

PREMIO TESI “S.I.P.I. 2006”

**Approccio sistematico a *Gyrodactylus salaris*
(Platyhelminthes, Monogenea)
e sua prima descrizione in Italia**

*Systematic approach to Gyrodactylus salaris
(Platyhelminthes, Monogenea): first report in Italy*

**Giuseppe Paladini¹, Andrea Gustinelli²,
Maria Letizia Fioravanti², Andrew Paul Shinn³**

¹ Corso di Laurea in Acquacoltura ed Ittiopatologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna, Sede di Cesenatico; ² Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ³ Institute of Aquaculture, University of Stirling, FK9 4LA, Scotland, UK

SUMMARY - The monogenean *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 is one of the most important parasites of farmed fish in Europe mainly for the heavy damages and losses caused in Atlantic salmon (*Salmo salar*), and for this reason in the past it was listed as a List III pathogen under the Fish Health Directive 91/67/EEC. Although rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) represents a suitable carrier host for *G. salaris*, the presence of this species has been never officially reported in Italy. More in general, information about the identity of *Gyrodactylus* species diffused in Italian rainbow trout farms are very scarce. Therefore during 2004 and 2005 a survey was carried out in 8 rainbow trout farms in order to search for and identify *Gyrodactylus* species. Morphological and molecular features of *Gyrodactylus* specimens collected allowed to identify 4 different species, *G. salaris*, *G. teuchis*, *G. derjavini* and *G. truttae* and to point out for the first time the presence of *G. salaris* and *G. teuchis* on the national territory.

Key words: *Gyrodactylus salaris*, *Gyrodactylus* spp., Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Identification, Italy.

INTRODUZIONE

I parassiti monogenei Gyrodactylidae appartenenti al genere *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832, vengono frequentemente indicati quali responsabili di problemi sanitari e perdite produttive in acquacoltura. In particolare *G. salaris* ha dimostrato un'elevata patogenicità per il salmone atlantico (*Salmo salar*), soprattutto allo stadio di parr (I anno di età) e smolt (dal II al V anno di età), tanto da venire inserito nell'Elenco III dell'Allegato A della Direttiva 91/67/CEE. Sebbene la nuova normativa europea di polizia sanitaria in acquacoltura (Direttiva 2006/88/CE) non prenda più in considerazione questo parassita, la sua importanza sanitaria per il salmone atlantico viene confermata dalle numerose ricerche e pubblicazioni scientifiche in corso. Va inoltre evidenziato come questo monogeneo possa parassitare in forma latente numerose altre specie di salmonidi che rappresentano quindi ospiti di trasporto di estrema rilevanza nella diffusione del parassita (Malmberg, 1993; Shinn *et al.*, 1998; Dalgaard *et al.*, 2003; Buchmann *et al.*, 2004; Dalgaard *et al.*, 2004). In particolare la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) è stata descritta frequentemente come ospite asintomatico o sub-clinico di *G. salaris* e per tal motivo viene considerata un serbatoio ideale del parassita.

In Italia, sebbene la troteicoltura rappresenti il maggiore comparto produttivo dell'acquacoltura dulciacquicola, mancano dati scientifici sulla presenza di *G. salaris* nelle trote iridee d'allevamento, così come peraltro risultano essere estremamente carenti in generale le informazioni sulle specie di monogenei Gyrodactylidae che possono essere reperite in questo ospite. Si è quindi condotta un'indagine al fine di individuare le specie di *Gyrodactylus* presenti in troteicoltura nazionali, conducendo esami parassitologici su trote iridee provenienti da allevamenti intensivi ubicati in diverse regioni italiane ed applicando i criteri identificativi suggeriti dal *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (OIE, 2003), inerenti morfometria delle strutture chitinee dell'opisthaptor ed analisi molecolare.

MATERIALI E METODI

Da ottobre 2004 a giugno 2005 sono stati condotti campionamenti in otto troteicoltura intensive ubicate nelle regioni Veneto (tre allevamenti), Umbria (due allevamenti), Toscana, Trentino Alto-Adige e Abruzzo (Tabella 1). Per ogni allevamento sono stati esaminati 20 soggetti di trota iridea di lunghezza compresa tra 10 e 40 cm. Da ogni esemplare è stato raccolto, previa eutanasia per spinalizzazione, il muco cutaneo mediante raschiamento di superficie corporea e pinne. Il materiale prelevato è stato fissato in alcool etilico 70° e sottoposto ad osservazione allo stereomicroscopio per la ricerca di monogenei girodattilidi. I parassiti isolati sono stati identificati nel corso di un periodo di studio all'estero condotto presso il laboratorio di Parassitologia dell'Institute of Aquaculture dell'Università di Stirling (Scotland, UK). Dopo accurata pulizia in acqua distillata, 51 esemplari sono stati sottoposti a leggera digestione in soluzione proteolitica (Shinn *et al.*, 1993) in modo da mantenere intatti gli organi chitinosi ed eliminare i tessuti molli, quindi montati su vetrino in fissativo di Malmberg (Malmberg, 1957). L'impiego di tecniche enzimatiche consente di ottenere un preparato estremamente sottile ed appiattito rendendo più facilmente osservabili gli apparati chitinosi utili all'identificazione del parassita (Malmberg, 1970; Shinn *et al.*, 1993). Si è quindi proceduto all'osservazione microscopica dei preparati utilizzando un microscopio Olympus BH2 a contrasto di fase e una camera digitale JVC KY-F30B 3CCD con il programma Zeiss KS300 iC/Windows Release ver. 3.0 (1997) (Carl Zeiss Vision GmbH, Munchen, Germany / Imaging Associates Ltd., Thame, Oxfordshire, UK). Ai fini identificativi sono state applicate le seguenti metodologie.

- Point-to-point Analysis

Per ogni esemplare sono stati presi in considerazione 25 parametri morfometrici, di cui 11 per l'*hamulus*, 6 per la barra ventrale e 8 per gli uncini marginali, raccogliendo in totale 1.275 misure, applicando il protocollo indicato da Shinn *et al.* (2004) con il software PointR ver. 1.0 (© Shinn, Bron, Kay & Sommerville, 2003, Universities of Stirling & Glasgow, UK).

- Statistical Classification

I dati rilevati con il software Point-R sono stati inseriti in un programma di analisi statistica contenente un database delle principali specie di girodattili dei salmonidi. Tale software (S-PLUS 2000, Professional Release 3 © 1988-2000 Mathsoft, Inc.) è in grado di effettuare una comparazione tra le misure degli esemplari in studio e quelle delle specie di *Gyrodactylus* inserite nel database, indicandone le probabilità di appartenenza ad una determinata specie (Kay *et al.*, 1999; Shinn *et al.*, 2000).

- OGRE (Optical Gyro Recognition)

La terza analisi é stata effettuata utilizzando il programma OGRE (Optical Gyro Recognition) ver. 1.0 (© Shinn, Bron, Kay & Sommerville, 2003, Universities of Stirling & Glasgow, UK) che attraverso vari passaggi di pulizia, ricostruzione e tagli dell'immagine permette di ottenere l'esatto profilo delle strutture anatomiche utili all'identificazione. Le immagini così ottenute sono state poi confrontate e sovrapposte a quelle di specie già classificate utilizzando i software MultiHook Comparisons ver. 1.0 e HookAlign I-IV ver. 1.0 databases (© Shinn, Bron, Kay & Sommerville, 2003, Universities of Stirling & Glasgow, UK).

- PCA (Principal Component Analysis)

Il PCA consiste in un'analisi discriminante che mostra graficamente e tridimensionalmente le similitudini fra le diverse specie di *Gyrodactylus* spp. grazie all'immissione, all'interno del software Statistical Release 6.0 (© StatSoft, Inc., 1984-2001, Tulsa, OK, USA), di tutte le misure "point to point" precedentemente rilevate. Per poter ottenere questo grafico è necessario definire preliminarmente due variabili corrispondenti alle due misure morfometriche che influiscono maggiormente sulla discriminazione di specie (Shinn *et al.*, 1996; 2001).

- PCR (Polymerase Chain Reaction)

Per riuscire ad effettuare anche l'analisi molecolare delle specie di girodattili rinvenute, ritenuta imprescindibile dall'analisi morfometrica nel *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* dell'OIE, si è proceduto alla dissezione della parte anteriore di 14 dei 51 parassiti in esame, prima della digestione proteolitica. Tale porzione veniva posta in alcool etilico 95° ed inviata al dott. Haakon Hansen presso i laboratori del Zoological Museum dell'University of Oslo (Norvegia), dove si procedeva all'analisi molecolare mediante PCR-RFLP dell'intera regione ITS dell'rRNA.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La presenza di monogeni appartenenti al genere *Gyrodactylus* è stata rilevata nelle trote iridee prelevate presso 5 (62,5%) degli 8 allevamenti sottoposti a campionamento. In tabella 1 vengono indicate le specie di girodattili identificate nel corso della ricerca, con indicazione della regione in cui erano ubicati gli allevamenti positivi.

| VENETO | UMBRIA | TOSCANA | TRENTINO ALTO-ADIGE | ABRUZZO |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|---------|
| <i>G. salaris</i> (n=6) | <i>G. salaris</i> (n=2) | <i>G. salaris</i> (n=10) | <i>G. salaris</i> (n=4) | ----- |
| | <i>G. teuchis</i> (n=8) | | <i>G. truttae</i> (n=1) | |
| | <i>G. salaris</i> (n=1) | | | |
| | <i>G. teuchis</i> (n=5) | | | |
| | <i>G. derjavini</i> (n=4) | | | |

Tabella 1 - Specie di *Gyrodactylus* identificate nel corso della ricerca
 Table 1 – *Gyrodactylus* species identified during the survey

Come si può osservare in tabella, è stato possibile identificare grazie alle analisi morfometriche 4 diverse specie di girodattili: *G. salaris*, *G. derjavini*, *G. teuchis* e *G. truttae* (Figure 1 A-D).

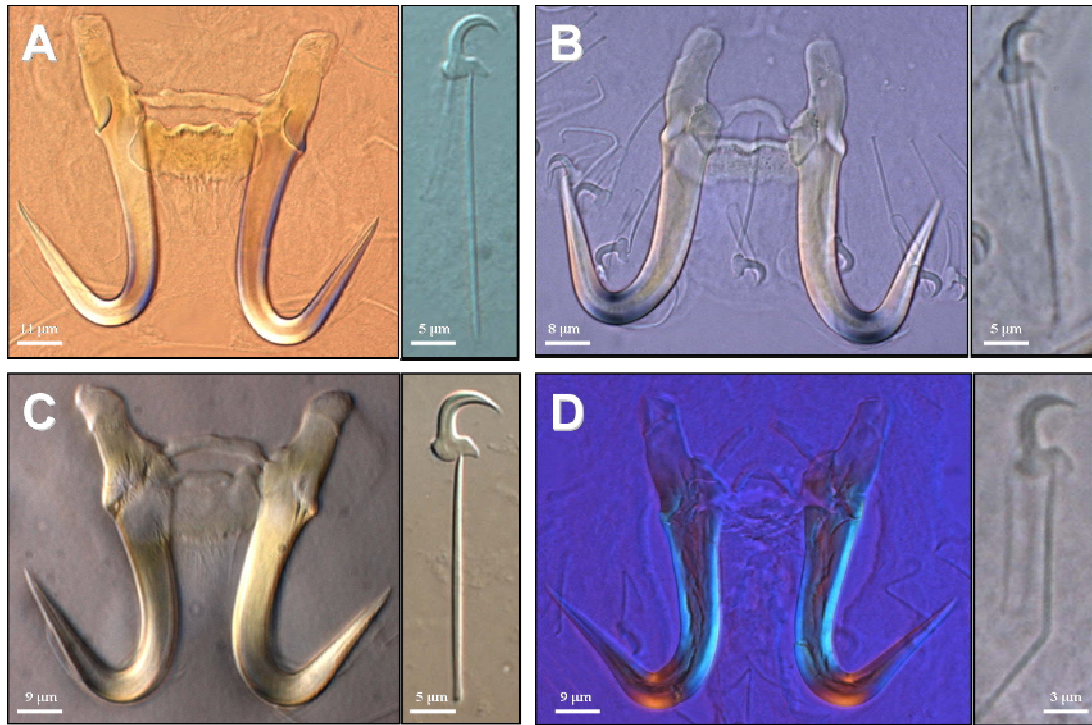


Figura 1 - Hamuli e uncini marginali di *Gyrodactylus salaris* (A), *G. derjavini* (B), *G. teuchis* (C), *G. truttae* (D).

Figure 1 - Hamuli and marginal hooks of *Gyrodactylus salaris* (A), *G. derjavini* (B), *G. teuchis* (C), *G. truttae* (D).

La presenza di *G. salaris* è stata riscontrata in tutti gli allevamenti risultati positivi. In particolare, in due allevamenti tutti gli esemplari sottoposti a identificazione morfologica sono stati riferiti esclusivamente a *G. salaris*, mentre nei restanti tre allevamenti *G. salaris* è stato riscontrato in associazione ad altre specie. Appare poi interessante come in Umbria, in entrambi gli allevamenti presi in considerazione, il numero di esemplari identificati come *G. teuchis* sia risultato predominante. Inoltre la specie *G. derjavini* è stata individuata soltanto nelle trote iridee campionate in questa regione. Per quanto concerne il Veneto, nell'unico allevamento risultato positivo sono stati reperiti girodattili appartenenti esclusivamente alla specie *G. salaris*, così come nei campioni provenienti dalla regione Toscana. Nel Trentino Alto-Adige, oltre ad un unico esemplare di *G. truttae*, specie già descritta in altre trocolture europee, sono stati evidenziati alcuni esemplari di *G. salaris*.

Lo studio delle sequenze dei 14 esemplari sottoposti ad analisi molecolare ha confermato la presenza in Italia di *G. teuchis*, *G. derjavini* e *G. salaris*, mentre l'identificazione di

G. truttae è stata condotta solo morfologicamente in quanto nel corso delle ricerche è stato isolato un unico esemplare di questa specie.

Ricerche effettuate in passato in Danimarca (Lindenstrøm *et al.*, 2003) avevano rilevato nelle trote d'allevamento le stesse quattro specie da noi identificate nelle trotilcolture italiane. Questi risultati sembrano indicare la trota iridea quale ospite idoneo per questi girodattili che, anche a diverse latitudini, mostrerebbero una notevole ospite-specificità.

In riferimento alle diverse procedure di identificazione morfologica applicate in questa ricerca, va evidenziato come l'applicazione di una singola procedura sia spesso insufficiente ad ottenere un'identificazione di specie, rendendo necessario integrare tutte le analisi di identificazione morfometrica. A titolo di conferma la conduzione parallela di analisi molecolari appare di notevole importanza (Lindenstrøm *et al.*, 2003).

Il rilevamento, negli esemplari di *G. salaris* raccolti nelle trotilcolture nazionali, di lievi differenze morfologiche rispetto a parassiti della stessa specie isolati da salmonidi presenti nei fiumi norvegesi, conferma la possibilità che le caratteristiche morfologiche di girodattili appartenenti alla stessa specie possano essere influenzate da fattori abiotici quali in particolare la temperatura (Harris, 1998).

CONCLUSIONI

Questa ricerca ha permesso di individuare, per la prima volta in Italia, la presenza di *G. salaris* nelle trote iridee d'allevamento, ampliando la distribuzione geografica di questo parassita (Ergens, 1983; Rintamaki, 1989; Keranen *et al.*, 1992; Mo, 1994; Shinn *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1996; Nielsen & Buchmann, 2001; Cunningham *et al.*, 2003; Bakke *et al.*, 2004).

Risulta inoltre di estremo interesse il reperto di *G. teuchis*, descritto originariamente in Francia (Cunningham *et al.*, 2001) e solo sporadicamente in Danimarca e Scozia, le cui caratteristiche biologiche e patologiche non risultano ancora definite e la cui presenza in Italia non era stata ancora segnalata.

Per quanto riguarda *G. derjavini* e *G. truttae*, frequentemente riportati in trotilcolture di altri paesi europei, risultano anch'essi diffusi negli allevamenti di trote nazionali sebbene siano stati evidenziati con frequenza minore rispetto alle precedenti due specie.

Appare particolarmente importante aver acquisito, nel corso delle ricerche condotte per la realizzazione di questa tesi, le conoscenze tecnico-scientifiche necessarie a condurre l'identificazione di specie dei girodattili dei salmonidi, con particolare riferimento a *G. salaris*, di estremo interesse non solo da un punto di vista strettamente parassitologico, ma anche e soprattutto in funzione dell'importanza sanitaria che questo parassita riveste nella salmonicoltura comunitaria.

RINGRAZIAMENTI

Parte delle ricerche sono state condotte grazie ad una borsa di studio all'estero del Corso di Laurea in Acquacoltura ed Ittiopatologia di Cesenatico finanziata dalla Banca di Credito Cooperativo di Sala di Cesenatico (FC).

BIBLIOGRAFIA

- Bakke T.A., Nielsen K.B. & Shinn A.P. (2004). Chaetotaxy applied to Norwegian *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) clades and related species from salmonids. *Folia Parasitologica*, 51: 253-261.
- Buchmann K., Madsen K.K. & Dalgaard M.B. (2004). Homing of *Gyrodactylus salaris* and *G. derjavini* (Monogenea) on different hosts and response post-attachment. *Folia Parasitologica*, 51: 263-267.
- Cunningham C.O., Collins C.M., Malmberg G. & Mo T.A. (2003). Analysis of ribosomal RNA intergenic spacer (IGS) sequences in species and populations of *Gyrodactylus* (Platyhelminthes: Monogenea) from salmonid fish in northern Europe. *Dis. Aquat. Org.*, 57: 237-246.
- 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. *System. Parasitol.*, 48: 141-150.
- Dalgaard M.B., Larsen T.B., Jørndrup S. & Buchmann K. (2004). Differing resistance of Atlantic salmon strains and rainbow trout to *Gyrodactylus salaris* infection. *J. Aquat. Animal Health*, 16: 109-115.
- Dalgaard M.B., Nielsen C.V. & Buchmann K. (2003). Comparative susceptibility of two races of *Salmo salar* (Baltic Lule river and Atlantic Conon river strains) to infection with *Gyrodactylus salaris*. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 173-176.
- Ergens R. (1983). *Gyrodactylus* from Eurasian freshwater Salmonidae and Thymallidae. *Folia Parasitologica*, 30: 15-26.
- Harris P.D. (1998). Extreme morphological variation between related individuals of *Gyrodactylus pungitii* Malmberg, 1964 (Monogenea). *System. Parasitol.*, 39: 137-140.
- Johnston C., Mackenzie K., Cunningham C.O., Eiras J.C. & Bruno D.W. (1996). Occurrence of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 in Portugal. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 16: 89-91.
- Kay J.W., Shinn A.P. & Sommerville C. (1999). Towards an automated system for the identification of notifiable pathogens: using *Gyrodactylus salaris* as an example. *Parasitol. Today*, 15, 5: 201-206.
- Keranen A.L., Koski P., Kulonen K., Ek-Kommonen C. & Neuvonen E. (1992). Occurrence of infectious fish diseases in fish farms in Northern Finland. *Acta Vet. Scandinavica*, 33: 161-167.
- 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 forekomsten av *Gyrodactylus* på avneska fiskar. *Skrifter utgivna av Södra svenska Fiskeriförning* Arzskrift: 19-76.
- Malmberg G. (1970). The excretory system and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). *Arkiv. Für Zool.*, 23: 1-235.
- Malmberg G. (1993). Gyrodactylidae and gyrodactylosis of salmonidae. *Bull. Franç. Pêche Piscicul.*, 328: 5-46.

- Mo T.A. (1994). Status of *Gyrodactylus salaris* problems and research in Norway. In: Pike A.W., Lewis J.W. (1994). *Parasitic Diseases of Fish*, Ed. Samara Publishing Limited: 43-56.
- Nielsen C.V. & Buchmann K. (2001). Occurrence of *Gyrodactylus* parasites in Danish fish farms. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 21, 1: 19-25.
- O.I.E. (Office International des Epizooties) (2003). Gyrodactylosis (*Gyrodactylus salaris*). *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, chapter 2.1.14: 200-206.
- Rintamaki P. (1989). *Gyrodactylus salaris* at a fish farm in Northern Finland. In: Bauer O.N., *Parasites of fresh national Symposium within the program of Sovietic-Finnish Cooperation. Institute of Biological Academy of Sciences, Karelia Petrozavodsk, USSR*: 123-130.
- Shinn A.P., Des Clers S., Gibson D.I. & Sommerville C. (1996). Multivariate analyses of morphometrical features from *Gyrodactylus* spp. (Monogenea) parasitising British salmonids: light microscope based studies. *System. Parasitol.*, 33: 115-125.
- Shinn A.P., Gibson D.I. & Sommerville C. (1993). A SEM study of the haptor sclerites of the genus *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea) following extraction by digestion and sonication techniques. *System. Parasitol.*, 25: 135-144.
- Shinn A.P., Gibson D.I. & Sommerville C. (2001). Morphometric discrimination of *Gyrodactylus salaris* Malmberg (Monogenea) from species of *Gyrodactylus* parasitising British salmonids using novel parameters. *J. Fish Dis.*, 24: 83-97.
- 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 population of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitologica*, 51: 239-252.
- Shinn A.P., Kay J.W. & Sommerville C. (2000). The use of statistical classifier for the discrimination of species of the genus *Gyrodactylus* (Monogenea). *Parasitology*, 120: 261-269.
- Shinn A.P., Sommerville C. & Gibson D.I. (1995). Distribution and characterization of species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea) parasitizing salmonids in the UK, and their discrimination from *G. salaris* Malmberg, 1957. *J. Nat. History*, 29: 1383-1402.
- Shinn A.P., Sommerville C. & Gibson D.I. (1998). The application of chaetotaxy in the discrimination of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Gyrodactylidae: Monogenea) from species of the genus parasitising British salmonids. *Int. J. Parasitol.*, 28: 805-814.