

***Hysteromorpha triloba*: primer registro de la presencia de la Enfermedad del Punto Negro en aguas continentales de Castilla y León (España)**

G. Illán¹, I. de Blas¹, I. Ruíz-Zarzuela¹

¹Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, Patología Animal y Epidemiología, C/ Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza
e-mail: gonzaloillan@hotmail.com

Resumen

La Enfermedad del Punto Negro (*Blackspot Disease*) es un proceso patológico de origen parasitario que afecta a peces continentales y marinos, caracterizado por el encapsulamiento de las fases metacercarias en las capas superficiales de la piel y que provoca la acumulación de melanina. *Hysteromorpha triloba* Rudolphi, 1819, perteneciente a uno de los varios géneros de trematodos digenéticos causantes de la enfermedad, ha sido descrita en la musculatura de varias especies continentales de Eurasia y Norteamérica (Bykhovskaya-Pavlovskaya *y cols.*, 1964; Hoffman, 1998). En el desarrollo de su ciclo vital intervienen, además de los peces, moluscos gasterópodos y aves piscívoras. Hasta la fecha, éste es el primer registro del parásito en las aguas continentales de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (España).

Palabras Claves: *Hysteromorpha triloba*, primer registro, Punto Negro, parásito trematodo, peces ciprinidos, moluscos gasterópodos, aves piscívoras, Castilla y León.

Summary

***Hysteromorpha triloba*: first report of the Black Spot Disease in inland waters of Castille and Leon (Spain)**

Blackspot Disease is a pathological process that affects freshwater and marine fish, characterized by the encapsulation of the metacercariae phases in the skin surface layers and that stimulates the accumulation of melanin. *Hysteromorpha triloba* Rudolphi, 1819 belongs to one of the various genera of digenetic trematodes that cause the disease and has been described in the muscles of several Eurasian and North American continental species (Bykhovskaya-Pavlovskaya *y cols.*, 1964; Hoffman, 1998). Besides the fish, also gastropod mollusks and piscivorous birds are involved in the development of its life cycle. Up to date, this is the first record of the parasite in continental waters of the region of Castile-Leon (Spain).

Key words: *Hysteromorpha triloba*, first record, Black Spot, trematode parasite, cyprinid fish, gastropod mollusks, piscivorous fish, Castille and Leon.

Introducción

Hysteromorpha triloba es un parásito que, como del resto de especies de trematodos digenéticos que afectan a los peces, presenta un ciclo vital heteroxeno, es decir, que comprende al menos dos hospedadores (Paperna, 1995) y que está condicionado por la temperatura ambiental (Bauer *y cols.*, 1964). Tras el desarrollo embrionario, de los huevos emergen fases larvarias acuáticas libres (*miracidios*) que tras localizar un molusco (hospedador intermedio), penetran activamente en él, y se desarrolla para formar *esporocistos* (una o varias fases) y *redias*. El pez (hospedador paraténico) se puede infectar o bien ingiriendo los moluscos infectados o bien a partir de las *cercarias* liberadas al medio acuático, que penetran activamente a través de la epidermis para formar *metacercarias*, y que pueden enquistarse o no. Finalmente, cuando el pez infectado es devorado por un ave piscívora (hospedador definitivo), las metacercarias se desarrollan

hasta el estadio adulto (Bauer *y cols.*, 1964; Paperna, 1995; Hoole *y cols.*, 2001). En el ciclo vital esta especie, las garzas y los cormoranes son los hospedadores más frecuentes (Hoffman, 1960), aunque también pueden serlo algunas especies de mamíferos, reptiles y otros peces (Hoffman, 1998).

Las fases metacercarias de *H. triloba*, cuando no están enquistadas (Fig. 5), muestran los siguientes rasgos morfológicos: dos regiones corporales definidas (Hoffman, 1960) y un perfil ligeramente trilobulado; ventosas oral y ventral de igual tamaño (Bhykhovskaya-Pavlovskaya *y cols.*, 1964); órgano de anclaje (*holdfast*) trilobulado y alargado, en posición media (Hoffman y Hundley, 1957) y en estado extendido tiene forma de embudo de 0,430 µm de diámetro (según Hawkins, 1932, citado por Chandler y Rausch, 1948). Las dimensiones varían entre un máximo de 1-1,5 mm de largo por 0,450 mm de ancho (Hughins, 1954; Bhykhovskaya-Pavlovskaya *y cols.*, 1964).

Cuando se enquistan en el pez hospedador, lo hacen principalmente en la musculatura de la zona dorsal, y sus efectos pueden llegar a ser patogénicos y afectar al normal funcionamiento de los tejidos cuando se localizan en áreas sensibles como las branquias (Hoole *y cols.*, 2001); en gran número son capaces de causar la muerte de los individuos afectados, siendo los alevines y juveniles los ejemplares más sensibles (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

A nivel productivo, su presencia puede conllevar graves pérdidas económicas al sector acuícola debido al grado de alteraciones y deformaciones que presentan los ejemplares infectados (Paperna, 1995).

Materiales y métodos

Entre los años 2005 y 2007, se llevó a cabo un muestreo aleatorio, estratificado y estacional. Para ello, se seleccionaron un total de siete puntos de muestreo: dos de ellos se localizaron en los tramos altos de la cuenca del río Duero y cuatro en los tramos medios, así como un único punto perteneciente a una piscifactoría de tencas (Figura 1). Se capturaron y analizaron un total de 782 ejemplares pertenecientes a 7 especies de ciprínidos: barbo común (*Luciobarbus bocagei*), bermejuela (*Achondrostoma arcasii*), boga del Duero (*Pseudochondrostoma duriense*), bordallo (*Squalius carolitertii*), gobio (*Gobio lozanoi*), piscardo (*Phoxinus phoxinus*) y tenca (*Tinca tinca*).

Figura 1. Representación gráfica de los puntos de muestreo de la Cuenca del río Duero (Castilla y León, España) seleccionados en el estudio, correspondientes a los tramos medios de los ríos Arlanza (*Ar*), Duratón (*Dur*), Ucero (*Uc-M*) y Eresma (*Er*), a los tramos altos de los ríos Revinuesa (*Rev*) y Ucero (*Uc-A*) y la piscifactoría (*Pisc*).



Bajo lupa binocular se observó la presencia de los puntos negros característicos (Figuras 2, 3 y 4) y bajo el microscopio óptico las características que sirvieron para el diagnóstico de las metacercarias libres de *H. triloba* (Figura 5); además, se realizaron cortes histológicos en las zonas de tejido dérmico donde las metacercarias estaban enquistadas bajo la forma de puntos negros (Figura 6).

Como criterios de clasificación se utilizaron los propuestos por de Kinkelin *y cols.* (1985), basados a su vez en Schmidt y Roberts (1977), con ciertas modificaciones:

- Phylum Platyhelminthes Gegenbaur, 1859
- Clase Trematoda Rudolphi, 1808
- Subclase Digenea Carus, 1863
- Orden Strigeidida (La Rue, 1926) Sudarikov, 1959
- Familia Strigeidae Raillet, 1919
- Género *Hysteromorpha* Lutz, 1931 Especie *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931 (syn. *Diplostomulum corti* Hughes, 1929; *Neascus musculicola* Waldenberg, 1860).

Figura 2. Puntos negros provocados por el enquistamiento de las metacercarias de *H. triloba* en la superficie corporal de un piscardio (río Arlanza).



Figura 3. Detalle de los puntos negros (metacercarias de *H. triloba*) en la superficie corporal de un piscardio (río Arlanza) (80X).

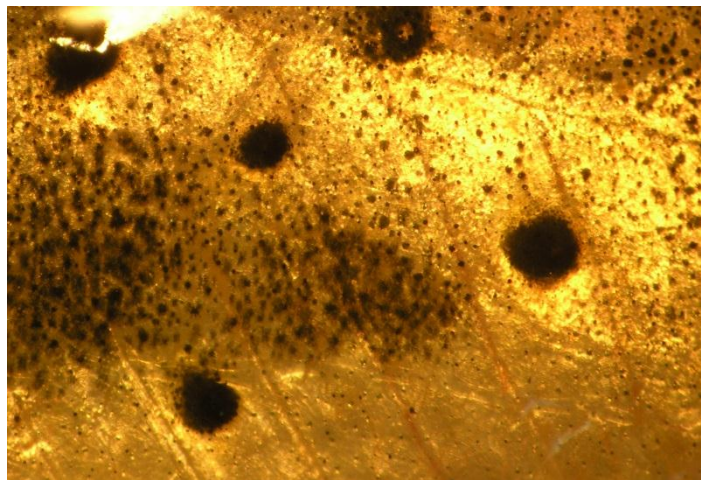


Figura 4. Detalle de los puntos negros (metacercarias de *H. triloba*) en radios de las aletas de un piscardo (río Arlanza) (izquierda: 80X; derecha: 100X).

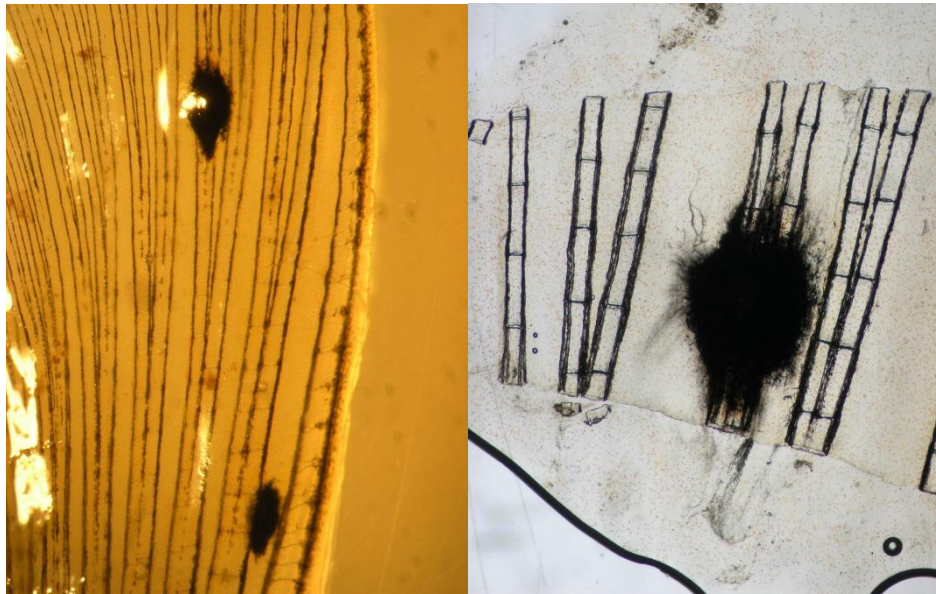


Figura 5. Metacercarias libres (no enquistadas) de *H. triloba* mostrando detalles de su morfología externa: ventosas oral y ventral, pseudoventosas laterales y órgano de anclaje (*holdfast*) trilobulado en la zona media (imagen de la derecha teñida con *lactofenol blue*) (100X).

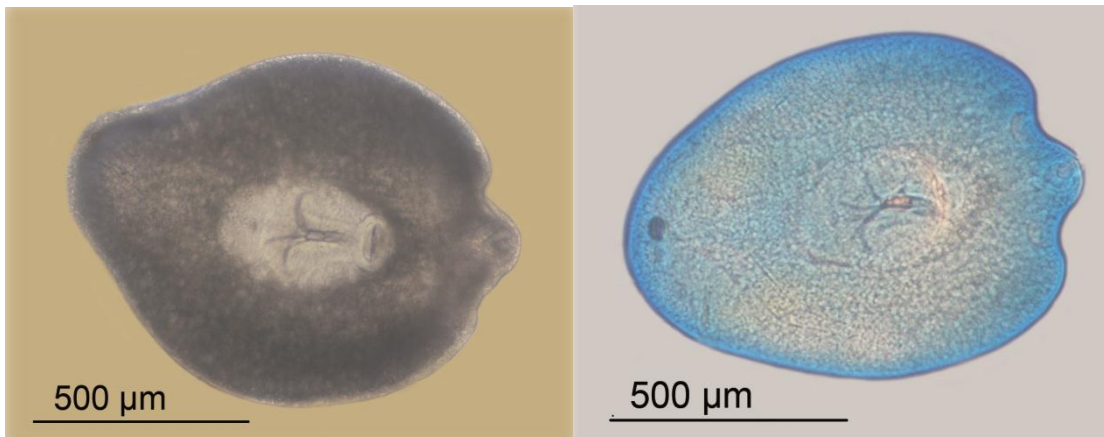
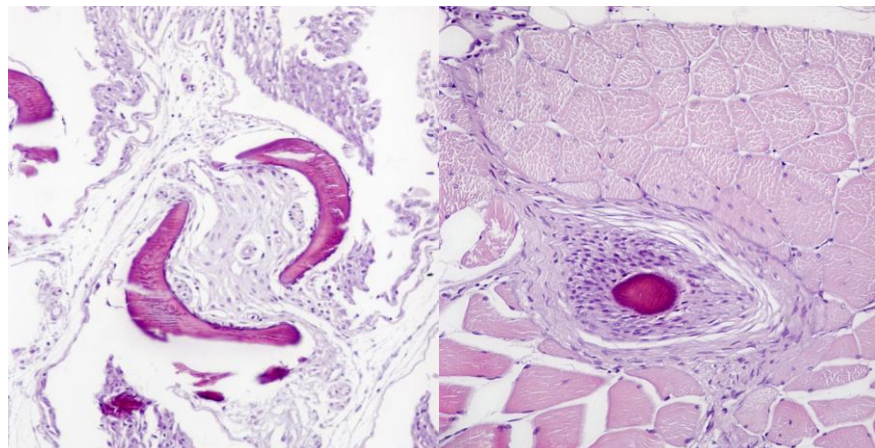


Figura 6. Cortes histológico del piscardo de la Figura 2, con metacercarias de *H. triloba* (sección más oscura). A la izquierda, dermis; a la derecha, musculatura (tinción Hematoxilina & Eosina, 100X, microscopía óptica).



Posteriormente, se calcularon las prevalencias e intensidades de parasitación, y se realizó un estudio de los principales factores de riesgo asociados a su presentación, mediante un análisis estadístico y epidemiológico con la ayuda de los programas informáticos WinEpi (2012), SPSS 15.0 y WinEpiScope 2.0. (Thursfield *y cols.*, 2001).

Resultados y Discusión

De la totalidad de ambientes muestreados y a lo largo del período de estudio, únicamente se encontraron metacercarias de *H. triloba* en un punto, situado en el tramo medio del río Arlanza (punto *Arl*, Figura 1), siendo las bogas (*Pseudochondrostoma duriense*) (con una prevalencia del 7,14%) y los piscardos (*Phoxinus phoxinus*) (66,67%) las únicas especies afectadas (p-valor 0,006^{RV}) (Tabla 1); en el 100% de los casos, los quistes estaban situados en piel y aletas. En la tabla 2 se muestra su longitud.

Tabla 1. Prevalencia de infección (%) por metacercarias de *H. triloba* según el sexo del hospedador estratificadas según las distintas especies de peces.

Especie	Prevalencia (%)
Barbo	0,00 (0,00-2,24)
Bermejuela	0,00 (0,00-11,29)
Boga	4,60 (0,20-9,00)
Bordallo	0,00 (0,00-25,89)
Gobio	0,00 (0,00-2,55)
Piscardo	3,43 (0,73-6,12)
Tenca	0,00 (0,00-3,27)
Total	1,57 (0,61-2,54)
p	0,006 ^{RV}

^{RV} Significación estadística según razones de verosimilitud

Tabla 2. Longitud total (µm) de los quistes de metacercarias de *H. triloba* en los ciprínidos capturados.

Estrato	n	Media	SD	Mínimo	Máximo
Piscardo (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	5	830,00	152,48	600	950
Boga (<i>Pseudochondrostoma duriense</i>)	3	1.016,67	160,73	900	1.200

Aunque ninguno de los parámetros de calidad de agua medidos en el punto de muestreo del río Arlanza (*Arl*) se comportó como factor de riesgo en la presentación de infecciones por *H. triloba*, cuando se analizó el conjunto de los datos de calidad de agua en este punto respecto al resto de los puntos muestreados (Tabla 3), se observó

que, en líneas generales se mostraban valores elevados de temperatura, conductividad y contenido en nutrientes (amonio, nitritos, nitratos y fosfatos), factores que podrían estar favoreciendo la presencia de hospedadores intermedios y/o finales y la transmisión del parásito, y por lo tanto la realización completa de su ciclo vital (Bauer y cols., 1964; Chubb, 1979; Paperna, 1995).

Tabla 3. Calidad físico-química y microbiológica del agua en los distintos puntos de muestreo (media ± DE).

	<i>ArI</i> (n=5)	<i>Dur</i> (n=8)	<i>Er</i> (n=6)	<i>Pisc</i> (n=5)	<i>Rev</i> (n=11)	<i>Uc-A</i> (n=9)	<i>Uc-M</i> (n=5)	p^{KW}	Total (n=49)
T^a	13,42 ± 3,91	14,59 ± 4,35	14,03 ± 3,86	15,14 ± 7,88	10,40 ± 3,68	11,40 ± 1,61	15,58 ± 2,89	0,162	13,03 ± 4,30
OD	10,05 ± 1,87	8,33 ± 2,49	9,22 ± 2,02	11,40 ± 2,84	9,72 ± 1,62	9,76 ± 1,71	8,18 ± 2,69	0,346	9,48 ± 2,21
pH	7,37 ± 0,44	7,95 ± 0,32	7,43 ± 0,24	9,62 ± 0,76	6,73 ± 0,30	7,49 ± 0,34	7,89 ± 0,16	<0,001	7,65 ± 0,87
Cond	194,40 ± 64,42	354,63 ± 30,98	260,33 ± 117,49	234,00 ± 65,25	47,03 ± 14,49	279,00 ± 142,28	402,8 ± 35,14	<0,001	240,34 ± 139,52
Turb	17,71 ± 32,12	4,10 ± 1,91	6,41 ± 5,37	5,44 ± 2,97	1,38 ± 1,38	3,81 ± 2,86	18,43 ± 18,05	0,003	6,71 ± 12,47
Alc	119,56 ± 27,82	224,18 ± 9,08	129,80 ± 29,51	126,88 ± 53,60	42,70 ± 28,48	246,71 ± 21,81	275,72 ± 18,50	<0,001	160,68 ± 87,90
Dur	165,60 ± 49,95	225,00 ± 23,57	147,00 ± 28,84	118,80 ± 48,63	49,09 ± 14,15	248,00 ± 21,63	291,60 ± 15,06	<0,001	170,08 ± 87,11
NH ₄	0,130 ± 0,152	0,100 ± 0,654	0,108 ± 0,097	0,080 ± 0,067	0,047 ± 0,007	0,063 ± 0,051	0,210 ± 0,188	0,020	0,094 ± 0,097
NO ₂	0,042 ± 0,038	0,191 ± 0,08	0,170 ± 0,137	0,018 ± 0,008	0,016 ± 0,008	0,020 ± 0,011	0,190 ± 0,184	<0,001	0,084 ± 0,111
NO ₃	4,40 ± 3,29	9,38 ± 5,04	10,83 ± 3,97	2,60 ± 1,34	2,73 ± 1,01	5,22 ± 2,44	8,20 ± 2,68	<0,001	5,98 ± 4,19
PO ₄	0,54 ± 0,55	0,40 ± 0,31	1,22 ± 0,46	0,56 ± 0,29	0,47 ± 0,73	0,25 ± 0,19	0,52 ± 0,16	0,010	0,53 ± 0,51
AT22°C	3259,4 ± 4765,0	4764,1 ± 3973,9	10017,8 ± 19373,1	413,0 ± 228,3	1800,5 ± 4998,2	2189,4 ± 2698,1	6153,2 ± 4470,4	0,010	3855,4 ± 7760,1
AT37°C	1280,4 ± 2233,3	886,4 ± 699,1	866,5 ± 598,4	86,8 ± 103,9	66,5 ± 154,4	319,3 ± 312,7	1258,8 ± 552,5	0,001	603,3 ± 897,5
CT	2409,0 ± 3047,0	3102,5 ± 2586,8	2146,3 ± 3423,7	43,6 ± 87,4	391,6 ± 603,3	3400,0 ± 1972,3	11000,0 ± 8710,6	<0,001	2854,5 ± 4392,3
CF	1686,2 ± 3531,0	1696,3 ± 2640,6	2008,3 ± 1091,1	32,8 ± 71,1	83,6 ± 127,6	1778,9 ± 1857,7	6170,0 ± 5111,7	<0,001	1673,4 ± 2814,0
EF	164,0 ± 259,4	110,6 ± 85,0	205,0 ± 72,3	57,6 ± 76,9	18,2 ± 27,1	127,6 ± 93,0	1004,0 ± 402,28	<0,001	195,7 ± 319,7
CSR 24h	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,0 ± 34,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 5,3	1,4 ± 3,1	0,392	2,4 ± 12,5
CSR 48h	1,2 ± 1,8	0,0 ± 0,0	17,7 ± 36,7	0,2 ± 0,5	0,0 ± 0,0	4,6 ± 5,9	5,8 ± 10,9	0,040	4,0 ± 14,3

^{KW} Significación según la prueba de Kruskal-Wallis

Parámetros físico-químicos: T^a : Temperatura (°C); Oxígeno disuelto (ppm); Cond: Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); Turb: Turbidez (FTU); Alc: Alcalinidad (mg/l); Dur: Dureza (mg/l); NH₄: Amonio (mg/l); NO₂: Nitritos (mg/l); NO₃: Nitratos (mg/l); PO₄: Fosfatos (mg/l)

Parámetros microbiológicos: AT22°C: Aerobios Totales 22°C (ufc/ml); AT37°C: Aerobios Totales 37°C (ufc/ml); CT: Coliformes Totales (ufc/100 ml); CF: Coliformes Fecales (ufc/100 ml); EF: Estreptococos Fecales (ufc/100 ml); CSR 24h: Clostridios 24 h (ufc/20 ml); CSR 48h: Clostridios 48 h (ufc/20 ml).

Consideramos que las condiciones abióticas (aguas lénticas) y bióticas, con la presencia de hospedadores intermedios (moluscos) y definitivos (aves piscívoras) (de Bont y de Bont Hers, 1952) generadas por la regulación hidráulica en este tramo del río, así como las características biológicas de las especies afectadas (menor grosor epidérmico) (Bauer, 1961), han generado el ambiente ideal para el desarrollo completo del ciclo vital de *H. triloba*.

Agradecimientos

A la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León y al personal técnico del Laboratorio de Ictiopatología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Bibliografía

1. Bauer ON, Vladimirov VL, Mindel NV. New knowledge about the biology of Strigeata causing mass diseases of fishes. En: Ergens R, Rysay B (eds). *Parasitic worms and aquatic condition*. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1964: 77-82.
2. Bauer ON. Relationships between host fishes and their parasites. En: Dogiel V.A., Petrushevski, G.K., and Polyanski, Yu.I. (eds.). *Parasitology of Fishes*. Oliver and Boyd Ltd., London. 1961.
3. Bykhovskaya-Pavlovskaya IE, Gusiev AV, Dubinina MN, Izumova NA, Smirnova TS, Sokolobskaya IL, Stein GA, Shulman SS and Epstein VM. *Key to Parasites of Freshwater Fish of the U.S.S.R. Academy of Sciences of the U.S.S.R.*, Zoological Institute. 1964; 919 pp.
4. Chandler AS, Rausch RL. A contribution to the study of certain avian Strigeids (Trematoda). *Faculty Publications from the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology*, 1948; 43(1): 207-210.
5. Chubb JC. Seasonal Occurrence of Helminths in Freshwater Fishes, Part II: Trematoda. *Advanced Parasitology*, 1979; 17: 141-313.
6. Cordero del Campillo M, Rojo FA. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill-Interamericana. 1999.
7. De Bont AF, De Bont Hers MJ. Mollusk control and fish farming in Central Africa. *Nature*, 1952; 170: 323-324.
8. De Kinkelin P, Michel CH, Ghittino P. *Precis de pathologie des poissons*. INRA-OIE, Paris. 1985.
9. Hoffman GL. Synopsis of Strigeoidea (Trematoda) of Fishes and Their Life Cycles. *US Fish and Wildlife Service Publications, Washington*. 1960; 60: 439-469.
10. Hoffman GL. *Parasites of North American Freshwater Fishes* (2nd edition). Comstock Publishing Associates. 1998; 539 pp.
11. Hoffman GL, Hundley JB. The life-cycle of *Diplostomumbaerieucaiae* n. subsp. (Trematoda: Strigeida). *The Journal of Parasitology*, 1957; 43(6): 613-627.
12. Hoole D, Bucke D, Burgues P, Wellby I. *Diseases of Carp and Other Cyprinid Fishes*. Blackwell Science (Fishing News Books). 2001; 264 pp.

13. Huggins EJ. Life history of a strigeid trematode, *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931. II. Sporocyst through adult. *Transactions of American Microscopical Society*, 1954; 73: 221-236.
14. Paperna I. Digenea (Phylum Platyhelminthes). En: Woo, P.T.K. *Fish Diseases and Disorders, Volume I: Protozoan and Metazoan Infections*. CABI Publishing. 1995, 808 pp.
15. Schmidt GD, Roberts LS. *Foundations of Parasitology*. C.V. Mosby Company, Saint Louis, Mi. 1977.
16. Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP, Frankena K. WinEpiScope 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The Veterinary Record*, 2001; 148: 567-72.
17. WinEpi (Programa informático *on line* Working in Epidemiology), disponible el 26/04/2012 en URL: <http://www.winepi.net>