

INFECCIÓN POR *Gyrodactylus salaris*

1. Ámbito de aplicación

Gyrodactylus salaris (Platyhelminthes; Monogenea) es un parásito vivíparo de agua dulce que podría causar girodactilosis en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*).

2. Información de enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Se han identificado varias cepas o clados de *Gyrodactylus salaris* mediante la genotipificación del marcador de la citocromo oxidasa I (CO1) mitocondrial (Hansen *et al.*, 2003; 2007b; Meinilä *et al.*, 2002; 2004). Aunque no parece haber ninguna correspondencia entre las cepas identificadas mediante la CO1 y la patogenicidad (Hansen *et al.*, 2007a), todas las cepas encontradas en el salmón del Atlántico que se han estudiado hasta la fecha en pruebas de laboratorio son muy patógenas para el salmón del Atlántico. Recientemente, se han encontrado cepas que no son patógenas para el salmón en la trucha alpina no migratoria (*Salvelinus alpinus*) en Noruega (Olstad *et al.*, 2007a; Robertsen *et al.*, 2007), y en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Dinamarca (Jørgensen *et al.*, 2007; Lindenstrøm *et al.*, 2003).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

La supervivencia de parásitos fuera del hospedador depende de la temperatura; así, sobreviven unas 24 horas a 19°C, 54 horas a 13°C, 96 horas a 7°C y 132 horas a 3°C (Olstad *et al.*, 2006). De igual forma, la supervivencia en un hospedador muerto también depende de la temperatura: *G. salaris* puede sobrevivir en ejemplares muertos de salmón del Atlántico 72, 142 y 365 horas a 18, 12 y 3°C, respectivamente (Olstad *et al.*, 2006).

2.1.3. Estabilidad del agente (métodos eficaces de inactivación)

Gyrodactylus salaris sobrevive a cualquier temperatura de entre 0 y 25°C. No se sabe cuál es la tolerancia a temperaturas superiores a los 25°C. No es resistente a la congelación. *Gyrodactylus salaries* no es resistente a la sequía y debe estar envuelto de agua para sobrevivir. *Gyrodactylus salaries* muere tras pocos días a un pH ≤5. Es más sensible a un pH bajo (5,1 < pH < 6,4) asociado a aluminio y zinc que el hospedador salmón del Atlántico (Poléo *et al.*, 2004; Soleng *et al.*, 2000) (véase también el apartado 2.4.2).

2.1.4. Ciclo de vida

Gyrodactylus salaries es un parásito estricto con un ciclo de vida directo. Estos parásitos tienen cinco ejemplares de descendencia y no hay huevos, estadios de reposo, estadios de transmisión especializados ni hospedadores intermediarios.

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Gyrodactylus salaris es un ectoparásito principalmente del salmón del Atlántico (*Salmo salar*), pero puede sobrevivir y reproducirse en varios salmónidos, como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), el salvelino (*Salvelinus fontinalis*), el timalo (*Thymallus thymallus*), la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*) y la trucha común (*Salmo trutta*) (en orden decreciente de susceptibilidad).

En el salmón del Atlántico se ha observado una susceptibilidad variable a *G. salaris* (Bakke *et al.*, 2002). Las cepas bálticas se han considerado resistentes. Sin embargo, esto solo se ha observado en el salmón procedente del río ruso Neva, del río sueco Torneälven y del lago finlandés sin litoral Saima. El salmón

báltico del río sueco Indalsälven es casi tan susceptible como el salmón noruego o el del río escocés Conon (Bakke *et al.*, 2004). El salmón de otros ríos bálticos muestra una susceptibilidad intermedia.

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Todos los estadios de la vida del hospedador son susceptibles, pero solo se ha observado mortalidad en alevines y en pintos.

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

No es aplicable.

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Gyrodactylus salaricus aparece en las aletas de la mayoría de ejemplares de salmón del Atlántico, pero la preferencia anatómica depende de la intensidad de la infección (Jensen y Johnsen, 1992; Mo, 1992). También se hallan parásitos con frecuencia en el cuerpo y menos a menudo en las branquias. En otros hospedadores, la distribución puede ser diferente, pero en algunas especies hospedadoras el parásito es relativamente menos abundante en las aletas y relativamente más frecuente en el cuerpo en comparación con el salmón.

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

No es aplicable.

2.2.6. Vectores

No es aplicable.

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Todas las especies hospedadoras susceptibles mencionadas en el apartado 2.2.1 pueden llegar a actuar como portadoras del parásito. Todos los hospedadores salmónidos podrían ser sospechosos de actuar como posibles portadores. Los hospedadores más susceptibles serán portadores de parásitos durante periodos más largos que los menos susceptibles.

2.3. Patrón de la enfermedad

2.3.1. Mecanismos de transmisión

Gyrodactylus salaris se ha extendido entre ríos y piscifactorías principalmente por el transporte de peces vivos y la utilización de estos para las repoblaciones. Los peces migratorios que nadan por aguas salobres también pueden hacer que el parásito se transmita entre ríos (véase también el apartado 2.3.5). Si se introduce *G. salaris* en una piscifactoría/tanque donde haya salmón del Atlántico, que es susceptible, será muy probable que todos los peces de la piscifactoría resulten infectados, en función de la distribución de la piscifactoría. Los ríos con salmón del Atlántico susceptible situados cerca de ríos infectados presentan un gran riesgo de infección si estos ríos están situados dentro del mismo sistema de agua salobre.

2.3.2. Prevalencia

La prevalencia en cepas de salmón del Atlántico susceptibles en ríos y piscifactorías alcanza prácticamente el 100% en poco tiempo. La prevalencia en cepas resistentes en río y piscifactorías no se conoce. La prevalencia de otras especies susceptibles suele ser mucho más baja y puede ser inferior al 10% (por ejemplo, en trucha arco iris de piscifactoría).

2.3.3. Distribución geográfica

La distribución de *Gyrodactylus salaris* se limita a Europa. Se ha hallado en salmón del Atlántico o trucha arco iris de piscifactoría en varios países de Europa (principalmente del norte). En la naturaleza, el parásito se ha hallado en salmónidos salvajes, principalmente en pintos de salmón del Atlántico, en ríos de Rusia, Suecia y Noruega. *Gyrodactylus salaris* es más frecuente en trucha arco iris de piscifactoría de lo que se creía, y es probable que exista en más países de lo que se supone actualmente. En 2006, se notificó *G. salaris* en piscifactorías de peces de Italia (Paladini *et al.*, 2009) y, en 2007, en piscifactorías de peces de Polonia (Rokicka *et al.*, 2007) y de Macedonia (Ziętara *et al.*, 2007). En 2009, el Laboratorio de Referencia de la OIE identificó *G. salaris* en piscifactorías de peces de Rumanía. Se ha observado que Gran Bretaña e Irlanda están libres del parásito.

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La mortalidad puede alcanzar el 100% en el salmón del Atlántico de piscifactoría si no se trata. La mortalidad en ríos de Noruega puede ser de incluso el 98%, con una media de alrededor del 85%. La mortalidad en otras especies hospedadoras susceptibles suele ser baja o pasar desapercibida.

2.3.5. Factores ambientales

Aunque *G. salaris* vive principalmente en agua dulce, se reproduce normalmente en salinidades de hasta 5-6 ppmil. La supervivencia en salinidades superiores depende de la temperatura. Así, por ejemplo, a 1,4°C *G. salaris* puede sobrevivir 240 horas, 78 horas y 42 horas a salinidades de 10 ppmil, 15 ppmil y 20 ppmil, respectivamente, mientras que a 12°C puede sobrevivir 72 horas, 24 horas y 12 horas a las mismas salinidades, respectivamente (Soleng y Bakke, 1997).

2.4. Control y prevención

2.4.1. Vacunación

No se dispone de vacunas.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

Gyrodactylus salaris es sensible a los cambios en la composición química del agua. Es sensible a las sustancias químicas más habitualmente utilizadas para el tratamiento por baño de pintos y huevos de salmón de piscifactoría (por ejemplo, agua con alta salinidad, formaldehído y compuestos que contengan cloro y yodo). Además, *G. salaris* es sensible a soluciones ácidas (pH de 5,0–6,0) de sulfato de aluminio ($[Al_2(SO_4)_3]$; AIS) (Soleng *et al.*, 1999). Dado que AIS es menos tóxico para los peces que para *G. salaris*, en aguas moderadamente acidificadas esta sustancia química puede utilizarse en los intentos de erradicación del parásito de los sistemas fluviales de Noruega.

2.4.3. Inmunoestimulación

No se dispone de inmunoestimulación.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

En pruebas de laboratorio, la selección genética ha dado lugar a una prolongación de la supervivencia de la descendencia (Salte *et al.*, 2010). Sin embargo, dicha selección no se ha aplicado a poblaciones salvajes de salmón, principalmente porque la población seguiría infectada y de esta forma el parásito se extendería a más ríos.

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

La repoblación con especies resistentes de salmón del Atlántico (como la cepa del río báltico Neva) en ríos afectados no es compatible con la gestión de las estirpes existentes de salmón del Atlántico.

2.4.6. Agentes bloqueadores

No son aplicables.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

Los huevos procedentes de piscifactorías infectadas deben desinfectarse (se han utilizado compuestos yodados).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las prácticas generales de manejo recomendadas para evitar la diseminación de los agentes infecciosos entre unidades de piscifactorías de peces de agua dulce son aplicables a *G. salaris*. El equipo (como redes de pesca) utilizado en una unidad no se puede utilizar en otra sin una desinfección suficiente.

3. Toma de muestras

3.1. Cómo escoger los ejemplares

En los casos en los que se toman muestras y no se sospecha de infección, debe tomarse una muestra aleatoria con un número suficiente de peces, por ejemplo de un río. En las piscifactorías, si los peces

presentan signos clínicos de infección (como los descritos en el apartado 4.1.1), deben escogerse estos peces.

3.2. Conservación de muestras para su envío

Los peces deben sacrificarse de inmediato y no debe permitirse que se sequen antes de iniciar la conservación. Deben conservarse peces enteros en etanol al 96-100% en frascos lo bastante grandes como para que quede espacio de sobra y quepa el conservante. La concentración de etanol tras la conservación no debe ser inferior al 70%. Como norma general, esta concentración se obtiene si la proporción de peces respecto al etanol no es superior a 1:9. Si la concentración es inferior, el mucus y la epidermis se pueden desintegrar y las muestras de *Gyrodactylus*, incluso conservadas, pueden empeorar. Los frascos deben tener un orificio lo bastante ancho como para al introducir o extraer los peces no haya rozamiento y se pierda así muestra de *Gyrodactylus*. Los frascos se deben guardar en posición horizontal hasta que el tejido esté fijado/conservado, para impedir que los peces se curven. Esto facilitará el examen de los peces, puesto que se les podrá dar la vuelta fácilmente con unas pinzas bajo el microscopio. Cuando termina la conservación de los peces, los frascos se pueden guardar en posición vertical.

Dado que *G. salaris* es frecuente en las aletas de salmón del Atlántico, también pueden enviarse aletas cortadas del cuerpo y guardadas en etanol como se ha descrito anteriormente. Esto es especialmente adecuado para peces más grandes y en condiciones de campo donde, por ejemplo, haya limitaciones de transporte.

3.3. Combinación de varias muestras

Se pueden agrupar muestras de un río o una piscifactoría, aunque cada pez tendrá que examinarse y analizarse también por separado. Las aletas de peces de una piscifactoría o río pueden agruparse y examinarse y analizarse también por separado, pero en este caso cada aleta no puede estar relacionada con un pez hospedador específico.

3.4. Órganos y tejidos de elección

Los peces se pueden examinar como ejemplares enteros vivos anestesiados (por ejemplo, como MS222), como ejemplares acabados de sacrificar o como ejemplares conservados. Además, pueden examinarse aletas frescas o conservadas. Se utiliza el mismo método de examen (véase el apartado 4.3.1) en todos los casos. El examen de peces vivos anestesiados es muy lento y no se recomienda.

En lugar de examinar el pez entero, pueden examinarse las aletas (mediante el método descrito en el apartado 4.3.1). Cuando se infectan pintos de salmón noruego, casi todos los peces tienen al menos un ejemplar de *G. salaris* en una de las aletas. En algunos peces, pueden hallarse *G. salaris* en el cuerpo o la cabeza, incluidas las narinas, las branquias y la cavidad bucal. La distribución de *G. salaris* en la superficie de las aletas y otras partes del pez varía en función de la especie de pez y parece variar también en función de la estirpe de salmón.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los peces muertos, conservados en hielo, no son aceptables para el examen destinado a hallar *Gyrodactylus*, ni siquiera si los peces se han conservado por separado en bolsas de plástico, etc. Los parásitos mueren enseguida si no están sumergidos en agua, y dado que estos parásitos no tienen exoesqueleto, los que mueren se desintegran rápidamente. Si este tipo de peces muertos se lavan en agua, pueden hallarse ejemplares de *Gyrodactylus* en el sedimento. Sin embargo, si no se hallan ejemplares en el sedimento, no puede concluirse que los peces no estuvieran infectados.

El examen de peces fijados en formaldehído no se recomienda por motivos de seguridad del operario. Las muestras de *Gyrodactylus* fijadas en formaldehído también son muy difíciles de identificar morfológicamente y no son adecuadas para el análisis del ADN.

4. Métodos de diagnóstico

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Normalmente no hay signos clínicos en los peces con uno o hasta unas pocas decenas de ejemplares del parásito.

En la primera fase de la enfermedad, son característicos los movimientos fugaces (los peces se rascan más la piel sobre el sustrato). Más adelante, pueden volverse grisáceos por un aumento de la producción de mucus y las aletas pueden erosionarse. Los peces enfermos están aletargados y suelen hallarse en aguas de movimiento lento.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Los movimientos fugaces son frecuentes en los peces de piscifactoría moderada a intensamente infectados porque se rascan la piel contra el fondo o las paredes del tanque o de los estanques. Los peces intensamente infectados pueden presentar una reducción de la actividad y permanecer en zonas de baja corriente.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

Los peces intensamente infectados pueden volverse grisáceos como consecuencia de un aumento de la mucificación, y en un estadio posterior las aletas dorsales y pectorales pueden volverse blanquecinas como consecuencia de un aumento del espesor de la epidermis (principalmente hipertrofia).

Los peces intensamente infectados pueden tener aletas erosionadas, sobre todo la dorsal, la caudal y la pectoral, debido a que el parásito se alimenta en ellas.

En peces con girodactilosis es frecuente observar infecciones fúngicas secundarias (*Saprolegnia* spp.).

4.2.2. Bioquímica clínica

No es aplicable.

4.2.3. Anatomopatología microscópica

No es aplicable.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Pueden utilizarse raspados (preparaciones húmedas) de piel o aletas para detectar ejemplares de *Gyrodactylus* en peces con girodactilosis. En estos casos, con una alta infestación, hay cientos o miles de ejemplares de *Gyrodactylus* por toda la superficie corporal y de las aletas. Las preparaciones húmedas no suelen ser adecuadas para la identificación de *Gyrodactylus* a nivel de especie, y para el análisis morfológico o del ADN deben realizarse otras preparaciones (véase abajo). Si el número de ejemplares de *Gyrodactylus* es bajo, la probabilidad de detectar el parásito mediante raspados también será baja.

4.2.5. Frotis

No son aplicables.

4.2.6. Cortes fijados

No es aplicable.

4.2.7. Microscopía electrónica/citopatología

No son aplicables.

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

La detección de *Gyrodactylus* y la identificación de *G. salaris* es un proceso de dos pasos. En primer lugar, se observan ejemplares del parásito mediante equipo óptico y, a continuación, se identifican los parásitos, normalmente de manera individual mediante otro equipo y otros métodos.

Para detectar *Gyrodactylus* debe utilizarse equipo óptico. En el caso de un brote sospechoso de girodactilosis en el que solo se disponga de microscopía óptica, pueden utilizarse preparaciones húmedas para detectar ejemplares de *Gyrodactylus*. No obstante, es muy aconsejable no utilizar este método en un programa de vigilancia, puesto que la especificidad y la sensibilidad son muy bajas (no se conocen los valores) y, por tanto, el número de peces examinados tendría que ser exageradamente alto.

Los peces se pueden examinar como ejemplares enteros vivos (anestesiados), acabados de sacrificar o conservados/fijados. En todos los casos se aplica el mismo método de examen (véase abajo). El examen de peces vivos anestesiados es muy lento y no se recomienda. El examen de peces fijados con formaldehído no se recomienda por motivos de seguridad del operario. Los ejemplares de *Gyrodactylus* fijados con formaldehído también son muy difíciles de identificar y no son adecuados para el análisis del ADN. En lugar de examinar los peces enteros, pueden examinarse las aletas (mediante el método descrito abajo). Cuando hay muchos pintos de salmón susceptibles infestados, casi todos los peces tienen al menos un *G. salaris* en una de las aletas. En algunos peces, pueden observarse ejemplares de *G. salaris* por el cuerpo o la cabeza, incluidas las narinas, las branquias y la cavidad bucal. La distribución de *G. salaris* sobre las aletas y otras partes del pez varía en función de la especie de pez y las distribuciones también parecen variar en función de la estirpe de salmón.

Los peces vivos anestesiados, aletas recién cortadas o peces o aletas conservados en etanol deben examinarse mediante microscopio de disección binocular con buena iluminación. Los peces deben colocarse en una caja y cubrirse por completo con agua dulce. Los peces conservados también pueden examinarse en etanol. Los parásitos vivos son más fáciles de detectar por sus movimientos, de modo que debe evitarse la perturbadora refracción de la luz sobre la piel de los peces. Los ejemplares vivos de *Gyrodactylus* son incoloros, mientras que los ejemplares de *Gyrodactylus* conservados en etanol suelen ser solo ligeramente opacos. Si el microscopio de disección está iluminado desde arriba, el fondo de la platina del microscopio debe ser negro. Esto aumentará el contraste y los parásitos se detectarán con mayor facilidad. Toda la superficie del pez, incluidas las branquias y la cavidad bucal, normalmente de menos de 10 cm, también pueden estudiarse utilizando iluminación desde la parte baja de la platina del microscopio. De esta forma, normalmente es más fácil observar ejemplares de *Gyrodactylus* sobre las aletas.

Si el examen se lleva a cabo en etanol, debe plantearse la utilización de guantes. A efectos de protección del operario, el microscopio de disección debe colocarse sobre una repisa de succión con una salida de gases hacia abajo para evitar la inhalación de conservante evaporado.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

La identificación de *Gyrodactylus* a nivel de especie se basa en la morfología y la morfometría de las anclas de los ganchos marginales (hamuli) y las barras del opistaptor (el órgano de fijación). Una buena preparación de los ejemplares es un prerrequisito para la identificación a nivel de especie.

Cuando se requiere una morfometría de alta resolución para establecer un diagnóstico morfométrico fiable es preferible una digestión del tejido blando, dejando solo las partes duras. El tejido blando se puede digerir en una solución (de aproximadamente 1 µl) de Tris 75 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM, un 5% de SDS (dodecilsulfato sódico) y 100 mg ml⁻¹ de proteinasa K, pH 8,0. Tras añadir la solución de digestión, la reacción debe observarse al microscopio hasta que termine y a continuación terminarse añadiendo una solución de parada (glicerol y formalina neutra tamponada al 10% a razón de 1:1). El procedimiento para la digestión lo describen en detalle Harris *et al.*, 1999. La identificación de *G. salaris* debe realizarse según las siguientes referencias bibliográficas: Cunningham *et al.*, 2001; Malmberg *et al.*, 1957; 1970; McHugh *et al.*, 2000; Olstad *et al.*, 2007b; Shinn *et al.*, 2004.

El tamaño de las partes duras del opistaptor de *Gyrodactylus* depende en gran medida de, por ejemplo, la temperatura, mientras que la forma es más constante (Mo, 1991a; 1991b; 1991c). Por tanto, la capacidad de las mediciones lineales de capturar la morfología podría no siempre ser suficiente para establecer un diagnóstico fiable (Olstad *et al.*, 2007b).

Gyrodactylus salaris es morfológicamente similar al *G. teuchis* de la trucha marina, del salmón del Atlántico y de la trucha arco iris, y al *G. thymalli* del timalo (Figura 1). Los morfólogos expertos son capaces de reconocer cada una de estas especies en función de la forma de la hoz del gancho marginal. *Gyrodactylus teuchis* tiene una hoja de la hoz más larga y de curva más constante, mientras que *G. thymalli* tiene un pequeño ángulo en el tallo de la hoz (Cunningham *et al.*, 2001; McHugh *et al.*, 2000; Shinn *et al.*, 2004).

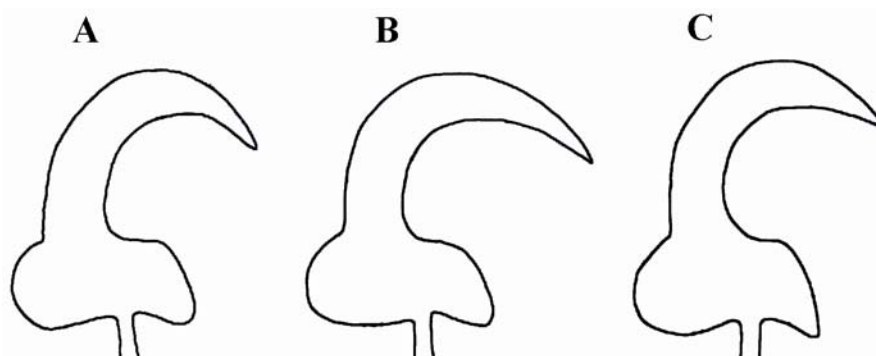


Figura 1. Ganchos marginales de (A) *Gyrodactylus salaris*, (B) *G. teuchis* y (C) *G. thymalli*. Dibujos modificados por Cunningham et al., 2001.

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

No son aplicables.

4.3.1.1.2. Frotis

No son aplicables.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

No son aplicables.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No son aplicables.

4.3.1.2.2. Métodos de detección de antígeno basados en anticuerpos

No son aplicables.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

Preparación de muestras

El ADN molde se debe preparar a partir de ejemplares vivos/frescos o bien conservados en etanol utilizando un protocolo adecuado de preparación de ADN. Puede utilizarse un kit de extracción de ADN siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.3.1.2.3.1. Análisis de la región de separación interna transcrita del gen del ARN ribosómico

- i) Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región de separación interna transcrita (ITS)

Para la amplificación de un producto de 1300 pares de bases de la región ITS, pueden utilizarse los cebadores como el 5'-TTT-CCG-TAG-GTG-AAC-CT-3' y 5'-TCC-TCC-GCT-TAG-TGA-TA-3'. Las condiciones de ciclado para la PCR son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; extensión final a 72°C durante 7 minutos (Cunningham, 1997). Si se analiza material parcialmente degradado, los espaciadores ITS1 e ITS2 pueden amplificarse en dos reacciones independientes utilizando los cebadores y las condiciones de la PCR descritos por Matejusova et al. (2001).

- ii) Secuenciación de la región ITS y análisis de la secuencia

Deben secuenciarse fragmentos de ITS amplificados preparados como en el apartado 4.3.1.2.3.1.i anterior y secuenciarse, y las secuencias deben someterse a una búsqueda BLAST en el GenBank/EMBL para establecer la identidad con secuencias conocidas. Además de los cebadores para la PCR, deben utilizarse al menos dos cebadores internos; 5'-ATT-TGC-GTT-CGA-GAG-ACC-G y 5'-TGG-TGG-ATC-ACT-CGG-CTC-A (Ziętara y Lumme, 2003). En el GenBank/EMBL se dispone de varias secuencias de otras especies que infectan a los salmónidos, como *G. derjavini*, *G. derjavinoides*, *G. truttae*, *G. teuchis* y *G. thymalli*.

Gyrodactylus salaris y *G. thymalli* no se pueden diferenciar por este método, pero las secuencias de ITS permiten diferenciar *G. salaris* y *G. thymalli* de todas las demás especies conocidas

Nota: En el GenBank/EMBL se dispone de varias secuencias de *G. salaris* y de *G. thymalli*, todas las cuales difieren en solo unas pocas mutaciones puntuales, pero no contienen ninguna mutación que permita diferenciar *G. salaris* de *G. thymalli*.

4.3.1.2.3.2. Análisis del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial

i) Amplificación por PCR del gen de la citocromo oxidasa I mitocondrial

Para amplificar el gen se pueden usar los cebadores 5'-TAA-TCG-GCG-GGT-TCG-GTA-A-3' y 5'-GAA-CCA-TGT-ATC-GTG-TAG-CA-3' (Meinilä *et al.*, 2002). Las condiciones de ciclado para la PCR son las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 50°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos; extensión final a 72°C durante 7 minutos. En la bibliografía pueden hallarse otros conjuntos de cebadores para la amplificación de la CO1: 4, Meinilä *et al.*, 2002; 2004.

ii) Secuenciación del CO1 y análisis de la secuencia

Deben secuenciarse fragmentos del CO1 amplificados preparados como se describe anteriormente, y compararse con otras secuencias mediante una búsqueda BLAST en el GenBank/EMBL. Además de los cebadores para la PCR, pueden utilizarse al menos dos cebadores internos, como 5'-CCA-AAG-AAC-CAA-AAT-AAG-TGT-TG-3' y 5'-TGT-CYC-TAC-CAG-TGC-TAG-CCG-CTG-G-3' (4).

Si la secuencia obtenida no tiene un 100% de coincidencia en el GenBank/EMBL, debe llevarse a cabo un análisis filogenético para establecer las relaciones con otras secuencias disponibles. Este método permite distinguir diferentes clados de *G. salaris* y *G. thymalli*.

NOTA: las secuencias del gen CO1 no permiten diferenciar claramente entre *G. salaris* y *G. thymalli* pero se pueden utilizar para asignar muestras a un clado. Los clados de *G. salaris* y de *G. thymalli* en general se asocian con claridad a preferencias por hospedador y/o a la distribución geográfica de los parásitos, con algunas excepciones. El CO1 no puede aplicarse como marcador de patogenicidad.

Hay que tener en cuenta que algunos investigadores han optado por enviar todas sus secuencias, tanto de salmón del Atlántico como de timalo, como *G. salaris*, lo cual causa confusión cuando se comparan secuencias (tanto de la ITS como del CO1) con las del GenBank/EMBL al realizar una búsqueda BLAST. Así pues, siempre debe comprobarse la identidad del hospedador de las secuencias del GenBank/EMBL.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No es aplicable.

4.3.2. Métodos serológicos

No son aplicables.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

No es aplicable.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de girodactilosis (*Gyrodactylus salaris*)

Los métodos de diagnóstico/detección para declarar la ausencia son los mismos que los descritos en el apartado 4.3.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

7.1. Definición de caso sospechoso

La observación de ejemplares de *Gyrodactylus* en salmón del Atlántico o trucha arco iris (u otros hospedadores susceptibles) en raspados de piel examinados al microscopio óptico o en aletas o piel examinadas al microscopio estereoscópico.

7.2. Definición de caso confirmado

El método de elección es una identificación molecular de uno o más ejemplares de *Gyrodactylus* como *G. salaris* (o *G. thymalli*) secuenciando su ITS, seguida de una secuenciación y análisis filogenético de CO1 para asignar la secuencia a la especie conocida más cercana. Los morfólogos expertos pueden identificar morfológicamente ejemplares de *Gyrodactylus* como *G. salaris* en base a estructuras del órgano de fijación. Sin embargo, el diagnóstico morfológico debe confirmarse mediante métodos moleculares. Se recomienda una combinación de métodos morfológicos y moleculares como la descrita en este capítulo.

8. Bibliografía

- BAKKE T.A., HARRIS P.D. & CABLE J. (2002). Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 281–308.
- BAKKE T.A., HARRIS P.D., HANSEN H., CABLE J. & HANSEN L. P. (2004). Susceptibility of Baltic and East Atlantic salmon *Salmo salar* stocks to *Gyrodactylus salaris* (Monogenea). *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 171–177.
- CUNNINGHAM C.O. (1997). Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.*, **83**, 215–219.
- CUNNINGHAM C.O., MO T.A., COLLINS C.M., BUCHMANN K., THIERY R., BLANC G. & LAUTRAITE A. (2001). Redescription of *Gyrodactylus teuchis* Lautraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae), a species identified by ribosomal RNA sequence. *Syst. Parasitol.*, **48**, 141–150.
- HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2003). Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1471–1478.
- HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007a). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends Parasitol.*, **23** (8), 363–367.
- HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007b). Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland, and Norway reveals further lineages. *Parasitol. Res.*, **100**, 1389–1394.
- HARRIS P.D., CABLE J., TINSLEY R.C. & LAZARUS C.M. (1999). Combined ribosomal DNA and morphological analysis of individual gyrodactylid monogeneans. *J. Parasitol.*, **85**, 188–191.
- JENSEN A.J. & JOHNSEN B.O. (1992). Site Specificity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in the River Lakselva, northern Norway. *Can. J. Zool.*, **41**, 264–267.
- JØRGENSEN T.R., LARSEN T.B., JØRGENSEN L.G., BRESCIANI J., KANIA P. & BUCHMANN K. (2007). Characterisation of a low pathogenic strain of *Gyrodactylus salaris* from rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 235–244.
- LINDENSTRØM T., COLLINS C.M., BRESCIANI J., CUNNINGHAM C.O. & BUCHMANN K. (2003). Characterization of a *Gyrodactylus salaris* variant: infection biology, morphology and molecular genetics. *Parasitology*, **127**, 165–177.
- MALMBERG G. (1957). Om förekomsten av *Gyrodactylus* på svenska fiskar. *Skr. söd. Sver. Fisk För.*, (Årsskr.) 1956, 19–76. (In Swedish, species descriptions and summary in English).
- MALMBERG G. (1970). The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). *Ark. Zool. [Ser. 2]*, **23**, 1–235.
- McHUGH E.S., SHINN A.P. & KAY J.W. (2000). Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data. *Parasitology*, **121**, 315–323.
- MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M. & LUMME J. (2002) Primers for amplifying approximately 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. *Hereditas*, **137**, 72–74.
- MEINILÄ M., KUUSELA J., ZIĘTARA M.S. & LUMME J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.*, **34**, 515–526.
- MO T.A. (1991a). Seasonal variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the River Batnfjordselva, Norway. *Syst. Parasitol.*, **19**, 231–240.

Mo T.A. (1991b). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) in a fish farm, with comments on the spreading of the parasite in south-eastern Norway. *Syst. Parasitol.*, **20**, 1–9.

Mo T.A. (1991c). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Syst. Parasitol.*, **20**, 11–19.

Mo T.A. (1992). Seasonal variations in the prevalence and infestation intensity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Fish Biol.*, **41**, 697–707.

OLSTAD K., CABLE J., ROBERTSEN G. & BAKKE T. A. (2006). Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology*, **133**, 33–41.

OLSTAD K., ROBERTSEN G., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007A). Variation in host preference within *Gyrodactylus salaris* (Monogenea): an experimental approach. *Parasitology*, **134**, 589–597.

OLSTAD K., SHINN A.P., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007B). Host-based identification is not supported by morphometrics in natural populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Platyhelminthes, Monogenea). *Parasitology*, **134**, 2041–2052.

PALADINI G., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., HANSEN H. & SHINN A.P. (2009). The first report of *Gyrodactylus salaris* Malmberg 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) on Italian cultured stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet. Parasitol.*, **165** (3–4), 290–297

POLÉO A.B.S., SCHJOLDEN J., HANSEN H., BAKKE T.A., MO T.A., ROSSELAND B.O. & LYDERSEN E. (2004). The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology*, **128**, 169–177.

ROBERTSEN G., HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T. A. (2007). Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, Gyrodactylidae) in Norway. *Parasitology*, **134**, 257–267.

ROKICKA M., LUMME J. & ZIĘTARA M. (2007). Identification of *Gyrodactylus* ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, Gyrodactylidae). *Acta Parasitologica*, **52**, 185–195.

SALTE R., BENTSEN H.B., MOEN T., TRIPATHY S., BAKKE T.A., ØDEGÅRD J., OMHOLT S. HANSEN L.P. (2010). Prospects for a genic management strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **67**, 121–129.

SHINN A.P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2004). The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.*, **51**, 239–252.

SOLENG A. & BAKKE T.A. (1997). Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 1837–1845.

SOLENG A., POLEO A.B.S., ALSTAD N.E.W. & BAKKE T. A. (1999). Aqueous aluminium eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. *Parasitology*, **119**, 19–25.

ZIĘTARA M.S. & LUMME J. (2003). The crossroads of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Syst. Parasitol.*, **55**, 39–52

ZIĘTARA M.S., ROKICKA, M., STOJANOVSKI S., SKORKOWSKI E.F. & LUMME J. (2007). Alien mitochondrial DNA in variant clones of *Gyrodactylus salaris* indicates a complex hybrid history in salmonid farms. 7th International Symposium on Fish Parasites, Viterbo, Italy. *Parassitologia*, **49**, 119.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Girodactilosis (*Gyrodactylus salaries*) (puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: www.oie.int).