT PCR todos los individuos muestreados durante la campaña de mantenimiento de la vigilancia. Se aplicó la metodología de pools de muestras; examinando los tejidos de los órganos blanco en pools de tres, agrupándolos en una sola muestra a testear y en paralelo el análisis histopatológico a cinco órganos de cada uno de los 1249 individuos muestreados.

Según la enfermedad a analizar, el tejido del órgano a procesar fue; pronefros (BKD, SRS, EHN, IHN, VHS, IPN) y corazón, pronefros (ISA). Ante la eventual detección de algún patógeno, agente etiológico, de las patologías estudiadas, se procede a abrir el pool y verificar individualmente las muestras, para identificar el o los individuos afectados. Una vez identificado el caso se continuará aplicando los mismos criterios de aceptación de resultados utilizados hasta ahora, para emitir un resultado confirmado.

### RESULTADOS Vigilancia 2009:

#### A- MUESTRAS COLECTADAS:

AÑO III	Total muestras	cultivo	Silvestres
2009	171	87	84

#### I- Resultados de anatomopatología aplicadas durante la vigilancia 2009

- Todos los peces que componían la muestra de la vigilancia se procesaron en paralelo por los análisis anatomopatológicos procesando los órganos blanco provenientes de los 171 individuos.
- **Resultados:** No se observaron lesiones compatibles o específicas de las enfermedades infecciosas denunciadas para la OIE

## II- Resultados Técnicas moleculares aplicadas durante la vigilancia 2009

Tabla N° 1

Pruebas Diagnosticas de PCR sobre Bacterias y Virus ADN					
Enfermedad	SRS	BKD	EHN	N°TOTAL Determinaciones	RESULTADOS
Agente Etiologico	<i>P.Salmonis</i>	<i>R. Salmoninarum</i>	EHNV		
Organos ext.ADN	Pronefros	Pronefros	Pronefros	171	Negativo
Muestreo 2009 Pooles de a 3	57	57	57		

Tabla N° 2

Pruebas Diagnosticas RT-PCR sobre Virus ARN										
Enfermedad	IHN		VHS		IPN		ISA		N°TOTAL Determinaciones por muestreo	RESULTADOS
Agente Etiologico	IHNV		VHSV		IPNV		ISAV			
Organos ext.ARN	Pronefros	Corazon	Pronefros	Corazon	Pronefros	Corazon	Pronefros	Corazon	456	Negativo
Muestreo 2009 Pooles de a 3	57	57	57	57	57	57	57	57		
N°TOTAL Determinaciones por enfermedad y organos blanco	114		114		114		114		456	Negativo

Sobre los resultados obtenidos se indica que:

- Durante la campaña de vigilancia sanitaria realizada en el 2009 se realizaron las pruebas diagnosticas de PCR, RT-PCR sobre las muestras de órganos blanco en pooles de a tres.

Tabla N°3

Controles de Extraccion de ADN y ARN sobre organos blanco					
Prueba de control	PCR 5S rADN <i>Salmo salar</i>	RT- PCR ARNm gen $\beta$ Actina <i>Salmo salar</i>			N°TOTAL Controles por muestreo
Organos	Pronefros	Pronefros	Corazon		
Muestreo 2009 Pooles de a 3	57	57	57		171
N°TOTAL Controles ADN, ARN por organo	57	114			

Sobre los resultados obtenidos se indica que:

- Se controlaron las extracciones de ADN de pronefros en pooles de a 3 mediante 57 reacciones de PCR 5S rADN, como controles de amplificación de ADN genómico total. 171 individuos totales. 114 extracciones de ARN total provenientes de 57 pronefros y 57 corazones en pooles de a 3 mediante 114 determinaciones de RT-PCR de ARNm de  $\beta$  Actina.

**A través de las metodologías de amplificación molecular aplicadas, NO se han detectado las secuencias específicas de los agentes etiológicos responsables de las patologías estudiadas.**

## 6.8. OTRAS ACTIVIDADES DE VIGILANCIA

### Control Sanitario previo a movimiento de alevinos

Se realizaron análisis en todas las hatcheries que abastecen alevinos a los establecimientos de engorde del embalse durante el período 2006-2009, estén estas dentro o fuera de la zona bajo vigilancia.

De cada establecimiento se tomaron 50 muestras de alevinos, de las cuales 25 se procesaron por histopatología y otras 25 se procesaron por las técnicas moleculares antes descritas.

Se analizaron por cada establecimiento 25 ejemplares, (Alevinos enteros u ovas) en pools de 5 a través de la técnica de PCR, empleando los mismos protocolos aplicados en el estudio epidemiológico de vigilancia sanitaria.

Durante el desarrollo del plan sanitario además de aplicar las técnicas de diagnóstico molecular por PCR sobre tejidos de órganos y sobre alevinos enteros se trabajó en la puesta a punto de la extracción de ácidos nucleicos de ovas embrionadas y su posterior procesamiento por PCR y RT PCR con el objetivo de poder aplicar un control más sobre las importaciones de ovas en cuarentena. (Técnica aun no estandarizada internacionalmente)

**A través de las metodologías de amplificación molecular aplicadas, NO se han detectado las secuencias específicas de los agentes etiológicos responsables de las patologías estudiadas.**

**En los análisis histopatológicos NO se observaron lesiones compatibles con enfermedades infecciosas, tras el examen de todos los órganos de cada uno de los alevinos estudiados.**

## **7. CONCLUSIONES**

La información incluida en el presente informe permite concluir que:

1. Las presentes conclusiones son específicas para la zona comprendida por la Cuenca Alta del Río Limay y el Embalse Alicurá, actuando como barrera física la represa de Alicurá, que es el lugar en donde se desarrollaron los estudios correspondientes al presente informe.
2. El diseño de los estudios epidemiológicos para las enfermedades virales y bacterianas correspondientes al presente documento, permiten asegurar con un 95% de confianza que es posible detectar al menos un individuo reactor (diagnóstico positivo) si la prevalencia esperada fuera igual o superior al 2% para cada una de las enfermedades en cuestión.
3. Los análisis de laboratorio determinaron la inexistencia de lesiones anatómicas patológicas compatibles o específicas de las enfermedades infecciosas estudiadas. Tampoco se detectaron las secuencias específicas de los agentes etiológicos responsables de las mismas.
4. No se ha detectado la presencia de enfermedad clínica para Necrosis Hematopoyética Epizootica (EHNV), Necrosis Hematopoyética Infecciosa (IHNV), Septicemia Hemorrágica Viral (VHS), Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN), Anemia Infecciosa del Salmón (ISA), Enfermedad Bacteriana Renal (BKD) y Piscirickettsiosis (SRS) en la población de salmónidos silvestres y de cultivo en la zona de la Cuenca Alta de Río Limay que incluye al Lago Nahuel Huapi, Lago Traful, ríos Limay y Traful y el embalse de Alicurá hasta la presa hidroeléctrica del mismo nombre.
5. Los resultados negativos obtenidos en todas las pruebas de diagnóstico, han demostrado la ausencia de infección y de actividad viral o bacteriana para las enfermedades EHNV, IHNV, VHS, IPN, ISA, BKD y SRS, de acuerdo con los supuestos enunciados para el diseño de los estudios epidemiológicos correspondientes al presente informe expresados en la conclusión N°2.
6. El Servicio veterinario posee la capacidad o competencia técnica de su personal como la capacidad financiera de recursos a su disposición (otorgados por medio de los instrumentos legales correspondientes: leyes, decretos y resoluciones) que permiten un correcto funcionamiento del Servicio para mantener un sistema de vigilancia eficaz, y la posibilidad de enfrentar situaciones sanitarias de emergencia.
7. Se ha realizado capacitación permanente desde comienzos del presente plan de trabajo tanto a los agentes del servicio nacional de laboratorio y campo, como a productores, técnicos y profesionales involucrados.
8. Se cuenta con un Laboratorio Nacional de Referencia, el cual presenta instalaciones adecuadas para el diagnóstico de las enfermedades de salmónidos estudiadas por las técnicas de Histopatología y PCR convencional y PCR Real Time.
9. La Legislación vigente ampara las acciones de vigilancia y prevención de las 7 enfermedades estudiadas.

10. Todos los establecimientos que se encuentran en la zona libre, así como también las hatcheries extrazona que abastecen alevinos a los establecimientos de engorde de la zona, se encuentran inscritos en los Registros RENSPA y RENACUA, por lo que se hallan identificados y georeferenciados.
11. El movimiento de los animales se encuentra registrado en el sistema veterinario oficial a través del correspondiente Documento de Tránsito animal (DTA).
12. Las importaciones de ovas se encuentran controladas bajo un sistema de cuarentena y diagnósticos previos a la liberación de los procesos cuarentenarios de importación y el correspondiente traslado al establecimiento de destino final.
13. Las acciones de vigilancia activa y el diseño de muestreo se determinó en base a las recomendaciones de la Sección 2. 1. Capítulo I. 1. B de Enfermedades de los peces del Manual de Diagnóstico para los Animales Acuáticos 2006 y el Código Sanitario 2009 de la OIE.
14. El diseño llevado a cabo se considera suficiente para considerar a la Zona bajo vigilancia epidemiológica, antes definida, como Libre de las Enfermedades ya indicadas.

## **8. Glosario**

LOTE: grupo de la misma especie que comparte un mismo suministro de agua y que se origina de una misma descendencia o población reproductora. (Manual OIE, 2006)

ZONA: desde el manantial de un río hasta una barrera que impide la introducción de una enfermedad.

HATCHERY: Establecimiento de acuicultura donde se realiza la reproducción y cría de juveniles.

## 9. Referencias Bibliográficas

1. Alvarez, M. A, 2005. Relevamiento de Lagos, Lagunas y Embalses de la Región Patagónica y su uso potencial en acuicultura. Dirección de Acuicultura, SAGPyA, 121 pp
2. Anna Wargelius. Per Gunnar Fjellidal. Tom Hansen. Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) Dev Genes Evol (2005) 215: 350–357
3. Blake, S.L., Schill, W.B., Mcallister, P.E., Lee, M-K, Singer, J.T. y Nicholson, B.L. (1995). Detection and identification of Aquatic birnaviruses by PCR assay. Journal of Clinical Microbiology 33: 835-839.
4. Chase D.M. & Pascho R.J. (1998). Development of a nested polymerase chain reaction for amplification of a sequence of the p57 gene of *Renibacterium salmoninarum* that provides a highly sensitive method for detection of the bacterium in salmonid kidney. Dis. Aquat. Org., 34, 223-229.
5. Chien M.S., Gilbert T.L., Huang C., Landolt M.L., O'Hara P.J. & Winton J. (1992). Molecular cloning and sequence analysis of the gene coding for the 57 kDa major soluble antigen of the salmonid fish pathogen *Renibacterium salmoninarum*. FEMS Microbiol. Lett., 96, 259-266.
6. Código Sanitario para la Animales Acuáticos de OIE, 2009.
7. Devold M., Krossoy B., Aspehaug V. & Nylund A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. Dis. Aquat. Org., 40, 9-18.
8. FAO 2009: <http://www.fao.org/forestry/country/18310/es/arg/>
9. Luchini, L., 2004. Calidad Sanitaria en relación al cultivo de Salmónidos: Lago Nahuel Huapi, Embalses de Alicurá y Piedra del Águila. Dirección de Acuicultura, SAGPyA, pp 108.
10. Marsh I.B., Whittington R.J., O'Rourke B., Hyatt A.D. & Chisholm O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. Molec. Cell. Probes, 16, 137-151.
11. Marshall S., Heath S., Henriquez V. & Orrego C. (1998). Minimally invasive detection of *Piscirickettsia salmonis* in cultivated salmonids via the PCR. Applied and Environmental Microbiology 64, 3066–3069.
12. Mauel M. J., Giovannoni S.J. & Fryer J.L. (1996). Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification, and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. Dis. Aquat. Org., 26, 189-195.
13. Mjaaland S., Rimstad E. & Cunningham C.O. (2002). Molecular diagnosis of infectious salmon anaemia. In: Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases, Cunningham C.O., ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1-2

14. Pendas, A.M., Moran, P.& Garcia Vazquez, E. (1994) Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenetics and Cell Genetics* 67, 31- 36.
15. Williams, K., Blake, A., Sweeney, A. (1999). Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 4139-4141.
16. Winton J.R. & Einer-Jensen K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*. Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 49-79
17. Tabashi Hibiya *An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features-1982- Edit. Kodansha-ISBN 0-98574- 174-1.*
18. *Métodos Histotecnológicos AFIP-USA-1995- ISBN 1-881041-21-2*
19. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology- Third Edition-1968-*
20. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animals –OIE-2006- Fith Edition ISBN 92-9044-682-x.-*
21. James R. Winton. *Fish Health Management*
22. *Handbook of Trout and Salmon Diseases, 3th Edition-1997.-*
23. Sloss- Kemp- Zajal, *Veterinary Clinical Parasitology –Iowa State University Press / Ames-6<sup>th</sup> Edition-1994.-*
24. *Procedimientos Normalizados de Trabajo –PNTA- Edición 2- Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, España.-*

## ANEXO I

### **Laboratorios de Referencia de OIE:**

### **Controles Positivos para las pruebas de PCR, RT-PCR:**

#### Controles Positivos BKD *R. salmoninarum*:

DNA purificado de cultivo BKD reconstituido en Tris 10 mM pH 8 provistos por:

Dr J. Winton  
 Western Fisheries Research Center, 6505 N.E. 65th Street,  
 Seattle, Washington 98115,  
 UNITED STATES OF AMERICA  
 Tel.: (1.206) 526.65.87, Fax: (1.206) 526.66.54,  
 E-mail: jim\_winton@usgs.gov

#### Controles Positivos SRS *P. Salmonis*:

Cultivo *P. Salmonis* inactivado con Trizol (Invitrogen) Provistos por:

Dr. Esteban Turic  
Biogénesis Bagó S.A. Argentina.  
Ruta Panamericana Km 38,2, Garín - Prov. de Bs.As.  
ARGENTINA  
Tel/Fax: (03327) 448333  
Email: info@biogenesisbago.com

Controles Positivos EHNV:

DNA EHNV purificado liofilizado provistos por:

Dr R. Whittington  
Faculty of Veterinary Science, University of Sydney,  
425 Werombi Road, Private Bag 3, Camden NSW 2570,  
AUSTRALIA  
Tel.: (61.2) 93.51.16.11., Fax: (61.2) 93.51.16.18  
E-mail: richardw@camden.usyd.edu.au

Controles Positivos IHNV:

Cultivo inactivado en buffer AVL Qiamap Viral RNA kit (Qiagen) provistos por:

Dr J. Winton  
Western Fisheries Research Center, 6505 N.E. 65th Street,  
Seattle, Washington 98115,  
UNITED STATES OF AMERICA  
Tel.: (1.206) 526.65.87, Fax: (1.206) 526.66.54,  
E-mail: jim\_winton@usgs.gov

Controles Positivos cultivo VHSV:

Cultivo inactivado RNAlater (Qiagen) provistos por:

Dr N.J. Olesen  
Danish Institute for Food and Veterinary Research, Hangovej 2,  
DK-8200 Aarhus N,  
DENMARK  
Tel.: (45) 89.37.24.31, Fax: (45) 89.37.24.70  
E-mail: njo@dfvf.dk

Controles Positivos Cultivo IPNV:

Cultivo inactivado (incubación a 60°C y congelación seca, heat 60°C freeze dried) provistos por:

Dr P. Dixon  
The Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (CEFAS),  
Barrack Road, Weymouth, Dorset DT4 8UB,  
UNITED KINGDOM  
Tel.: (44.1305) 20.66.42, Fax: (44.1305) 20.66.01  
E-mail: peter.dixon@cefasc.co.uk

Controles Positivos IPNV:

Cultivo inactivado con Trizol (Invitrogen) Provistos por:

Dr. Esteban Turic  
Biogénesis Bagó S.A. Argentina.  
Ruta Panamericana Km 38,2, Garín - Prov. de Bs.As.  
ARGENTINA  
TEL/FAX: (03327) 448333  
Email: info@biogenesisbago.com

Controles Positivos Cultivo ISAV:

Cultivo inactivado Buffer AVL Qiampr Viral RNA (Qiagen) y tejido de pronefros infectado en RNAlater (Qiagen) provistos por:

Dr B. Dannevig  
National Veterinary Institute, Ullevålsveien 68,  
P.O. Box 8156 Dep., 0033 Oslo,  
NORWAY  
Tel.: (47.23) 21.64.04, Fax: (47.23) 21.63.01  
E-mail: birgit.dannevig@vetinst.no

Controles Positivos ISAV:

Controles clonados cDNA ISAV purificado y RNA ISAV precipitado en etanol provistos por:

Dr F. Kibenge  
Atlantic Veterinary College, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine,  
University of Prince Edward Island 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, C1A 4P3  
CANADA  
Tel: (1.902) 566.09.67 Fax: (1.902) 566.08.51  
Email: kibenge@upei.ca

**Controles Negativos para las pruebas de PCR, RT-PCR:**

Los controles negativos se obtuvieron de peces SPF (specific pathogens free) certificados, libres de patógenos de las especies *Salmo salar* y *Oncorhynchus kisutch*, utilizando la misma metodología anteriormente descrita para la toma de muestras de los individuos a estudiar. Los órganos de los peces SPF extraídos se conservaron a -80° C, Los peces fueron provistos en el 2006 por:

Dr. Esteban Turic  
Biogénesis Bagó S.A. Argentina.  
Ruta Panamericana Km 38,2, Garín - Prov. de Bs.As.  
ARGENTINA  
TEL/FAX: (03327) 448333  
Email: info@biogenesisbago.com  
Laboratorio productor de vacunas de IPN y SRS.