



Protocolo de Acciones ante Mortandades de Peces

Alejandra Volpedo
Dario Colautti
Esteban Morón Alcain
Germán Coscelli
Fabrizio Vigliano

Dirección Red de Seguridad Alimentaria:
Carlos J. Van Gelderen

Coordinación Red de Seguridad Alimentaria:
Javier Pardo

Dirección Red de Fortalecimiento de la Acuicultura:
Silvia Arranz



Protocolo de Acciones ante Mortandades de Peces /
Alejandra V. Volpedo ... [et al.]. - 1a ed . - Ciudad
Autónoma de Buenos Aires : CONICET - Consejo
Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas,
2019.
105 p. ; 30 x 21 cm.

ISBN 978-950-692-164-4

1. Peces. 2. Protocolo. 3. Seguridad Alimentaria. I. Volpedo, Alejandra V.
CDD 597



Dra. Alejandra V. Volpedo

Investigador Independiente – CONICET/INPA
Profesora Adjunta Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires
Directora del Instituto de Investigaciones en Producción Animal
(INPA-CONICET)



Dr. Dario Colautti

Investigador Independiente – CONICET/ILPLA
Vicedirector del Instituto de Limnología "Dr. Raúl A. Ringuelet"
(ILPLA-CONICET)



Méd. Vet. Esteban Morón Alcain

Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Piscicultura
Investigador Asociado - Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario



Dr. Méd. Vet. Germán A. Coscelli

Profesor Adjunto Cátedras de Patología General y Especial
Investigador Titular - Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario



Dr. Méd. Vet. Fabricio A. Vigliano

Investigador Adjunto – CONICET/CCT-Rosario
Profesor Titular Cátedras de Histología I y Embriología Básica / Piscicultura
Director del Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario

Los formularios presentados en el Anexo III de este documento contaron con aportes de los miembros de la Comisión de Pesca Continental, quienes con su valiosa contribución permitieron mejorarlos. Esta actividad se desarrolló en el marco del Taller "Mortandad masiva de peces: protocolo de acción" realizado para tal fin en mayo de 2018.

**Participantes de la Comisión de Pesca Continental
en el Taller "Mortandad masiva de peces: protocolo de acción"**

- > **Gabriela Navarro**
Directora de la Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías (DPyGP) - Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SSPyA) de Nación
- > **Leandro Balboni**
Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías (DPyGP) - Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SSPyA) de Nación
- > **Jorge Liotta**
Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías (DPyGP) - Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SSPyA) de Nación
- > **Julia Mantinian**
Dirección de Planificación y Gestión de Pesquerías (DPyGP) - Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (SSPyA) de Nación
- > **Ximena Beiras**
Sanidad Animal - (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA) - Nación
- > **Marinela Alegre**
Programa de enfermedades de los Animales Acuáticos, Sanidad Animal de (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA)- Nación
- > **Mauro Meske**
Sanidad Animal - (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria – SENASA) - Nación
- > **Santiago D'Alessio**
Grupo de trabajo de Recursos Acuáticos (GTRA) - Secretaría de Gobierno de Ambiente y Desarrollo Sustentable – Nación
- > **Francisco Firpo Lacoste**
Grupo de trabajo de Recursos Acuáticos (GTRA) - Secretaría de Gobierno de Ambiente y Desarrollo Sustentable – Nación
- > **Ángel Alvarenga**
Prefectura Naval Argentina (PNA)
- > **Gabriela Riviello López**
Medio Ambiente- Prefectura Naval Argentina (PNA)
- > **Roxana Blasetti**
Dirección del Consejo Federal Agropecuario

- > **Gloria García Río**
Consejo Federal Agropecuario

- > **Fernando Diego Ramírez**
Dirección Provincial de Pesca, Jefe de Departamento de Estudios Tecnológicos y Económicos
(Provincia de Buenos Aires)

- > **Cristian Ciarrocca**
Ministerio Producción (Provincia de Entre Ríos)

- > **Norberto Giménez**
Ministerio de la Producción (Provincia de Santa Fe)

- > **Juan Carlos Rozzatti**
Secretaría de Medio Ambiente (Provincia de Santa Fe)

- > **Danilo Demonte**
Secretaría de Medio Ambiente (Provincia de Santa Fe)

- > **David Hernández**
Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE)-Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad
Nacional del Nordeste, Corrientes

Agradecimientos

A Gabriela Navarro (SSPyA), Julia Mantinian (SSPyA), Silvia Arranz (Laboratorio Mixto de Biotecnología Acuática del Centro Científico, Tecnológico y Educativo "Acuario del Río Paraná") y Adrián Beltrame (A. Ca. Pes. Co) por sus valiosos aportes y la lectura crítica del manual.

INDICE

1. Introducción.	9
2. ¿Qué recaudos debemos tener en cuenta ANTES de que ocurra un brote de enfermedades o mortandades masivas?	11
2.a. Bioseguridad en la recolección de muestras y su remisión.....	11
2.b. Materiales y equipamiento necesarios para la toma de muestras de agua y sedimentos.	11
2.c. Materiales y equipamiento básico necesarios para la manipulación de muestras y animales.	11
2.d. Materiales para la toma de muestras para bacteriología <i>in situ</i>	12
2.e. Materiales mínimos necesarios para la estimación cuali-cuantitativa de mortandades.	12
3. ¿Cómo debemos proceder DURANTE un brote de enfermedades o mortandades masivas?	13
3.a. Inspección del cuerpo de agua y los peces afectados.	13
3.b. Metodología para la estimación cuali-cuantitativa de mortandades.....	13
3.c. Procedimientos de identificación y colecta de muestras.	18
3.d. Recolección y envío de peces vivos.	21
3.e. Recolección y envío de muestras para histopatología.	24
3.f. Recolección y envío de muestras para estudios toxicológicos en tejidos de peces.....	27
3.g. Recolección y envío de muestras para estudios bacteriológicos.	28
A. Recolección de muestras para Bacteriología mediante TÉCNICA 1.	32
B. Recolección de muestras para Bacteriología mediante TÉCNICA 2.	35
3.h. Registro de variables fisicoquímicas del agua en el lugar y momento de muestreo.....	38
3.i. Recolección y envío de muestras para análisis de agua.	38
3.j. Recolección y envío de muestras para análisis de sedimentos.	39
4. ¿Qué debemos hacer DESPUÉS de un brote de enfermedades o mortandades masivas?	40
4.a. Destino de peces moribundos o muertos.	40
4.b. Disposición final del material utilizado para los muestreos.	41

ANEXOS	43
ANEXO I.....	45
Anatomía de los peces	45
ANEXO II	57
Técnica de necropsia en peces	57
ANEXO III	71
Formularios de recolección de datos y envío de muestras ante eventos de mortandades	71
ANEXO IV	81
Preparación de soluciones útiles para el muestreo	81
ANEXO V	85
Datos de contacto de Laboratorios especializados.....	85
6. Bibliografía	94

1. Introducción.

Una mortandad de peces puede definirse como la aparición repentina de un número importante de peces muertos en un ambiente acuático. Estos eventos que se repiten con bastante frecuencia en distintos tipos de cuerpos de agua suelen ocurrir en un área o región definida y durar un corto período de tiempo. Debido a sus características, la ocurrencia de mortandades alarma y sensibiliza a la sociedad por ser considerados indicadores de problemas ambientales y potenciales fuentes de riesgo para la salud humana. No obstante, en muchos casos pueden tratarse de fenómenos naturales vinculados a cuestiones climáticas, ambientales o ecológicas, aunque también pueden relacionarse con contaminación, derrames de sustancias tóxicas o manejos indebidos del ecosistema acuático y/o terrestre circundante.

Una vez detectada una mortandad, resulta de gran importancia determinar su magnitud, especies involucradas y causas. Si se consideran las diversas razones por las que pueden ocurrir estos fenómenos, es evidente que para dar una respuesta a la sociedad es necesaria la intervención de profesionales de diferentes disciplinas y la participación de los distintos organismos gubernamentales con responsabilidad en el tema, así como del sector científico-técnico y académico. La respuesta adecuada sólo se logra si se desarrollan acciones conjuntas y si existe una organización previa que posibilite actuar de manera rápida y coordinada ante una alarma de mortandad ya que la dinámica de estos eventos así lo requiere.

Las mortandades masivas de peces en Argentina son fenómenos frecuentes, ampliamente distribuidos y documentados, desde 1912 a la actualidad. Según sea su origen, pueden agruparse en mortandades por causas naturales directas como por ejemplo temperaturas extremas, cambios bruscos de modificaciones del pH, bajas concentraciones de oxígeno disuelto en agua; o también pueden deberse a causas de origen antrópico como derrames de hidrocarburos, pulsos de contaminantes o vertidos de efluentes cloacales, entre otros. Las mortandades masivas pueden desencadenarse por múltiples causas generadas en un momento determinado o bien las mismas pueden darse de manera secuencial. En el caso de los peces en cultivo, cualquier situación estresante (manipulación indebida de los ejemplares, transporte, etc.) que induce un desequilibrio entre los mecanismos de defensa de los peces y potenciales patógenos primarios o secundarios oportunistas.

El análisis de 66 casos de mortandades masivas de peces desde 1912 a 2007 realizado por Gómez (2014) permite evidenciar que el mayor porcentaje de estos eventos se da por causas naturales y dentro de ellas por la presencia de temperaturas extremas y la disminución de la concentración del oxígeno disuelto. Sólo en 3 casos de los reportados se comprobó que la mortandad se debía a vertido de tóxicos.

Las temperaturas extremas (mínimas y máximas) generalmente están fuera de los límites de tolerancia biológica de muchas de las especies (Menni y col., 1996, 1998; Cussac y col., 2009; González Naya y col., 2011) y, cuando esto sucede, los peces mueren. La teoría ecológica establece que para cada variable ambiental hay un rango de valores y un óptimo fisiológico donde la eficiencia biológica del organismo es máxima (Pianka, 1983). Fuera del rango de tolerancia, la fisiología de la especie no es viable.

Las especies de peces de las diferentes ecorregiones de Argentina presentan diferentes rangos de tolerancia a las condiciones ambientales (Menni y col., 1996; 1998; Cussac y col., 2009). Muchas veces a temperaturas superiores del valor de máxima tolerancia a los peces les cuesta recuperarse y pueden morir (Almirón y col., 2000; Beitinger y col., 2000; Gómez y Volpedo, 2017). En

otras palabras cuando un pez pierde su flotabilidad a una dada temperatura y luego puede regular su flotabilidad y sobrevive al evento, se puede decir que se ha recuperado.

En general cuando las temperaturas ambientales son superiores a los 30 °C, aun en especies aclimatadas a altas temperaturas, la fisiología de las mismas se ve afectada en tal grado que si las condiciones perduran en el tiempo los ejemplares no pueden recuperarse y mueren (De Almeida-Val y col., 2005). Esto se condice con lo estudiado por González Naya y col. (2011) que analizando las variables climáticas (precipitaciones, temperatura del aire y presión) presentes en 66 eventos de mortandades masivas, hallaron una fuerte relación entre estos con la temperatura media mensual del aire. Cuando la temperatura superó el rango de 28,4-38°C, o bien cuando disminuyó por debajo de 8°C por un período más prolongado de lo normal, se producían mortandades.

Por otro lado, también hay que considerar que la presencia de otros factores, como altas concentraciones de materia orgánica (la cual pueden provenir tanto de la actividad antrópica¹ como por aporte natural), también disminuyen la concentración de oxígeno disuelto en el agua y favorecen la proliferación de microorganismos patógenos oportunistas. La mayoría de las mortandades de peces, tanto en ambientes naturales como en cultivo, son multicausales o multifactoriales.

Es por ello que la recolección de muestras y el registro de datos *in situ* de una mortandad es clave en la búsqueda de respuestas y en la prevención de estos eventos. En este sentido desde hace casi una década se han desarrollado diferentes reuniones entre profesionales y autoridades vinculadas a la temática, como el taller realizado en el año 2010 en el Museo de La Plata, y las reuniones organizadas en 2018 por la Red de Seguridad Alimentaria (RSA-CONICET) y la Red de Fortalecimiento de la Acuicultura (ReFACUA-CONICET) y la Comisión de Pesca Continental y Acuicultura del Consejo Federal Agropecuario (CPCyA-CFA) a efectos de tratar el tema para evaluar las posibles causas, su gravedad y elaborar respuestas acordes a la situación, a fin de minimizar la confusión y los focos de desinformación que generan estos eventos en la opinión pública.

Como resultado de estas reuniones surgió la necesidad de generar un documento a nivel nacional que pueda reflejar el trabajo en red de los diferentes actores y autoridades competentes, con sólida base científica y que tenga la capacidad de permitir generar una respuesta rápida, estandarizada y coordinada ante casos de mortandades de peces en todo nuestro país. Para ello, se propuso el trabajo conjunto en la elaboración de protocolos para relevar de forma sistematizada información y muestras en campo, y conformar una red multidisciplinaria de especialistas que posibilite analizar de manera ágil y específica los datos y muestras de cada mortandad para generar una respuesta con fundamento científico-técnico sólido en tiempo y forma.

¹ Efluentes cloacales e industriales, aporte de materia orgánica por escorrentía de áreas deforestadas, etc.

2. ¿Qué recaudos debemos tener en cuenta ANTES de que ocurra un brote de enfermedades o mortandades masivas?

2.a. Bioseguridad en la recolección de muestras y su remisión.

Las muestras de agua, peces y/o sedimentos deben ser recolectadas utilizando guantes de látex, los materiales para su colecta deben estar limpios y en condiciones apropiadas para cada tipo de muestreo. Los agentes que recolecten las muestras deben tener la precaución al entrar en contacto con el agua o las muestras de estar utilizando guantes de látex, botas, o equipo para agua.

2.b. Materiales y equipamiento necesarios para la toma de muestras de agua y sedimentos.

- > GPS o celular para georreferenciar los sitios de toma de muestras.
- > Bandas elásticas.
- > Draga o pala para colecta de sedimentos.
- > Recipientes de plástico 500 ml para muestras destinadas a análisis físicoquímicos generales, o de un 1L para estudios físicoquímicos completos (al menos dos recipientes para cada sitio de muestreo) por cada análisis a efectuar, con tapa a rosca y cierre hermético.
- > Cajas grandes de telgopor con refrigerante (hielo o refrigerantes) para mantener la muestra refrigerada a 4 °C.
- > Folios plásticos.
- > Guantes de látex.
- > Sonda multiparamétrica.
- > Soluciones de calibración para la sonda multiparamétrica.

2.c. Materiales y equipamiento básico necesarios para la manipulación de muestras y animales.

- > Bolsas plásticas gruesas y resistentes para el envío de ejemplares vivos.
- > Tanque de oxígeno^{2,3}.
- > Bandas elásticas.
- > Cajas grandes de telgopor.
- > Hielo o refrigerantes.
- > Folios plásticos.
- > Frascos de plástico de distintos volúmenes con tapa a rosca y cierre hermético.
- > Bolsas plásticas tipo Ziploc de distintos tamaños.
- > Guantes de látex.
- > Red manual o copo para peces.

² En el caso que las muestras sean colectadas vivas. No es un elemento de uso básico.

- > Rotulador indeleble/lápiz negro.
- > Etiquetas de papel o papel vegetal.
- > Formol al 10% (fijador de tejidos, ver preparación en el Anexo IV)³.
- > Casetes de inclusión³.
- > Instrumental de disección (mango y hojas de bisturí, pinzas y tijeras, sierra chica)³.
- > Balanza manual³.

2.d. Materiales para la toma de muestras para bacteriología *in situ*

- > Tijeras de diferentes modelos (Mayo, Metzemaum, Iris) y tamaños.
- > Pinzas (de disección, Adson).
- > Mangos de bisturí (N° 3 o 4).
- > Hojas de bisturí (N° 11, 15, 20, 22 o 24).
- > Guantes de látex.
- > Jeringas.
- > Agujas de distinta longitud y calibre.
- > Recipientes estériles de distinto tamaño (frascos, tubos Falcom, crioviales).
- > Alcohol 70°, 96° y alcohol iodado (ver preparación en Anexo IV).
- > Hisopos estériles y medios de cultivo para transporte (Stuart, Cary Blair).
- > Rotulador indeleble.
- > Bolsas de polietileno nuevas.

2.e. Materiales mínimos necesarios para la estimación cuali-cuantitativa de mortandades.

- > Cinta métrica de hasta 50m.
- > Sistema de Posicionamiento Global (GPS).
- > Cámara fotográfica.
- > Lápiz.
- > Planillas.
- > Mapas de la zona.
- > Embarcación (opcional dependiendo del ambiente).

³ Elementos para uso especializado.

3. ¿Cómo debemos proceder DURANTE un brote de enfermedades o mortandades masivas?

La notificación inicial de un evento de mortandad masiva de peces debe ser reportado a las autoridades competentes⁴ a la brevedad apenas se presenta el mismo.

La coordinación del esfuerzo de la respuesta que se genera en las autoridades competentes debe tener una ruta clara y precisa a fin de que se pueda dar respuesta en tiempo y forma al evento. Los equipos de las autoridades de aplicación deben estar formalizados y capacitados con la tarea de coleccionar y preservar las muestras y redireccionarlas a los laboratorios de análisis.

Los resultados de los análisis una vez interpretados deben ser claramente comunicados a la población por las autoridades competentes.

3.a. Inspección del cuerpo de agua y los peces afectados.

Los formularios de mortandades de peces (ANEXO III) presentan la información inicial necesaria para tener una aproximación a los factores potenciales que han generado la mortandad. Estos formularios deben completarse según corresponda (Formulario I, mortandad de peces en ambientes naturales o Formulario II, mortandad de peces en cultivo) durante la inspección al cuerpo de agua. Los observadores deben determinar si existe una posible fuente de contaminación o de generación de un impacto a fin de poder frenar en lo posible la influencia del mismo y minimizar el daño ambiental. Muchas veces la fuente de generación de impacto y/o de contaminación no se puede identificar claramente, ya que como este tipo de eventos en general son multifactoriales es difícil asignar una única causa. Debido a esto, es clave la inspección del cuerpo de agua donde se deberá observar y registrar parámetros hidrometeorológicos (cambios en la altura del curso de agua), aportes de materiales (naturales y antrópicos) traídos por corrientadas, o desde el ambiente terrestre, eventos meteorológicos extremos (inundaciones, tormentas) y cambios abruptos en el uso de la tierra (desforestaciones, siembras, fumigaciones, etc.) de zonas aledañas o de la cuenca alta del curso de agua.

3.b. Metodología para la estimación cuali-cuantitativa de mortandades.

Muestreo de mortandades.

Para realizar esta tarea se deben realizar conteos de peces muertos en varios sectores de tamaño definido (unidades muestrales) dentro del área afectada por la mortandad. La cantidad y tipo de unidades muestrales dependerá del ambiente en que haya ocurrido la mortandad, el número de peces involucrado, la accesibilidad para realizar el muestreo y los recursos disponibles.

A continuación, se desarrollará una guía orientativa para el levantamiento de información y toma de muestras en caso de mortandades de peces, discriminando según los tipos de ambientes

⁴ Se considera autoridades competentes a los organismos locales, provinciales o nacionales que tienen injerencia en cada jurisdicción sobre los recursos acuáticos de los ambientes naturales. En el caso particular de un establecimiento las autoridades competentes dependen de la jurisdicción donde este el establecimiento y de SENASA.

más comunes en que pueden ocurrir en nuestro país. Los materiales mínimos necesarios se mencionan en el ítem 2.e.

Arroyos.

Al llegar al sitio donde ocurre la mortandad lo primero que hay que hacer es recorrer y medir o estimar el largo total del curso de agua en que se desarrolla la mortandad (Figura 1).

Posteriormente, se deberán definir la cantidad y ubicación de los segmentos del arroyo en los que se realizarán la identificación por especie y los conteos de peces muertos depositados en ambas orillas y en el cauce. Se recomienda que la suma del largo de los segmentos resulte igual o mayor al 10% del largo afectado del arroyo y que la cantidad de segmentos sea igual o mayor a tres y que se distribuyan a intervalos regulares, abarcando toda el área afectada. Esto condiciona a que el largo y cantidad de segmentos para realizar conteos esté supeditado a las características de la mortandad.

Si no se puede acceder a todo el largo del cauce afectado por la mortandad, entonces habrá que realizar los conteos en los puntos accesibles (puentes, calles marginales al cauce, costas públicas, etc.), y en este caso el área de trabajo se considerará dividida en estratos, que pueden ser 2 (zonas accesibles y no accesibles) o 3 (no accesibles, accesibles sin influencia de estructuras asociadas al punto de acceso y accesibles con influencia de dichas estructuras). Las dos últimas categorías en el caso de un puente podrían ser los segmentos accesibles, pero donde el cauce no se ve interrumpido o alterado en su estructura por la presencia del puente y el área del puente donde los pilares y las modificaciones del cauce pueden alterar la distribución de los peces en ese segmento del arroyo. Si los puntos de acceso permiten evaluar la mortandad en una cantidad de segmentos razonable, los conteos del estrato 2 servirán para interpretar lo observado en el estrato 3 y a partir de esa información estimar lo ocurrido en el estrato 1.

Otro problema puede presentarse cuando los peces están derivando por la corriente. Si la deriva es lenta o los peces pueden contarse sumándose a los que están depositados en la costa, el error será mínimo. Si la deriva es rápida y los peces ingresan y salen del segmento mientras se realiza el conteo habrá que aplicar correcciones. Estas dependerán si la persona que cuantifica o sea el "contador" se mueve aguas abajo o aguas arriba. Si se cuenta desplazándose aguas arriba se recomienda contar a los peces en la costa y los que pasan por el cauce discriminando entre ambos, tomando el tiempo que llevó realizar el conteo del segmento. Para corregir, se sugiere quedarse quieto en el punto límite aguas arriba del segmento y contar los peces que pasan derivando durante el tiempo que llevó contar el segmento. El número corregido se obtendrá restando al número de peces derivando del primer conteo la cantidad registrada en el segundo conteo. Si el valor da cero o negativo se usará el primer conteo sin corregir.

En caso contrario el valor del segmento corresponderá al de los peces depositados en la costa o bancos más el valor corregido de peces derivando.

Si la persona que cuantifica camina aguas abajo, para corregir el número de peces derivando habrá que tomar el tiempo que lleva recorrer el segmento, contar los peces depositados y dividir a los que flotan en dos categorías: 1. los que el "contador" pasa, y 2. los que pasan al "contador" mientras recorre. Después en el punto límite aguas abajo del segmento habrá que contar los peces que pasan en el mismo intervalo de tiempo que duró la recorrida del segmento.

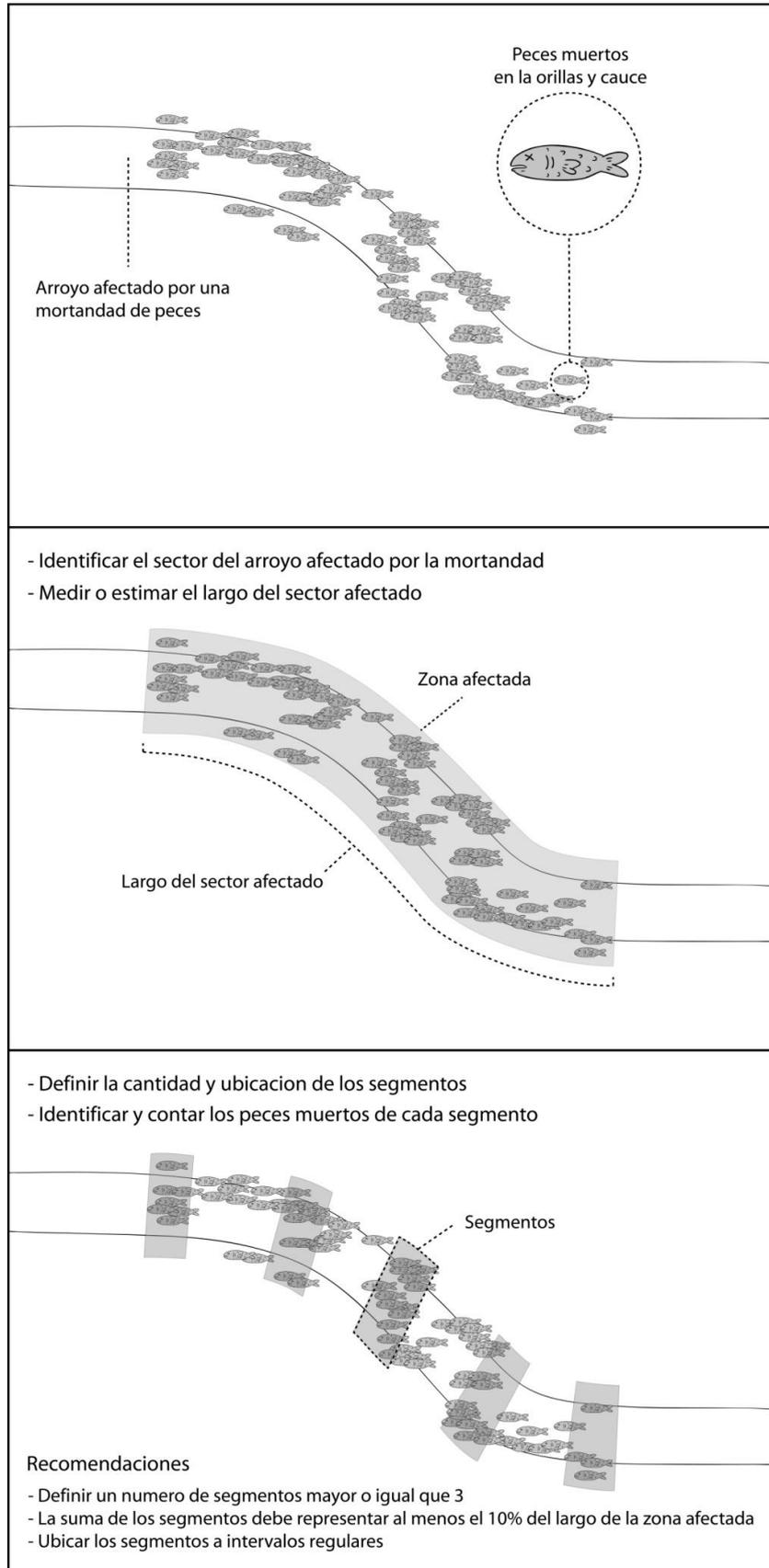


Figura 1. Procedimiento para cuantificar mortandades en un arroyo.

La corrección de peces derivando en el segmento se realizará sumándole al número de peces flotantes que pasaron por el punto fijo el número de peces flotantes que se pasaron durante el conteo menos los que pasaron al “contador” en ese lapso. El valor corregido se sumará a la cantidad de peces depositados para obtener la cantidad total de peces muertos en el segmento. Si la corrección de peces flotantes da cero o negativo, usar el valor de peces flotantes que pasaron por el punto fijo para obtener el número total de peces muertos para el segmento.

La información recabada será registrada en planillas en las que constarán el largo total del sector del arroyo afectado por la mortandad, el largo de los segmentos y el número de peces por especie, tamaño o categoría con que se clasifiquen, por cada segmento. Si bien, estas planillas están integradas en el formulario I del Anexo III, se muestran a continuación a los fines de comprender el texto (Tabla 1).

Tabla 1. Planilla de recolección de datos sobre mortandades en arroyos.

Medidas	Valor	N° de segmento	N° de Peces sp 1	N° de Peces sp 2	N° de Peces sp x
Largo zona afectada (m)		1			
Largo segmentos (m)		2			
		3			
		n			

Lagos y ríos.

En estos ambientes usualmente se acumulan muchos peces en la costa, pero otros quedan flotando, por lo cual, se definen dos estratos y como consecuencia de ello se sugiere implementar dos métodos de muestreo para estimar la totalidad de peces muertos:

- > Conteo por segmentos de costa.
- > Transectas de conteo en aguas abiertas.

Las estimaciones de la cantidad de peces muertos se realizarán para cada estrato y luego se sumarán los valores obtenidos para obtener el número por especie o total de peces involucrados.

En el caso de conteos en segmentos de costa se deberá establecerse el largo de los segmentos teniendo en cuenta lo explicado para los arroyos, pero también deberá establecerse un ancho de segmento. Es decir, será necesario establecer qué distancia desde la costa representa el ancho de los segmentos ya que dicho límite será el inicio y final de las transectas. Por lo general el ancho está dado por la distancia a la costa en que se puede ver, identificar y contar con precisión a los peces, así como también acceder a los mismos desde la orilla para tomar muestras. Por esta razón en la planilla de campo además de registrar los datos indicados, también se deberá incluir el ancho de segmento.

Las transectas para realizar los conteos de peces muertos en aguas abiertas, pueden definirse como franjas rectas y paralelas de ancho conocido, dispuestas de manera perpendicular al eje principal del cuerpo de agua, que se extienden desde una orilla a la orilla opuesta. Para definir la cantidad y ancho de las transectas debe considerarse el largo del eje principal del cuerpo de agua y el ancho de franja en el que podemos identificar, contar y recolectar peces muertos. Supongamos que el largo del eje principal de un lago es 600 m y que podemos hacer 10 transectas de un ancho de 6m que es nuestra distancia máxima para identificar y contar con precisión a los peces desde la

embarcación (3 m para cada lado). Entonces si dividimos los 600m por 10, el cuerpo de agua nos queda fraccionado en 10 franjas de 60 m de ancho. Ahora bien, debemos realizar una transecta de 6m de ancho en cada una de estas franjas de 60 m., entonces para saber dónde ubicar la transecta de 6 m en cada una de estas franjas, debemos dividir el ancho de franja (60m en este caso) por el ancho de transecta (6m en este caso) que nos dará el número posible de transectas dentro de la franja (10 en este caso). Una vez conocido el número posible de transectas en la franja se sorteará al azar un número entre 1 y el máximo posible de transectas y el valor obtenido será el que indique a qué distancia del borde de la primera franja deberá ubicarse la transecta (En nuestro caso si el número sorteado fue 7 entonces la transecta deberá ubicarse a 30 m del borde de la franja (7 x 6m = 42m). Las transectas del resto de las franjas se realizarán a intervalos regulares de 60 m una respecto de la otra (Figura 2).

En la planilla de campo se registrará el largo de la línea de base, el ancho de transecta, el largo de cada una de las transectas y el número de peces por especie, tamaño o categoría con que se clasifiquen, por cada transecta. La Tabla 2 muestra un diseño para la recolección de estos datos (ya incluidas en el formulario I del Anexo III).

Tabla 2. Planilla de recolección de datos sobre mortandades en lagos y ríos.

Medidas	Valor	N° de transecta	Largo transecta (m)	N° de Peces sp 1	N° de Peces sp 2	N° de Peces sp n
Largo línea de base (m)		1				
Ancho transecta (m)		2				
Area total mortandad (m ²)		3				
		4				
		5				
		n				

Estimación del número total de peces muertos y su error estándar

Con la información recabada se realizarán una serie de cálculos que permitirán estimar el número total de peces involucrados y sus respectivos errores estándar. Dado que el espíritu de este manual es estandarizar métodos y obtener resultados comparables, se ha diseñado una planilla Excel que puede obtenerse en el sitio www.rsa.conicet.gov.ar con la cual los estadísticos referidos se obtienen automáticamente luego de cargar los datos registrados en la planilla.

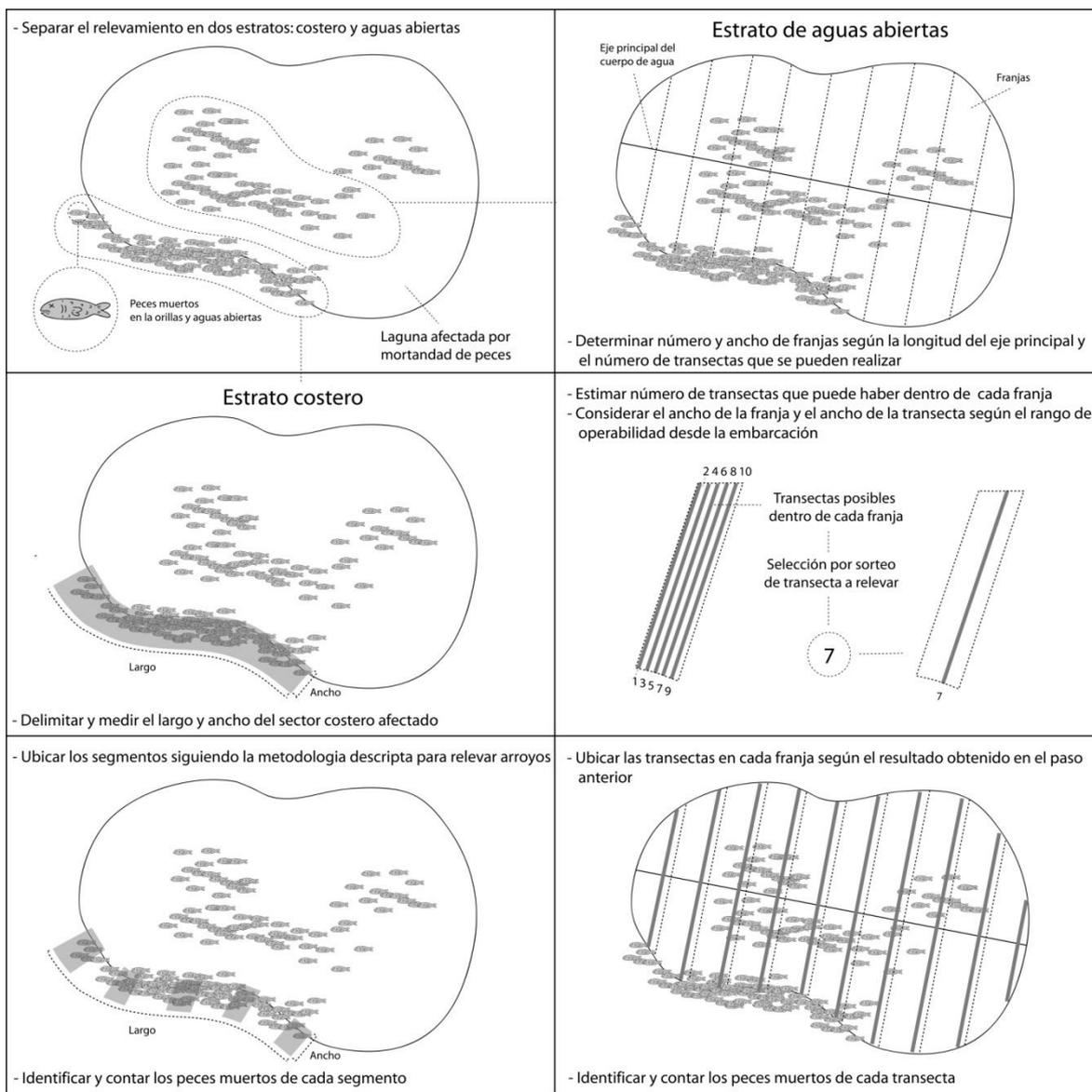


Figura 2. Procedimiento para cuantificar mortandades en un lago o río.

3.c. Procedimientos de identificación y colecta de muestras.

Las muestras a recolectar son muestras de **agua**, **sedimento** y de **peces** (moribundos y/o muertos). Las muestras de agua deben colectarse en el mismo sitio donde están los peces muertos o moribundos, así como también en áreas donde no hay peces muertos. Las mismas deben ser representativas del cuerpo de agua y deben ser colectadas en la orilla y en el centro del cuerpo del agua (en lo posible) y tanto en superficie como en profundidad.

Se debe registrar el lugar preciso de la toma de muestra. En lo posible georeferenciarlo (obtener las coordenadas geográficas con GPS o celular), o bien determinar lo más específicamente su ubicación espacial, utilizando marcos de referencia lo más exactos posibles.

Los parámetros fisicoquímicos del agua a determinar *in situ* son temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/l), pH, amonio total (mg/l), conductividad (µm/S) y salinidad (UPS, en caso de que sea un ambiente estuarial, marino o salobre). Estos parámetros pueden determinarse con equipo de

campo básico. Todos los instrumentos con los que se registren dichos parámetros deben estar calibrados previamente y su calibración debe ser incorporada en el registro de los valores medidos ya que de esta manera, en el caso de ser necesario se puede utilizar el valor determinado en el ámbito legal. Además en caso de acciones legales se debe mantener una cadena de custodia de las mismas⁵.

Cuando se sospeche que puede existir la presencia de un tóxico se deben coleccionar muestras de agua por duplicado o triplicado ya que según si los tóxicos son compuestos orgánicos (por ejemplo, pesticidas) o metales pesados la preservación de las mismas para su análisis es diferente.

Para determinación de metales pesados en las muestras de agua las mismas se coleccionan en botellas plásticas previamente enjuagadas con ácido nítrico (HNO₃) y puestas a secar, para luego ser utilizadas en la colecta de muestras de agua. En el caso de sospechar la presencia de compuestos orgánicos, la colecta de agua debe realizarse en botellas de vidrio según las técnicas estandarizadas (APHA, 2012). Una vez en el sitio del evento debe enjuagarse las botellas con el agua a muestrearse 2 o 3 veces y llenar las botellas sin dejar cámara de aire.

La cantidad de muestras de agua debe estar en relación con la superficie del cuerpo de agua y la magnitud subjetiva del evento de mortandad, como mínimo debe ser de tres muestras de orilla y otras tres muestras del centro de cuerpo de agua, tanto en superficie como en profundidad. En esos sitios también se debe registrar *in situ* temperatura, oxígeno disuelto, pH, amonio total y conductividad.

Las muestras de sedimento deberán coleccionarse de la orilla del cuerpo de agua y si el cuerpo de agua es somero también en el centro del mismo (en la medida de las posibilidades). Estas muestras se coleccionan con una pala o bien una draga de ser necesario y se preservan en bolsas ziploc o bien en frascos.

Para las muestras de peces, invertebrados y/o otras especies, se deben seleccionar aquellos especímenes que se encuentren más frescos y deben examinarse externamente para determinar si tienen anomalías, hemorragias, lesiones abiertas o decoloraciones y en el caso de ser posible registrar fotográficamente las mismas. Las muestras de peces deben coleccionarse en lo posible en el mismo sitio donde se coleccionaron las muestras de agua. En el caso de observarse la presencia de diferentes especies o tamaños de ejemplares deberán coleccionarse aproximadamente 5 a 10 ejemplares por especie y tamaño en lo posible. Si en la observación preliminar se observan peces moribundos además de muertos deben observarse y registrarse (video o fotografía) su comportamiento.

Los peces se deben recoger empleando una red de mano. Se debe elegir los peces con sintomatología representativa, o moribundos, en caso contrario aquellos recién muertos. Si existen comportamientos anormales en los peces como natación errática, pérdida del equilibrio, toman aire o "boquean" irregularmente, estos datos deben registrarse en los formularios I o II del Anexo III, ya que muchas veces permiten dar indicios de las posibles causas de la mortandad. Algunos signos físicos asociados con problemas de mortandad de peces causados por el agotamiento de oxígeno, floraciones de algas tóxicas y toxicidad por plaguicidas se presentan en la Tabla 3 (Wedemeyer y col., 1976; AFS, 1992). Otros signos físicos que pueden presentar los peces puede ser el aletargamiento y la pérdida de flotabilidad en respuesta a las bajas temperaturas, esto algo

⁵ La cadena de custodia incluye que un funcionario del ámbito legal o de la fuerza del orden público, firme y certifique que la colecta de muestras se realizó adecuadamente, garantice con su firma el rótulo de los frascos y contenedores de las muestras, y asegure que los procesos protocolares de laboratorio para la determinación de las mismas se hayan realizado correctamente. Esto ocurre por ejemplo con muestras utilizadas en pericias ambientales.

Tabla 3. Signos físicos de los peces debido a diferentes causas (modificado de Wedemeyer y col.,1976).

Signos asociados con la mortandad de peces	Causa de mortandad		
	Disminución de oxígeno disuelto	Floración de algas tóxicas	Toxicidad de plaguicidas
Comportamiento de los peces	Boqueo y natación en la superficie.	Natación convulsiva, errática, letargo.	Natación convulsiva, errática, letargo.
Selectividad de especies de peces muertos	Si el agotamiento de oxígeno disuelto es total todas las especies de peces son afectadas. Si la disminución oxígeno disuelto es parcial si bien pueden existir peces muertos, algunas especies como los bagres y carpas pueden sobrevivir.	Todas las especies son afectadas.	Usualmente se identifica la muerte predominantemente de una especie, antes de que del resto. Esto se debe a las diferentes sensibilidades de los peces ante un tóxico.
Tamaño de los peces	Los ejemplares de peces grandes mueren primero, sin embargo al disminuir el oxígeno disuelto también pueden morir ejemplares de tallas pequeñas.	Los ejemplares de peces pequeños mueren primero, pero eventualmente pueden morir peces de todas las tallas.	Los ejemplares de peces pequeños mueren primero, pero eventualmente pueden morir peces de todas las tallas.
Franja horaria principal	Noche y amanecer	Únicamente en horas de mucha luz solar (por ejemplo de 9:00 a 17.00 horas).	Cualquier hora, día o noche.
Abundancia de plancton	Mueren algas y zoopláncteres presentes en el agua.	Abundancia de una especie determinada de alga, pequeño zooplancton presente.	Si el tóxico es un insecticida no hay zooplancton presente en el agua, pero si hay presencia normal de algas. Si hay herbicida puede haber ausencia de algas.
Oxígeno disuelto	Menos de 2 ppm, usualmente menos de 1 ppm.	Muy alto, usualmente saturado o súper saturado cerca de la superficie.	Rango normal.
pH del agua	6.0-7.5	9.5 o superior	7.5-9.0.
Color del agua	Marrón, gris o negro.	Verde oscuro, marrón, o dorado, a veces con olor a humedad.	Color normal, ningún o muy poco olor inusual
Floraciones de algas	Muchas células de algas muertas y moribundas en las muestras de agua.	Abundantes algas, predominantemente de una especie.	Floración normal de especies mixtas a menos que involucre herbicida, luego ausencia de algas o reducción.

típico en los estanques de piscicultura en la estación invernal luego de varios días de frío (Felipe del Pazo *com. pers.*). En la revisión realizada por Donalson y col., (2008) se presentan las respuestas primarias, secundarias y terciarias de los peces ante un shock de bajas temperaturas.

Las muestras de peces deben colocarse en bolsas de plásticas en contenedores con hielo, pero no permitir el contacto directo entre la muestra y el hielo (puede colocarse un cartón grueso entre la bolsa y el hielo). Las muestras de peces frescos son necesarias para estudios de patología, microbiología y análisis de sustancias tóxicas.

Si los peces son de pequeño tamaño o medianos (menos de 20 cm), se deben coleccionar 10 o más especímenes. Si los peces son de gran tamaño (más de 20 cm) coleccionar al menos tres ejemplares de esa especie.

Fijación de especímenes en formol al 10%.

Para la fijación de peces se debe considerar la talla de los mismos. Los peces pequeños (menos de 2-3 cm) se fijan completamente en un recipiente plástico de cierre hermético. En los peces medianos (3 a 6 cm) abrir cuidadosamente la cavidad abdominal y eliminar el opérculo para que el fijador penetre correctamente. Los peces grandes (más de 6 cm) requieren diseccionarse y fijar muestras de tejido/órganos. El fijador de campo más utilizado es formol o formalina al 10% tamponada. Debe tener el recaudo de que el volumen de fijador sea 10 a 20 veces superior al volumen del total de muestras.

Asegúrese de usar guantes de látex y gafas de seguridad para el proceso de fijación de los peces a campo. El contacto directo del formol con la piel, ojos o mucosas o los vapores emitidos por el mismo generan irritación. El frasco de fijador debe estar claramente rotulado con indicaciones respecto a su peligro de uso y debe ser manipulado de manera responsable por personal capacitado.

Para evitar derrames de formol en el vehículo, realice el procedimiento de fijación de las muestras fuera del mismo, selle las tapas de los frascos con cinta y coloque los mismos en una bolsa antiderrames en un contenedor plástico o de telgopor. No almacene el fijador de campo en el vehículo durante períodos prolongados ya que la exposición al calor puede generar vapores de formol.



NOTA IMPORTANTE: En el ANEXO V encontrará los datos de contacto de los laboratorios que pueden darle soporte en el estudio y diagnóstico de mortandades de peces.

3.d. Recolección y envío de peces vivos.

Siempre que sea posible, deben remitirse animales vivos a los laboratorios para que se tomen las muestras necesarias y, si fuera necesario, pueda conservarse material para estudios futuros. Sin embargo, antes de proceder a la recolección de animales vivos, Ud. deberá confirmar que el sistema de transporte seleccionado podrá entregar el material al laboratorio de referencia en un plazo máximo de 8 horas desde que Ud. realizó el procedimiento. También es importante que antes de proceder a la recolección de los peces se contacte con personal del laboratorio a los fines de notificar el envío y asegurarse que alguien recibirá los peces en destino.

• Procedimiento para el envío de peces vivos al laboratorio de diagnóstico:

1. Llene una bolsa plástica resistente con un tercio de agua tomada del mismo cuerpo de agua donde se extraerán los peces.



2. Recolecte peces que presenten signología clínica que pueda relacionarse con la mortandad (peces boqueando en superficie, letárgicos, con hiperpigmentación, con lesiones tegumentarias, etc.).



3. Coloque los peces en la bolsa plástica y complete los dos tercios de la capacidad de la bolsa con oxígeno. Cierre la bolsa torciendo el extremo y coloque una banda elástica bien ajustada para evitar la pérdida de oxígeno.



4. Ponga la bolsa plástica dentro de una caja de telgopor y agregue hielo picado alrededor hasta llegar al mismo nivel de agua existente dentro de la bolsa.



5. Cierre la caja con cinta adhesiva. El formulario de recolección y envío de muestras deberá ser incluido dentro de un folio plástico y pegado en la tapa de la caja.



3.e. Recolección y envío de muestras para histopatología.

Cómo se mencionó más arriba, el envío de ejemplares vivos será la primera elección ya que el patólogo por su experiencia sabrá qué órganos extraer para arribar a un diagnóstico correcto en función de las lesiones que se presenten en cada caso en particular. Sin embargo, si no es posible enviar los peces vivos, Ud. puede recolectar las muestras y fijarlas de acuerdo al siguiente procedimiento antes de enviarla al laboratorio de referencia.



NOTA IMPORTANTE: La histopatología es un método de diagnóstico cuyo objetivo es determinar la causa o naturaleza de una lesión o enfermedad mediante el estudio microscópico de los tejidos. **Para ello, se requiere tomar muestras de TODOS LOS ÓRGANOS y de TODAS LAS LESIONES que se observen de acuerdo al protocolo de necropsia de manera completa, ordenada y sistemática descrito en el Anexo II.**

Si la necropsia va a ser realizada en animales que se encontraron muertos, es importante que se tenga la certeza que no ha transcurrido más de 6 horas desde la muerte de los mismos. Esta ventana de tiempo desde la muerte al momento de realizar la necropsia puede ser menor si existen elevadas temperaturas como en el NEA-NOA de nuestro país. Con posterioridad a ese tiempo, las muestras pueden haber sufrido procesos autolíticos que enmascaren las lesiones y por tanto invaliden su valor diagnóstico.

NO CONGELAR NUNCA tejidos destinados a histopatología clásica.

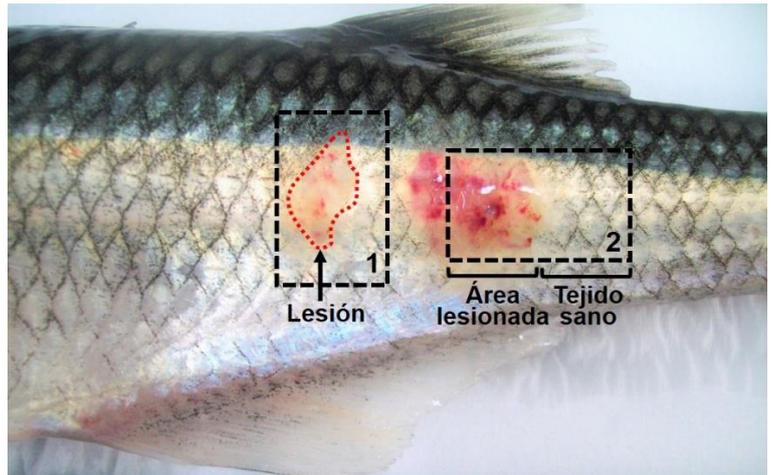
- Procedimiento para la toma y el envío de muestras fijadas al Laboratorio de Histopatología:

Siguiendo el protocolo de necropsia descrito en el Anexo II, para cada órgano realice lo siguiente:

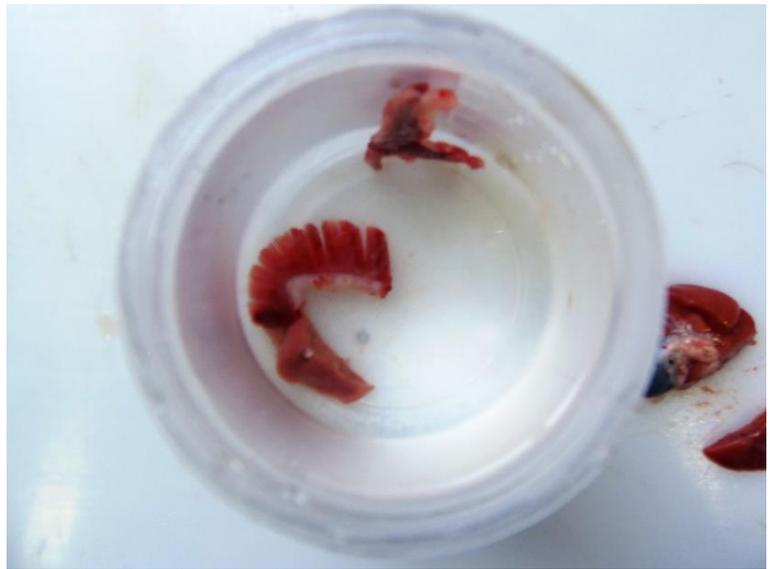
1. Corte el órgano en secciones transversales o longitudinales. Para la correcta fijación de la muestra (en formol al 10%), **el espesor de la muestra no debe superar los 0,5 cm**, mientras que el largo y alto pueden ser de tamaños variables.



2. Si observó alguna lesión/es, es importante incluir en la muestra toda la lesión (1). En el caso de ser muy grande, se puede tomar uno o varios fragmentos que contengan áreas representativas de la lesión junto con tejido sano adyacente (2).

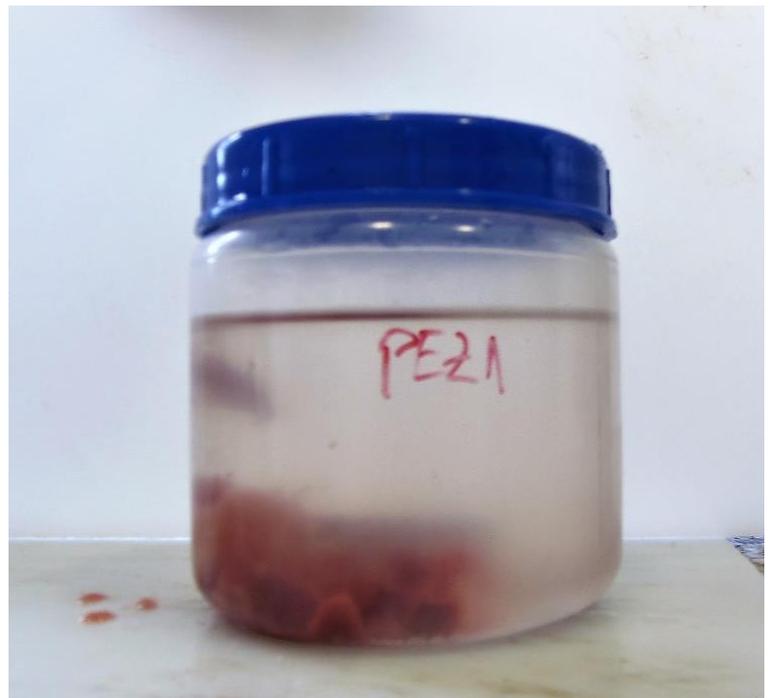


3. Sumerja las muestras de las lesiones y los restantes órganos en el formol al 10 % (puede consultar como prepararlo en el Anexo IV de este manual), previamente colocado en un envase de plástico de boca ancha, con tapa a rosca y cierre hermético.



4. El volumen de formol debe ser 10 a 20 veces mayor al volumen de las muestras. Asegúrese que el frasco no pierda fijador.

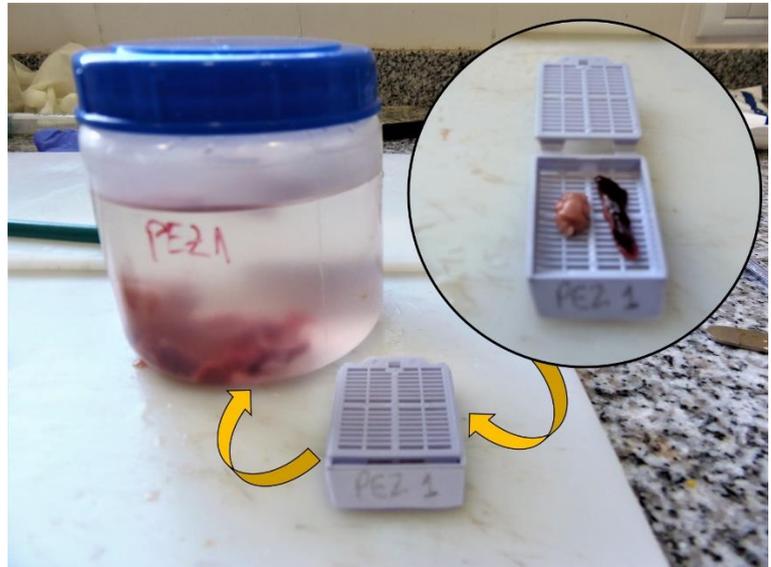
5. Rotular con marcador indeleble en el recipiente (en el cuerpo y la tapa), con una referencia, código y/o datos pertinentes al muestreo (fecha y lugar de muestreo, especie, etc). Ejemplo: Pez 1.





NOTA IMPORTANTE: Si las muestras de tejido flotan en el fijador, colocar por encima de ellas algodón o gasa para que los tejidos queden completamente sumergidos en el formol. Controlar que las muestras no queden adheridas al fondo del envase o entre sí.

6. En casos de ser necesario identificar o individualizar una muestra en particular, las muestras pueden colocarse por separado en casetes.



7. Coloque el o los frascos dentro de una caja de telgopor. Si los frascos son de vidrio, ponga papeles de diario entre ellos para que no se rompan. **NO** debe adicionarse hielo para remitir las muestras fijadas en formol.



8. Cierre la caja con cinta adhesiva. El formulario de recolección y envío de muestras deberá ser incluido dentro de un folio plástico y pegado en la tapa de la caja.



NOTA IMPORTANTE: Si debe remitir larvas, alevines o juveniles o adultos de menos de 2-3 cm de longitud pueden colocarse enteros en el formol al 10%. Si es posible, realice una incisión en la región ventral del abdomen para que penetre el formol en la cavidad. En el caso de peces de 3 a 6 cm de longitud, primero remueva los opérculos (ver Anexo II), realice una incisión en la región ventral del abdomen para que penetre el formol en la cavidad celómica y colóquelos enteros en el fijador.

3.f. Recolección y envío de muestras para estudios toxicológicos en tejidos de peces.

En lo posible colecte peces enteros, en el caso que no tenga posibilidades debido al tamaño de los mismos debe seguir el protocolo de necropsia descrito en el Anexo II para la extracción y preservación de las muestras de hígado, músculo, gónadas (ovarios o testículos) y branquia:

1. Identifique la especie de pez. Registre el largo total (cm), el largo estándar (cm) y el peso del espécimen (g).



2. Extraiga los órganos a estudiar con instrumental no metálico (pinzas plásticas, cuchillo de cerámica) y péselo en una balanza lo más precisa posible. Registre el peso y colóquelo en un sobre de papel de aluminio rotulado dentro de una bolsa y póngalo en frío.



NOTA IMPORTANTE: Si las muestras de tejido son extraídas en el laboratorio debe garantizar que las mismas estén en frío desde la colecta de los peces hasta el laboratorio. Las medidas morfométricas (longitud, longitud estándar y peso) deben ser tomadas *in situ*. Si los órganos son extraídos *in situ* deben estar en frío.



3.g. Recolección y envío de muestras para estudios bacteriológicos.

Para los estudios bacteriológicos lo ideal es el envío de animales vivos siguiendo el procedimiento de Recolección y envío de peces vivos descrito en el apartado **3.d.** de este manual.

Si no pueden enviarse los peces vivos, la forma más sencilla de remitir muestras al Laboratorio de Bacteriología es a través del envío de peces muertos o eutanasiados **RECIENTEMENTE**, enteros y refrigerados.

- Procedimiento para el envío de peces refrigerados al Laboratorio de Bacteriología:

1. Recolecte peces que presenten signología clínica que pueda relacionarse con la mortandad (peces boqueando en superficie, letárgicos, con hiperpigmentación, con lesiones tegumentarias, etc.).



2. Sacrifique los peces con un anestésico siguiendo el método descrito en el Anexo II. Si no dispone de anestésico, puede sumergir los peces en agua con hielo (o refrigerantes) a 0°C hasta comprobar el cese de la actividad respiratoria. Este método puede requerir bastante más tiempo en especies aclimatadas a bajas temperaturas como los salmónidos.



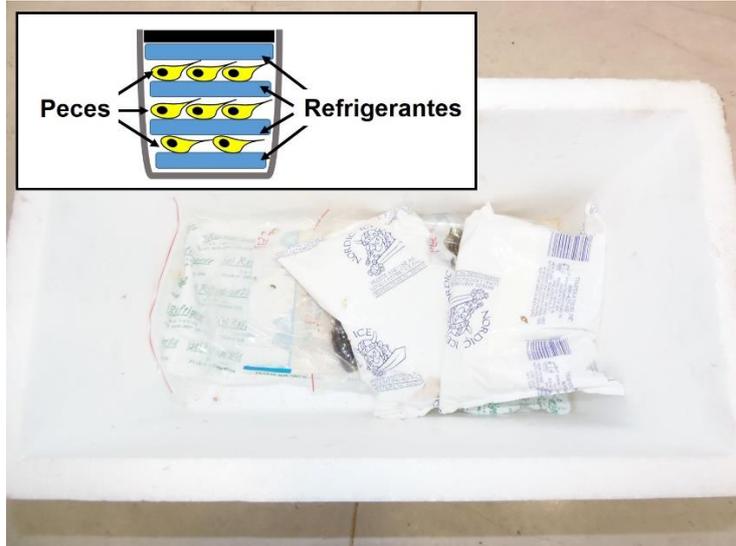
3. Coloque cada pez en bolsas individuales (un pez en cada bolsa para evitar contaminación entre ejemplares) tipo Ziploc. Si los peces son pequeños pueden agruparse en la misma bolsa siempre que hayan sido extraídos de la misma unidad de cultivo o área afectada.



4. En una caja de telgopor, coloque una capa de bolsas refrigerantes congeladas. Sobre las mismas deposite las bolsas con los peces remitidos cuidando que las bolsas no se encimen.



5. Agregue una nueva capa de bolsas refrigerantes. Si los peces a remitir no entran en una sola capa, puede alternar capas de peces y capas de bolsas refrigerantes.



6. Cierre la caja con cinta adhesiva. El formulario de recolección y envío de muestras deberá ser incluido dentro de un folio plástico y pegado en la tapa de la caja.



NOTA IMPORTANTE: El traslado de peces remitidos refrigerados no debería demorar más de 24 horas desde que son embalados hasta que son recibidos en el Laboratorio de Bacteriología.

Si no pueden remitirse los peces vivos ni muertos refrigerados para cultivo de microorganismos, existe una tercera alternativa. Esto es, tomar muestras a campo, aunque la metodología es engorrosa para personal no experimentado. La recolección de muestras para bacteriología debe realizarse en las condiciones “lo más **ASÉPTICAS** posibles” y usando materiales estériles.

- Procedimiento para la toma de muestras para su envío al Laboratorio de Bacteriología:

El procedimiento de toma de muestras para bacteriología puede variar de acuerdo a la disponibilidad de materiales y enfermedades determinadas. Durante la necropsia se pueden tomar muestras para microbiología, tomando las medidas necesarias para evitar contaminaciones (ver TÉCNICA 1). Si durante la necropsia, el riesgo de contaminación es elevado, es recomendable utilizar una técnica sencilla y rápida de muestreo accediendo directamente al riñón (ver TÉCNICA 2).



NOTA IMPORTANTE: En el muestreo para Bacteriología debe:

- Colocar cada muestra en un recipiente o bolsas individuales. **ROTULAR.**
- Cada muestra debe ser identificada escribiendo con un rotulador indeleble en el envase (frasco, bolsa, medio de transporte) o etiqueta del envase el tejido/órgano acompañado de información adicional pertinente, referencia o código.
- Remitir **RÁPIDAMENTE** y **REFRIGERADO** al laboratorio.
- **NO CONGELAR** muestras para bacteriología.
- NO Enviar muestras de animales **TRATADOS** con antibióticos.

Los materiales básicos necesarios para la toma de muestras para estudios bacteriológicos se muestran en las siguientes fotografías.



Entre ellos podemos mencionar:

1. Tijeras de diferentes modelos (Mayo, Metzembraum, Iris) y tamaños
2. Pinzas (de disección, Adson)
3. Mangos de bisturí (N° 3 o 4)
4. Hojas de bisturí (N° 11, 15, 20, 22 o 24)
5. Guantes de látex
6. Jeringas
7. Agujas de distinta longitud y calibre

8. Recipientes estériles de distinto tamaño (frascos, tubos Falcom, crioviales)
9. Alcohol 70°, 96° y alcohol iodado (ver preparación en Anexo IV)
10. Hisopos estériles y medios de cultivo para transporte (Stuart, Cary Blair)
11. Rotulador indeleble
12. Bolsas de polietileno nuevas

A. Recolección de muestras para Bacteriología mediante TÉCNICA 1.

1. La toma de muestras debe realizarse usando material estéril o desinfectar previamente los instrumentales sumergiendo el extremo de los mismos en alcohol 96° y dejar secar.



2. Si fuera posible, inmediatamente luego de sumergir el extremo del instrumental en alcohol, flaméelos con llama de mechero de alcohol o encendedor.



NOTA IMPORTANTE: Dejar enfriar el instrumental. **NO** tomar la muestra con instrumentos mojados con alcohol o calientes porque puede afectarse el crecimiento de los microorganismos.

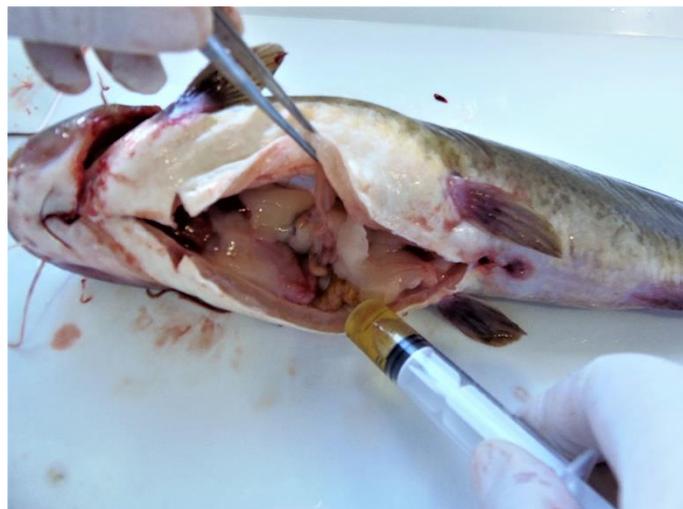
3. Coloque las muestras de tejido en recipientes estériles herméticos (frascos, tubos, crioviales) o bolsas de polietileno con cierre metálico o zip o anudando fuertemente.



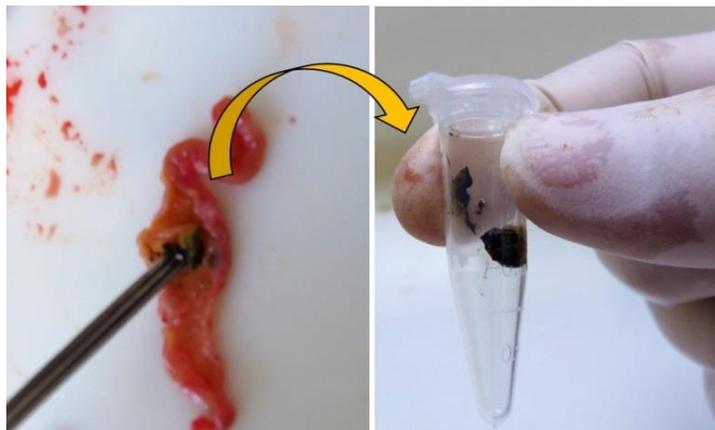
4. En tejidos y órganos macizos (hígado, riñón, músculo, etc.) realice un pequeño corte o incisión en el tejido y frote un hisopo estéril dentro de la hendidura. Para tomar muestras de órganos tubulares (estómago, intestino), abra el órgano y frote el hisopo sobre la superficie interna.



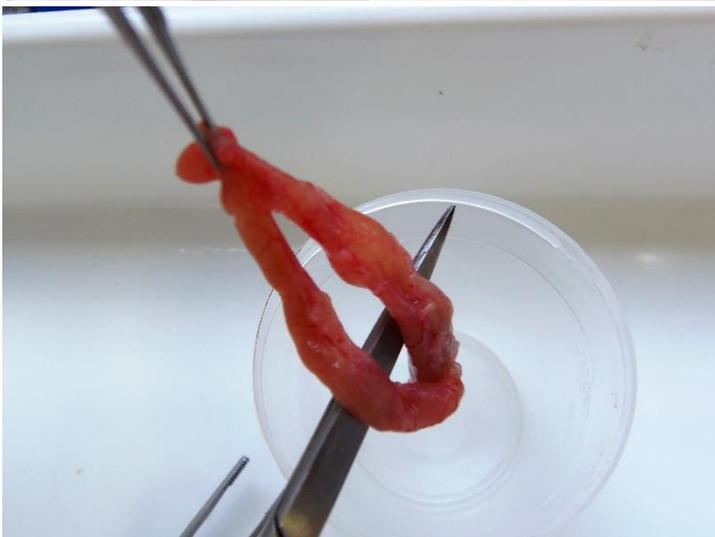
5. Si existe líquido acumulado en la cavidad celómica, embeba un hisopo estéril y posteriormente colóquelo en medio de transporte. También puede recolectarse con jeringa y aguja estériles, y colocar el material en recipientes estériles, o remitirlas dentro de la jeringa con la cual se efectuó la extracción del líquido.



6. Si hay contenido intestinal coléctelo con material estéril como una cánula o punta de bisturí y colóquelo en recipientes estériles.



7. También puede remitir el intestino completo o un segmento de intestino en un recipiente estéril.



8. Identifique cada muestra con un rotulador indeleble en el envase (frasco/ bolsa/ criovial). Colóquelas dentro de una caja de telgopor con refrigerantes por debajo y por encima de las muestras.



9. Cierre la caja con cinta adhesiva. El formulario de recolección y envío de muestras deberá ser incluido dentro de un folio plástico y pegado en la tapa de la caja.



NOTA IMPORTANTE: En caso de infecciones sistémicas (y en cualquier caso, de forma rutinaria) debemos enviar muestras de riñón anterior, bazo, hígado y encéfalo. En caso de detectar lesiones específicas (erosiones, úlceras, lesiones en órganos internos, líquido intraabdominal) deben tomarse además, muestras de las mismas.

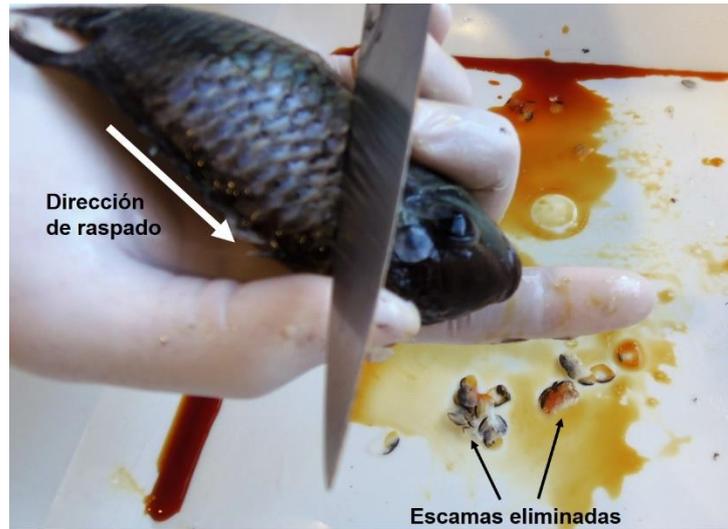
B. Recolección de muestras para Bacteriología mediante TÉCNICA 2.

1. Si el pez está vivo realice la eutanasia de acuerdo a lo indicado en los pasos 1 y 2 del *Procedimiento para el envío de peces refrigerados al Laboratorio de Bacteriología.*

2. Lave todo el pez con solución de alcohol yodado (ver preparación en Anexo IV).



- 3.** Elimine las escamas raspando la piel del pez con el lomo de un cuchillo (borde opuesto al filo) con movimientos desde la cola a la cabeza.



NOTA IMPORTANTE: Para evitar contaminación de la muestra es fundamental eliminar todas las escamas, sobre todo aquellas localizadas en el área donde se realizará el corte para introducir el hisopo.

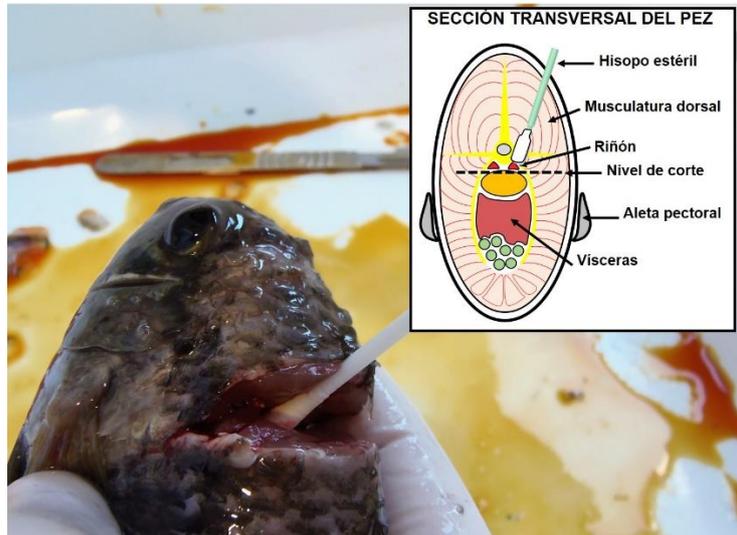
- 4.** Una vez eliminadas todas las escamas, vuelva a lavar todo el pez con la solución de alcohol iodado.



- 5.** Realice un corte transversal profundo con bisturí o cuchillo estéril por detrás de la cabeza del pez. Este corte debe involucrar piel, musculatura y columna vertebral hasta acceder al riñón, el cual se localiza inmediatamente por debajo de la columna.



- 6.** Recolecte la muestra frotando la punta de un hisopo estéril en el interior del riñón.



- 7.** Coloque el hisopo en un medio de cultivo para transporte y envíelo refrigerado al Laboratorio de Bacteriología.



3.h. Registro de variables fisicoquímicas del agua en el lugar y momento de muestreo.

Los parámetros fisicoquímicos a determinar *in situ* son temperatura (°C), oxígeno disuelto (mg/l), pH, amonio total (mg/l), conductividad ($\mu\text{m/S}$) y salinidad (UPS, en caso de que sea un ambiente estuarial, marino o salobre). Estos parámetros pueden determinarse con equipo de campo básico por ejemplo sondas multiparamétricas.



Determinación de muestras de agua con sondas multiparamétricas.

Las sondas se deben calibrar previamente y su calibración debe ser incorporada en el registro de los valores medidos. Los valores de los parámetros fisicoquímicos deben ser registrados en los apartados correspondientes de los formularios I o II que figuran en el Anexo III.

3.i. Recolección y envío de muestras para análisis de agua.

La colecta de muestras de agua debe realizarse en el lugar donde están los peces muertos. En lo posible en un recipiente (botella) nuevo o si no reciclado limpio de agua mineral. El volumen colectado sin cámara de aire (esto se logra dejando rebalsar completamente el recipiente) debe ser de 500 ml ($\frac{1}{2}$ Litro) para análisis físico-químico general o de 1000 ml (1 Litro) para una análisis físico-químico completo. El recipiente se debe enjuagar tres veces con el agua de donde se colectará la muestra a analizar.



Colecta de muestras de agua.

En el caso de que el cuerpo de agua a muestrear sea somero (laguna, arroyo, río) o **de un estanque de acuicultura**, la botella será sumergida a una cierta distancia del fondo (50 cm) y de la superficie, lejos de las orillas o de los bordes y evitando remover el fondo. Si el cuerpo de agua es

profundo (por ejemplo, un **lago**), hay que escoger varios puntos de toma a diferentes profundidades. Esto se logra con un equipamiento especial (botella Niskin) o una bomba especial.

Las muestras deben preservarse refrigeradas a 4 °C, pudiéndose lograr esto colocando los recipientes con las muestras en conservadoras con hielo o con geles refrigerantes para llevarlas al laboratorio antes de las siguientes 24-36 hs.

3.j. Recolección y envío de muestras para análisis de sedimentos.

La recolección de sedimentos debe realizarse en lo posible en el área donde están los peces muertos, en caso de no poderse por la profundidad excesiva se puede muestrear una zona costera próxima, indicándolo en el rótulo del envase. Las muestras pueden ser colectadas con una pala o una draga. De tener dicho equipamiento, el volumen aproximado de muestra puede ser de 250g a 500g.



Colecta de muestras de sedimento

Las muestras deben ser colocadas en un frasco de boca ancha rotulado sin dejar en lo posible cámara de aire, o bien guardarse en bolsas de cierre hermético rotulado con el número de muestra y su lugar de recolección, fecha y hora de la recolección de la muestra. Los residuos de los cuerpos de agua como rocas, palos y hojas, etc., deben eliminarse de las muestras de sedimentos.

Las muestras deben ser preservadas refrigeradas a 4 °C (no congelar) para análisis en el laboratorio. En el caso de ser necesario por cuestiones legales se debe acompañar cada envío de muestra con un formulario de cadena de custodia.

4. ¿Qué debemos hacer DESPUÉS de un brote de enfermedades o mortandades masivas?

A *posteriori* de un evento de mortandad en cuerpos de agua hay que desarrollar diferentes acciones como ser el informe del evento, el análisis del protocolo seguido para evaluar si funcionó y hacer eventualmente ajustes, comunicar a la población, e incluir los datos en una base de datos. En el caso de mortandades presentes en cultivos deberán darse los pasos previstos por SENASA.

Los informes o reportes deben incluir los resultados del análisis de las muestras, la identificación georeferenciada del evento, las conclusiones de las posibles causas del mismo. El informe debe incluir todos los aspectos analizados y debe difundirse públicamente por las autoridades competentes.

Por otro lado, el análisis de la respuesta y el seguimiento del protocolo deben ser realizados a fin de facilitar una mejora continua en la eficiencia de la respuesta y preparación para otras emergencias. Es importante para confirmar lo que funcionó bien y lo que no, analizar bien las lecciones aprendidas e incorporar en los planes de respuesta, protocolo y capacitaciones dichos ajustes para mejorar la gestión de incidentes futuros. En esta etapa deben participar todos los organismos gubernamentales involucrados en dar respuesta en el evento y es una oportunidad para que los involucrados logren cerrar el tema del evento de mortandad y ajustar futuras acciones.

Finalmente, la comunicación de las conclusiones del informe también debe ser emitida en un comunicado de prensa final a las partes interesadas, tomando nota de que el incidente está oficialmente cerrado. Esta comunicación debe ser consensuada entre los organismos involucrados y tener de base el informe realizado.

Los organismos gubernamentales involucrados deben tener copia de los análisis y del informe realizado. Por otro lado, es recomendable la generación de una base de datos accesible o de datos abiertos donde se incluyan los datos obtenidos de manera sistematizada junto a los de otras mortandades.

4.a. Destino de peces moribundos o muertos.

Los peces muertos deben ser recolectados en su mayoría del cuerpo de agua y de las costas y ser llevados a un relleno sanitario y cubiertos por tierra, no deben quedar expuestos. En el caso de no contarse con un relleno sanitario, los peces deben colectarse y enterrarse lejos de cuerpos de agua o en lugares altos donde las napas de agua estén profundas. Debe tenerse la precaución que ni personas, ni animales domésticos, ni animales carroñeros tengan contacto con los peces muertos, a fin de evitar cualquier tipo de contaminación o de transmisión de potenciales enfermedades zoonóticas.

Nunca es recomendable dejar los peces muertos en el cuerpo de agua, ya que su descomposición aumentaría las posibilidades de eutrofización del ambiente acuático y por ello se podrían generar *a posteriori* floraciones algales, las cuales en algunos casos pueden generar toxinas como microcistina que deterioran la calidad del agua para distintos usos y que generan riesgo para la salud de la población humana.

4.b. Disposición final del material utilizado para los muestreos.

El material utilizado en los muestreos debe lavarse y limpiarse de acuerdo a los protocolos habituales de laboratorio. En el caso de ser necesario las muestras de tejidos deben tratarse como residuos patogénicos una vez hecho los correspondientes análisis. Las muestras de agua y sedimento también se descartarán luego de los análisis siguiendo los protocolos habituales que implementarán los Laboratorios que las hayan determinado. En el caso de que las muestras hayan sido extraídas con cadena de custodia, las mismas se presentarán en heladera el tiempo necesario hasta que las autoridades judiciales competentes involucradas en la custodia de las muestras indiquen que se pueden descartar. Los reactivos utilizados en los muestreos serán descartados en bidones y procesados y tratados como efluentes de laboratorio siguiendo las normas de Higiene y Seguridad de la institución que hace las determinaciones químicas.

ANEXOS

ANEXO I

Anatomía de los peces

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente anexo es realizar una aproximación a los aspectos anatómicos generales de los peces, sin entrar en detalles complejos que, además, el lector que desee profundizar podrá encontrar fácilmente en la numerosa bibliografía disponible. Para no utilizar lenguaje técnico que dificulte el entendimiento no se han seguido las normas establecidas en la Nomenclatura Anatómica Veterinaria ya que este material no está dirigido a profesionales veterinarios ni a académicos sino al público en general. Se propone una sencilla descripción de cada sistema, con especial mención sobre las diferencias que puedan observarse entre las especies al momento de realizar la necropsia y la toma de muestras para su posterior remisión al laboratorio.

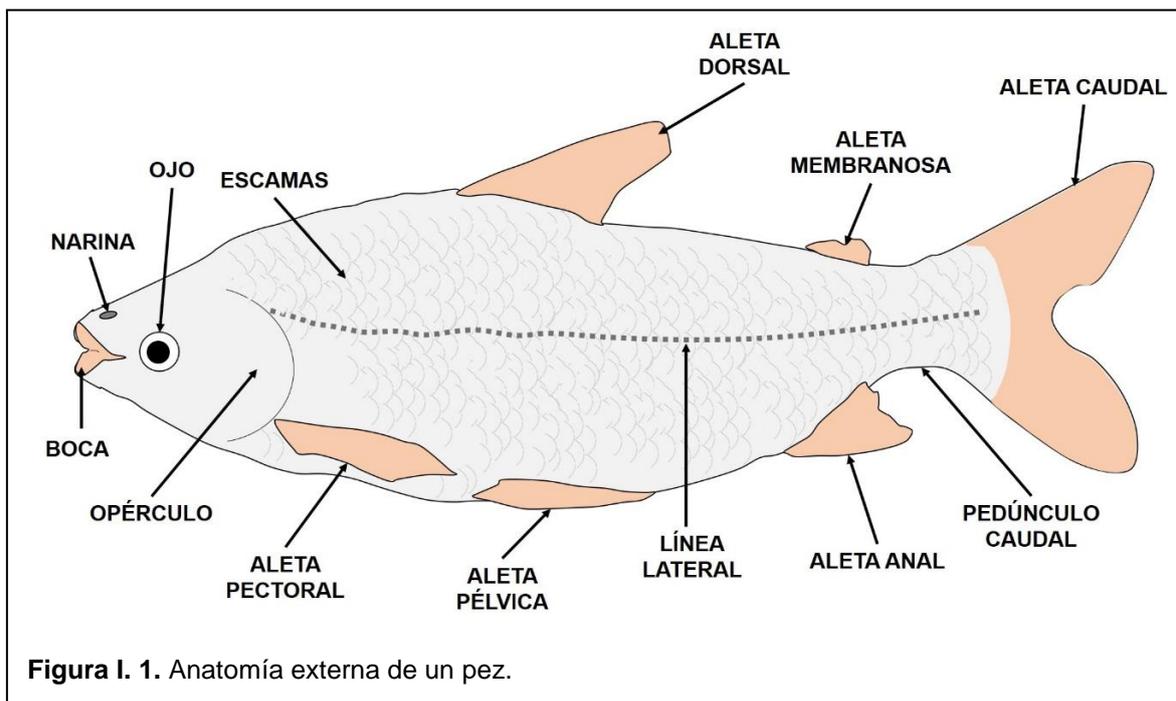
La principal intención es brindar las herramientas necesarias para que el eventual usuario de este manual sea capaz de reconocer no sólo lo que está observando durante el muestreo, sino que también pueda reconocer si lo que está observando es normal o no.

A los efectos de simplificar la comprensión de la anatomía, abordaremos el tema describiendo las características externas de un pez y luego los diferentes sistemas de órganos que lo componen y que, al mismo tiempo, son de interés conocer para realizar el muestreo de manera correcta.

ANATOMIA EXTERNA

La forma corporal de las distintas especies de peces está determinada por la adaptación a los nichos ecológicos que habitan y por el estilo de vida. En los peces que pasan la mayor parte de su vida en la columna de agua (pelágicos), la forma corporal está adaptada para disminuir la resistencia durante el desplazamiento en la misma, por lo que en un corte transversal de los mismos son subcirculares o comprimidos lateralmente.

En los peces de fondo (bentónicos), la forma puede ser aplanada dorsoventralmente como en las rayas, o bien pueden estar apoyados en un flanco del cuerpo como en el caso de los lenguados de río. Por lo general los peces poseen dos aletas pectorales, dos aletas pélvicas, una aleta anal, una o dos aletas dorsales (la segunda aleta es membranosa o adiposa) y una aleta caudal (Figura I.1).



A ambos lados del cuerpo se puede observar una **línea lateral**, que participa en la percepción sensorial del entorno.

Internamente, los peces presentan cavidades que alojan a los órganos de los distintos sistemas que regulan y ejecutan las funciones básicas para el desarrollo, crecimiento y reproducción. Las más importantes son las cavidades celómica, craneana, opercular y pericárdica (Figura I.2).

A continuación, se describen los sistemas y órganos más importantes.

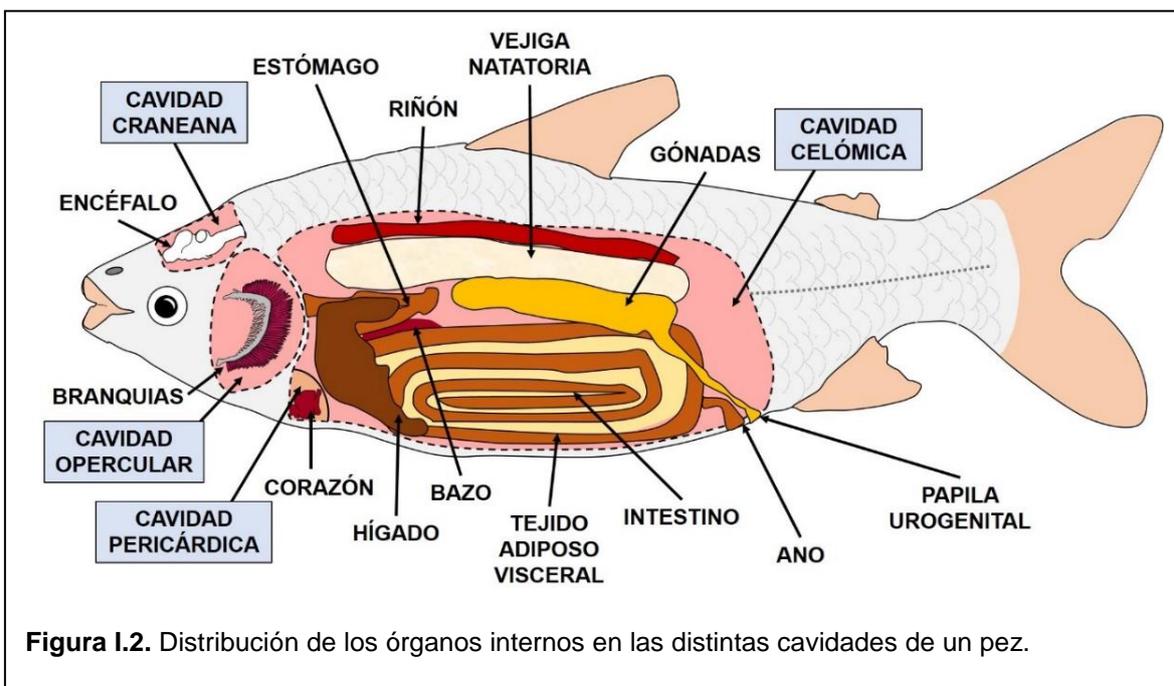


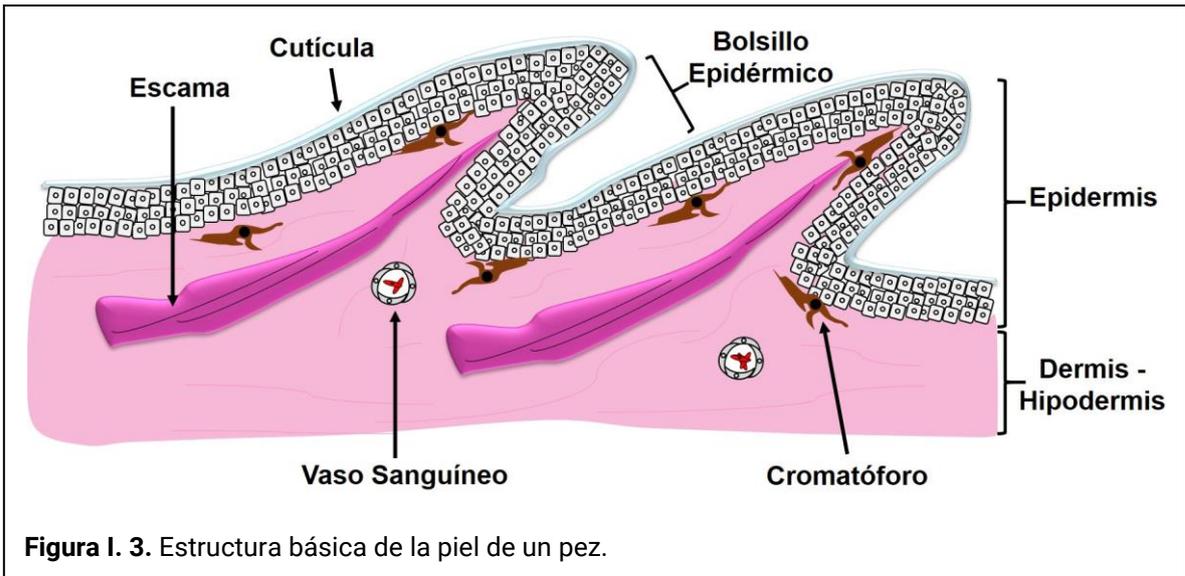
Figura I.2. Distribución de los órganos internos en las distintas cavidades de un pez.

SISTEMA TEGUMENTARIO (PIEL Y ANEXOS)

La piel es la primera barrera de defensa que poseen los peces para protegerse del medio en que se encuentran inmersos, ya que en el agua pueden encontrarse múltiple cantidad de agentes con diferente grado de agresividad para los peces como *tóxicos, bacterias, hongos, parásitos, etc.*

A los fines prácticos, dividiremos al tegumento en dos capas fundamentales. Una capa superficial, compuesta por la **epidermis** y la **cutícula**, más externa (Figura I.3). La cutícula es una capa fina de aspecto mucoso, transparente, que recubre superficialmente todo el cuerpo del pez y que cumple importantes funciones de defensa. Esta capa es producida y secretada por la epidermis, encargada también de otorgar la resistencia mecánica y de participar activamente en la cicatrización de las heridas.

La capa profunda, está formada por la **dermis-hipodermis**, encargada de aportar la nutrición e inervación a la epidermis, así como también alojar a las células de defensa y a las células cromatóforas responsables de otorgar la coloración característica a cada especie. En la dermis se encuentran también alojadas las *escamas* (Figura I.3). A su vez, estos anexos se recubren por la epidermis que se encuentra superficialmente, a modo de un *"bolsillo epidérmico"*. En este bolsillo se alojan normalmente bacterias que pueden ser potencialmente patógenas si se pierde la integridad de la epidermis. Por ello al momento de manipular los animales vivos que serán devueltos posteriormente al agua es importante hacerlo con cuidado, ya que el desprendimiento ocasional de las escamas determina una pérdida local de la barrera de defensa física con el consecuente incremento de la susceptibilidad a infecciones.



SISTEMA RESPIRATORIO

Los peces respiran por las **branquias**. Este órgano se localiza a ambos lados de la cabeza dentro de la cavidad opercular (Figuras I.2 y I.4). En dicha cavidad se encuentran ocho arcos branquiales rígidos (cuatro del lado izquierdo y cuatro del lado derecho) que proyectan caudalmente hileras de filamentos muy finos a modo de "peine" (Figura I.5). Estos filamentos le dan a la branquia el color rojo brillante (color sangre) y es el sitio donde se produce el intercambio de oxígeno entre el agua y la sangre de los peces. En el borde craneal de los arcos branquiales se encuentran las espinas branquiales (Figura I.5).

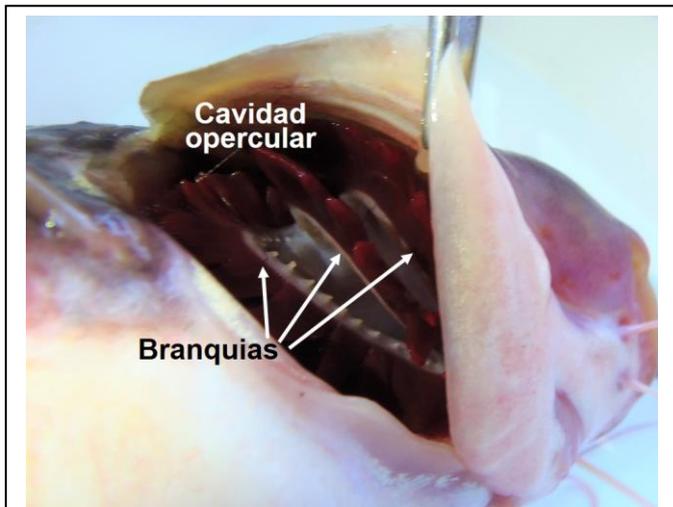
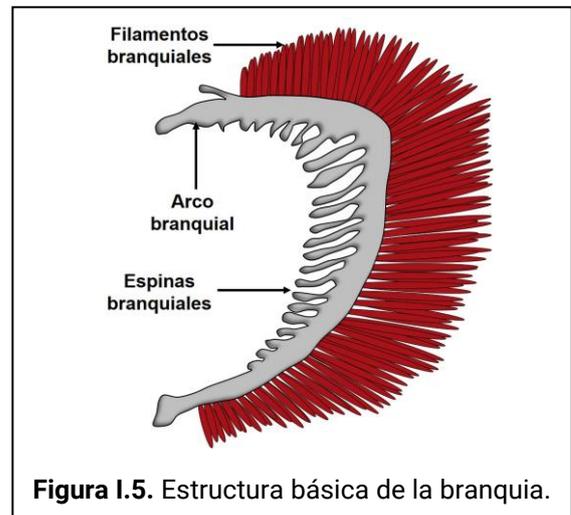


Figura I.4. Localización de las branquias en la cavidad opercular.

Estas estructuras son de color blanquecino como los arcos braquiales y presentan distinto grado de desarrollo (más cortos o más largos) en las diferentes especies de acuerdo al hábito alimenticio ya que pueden participar en el filtrado del alimento. También protegen a los filamentos branquiales atrapando partículas suspendidas en el agua que pueden lesionarlos mecánicamente.



SISTEMA DIGESTIVO.

El sistema digestivo está formado por el tubo digestivo, que empieza en la boca y termina en el ano, y las glándulas anexas.

La estructura del tubo digestivo presenta gran variabilidad entre las especies ya que, en gran medida, las diferentes adaptaciones morfológicas que se presentan dependen de la gran diversidad de hábitos alimenticios. De manera simple podemos describir al tubo digestivo como un conducto por el que es transportado el alimento para ser digerido, absorbido, y luego ser excretados los desechos producidos. Este tubo está formado por distintos órganos asociados que desde la región craneal a la caudal se denominan bucofarínge, esófago, estómago, intestino y ano. Algunas especies pueden presentar ciegos pilóricos que comunican con el tubo digestivo.

La **cavidad bucofaríngea** está limitada cranealmente por los labios y caudalmente por el esfínter esofágico. En la porción posterior, a ambos lados, se encuentran ubicados los arcos branquiales.

La abertura oral presenta diferentes posiciones, generalmente de acuerdo al hábito alimentario y al nicho ecológico en el que habita la especie. Las posiciones **dorsal** (comunes en peces que comen insectos y frutas) y **terminal** se encuentran en peces del tipo *pelágico* (que pasan la mayor parte de su vida en la columna de agua), mientras que la posición **ventral** se encuentra en especies del tipo *bentónicas* (viven en el fondo) (Figura I.6). Aunque generalmente no existe actividad masticatoria, algunas especies tienen la capacidad de macerar el alimento con la dentición faríngea de manera de preparar el alimento para una digestión más eficiente.

El **esófago** es un órgano tubular hueco, corto y distensible para poder contener piezas de gran tamaño y, al mismo tiempo, con buen desarrollo muscular de manera poder regurgitar el alimento que, una vez deglutido, no sea aceptado por el pez. Es la porción encargada de transportar el alimento hacia las regiones encargadas de digerirlo.

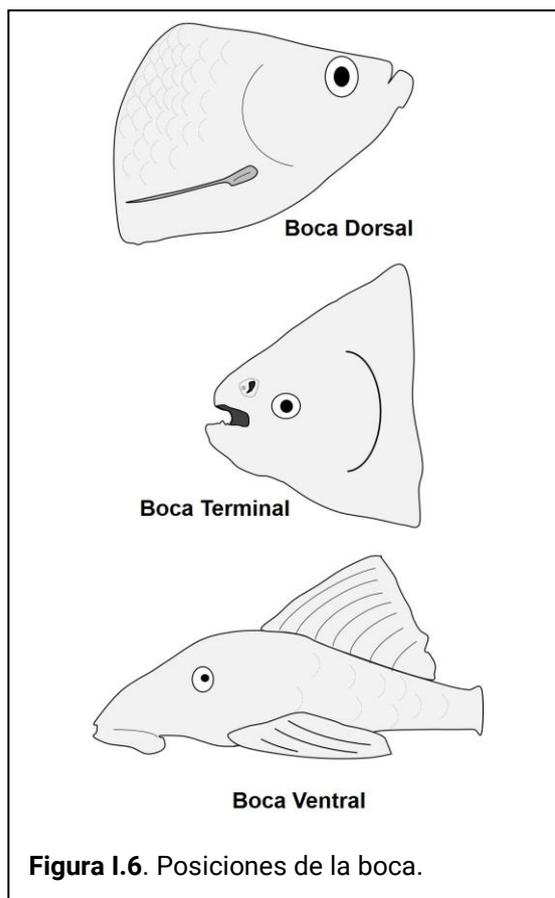
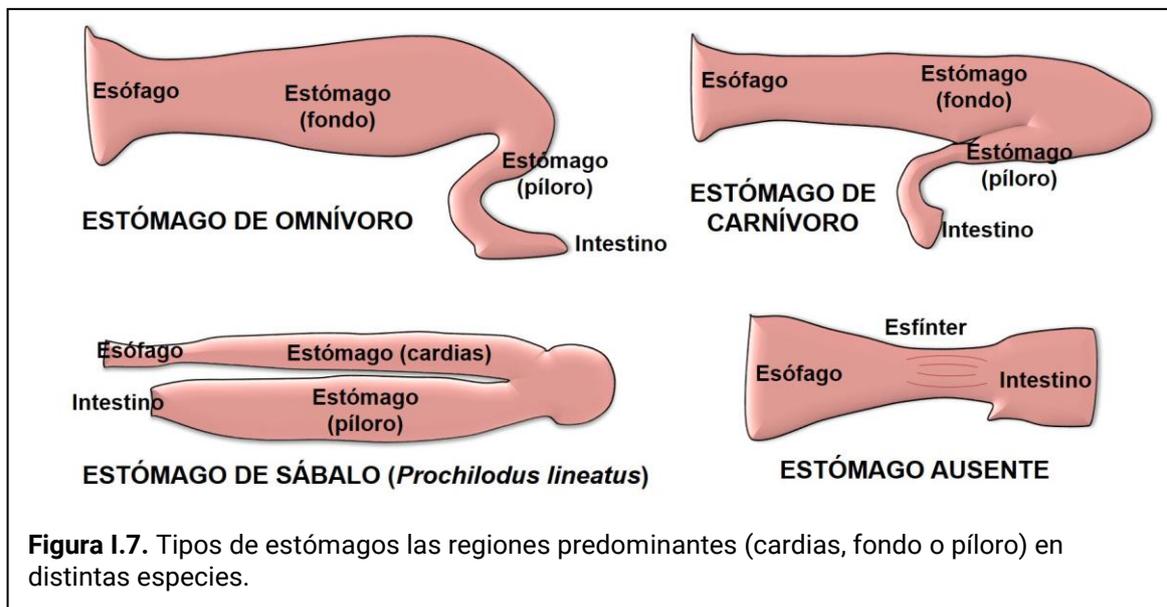


Figura I.6. Posiciones de la boca.

El **estómago** es una dilatación del tubo digestivo que, cuando está presente, tiene distinto grado de desarrollo en las diferentes especies. El estómago puede presentar tres regiones: cardias, fondo y píloro, cada una de ellas con distinto desarrollo en las distintas especies. En aquellas orientadas hacia la piscivoría (especies como el dorado que comen otros peces) el estómago presenta un mayor desarrollo del *fondo*, encargado de producir la secreción ácida característica y muy necesaria para digerir las piezas capturadas. En estas especies, se observa macroscópicamente que la dilatación pareciera posicionar lateralmente la salida del estómago (*píloro*) pudiendo encontrarse estómagos que tienen forma de "sifón" o se asemejen a las letras "J" o incluso una "U", en lugar de continuarse longitudinalmente con el intestino. Una mención especial merece el caso del sábalo (*Prochilodus lineatus*) cuya base alimentaria son los detritus orgánicos presentes en el barro. En esta especie, el estómago tiene forma característica en "V" con un píloro

de gran desarrollo muscular, que se observa normalmente de un color rojo intenso, utilizado para macerar y preparar el alimento. Algunas especies como las carpas no poseen estómago (Figura I.7).



El **intestino** es un tubo sencillo que no presenta grandes diferencias anatómicas en su extensión. No obstante, la relación que existe entre la longitud que presenta en las diferentes especies y la longitud corporal del pez permite inferir el tipo de alimentación, siendo mucho más corto en los carnívoros que en los omnívoros y herbívoros. La región posterior está conformada por el recto que desemboca en la papila anal.

Algunas especies pueden presentar asociados a la porción final del estómago o a la porción inicial del intestino unas estructuras huecas en forma de dedos, de similar color al tubo digestivo, conocidas como *ciegos pilóricos*. Su función no está del todo dilucidada, pero se sabe que colaboran con los procesos de digestión. El número y tamaño de estos sacos ciegos varía en las diferentes especies siendo por lo general más numerosos en los peces de alimentación carnívora.

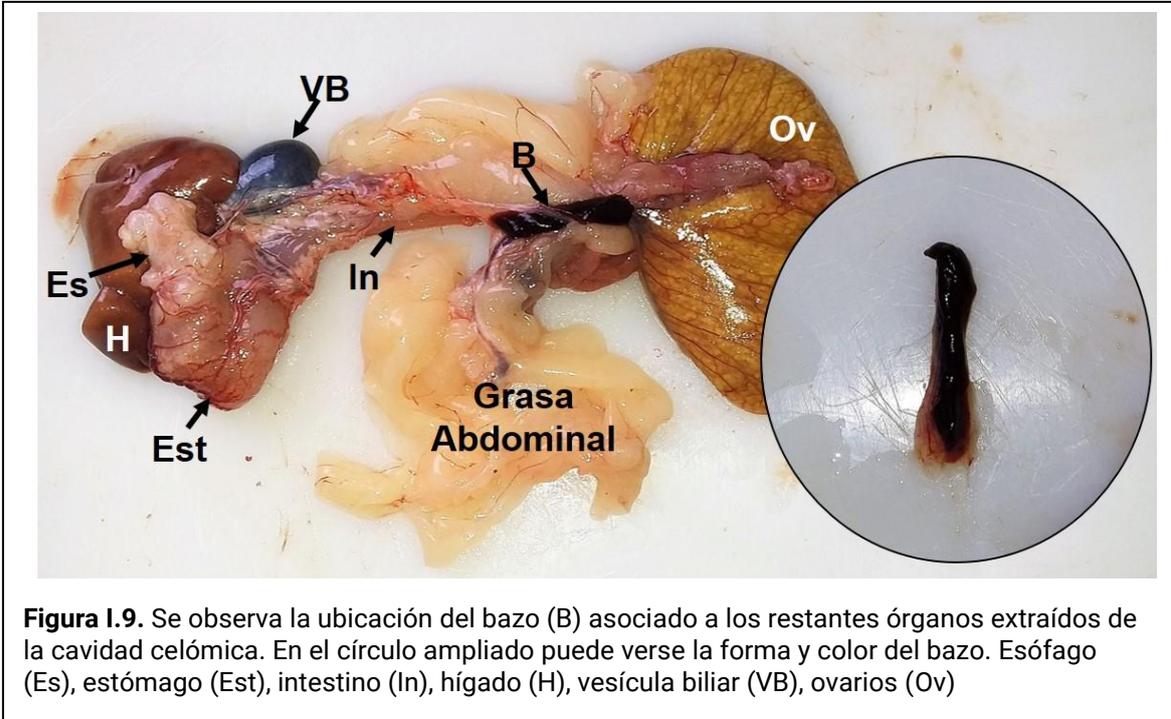
Las glándulas anexas del sistema digestivo están representadas por el hígado y el páncreas. El **hígado** se ubica cranealmente en la cavidad celómica, es de gran tamaño y suele presentar un color marrón rojizo (Figuras I.2 y I.8). Este color se torna más claro en las hembras a medida que se acerca la época reproductiva, ya que es en este órgano donde se sintetizan los componentes del vitelo de los huevos. El hígado puede ser macroscópicamente de estructura simple o estar dividido en lóbulos. Generalmente se asocia a este órgano una vesícula biliar (Figura I.8), de color verdosa, que puede variar de tamaño en las diferentes especies.

El **páncreas** puede estar presente como un órgano individual de color blanquecino y dispuesto entre las asas intestinales y puede confundirse con la grasa abdominal. Algunas especies pueden no presentar un páncreas anatómicamente constituido y en ellas suele estar dentro del hígado formando un *hepatopáncreas*.

Otro órgano que suele encontrarse en la cavidad celómica asociado al paquete visceral del tubo digestivo pero que no tiene relación funcional con él es el **bazo** (Figuras I.2 y I.9). Es un órgano generalmente alargado, de color rojo oscuro homogéneo, y que suele ubicarse por detrás del hígado, lateralmente al estómago. Este órgano tiene una función en la defensa del pez contra microorganismos patógenos por lo que es importante poder reconocerlo para la toma y remisión de muestras al laboratorio.



La *vejiga natatoria*, si bien tampoco pertenece al sistema digestivo, sí se origina embriológicamente a partir de éste. Se encuentra dorsalmente en la cavidad celómica (Figura 1.8) y generalmente se la encuentra llena de gas en la mayoría de las especies. Suele tener una coloración blanquecina nacarada y puede estar dividida en dos o más compartimentos. Su principal función está asociada a regular la flotabilidad del pez.



SISTEMA REPRODUCTOR DE HEMBRAS

Los órganos que probablemente más llaman la atención al momento de abordar la cavidad celómica en la época reproductiva son los **ovarios**. Estos órganos presentan gran variabilidad en las diferentes especies y durante el año, tanto en estructura como en volumen y coloración.

Por lo general hay dos ovarios. En la mayoría de los peces *teleósteos* estos órganos tienen una luz central donde se liberan y almacenan los huevos (*oocitos*), para luego ser transportados hacia la papila genital a través del *conducto ovárico*. No obstante, existen especies como los salmones o esturiones, en las que los oocitos son liberados hacia la cavidad celómica y posteriormente son capturados por un conducto, que no se relaciona anatómicamente con el ovario.

El grado de desarrollo de los ovarios varía con la época del año, ya que en la mayoría de las especies suele involucionar en la temporada no reproductiva. Cerca de la época reproductiva, pueden observarse cargados de huevos y ocupando casi toda la cavidad celómica. Su color varía en las diferentes especies, pudiendo ser color grisáceo o amarillento anaranjado según la especie (Figuras I. 8 y I.9).

SISTEMA REPRODUCTOR DE MACHOS

Los **testículos** están dentro de la cavidad celómica. Su coloración puede variar de un color rosado en períodos de reposo reproductivo (Figura I.10) a blanquecina cuando están cargados de semen en la época reproductiva. Por su forma, pueden encontrarse dos tipos principales de testículos. Los testículos *acintados*, con bordes netos y superficie lisa, y los testículos *tubulares*, que presentan numerosas proyecciones ciegas comunicadas con un conducto central (más común en los *siluriformes*).

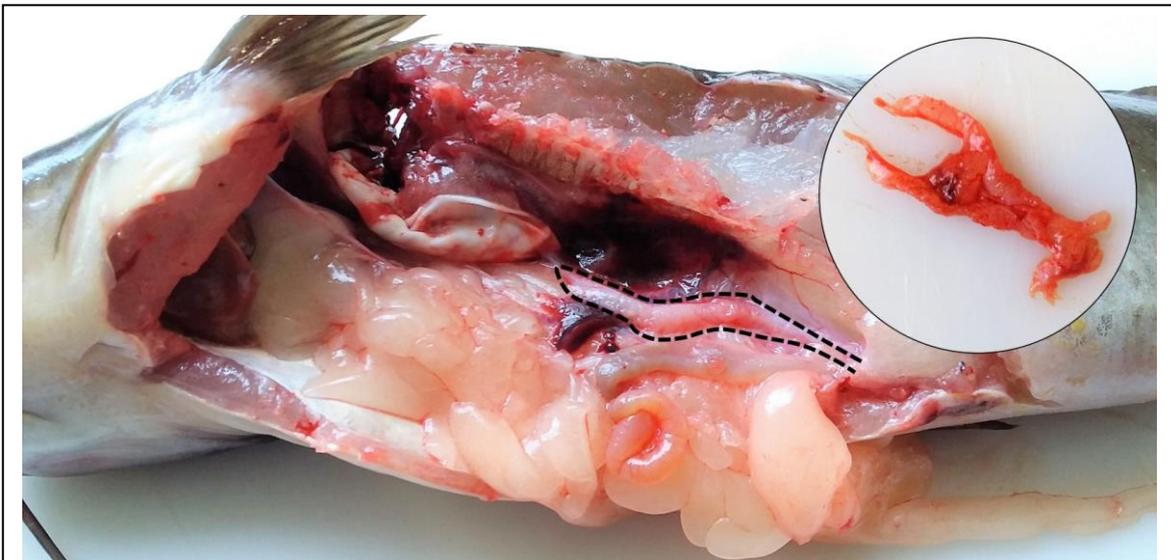


Figura I.10. Se observa la ubicación del testículo izquierdo (línea negra punteada) asociado a los restantes órganos de la cavidad celómica. En el círculo ampliado puede verse la forma y color del testículo en reposo reproductivo.

SISTEMA EXCRETOR RENAL

El **riñón** es un órgano par que se encuentra localizado en el techo de la cavidad celómica por debajo y a ambos lados de la columna vertebral. Para poder observarlo, luego de la apertura de la cavidad celómica es necesario retirar todas las vísceras (incluida la vejiga natatoria). Posee forma alargada pudiendo presentar un ensanchamiento o bifurcación en su extremo craneal (Figura I.11). Es de color rojo oscuro y en algunas especies como el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) puede presentar un puntillado negro visible en la superficie. El órgano es muy lábil y está fuertemente adherido al techo de la cavidad celómica por lo que durante la toma de muestras se debe desprender cuidadosamente para no dañarlo.



El riñón en los peces, además de producir la orina, es el encargado de fabricar las células de la sangre. Algunas especies pueden presentar una dilatación a modo de **vejiga urinaria** en el conducto que lo comunica con la papila urogenital.

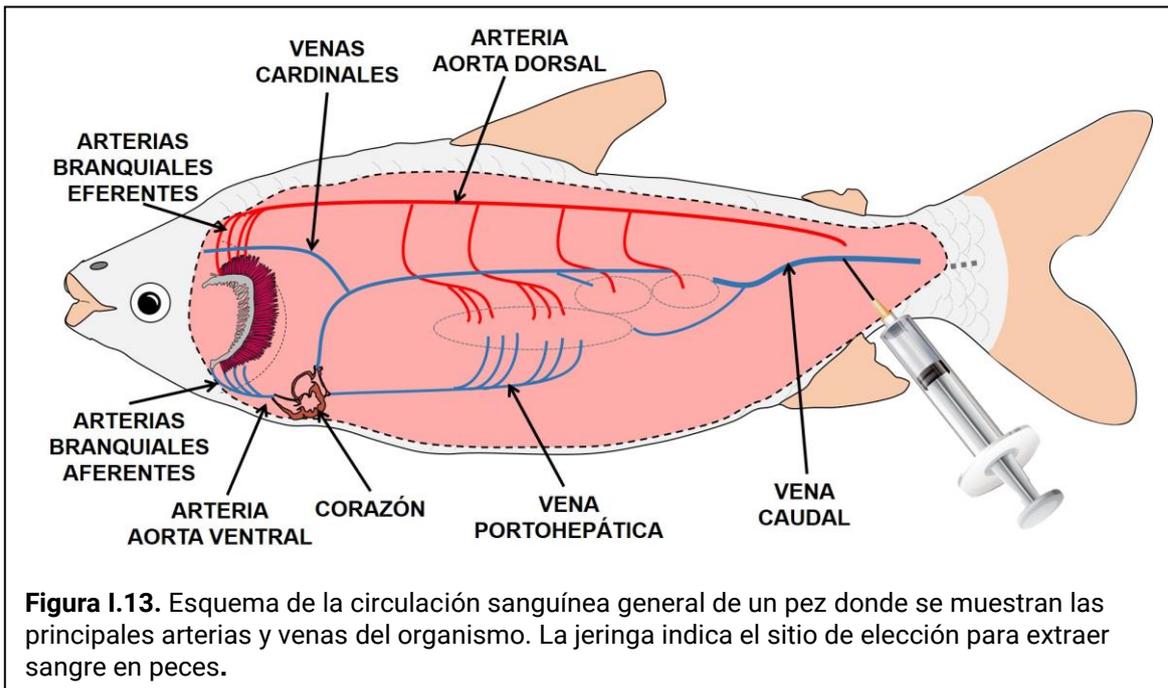
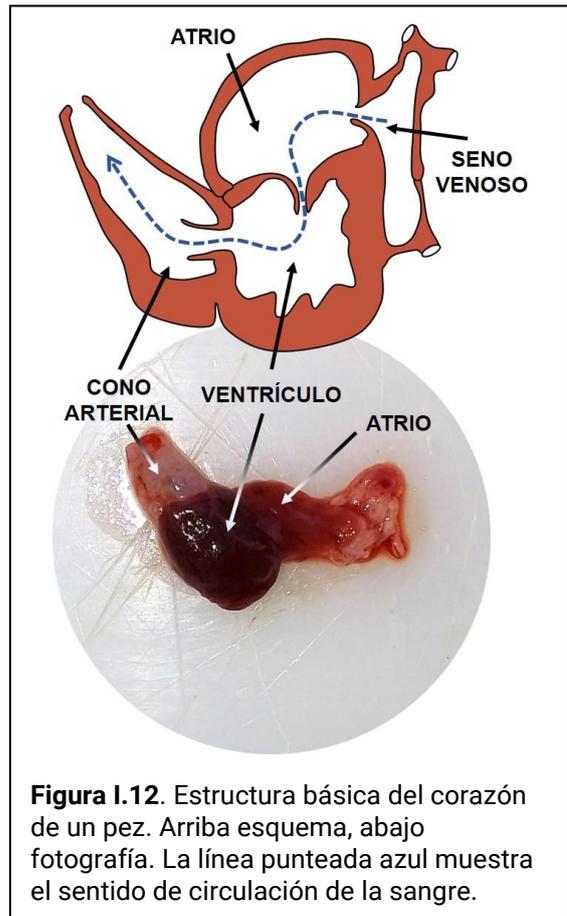
Es importante destacar que el riñón requiere una atención particular al momento del muestreo ya que, al estar separado de las vísceras abdominales por la membrana peritoneal, suele estar protegido de posibles contaminaciones bacterianas a partir de las mismas.

SISTEMA CIRCULATORIO

El sistema circulatorio está formado por el corazón y arterias y venas de distinto calibre. A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, donde el sistema circulatorio es doble (presentan una circulación pulmonar que oxigena la sangre y una circulación general que la distribuye en todo el organismo), los peces presentan un sistema circulatorio simple.

Por ello, el **corazón** presenta un sistema de cámaras simples. La sangre con poco oxígeno llega al *seno venoso* proveniente de las principales venas del organismo. De aquí pasa al *atrio* y luego al *ventrículo*, el cual posee una pared muscular gruesa cuya contracción impulsa a la sangre a través del *cono arterial* (Figura I.12).

Posteriormente, la sangre desoxigenada es conducida por la *arteria aorta ventral* que se ramifica en numerosas *arterias branquiales aferentes* penetrando en las branquias. En este órgano la sangre se oxigena, sale por varias *arterias braquiales eferentes* y luego es transportada a todo el cuerpo del pez por la *arteria aorta dorsal* y sus ramificaciones (Figura I.13). De regreso hacia el corazón, la sangre es volcada hacia una *vena caudal* que recoge el aporte de todos los órganos de la cavidad celómica en su recorrido hacia el corazón, para reiniciar el circuito. La vena caudal en la región del pedúnculo (por detrás de las aletas pélvicas) es el sitio de elección para extracción de sangre en peces de más de 10 cm de longitud.



SISTEMA NERVIOSO (ENCÉFALO)

El encéfalo está conformado por tres estructuras; el *cerebro*, el *cerebelo*, y la *médula oblongada*. Dichas estructuras se encuentran dentro de la cavidad craneana que se localiza dorsalmente en la cabeza, por detrás de los ojos. Estos órganos tienen un desarrollo menos complejo que en los mamíferos superiores, por lo que se observa una superficie homogénea, lisa, y de color blanquecino a rosado (Figura I.14). Son muy lábiles, por lo que al momento de la toma de muestras debe tenerse especial cuidado en conservar la estructura.

Debajo del mismo, suele descansar un órgano glandular, de similares características, conocido como *hipófisis*, que es el encargado de producir hormonas que regulan muchos procesos como el ciclo reproductivo. Este órgano suele ser de interés para los piscicultores ya que, luego de procesado, se utiliza para estimular la desova en peces de cultivo.

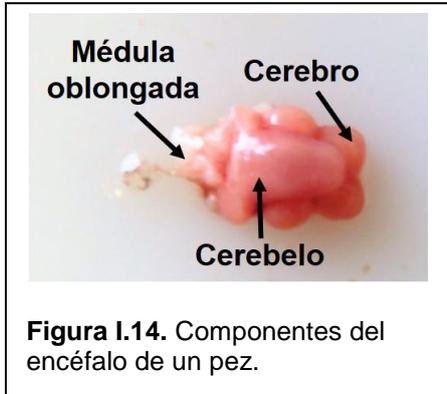


Figura I.14. Componentes del encéfalo de un pez.

ANEXO II

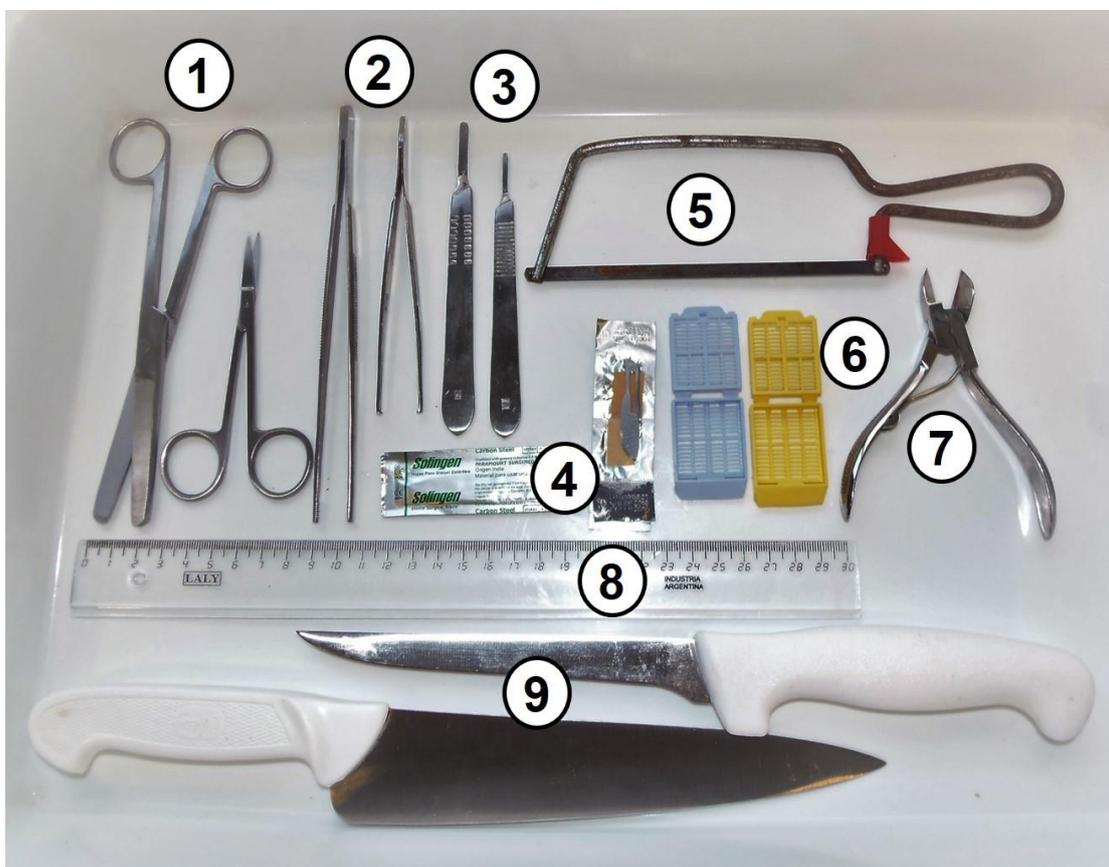
Técnica de necropsia en peces

INTRODUCCIÓN

La necropsia o autopsia es un conjunto de procedimientos ordenados, metódicos y sistemáticos para examinar de forma completa un cadáver para el diagnóstico de enfermedades y causa de muerte. Los hallazgos de necropsia, junto con los datos anamnésticos, signos clínicos y estudios de laboratorio (histopatológicos, bacteriológicos, toxicológicos, etc.) son necesarios para establecer un diagnóstico definitivo o etiológico. En este manual se describe una técnica de necropsia completa y de fácil ejecución. De cualquier forma, la mejor técnica es la que nos ayuda a recoger la mayor cantidad de datos posibles, no importa que exista alguna variación puntual de la misma.

1. Equipo de necropsia:

Los materiales básicos necesarios para realizar la necropsia se muestran en las siguientes fotografías.



Entre ellos podemos mencionar:

1. Tijeras de diferentes modelos (Mayo, Metzemaum, Iris) y tamaños.
2. Pinzas (de disección, Adson).
3. Mangos de bisturí (N° 3 o 4).
4. Hojas de bisturí (N° 11, 15, 20, 22 o 24).
5. Sierra de arco.
6. Casetes de inclusión.

7. Tijeras fuertes, de pescadería o alicate para cortar tejidos duros (opérculos, espinas, cintura pelviana).

8. Regla para registrar la longitud de los peces.

9. Cuchillos de distintos tamaños.

10. Formol al 10% (ver preparación en Anexo IV).

11. Envases limpios (no estériles) de diferentes tamaños y preferentemente plásticos.

12. Guantes.

13. Bandejas y tablas de plástico. También son necesarios lápiz de grafito y fibras indelebles para rotular los envases.



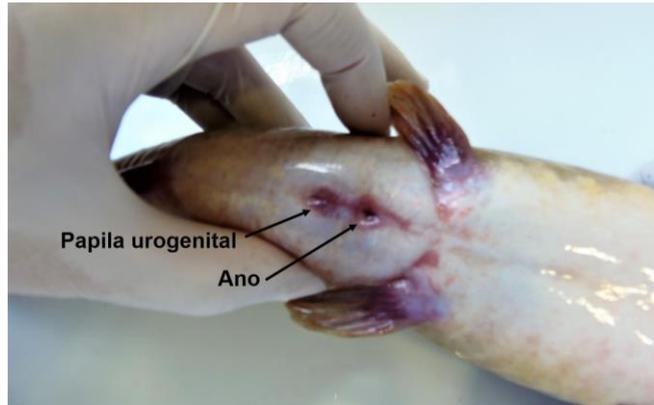
2. Técnica de necropsia

1. INSPECCIÓN EXTERNA

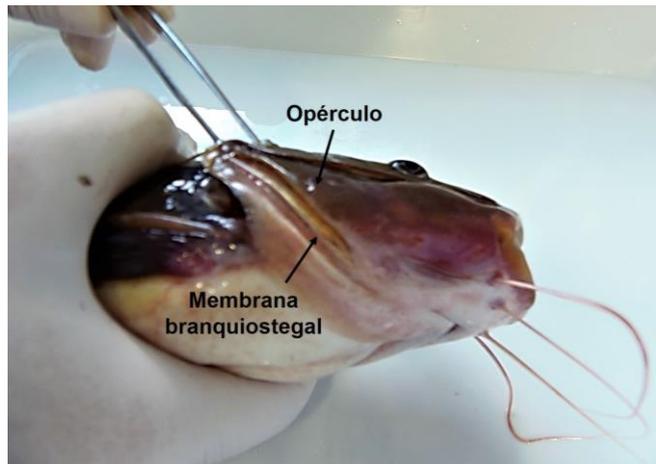
1.1. Comience la necropsia con la inspección externa del cadáver a fin de detectar posibles alteraciones o lesiones externas. Evalúe el estado corporal (delgadez), coloración de la piel y ausencia de escamas. Ponga especial atención en observar las aletas, evaluando la integridad de las mismas y revisando su inserción en el cuerpo ya que es un sitio elegido por los parásitos externos para adherirse.



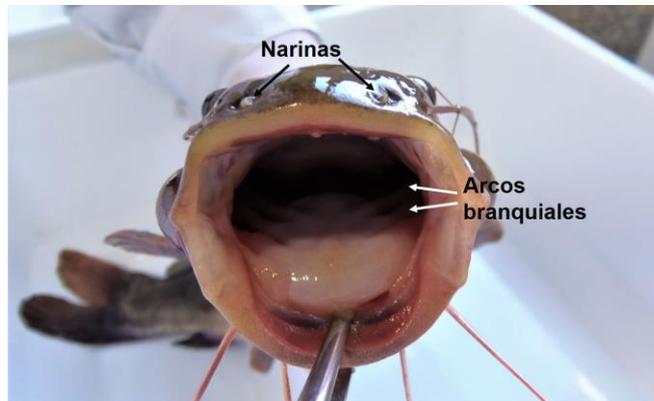
1.2. Observe la papila urogenital y el ano determinando si existen áreas enrojecidas.



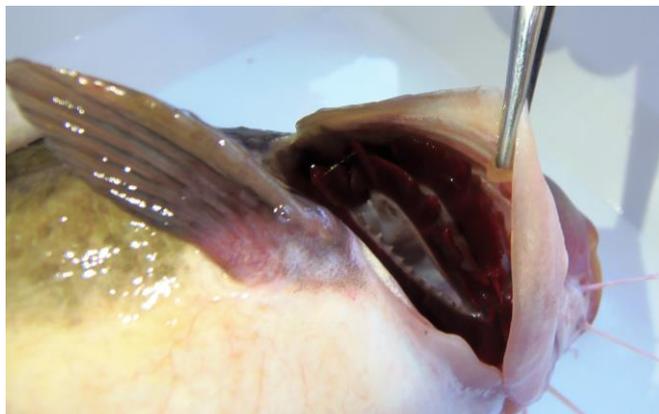
1.3. Revise el opérculo y membrana branquiostegal. Los pliegues que presenta esta última también suelen ser un sitio elegido por parásitos externos para fijarse al pez. Observe también el aspecto de las narinas y los ojos.



1.4. Abra la boca y examine labios, dientes, lengua (basihial), cavidad bucal y arcos branquiales.



1.5. Levante el opérculo e inspeccione ambas cavidades operculares y branquias.

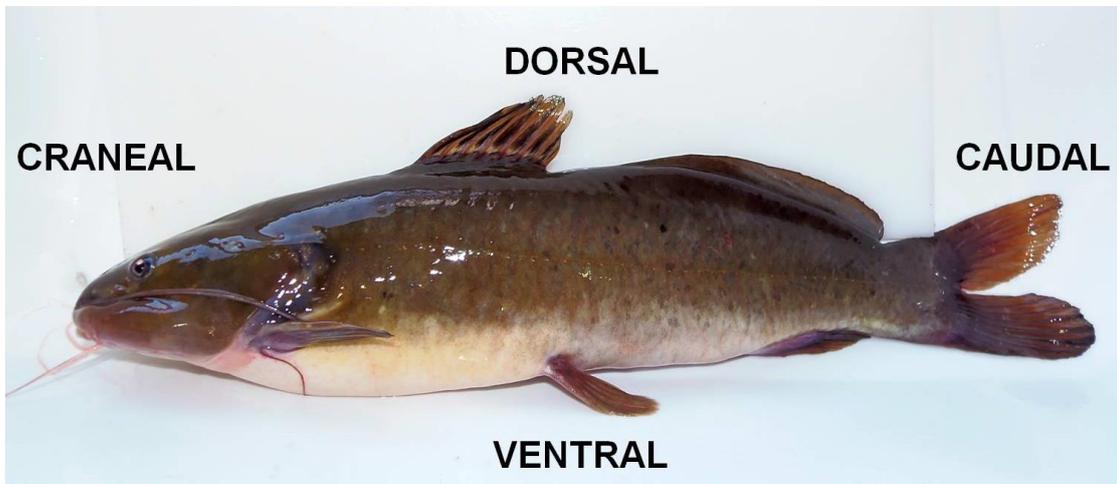




NOTA IMPORTANTE: En caso de observar parásitos sobre la piel o branquias recójalos con una pinza y colóquelos en un recipiente con alcohol al 70 % (ver preparación en Anexo IV).

2. APERTURA DE CAVIDADES

Para comenzar la apertura de las cavidades, coloque el cadáver en posición decúbito lateral derecho o izquierdo (lado derecho o izquierdo, respectivamente), eligiendo la posición que le resulte más cómoda.



Los términos craneal, caudal, dorsal y ventral que utilizamos se corresponden con los planos anterior, posterior, superior e inferior del pez, respectivamente.

2.1. APERTURA DE LA CAVIDAD OPERCULAR

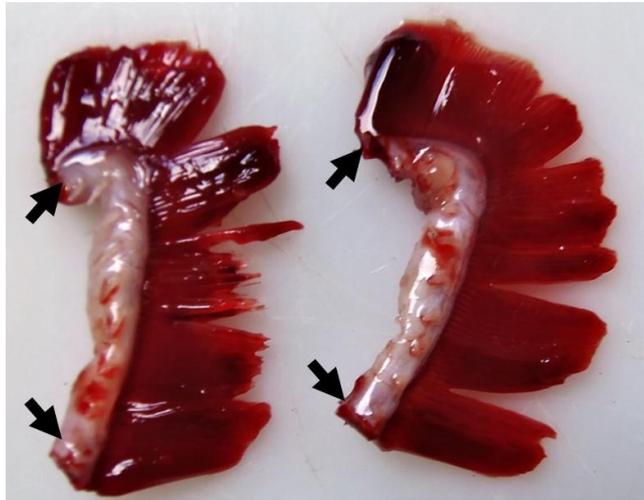
2.1.1. Retire el opérculo realizando un corte longitudinal con una tijera fuerte o alicate lo más próximo a su inserción o base.



2.1.2. De esta manera, quedarán expuestas las branquias para su inspección y toma de muestra.

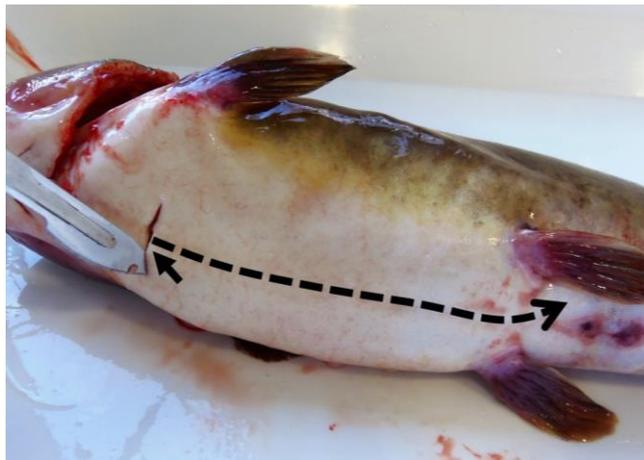


2.1.3. Extraiga las branquias cortando las inserciones dorsales y ventrales de los arcos branquiales en los puntos donde indican las flechas. Repita los pasos indicados en los puntos 2.1.1. a 2.1.3. para la cavidad opercular del lado opuesto.



2.2. APERTURA DE LA CAVIDAD CELÓMICA

2.2.1. Realice una pequeña incisión u ojal con bisturí o tijera en la pared abdominal ventral medial, aproximadamente a la altura de las aletas pectorales, cortando piel y musculatura hasta alcanzar la cavidad celómica.

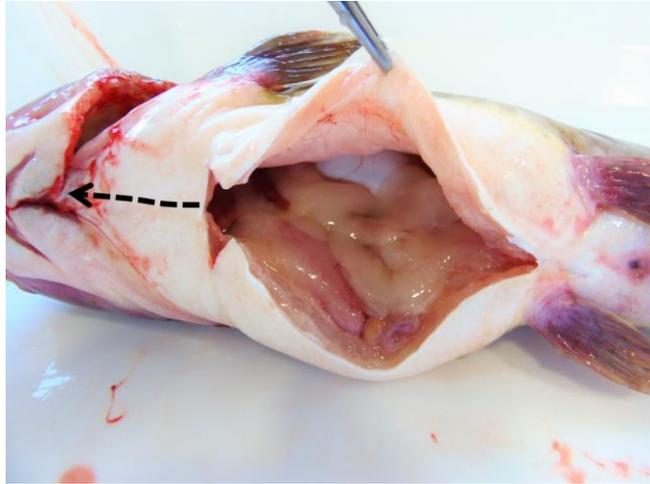


NOTA IMPORTANTE: Cuando realice estas maniobras para la apertura de la cavidad celómica tenga especial cuidado en no cortar órganos internos, sobre todo si se van a extraer muestras para enviar al Laboratorio de Bacteriología.

2.2.2. Desde el ojal realizado en el paso anterior, corte la pared abdominal (con tijera, bisturí o cuchillo) por la línea media ventral hacia caudal hasta la región anal como lo indica la línea negra punteada de la fotografía 2.2.1. (corte ventral).



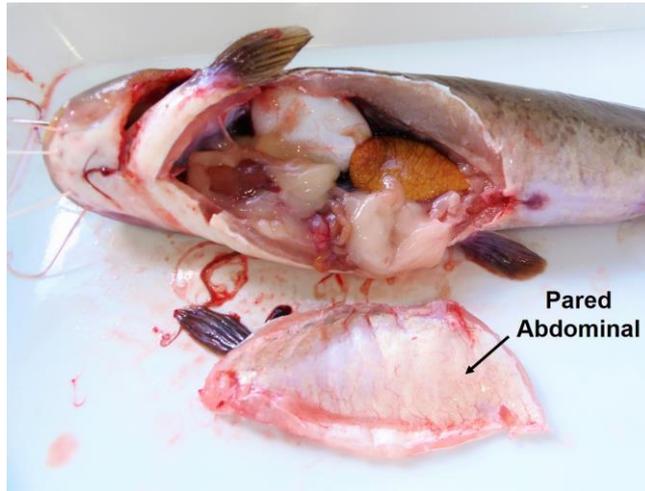
2.2.3. Complete el corte por la línea media ventral desde el ojal original hacia craneal hasta la cavidad opercular como indica la línea negra punteada. De esta manera queda expuesta la cavidad celómica para recolectar líquido con jeringa y aguja estériles si fuera necesario.



2.2.4. Continúe la apertura de la cavidad celómica realizando un corte oblicuo y hacia craneal desde la región anal hacia a la línea lateral, pasando por detrás de la aleta pélvica. Extienda el corte paralelo a la línea lateral hacia craneal hasta la base de la aleta pectoral (corte dorsal, línea naranja punteada). Finalice la apertura de la cavidad celómica uniendo el corte dorsal y ventral con un corte paralelo a la cavidad opercular (línea negra punteada).



2.2.5. Retire la pared abdominal. De esta manera, se muestra el contenido de la cavidad celómica, momento que denominaremos "tiempo de exposición". Observe las vísceras sin moverlas de su lugar.

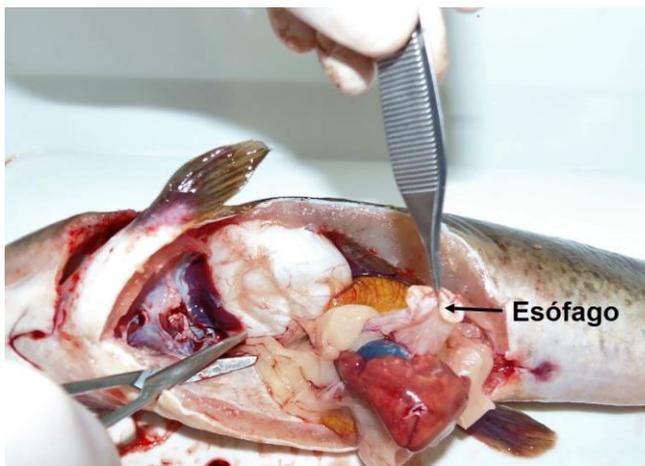


3. EXTRACCIÓN DE VÍSCERAS ABDOMINALES

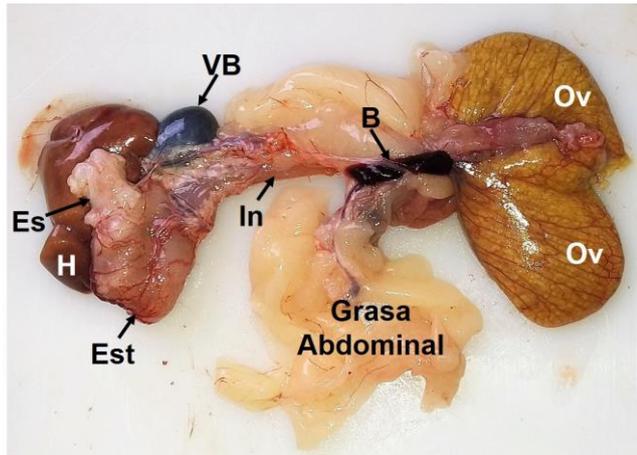
3.1. Identifique el esófago, tómelo con una pinza y corte con una tijera transversalmente por delante donde muestra la línea blanca punteada de la fotografía.



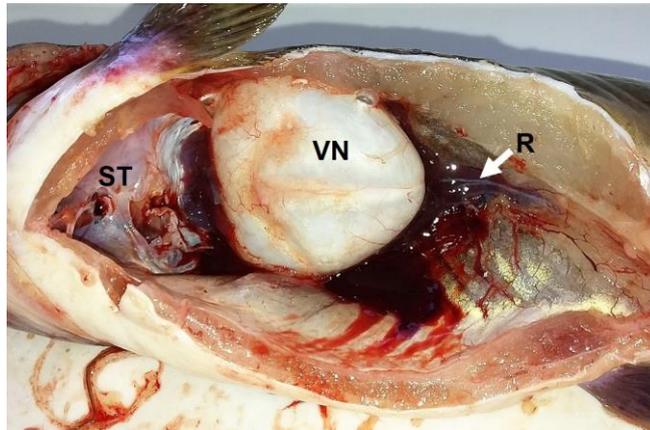
3.2. Agarrando el esófago firmemente con la pinza, traccione cuidadosamente hacia caudal, cortando con tijera las inserciones o adherencias de las vísceras a la cavidad celómica hasta llegar el recto. Corte transversalmente el recto y extraiga las vísceras en bloque.



3.3. El bloque de vísceras extraído incluye esófago (Es), estómago (Est), intestino (In), hígado (H), vesícula biliar (VB), bazo (B), ovarios (Ov) (en machos, los testículos) y la grasa abdominal.



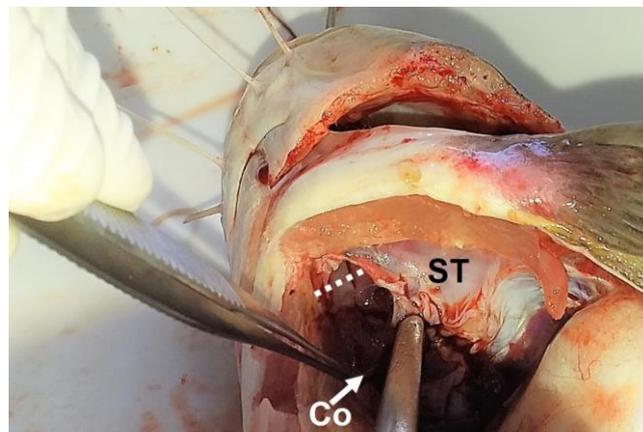
3.4. Una vez extraído el bloque de vísceras se puede observar la vejiga natatoria (VN) completa. Extráigala para exponer el riñón (R). En la fotografía también se observa el septo transversal (ST) que separa la cavidad celómica de la cavidad pericárdica que aloja al corazón.



3.5. Desinserte y retire cuidadosamente el riñón (R). Tenga en cuenta que el riñón presenta una textura muy delicada y puede romperse con facilidad ya que está fuertemente adherido a la superficie ventral de la columna vertebral.



3.6. Para extraer el corazón (Co), primero realice una incisión del septo transversal (ST) para acceder a la cavidad pericárdica. Con una pinza traccione ligeramente el ventrículo y corte el seno venoso y el cono arterial transversalmente por donde indica la línea blanca punteada.



4. EXTRACCIÓN DE OJOS Y ENCÉFALO

4.1. Extraiga ambos globos oculares cortando los músculos que unen a los mismos con las cavidades orbitarias.



4.2. Para abrir la cavidad craneana, corte los huesos del cráneo con una sierra de arco (dependiendo del tamaño del pez y dureza de los tejidos también puede usar alicate o bisturí), colocando la hoja paralela a la región ventral del pez y aserrando de craneal a caudal, comenzando aproximadamente por encima de las cavidades orbitarias.



4.3. Levante y retire la tapa ósea que expone al encéfalo. Para extraer el encéfalo (indicado dentro del área punteada), corte cuidadosamente los nervios olfatorios hacia craneal y la médula oblongada hacia caudal.



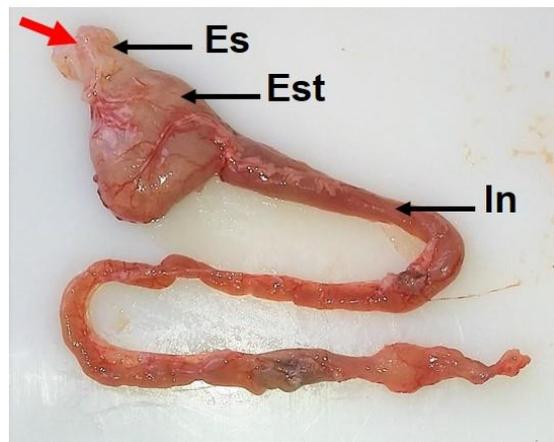
NOTA IMPORTANTE: El encéfalo es un órgano muy delicado, por lo que una vez cortados los pares craneales y la médula oblongada es recomendable retirarlo levantándolo por debajo con un elemento que actúe como espátula (puede usar el extremo romo de la hoja de una tijera pequeña).

5. INSPECCIÓN DE MUSCULATURA Y VÍSCERAS

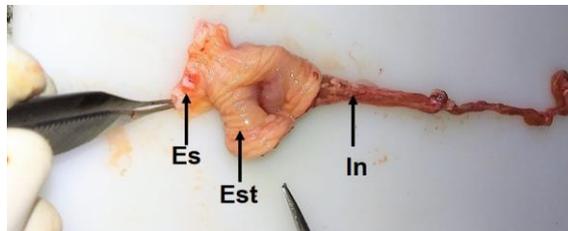
5.1. Inspeccione la musculatura esquelética realizando múltiples cortes transversales profundos o efectuando cortes transversales completos del pedúnculo caudal. Tome muestras de piel y musculatura esquelética.



5.2. Para evaluar el tubo digestivo, introduzca una tijera en la luz del esófago (Es) por donde indica la flecha roja y desde aquí cortar longitudinalmente el estómago (Est) e intestino (In).



5.3. Inspeccione el contenido y la superficie mucosa (superficie interna) del esófago (Es), estómago (Est) e intestino (In).



5.4. Para la evaluación macroscópica de los restantes órganos, sepárelos e inspecciónelos individualmente prestando especial atención a alteraciones de la forma, tamaño y color.





NOTA IMPORTANTE: Para evitar la rápida degradación de los tejidos, que puede invalidar el valor diagnóstico de las muestras, es **fundamental que cada órgano sea muestreado y fijado en formol al 10%** (siguiendo el procedimiento descrito en el apartado **3.e.** Recolección y envío de muestras para histopatología) **inmediatamente después de su inspección.** Es decir, a medida que se extraen los distintos órganos no deben reservarse en la tabla de muestreo hasta el final de la necropsia como se observa en la fotografía anterior, ya que aquí sólo se ha realizado a los fines de que el usuario de este manual pueda reconocer los distintos órganos en el conjunto de muestreo.

ANEXO III

Formularios de recolección de datos y envío de muestras ante eventos de mortandades

Formulario I

Mortandad de peces en ambientes naturales

Nombre y Apellido del remitente: _____
 Dirección y teléfono: _____
 Institución a la que pertenece: _____
 Correo electrónico: _____

Fecha		
Lugar del evento		
Coordenadas geográficas	Longitud	Latitud

- Marcar con una cruz (X), o llenar con letra imprenta según corresponda.

1. Datos referentes al fenómeno de mortandad						
1.A. DATOS GENERALES						
Especies involucradas						
Fotos		Individuales		Panorámicas		
Tamaño de los peces		Variado		Homogéneo		
Grandes		Medianos		Chicos		
Estadio de crecimiento de los peces		Alevinos	Larvas	Juveniles	Adultos	
Número de peces		Cientos	Miles	¿Cuántos?		
% de Mortandad diaria		% de Mortandad acumulada				
% de peces enfermos		Duración del fenómeno				
El número de peces afectados desde el inicio del fenómeno		Aumentó		Disminuyó		Se mantuvo constante
Estado hallado		Moribundos	Muertos	Frescos	Descompuestos	
Tipo de mortandad		Progresiva		Súbita		
En un sector o en todas partes.						
Llegaron a la orilla SI/NO		Por sus medios		Por corriente		Por viento
1.B. ESTIMACIÓN CUANTITATIVA DE LA MORTANDAD						
1.B.1. MORTANDADES EN ARROYOS						
Medidas	Valor	Número de segmento	Número de Peces sp 1	Número de Peces sp 2	Número de Peces sp n	
Largo zona afectada (m)		1				
Largo segmentos (m)		2				
		n				

1.B.2 MORTANDADES EN LAGOS Y RÍOS						
Medidas	Valor	N° transecta	Largo (m) transecta	N° de Peces sp 1	N° de Peces sp 2	N° de Peces sp n
Largo línea de base (m)		1				
Ancho transecta (m)		2				
Area total mortandad (m ²)		3				
		n				
1.C. DATOS DE LOS PECES AFECTADOS						
1.C.1. LESIONES EN PIEL						
Tipo de lesión		Presencia/Extensión de la lesión				
Erosiones		Focal		Multifocal		Difusa
Despigmentación		Focal		Multifocal		Difusa
Hiperpigmentación		Focal		Multifocal		Difusa
Pérdida de escamas		Focal		Multifocal		Difusa
Úlceras		Superficiales			Profundas	
Hemorragias		Petequias			Equimosis	
Presencia de nódulos		Focal		Multifocal		Difusa
Presencia de masas algodonosas		SI		NO		
Presencia de parásitos		SI		NO		
Necrosis/deshilachamiento de aletas		SI		NO		
Aumento de la mucosidad superficial		SI		NO		
1.C.2. LESIONES EN BRANQUIAS						
Tipo de lesión		Presencia/Extensión de la lesión				
Aumento de la mucosidad superficial		SI		NO		
Branquias pálidas (anemia)		SI		NO		
Branquias oscuras		SI		NO		
Necrosis/deshilachadas		SI		NO		
Hemorragias		Petequias		Equimosis		
Presencia de masas algodonosas		SI		NO		
Presencia de parásitos		SI		NO		
1.C.3. LESIONES EN OJOS						
Tipo de lesión		Presencia/Extensión de la lesión				
Exoftalmia		SI		NO		
Microftalmia		SI		NO		
Opacidad corneal		SI		NO		
Úlceras		Superficiales			Profundas	
Hemorragias		Petequias			Equimosis	
Presencia de nódulos		SI		NO		
Presencia de masas algodonosas		SI		NO		
Presencia de parásitos		SI		NO		

1.C.4. LESIONES INTERNAS				
Tipo de lesión	Órgano	Presencia/Extensión de la lesión		
Congestión		SI	NO	
Hemorragias		Focal	Multifocal	Difusa
Granulomas		Focal	Multifocal	Difusa
Presencia de nódulos		SI	NO	
Necrosis		Focal	Multifocal	Difusa
Presencia de parásitos		SI	NO	
Distensión abdominal		SI	NO	
Adherencias		SI	NO	

2. Datos referentes al cuerpo de agua donde ocurrió el fenómeno de mortandad						
Tipo de ambiente	Laguna	Río	Arroyo	Bañado	Embalse	Otro
Nombre						
Poblado cercano						
Superficie en has.	Profundidad habitual			Tipo de fondo		
Vegetación acuática	Costera	Flotante	Sumergida			
Observaciones referentes a las últimas semanas						
Variaciones en el nivel	Subió			Bajó		
Tipo de variación	Brusca			Suave		
Cambios en la coloración	Si	No	Mucha	Poca		
Cambios en la turbidez	Si	No	Mucha	Poca		
Olores desagradables	Si	No	Mucho	Poco		
Presencia de espumas	Si	No	Mucha	Poca		
Burbujeo desde el fondo	Si	No	Mucho	Poco		
Iridiscencias en la superficie	Si	No	Muchas	Pocas		
Deposición de residuos	Si	No	Mucha	Poca		
Cambios en abundancia de aves	Si	No	Mucha	Poca		
Descargas de sustancias extrañas	Si	No	Mucha	Poca		
Lavado de máquinas	Si	No	Mucho	Poco		
Descarga de tanques	Si	No	Mucho	Poco		
Descarga de aguas servidas	Si	No	Mucho	Poco		
Peces u otros organismos muertos	Si	No	Muchos	Pocos		
Descripción de los organismos:						
Comentarios:						

3. Datos climáticos de los días previos					
Vientos	Si		No		
Intensidad	Variable		Constante		
Dirección	Variable		Constante		
Velocidad Km/h					
Lluvias	Si		No		
Intensidad	Copiosa		Suave		Intermitente
Cantidad de mm	Tormenta eléctrica				
Temperaturas	Máxima		Mínima		
Variaciones bruscas	Si	No	Variaciones en °C:		

Nubosidad	Nublado	Variable	Despejado
Presión atmosférica	Alta	Baja	
Fenómenos anormales			

4. Actividad pesquera en la zona			
Deportiva	Comercial	Furtiva	
Elementos de pesca			
Intensidad			

5. Actividad motonáutica en la zona			
Permanente	Estacional		
Cantidad	Muchas	Pocas	
Tipo de embarcaciones			

6. Manejo del cuerpo de agua			
Movimiento de compuertas	Si	No	Como:
Control de vegetación acuática	Si	No	Como:
Remoción de fondos	Si	No	Como:
Introducción de especies	Si	No	Tipo:
Actividades de piscicultura	Si	No	Tipo:
Otros			

7. Actividad humana actual en torno al sistema				
Industrias linderas	Si	No	Cuantas	
Asentamientos humanos	Si	No	Nº promedio de habitantes	
Actividad agropecuaria	Si	No	Has.	
Arados	Si	No	Has.	
Cosechas	Si	No	Has.	
Fumigaciones	Si	No	Has.	
Cría intensiva de ganado	Si	No	Especie	Número
Tambos	Si	No	Cuantos	Tot. vacas
Otros	Si	No	Tipo	Número
Actividad forestal	Si	No	Has.	
Tala	Si	No	Has.	
Uso de fertilizantes	Si	No	Has.	
Comentarios				

Formulario II Mortandad de peces en cultivo

Nombre y Apellido del remitente: _____

Dirección y teléfono: _____

Institución/Empresa a la que pertenece: _____

Correo electrónico: _____

Fecha		
Lugar del evento		
Coordenadas geográficas	Longitud	Latitud

Marcar con una cruz (X), o llenar con letra imprenta según corresponda.

1. Datos referentes al fenómeno de mortandad				
1.A. DATOS GENERALES				
Especie/s cultivada/s				
Especie/s afectada/s				
Fotos		Individuales	Panorámicas	
Estadio de crecimiento de los peces afectados		Alevinos	Larvas	Juveniles Reproductores
Número de peces	Cientos	Miles	¿Cuántos?	
% de Mortandad diaria		% de Mortandad acumulada		
% de peces enfermos		Duración del fenómeno		
El número de peces afectados desde el inicio del fenómeno		Aumentó	Disminuyó	Se mantuvo constante
Estado hallado	Moribundos	Muertos	Frescos	Descompuestos
Tipo de mortandad	Progresiva		Súbita	
1.B. DATOS DE LOS PECES AFECTADOS				
1.B.1. LESIONES EN PIEL				
Tipo de lesión		Presencia/Extensión de la lesión		
Erosiones		Focal	Multifocal	Difusa
Despigmentación		Focal	Multifocal	Difusa
Hiperpigmentación		Focal	Multifocal	Difusa
Pérdida de escamas		Focal	Multifocal	Difusa
Úlceras		Superficiales		Profundas
Hemorragias		Petequias		Equimosis
Presencia de nódulos		Focal	Multifocal	Difusa
Presencia de masas algodonosas		SI	NO	
Presencia de parásitos		SI	NO	
Necrosis/deshilachamiento de aletas		SI	NO	
Aumento de la mucosidad superficial		SI	NO	
1.B.2. LESIONES EN BRANQUIAS				
Tipo de lesión		Presencia/Extensión de la lesión		
Aumento de la mucosidad superficial		SI	NO	
Branquias pálidas (anemia)		SI	NO	

Branquias oscuras	SI	NO
Necrosis/Deshilachamiento	SI	NO
Hemorragias	Petequias	Equimosis
Presencia de masas algodonosas	SI	NO
Presencia de parásitos	SI	NO
1.B.3. LESIONES EN OJOS		
Tipo de lesión	Presencia/Extensión de la lesión	
Exoftalmia	SI	NO
Microftalmia	SI	NO
Opacidad corneal	SI	NO
Úlceras	Superficiales	Profundas
Hemorragias	Petequias	Equimosis
Presencia de nódulos	SI	NO
Presencia de masas algodonosas	SI	NO
Presencia de parásitos	SI	NO
1.B.4. LESIONES INTERNAS		
Tipo de lesión	Órgano	Presencia/Extensión de la lesión
Congestión		SI NO
Hemorragias		Focal Multifocal Difusa
Granulomas		Focal Multifocal Difusa
Presencia de nódulos		SI NO
Necrosis		Focal Multifocal Difusa
Presencia de parásitos		SI NO
Distensión abdominal		SI NO
Adherencias		SI NO

2. Datos referentes al cuerpo de agua donde ocurrió el fenómeno de mortandad					
Tipo de Unidad de Cultivo en la que se produjo el brote	Hatchery	Estanques excavados	Jaulas	Otro	
Superficie de la unidad de cultivo	Profundidad		Tipo de fondo		
Suministro de agua	Napa freática		Ambientes naturales		
¿Notó algún cambio en las características del agua?	NO	SI	¿Cuáles?		
¿Realiza un registro de variables fisicoquímicas del agua?	NO	SI	¿Cuáles? (Turbidez; Temperatura; Oxígeno disuelto; pH; Amoníaco; Nitratos; Nitritos; Salinidad)		
Si la respuesta es sí, adjunte los datos registrados.					
Problema observado	Mortandad	Lesiones superficiales	Crecimiento lento	Malformaciones	
¿Desde cuándo observa el problema?					
¿Han existido modificaciones en la rutina del lote?		No	Si	¿Cuáles?	
¿Los peces afectados comen?	No	Si	Normalmente		Poco
¿Cómo nadan los peces afectados?	Normalmente		Erráticamente	En círculos	
¿Observa alteraciones en el comportamiento?		No	Si	¿Cuáles?	
¿Observa alteraciones en la respiración?		No	Si	Más lenta	Más rápida

3. En caso de haber realizado algún tratamiento en cultivo, completar este cuadro			
Tratamientos en el agua		SÍ	NO
Químico o droga	Dosis/concentración	Días de tratamiento	Frecuencia
Último tratamiento		Fecha	

4. Datos climáticos de los días previos			
Vientos	Si		No
Intensidad		Variable	Constante
Dirección		Variable	Constante
Velocidad Km/h			
Lluvias	Si		No
Intensidad	Copiosa	Suave	Intermitente
Cantidad de mm		Tormenta eléctrica	
Temperaturas	Máxima		Mínima
Variaciones bruscas	Si	No	Variaciones en °C:
Nubosidad	Nublado	Variable	Despejado
Presión atmosférica	Alta		Baja
Fenómenos anormales			

ANEXO IV

Preparación de soluciones útiles para el muestreo

A. Formol al 10%

El formol al 10% es la solución más utilizada como fijador de tejidos para estudios histopatológicos. Lo ideal es poder contar con la solución tamponada. Para preparar 1 litro de formol al 10% tamponado utilice la fórmula que se detalla a continuación:

Formol al 37-40% (concentración comercial) _____	100 ml
Agua destilada _____	900 ml
Fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄H₂O) _____	4,0 g
Fosfato de sodio dibásico (anhidro) (Na₂HPO₄) _____	6,5 g

Luego de disolver las sales en la solución, ajustar el pH en un rango de 7,2 a 7,4. En el caso de no contar con infraestructura (balanza de precisión, agitador magnético y peachímetro) para prepararlo como se indica en la tabla anterior, puede usarse la siguiente fórmula para obtener 1 litro de formol al 10%:

Formol al 37-40% (concentración comercial) _____	100 ml
Agua de la canilla _____	900 ml

B. Alcohol 70%

Esta solución es útil para conservar parásitos que puedan encontrarse durante el muestreo. Para preparar 100 ml de alcohol 70° use la siguiente fórmula:

Alcohol 96° (concentración comercial) _____	73 ml
Agua destilada _____	27 ml

C. Alcohol iodado

Esta solución se emplea para desinfectar la superficie de los peces que serán muestreados para estudios bacteriológicos. Además, el yodo de la solución coagula el moco presente en la cutícula de los peces lo que los hace menos resbaladizos facilitando su manipulación. Para preparar 100 ml de alcohol iodado use la siguiente fórmula:

Iodo povidona 10% (presentación comercial) _____	20 ml
Alcohol 96° (concentración comercial) _____	80 ml

D. Benzocaína

Existen muchos anestésicos para peces, aunque la benzocaína es una de las más utilizadas por ser muy económica. Dependiendo de la dosis utilizada puede emplearse tanto para sedar y anestesiarse los peces, así como para eutanasiarlos (sacrificarlos de manera humanitaria) si emplea concentraciones elevadas. De acuerdo a la finalidad de este manual, haremos sólo mención a dosis para el sacrificio.

Como la benzocaína no es hidrosoluble (no se mezcla con el agua), primero deberá preparar una solución de stock concentrada (10000 ppm) en base alcohólica. Para preparar 1000 ml de solución de stock de benzocaína concentrada use la siguiente fórmula:

Benzocaína _____	10 g
Alcohol 96° (concentración comercial) _____	1000 ml

Conserve esta solución en un frasco de vidrio color caramelo.

Cuando sea necesario sacrificar los peces, deberá preparar una solución diluida (200 ppm) de benzocaína en base acuosa. Para preparar 1000 ml de solución diluida de benzocaína use la siguiente fórmula:

Solución de stock concentrada (10000 ppm) de benzocaína _____	20 ml
Agua (usar la misma de dónde sacó los peces) _____	980 ml

Luego coloque los peces en la solución diluida (200 ppm) de benzocaína hasta comprobar el cese de la actividad respiratoria (los peces no moverán más los opérculos). Si bien las distintas especies de peces responden de manera distinta al anestésico, esta dosis recomendada produce la muerte en la mayoría de las especies.

ANEXO V

Datos de contacto de Laboratorios especializados⁶

⁶ Este listado es orientativo (no están todos los laboratorios especializados), recomendamos ubicar los laboratorios más cercanos al lugar del evento, revisando <https://www.conicet.gov.ar/> o bien en las páginas web de las autoridades nacionales, provinciales y locales de los diferentes estamentos.

> **Estudios histopatológicos y microbiológicos**

Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario

Bv. Ovidio Lagos y Ruta 33 (2170), Casilda, Santa Fe.

Teléfono: 3464-422050/423377 Interno: 235

e-mail: cipex@unr.edu.ar

website: <https://cipex-fcv-unr.wixsite.com/cipex>

Contacto: Dr. Fabricio Vigliano

> **Estudios toxicológicos**

Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos y Ambientales en Animales- IDEA-UNC-CONICET

Sede Centro de Zoología Aplicada: Sede FCEFYN:

Rondeau 798 (Jardín Zoológico), CP 5000, Córdoba, Argentina

CP 5000, Córdoba, Argentina

Teléfono: (0351) 433-2055/54 Int. 104

E-mail: secretaria.idea@conicet.gov.ar / secretaria.idivyecol@gmail.com

Contacto: **Dra. María de los Ángeles Bistoni / Dra. Andrea Hued**

Laboratorio de Ecotoxicología Acuática

Instituto de Biodiversidad y Biología Experimental y Aplicada

IBBEA-UBA-CONICET

Int. Güiraldes s/n, Pabellón 2, Piso 4º, C1428 CABA

Teléfono: (+54 11) 5285-8634 Ext. 58634

E-mail: f.lonostro@gmail.com

Contacto: **Dra. Fabiana Lo Nostro**

Laboratorio de Ecotoxicología y Contaminación Ambiental

Instituto de Investigaciones Marinas Y Costeras

IIMC-UNMdP-CONICET

Rodriguez Peña 4046 Nivel 1

Casilla de Correo 1260

Correo Central Mar del Plata

Teléfono: (+54) 223-473-4635

E-mail: iimyc@mdp.edu.ar

Contacto: **Dra. Karina Miglioranza**

***Coordinación de Activos y Residuos Químicos CRQ
SENASA***

Talcahuano 1660 Martinez-Buenos Aires
Teléfono: (011) 48746742 ; (011) 48746743
E-mail: lvillalba@senasa.gob.ar
website: www.senasa.gob.ar
Contacto: Dr. Carlos Alli

***Laboratorio de Química Analítica para Investigación y Desarrollo
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCUYO***

Padre Jorge Contreras 1300, M5502 JMA, Mendoza
Teléfono: (261) 425-9738
website: <https://sites.google.com/site/grupoquianid>
E-mail: rodolfowuilloud@gmail.com
Contacto: Rodolfo Wuilloud

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba

ICYTAC- Universidad Nacional de Córdoba
Bv. Dr. Juan Filloy S/n – Ciudad Universitaria, Ciudad de Córdoba
Teléfono: (0351)-4333194 int 125/ 03516521073
website: <http://www.icytac.conicet.unc.edu.ar>
E-mail: dwunder@mail.fcq.unc.edu.ar / danielwunderlin@gmail.com
Contacto: Daniel Wunderlin

Estudios de calidad de agua

Centro de Estudios Interdisciplinarios del Agua

CETA-UBA

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires
Av. Chorroarín 280 (1427), Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
Teléfono: 11-5287-2071
E-mail: ceta@fvvet.uba.ar
website: <https://www.fvet.uba.ar>
Contacto: Dra. Alicia Fernández Cirelli / Dr. Alejo Perez Carrera

***Instituto de Limnología - Dr. Raúl A. Ringuelet - CONICET La Plata - FCNyM
(UNLP)***

Boulevard 120 y 62 N° 1437- Casilla de Correo N° 712
La Plata (1900) - Buenos Aires - Argentina - -
Teléfono: 0221 - 422 2775 | 2832 - Interno: 19 (secretaría)
E-mail: secretaria@ilpla.edu.ar
Contacto: Dr. Dario Colautti

Laboratorio de química y contaminación

Servicio de Hidrografía Naval

Av. Montes de Oca 2124 BUENOS AIRES

Teléfono: 011-4317-2000 int 4117

E-mail: dmolina@hidro.gob.ar

website: <http://www.hidro.gov.ar/>

Contacto: Lic. Molina Daniel/ Lic. Llorente Constanza

Laboratorio de química Analítica, Departamento de Físicoquímica y Control de Calidad LQA (DFC)

CNEA - Gerencia Complejo Tecnológico Pilcaniyeu

Av. Bustillo 9500, S C de Bariloche (CP 8400) Río Negro

Teléfono: (0294) 4445293

E-mail: bohe@cab.cnea.gov.ar

website: <http://www.cab.cnea.gov.ar/dfc-ctp>

Contacto: Ana Bohé /Fabiola Álvarez

Laboratorio de Química Analítica para Investigación y Desarrollo

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNCUYO

Padre Jorge Contreras 1300, M5502 JMA, Mendoza

Teléfono: (261) 425-9738

website: <https://sites.google.com/site/grupoquianid>

E-mail: rodolfowuilloud@gmail.com

Contacto: Rodolfo Wuilloud

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba

ICYTAC- Universidad Nacional de Córdoba

Bv. Dr. Juan Filloy S/n – Ciudad Universitaria, Ciudad de Córdoba

Teléfono: (0351)-4333194 int 125/ 03516521073

website: <http://www.icytac.conicet.unc.edu.ar>

E-mail: dwunder@mail.fcq.unc.edu.ar / danielwunderlin@gmail.com

Contacto: Daniel Wunderlin

Servicio Geológico Minero Argentino SEGEMAR

Av. General Paz 5445 -Parque Tecnológico Miguelete- Edificio 14 y Edificio 25 San Martín (B1650 WAB) Buenos Aires

Teléfono: (011) 5670-0100

website: <http://www.segemar.gov.ar/>

E-mail: atencionalcliente@segemar.gov.ar

Contacto: Patricia Claramunt

Instituto de Medio Ambiente IMA

Facultad de Ingeniería, Universidad de Cuyo

Centro Universitario MENDOZA

Teléfono: (0261)4135000 int: 2141

website: <http://ingenieria.uncuyo.edu.ar/instituto-de-medio-ambiente-ima53>

E-mail: mbarbei@uncu.edu.ar

Contacto: María Esther Barbeito

Toxicología y Química Legal

Instituto de Química de San Luis INQUISAL

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis

Chacabuco y Pedernera D5700BWS-San Luis, Argentina

Teléfono: (0266)-4446765 /(0266)-4425385

website: <https://inqui-unsl.conicet.gov.ar/contacto/>

E-mail: ppacheco@unsl.edu.ar

Contacto: Pablo Pacheco

Laboratorio de Geoquímica. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Tierra. LABGEO CICTERRA

Universidad Nacional de Córdoba

Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA, Córdoba

Teléfono: 0351-5353800 Int 30238

website: <http://www.cicterra-conicet.gov.ar>

E-mail: karina.lecomte@unc.edu.ar

Contacto: Karina Lecomte

Instituto de Química del Sur INQUISUR

Universidad Nacional del SUR

Av. Alem 1253 8000-Bahía Blanca BUENOS AIRES

Teléfono: (54 291) 4595101 int 3506 /Fax: 54 291 4595160

website: <https://www.bahiablanca-conicet.gob.ar/index.php/inquisur>

E-mail: inquisur@inquisur-conicet.gob.ar

Contacto: Gustavo Apignanesi

Laboratorio Experimental de Calidad de Aguas.

Instituto Nacional del Agua LECA-INA

Centro de tecnología del Uso del Agua

Teléfono: (54 11) 4480-4500 int. 2455 *Fax:* (54 11) 4480-4500 int. 2388

Aut. Ezeiza Cañuelas, tramo J. Newbery km1,620 C.P. (1804) - Ezeiza -

Buenos Aires – Argentina

website: www.ina.gob.ar

E-mail: [msvillemur@ina.gob.ar](mailto:mvillemur@ina.gob.ar)

Contacto: Maria Villemur

Centro de Investigacion y Asistencia Tecnica a la Industria

CEITI

Av. Mitre y 20 de junio

(8336) Villa Regina - Río Negro

Teléfono: Tel.: 54-298-4461062 / 4462810 / Fax:54-298-4461101

E-mail: juano@ciati.com.ar

Contacto: Dr. Juan Oteiza

> **Estudios de sedimento**

Centro de Estudios Interdisciplinarios del Agua

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

Av. Chorroarín 280 (1427), Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Teléfono: 11-5287-2071

E-mail: ceta@fvet.uba.ar

website: <https://www.fvet.uba.ar>

Contacto: Dra. Alicia Fernández Cirelli / Dr. Alejo Perez Carrera

Instituto de Limnología - Dr. Raúl A. Ringuelet - CONICET La Plata - FCNyM (UNLP)

Boulevard 120 y 62 N° 1437- Casilla de Correo N° 712

La Plata (1900) - Buenos Aires - Argentina - -

Teléfono:0221 - 422 2775 | 2832 - Interno: 19 (secretaría)

E-mail: secretaria@ilpla.edu.ar

Contacto: Dr. Dario Colautti

Laboratorio de química y contaminación

Servicio de Hidrografía Naval

Av. Montes de Oca 2124 BUENOS AIRES

Teléfono: 011-4317-2000 int 4117

E-mail: dmolina@hidro.gob.ar

website: <http://www.hidro.gov.ar/>

Contacto: Lic. Molina Daniel/ Lic. Llorente Constanza

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba

ICYTAC- Universidad Nacional de Córdoba

Bv. Dr. Juan Filloy S/n – Ciudad Universitaria, Ciudad de Córdoba

Teléfono: (0351)-4333194 int 125/ 03516521073

website: <http://www.icytac.conicet.unc.edu.ar>

E-mail: dwunder@mail.fcq.unc.edu.ar / danielwunderlin@gmail.com

Contacto: Daniel Wunderlin

Laboratorio de Geoquímica. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Tierra. LABGEO CICTERRA

Universidad Nacional de Córdoba

Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016GCA, Córdoba

Teléfono: 0351-5353800 Int 30238

website: <http://www.cicterra-conicet.gov.ar>

E-mail: karina.lecomte@unc.edu.ar

Contacto: Karina Lecomte

Laboratorio de Química Ambiental y Ecotoxicología LAQUIAE

CESIMAR-CONICET

Bld. Brown 2915, (U9120ACD) Puerto Madryn, Chubut

Teléfono: +54-0280-4883184 int. 1301

website: <https://cenpat.conicet.gov.ar/laboratorio-de-quimica-y-analisis-de-elementos-laquiae/>

E-mail: monicagil.pm@gmail.com

Contacto: Mónica Noemí Gil

Laboratorio Experimental de Calidad de Aguas.

Instituto Nacional del Agua LECA-INA

Centro de tecnología del Uso del Agua

Aut. Ezeiza Cañuelas, tramo J. Newbery km 1,620 C.C. 46 (1802)

C.P. (1804) - Ezeiza - Bs. As - Argentina

Teléfono: (54 11) 4480-4500 int. 2455 / *Fax:* (54 11) 4480-4500 int. 2388

website: www.ina.gob.ar

E-mail: [msvillemur@ina.gob.ar](mailto:mvillemur@ina.gob.ar)

Contacto: Maria Villemur

6. Bibliografía

American Fisheries Society. (1992). Investigation and valuation of fish kills. American Fisheries Society Special Publication 24.

Agencia de Protección Ambiental (USEPA, 2008) <https://cfpub.epa.gov>

Almirón, A. E., García, M. L., Menni, R. C., Protogino, L. C., & Solari, L. C. (2000). Fish ecology of a seasonal lowland stream in temperate South America. *Marine and Freshwater Research*, 51(3), 265-274.

Barnabé, G. (1996). Bases biológicas y ecológicas en acuicultura. Acribia, Zaragoza. 519 p.

Beitinger, T. L., Bennett, W. A., & McCauley, R. W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental biology of fishes*, 58(3), 237-275.

Brown, L. (2000). Acuicultura para veterinarios: producción y clínica de peces. Acribia, Zaragoza. 443 p.

Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life (1999). https://www.ccme.ca/en/resources/canadian_environmental_quality_guidelines/

Chapman D. (1996), Water Quality Assessments United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, World and Health Organization, United Nations Environment Programme; 2nd Ed. Accesible en: www.who.int/water_sanitation_health/resourcesquality/watqualassess.pdf

Cussac, V. E., Fernández, D. A., Gómez, S. E., & López, H. L. (2009). Fishes of southern South America: a story driven by temperature. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 29-42.

De Almeida-Val, V. M. F., Gomes, A. R. C., & Lopes, N. P. (2005). Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. En: *Fish Physiology: The Physiology of Tropical Fishes* (Val, A., Almeida-Val, V. M. F., Randall, D. eds). Academic Press, 443-500.

Donaldson, M. R., Cooke, S. J., Patterson D. A. & MacDonaldk. J. S. (2008). Cold shock and fish. *Journal of Fish Biology* 73:1491-1530.

Gómez S.E. (2014) Análisis de las mortandades masivas de peces en el siglo 20, Argentina, Sud America. *Biokos*, Campinas, 28(2):95-102.

Gómez, S. S., & Volpedo, A. V. (2017). Tolerancia térmica de dos cíclidos neotropicales sudamericanos *Rocio octofasciata* (Regan, 1903) y *Australoheros facetus* (Jenyns, 1842). *Biología Acuática*. 32, 24-31

Gonzalez Naya, G., Ramírez, L., Gómez, S. E., & Menni, R. C. (2011). Temperature and massive fish deaths in southern South America. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales. Nueva Serie*, 13(2), 131-134.

Menni, R. C., Gomez, S. E., & Armengol, F. L. (1996). Subtle relationships: freshwater fishes and water chemistry in southern South America. *Hydrobiologia*, 328(3), 173-197.

Menni, R.C., Miquelarena, A.M., & Gómez, S. E. (1998). Fish and limnology of a thermal water environment in subtropical South America. *Environmental Biology of Fishes*, 51 (3): 265 -28.

Meyer, F. P., & Barclay, L. A. (1990). Field manual for the investigation of fish kills. Federal Government Series. U.S. Fish and Wildlife Service. Washington, D.C. 177pp.

Noga, E.J. (2010). Fish disease: diagnosis and treatment. Second Edition. Iowa State University Press, Iowa. 519 p.

Ostrander, G. (2000). The Laboratory Fish. Academic Press, London. 678 p.

Pianka, E.R. (1982). Ecología evolutiva. Barcelona: Omega.

Roberts, R.J. (2012). Fish pathology. 4th ed. Wiley-Blackwell, Oxford. 581 p.

Wedemeyer, G. A. (1976). Physiological response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33(12), 2699-2702.

Whitman, K. A. (2003). Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures. Wiley-Blackwell, Iowa. 258 p.