

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΟΣΟΣΤΟΥ
ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΜΥΞΟΣΠΟΡΙΔΙΩΝ ΣΕ ΑΓΡΙΟΥΣ
ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ
ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ
ΕΜΦΥΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΣΕ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ
ΧΙΟΝΑΣ (*DIPLODUS PUNTAZZO* C.) ΜΕ ΤΟ
ΠΑΡΑΣΙΤΟ *ENTEROMYXUM LEEI* DIAMANT, LOM &
ΔΥΚΟΝΑΪ 1994**

ΕΛΕΝΗ Ν. ΓΚΟΛΟΜΑΖΟΥ

Γεωπόνος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας &
Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2007

Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη των Μυξοσποριδίων, που παρατηρούνται στα μεσογειακά καλλιεργούμενα είδη ψαριών, δίνοντας έμφαση στη νόσο που οφείλεται στο Μυξοσπορίδιο *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dyková 1994 και αποσκοπεί:

- Στην εκτίμηση της εμφάνισης της ασθένειας αυτής (Μυξοσποριδίαση) στη χώρα μας στις ιχθυοκαλλιέργειες των ψαριών της οικογένειας Sparidae, που αποτελούν ένα από το μεγαλύτερο μέρος της ελληνικής ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής καθώς και στη μελέτη του ρόλου άλλων ειδών ψαριών που αποτελούν τους φορείς στην εξάπλωση της παρασίτωσης.
- Στη μελέτη του τρόπου μετάδοσης του Μυξοσποριδίου *E. leei* και στη διερεύνηση των ανοσολογικών μηχανισμών που ενεργοποιούνται ενάντια στο παράσιτο αυτό, με απώτερο στόχο την ανάπτυξη μέτρων πρόληψης.
- Στην εκτίμηση της αντι-μυξοσποριδιακής επίδρασης διαφόρων φαρμάκων που διατίθενται στο εμπόριο για άλλα είδη εκτρεφόμενων ζώων σε χιόνες (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777), φυσικά μολυσμένες με το Μυξοσπορίδιο *E. leei*.

Η διατριβή χωρίζεται σε τέσσερα κεφάλαια: 1^ο Εισαγωγή, 2^ο Υλικά & Μέθοδοι, 3^ο Αποτελέσματα και 4^ο Συζήτηση.

Στην Εισαγωγή, γίνεται ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας. Το κεφάλαιο αυτό υποδιαιρείται σε τέσσερα τμήματα. Στο πρώτο τμήμα περιγράφεται η κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο, ευρωπαϊκό και ελληνικό επίπεδο. Στο δεύτερο τμήμα περιγράφονται τα παθολογικά προβλήματα που παρατηρούνται στις μεσογειακές υδατοκαλλιέργειες. Στο τρίτο τμήμα γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση των κυριότερων Μυξοσποριδίων παρασίτων που έχουν αναφερθεί στις υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Τέλος, στο τέταρτο τμήμα γίνεται

βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την ανοσία κατά των λοιμογόνων παραγόντων και ειδικότερα των πρωτόζωων παρασίτων των ψαριών.

Στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι” περιγράφεται το πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση παρασίτων, τον προσδιορισμό των ανοσολογικών παραγόντων και τα στατιστικά πακέτα που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση.

Στο κεφάλαιο “Αποτελέσματα” στο υποκεφάλαιο 3.1, γίνεται εκτίμηση της εποχικότητας και του ποσοστού προσβολής των Μυξοσποριδίων που παρασιτούν σε άγρια και εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα. Το *E. leei* παρατηρήθηκε τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια. Η χιόνα ή μυτάκι (*D. puntazzo*) αποδείχθηκε ο κύριος ξενιστής του παράσιτου όπου παρατηρήθηκαν και οι μεγαλύτερες θνησιμότητες και τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής, ενώ για πρώτη φορά διεθνώς ο εκτρεφόμενος σαργός (*Diplodus sargus* Cetti 1777) θεωρήθηκε σημαντικός ξενιστής αυτού του παράσιτου. Επίσης, το παράσιτο αυτό παρατηρήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς σε άγρια τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus 1758) και άγριο κέφαλο (*Mugil cephalus* Linnaeus 1758) που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια. Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν το έντερο. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν μεγάλα ποσοστά προσβολής σε εκτρεφόμενη χιόνα και σαργό παρατηρήθηκε επίσης και στη χοληδόχο κύστη και στα βράγχια. Επίσης, για πρώτη φορά διεθνώς αναφέρεται ότι ο νεφρός αποτελεί όργανο στόχο του παράσιτου, αφού ώριμοι σπόροι του παράσιτου παρατηρήθηκαν στους νεφρούς σε έντονα μολυσμένη εκτρεφόμενη χιόνα.

Το *Polysporoplasma sparis* Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1995, παρατηρήθηκε τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εκτρέφονταν τα μολυσμένα ψάρια. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η τσιπούρα αποτελεί τον κύριο ξενιστή του παράσιτου, ενώ

παρατηρήθηκε σε μικρότερα ποσοστά προσβολής και σε εκτρεφόμενη χιόνα. Επίσης, για πρώτη φορά διεθνώς παρατηρήθηκε σε άγρια ψάρια όπως: τσιπούρα, κέφαλο και σε μία περίπτωση σε λιθρίνι *Pagellus erythrinus* Linnaeus 1758 που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εκτρεφόταν τα μολυσμένα ψάρια. Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν ο νεφρός. Το παράσιτο παρατηρήθηκε επίσης και στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό ενώ σε λίγες περιπτώσεις σπόροι του *P. sparis* βρέθηκαν και σε μελανομακροφάγα κέντρα του νεφρικού παρεγχύματος, (MMC) περιχαρακωμένα με διπλή μεμβράνη συνδετικού ιστού.

Το παράσιτο *Myxobolus* sp. παρατηρήθηκε τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εκτρέφονταν τα μολυσμένα ψάρια. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενη χιόνα και για πρώτη φορά διεθνώς σε εκτρεφόμενο σαργό. Επίσης, είναι η πρώτη φορά που το παράσιτο αυτό αναφέρεται σε άγριο κέφαλο στην Ελλάδα, ενώ παρατηρήθηκε και σε άγριο σαργό. Το κύριο όργανο στόχος στα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια (σαργός και χιόνα) αλλά και στον άγριο σαργό ήταν ο ενδιάμεσος συνδετικός ιστός και τα μελανομακροφάγα κέντρα του νεφρού όπου παρατηρήθηκαν τροφοζώιτες και ώριμοι σπόροι του παράσιτου. Στον άγριο κέφαλο, ώριμοι σπόροι του παράσιτου παρατηρήθηκαν μόνο σε έντερο και χοληδόχο κύστη, εύρημα το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά διεθνώς.

Όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου *Ceratomyxa diplodae* Lubat, Radujkovic, Marques & Bouix 1989 και *Ceratomyxa sparusaaurati* Sitjà-Bobadilla, Palenzuela & Álvarez-Pellitero 1995 παρατηρήθηκαν σε χιόνα και τσιπούρα αντίστοιχα, χωρίς όμως να παρατηρηθούν θνησιμότητες εξαιτίας αυτού του παράσιτου. Επίσης, αταυτοποίητα είδη του γένους *Ceratomyxa* αναφέρθηκαν για πρώτη φορά διεθνώς σε άγρια ψάρια τσιπούρα και γόπα, (*Boops boops* Linnaeus 1758). Το κύριο όργανο στόχος του παράσιτου που παρατηρήθηκε τόσο στα εκτρεφόμενα όσο και στα άγρια ψάρια στην παρούσα έρευνα, ήταν η χοληδόχος κύστη.

Το Μυξοσπορίδιο *Henneguya* sp. παρατηρήθηκε σε άγρια τσιπούρα, ενώ είναι η πρώτη φορά διεθνώς που γίνεται αναφορά του παράσιτου αυτού σε εκτρεφόμενη χιόνα. Το όργανο στόχος του παράσιτου στην παρούσα έρευνα ήταν η χοληδόχος κύστη.

Τέλος, είδος Μυξοσποριδίου του γένους *Kudoa* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς σε μυικό ιστό σε εκτρεφόμενο σαργό.

Έξαρση των μυξοσποριδιάσεων παρατηρήθηκε τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, το καλοκαίρι παρατηρήθηκαν τα στατιστικά μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής για όλα τα Μυξοσπορίδια σε όλα τα είδη ψαριών που μελετήθηκαν (άγρια και εκτρεφόμενα), ενώ τα επίπεδα προσβολής ακολουθούν κατά φθίνουσα πορεία τη σειρά: άνοιξη, φθινόπωρο και χειμώνας.

Επίσης, αποδείχθηκε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση στη μετάδοση των Μυξοσποριδίων μεταξύ των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποδείχθηκε ότι τα άγρια ψάρια αποτελούν φορείς των Μυξοσποριδίων στα εκτρεφόμενα ψάρια, και αυτό προέκυψε αφενός από τον συγχρονισμό της παρασίτωσης ανάμεσα σε εκτρεφόμενα και άγρια ψάρια στις περισσότερες περιπτώσεις και αφετέρου από τα στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής των άγριων ψαριών συγκριτικά με των εκτρεφόμενων.

Στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα" στο υποκεφάλαιο 3.2, περιγράφεται η άμεση μετάδοση του παράσιτου *E. leei* σε εκτρεφόμενη χιόνα που επιτεύχθηκε για πρώτη φορά μέσω συνύπαρξης υγιών και ασθενών ψαριών. Ο προσδιορισμός της εξέλιξης της παρασίτωσης βασίστηκε στην ανίχνευση διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του Μυξοσποριδίου στον εντερικό σωλήνα και σε άλλα όργανα. Μολυσμένα ψάρια με *E. leei* παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την 5^η ημέρα από την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης (ποσοστό προσβολής: 20%). Το συνολικό ποσοστό προσβολής έφτασε το 100% την 19^η ημέρα και διατηρήθηκε σε αυτό το υψηλό επίπεδο μέχρι το τέλος της πειραματικής μόλυνσης (55^η ημέρα). Επίσης, στην αρχή η ένταση όλων των παρασιτικών σταδίων ήταν χαμηλή, αλλά την 26^η ημέρα η ένταση των τροφοζωιτών

αυξήθηκε ξαφνικά, ακολουθούμενη από αύξηση των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων. Επίσης, για πρώτη φορά εξετάστηκαν παράγοντες έμφυτης ανοσίας σε χιόνες μολυσμένες με το *E. 1aei*, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της μόλυνσης στην αμυντική ικανότητα του ψαριού ξενιστή. Εξετάστηκαν δύο παράγοντες της έμφυτης ανοσίας (NO και λυσοζύμη), προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της παρασίτωσης στην αμυντική ικανότητα του ξενιστή. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της έκκρισης NO από τα μονοκύτταρα του αίματος, των οποίων η συγκέντρωση αυξήθηκε σταδιακά στον ορό από την 5^η ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση και συνεχίστηκε έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, έγινε μία προσπάθεια υπολογισμού της επίδρασης της παρασίτωσης στα μονοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα του αίματος, (πληθυσμοί κυττάρων που επίσης επηρεάζουν μηχανισμούς μη ειδικής αντίδρασης), από τη μέτρηση της συγκέντρωσης λυσοζύμης στον ορό του αίματος. Ποσότητες λυσοζύμης στον ορό του αίματος των μολυσμένων ψαριών όμως δεν ανιχνεύτηκαν, παρά το γεγονός ότι σε φυσικές μολύνσεις του ίδιου ψαριού με άλλα Μυξοσπορίδια (πχ. *Myxobolus* sp.) είχε βρεθεί ότι η αύξηση της έντασης της παρασίτωσης παρεμποδίζει τη συστηματική έκκριση της λυσοζύμης και είχε προταθεί μία πιθανή επίδραση των Μυξοσποριδίων στην παραγωγή της λυσοζύμης, γεγονός το οποίο σχετίστηκε με την ένταση της παρασίτωσης. Επίσης, περιγράφεται για πρώτη φορά διεθνώς, μία μη επιτυχής πειραματική μόλυνση σε χιόνες που είχαν μολυνθεί παλαιότερα από το Μυξοσπορίδιο *E. 1aei* και είχαν θεραπευτεί μετά από χορήγηση θεραπευτικής αγωγής (αμπρόλιο και σαλινομικίνη), γεγονός που ίσως να αποτελεί μία ένδειξη ανάπτυξης αμυντικών μηχανισμών προστασίας.

Στο κεφάλαιο “Αποτελέσματα” στο υποκεφάλαιο 3.3, περιγράφεται η δοκιμή διαφόρων φαρμάκων, που χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά σε άλλα είδη ζώων σε περιπτώσεις μόλυνσης από σπορογόνα πρωτόζωα παράσιτα, τα οποία έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά σε πειραματικές θεραπείες άλλων Μυξοσποριδίων σε ψάρια. Σε χιόνες (μέσου βάρους 15g) φυσικά μολυσμένες με το Μυξοσπορίδιο *E.*

leei σε ποσοστό προσβολής 100%, ελήφθησαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα με εφαρμογή αμπρόλιου και σαλινομυκίνης (AS). Σύμφωνα μ' αυτά παρατηρήθηκε, μείωση του ποσοστού προσβολής, της έντασης και του ποσοστού θνησιμότητας στα υπό θεραπεία ψάρια, χωρίς παράλληλα να υπάρχει καμία ιστοπαθολογική ένδειξη τοξικότητας, ενώ σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι με παραμορφωμένη δομή παρατηρήθηκαν σε μικρό χρονικό διάστημα και σε μεγάλο ποσοστό. Συμπερασματικά, από τη διατριβή αυτή προκύπτει ότι ο συνδυασμός αμπρόλιο και σαλινομυκίνης μπορεί να είναι μία πολλά υποσχόμενη και ασφαλής αγωγή για τη θεραπεία πολλών Μυξοσποριδίων ευρύαλων ψαριών, περιορίζοντας τόσο την ένταση της παρασίτωσης όσο και τη θνησιμότητα.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής είναι:

- ο Τα Μυξοσπορίδια είναι παράσιτα τα οποία παρασιτούν ευρέως στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες και προκαλούν σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις σε αυτές. Ξενιστές των Μυξοσποριδίων είναι τόσο εκτρεφόμενα όσο και άγρια ψάρια και το καλοκαίρι είναι η εποχή που ευνοεί την έξαρση των μυξοσποριδιάσεων. Επίσης, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των άγριων και των εκτρεφόμενων ψαριών όσον αφορά στη μετάδοση των Μυξοσποριδίων και τα άγρια ψάρια μπορεί να αποτελούν φορείς μετάδοσης ορισμένων από τα παράσιτα αυτά στα εκτρεφόμενα ψάρια.
- ο Ο βιολογικός κύκλος του *E. leei* στη χιόνα είναι άμεσος και η μετάδοση του παράσιτου γίνεται μέσω του μολυσμένου νερού. Το έντερο είναι το πρώτο όργανο “στόχος” του παράσιτου. Η επίδραση της παρασίτωσης στην αμυντική ικανότητα του ξενιστή αποδείχθηκε από την ενεργοποίηση της έκκρισης NO από τα μονοκύτταρα του αίματος στα μολυσμένα ψάρια. Στο χρονικό διάστημα των 55 ημερών, που διήρκησε το πείραμα, η παρασίτωση βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια, γεγονός που εξηγεί τη μη

ανάπτυξη του παράσιτου σε άλλα όργανα στόχους και τις μηδενικές θνησιμότητες, ευνοώντας τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής.

- ο Ο συνδυασμός αμπρόλιο και σαλινομικίνη μπορεί να είναι μία πολλά υποσχόμενη, οικονομικά συμφέρουσα και ασφαλής θεραπεία για το *E. leei* που μπορεί να περιορίσει τόσο το ποσοστό προσβολής και την ένταση της παρασίτωσης όσο και τις θνησιμότητες.

Δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με την παρούσα διατριβή

Στις παρακάτω επιστημονικές δημοσιεύσεις παρουσιάζονται τμήματα της παρούσας διατριβής:

1. **Γκολομάζου Ε.**, Καραγκούνη Ε. & Αθανασοπούλου Φ. (2004). “Τα κυριότερα Μυξοσπορίδια παράσιτα των εκτρεφόμενων μεσογειακών ψαριών”. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας* 55(4): 342-352. Άρθρο ανασκόπησης.
2. **Golomazou E.**, Athanassopoulou F., Vagianou S., Sabatakou O., Tsadilas H., Rigos G., Kokkokiris L. (2006). “Diseases of white sea bream (*Diplodus sargus* L.) reared in experimental and commercial conditions in Greece” *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 30: 389-396. (IF= 0,103)
3. **Golomazou E.**, Athanassopoulou F., Karagouni E., Vagianou S., Tsantilas H., Karamanis D. (2006). “Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dykova, 1994 in infection in sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* C.” *International Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58(3): 157-169. (IF= 0,435)
4. **Golomazou E.**, Athanassopoulou F., Karagouni E., Tsagozis P., Tsantilas H., Vagianou S. (2006). “Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dykova, 1994 in sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters.” *Aquaculture* 260(1-4): 44-53. (IF=1,507)
5. Muñoz P., Cuesta A., Athanassopoulou F., **Golomazou E.**, Crespo S., Padrós F., Sitza-Bobadilla A., Albiñana G., Esteban MA, Alvarez-Pellitero P. Meseguer J. (in press). Sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) humoral immune response against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Fish and Shellfish Immunology*. (IF=1,696)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φ. Αθανασοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. Γεωργουλάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Προστασίας Υδρόβιου Ζωικού Κεφαλαίου, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και
Υδάτινου Περιβάλλοντος

Ε. Καραγκούνη, Ερευνήτρια Β', Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χ. Νεοφύτου, Καθηγητής	Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ε. Μπουρτζή-Χατζοπούλου, Καθηγήτρια	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Στ. Φρύδας, Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ι. Γεωργουλάκης, Αν. Καθηγητής	Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σπ. Κλαουδάτος, Καθηγητής	Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Ι. Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

**STUDY OF SEASONALITY AND PREVALENCE OF
MYXOSPORIDA INFECTIONS IN WILD FISH
POPULATION AND STUDY OF THE INNATE IMMUNE
RESPONSE OF *DIPLODUS PUNTAZZO*
EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *ENTEROMYXUM*
LEEI DIAMANT, LOM & DYKOVA 1994.**

ELENI N. GOLOMAZOU

Agriculturist

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Laboratory of Fish Diseases and Aquaculture of the Faculty
of Veterinary Medicine of the University of Thessaly

Karditsa. Greece 2007

ABSTRACT

The present thesis concerns the study of myxosporea infections in Mediterranean maricultured species, with emphasis in the myxosporea infection caused by *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dyková 1994. The objectives of the present thesis were:

- The estimation of the myxosporea infections in greek aquaculture, in Sparidae family cultured fish, which are the largest part of Greek mariculture and the role of wild fish as myxosporea reservoirs in cultured fish, as well.
- The study of *E. leei* transmission and immune response in receptor fish subjected to experimental infection of *E. leei*.
- The estimation of the efficacy and the toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs, commonly used for other cultured animals, for innovative treatments of *E. leei* in infection in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777).

The thesis is divided in four Chapters, Introduction, Material & Methods, Results and Discussion.

In the Introduction, the relevant literature is reviewed. The Chapter is subdivided into four Parts. In Part A, the World, European and greek aquaculture situation is described. In Part B, the pathological problems that are observed in aquaculture are described. In Part C, the literature of the most important myxosporea infections observed in Mediterranean aquaculture is reviewed. In Part D, the literature associated with the immune response of fish against infections and in particular protozoan parasites is reviewed.

In Material and Methods, the protocol used in each experiment and the laboratory techniques used for the detection of parasites and for definition of

immunological parameters are described. The statistical packages used for the statistical analysis of the results are also described.

In the Results, in subchapter 3.1, an estimation of the seasonality and prevalence caused by myxosporea infections in wild and cultured fish species in Greece is described. *E. leei* has been observed in both cultured and wild fish neighboring cages of cultured fish. Sharpsnout seabream proved to be the main host of this parasite where the highest prevalence and mortality rate were observed, while white seabream (*Diplodus sargus* Cetti 1777) proved to be also a significant host. *E. leei* was also observed in wild gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus 1758) and mullets (*Mugil cephalus* Linnaeus 1758) neighboring cultured fish. The main target organ of all infected fish was the intestine. In cases where high prevalence was observed in cultured sharpsnout seabream and white seabream, the gallbladder and the gills were also target organs. This is the first time that renal tissue is found as a target organ of this parasite; *E. leei* mature spores being observed in the kidney of heavily infected cultured sharpsnout seabream.

Polysporoplasma sparis Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1995, has been observed in both cultured and wild fish neighboring cages of cultured fish. Gilthead seabream proved to be the main host of this parasite, but it was also observed in cultured sharpsnout seabream. This is the first time that *P. sparis* is observed in wild fish such as: gilthead seabream and mullets and in one case in common pandora (*Pagellus erythrinus* Linnaeus 1758), neighboring cages of cultured fish. The main target organ in all infected fish was the kidney. The parasite was found also in the renal interstitial tissue while in a few cases *P. sparis* spores were observed in the melanomacrophage centers of the kidney demarcated by two layers of connective tissue.

Myxobolus sp. has been observed in both cultured and wild fish neighboring cages of cultured fish. This parasite was observed in cultured sharpsnout seabream and for the first time, internationally, in cultured white seabream. Also this is the first

time that this parasite was observed in wild mullets in Greece, while it was also observed in wild white seabream. The main target organ in cultured infected fish (white seabream and sharpsnout seabream) and in wild white seabream, was the renal interstitial connective tissue and the melanomacrophage centres of the kidney where trophozoites and mature spores were observed. In wild mullet, mature spores of the parasite were observed only in the gut and the gallbladder; this is found for the first time internationally.

All the developmental stages of *Ceratomyxa diplodae* Lubat, Radujkovic, Marques & Bouix 1989 and *Ceratomyxa sparusaurati* Sitjà-Bobadilla, Palenzuela & Álvarez-Pellitero 1995 were observed in sharpsnout seabream and gilthead seabream respectively, without causing any mortality. Also, unidentified species of the genus *Ceratomyxa* were mentioned for the first time in wild fish (gilthead seabream and bogue, *Boops boops* Linnaeus 1758) internationally. The main target organ of the parasite in both cultured and wild fish was the gallbladder.

The parasite *Henneguya* sp. was observed in wild gilthead seabream and for the first time in cultured sharpsnout seabream. The main target organ of this parasite was the gallbladder.

Finally, *Kudoa* sp. was observed for the first time internationally in the muscle of cultured white seabream.

Myxosporean parasites outbreaks were observed in the seasons of highest temperature. Summer, in particular, was the season when the more statistically significant prevalence was observed in all studied fish species (wild and cultured).

Also, an interaction in transmission of myxosporea parasites between cultured and wild fish was documented. In most cases, wild fish proved to be the reservoirs of myxosporea parasites transmitting the parasites in the cultured fish. This conclusion was based on the fact that simultaneous infection in cultured and wild fish occurred in most cases and on the fact that the prevalence was statistically higher in wild than in cultured fish.

In the Results, in subchapter 3.2, the study of the life cycle of myxosporea *Enteromyxum leei* in sharpsnout seabream is described. Direct transmission of the infection was achieved by cohabitation of infected and healthy sharpsnout seabream for the first time. The progress of the infection was monitored by the detection of different developmental stages of the parasite in the intestine. *E. leei* infected fish were firstly observed on day 5 (prevalence of 20%). The total prevalence reached 100% on day 19 and was maintained at this high level until the end of the experimental period (day 55). In addition, the initial intensity of the different parasite stages was low, but on day 26 the intensity of trophozoites was suddenly increased, followed by the increased intensity of sporoblasts and mature spores. Also, two innate immune factors were examined in order to determine the influence of the infection on the defence immunity of the host. Particularly, NO secretion from blood monocytes was gradually increased after their stimulation from parasite antigens. In the present study, lysozyme levels were not detected in blood serum of infected fish despite the fact that in natural infections of the same fish with other myxosporea parasites a possible influence of myxosporea infection in lysozyme production had been found, a fact that was related to the infection's intensity level. Also, the experimental transmission of *E. leei* in recovered sharpsnout seabream previously treated with Salinomycin and Amprolium (AS) proved to be unsuccessful, suggesting a possible development of protective immunity against this parasite.

In the Results, in subchapter 3.3, different drugs, effective against other spore-forming parasites in other animals were tested in order to estimate their anti-myxosporean effect in naturally infected (prevalence 100%) sharpsnout sea bream (with *E. leei*). Two medicated diets were applied: a) Amprolium and Salinomycin (AS) and b) Fumagillin (F). Significant drug effect on reduction of prevalence, intensity of all developmental myxosporea stages and mortality were observed at the end of both treatments in comparison to untreated fish. The effect was most prominent in the case of Amprolium and Salinomycin combination, exhibiting a significant reduction in

intensity, prevalence and mortality rate in treated fish without any histopathological evidence of toxic side effects or reduction on growth. Furthermore, sporoblasts and mature spores with distorted structure were observed in both tested treatments, but their prevalence was higher in the case of Amprolium and Salinomycin medication than in Fumagillin treated fish proving evidence of the effectiveness of the drug directly on the parasite. This data suggests that Amprolium and Salinomycin could be a promising treatment for *E. leei* infections in intensively cultured warm-water fish.

From the findings of the present study the following conclusions can be drawn:

- Myxosporea are widely distributed parasites in greek aquaculture causing serious economic effects. Cultured and wild fish are the hosts of these parasites and summer is the season that favours the myxosporea's elevation. Also, there is an interaction in myxosporea infection between cultured and wild fish and wild fish seems to be the parasite reservoir in cultured fish.
- The transmission of *E. leei* in sharpsnout seabream is direct and the parasite transmission is achieved through waterborn contamination. The intestine is the first "target" organ of this parasite. The influence of the infection on the defense immunity of the host, was proved by NO secretion from blood monocytes in infected fish. During the 55day experiment, the parasitosis is still in a primary phase, which is proved by the presence of the parasite in the intestine and not in other "target" organs and the deficiency of mortalities.
- The Amprolium and Salinomycin combination proved to be a well promising, cheap and safe combination treatment for *E. leei* reducing the prevalence and intensity level of parasitosis as well as the mortality rate.

Publications associated with the present thesis

The following scientific papers presenting facets of the present thesis, are available:

1. **Golomazou E.**, Karagouni, E., & Athanassopoulou F. (2004). The most important Myxosporean parasite species affecting cultured Mediterranean fish. *Journal of the Hellenic Medical Society* 55(4): 342-352 (In Greek with English abstract).
2. **Golomazou E.**, Athanassopoulou F., Vagianou S., Sabatakou O., Tsadilas H., Rigos G., Kokkokiris L. (2006). "Diseases of white sea bream (*Diplodus sargus* L.) reared in experimental and commercial conditions in Greece" *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 30: 389-396. (IF= 0,103)
3. **Golomazou E.**, Athanassopoulou F., Karagouni E., Vagianou S., Tsantilas H., Karamanis D. (2006). "Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dykova, 1994 in infection in sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* C." *International Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58(3): 157-169. (IF= 0,435)
4. **Golomazou E.**, Athanassopoulou F., Karagouni E., Tsagozis P., Tsantilas H., Vagianou S. (2006). "Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dykova, 1994 in sharpsnout seabream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters." *Aquaculture* 260(1-4): 44-53 (IF=1,507)
5. Muñoz P., Cuesta A., Athanassopoulou F., **Golomazou E.**, Crespo S., Padrós F., Sitza-Bobadilla A., Albiñana G., Esteban MA, Alvarez-Pellitero P. Meseguer J. (in press). Sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) humoral immune response against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Fish and Shellfish Immunology*. (IF=1,696)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ – ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	11
ABSTRACT	13
ADVISORY COMMITTEE – EXAMINATION BOARD	19
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	20
Πρόλογος – Σκοποί της παρούσας διατριβής	27
Ευχαριστίες	30
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</u>	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Περὶ υδατοκαλλιιεργειών	33
1.1.1 Σημασία των υδατοκαλλιιεργειών.....	33
1.1.2 Υδατοκαλλιιεργειες σε διεθνή χώρο.....	36
1.1.3 Υδατοκαλλιιεργειες σε Ευρώπη και Μεσόγειο.....	39
1.1.4 Παρούσα κατάσταση των υδατοκαλλιιεργειών στην Ελλάδα.....	42
1.2 Παθολογικά προβλήματα στις υδατοκαλλιιεργειες	47
1.2.1 Πρωτόζωα	48
1.2.2 Μυξοσπορίδια, Κλάση: Myxosporoea.....	49
1.3 Τα κυριότερα Μυξοσπορίδια παράσιτα που έχουν αναφερθεί στις ελληνικές υδατοκαλλιιεργειες	60
1.3.1 <i>Enteromyxum leei</i> (πρώην <i>Myxidium leei</i>) Diamant, Lom & Dykονά 1994.....	63

1.3.2	<i>Myxobolus</i> sp.....	65
1.3.3	<i>Sphaerospora</i> sp.....	67
1.3.4	<i>Polysporoplasma sparis</i> Sitjà-Bobadilla & Alvarez -Pellitero 1995	70
1.3.5	<i>Ceratomyxa</i> sp.....	71
1.3.6	<i>Kudoa</i> sp.	72
1.3.7	Πρόληψη – Θεραπεία Μυξοσποριδίων.....	73
1.4	Η ανοσία κατά των λοιμογόνων παραγόντων.....	75
1.4.1	Γενικά – Έμφυτη και επίκτητη ανοσία.....	75
1.4.2	Μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας.....	76
1.4.3	Μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας και παράσιτα.....	78
1.4.4	Αμυντικοί μηχανισμοί των ψαριών.....	79
1.4.5	Μονοκύτταρα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.....	82
1.4.6	Λυσοζύμη	84
1.4.7	NO.....	87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1	Πειραματικά πρωτόκολλα.....	91
2.1.1	Μελέτη των μυξοσποριδιάσεων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Ρόλος των άγριων ψαριών στη μετάδοση των παρασίτων (Μυξοσποριδίων).....	92
2.1.1.1	Περιοχή δειγματοληψίας.....	92
2.1.1.2	Πειραματικά ψάρια – Πρωτόκολλο δειγματοληψιών.....	94
2.1.2	Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με <i>E. ictyoi</i> σε χιόνα και μελέτη ορισμένων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας που αναπτύσσονται κατά τη μόλυνση.....	98

2.1.2.1	Πειραματικά ψάρια.....	98
2.1.2.2	Τρόποι πειραματικής μόλυνσης.....	101
2.1.2.3	Πειραματικές δεξαμενές.....	103
2.1.2.4	Εξετάσεις πριν την έναρξη των πειραματισμών.....	106
2.1.2.5	Πρωτόκολλο δειγματοληψιών.....	107
2.1.2.6	Συνθήκες εκτροφής κατά τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης.....	107
2.1.3	Εφαρμογή πειραματικών θεραπειών κατά την παρασίτωση με <i>E. iberi</i> σε χιόνα.....	108
2.1.3.1	Πειραματικά ψάρια.....	108
2.1.3.2	Πειραματικές δεξαμενές.....	109
2.1.3.3	Θεραπευτικές αγωγές.....	110
2.1.3.4	Εξέταση των ψαριών πριν την έναρξη των δειγματοληψιών.....	111
2.1.3.5	Πρωτόκολλο δειγματοληψιών.....	111
2.1.3.6	Συνθήκες εκτροφής κατά τη διάρκεια των πειραματικών θεραπειών.....	112
2.2	Ανίχνευση παρασίτων.....	112
2.2.1	Μακροσκοπική και νεκροσκοπική εξέταση.....	112
2.2.2	Παρασιτολογική εξέταση.....	113
2.2.3	Ιστοπαθολογική εξέταση.....	117
2.3	Προσδιορισμός ανοσολογικών παραγόντων.....	122
2.3.1	Αιμοληψία.....	122
2.3.2	Προσδιορισμός Λυσοζύμης.....	122
2.3.3	Προσδιορισμός NO.....	123
2.4	Στατιστική ανάλυση.....	123

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1	Μελέτη των μυξοσποριδιάσεων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Ρόλος των άγριων ψαριών στη μετάδοση των παρασίτων.....	126
3.1.1	<i>E. leei</i>	126
3.1.1.1	Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου <i>E. leei</i>	126
3.1.1.2	Εποχιακή κατανομή του <i>E. leei</i>	128
3.1.1.3	Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του <i>E. leei</i>	132
3.1.2	<i>P. sparis</i>	134
3.1.2.1	Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου <i>P. sparis</i>	134
3.1.2.2	Εποχιακή κατανομή του <i>P. sparis</i>	136
3.1.2.3	Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του <i>P. sparis</i>	140
3.1.2.4	Άλλες αλλοιώσεις που σχετίζονται με την παρασίτωση από <i>P. sparis</i>	143
3.1.3	<i>Myxobolus</i> sp.....	152
3.1.3.1	Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου <i>Myxobolus</i> sp.....	152
3.1.3.2	Εποχιακή κατανομή του <i>Myxobolus</i> sp.....	154
3.1.3.3	Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του <i>Myxobolus</i> sp.....	157
3.1.3.4	Άλλες αλλοιώσεις που σχετίζονται με την παρασίτωση από <i>Myxobolus</i> sp.....	160

3.1.4	<i>Ceratomyxa</i> sp.....	166
3.1.4.1	Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου <i>Ceratomyxa</i> sp.....	166
3.1.4.2	Εποχιακή κατανομή του <i>Ceratomyxa</i> sp.....	169
3.1.4.3	Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του <i>Ceratomyxa</i> sp.....	173
3.1.5	<i>Henneguya</i> sp.....	175
3.1.5.1	Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου <i>Henneguya</i> sp.....	175
3.1.5.2	Εποχιακή κατανομή του <i>Henneguya</i> sp.....	177
3.1.5.3	Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του <i>Henneguya</i> sp.....	179
3.1.6	<i>Kudoa</i> sp.....	181
3.1.6.1	Μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου <i>Kudoa</i> sp.....	181
3.1.6.2	Εποχιακή κατανομή του <i>Kudoa</i> sp.....	182
3.1.7	Σύνοψη των Μυξοσπορίδιων παρασίτων που ανιχνεύτηκαν στα εκτρεφόμενα και άγρια είδη ψαριών που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα.....	183
3.2	Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με <i>E. ictii</i> σε χιόνα και μελέτη ορισμένων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας που αναπτύσσονται κατά τη μόλυνση.....	186
3.2.1	Ανάλυση της πειραματικής μόλυνσης με συνύπαρξη.....	187
3.2.1.1	Πειραματική δεξαμενή συνύπαρξης με ψάρια δέκτες υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.....	187
3.2.1.2	Πειραματική δεξαμενή συνύπαρξης με ψάρια δέκτες υγιείς χιόνες μέσου βάρους 150g, τα οποία στο παρελθόν είχαν μολυνθεί με	

	φυσική μόλυνση με το <i>E. coli</i> και είχαν θεραπευτεί.....	201
3.2.1.3	Πειραματική δεξαμενή μαρτύρων με ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.....	201
3.2.1.4	Πειραματική δεξαμενή μαρτύρων με ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 150g, τα οποία στο παρελθόν είχαν μολυνθεί με φυσική μόλυνση με το <i>E. coli</i> και είχαν θεραπευτεί.....	201
3.2.2	Πειραματική μόλυνση με στομαχικό καθετήρα.....	202
3.2.2.1	Πειραματική δεξαμενή μόλυνσης με στομαχικό καθετήρα σε ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.....	202
3.2.2.2	Πειραματική δεξαμενή μαρτύρων με ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.....	202
3.3	Εφαρμογή πειραματικών θεραπειών κατά την παρασίτωση με <i>E. coli</i> σε χιόνα.....	203
3.3.1	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών όσον αφορά τα ευρήματα της μακροσκοπικής παρατήρησης και νεκροτομικής εξέτασης.....	204
3.3.2	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής.....	204
3.3.2.1	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής από τροφοζώιτες.....	204
3.3.2.2	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής από σποροβλάστες.....	205
3.3.2.3	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους.....	206
3.3.3	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στην ένταση της παρασίτωσης.....	212

3.3.4	Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στην ανάπτυξη και στο ποσοστό θνησιμότητας.....	219
3.3.5	Εκτίμηση της τοξικότητας με ιστοπαθολογική εξέταση	221

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1	Μελέτη των μυξοσποριδιάσεων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Ο ρόλος των άγριων ψαριών στη μετάδοση των παρασίτων.....	224
4.1.1	Ξενιστές και εποχικότητα Μυξοσποριδίων.....	224
4.1.2	Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση των Μυξοσποριδίων.....	243
4.2	Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με <i>E. ictyoi</i> σε χιόνα και μελέτη ορισμένων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας που αναπτύσσονται κατά τη μόλυνση.....	247
4.3	Εφαρμογή πειραματικών θεραπειών κατά την παρασίτωση με <i>E. ictyoi</i> σε χιόνα.....	252
4.4	Συμπεράσματα.....	259
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	263

Πρόλογος – Σκοποί της παρούσας διατριβής

Την τελευταία 25ετία έχει αναπτυχθεί στον ευρωπαϊκό, και ιδιαίτερα στο μεσογειακό χώρο, μεγάλο ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες κάθε τύπου και μορφής. Τα τελευταία 15 χρόνια μάλιστα, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες σε θαλασσινό νερό, που η συνολική παραγωγή τους το 2004 έφτασε τους 2.238.683 τόνους (τον.) (FAO 2004, [http¹](#)). Η Ελλάδα, με ετήσια παραγωγή που υπερβαίνει τους 60.000 τον. (για το έτος 2002), είναι πρώτη σε παραγωγή λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax* L.) και τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) με περισσότερες από 200 μονάδες εκτροφής, ενώ σε πολλές μονάδες της εφαρμόζεται πλέον ικανοποιητικά η εντατική εκτροφή νέων ειδών, όπως η χιόνα (*Diplodus puntazzo* C.), το φαγκρί (*Pagrus pagrus* L.), ο σαργός (*Diplodus sargus* C.), η συναγρίδα (*Dentex dentex* L.), το λιθρίνι (*Pagellus erythrinus* L.) και η γλώσσα (*Solea solea* L.).

Τη ραγδαία όμως ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών ακολούθησε η εμφάνιση παθολογικών προβλημάτων, κυρίως παρασιτικής αιτιολογίας, τα οποία δυσκολεύουν την ομαλή ανάπτυξη των ψαριών, κυρίως στα στάδια της προπάχυνσης και της πάχυνσης (κλωβοί). Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση πρωτοζωικών παρασιτικών ειδών, τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί για επιδημίες. Τα Μυξοσπορίδια είναι τα πιο κοινά παράσιτα που προσβάλλουν τα εντατικά εκτρεφόμενα ψάρια της Μεσογείου, δημιουργώντας ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων, που καθορίζονται από το είδος του παράσιτου, από την ευαισθησία του ξενιστή, τις περιβαλλοντικές και διατροφικές συνθήκες και το βιολογικό κύκλο των παρασίτων (Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1992α,β, 1993α,β, Diamant 1997). Στα μεσογειακά καλλιεργούμενα είδη ψαριών έχουν παρατηρηθεί διάφορα είδη Μυξοσποριδίων, μεταξύ των οποίων το *E. leei* που είναι ένα εξαιρετικά παθογόνο Μυξοσπορίδιο για τα είδη της οικογένειας Sparidae στην Ελλάδα. Στην Ελλάδα, μόλυνση από *E. leei* στη χιόνα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1995 από τους Le Breton και Marques σε μονάδες

πάχυνσης χιόνας και τσιπούρας όπου το ποσοστό της θνησιμότητας έφτασε το 40%. Στο είδος αυτό έχουν παρατηρηθεί οι σημαντικότερες επιδημίες, σε βαθμό που να το καθιστούν ασύμφορο για εντατική καλλιέργεια, με πιο σημαντική αυτή των ετών 1997 και 1998, η οποία προκάλεσε απώλειες σε χιόνα και τσιπούρα που έφτασαν το 80% της παραγωγής (πάχυνσης) της χιόνας στην Ελλάδα (Athanassopoulou, Prapas, Rodger 1999).

Για τα θαλάσσια Μυξοσπορίδια οι πληροφορίες σχετικά με τη μετάδοση και το βιολογικό τους κύκλο είναι λιγοστές. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περιπτώσεις άμεσου βιολογικού κύκλου (μετάδοση των Μυξοσποριδίων από ψάρι σε ψάρι) και έμμεσου βιολογικού κύκλου (μετάδοση των Μυξοσποριδίων με τη βοήθεια ενός ενδιάμεσου ξενιστή). Επίσης, η σημαντικότητα των παρασιτώσεων και τα αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας που πολλές φορές παρατηρούνται σχετίζονται και με την απουσία κατάλληλης θεραπείας για τα Μυξοσπορίδια. Για τα μεσογειακά ψάρια έχουν γίνει λίγες έρευνες σχετικά με την θεραπεία των παρασίτων (Rigos, Christophilogiannis, Yiagnisi, Andriopoulou, Koutsodimou, Nengas & Alexis 2000, Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1992γ, Athanassopoulou, Karagouni, Dotsika, Ragias, Tavla & Christofilloyianis 2004α, Athanassopoulou, Karagouni, Dotsika, Ragias, Tavla, Christofilloyianis & Vatsos 2004β, Karagouni, Athanassopoulou, Lytra, Komis, Dotsika 2005α, Karagouni, Athanassopoulou, Tsagozis, Ralli, Moustakareas, Lytra, Dotsika 2005β), ενώ δεν υπάρχουν εγκεκριμένα αντιπαρασιτικά φάρμακα και επίσημα ελάχιστα όρια καταλοίπων (MRL's), με αποτέλεσμα οι μέχρι τώρα διαθέσιμες πληροφορίες να προκύπτουν από τα είδη ψυχρών υδάτων, κυρίως Salmonidae. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, καθώς τόσο οι θεραπευτικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, σταθερότητα, τοξικότητα σε άλλα υδρόβια ζώα) όσο και οι παράγοντες της βιολογίας του ψαριού (ασφάλεια, μεταβολισμός, stress, κατάλοιπα κ.α.) είναι πολύ διαφορετικά σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη των Μυξοσποριδίων στα μεσογειακά καλλιεργούμενα είδη ψαριών, δίνοντας έμφαση στην μυξοσποριδίαση που οφείλεται στο Μυξοσπορίδιο *E. izei* και αποσκοπεί:

- Στην εκτίμηση της κατάστασης της ασθένειας αυτής (Μυξοσποριδίαση) στη χώρα μας, στις ιχθυοκαλλιέργειες των ψαριών της οικογένειας Sparidae, που αποτελούν ένα από το μεγαλύτερο μέρος της ελληνικής ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής και στη μελέτη του ρόλου άλλων ειδών που αποτελούν τους φορείς στην εξάπλωση της παρασίτωσης
- Στη μελέτη της μετάδοσης του Μυξοσποριδίου *E. izei* και στην εξέταση της ανοσολογικής αντίδρασης και των μηχανισμών που σχετίζονται με την άμυνα των ψαριών στην παρασίτωση από το παράσιτο αυτό, προκειμένου να αναπτυχθούν μέτρα προφύλαξης και πρόληψης.
- Στην εκτίμηση της αντι-παρασιτικής επίδρασης διαφόρων φαρμάκων που διατίθενται στο εμπόριο για άλλα είδη εκτρεφόμενων ζώων σε χιόνες φυσικά μολυσμένες με το Μυξοσπορίδιο *E. izei*.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ερευνητική εργασία που περιγράφεται διήρκησε από το φθινόπωρο του 2002 έως το φθινόπωρο του 2005 και η συγγραφή της διατριβής έγινε κατά το 2005 και το 2006. Τα έξοδα της διατριβής καλύφθηκαν από το ερευνητικό πρόγραμμα "Diagnosis, epidemiology and control of an enteric myxosporosis of commercial Mediterranean fish", που χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση. (Project number: QLRT-2001-00722).

Τμήματα της ερευνητικής εργασίας που περιγράφονται στη διατριβή πραγματοποιήθηκαν στον Ιχθυογεννητικό Σταθμό του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Περιβάλλοντος που εδρεύει στην Πωγωνίτσα Πρέβεζας και στο Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur στην Αθήνα.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ την κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω αυτή τη διατριβή και την επέβλεψε, υποστηρίζοντας και καθοδηγώντας με καθ' όλη τη διάρκειά της. Η συμβολή της ήταν καθοριστική στην επιλογή του θέματος, το οποίο εντάσσεται στα πιο σημαντικά ερευνητικά ενδιαφέροντά της. Επίσης την ευχαριστώ για την ανεύρεση χρηματικών πόρων μέσω της ένταξής μου σε ένα εξαιρετικό ερευνητικό πρόγραμμα, καθώς και για τη συνεχή βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Ιωάννη Γεωργουλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη συμβολή του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής και τις πολύτιμες συμβουλές του, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, παροτρύνοντάς με να ξεκινήσω αυτή τη διδακτορική διατριβή. Επίσης, ευχαριστώ την κα Ευδοκία Καραγκούνη, Ερευνήτρια Β' του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur, για τη βοήθειά της στο ανοσολογικό μέρος της διατριβής, τη συνεχή υποστήριξή της και τις πολύτιμες συμβουλές της, που αποδείχθηκαν ιδιαίτερα σημαντικές για την ολοκλήρωση της διδακτορική διατριβής.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στον κ. Καραμάνη για τη βοήθεια στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στην κ. Ά. Παππά, φιλόλογο, για την φιλολογική επιμέλεια του κειμένου.

Στον κ. Ά. Τριανταφύλλη, προϊστάμενο του Ιχθυογεννητικού σταθμού του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων στην Πωγωνίτσα Πρέβεζας, καθώς και στο προσωπικό του σταθμού για την φιλοξενία τους για την πραγματοποίηση των πειραμάτων καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά τους.

Στον κ. Π. Τσαγκόζη και στην κ. Μ. Αγάλλου, υποψήφιους διδάκτορες, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην πραγματοποίηση των ανοσολογικών μεθοδολογιών.

Στον κ. Η. Τσαντήλα, υποψήφιο διδάκτορα, για την βοήθειά του στην πραγματοποίηση των πειραματικών μολύνσεων.

Στην κ. Κ. Μπιτσαβά, υποψήφια διδάκτορα, για την βοήθειά της στην παρασιτολογική εξέταση μέρους των άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών.

Στην κ. Σ. Βαγιάνου, τεχνικό του Εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας, Υδατοκαλλιέργειών, για την παρασκευή δειγμάτων για ιστοπαθολογική εξέταση.

Στον κ. Μ. Λιάσκο, τέως προϊστάμενο του Κέντρου Γενετικής Βελτίωσης Ζώων Καρδίτσας Καρδίτσας (Κ.Γ.Β.Ζ.Κ), στον κ. Κ. Τσιλιώνη, νυν προϊστάμενο του Κ.Γ.Β.Ζ. Καρδίτσας, στον κ. Ν. Λιαπή, αναπληρωτή προϊστάμενο του Κ.Γ.Β.Ζ. Καρδίτσας, για την επιείκεια που μου έδειξαν, διευκολύνοντάς με να ολοκληρώσω τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της δωδεκάμηνης πρακτικής μου άσκησης στην ειδικότητα του Γεωπόνου στο (Κ.Γ.Β.Ζ.Κ).

Στους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου όταν τους χρειαζόμουν.

Τέλος, στους γονείς μου ένα μεγάλο ευχαριστώ, για τη μέχρι τώρα προσφορά τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για την απεριόριστη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου έδειξαν στις δύσκολες στιγμές, δίνοντάς μου δύναμη και κουράγιο να ολοκληρώσω αυτή την διδακτορική διατριβή.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περί υδατοκαλλιεργειών

1.1.1 Σημασία των υδατοκαλλιεργειών

Ο όρος «υδατοκαλλιέργειες» περιλαμβάνει τις προσπάθειες του ανθρώπου για εκτροφή και καλλιέργεια (εκμετάλλευση) υδρόβιων οργανισμών με την καταβολή τόσο εργασίας όσο και ενέργειας. Αποτελούν επομένως τον κλάδο της γεωργίας που ασχολείται με το υδάτινο περιβάλλον.

Οι υδατοκαλλιέργειες, για να φτάσουν στη σημερινή τους μορφή, από την άποψη της διαδικασίας παραγωγής, πέρασαν από πολλά ενδιάμεσα στάδια και η σημερινή τους κατάσταση δεν είναι τίποτε άλλο από ένα μεταβατικό στάδιο.

Ο άνθρωπος άρχισε να εκτρέφει υδρόβιους οργανισμούς, σύμφωνα με ευρήματα που έχουμε στη διάθεσή μας, από τον 20ο αιώνα π.χ. στην Άπω Ανατολή. Με την πάροδο των αιώνων οι ανθρώπινες ανάγκες άλλαξαν και η τεχνολογία εξελίχθηκε. Στις μέρες μας, οι στόχοι εφαρμογής των υδατοκαλλιεργειών διαμορφώθηκαν, ως εξής :

- Παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο.
- Παραγωγή τροφής για τα κατοικίδια.
- Παραγωγή προϊόντων για τη βιομηχανία.
- Βελτίωση φυσικών αποθεμάτων υδρόβιων οργανισμών με τεχνητές μεθόδους.
- Παραγωγή διακοσμητικών υδρόβιων οργανισμών.
- Παραγωγή δολωμάτων για την αλιεία ιχθύων.
- Παραγωγή ιχθύων κατάλληλων για τον εμπλουτισμό φυσικών υδάτινων μαζών και την ερασιτεχνική αλιεία.

Καθώς η μεγάλη κρίση της εποχής μας δεν είναι αυτή της ενέργειας, αλλά των τροφίμων, η παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο, τουλάχιστον σήμερα, αποτελεί

το σημαντικότερο στόχο εφαρμογής των υδατοκαλλιεργειών. Οι λόγοι που συνηγορούν στο σημαντικό ρόλο που παίζουν και που προβλέπεται να παίζουν οι υδατοκαλλιέργειες στο πρόβλημα των τροφίμων στον πλανήτη μας αποδεικνύονται από τα παρακάτω:

1. Έντονος ρυθμός αύξησης του πληθυσμού της γης. Στα επόμενα 50-100 χρόνια θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα να διατραφεί ένας πληθυσμός περίπου 2 έως 4 φορές μεγαλύτερος από το σημερινό.
2. Σε πολλές χώρες του κόσμου, ίσως στις περισσότερες, η έλλειψη τροφίμων, και ιδιαίτερα πρωτεϊνών χαμηλού κόστους και υψηλής βιολογικής αξίας, άρχισε ήδη να γίνεται αισθητή.
3. Σε πολλές περιοχές, η φυτική και ζωική παραγωγή όχι μόνο έχουν σχεδόν εξαντλήσει τις δυνατότητές τους, αλλά γενικά η παραγωγή τους είναι πολύ δύσκολο να ακολουθήσει το ρυθμό αύξησης του πληθυσμού της γης.
4. Οι δυνατότητες της αλιείας έχουν φτάσει σχεδόν στο μέγιστο σημείο των αποδόσεων τους.
5. Ο έντονος ρυθμός αύξησης του πληθυσμού παρατηρείται σε χώρες υπανάπτυκτες με μικρές δυνατότητες παραγωγής τροφίμων. Ο σημερινός πληθυσμός των υποανάπτυκτων χωρών είναι της τάξεως των 2,9 δισεκ., αποτελεί δηλαδή περίπου το 60% του πληθυσμού της γης. Οι ίδιες αυτές χώρες παρουσιάζουν μια ετήσια αύξηση περίπου 60 εκατ. ανθρώπων, που αντιστοιχεί στα 80% της ετήσιας συνολικής πληθυσμιακής αύξησης της Γης.
6. Η βελτίωση της ποιότητας της ζωής σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες. Μολονότι δεν έχει πλήρως επιβεβαιωθεί, εντούτοις είναι σχεδόν σίγουρο ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες, κατά τα τελευταία χρόνια, οι γεννήσεις είναι τόσες ώστε η αύξηση του πληθυσμού να είναι γύρω στο μηδέν. Στις ίδιες όμως χώρες, η ευρύτατη αντίληψη για ισορροπημένη διατροφή, καθώς και η σχεδόν άρτια ιατροφαρμακευτική περίθαλψη, έχουν ανεβάσει τόσο το επίπεδο όσο και το μέσο όρο ζωής, και επομένως έχουν μειώσει το ρυθμό των θανάτων.

Η ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών συνεπάγεται:

- Τη μεγιστοποίηση της παραγωγής σε σχέση με το εφαρμοζόμενο σύστημα παραγωγής.
- Την παραγωγή προϊόντων αρίστης ποιότητας.
- Την επίτευξη της προβλεπόμενης παραγωγής στο ελάχιστο δυνατό χρονικό διάστημα.
- Τη χρησιμοποίηση της ελάχιστης δυνατής ποσότητας νερού.
- Την επίτευξη του χαμηλότερου δυνατού κόστους παραγωγής.
- Τη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας του υδάτινου περιβάλλοντος.

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι ένας από τους σημαντικότερους και συγχρόνως οικονομικότερους τρόπους παραγωγής τροφίμων. Αυτό υποστηρίζεται από διάφορες επιστημονικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι η αύξηση σε ζωντανό βάρος, ανά μονάδα βάρους σιτηρεσίου, καθώς και ο συντελεστής αποδοτικότητας της πρωτεΐνης στους ιχθύες, είναι ίσα ή υψηλότερα από εκείνα των βιομηχανικών εκτροφών των ορνίθων και οπωσδήποτε υψηλότερα από εκείνα των βιομηχανικών εκτροφών χοίρων, προβάτων και μόσχων.

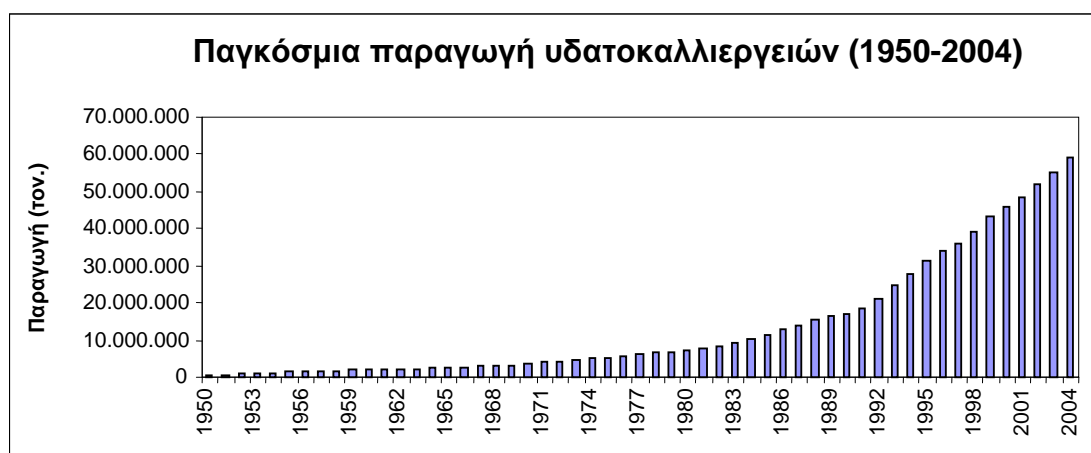
Έτσι, θα μπορούσε να σημειωθεί ότι οι ιχθύες αλλά και άλλοι υδρόβιοι οργανισμοί, όπως για παράδειγμα τα μαλάκια, αποτελούν «εργοστάσια» υψηλής αποδοτικότητας πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένων και των φυτικών οργανισμών) που τις μετατρέπουν σε άριστης ποιότητας τροφή για τον άνθρωπο.

Παρόλα όμως τα πλεονεκτήματα, δεν πρέπει η εφαρμογή τους να γίνεται με μοναδικό σκοπό το οικονομικό όφελος, αλλά οι διαθέσιμες γνώσεις, τα κεφάλαια και η τεχνολογία να συνεργάζονται ώστε παράλληλα με την παραγωγή τροφίμων να προστατεύεται και το περιβάλλον (Παπουτσόγλου 1997).

1.1.2 Υδατοκαλλιέργειες στο Διεθνή Χώρο

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών, οι υδατοκαλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί, διαφοροποιηθεί, εντατικοποιηθεί και τεχνολογικά αναβαθμιστεί. Τα πιο πρόσφατα στοιχεία που αφορούν στην παγκόσμια παραγωγή έχουν ανακοινωθεί από το FAO (Οργανισμός Τροφίμων και Επισιτισμού του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών) το 2004 και αφορούν στοιχεία μέχρι το 2002. Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά, η συνεισφορά των υδατοκαλλιεργειών στην κάλυψη των παγκοσμίων αναγκών σε ψάρια, μαλάκια και καρκινοειδή συνεχίζει να αυξάνεται, από 3,9% του συνολικού βάρους παραγωγής το 1970 σε 29,9% το 2002. Οι ιχθυοκαλλιέργειες αυξάνονται πιο γρήγορα από τους τομείς των άλλων προϊόντων ζωικής παραγωγής. Παγκοσμίως αυτός ο τομέας αυξάνεται με ένα μέσο ποσοστό 8,9% κάθε χρόνο από το 1970, συγκρινόμενο με το ποσοστό της αλιείας που αυξάνεται μόλις κατά 1,2% και με το ποσοστό της παραγωγής κρέατος που αυξάνεται μόλις κατά 2,8% κάθε χρόνο.

Το 2004 η παγκόσμια συνολική παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών (συμπεριλαμβανομένων και των υδρόβιων φυτών) ήταν 59,4 εκατομμύρια τον. Στο Γράφ. 1-1 φαίνεται η μεταβολή της παγκόσμιας συνολικής παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών από το έτος 1950 έως το έτος 2004 ([http¹](#))



Γράφημα 1-1. Μεταβολή της παγκόσμιας συνολικής παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών από το έτος 1950 έως το έτος 2004.

Περισσότερα από 210 διαφορετικά είδη υδρόβιων ζώων και φυτών έχουν αναφερθεί μέχρι το έτος 2002. Αυτή η ποικιλία απεικονίζει το μεγάλο αριθμό υδρόβιων ειδών τα οποία προσαρμόζονται στο μεγάλο εύρος συστημάτων παραγωγής που εφαρμόζονται σε διάφορες χώρες και περιοχές του κόσμου. Το 2000, περισσότερη από τη μισή της παγκόσμιας παραγωγής προερχόταν από θαλασσινά ή υφάλμυρα νερά. Το μέσο ετήσιο ποσοστό αύξησης (για την περίοδο 1970-2000) ήταν υψηλότερο για την παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες γλυκών υδάτων. Παρά το γεγονός ότι η παραγωγή υφάλμυρων νερών αντιπροσωπεύει μόλις το 4,6% του βάρους της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής για το 2000, αντιστοιχεί στο 15,7% της αξίας της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής. Τα κυριότερα καλλιεργούμενα είδη στα γλυκά νερά είναι οι τελεόστεοι ιχθύες. Υψηλής αξίας καρκινοειδή και οστέιχθες κυριαρχούν στα υφάλμυρα νερά ενώ μαλάκια και υδρόβια φυτά κυριαρχούν στα θαλασσινά νερά (FAO 2002). Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία του FAO (FAO 2004), για το έτος 2002, το ετήσιο ποσοστό αύξησης για τα θαλασσινά είδη μειώθηκε από 12,3% (έτος 2000) σε 9,5%, για τα είδη εσωτερικών υδάτων μειώθηκε από 7,8% (έτος 2000) σε 5,8%, για τα οστρακοειδή μειώθηκε από 5,3% (έτος 2000) σε 4,6% ενώ για τα καρκινοειδή αυξήθηκε από 9,9% (έτος 2000) σε 11%.

Στηριζόμενος ο FAO σε τέτοια στοιχεία όπως τα παραπάνω δίνει προβλέψεις που παρουσιάζονται στον Πίν. 1-1.

Πίνακας 1-1. Προβλεπόμενη παραγωγή υδατοκαλλιεργειών από το 1982 έως το 2050				
Ομάδες ειδών	Παραγωγή 1992 (εκ. τον.)	Ποσοστό αύξησης 1986-1992 %	Εκτιμώμενη ανάπτυξη το 2010 (εκ. τον.)	Προβλεπόμενη ανάπτυξη το 2050 (εκ. τον.)
Ιχθύες γλυκού νερού	7,981	7,9	17,770	28,280
Διάδρομοι ιχθύες	1,081	7,6	2,130	3,960
Άλλοι θαλάσσιοι ιχθύες	0,356	7,2	0,910	5,100
Σύνολο ιχθύων	9,418	7,8	20,810	37,340
Καρκινοειδή γλυκού νερού	0,062	1,4	0,150	0,610
Καρκινοειδή θαλασσινού νερού	0,920	18,6	1,650	2,650
Σύνολο καρκινοειδών	0,982	16,8	1,800	3,260
Μαλάκια γλυκού νερού	0,256	-15,8	-	-
Θαλάσσια μαλάκια	3,500	6,5	9,980	15,350
Σύνολο μαλακίων	3,501	6,5	9,980	15,410
Σύνολο καλλιεργούμενων ειδών	5,390	8	14,230	49,020
Σύνολο υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής (συμπ. φυκών)	19,200			105,000
Σύνολο υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής (εξαιρ. φυκών)	13,900		33,000	56,000

1.1.3 Υδατοκαλλιέργειες σε Ευρώπη και Μεσόγειο

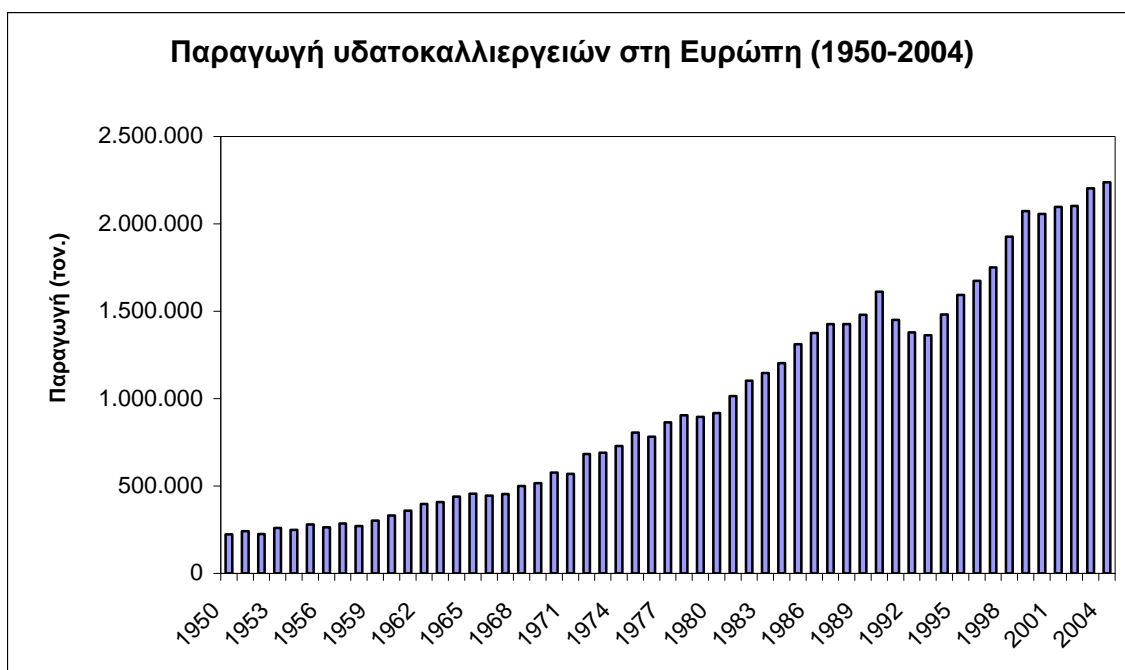
Την τελευταία 25ετία, έχει παρατηρηθεί στον ευρωπαϊκό και ιδιαίτερα στο μεσογειακό χώρο, μεγάλο ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες κάθε τύπου και μορφής, ενώ την τελευταία 15ετία, για τις υδατοκαλλιέργειες σε θαλασσινό νερό.

Η χαμηλή παραγωγικότητα της Μεσογείου, η σχετική εξάντληση ορισμένων υπερπόντιων αλιευτικών πεδίων, η καθιέρωση των ζωνών αλιείας και της οικονομικής ζώνης των 200 μιλίων από τις περισσότερες χώρες, σε συνδυασμό με την αύξηση της αγοραστικής δύναμης των καταναλωτών των ευρωπαϊκών χωρών, αλλά και η ενίσχυση της τάσης για υγιεινή διατροφή, είναι αιτίες που ώθησαν στην ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών.

Η παρούσα κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών στον ευρωπαϊκό αλλά και μεσογειακό χώρο εμφανίζει δύο όψεις: αυτή που αφορά στις υδατοκαλλιέργειες των εσωτερικών γλυκών νερών και εκείνη των υφάλμυρων και θαλάσσιων νερών. Σ' ότι αφορά στην πρώτη, πρέπει να τονιστεί ότι χαρακτηρίζεται από μία αύξηση κατά την τελευταία δεκαετία της συνολικής της παραγωγής, που μπορεί να αποδοθεί:

- Στην απόδοση των μέτρων προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος.
- Στη βελτίωση των μεθόδων εκτροφής, με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής.
- Στην επιτυχή αντιμετώπιση πολλών βιολογικών προβλημάτων των εκτρεφόμενων οργανισμών.

Στο Γράφ. 1-2 φαίνεται η μεταβολή της συνολικής ευρωπαϊκής παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών από το έτος 1950 έως το έτος 2004 ([http^{1\)}](#)).



Γράφημα 1-2. Μεταβολή της συνολικής ευρωπαϊκής παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών από το έτος 1950 έως το έτος 2004.

Οι οργανισμοί που συνθέτουν τη συνολική παραγωγή των ευρωπαϊκών εσωτερικών-γλυκών νερών είναι κυρίως η πέστροφα, οι κυτρίνοι, η τούρνα, οι οξύρυγχοι και τα χέλια.

Σε ότι αφορά στην παραγωγή στα υφάλμυρα και θαλάσσια νερά, πρέπει να τονιστεί ότι αποτελείται κυρίως από δίθυρα – μαλάκια, μεταξύ των οποίων, εξέχουσα θέση κατέχουν τα μύδια και τα στρείδια. Πρέπει, επίσης, να τονιστεί ότι κατά την τελευταία δεκαετία αντιμετωπίστηκαν με ικανοποιητική επιτυχία ορισμένα από τα έντονα βιολογικά προβλήματα εξαιτίας των οποίων καθυστέρωσε η βιομηχανική εκτροφή ορισμένων ψαριών μεγάλης εμπορικής σημασίας. Έτσι, από την άποψη αυτή, δεν παρουσιάζουν σήμερα ιδιαίτερα προβλήματα οι εκτροφές της τσιπούρας, της γλώσσας, του λαβρακιού, των κεφάλων και του καλκανιού. Οπωσδήποτε όμως και ο τομέας αυτός, των βιολογικών δηλαδή προβλημάτων των ψαριών, έχει ακόμη δυσκολίες που πρέπει να αντιμετωπιστούν, προκειμένου να επιτευχθεί πληρέστερα η μαζική βιομηχανική παραγωγή τους. Εκείνο όμως που εμφανίζεται ως ουσιαστικό πρόβλημα είναι οι περιοχές που θα χρησιμοποιηθούν για την εκτροφή των

οργανισμών αυτών, δεδομένου ότι η ρύπανση και η μόλυνση των παράκτιων περιοχών της Μεσογείου αλλά και της Ευρώπης δεν προδιαγράφουν αισιόδοξο μέλλον.

Σύμφωνα με τα τελευταία ανακοινωμένα στοιχεία του FAO (2004) η συνολική μεσογειακή παραγωγή των προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών κατά το 2000 ήταν της τάξης των 1.289.000 τον., από τους οποίους οι 240.000 τον. αντιστοιχούσαν σε παραγωγή εσωτερικών υδάτων και οι 1.049.000 τον. σε παραγωγή θαλασσινών υδάτων. Για το μεσογειακό χώρο ιδιαίτερα, πρέπει να τονιστεί η ανάγκη αύξησης της παραγωγής των προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών των θαλάσσιων καθώς και των υφάλμυρων νερών, για να αντιμετωπιστεί η καθημερινώς αυξανόμενη έλλειψη ιχθυηρών. Ο μεσογειακός χώρος, εκτός από την σχετικά χαμηλή πρωτογενή παραγωγή του και την υπεραλίευση των φυσικών του αποθεμάτων, αποτελεί χώρο έντονης τουριστικής αξιοποίησης, που δυστυχώς συνδέεται με τη ρύπανση των παράκτιων περιοχών. Στον Πίν. 1-2 φαίνεται η συνολική μεσογειακή παραγωγή υδατοκαλλιεργειών μέχρι το 2000 (FAO 2002).

Πίνακας 1-2. Συνολική μεσογειακή παραγωγή υδατοκαλλιεργειών μέχρι το 2000				
Παραγωγή Υδατοκαλλιεργειών	1988	1992	1996	2000
Παραγωγή εσωτερικών υδάτων (τον.)	195.000	226.000	250.000	240.000
Ποσοστό % της παγκόσμιας παραγωγής	2,7	2,4	1,6	1,1
Παραγωγή θαλασσινών υδάτων (τον.)	714.000	686.000	889.000	1.049.000
Ποσοστό % της παγκόσμιας παραγωγής	15,7	11,2	8,2	7,4

Η παραγωγή των ιχθυοκαλλιεργειών της Μεσογείου χαρακτηρίζεται από την κυριαρχία δυο ειδών, του λαβρακιού και της τσιπούρας, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 48% και το 50% της συνολικής παραγωγής αντίστοιχα, ενώ άλλα δέκα είδη αντιπροσωπεύουν το υπόλοιπο 2% της συνολικής παραγωγής.

Παρακάτω παρουσιάζεται πίνακας που αφορά στην παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού στις διάφορες μεσογειακές χώρες για τα έτη 1992-1997 (Πίν. 1-3) (<http>¹).

Πίνακας 1-3. Παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού στις διάφορες μεσογειακές χώρες για τα έτη 1992-1997 (τον.)						
	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Ελλάδα	6.000	9.000	13.000	17.500	21.000	26.000
Ισπανία	2.000	2.600	3.200	3.950	5.400	6.360
Ιταλία	2.900	3.400	4.000	5.200	6.900	7.800
Γαλλία	1.200	2.400	3.200	3.600	3.700	2.650
Πορτογαλία	360	500	700	1.050	1.250	2.600
ΣΥΝΟΛΟ Ε.Ε.	12.460	17.900	24.100	31.300	38.250	45.410
Τυνησία	500	650	700	300	400	500
Τουρκία	1.200	1.500	7.500	9.500	12.000	15.000
Μαρόκο	300	470	600	1.000	1.200	1.300
Κύπρος	70	170	210	300	750	900
Κροατία		300	1.200	1.600	1.050	2.000
Μάλτα		300	1.300	1.400	1.500	2.500
Ισραήλ					1.000	1.400
Λοιπές χώρες	100	100	100	200	300	
ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΣΟΓΕΙΟΥ	14.630	21.390	35.710	45.600	56.450	69.010

Σύμφωνα με τα δεδομένα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής, που είχε ως αποτέλεσμα την κατάρρευση των τιμών, καθώς η πενιχρή προώθηση προϊόντων δεν κατάφερε να αναπτυχθεί σε νέες αγορές. Τέλος, η μεσογειακή θαλάσσια παραγωγή ψαριών αναπτύσσεται τα τελευταία πέντε χρόνια με ρυθμό 40% το χρόνο.

1.1.4 Παρούσα κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα

Αναμφίβολα, στην Ελλάδα κατά την τελευταία δεκαετία παρουσιάζεται μια αύξηση στον αριθμό των ειδών των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών. Το σημερινό όμως ακριβές μέγεθος της συνολικής της παραγωγής δεν είναι γνωστό. Η αύξηση του αριθμού των υδρόβιων οργανισμών που εκτρέφονται σήμερα στον

ελληνικό χώρο συνδέεται με την εκτροφή ειδών όπως κυπρίνοι, χέλια και θαλάσσια ευρύαλα ψάρια (τσιπούρα, λαβράκι, κ.λ.π.). Πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι πριν από λίγα χρόνια το μοναδικό είδος ψαριού που εκτρεφόταν με όλη τη διαδικασία που συνεπάγεται η λέξη εκτροφή, ήταν η πέστροφα. Η κύρια περιοχή εκτροφής του ψαριού αυτού εξακολουθεί να είναι η Δυτική Ελλάδα (περιοχή Ιωαννίνων).

Η άνοδος του βιοτικού επιπέδου στην Ελλάδα τα τελευταία 20 χρόνια και η αύξηση του πληθυσμού οδήγησε σε αύξηση της ζήτησης υδρόβιων οργανισμών, η οποία παρουσιάζει περαιτέρω άνοδο κατά την τουριστική περίοδο. Η αύξηση όμως της ζήτησης δε συνοδεύτηκε από παράλληλη αύξηση της ποσότητας των αλιευμάτων. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ραγδαία μείωσή τους, που οφείλεται κυρίως στην υπεραλίευση πολλών ειδών, στη μειωμένη παραγωγικότητα της Μεσογείου και στη ρύπανση. Οι εντατικές καλλιέργειες θαλάσσιων ψαριών, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, είναι ένας τομέας της ελληνικής οικονομίας που αναπτύχθηκε σημαντικά τα τελευταία 15 χρόνια. Υπολογίζεται ότι έχουν γίνει επενδύσεις 90.000.000€ περίπου και έχουν δημιουργηθεί περίπου 2.500 νέες θέσεις εργασίας, ενώ εμμέσως, έχουν δημιουργηθεί 7.000 θέσεις εργασίας σε σχετικές δραστηριότητες.

Από τη συνολική παραγωγή, στην εσωτερική αγορά διατίθεται ένα μικρό ποσοστό που για το 1997 αποτέλεσε το 46,2% της συνολικής παραγωγής τσιπούρας και το 19,9% της συνολικής παραγωγής λαβρακιού. Τα υπόλοιπα διατίθενται σε χώρες του εξωτερικού, όπως η Ιταλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Γερμανία, η Γαλλία και άλλες χώρες. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια νέα είδη, όπως η χιόνα ή μυτάκι, εντάχθηκαν στις εντατικές καλλιέργειες. Αυτή η παραγωγή έχει ως αποτέλεσμα, η Ελλάδα να είναι πρώτη μεταξύ των χωρών της Μεσογείου και της Ευρώπης στην παραγωγή και στην εξαγωγή θαλάσσιων ψαριών.

Σύμφωνα με τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, κατά το 2002 συνεχίστηκε η ανάπτυξη του κλάδου των

υδατοκαλλιεργειών στη χώρα μας, με ιδιαίτερα υψηλές παραγωγικές επιδόσεις στον τομέα των θαλάσσιων καλλιεργειών. Η αυξανόμενη παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιεργειών και γόνου κυρίως αντιπροσωπεύει την αυξανόμενη παραγωγή των θαλασσινών ειδών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, όλο και περισσότερες μονάδες παραγωγής καλύπτουν όλη την εγκεκριμένη δυναμικότητα, ενώ παλαιότερες εκσυγχρονίζονται και επεκτείνονται και τέλος πολλές νέες ιδρύονται.

Στον Πίν. 1-4 φαίνεται συγκεντρωτικά η κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών εσωτερικών υδάτων στην Ελλάδα (Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).

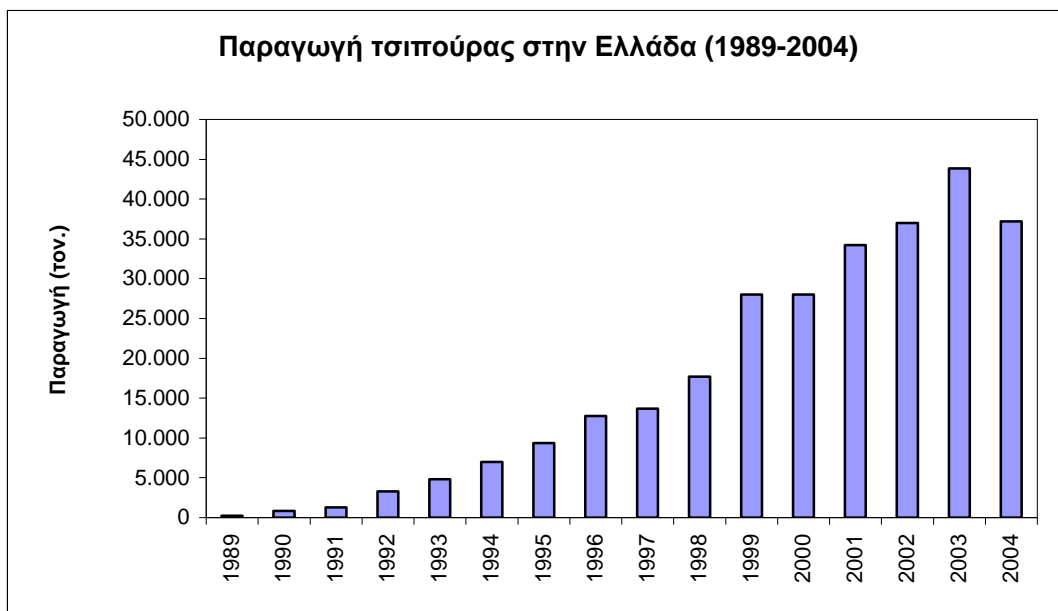
Πίνακας 1-4. Κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών εσωτερικών υδάτων και αξία για το έτος 2002 στην Ελλάδα			
ΤΥΠΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (σε τον.)	ΑΞΙΑ (σε χιλ. €)
Πέστροφα	88	2.340	10.530
Κυπρίνος	12	121	484
Σολομός	6	20	210
Χέλια	10	664,2	4.981,5
Μεικτές (κέφαλοι, τιλάπια, γατόψαρο, οξύρρυγχος, τσιπούρα, λαβράκι)	11	90 & 100.000 ιχθ. διακοσμητικών ειδών	315
ΣΥΝΟΛΟ	121	3.235,2 & 100.000 ιχθ. διακοσμητικών ειδών	16.520,5
Εκμεταλλεύσεις λιμνοθαλασσών	72	1.300	5.720
ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΝΟΛΟ	193	4.535,2 & 100.000 ιχθ. διακοσμητικών ειδών	22.240,5

Στον Πίν. 1-5 φαίνεται συγκεντρωτικά η παραγωγή υδατοκαλλιεργειών και εσωτερικών υδάτων, καθώς και η αξία τους για το έτος 2002 στην Ελλάδα (Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων).

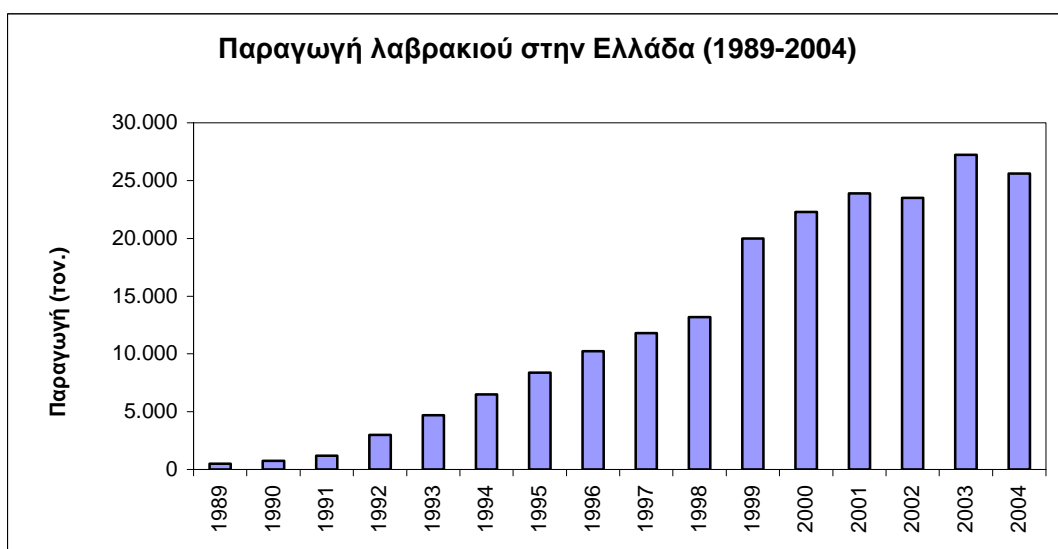
Πίνακας 1-5. Αλιευτικής παραγωγής υδατοκαλλιεργειών & εσωτερικών υδάτων και αξία για το έτος 2002 στην Ελλάδα			
ΕΙΔΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΝΑΔΩΝ	ΠΑΡΑΓΩΓΗ (ΤΟΝΟΙ Ή ΙΧΘΥΔΙΑ)	ΑΞΙΑ (σε χιλ. €)
Καλλιέργειες σε γλυκά νερά	121	3.235,2 & 100.000 ιχθ. διακοσμητικών ειδών	16.520,5
Εντατικές καλλιέργειες σε θαλασσινά νερά			
α) Μονάδες πάχυνσης	308	62.456,68	230.707
β) Ιχθυογεννητικοί σταθμοί	39	269.506.513 (ιχθ.)	68.951
Οστρακοκαλλιέργειες	574	31.823	11.902
Γαριδοκαλλιέργεια	1	4	52
Σπογγοκαλλιέργεια	2	5	1.610
Καλλιέργεια υδρόβιων φυτών	1	46	50
Εκμεταλλεύσεις λιμνοθαλασσών	72	1.300	5.720
ΣΥΝΟΛΟ	1.117	98.869,88 τον 269.506.513 ιχθ. & 100.000 ιχθ. διακοσμητικών ειδών	335.512,5

Στην παραγωγή του 2002 συμπεριλαμβάνονται 1.956,53 τον. εμπορεύσιμου προϊόντος νέων ειδών, όπως φαγκρί (*Pagrus major* Temminck & Schlegel 1843), χιόνα (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777), συναγρίδα (*Dentex dentex* Linnaeus 1758), σαργός (*Diplodus sargus* Cetti 1777), όπως και στη συνολική παραγωγή των 269.506.513 ιχθυδίων συμπεριλαμβάνονται και 17.547.964 ιχθύδια νέων ειδών, όπως χιόνα, σαργός, φαγκρί, συναγρίδα κ.λπ.

Στα Γραφήματα 1-3 και 1-4 φαίνεται η εξέλιξη της συνολικής παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού αντίστοιχα στην Ελλάδα σύμφωνα με τα τελευταία δημοσιευμένα στοιχεία του FAO (<http>¹).



Γράφημα 1-3. Εξέλιξη της συνολικής παραγωγής τσιπούρας στην Ελλάδα (1989-2002)



Γράφημα 1-4. Εξέλιξη της συνολικής παραγωγής λαβρακιού στην Ελλάδα (1989-2002)

1.2 Παθολογικά προβλήματα στις υδατοκαλλιέργειες

Ιχθυοπαθολογία είναι η επιστήμη που μελετά τις παθολογικές καταστάσεις των υδρόβιων οργανισμών και, κυρίως, των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (ψαριών και διθύρων), με σκοπό την αντιμετώπιση των καταστάσεων αυτών που χωρίς εξωτερική βοήθεια μπορεί να αποβούν μοιραίες για την εκτροφή αλλά και τη δημόσια υγεία.

Τα νοσήματα που είναι περισσότερο γνωστά και έχουν καλύτερα μελετηθεί, είναι αυτά που προσβάλλουν τα ψάρια εκτροφής και αυτό όχι μόνο γιατί προκάλεσαν περισσότερο το ενδιαφέρον των ερευνητών, αλλά και γιατί στα ψάρια αυτά, εξαιτίας της μεγάλης ιχθυοπυκνότητας, τα διάφορα νοσήματα εμφανίζονται με μεγαλύτερη ένταση και συχνότητα και μπορούν να μελετηθούν καλύτερα οι διάφορες φάσεις τους (παθογένεια, αιτιολογία, πρόληψη κ.λ.π.) Τα ψάρια που ζουν στα ελεύθερα γλυκά και αλμυρά ύδατα προσβάλλονται επίσης από διάφορα νοσήματα, πλην όμως είναι λιγότερο γνωστά, γιατί ξεφεύγουν από τον έλεγχο των ειδικών.

Γενικά, από πλευράς ταξινόμησης, τα νοσήματα των ψαριών διακρίνονται ανάλογα με τα αίτια που τα προκαλούν σε:

- A) Νοσήματα από ιούς
- B) Νοσήματα από βακτήρια
- Γ) Νοσήματα από μύκητες
- Δ) Νοσήματα από παράσιτα (Πρωτόζωα, Έλμινθες, Μαλάκια, Αρθρόποδα)
- Ε) Νοσήματα που οφείλονται σε παράγοντες του περιβάλλοντος και της διαχείρισης
- Στ) Νοσήματα που οφείλονται σε διατροφικά σφάλματα και
- Z) Νεοπλάσματα

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή ασχολείται με μία κατηγορία παρασιτικών νοσημάτων, η οποία οφείλεται σε μία κατηγορία πρωτόζων παρασίτων, τα Μυξοσπορίδια.

1.2.1 Πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα είναι μικροί μονοκύτταροι οργανισμοί με πολύπλοκη δομή. Η ομάδα αυτή διαιρείται σε επτά φύλα: Mastigophora, Sarcodina, Apicomplexa, Microspora, Cnidosporidia, Harlospora και Ciliata. Τα παράσιτα που συναντώνται στα ψάρια ανήκουν σε όλα τα παραπάνω φύλα, εκτός από το φύλο Harlospora το οποίο παρασιτεί στα Ασπόνδυλα.

Σε συνθήκες εκτροφής σε χερσαίες δεξαμενές, συγκεκριμένα είδη πρωτόζωων μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες, προκαλώντας περιστασιακά σημαντικές θνησιμότητες και προκαλώντας έτσι σοβαρά οικονομικά προβλήματα στις ιχθυοκαλλιέργειες γλυκών νερών. Επίσης, περίπου 550 είδη πρωτόζωων παρασίτων έχουν βρεθεί να παρασιτούν σε θαλασσινά ψάρια (Lom 1974). Μερικά από αυτά δεν αποτελούν άμεση απειλή για την υγεία και τη ζωή των ψαριών. Τα Μυξοσπορίδια, τα οποία μελετώνται στη συγκεκριμένη εργασία, είναι πρωτόζωα παράσιτα τα οποία ανήκουν στο φύλο Cnidosporidia και προκαλούν σοβαρά παθολογικά προβλήματα στα ψάρια.

Το φύλο αυτό αποτελείται από παράσιτα που παράγουν χαρακτηριστικούς σπόρους, που πάντα περιέχουν πολικές κάψες με σπειροειδή νημάτια. Κατά την ανάπτυξή τους παρατηρούνται πολυκύτταρα στάδια αγενούς αναπαραγωγής (πλασμώδια) και εγγενούς αναπαραγωγής (σπόροι).

Η ταξινομική κατάσταση των Cnidosporidia ακόμα μελετάται. Μερικοί συγγραφείς (Raabe 1964) τα θεωρούν σαν μία κλάση του φύλου Sarcodina, υποφύλο Amoebosporidia, γιατί οι σποροζωίτες σε ένα σπόρο μοιάζουν με αμοιβάδα. Η παρουσία πολικών καψών θεωρείται ως χαρακτήρας μη φυλογενετικής σημασίας. Άλλοι συγγραφείς (Grell 1973) έχουν την άποψη ότι τα Cnidosporidia πρέπει να θεωρηθούν μεταξύ των πρωτοζώων ως οργανισμοί που απέχουν μορφολογικά και αναπτυξιακά από τα άλλα πρωτόζωα και τοποθετούνται ανάμεσα στα πρωτόζωα και στα μετάζωα αφού ο σπόρος είναι ένας πολυκύτταρος

οργανισμός παρά ένας μονοκύτταρος. Επίσης, άλλοι συγγραφείς, εξαιτίας της ύπαρξης των πολικών καψών, θεωρούν τα Cnidosporidia ως Cnidaria που έχουν παρακμάσει εξαιτίας του παρασιτικού τρόπου ζωής τους.

Το πρόβλημα αυτό δεν έχει ακόμα λυθεί και τα Cnidosporidia θεωρούνται ακόμα πρωτόζωα. Το φύλο αυτό αποτελείται μόνο από παρασιτικά είδη και πολλά από τα παράσιτα των ψαριών ανήκουν στην κλάση Myxosporrea.

1.2.2. *Μυξοσπορίδια, Κλάση: Myxosporrea*

Τα Μυξοσπορίδια είναι μία μεγάλη ομάδα παρασιτικών οργανισμών. Κατέχουν μία μοναδική θέση στο βασίλειο των Πρωτίστων, γιατί οι πολυκύτταροι σπόροι έχουν πολικές κάψες. Τα παράσιτα αυτά προκαλούν σοβαρές μολύνσεις και ασθένειες στα καλλιεργούμενα ψάρια, αν και στα άγρια ψάρια μπορούν επίσης τα Μυξοσπορίδια να προκαλέσουν εκτεταμένες αλλοιώσεις και θνησιμότητες (Jadwiga 1991)

Έτσι, η μελέτη των Μυξοσποριδίων επικεντρώνεται κυρίως στη σημασία της παθογένειάς τους στις ιχθυοκαλλιέργειες, καθώς επίσης και στην ιδιομορφία της βιολογίας και του βιολογικού τους κύκλου και της σχέσης τους με άλλους οργανισμούς. Τα Μυξοσπορίδια είναι πολύ κοινά παράσιτα ψαριών που ζουν από τις τροπικές έως τις πολικές θάλασσες και σε ποικίλα βάθη. Ο Noble (1966) κατέγραψε υψηλά ποσοστά μόλυνσης σε ψάρια, η σύλληψη των οποίων έγινε σε 3960m βάθος. Τα Μυξοσπορίδια παρασιτούν με μεγάλη ένταση και μερικά είναι πολύ παθογόνα. Όμως, εκτός από τις παθολογικές αλλοιώσεις, άλλες δυσμενείς επιδράσεις στα ψάρια δεν είναι πάντα δυνατό να ανιχνευθούν (Jadwiga 1991).

Κατανομή Μυξοσποριδίων

Περισσότερα από 1250 είδη Μυξοσποριδίων έχουν ανιχνευθεί στους ιστούς και την περιτοναϊκή κοιλότητα ψαριών των γλυκών, υφάλμυρων και αλμυρών νερών. Μερικά βρίσκονται σε ελασματοβράγχιους, σε πετρόμυζον και μυξίνους. Μόνο μερικά είδη έχουν περιγραφεί σε υδρόβια ερπετά, σε αμφίβια και σε ασπόνδυλα ζώα.

Μερικά είδη Μυξοσποριδίων εμφανίζουν εξειδίκευση όσον αφορά τον ξενιστή τους, ενώ άλλα είδη παρασιτούν σε πολλά είδη ξενιστών. Η αληθινή έκταση του εύρους των ξενιστών για τα περισσότερα είδη δεν είναι ακόμα γνωστή. Επίσης, η γεωγραφική κατανομή των Μυξοσποριδίων εξαρτάται από τη γεωγραφική κατανομή των ξενιστών. Τα παράσιτα των διακοσμητικών ψαριών είναι παρόμοια κατανεμημένα μεταξύ των διαφόρων ηπείρων.

Το ποσοστό προσβολής από Μυξοσπορίδια σε μία περιοχή μπορεί να κυμαίνεται από πολύ υψηλό (100%) έως πολύ χαμηλό. Σε μερικά φυσικά ενδιαιτήματα, όπως και στο θαλάσσιο περιβάλλον, το ποσοστό προσβολής των πληθυσμών των ξενιστών μπορεί να διαφέρει για ένα συγκεκριμένο είδος Μυξοσποριδίου. Αυτές οι διαφορές στα ποσοστά προσβολής, έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες για να καθορίσουν τα αποθέματα των πληθυσμών των ψαριών. Μερικά είδη Μυξοσποριδίων σε εύκρατα κλίματα εμφανίζουν αξιοσημείωτη εποχιακή διακύμανση, ενώ η μόλυνση από Μυξοσπορίδια μπορεί να είναι μεγάλης διάρκειας στα ψάρια (Lom & Dyková 1995).

Ταξινόμηση Μυξοσποριδίων

Τα Μυξοσπορίδια θεωρούνται μέχρι τώρα ως μία από τις δύο κλάσεις (Myxosporrea Bütschli 1881) στο φύλο Μυξόζωα Grassé 1960. Η ταξινόμηση βασίζεται αποκλειστικά στη δομή των σπόρων. Τα χαρακτηριστικά των μη παρασιτικών σταδίων και του βιολογικού κύκλου ζωής είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν. Όταν επιβεβαιωθεί η μεταμόρφωση των Μυξοσποριδίων-Ακτινοσποριδίων και εκτιμηθεί η έκταση στα γένη, η ταξινόμηση των φύλων μπορεί

να αλλάξει δραματικά. Προς το παρόν, τα Μυξοσπορίδια χωρίζονται σε δύο τάξεις, την τάξη Bivalvulida Schulman 1959 (σπόροι με δύο βαλβίδες και μία έως τέσσερις πολικές κάψες) και την τάξη Multivalvulida Shulman 1959 (σπόροι με τρεις έως επτά βαλβίδες και μία έως επτά πολικές κάψες). Τα Bivalvulida υποδιαιρούνται σε τρεις υποτάξεις με δώδεκα οικογένειες. Η κατανομή βασίζεται στη θέση των πολικών καψών, σε σχέση με το σχήμα των σπόρων και τη γραμμή διαχωριστικού των βαλβίδων. Ο αριθμός των πολικών καψών, οι βαλβίδες, το σχήμα και η δομή τους είναι, επίσης, σημαντικά χαρακτηριστικά (Lom & Noble 1984). Σε επίπεδο είδους, υπάρχουν δυσκολίες στην ταξινόμηση παρόμοιων ειδών σε διάφορα γένη, οι σπόροι των οποίων έχουν λίγα διαγνωστικά γνωρίσματα, τα οποία είναι πολύ διαφορετικά. Προς το παρόν υπάρχουν 51 γένη με περίπου 1250 είδη (Lom & Dykonά 1995).

Ο σπόρος και τα στάδια ανάπτυξης

Ο σπόρος, που είναι το μολυσματικό στάδιο, αποτελείται από αρκετά 4 έως 16 κύτταρα, που μεταμορφώνονται κατά τη σπορογένεση στα επιμέρους στοιχεία του σπόρου. Ανάλογα με το γένος, μπορεί να υπάρχουν ένα έως επτά κύτταρα που σχηματίζουν τις πολικές κάψες (capsulogenic cells), δύο έως επτά κύτταρα που σχηματίζουν τις βαλβίδες (valvulogenic cells) και ένα έως δύο κύτταρα που αποτελούν το μολυσματικό σπορόπλασμα. Οι βαλβίδες προσκολλώνται μεταξύ τους στη γραμμή ραφής και καλύπτουν τις πολικές κάψες που είναι τοποθετημένες στην κορυφή του σπόρου. Το σπορόπλασμα στο πίσω (ή μεσαίο) τμήμα του σπόρου μπορεί να είναι υπό μορφή ενός διπύρηνου ή δύο μονοπύρηνων σποροπλασμάτων, το ένα μέσα στο άλλο. Το σπορόπλασμα περιέχει πυκνά σωματίδια (σποροπλασμοσώματα), τα οποία είναι ευδιάκριτα σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (TEM). Σε μερικά γένη, περιέχει μόρια β-γλυκογόνου, συγκεντρωμένα σαν ένα στρογγυλό ιοδιόφιλο έγκλειστο (θετικό στη χρώση με Lugol).

Οι βαλβίδες μπορεί να είναι λείες, να σχηματίζουν ραβδώσεις, να έχουν διάφορες προεξοχές ή μπορεί να περιβάλλονται με ένα προσωρινό βλεννώδες

περίβλημα, το οποίο συνήθως εξαφανίζεται σε λίγες μέρες μετά την απελευθέρωση του σπόρου. Αυτές οι δομές έχουν ως σκοπό την αύξηση της πλευστότητας του σπόρου και έτσι αυξάνουν τη διασπορά των σπόρων στο υδάτινο περιβάλλον.

Οι πολικές κάψες με συμπαγές περίβλημα, οι οποίες διαθλούν το φως όταν οι σπόροι συλλέγονται φρέσκοι, περιέχουν σπειροειδή πολικά νημάτια. Το πολικό νημάτιο είναι ένας κενός πόρος, είναι σπειροειδώς τυλιγμένο κατά μήκος του μακρύτερου άξονά του και είναι ικανό να εκτοξευθεί γρήγορα προς τα έξω. Το εκτοξευμένο νημάτιο είναι κολλώδες και πιθανώς χρησιμοποιείται για να προσκολλάται ο σπόρος στην επιφάνεια των οργάνων του ξενιστή. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το τοίχωμα της κάψας φαίνεται να αποτελείται από δύο στρώματα. Το εσωτερικό στρώμα είναι διαυγές και αποτελείται από χιτίνη, ενώ το εξωτερικό στρώμα είναι πρωτεϊνικής φύσεως. Και τα δύο στρώματα συνεχίζουν στο τοίχωμα των πολικών νηματίων. Η διάταξη των πολικών νηματίων διαφέρει στα διάφορα γένη. Το στόμιο της πολικής κάψας εμφανίζεται σε μία κυπελόμορφη δομή, η οποία σφραγίζει το κανάλι διαμέσου του οποίου εκτοξεύεται το νημάτιο μέσα στη βαλβίδα.

Η ενέργεια για την εκτόξευση του νηματίου μπορεί να παρέχεται από πίεση αποθηκευμένη στην πολική κάψα, η οποία ελευθερώνεται όταν η κυπελόμορφη δομή μετακινείται από τα πεπτικά υγρά του ξενιστή (Lom 1990). Επίσης, η ενέργεια που αποδεδεσμεύεται μπορεί να προέρχεται από τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) (Uspenskaya 1982). Η εξώθηση των νηματίων μπορεί να προκληθεί από διάφορα χημικά, όπως π.χ. κορεσμένο διάλυμα υδατικής ουρίας.

Το μέγεθος των σπόρων είναι συνήθως μεταξύ 8-20 μm . Οι μεγαλύτεροι σπόροι (98 μm) είναι αυτοί του *Myxidium giganteum* Doflein 1898.

Τα βλαστικά στάδια ή τροφοζώϊτες ποικίλουν από λίγα μικρά μέχρι μεγάλα σπορογονικά πλασμώδια, τα οποία είναι σε μέγεθος μερικά χιλιοστά (στη περίπτωση της *Sphaeromyxa maiyai* Morrison & Pratt 1973 είναι πάνω από 2cm). Το κυτταρόπλασμα τους περιέχει τα περισσότερα από τα τυπικά οργανίδια (εκτός από τα απόντα κεντριόλια). Χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι οι δέσμες μικροσωληναρίων

κοντά στον πυρήνα των γενετικών ή σπορογονικών κυττάρων και τα ελεύθερα ριβοσωμάτια, τα οποία μερικές φορές μπορεί να εμφανίζονται σε μεγάλο αριθμό. Τα βλαστικά στάδια εμφανίζουν μία ποικιλία μορφών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους στα ψάρια. Οι σπόροι των Μυξοσποριδίων είναι μικροί (μερικά μικρά στο μέγεθος), φακοειδείς, σφαιρικοί, ωοειδείς, τετραγωνισμένοι με στρογγυλεμένες άκρες, ή έχουν σχήμα αστεριού. Ανάλογα με το γένος, οι σπόροι περιέχουν από μία (*Thelohanella*) έως έξι (*Hexacapsula*) πολικές κάψες.

Βιολογικός κύκλος

Ένα ψάρι συνήθως μολύνεται μετά από κατάποση των σπόρων. Τα πεπτικά υγρά του εντέρου προκαλούν το άνοιγμα της πολικής κάψας και το πολικό νημάτιο εξέρχεται όντας ακόμα συνδεδεμένο με τον σπόρο. Το νημάτιο αγκιστρώνει τον σπόρο στο εντερικό επιθήλιο, όπου ανοίγουν οι βαλβίδες και εξέρχεται η αμοιβαδοειδής δομή ή στάδιο, η οποία μέσω του κυτταρικού τοιχώματος μεταφέρεται στα αιμοφόρα αγγεία και μετά το αίμα τα μεταφέρει σε κατάλληλα “όργανα στόχους”. Κατά τη διάρκεια αυτής της μετακίνησης οι πυρήνες της αμοιβάδας συγχωνεύονται για το σχηματισμό ενός ζυγωτού. Όταν η αμοιβάδα βρει την θέση της μέσα στον ξενιστή, το ζυγωτό αναπτύσσεται και ο πυρήνας του διαιρείται αρκετές φορές για να σχηματίσει ένα πολυπύρηνο αγενούς πολλαπλασιασμού στάδιο, το πλασμώδιο (*plasmodium*), του οποίου η δομή και ο αριθμός των πυρήνων εξαρτάται από το είδος. Οι πυρήνες που προκύπτουν διαφοροποιούνται σε αγενούς και εγγενούς αναπαραγωγής και οι τελευταίοι αναπτύσσονται σε ένα σπόρο. Τα πλασμώδια συχνά διαιρούνται σε θυγατρικά πλασμώδια.

Κατά την ανάπτυξη των αγενών σταδίων, το πρωτόπλασμα συμπυκνώνεται σε δύο εγγενείς πυρήνες και σχηματίζει μία πανσποροβλάστη. Ο πυρήνας της διαιρείται δύο φορές και παράγει τέσσερις πυρήνες. Δύο από αυτούς δεν διαιρούνται περαιτέρω, ενώ οι άλλοι δύο διαιρούνται δύο φορές ακόμα, από τις οποίες η μία διαίρεση είναι μιτωτική. Οι υπόλοιποι δύο πυρήνες διαιρούνται ξανά και έτσι

εμφανίζεται τελικά μία εξαπύρηνη σποροκύστη. Από τους έξι πυρήνες της σποροκύστης, οι δύο συμμετέχουν στο σχηματισμό των βαλβίδων, οι δύο στο σχηματισμό των πολικών καψών και οι άλλοι δύο παραμένουν στο αμοιβαδοειδές στάδιο. Έτσι, σχηματίζεται ένας τελικός σπόρος. Οι σπόροι πολλαπλασιάζονται εντατικά και παράγουν κύστες γεμάτες με μεγάλο αριθμό σπόρων (Jadwiga 1991).

Εναλλακτικά, στο όργανο στόχο, μπορεί να γίνεται μία προσπορογονική, αναπαραγωγική φάση (Dykoná & Lom 1988). Επίσης, μπορεί να γίνεται ένας ή περισσότεροι προσπορογονικοί κύκλοι σε ένα άλλο όργανο, πριν φτάσει στο όργανο στόχο.

Ένας τέτοιος προσπορογονικός πολλαπλασιασμός μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί στις περιπτώσεις στις οποίες το μολυσματικό στάδιο προέρχεται από το σπορόπλασμα ενός ακτινοσποριδίου. Μερικές φάσεις του προσπορογονικού κύκλου έχουν παρατηρηθεί να παραμένουν παράλληλες με την τελική σπορογόνο φάση, και προτιμώνται από διάφορους ερευνητές να αποκαλούνται extra-σπορογονικές παρά προσπορογονικές (Lom 1987). Το φαινόμενο, να βρίσκεται ένα κύτταρο εντός άλλου κυττάρου, είναι τυπικό των Μυξοσποριδίων και συνήθως συμβαίνει κατά τη διάρκεια του βιολογικού κύκλου (Lom 1987).

Η πρώτη διαίρεση του αμοιβαδοειδούς σταδίου, επίσης, εξηγεί το διαχωρισμό των σωματικών στοιχείων (είναι το αρχικό κύτταρο που γίνεται αργότερα το κύτταρο του πλασμοδίου, οι βαλβίδες του σπόρου και τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται οι πολικές κάψες).

Extra-σπορογονικοί κύκλοι ανάπτυξης

Οι extra-σπορογονικοί κύκλοι ανάπτυξης είναι αρκετά συχνό στα Μυξοσπορίδια που παράγουν μεγάλους αριθμούς παρασιτικών σταδίων που διασπείρουν τη μόλυνση στο ψάρι. Αυτό είναι το αποτέλεσμα σε πολύ έντονες μολύνσεις, οι οποίες επίσης μπορεί να επιτευχθούν τόσο από μαζική κατάποση σπόρων όσο και από αυτομόλυνση. Αυτομόλυνση είναι η εκκόλαψη των σπόρων in

situ ή μέσα στον ίδιο ξενιστή. Αυτό έχει προταθεί από πολλούς συγγραφείς (Amandi, Holt & Fryer 1985), αλλά ακόμη αυτό δεν έχει αποδειχθεί.

Οι extra-σπορογονικοί κύκλοι έχουν μελετηθεί κυρίως σε παράσιτα του γένους *Sphaerospora*. Οι extra-σπορογονικοί κύκλοι μπορεί να διαφέρουν μορφολογικά μεταξύ των ειδών.

Σπορογονική φάση

Τα στάδια ανάπτυξης ή οι τροφοζωίτες των Μυξοσποριδίων είναι τα ίδια πλασμώδια της σπορογονικής φάσης. Είναι αρχικά κύτταρα και περιέχουν από έναν έως λίγους ή πολυάριθμους πυρήνες ανάπτυξης και εσωκλείουν μερικά δευτερογενή βλαστικά κύτταρα που παράγουν σπόρους. Οι πυρήνες ανάπτυξης μερικές φορές διακρίνονται από τον πυρήνα των γενετικών κυττάρων από το διαφορετικό τους μέγεθος. Σύμφωνα με την Uspenskaya (1984), οι πυρήνες ανάπτυξης είναι οι γενετικοί πυρήνες και είναι διπλοειδείς.

Υπάρχουν τρεις τύποι σπορογονικών τροφοζωιτών. Ο πρώτος αντιπροσωπεύεται από μικρούς, μονοσπορικούς ή δισπορικούς τροφοζωίτες. Παράγουν ένα ή δύο σπόρους και έχουν μόνο έναν παραγωγικό πυρήνα και έτσι ονομάζονται ψευδοπλασμώδια. Οι σπόροι προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό βλαστικών κυττάρων, τα οποία ενώνονται για το σχηματισμό σποροκύστεων. Τα ψευδοπλασμώδια είναι τυπικά για τα κοιλοζωικά Μυξοσπορίδια, τα οποία βρίσκονται στις κοιλότητες των οργάνων. Ο δεύτερος τύπος τροφοζωιτών αντιπροσωπεύει μεγάλα (πάνω από μερικά χιλιοστά) πολυσπορικά πλασμώδια, με πολλούς πυρήνες και βλαστικά κύτταρα (Grassé & Lavette 1978). Οι πυρήνες αυτοί παράγουν πολλούς σπόρους. Μία τρίτη κατηγορία είναι η ενδιάμεση μεταξύ αυτού και του προηγούμενου και βρίσκεται σε μερικά κοιλοζωικά Μυξοσπορίδια. Αυτά τα πλασμώδια παράγουν από έναν έως και πολλούς σπόρους.

Ραβδοειδείς προεκτάσεις με αναπαραγωγικούς πυρήνες και λίγα γενετικά κύτταρα μπορούν να σχηματιστούν στην επιφάνεια (εξωτερικά) ή μέσα στα

πλασμώδια (εσωτερικά). Η κυτταρική μεμβράνη συχνά διαμορφώνεται με εγκολπώματα για να αυξηθεί η επιφάνεια απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών. Συχνά υπάρχουν κυτταροπλασματικές προεκβολές για να διευκολύνεται η προσκόλληση στα τοιχώματα και στις κοιλότητες των οργάνων. Μερικά πλασμώδια είναι κινητά και έχουν ψευδοπόδια. Η σπορογονία δεν είναι συγχρονισμένη και όλα τα στάδια μπορεί να υπάρχουν την ίδια στιγμή. Τα ιστοζωικά πλασμώδια είναι σφιχτά στερεωμένα ανάμεσα στα κύτταρα των ιστών, στα αιμοφόρα αγγεία ή μέσα σε μυοκύτταρα. Δεν διαιρούνται, αλλά συχνά αυξάνονται σε τεράστιο μέγεθος. Η κυτταρική μεμβράνη σχηματίζει πολυάριθμα μικρά εγκολπώματα ή πινοκυτταρωτικά κυστίδια για ενδοκυττάρωση θρεπτικών ουσιών από τη διαχωριστή επιφάνεια μεταξύ παράσιτου και ξενιστή. Τα αναπτυγμένα πλασμώδια περικλείονται από ένα κάλυμμα ινοβλαστών του ξενιστή και εμφανίζονται ως μεγάλα, συχνά μακροσκοπικά ορατά, που αναφέρονται συνήθως σαν μία μυξοσποριδιακή κύστη. Σε βαριές μολύνσεις ο μεγάλος αριθμός κύστεων είναι το αποτέλεσμα extra-σπορογονικού πολλαπλασιασμού, αντί του να προέρχεται από κατάποση μεγάλου αριθμού σπόρων. Η σπορογονία συγχρονίζεται και οι σπόροι ωριμάζουν συγχρόνως. Το πλασμώδιο γίνεται ένας φάκελος που είναι γεμάτος με σπόρους (Lom & Dykoná 1995).

Σπορογένεση

Η σπορογένεση μπορεί να ξεκινήσει είτε με πανσποροβλάστες (Current 1979, Current & Janovy 1977, Current, Janovy & Knight 1979) είτε χωρίς (Lom, Dykoná, Lhotakova 1983, Weidner & Overstreet 1979,). Οι πανσποροβλάστες σχηματίζονται από την ένωση δύο βλαστικών κυττάρων (Desser & Paterson 1978, Lom & de Ruytorac 1965). Το ένα είναι το περικύτταρο και εσωκλείει το άλλο, που είναι το σπορογονικό κύτταρο. Πριν από την ένωσή τους, τα δύο κύτταρα είναι δύσκολο να ξεχωρίσουν. Το περικύτταρο σχηματίζεται αργότερα από τον πανσποροβλαστικό φάκελο και μέσα σε αυτό το σπορογονικό κύτταρο διαιρείται για να παράγει ένα ή,

συνήθως, δύο σπόρους. Κύτταρα που θα δώσουν βαλβίδες διαφοροποιούνται στα κύτταρα κελύφους, ενώ καψουλογενετικά κύτταρα παράγουν τις πολικές κάψες και τα σποροπλασματικά κύτταρα. Στα ψευδοπλασμώδια μερικών γενών (π.χ. *Sphaerospora*) η σπορογονία ξεκινά με την παραγωγή ενός αριθμού κυττάρων που οργανώνεται για να σχηματίσει έναν ή δύο σπόρους. Σε είδη με μεγάλους πλασμωδιακούς τροφοζώιτες (π.χ. *Kudoa*) οι σπόροι παράγονται χωρίς σχηματισμό σποροβλαστών (Lom & Dykoná 1988, Stehr & Whitaker 1986).

Κατά τη διάρκεια της σπορογένεσης, κύτταρα που θα δώσουν βαλβίδες διασπείρονται αραιά γύρω από τα σποροπλασματικά και καψουλογενετικά κύτταρα. Οι χοντρές άκρες τους ενώνονται στις κυτταρικές διασταυρώσεις και αυτό είναι όμοιο με τα δεσμοσώματα των Μεταζώων. Η κυτταρική μεμβράνη παχύνεται από κάτω με μη-κεράτινες πρωτεΐνες και το κυτταρόπλασμα συρρικνώνεται σε μία πυκνή μάζα. Οι πυρήνες γίνονται Feulgen- θετικοί και στη συνέχεια εξαφανίζονται τελείως.

Οι πολικές κάψες στα καψουλογενετικά κύτταρα αναπτύσσονται από μία δομή σχήματος μπαστουνιού, η οποία εξωτερικά είναι επιστρωμένη με μικροσωληνάρια. Αναπτύσσεται σε μία βολβοειδή κάψα και περνά σε ένα στενό, μακρύ, εξωτερικό σωλήνα. Αργότερα, τα πρωτογενή πολικά νημάτια εμφανίζονται μέσα σε αυτό τον σωλήνα, καθώς το νηματοειδές σπείραμα βρίσκεται κάτω από το τοίχωμα (primordium), το οποίο βαθμιαία θα πάρει τη μορφή της ώριμης πολικής κάψας (Lom & de Puytorac 1965). Ταυτόχρονα, ο εξωτερικός σωλήνας μικραίνει και τελικά εξαφανίζεται τελείως. Έτσι, το νηματοειδές είναι ένας μεταμορφωμένος, μετασχηματισμένος εξωτερικός σωλήνας. Το υπόλειμμα του καψουλογενετικού πυρήνα του κυττάρου μπορεί να φανεί συχνά κοντά στη βάση της πολικής κάψας.

Φυλετικότητα

Η σεξουαλική εξέλιξη γίνεται με αυτογαμία. Ο πυρήνας του σποροπλάσματος ενώνεται πριν ή μετά την εκκόλαψη (αυτό είναι το μόνο μονοπύρηνο στάδιο στον βιολογικό κύκλο). Τα προϊόντα της διαίρεσης του ζυγωτικού πυρήνα

διαφοροποιούνται αργότερα στους αναπαραγωγικούς πυρήνες και στους πυρήνες των γενετικών κυττάρων. Σύμφωνα με την Uspenskaya (1982, 1984) οι αναπαραγωγικοί πυρήνες είναι πολυπλοειδείς, ενώ οι πυρήνες των βλαστικών κυττάρων διπλοειδείς. Οι τελευταίες κυτταρικές διαιρέσεις στους σποροβλάστες είναι μειωτικές και τα σποροβλαστικά κύτταρα είναι απλοειδή. Η ένωση των σποροπλασματικών πυρήνων αποκαθιστά τη διπλοειδή κατάσταση.

Μετάδοση

Οι σπόροι των Μυξοσποριδίων μπορούν να διατηρήσουν τη φυσιολογική τους εμφάνιση σε κρύο νερό για περισσότερο από ένα χρόνο. Μέχρι το 1984, θεωρούνταν ότι η μετάδοση των σπόρων ήταν άμεση. Η αποτυχία στις περισσότερες πειραματικές μολύνσεις χρησιμοποιώντας φρέσκους σπόρους εξηγήθηκε από την ανάγκη των σπόρων να ωριμάζουν για ορισμένους μήνες στην υγρασία ή στο νερό ή στο περιβάλλον.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες πληροφορίες αφορούν τα Μυξοσπορίδια των γλυκών υδάτων, (Kent, Andree, Bartholomew, El-Matbouli, Desser, Devlin, Feist, Hallet, Hedrick, Hoffmann, Khattra, Lester, Longshaw, Palenzuela & Xiao 2001, Markiw & Wolf 1983, Wolf & Markiw 1984). Οι Wolf και Markiw (1984) έδειξαν ότι μπορεί να χρειάζεται ένας ενδιάμεσος ξενιστής για τη μετάδοση των σπόρων. Ο ενδιάμεσος αυτός ξενιστής μπορεί να είναι ένα σκουλήκι *Triactinomyxon* του γένους *Tubifex*. Η θεωρία των Ακτινοσποριδίων έχει επιβεβαιωθεί για το *Mycobolus cerebralis* από ευρήματα των Markiw (1989, 1991) και El-Matbouli & Hoffman (1989). Επιπλέον, οι Markiw (1989) και Yokoyama (1993) αναφέρουν ότι είναι πιθανή και η μόλυνση στα ψάρια από διείσδυση στο δέρμα ή στο επιθήλιο των βραγχίων από σποροπλάσματα που απελευθερώνονται από σπόρους Ακτινοσπορίων που έρχονται σε επαφή με τα ψάρια.

Για τα θαλάσσια Μυξοσπορίδια, σε αντίθεση με τα Μυξοσπορίδια των γλυκών υδάτων, έχουν αναφερθεί λιγοστές μελέτες που περιγράφουν έναν ολοκληρωμένο

βιολογικό κύκλο που να περιπλέκει φάσεις τόσο ενδιάμεσων ξενιστών όσο και Μυξοσποριδίων. Σχετικά με τα θαλάσσια Μυξοσπορίδια, ένας ολοκληρωμένος κύκλος που να περιπλέκει φάσεις τόσο Ακτινοσποριδίων όσο και Μυξοσποριδίων έχει περιγραφεί μόνο στην περίπτωση του Μυξοσποριδίου *Ellipsomyxa gobii* Køie 2003 (Køie, Whipps & Kent 2004), ενώ Ακτινοσπορίδια έχουν βρεθεί στο θαλάσσιο βένθος (ολιγόχαιτους και πολύχαιτους) (Hallett, Erseus, Lester 1999, Ikeda 1912, Køie 2000, 2002).

1.3 Τα κυριότερα Μυξοσπορίδια παράσιτα που έχουν παρατηρηθεί στις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες

Μετά τη ραγδαία ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών ακολούθησε η εμφάνιση παθολογικών προβλημάτων, τα οποία τα τελευταία έτη, είναι κυρίως παρασιτικής αιτιολογίας, και δυσκολεύουν την ομαλή ανάπτυξη των ψαριών, κυρίως, στα στάδια της προπάχυνσης και της πάχυνσης. Μάλιστα, κατά περιόδους στη χώρα μας έχει παρατηρηθεί μέχρι και 80% θνησιμότητα με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις, που πολλές φορές καθιστούν ασύμφορες τις υδατοκαλλιέργειες. Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση πρωτοζωικών παρασιτικών ειδών, τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί για επιδημίες και πιο συγκεκριμένα των Μυξοσποριδίων, τα οποία παρασιτούν ευρέως τόσο στα θαλασσινά ψάρια (Abella & Le Breton 1996, Álvarez-Pellitero 1995, Álvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla 1993α,β, Athanassopoulou και συν. 1999, Rigos, Christophilogiannis, Yiagnisi, Andriopoulou, Koutsodimou, Nengas & Alexis 1999, Sakiti, Jacquemin & Marques 1994) όσο και σε ψάρια γλυκών υδάτων (El-Matbouli, Fischer-Scherl & Hoffmann 1992, Feist 1997). Μερικά από τα παράσιτα αυτά έχουν αναφερθεί ως πολύ παθογόνα για τους ξενιστές τους, ενώ άλλα είδη παρασίτων δεν προκαλούν παθογένεια. (Lom 1984, 1987, Paperna 1991). Τα σημαντικότερα Μυξοσπορίδια που παρατηρούνται στα εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη είναι τα: *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dyková 1994, *Myxobolus* sp., *Sphaerospora* sp., *Polysporoplasma sparisi* Sitjà-Bobadilla και Álvarez – Pellitero 1995, *Ceratomyxa* sp., *Kudoa* sp. και *Henneguya* sp.

Τα κυριότερα Μυξοσπορίδια των μεσογειακών ειδών που έχουν βρεθεί, καθώς και τα είδη ξενιστών και τα όργανα ανεύρεσής τους φαίνονται στον Πίν. 1-6.

Πίνακας 1-6. Τα κυριότερα Μυξοσπορίδια παράσιτα των μεσογειακών ειδών

Είδος Παράσιτου	Είδος Ψαριού Ξενιστή	Όργανο Στόχος	Βιβλιογραφικές αναφορές
<i>Enteromyxum leei</i>	<i>Diplodus puntazzo</i> C. <i>Sparus aurata</i> L. <i>Pagrus pagrus</i> L. <i>Pagrus major</i> T. <i>Diplodus sargus</i> C.	Έντερο Χοληδόχος κύστη Ήπαρ Βράγχια Νεφρός	Athanassopoulou και συν. 1999, Diamant 1992, 1997, Diamant & Wajsbrodt 1997, Diamant και συν. 1994, Rigos και συν. 1999, Sakiti, Jacquemi & Marques 1994
<i>Myxobolus</i> sp.	<i>Diplodus puntazzo</i> C. <i>Sparus aurata</i> L. <i>Diplodus sargus</i> C. <i>Diplodus annularis</i> L. <i>Diplodus vulgaris</i> L. Mugilidae	Νεφρός Χοληδόχος κύστη	Athanassopoulou και συν. 2003, Mladineo 2003, Παπαθανασίου 2004
<i>Sphaerospora</i> sp.	<i>Dicentrarchus labrax</i> L. <i>Sparus aurata</i> L.	Όρχεις Νεφρός Πάγκρεας Χοληδόχος κύστη Έντερο	Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992α,β, 1993α,β,γ
<i>Polysporoplasma sparis</i> .	<i>Sparus aurata</i> L. <i>Diplodus puntazzo</i> C.	Νεφρός	Αθανασοπούλου και συν. 2003, Mladineo 2003, Palenzuela και συν. 1999, Rigos και συν. 1999, Sitja- Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1995

<i>Ceratomyxa</i> sp.	<i>Dentex dentex</i> L. <i>Diplodus puntazzo</i> C. <i>Sparus aurata</i> L. <i>Pagrus pagrus</i> L. <i>Dicentrarchus labrax</i> L.	Χοληδόχος κύστη Έντερο	Abella & Le Breton 1996, Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α,δ, Αθανασοπούλου και συν. 1998, Company και συν.1999, Palenzuela και συν. 1997, Rigos και συν.1997
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Diplodus sargus</i> C. <i>Dicentrarchus labrax</i> L. <i>Sparus aurata</i> L. <i>Pagellus acarne</i> R.	Σωματικοί και καρδιακοί μύες Βράγχια Ήπαρ Νεφρός Περιτόναιο Μεσεντέριο	Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α, Kabata & Whitaker 1986, 1989, Moran και συν. 1999, Paperna 1982, Rigos και συν. 1999, Maeno και συν. 1993, Whitaker & Kent 1991, Whitaker και συν. 1996
<i>Henneguya</i> sp.	<i>Diplodus puntazzo</i> C. <i>Sparus aurata</i> L.	Χοληδόχος κύστη Βράγχια	Αθανασοπούλου (μη δημοσιευμένα στοιχεία) Bahri και συν. 1990
<i>Leptotheca sparidarum</i> n sp.	<i>Dentex dentex</i> L. <i>Sparus aurata</i> L.	Νεφρός Έντερο	Sitzà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 2001

1.3.1 *Enteromyxum leei* (πρώην *Myxidium leei*) Diamant, Lom & Dyková 1994

Επιδημιολογία

Η παρασίτωση με *E. leei* είναι μία ασθένεια η οποία είναι υπεύθυνη για σημαντικές απώλειες στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες. Στην τσιπούρα έχει αποδειχθεί ότι ο βιολογικός κύκλος του παράσιτου είναι άμεσος, από ψάρι σε ψάρι, το παράσιτο δηλαδή μεταδίδεται από το νερό (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrodt 1997). Στην Ελλάδα, μόλυνση από *E. leei* στη χιόνα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1995 από τους Le Breton και Marques σε μονάδες πάχυνσης χιόνας και τσιπούρας όπου το ποσοστό της θνησιμότητας έφτασε το 40%. Μεγάλες επιδημίες έχουν παρατηρηθεί, κυρίως, στο είδος χιόνα, σε βαθμό που να έχουν καταστήσει το είδος αυτό ασύμφορο για εντατική καλλιέργεια. Το 1997 επιδημία της Μυξοσποριδίασης αυτής παρουσιάστηκε για δεύτερη φορά, προκαλώντας απώλειες σε χιόνα και τσιπούρα με απώλειες που έφτασαν το 80% της παραγωγής των ειδών αυτών στην Ελλάδα (Athanasopoulou και συν. 1999, Rigos και συν. 1999). Τα ποσοστά θνησιμότητας από *E. leei* συνήθως αυξάνονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 22°C και μειώνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C (Αθανασοπούλου, Παπαδοπούλου & Λύτρα 1998, Rigos και συν. 1999). Ειδικά σε μικτές, ταυτόχρονες μολύνσεις με τα Μυξοσπορίδια *Ceratomyxa diplodae* Lubat, Radujkovic, Marques & Bouix 1989 και *E. leei* η θνησιμότητα είναι πολύ μεγάλη στη χιόνα και στην τσιπούρα (Athanasopoulou και συν. 1999, Rigos και συν. 1999). Μετά τις επιδημίες αυτές, σε επόμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το 1998 μέχρι το 2001, βρέθηκε ότι το ποσοστό προσβολής από *E. leei* ήταν χαμηλό. Το παράσιτο βρέθηκε μόνο στη χιόνα στο στάδιο της πάχυνσης, και ενώ είχε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των ψαριών, προκάλεσε επίσης θνησιμότητες μικρότερες από αυτές των προηγούμενων ετών (1995-1997). Το γεγονός ότι τόσο τσιπούρες κλωβών γειτονικών με προσβεβλημένες χιόνες, όσο και άγριες χιόνες που αλιεύθηκαν και διατηρήθηκαν υπό συνθήκες κλωβών δεν εμφάνισαν μόλυνση από

Μυξοσπορίδια, αποτελεί ένδειξη πως κάποιοι δευτερογενείς παράγοντες μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση των θνησιμοτήτων από την παρασίτωση αυτή. Η υψηλή σε λιπαρά διατροφή είναι πιθανόν ένας πολυσυζητημένος προδιαθετικός παράγοντας (Athanasopoulou και συν. 1999, Nengas, Alexis, Koutsodimou, Athanasopoulou, Dotsika, Karagouni, Kourtis & Rigos 2000), ενώ πιο ευαίσθητα είναι τα μικρά ιχθύδια χιόνας (20-85g) (Rigos και συν. 1999).

Κλινικά Συμπτώματα και Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Στις περιπτώσεις μολύνσεων από το Μυξοσπορίδιο *E. izei*, τα ψάρια παρουσιάζουν εξωτερικά απίσχναση και μία χαρακτηριστική περιγεγραμμένη αλλοίωση με απώλεια λεπιών στην ραχιαία και πλευρική επιφάνεια του σώματος. Εσωτερικά, το έντερο παρουσιάζει διάταση και πολτώδες τυροειδές περιεχόμενο και η χοληδόχος κύστη είναι επίσης διατεταμένη, ενώ το ήπαρ παρουσιάζει ελαφρύ αποχρωματισμό. Ανώριμες μορφές του παράσιτου έχουν παρατηρηθεί σε ξέσματα από τον εντερικό βλεννογόνο, ενώ ώριμοι σπόροι βρέθηκαν στο έντερο, στο περιεχόμενο της χοληδόχου κύστης και σπανιότερα στο ήπαρ, στα βράγχια και στο νεφρό. Το έντερο είναι το κύριο όργανο στόχος παρουσιάζοντας εκτεταμένη νέκρωση και εντοπισμένη αιμορραγία του βλεννογόνου (Athanasopoulou και συν. 1999). Τα μολυσμένα ψάρια παρουσιάζουν απίσχναση με διογκωμένες χοληδόχους κύστες και διογκωμένο κοιλιακό τοίχωμα. Περιστασιακά έχει παρατηρηθεί αποχρωματισμένο ή πρασινωπό ήπαρ με εμφανή σημάδια λιπώδους εκφύλισης. Στα σπλάχνα των περισσότερων μολυσμένων ψαριών έχουν παρατηρηθεί σημαντικές ποσότητες λίπους (Rigos και συν. 1999).

Νεκροσκοπικές και Ιστολογικές Αλλοιώσεις

Στα προσβεβλημένα ψάρια, τα Μυξοσπορίδια του είδους *E. izei* προκαλούν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο έντερο, στη χοληδόχο κύστη, στο ήπαρ και στα βράγχια, όπου, ώριμοι σπόροι και αρχικά στάδια του παράσιτου προκαλούν

απόπτωση του επιθηλίου με εκτεταμένη νέκρωση και τοπική αιμορραγία (Athanassoroulou και συν. 1999, Diamant 1992, Diamant 1997, Diamant, Lom & Dykonά 1994, Diamant & Wajsbroτ 1997, Rigos και συν. 1999). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη απόρριψη του επιθηλίου και ταυτόχρονα αύξηση των εωσινόφιλων κυττάρων του εντερικού τοιχώματος. Στις περιπτώσεις μικτής μόλυνσης με *Ceratomyxa diplodae*, έχουν παρατηρηθεί στον εντερικό βλεννογόνο εκτεταμένες φλεγμονώδεις αλλοιώσεις κοκκιωματώδους φύσης, οι οποίες εμπεριείχαν λεμφοκύτταρα και άλλα κύτταρα φλεγμονής (Athanassoroulou και συν. 1999).

1.3.2 *Myxobolus* sp.

Επιδημιολογία

Το *Myxobolus* sp. είναι άλλο ένα Μυξοσπορίδιο που παρατηρείται σε εκτρεφόμενα ψάρια (Athanassoroulou και συν. 2004β, Mladineo 2003, Παπαθανασίου 2004,). Κύστεις με ώριμους σπόρους *Myxobolus* sp. έχουν παρατηρηθεί στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό του νεφρού στην καλλιεργούμενη χιόνα, με μεγάλο ποσοστό προσβολής και ένταση τους καλοκαιρινούς μήνες. Το ποσοστό προσβολής κυμάνθηκε από 15,4% - 95,2%, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας τους καλοκαιρινούς μήνες έφτασε το 18,7%. Το παράσιτο παρατηρήθηκε για πρώτη φορά τον Ιούλιο του 1999 σε μεγάλη χιόνα (>50g) και τον Οκτώβριο του ίδιου έτους σε μικρότερη χιόνα (Athanassoroulou και συν. 2004β). Από τότε, το παράσιτο παρατηρείται στην καλλιέργεια της χιόνας με αυξημένο ποσοστό προσβολής και ένταση μέχρι σήμερα. Στα προσβεβλημένα ψάρια παρατηρήθηκε χαμηλός ρυθμός ανάπτυξης, που μπορεί να οφείλεται σε μία πιθανή οργανική δυσλειτουργία του απεκκριτικού συστήματος των ψαριών και στην καταστροφή του νεφρικού παρεγχύματος (Athanassoroulou και συν. 2004β). Αυτό έχει περιγραφεί και για άλλα

είδη Μυξοσποριδίων (Fiest 1997, Palenzuela, Álvarez-Pellitero & Sitja-Bobadilla 1999). Αυτό το εύρημα είναι πολύ σημαντικό, αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι η χρονική εποχή της έξαρσης των μυξοσποριδιακών παρασιτώσεων συμπίπτει με την εποχή που παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη των ψαριών, που είναι πολύ σημαντική για κάθε επιχείρηση. Κύστεις με ώριμους σπόρους *Myxobolus* sp., παρόμοιες με αυτές που έχουν παρατηρηθεί στη χιόνα έχουν βρεθεί και στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό του νεφρού σε καλλιεργούμενους σαργούς και τσιπούρες, σε υψηλά αλλά και χαμηλά ποσοστά προσβολής και έντασης, αντίστοιχα, κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ το φθινόπωρο έχουν παρατηρηθεί κυρίως ανώριμα στάδια (τροφοζώιτες) (Athanassoroulou και συν. 2004β). Το ίδιο παράσιτο βρέθηκε επίσης στο νεφρό των άγριων ψαριών, όπως σπάρου (*Diplodus annularis* Linnaeus 1758) και κακαρέλου (*Diplodus vulgaris* Geoffroy Saint-Hilaire 1817), παρουσιάζοντας τα ίδια παθολογικά ευρήματα με αυτά που παρατηρούνται στη χιόνα (Παπαθανασίου 2004). Ένα διαφορετικό, μη ταυτοποιημένο είδος *Myxobolus* έχει παρατηρηθεί στον εντερικό σωλήνα σε χιόνες στην Κροατία (Mladineo 2003) με πολύ όμως χαμηλά ποσοστά προσβολής (10%).

Κλινικά Συμπτώματα και Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Για τα Μυξοσπορίδια *Myxobolus* sp. δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τις αλλοιώσεις που προκαλούν στα ψάρια εκτροφής.

Νεκροσκοπικές και Ιστολογικές Αλλοιώσεις

Πρώιμοι τροφοζώιτες του παράσιτου *Myxobolus* sp. παρατηρούνται στο νεφρικό παρέγχυμα, ενώ ελεύθεροι σπόροι είναι περιχαρακωμένοι στα μελανομακροφάγα κέντρα (MMC). Ουρολιθίαση και ασβέστωση παρατηρείται τόσο στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό αλλά και μέσα στα ουροφόρα σωληνάρια, τα οποία εμφανίζονται διευρυμένα και εμφανίζουν επιθηλιακή ατροφία και εκφύλιση (Athanassoroulou και συν. 2004β).

1.3.3 *Sphaerospora* sp.

Επιδημιολογία

Μυξοσπορίδια του γένους *Sphaerospora* έχουν παρατηρηθεί στο λαβράκι σε υδατοκαλλιέργειες της Μεσογείου και αφορούν κυρίως σε δύο διαφορετικά είδη: το παράσιτο *Sphaerospora dicentrarchi* Sitja-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992 και το *Sphaerospora testicularis* Sitja-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1990. Αυτά είναι τα πιο συχνά Μυξοσπορίδια στο λαβράκι (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992α). Το *S. dicentrarchi* είναι ένα παράσιτο το οποίο παρασιτεί σε όλα σχεδόν τα εσωτερικά όργανα του ξενιστή, με προτίμηση στο συνδετικό και μυϊκό ιστό της χοληδόχου κύστης και στο μυϊκό χιτώνα του εντέρου. Τα ποσοστά προσβολής έχουν βρεθεί ακόμη και 100% σε άγρια ψάρια και 70,5% σε καλλιεργούμενα (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993α), ενώ στην Ελλάδα, οι θνησιμότητες έχουν φτάσει το 5-10% ημερησίως τους καλοκαιρινούς μήνες (Rigos και συν. 1999). Το Μυξοσπορίδιο αυτό έχει θεωρηθεί ιδιαίτερα επικίνδυνο σε περιπτώσεις μαζικών μολύνσεων, στις οποίες παρατηρείται εκτεταμένη καταστροφή του ιστού πολλών οργάνων και κυρίως του νεφρού, του παγκρέατος και των όρχεων (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993γ). Το *S. testicularis* είναι ένα παράσιτο που παρασιτεί στα σπερματοφόρα σωληνάρια, αλλά σε περίπτωση έντονης παρασίτωσης το παράσιτο επεκτείνεται και στον ιστό που βρίσκεται γύρω από τους όρχεις, προκαλώντας έτσι καταστροφή της ευρύτερης περιοχής των όρχεων (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993β,γ).

Ένα άλλο αταυτοποίητο είδος *Sphaerospora* sp. (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992α,β), έχει βρεθεί στα ουροφόρα σωληνάρια της καλλιεργούμενης τσιπούρας και στα καλλιεργούμενα κεφαλοειδή σε ημι-εκτατικά συστήματα εκτροφής. Το ποσοστό προσβολής μπορεί να φτάσει το 80% και η ένταση της παρασίτωσης είναι αρκετά υψηλή, έτσι ώστε να προκαλεί σοβαρές λειτουργικές ζημιές στους νεφρούς (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992α,β).

Κλινικά Συμπτώματα και Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Ωριμοί σπόροι και ανώριμα στάδια του παράσιτου *S. dicentrarchi* που παρασιτεί στο έντερο, στη χοληδόχο κύστη, στο νεφρό, στο ήπαρ και στα βράγχια του λαβρακιού, δεν προκαλούν σοβαρές αλλοιώσεις, παρά μόνο αν η μόλυνση είναι έντονη. Το παράσιτο αυτό μπορεί να σχετίζεται με μία δυσλειτουργία του πεπτικού συστήματος, αφού σημαντικές ποσότητες άπεπτων ουσιών έχουν παρατηρηθεί στο έντερο των προσβεβλημένων ατόμων (Rigos και συν. 1999).

Το παράσιτο *S. testicularis* είναι κοιλοζωικό και συνήθως παρασιτεί στις γονάδες των ψαριών χωρίς να προκαλεί φλεγμονώδη αντίδραση. Όμως, όταν η μόλυνση είναι έντονη, μπορεί να προκαλέσει ολική καταστροφή των γονάδων. Τα κλινικά συμπτώματα τότε αφορούν σε διόγκωση της κοιλιακής κοιλότητας εξαιτίας του ασκίτη, υπερτροφία των όρχεων με αντικατάσταση του ιστού από ινώδη συνδετικό ιστό και παρασιτικές μορφές, προκαλώντας έτσι αισθητή αύξηση του γοναδοσωματικού δείκτη (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993γ). Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου έχει παρατηρηθεί ότι παράσιτα ελευθερώνονται μαζί με το σπέρμα. Η παρασίτωση είναι χαμηλής έντασης στην αρχή της περιόδου αναπαραγωγής, όπου παρατηρούνται κυρίως ανώριμοι τροφοζώιτες, οι οποίοι όμως σταδιακά αναπτύσσονται καθώς εξελίσσεται η παρασίτωση (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993γ).

Νεκροσκοπικές και Ιστολογικές Αλλοιώσεις

Η παθογένεια της επίδρασης του μυξοσπορίδου *Sphaerospora* sp. στα θαλασσινά ψάρια φαίνεται να είναι διαφορετική, αναλόγως του ξενιστή όπου παρασιτεί (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993α,β,γ). Τα είδη που προσβάλλουν το λαβράκι, *S. dicentrarchi* και *S. testicularis*, βρέθηκαν με διαφορετικά ποσοστά θνησιμότητας και με διαφορετική παθογένεια. Έντονη μόλυνση με το *S. testicularis* στο λαβράκι προκαλεί μία σημαντική καταστροφή στους προσβεβλημένους όρχεις, η οποία συνοδεύεται και από σημαντική θνησιμότητα ψαριών. Εξαιτίας της

παρατεταμένης παρασίτωσης στα σπερματοφόρα σωληνάρια, τα σπερματογόνια και τα κύτταρα Sertoli εμφανίζονται με κενοτόπια, με αποδιοργανωμένα μιτοχόνδρια και υπερτροφικούς πυρήνες. Επίσης, σε έντονες παρασιτώσεις, τα παράσιτα εμφανίζονται και εξαπλώνονται και στον ορογόνο παρακείμενων οργάνων με ταυτόχρονη ανάπτυξη κυτταρικών αντιδράσεων του ξενιστή (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993γ). Ο προσβεβλημένος ορογόνος παρουσιάζει υπερτροφία και παρατηρείται διήθηση λευκοκυττάρων, κυρίως κοκκιοκυττάρων, ενώ μείωση της αναπαραγωγικής ικανότητας των προσβεβλημένων ψαριών είναι πιθανή (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993α). Το *S. dicentrarchi* εμφανίζεται λιγότερο παθογόνο συγκριτικά με το *S. testicularis* (Rigos και συν. 1999). Το έντερο και η χοληδόχος κύστη είναι τα όργανα στόχοι αυτού του παράσιτου. Σε πολύ σοβαρές όμως μολύνσεις, το παράσιτο μπορεί να βρεθεί και σε άλλους ιστούς, όπως στο νεφρό και στο πάγκρεας (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993α). Στις περιπτώσεις μόλυνσης του νεφρού, τα νεφρικά σωμάτια είναι τελείως κατεστραμμένα και καταλαμβάνονται από τα παράσιτα που σχηματίζουν σχηματισμούς σαν ροζέτες. Η κάψα του Bowman είναι διογκωμένη και το αγγειώδες σπείραμα καταστρέφεται ή μετατοπίζεται.

Οι κύριες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στην τσιπούρα από το είδος *Sphaerospora* sp. είναι καταστροφή των νεφρικών σωματίων, αιμορραγία και λευκοκυτταρική διήθηση στα νεφρικά σωμάτια. Σε επιδημία παρασίτωσης, παρατηρήθηκαν εκτεταμένα δερματικά έλκη σε ποσοστό 20% σε τσιπούρες 18 μηνών. Μετά από νεκροσκοπική εξέταση αυτών των ψαριών, παρατηρήθηκε σε όλα το Μυξοσπορίδιο *Sphaerospora* sp. στους νεφρούς και στα δερματικά έλκη (Álvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla 1993α).

1.3.4 *Polysporoplasma sparis* Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1995

Επιδημιολογία

Το Μυξοσπορίδιο *P. sparis* έχει βρεθεί σε νεφρούς καλλιεργούμενης τσιπούρας στην Ισπανία (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1995), την Αδριατική Θάλασσα (Mladíneo 2003) και σε μονάδες σε όλη την Ελλάδα, με υψηλά ποσοστά προσβολής την καλοκαιρινή περίοδο (Athanassopoulou και συν. 2004α, Rigos και συν. 1999). Το ίδιο Μυξοσπορίδιο αυτό βρέθηκε σε μία περίπτωση και σε χιόνα (Rigos και συν. 1999). Οι Palenzuela και συν. (1999) μελέτησαν την παρασίτωση από *P. sparis* σε διαφορετικά συστήματα και βρήκαν το παράσιτο μόνο σε ημι-εντατικά συστήματα εκτροφής και σε ψάρια μεγαλύτερα των 51g, χωρίς όμως να παρατηρηθεί διαφορά στο ποσοστό προσβολής μεταξύ εποχών. Στην Ελλάδα, αντίθετα, έχουν βρεθεί υψηλά ποσοστά προσβολής που φτάνουν και το 93% και αυξημένη ένταση της παρασίτωσης σε τσιπούρες μικρού και μεγάλου μεγέθους σε πολλά εντατικά συστήματα εκτροφής σε κλωβούς σε όλη την Ελλάδα (Athanassopoulou, Karagouni, Dotsika, Vatsos, Christofilloyannis, Lytra & Dourala 2003, Athanassopoulou και συν. 2004α, Rigos και συν. 1999).

Κλινικά Συμπτώματα και Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Για το Μυξοσπορίδιο *P. sparis* δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τις αλλοιώσεις που προκαλούν στα ψάρια εκτροφής.

Νεκροσκοπικές και Ιστολογικές Αλλοιώσεις

Έντονη μόλυνση από *P. sparis* έχει περιγραφεί σε νεφρό της τσιπούρας, που κατάστρεψε τα νεφρικά σωμάτια και προκάλεσε διόγκωση των νεφρικών σωληναρίων. Το ίδιο Μυξοσπορίδιο βρέθηκε και σε μία περίπτωση σε χιόνα, αλλά σε μικρότερη ένταση συγκριτικά με την ένταση της μόλυνσης στην τσιπούρα. Στην περίπτωση αυτή, τα νεφρικά σωμάτια παρέμειναν απρόσβλητα και τα νεφρικά

σωληνάρια δεν ήταν διογκωμένα (Rigos και συν. 1999). Αντίθετα, στην τσιπούρα, τα νεφρικά σωμάτια παρουσιάζονται συνήθως διογκωμένα με μέγεθος τριπλάσιο από το φυσιολογικό. Στα νεφρικά σωμάτια με έντονη μόλυνση, το αγγειώδες σπείραμα είναι εκτοπισμένο περιφερειακά και με παράλληλη παρουσία νεκρωτικών κυττάρων. Σε επόμενα στάδια, μόνο οι σπόροι είναι εμφανείς στα νεφρικά σωμάτια και αυτά είναι περιχαρακωμένα από συνδετικό ιστό, χωρίς όμως ανάπτυξη έντονης φλεγμονής. Τα μολυσμένα νεφρικά σωμάτια γίνονται τελικά κύστεις που περιέχουν άμορφο υλικό το οποίο πολύ συχνά ασβεστοποιείται. Συχνά μόνο περιχαρακωση των μελανομακροφάγων κέντρων (MMC) από συνδετικό ιστό χωρίς εμφανείς σπόρους είναι εμφανής (Athanassopoulou και συν. 2004α).

1.3.5 *Ceratomyxa* sp.

Επιδημιολογία

Σε θαλασσινά ψάρια έχουν βρεθεί επίσης αρκετά είδη Μυξοσποριδίων του γένους *Ceratomyxa* (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α). Στην Ελλάδα, το παράσιτο *C. diplodae* έχει προκαλέσει σοβαρές θνησιμότητες (>78%) στην εκτρεφόμενη συναγρίδα (*Dentex dentex* L.), (Athanassopoulou και συν. 1999, Company, Sitzà-Bobadilla, Pujalte, Garay, Álvarez-Pellitero & Pérez-Sánchez 1999, Rigos, Grigorakis, Christophilogiannis, Nengas & Alexis 1997) παρασιτώντας στη χοληδόχο κύστη, ενώ θνησιμότητες προκαλεί και στη χιόνα (Rigos και συν. 1997, Athanassopoulou και συν. 1999). Το *Ceratomyxa sparusaaurati* Sitzà-Bobadilla, Palenzuela, Álvarez-Pellitero 1995 έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με θνησιμότητες στην τσιπούρα (Abella & Le Breton 1996, Athanassopoulou και συν. 1999, Palenzuela, Sitzà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1997) αλλά και στο φαγκρί (Athanassopoulou και συν. 1999) προσβάλλοντας κυρίως τη χοληδόχο κύστη και το έντερο, ενώ έχει παρατηρηθεί και σε λαβράκι, σε πολύ χαμηλά όμως ποσοστά

μόλυνσης (Rigos και συν. 1997), στο οποίο όμως παρασιτεί ένα άλλο είδος το *Ceratomyxa labracis* Sitzà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero, (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993β).

Κλινικά Συμπτώματα και Μακροσκοπικές αλλοιώσεις

Για το Μυξοσπορίδιο *Ceratomyxa sp.* δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τις αλλοιώσεις που προκαλούν στα ψάρια εκτροφής.

Νεκροσκοπικές και Ιστολογικές Αλλοιώσεις

Τα Μυξοσπορίδια αυτά προκαλούν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στη χοληδόχο κύστη κυρίως σε μεγαλύτερα ψάρια και μπορεί να επεκταθούν και σε άλλα όργανα σε έντονη μόλυνση.

1.3.6 *Kudoa sp.*

Επιδημιολογία

Τα Μυξοσπορίδια παράσιτα του γένους *Kudoa* έχουν βρεθεί σε θαλασσινά ψάρια και ως επί το πλείστον προσβάλλουν τους μυϊκούς ιστούς των ψαριών (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α, Maeno, Nagasawa & Sorimachi 1993, Moran, Whitaker & Kent 1999α, Whitaker, Kent & Sakanari 1996), υποβαθμίζοντας ακόμα και την ποιότητα των μεταποιημένων προϊόντων (Whitaker & Kent 1991) λόγω της γαλακτοματοειδούς υφής που παίρνουν οι παρασιτούμενοι μύες. Έχει παρατηρηθεί επίσης σε μικρότερο βαθμό στα βράγχια (Joy 1972) καθώς και στους καρδιακούς μυς (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α, Kabata & Whitaker 1986, 1989), στο ήπαρ και στο νεφρικό ιστό (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α) σε θαλασσινά ψάρια. Στην Ελλάδα έχει παρατηρηθεί σε μυϊκούς ιστούς, σε λαβράκι (Rigos και συν. 1999) και σε σαργό (Athanassopoulou μη δημοσιευμένα στοιχεία),

χωρίς όμως να προκαλεί αξιοσημείωτες θνησιμότητες, ενώ άλλα μεσογειακά είδη στα οποία έχει βρεθεί είναι η τσιπούρα στην οποία προσβάλλει το νεφρικό ιστό, το περιτόναιο και το μεσεντέριο και τέλος, το μουσμούλι (*Pagellus acarne* Risso 1827) στο οποίο προσβάλλει τους μυς (Papeona 1982).

1.3.7 Πρόληψη – Θεραπεία Μυξοσποριδίων

Η θεραπεία των Μυξοσποριδίων είναι δύσκολη (Molnár 1993). Πρωταρχικό ρόλο για την εφαρμογή οποιασδήποτε προληπτικής ή θεραπευτικής αγωγής έχει η σωστή και έγκαιρη εκτίμηση της κατάστασης των ψαριών και της σημαντικότητας του παράσιτου, το οποίο θα πρέπει να διαγνωσθεί έγκαιρα και σωστά από ειδικευμένο ιχθυοπαθολόγο και να εκτιμηθεί αν πρόκειται για πρωτογενές ή δευτερογενές αίτιο.

Η φουματζιλίνη (και τα ανάλογά της) είναι το μόνο αποδεδειγμένα αποτελεσματικό φάρμακο στην θεραπεία μικροσποριδιακών και μυξοσποριδιακών μολύνσεων (Hedrick, Groff, Foley & McDowell 1988, Hedrick, Groff & Baxa 1991, Higgings & Kent 1988, Kent & Dawe 1994, Molnár, Baska & Szekely 1987). Για το παράσιτο *E. leei* θεραπεία δεν υπάρχει. Διάφορα θεραπευτικά σκευάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά, αλλά δεν υπάρχει ικανοποιητική θεραπεία, ιδίως στη χιόνα (Λύτρα 1997, Athanassopoulou και συν. 1999). Η πειραματική εφαρμογή φουματζιλίνης ενάντια στη μυξοσποριδίαση δεν μείωσε τις απώλειες των ψαριών, παρά το ότι ο βαθμός αφομοίωσης του φαρμάκου βρέθηκε ικανοποιητικός (72-75%) στις προτεινόμενες δόσεις για την τσιπούρα (Rigos και συν. 1999). Επομένως, η φουματζιλίνη φαίνεται αναποτελεσματική ενάντια στη μυξοσποριδίαση από *E. leei* στην τσιπούρα και στη χιόνα, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του φαρμάκου αυτού ενάντια σε άλλες μυξοσποριδιακές μολύνσεις (El-Matbouli & Hoffmann 1991, Hedrick και συν. 1988).

Αντίθετα, για το παράσιτο *P. sparis* στην τσιπούρα και *Myxobolus* sp. στη χιόνα έχουν εφαρμοστεί διάφορες πειραματικές θεραπείες (φουματζιλίνη, αιθέρια έλαια, σουλφοναμίδες) που έδειξαν ότι ο συνδυασμός σαλινομυκίνη και αμπρόλιο καθυστερεί και περιορίζει την μόλυνση. Επιπλέον, αυτός ο συνδυασμός δεν ήταν τοξικός για τα ψάρια στις δοκιμασμένες δόσεις (Athanassoroulou και συν. 2003).

Η φουματζιλίνη αποδείχθηκε ασφαλής σε δόσεις $<6 \text{ mg Kg}^{-1}$ σε χιόνα και σε τσιπούρα (Athanassoroulou και συν. 2003). Η φουματζιλίνη σε χαμηλές δόσεις μπορεί να οδηγήσει σε ικανοποιητική μείωση του ποσοστού μόλυνσης χωρίς τοξικότητα, ενώ αντίθετα η θεραπεία με τολτραζουρίλη σε χιόνα έχει αποδειχθεί τόσο αναποτελεσματική όσο και τοξική (Athanassoroulou και συν. 2003).

Θεραπίες που έχουν γίνει με αιθέρια έλαια και ειδικά το ριγανέλαιο, έχουν βρεθεί να προκαλούν ανασταλτική δράση διαφόρων μικροοργανισμών (Athanassoroulou και συν. 2004α,β), συμπεριλαμβανομένων και σπορόμορφων μικροοργανισμών (Mejholm & Dalgaard 2002, Sivropoulou, Papanicolaou, Nikolaou, Kokkini, Lanaras & Arsenakis 1996). Σε πειραματικές θεραπείες που έγιναν σε τσιπούρα μολυσμένη με Μυξοσπορίδια τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά, αφού τα ποσοστά προσβολής μειώθηκαν, όμως περισσότερα πειραματικά δεδομένα χρειάζονται προκειμένου να εφαρμοστεί αυτή η θεραπεία σε ευρύτερη κλίμακα (Athanassoroulou και συν. 2003, Athanassoroulou και συν. 2004α,β).

Η συνδυαστική θεραπεία σαλινομυκίνη με αμπρόλιο έχει αποδειχθεί ως η πιο αποτελεσματική και ασφαλής τόσο στη θεραπεία της τσιπούρας όσο και της χιόνας από τα Μυξοσπορίδια *P. sparis* και *Myxobolus* sp. αντίστοιχα (Athanassoroulou και συν. 2004α,β). Όλα τα ψάρια στα οποία πραγματοποιήθηκε θεραπεία με Σαλινομυκίνη 12% και Αμπρόλιο έδειξαν μία στατιστικά σημαντική έκκριση NO και της λυσοζύμης συγκριτικά με άλλες θεραπείες σε ψάρια ή σε ψάρια τα οποία δεν είχαν υποστεί καμία θεραπεία (Karagouni και συν. 2005α,β).

1.4 Η ανοσία κατά των λοιμογόνων παραγόντων

1.4.1 Γενικά – Έμφυτη και επίκτητη ανοσία

Όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των φυτών, των ασπόνδυλων και των σπονδυλωτών, αναπτύσσουν ενδογενείς μηχανισμούς προστασίας κατά των λοιμώξεων. Έτσι, το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών απαρτίζεται από ένα σύνολο μηχανισμών οι οποίοι συνιστούν την έμφυτη και την επίκτητη ανοσία (Roitt, Brostoff & Male 1987).

Η έμφυτη ή φυσική ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και είναι ικανή να ενεργοποιεί την παραγωγή ανοσολογικών παραγόντων εναντίον διαφόρων μικροοργανισμών με στόχο την εξάλειψή τους. Εάν αυτή η πρώτη γραμμή άμυνας ξεπεραστεί, δρα η επίκτητη ή προσαρμοστική ανοσία η οποία απαιτεί την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων των μικροοργανισμών προκειμένου να γίνει αποτελεσματική. Οι επίκτητες ανοσοαποκρίσεις κατευθύνονται τόσο κατά μικροοργανισμών όσο και κατά μη-μικροβιακών αντιγόνων. Η έμφυτη ανοσία όμως δεν αποτελεί απλά την πρώτη γραμμή άμυνας στις λοιμώξεις. Παίζει, επίσης, καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μηχανισμών επίκτητης ανοσίας και κυρίως στην παρουσίαση των αντιγόνων στα ανοσοαρμόδια Β και Τ λεμφοκύτταρα. Αποτελεί επομένως το φυσικό πέρασμα στην επίκτητη ανοσία (Abbas & Lichtman 2004). Η ενεργοποίηση των παραπάνω κυττάρων χαρακτηρίζεται επιπλέον και από την ανάπτυξη μνήμης εναντίον των αντιγόνων τα οποία τα ενεργοποίησαν, με αποτέλεσμα την προστασία του οργανισμού σε μελλοντικές επαναμολύνσεις από τον ίδιο μικροοργανισμό (Roitt και συν. 1987).

1.4.2 Μηχανισμοί της έμφυτης ανοσίας

A) Το δέρμα και οι βλεννογόνοι του σώματος αποτελούν μηχανικούς φραγμούς για την είσοδο, παθογόνων και μη, μικροοργανισμών.

B) Η ύπαρξη γαλακτικού οξέος και λιπαρών οξέων στον ιδρώτα και στις σμιγματογόνες εκκρίσεις (χαμηλό pH), τα οξέα του στομάχου και η σπερμίνη, ουσία που υπάρχει στο σπέρμα, εμποδίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών ή προκαλούν την καταστροφή τους.

Γ) Το κροσσωτό επιθήλιο στην αναπνευστική οδό εμποδίζει την είσοδο της σκόνης, που περιέχει διάφορους μικροοργανισμούς, στους βρόγχους. Με την κατάποση τα μικρόβια που φτάνουν στο στομάχι καταστρέφονται από τις όξινες γαστρικές εκκρίσεις.

Δ) Οι βλεννώδεις εκκρίσεις περιέχουν βλεννο-πολυσακχαρίτες που εμποδίζουν την εισροή ιών στα κύτταρα λόγω ανταγωνισμού για κυτταρικούς επιφανειακούς υποδοχείς (ιικές νευραμινιδάσες).

E) Το βακτηριοκτόνο (κυρίως για Gram+ βακτήρια) ένζυμο λυσοζύμη, βασική πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους, βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα δάκρυα, στο σάλιο, στο έκκριμα της μύτης, στα ούρα, στον ιδρώτα και στα κοκκία των πολυμορφοπύρηνων και μακροφάγων προκαλεί λύση των μικροβίων επιδρώντας με τα γλυκοπεπτίδια του κυτταρικού τοιχώματος.

Στ) Κατά τη φαγοκυττάρωση καταστρέφονται μικροοργανισμοί που προσκολλώνται στα πολυμορφοπύρηννα και μακροφάγα, μετά την αναγνώριση τους με κάποιο μάλλον πρωτόγονο μηχανισμό.

Z) Η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση, μη ειδική αντίδραση του οργανισμού σε τραυματισμό, έχει σπουδαία προστατευτική λειτουργία. Κατά τη φλεγμονή εκκρίνεται ισταμίνη που προκαλεί διαστολή των αγγείων. Η αυξημένη τριχοειδική διαπερατότητα (που προκαλεί η ισταμίνη) οδηγεί στη γρήγορη έξοδο από το αίμα των πολυμορφοπύρηνων και αργότερα με άλλο μηχανισμό, των μονοκύτταρων, στο

μέρος όπου βρίσκονται τα μικρόβια (φλεγμονή) τα μικρόβια καταστρέφονται με φαγοκυττάρωση και από τη μαζική διαπήδηση βακτηριοκτόνων παραγόντων του ορού.

Η) NK κύτταρα ή φυσικοί φονιάδες, λευκοκύτταρα που αναγνωρίζουν αλλαγές στην κυτταρική επιφάνεια, συνδέονται με τα κύτταρα στόχους και τα καταστρέφουν.

Θ) Ββακτηριοκτόνοι παράγοντες του ορού όπως:

1. η C-δραστική πρωτεΐνη (C-reactive protein). Το μόριο αυτό δεν έχει σχέση με τις ανοσοσφαιρίνες και κατακρημνίζει τους C- υδατάνθρακες των πνευμονόκοκκων με την παρουσία Ca^{++} . Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει σε μία ομάδα πρωτεϊνών που αυξάνονται εκατό και πλέον φορές στο αίμα μετά από μόλυνση και ονομάζονται πρωτεΐνες οξείας φάσης.

2. Η προπερδίνη και το σύστημα του συμπληρώματος (εναλλακτικός μηχανισμός ενεργοποίησης συμπληρώματος) καταστρέφουν ποικιλία μικροοργανισμών με την παρουσία ιόντων Mg^{++} (Χατζηπέτρου-Κουρουνάκη 1987).

Μη ειδικά επίσης συνεισφέρουν:

A) Τα φυσικά αντισώματα που υπάρχουν στον ορό φυσιολογικών ατόμων και είναι κυρίως της τάξης IgM. Τα αντισώματα αυτά, πιστεύεται ότι δημιουργούνται σαν απόκριση του οργανισμού σε βακτήρια της εντερικής χλωρίδας κατά την εμβρυική ή νεογεννητική περίοδο.

B) Η ιντερφερόνη, η οποία είναι μη ειδική αντι-ιική πρωτεΐνη και εμποδίζει την ενδοκυτταρική ανάπτυξη των ιών, συντίθεται από κύτταρα που μολύνθηκαν με ιούς, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα (Χατζηπέτρου-Κουρουνάκη 1987).

1.4.3 Μη ειδικοί μηχανισμοί άμυνας και παράσιτα

Μετά την εισβολή τους στον ξενιστή, τα παράσιτα υφίστανται τη δράση λυτικών ενζύμων (πχ. λυσοζύμη), κυττάρων (πχ. φαγοκυττάρωση) ή της γλυκοπρωτεΐνης C9 του συμπληρώματος (εναλλακτική οδός ενεργοποίησης) (Bier, da Silva, Goetze & Mota 1986).

Επιπλέον, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και άλλα κύτταρα με φαγοκυτταρική ικανότητα μετά τη φαγοκυττάρωση του παράσιτου ελευθερώνουν διάφορες κυτταροκίνες, όπως ιντερλευκίνη 1 (IL-1), ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και παράγοντες νέκρωσης καρκινικών όγκων, (TNF), που ενεργοποιούν τη σύνθεση και την έκκριση από τα ηπατικά κύτταρα των πρωτεϊνών οξείας φάσης (πχ. C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, α1-οξική γλυκοπρωτεΐνη και α2-μακροσφαιρίνη). Οι πρωτεΐνες οξείας φάσης κατέχουν ρόλο οψωνινών, μεταφορέων ή αντιπρωτεασών, χωρίς ακόμη να έχει διευκρινισθεί αν είναι ευεργετικές ή βλαπτικές για τον ξενιστή (James, Glaven, Goldenberg, Meltzer & Pearce 1990, Stadnyk & Gauldie 1991, Titus, Sherry & Cerami 1991).

Η φαγοκυττάρωση και η δράση των ενζύμων αποτελούν σημαντικούς μηχανισμούς της έμφυτης ανοσίας, προϋποθέτουν όμως την αρχική σύνδεση του παθογόνου παράγοντα στην επιφάνεια των κυττάρων. Μετά τη σύνδεση των παρασίτων τα κύτταρα εκκρίνουν μεταβολίτες της φλεγμονής, υπεροξειδίο του υδρογόνου, αραχιδονικό οξύ κ.λ.π. (Handman, McConville & Goding 1987), ενώ τα φαγοκύτταρα περιβάλλουν τα παράσιτα με ψευδοπόδια, τα εγκλείουν στο κυτταρόπλασμα τους και τα διαβρώνουν με ένζυμα.

Ορισμένα Πρωτόζωα αποφεύγουν, για μικρό τουλάχιστον χρονικό διάστημα, τη δράση των ενζύμων και πολλαπλασιάζονται μέσα ή έξω από τα φαγοκύτταρα (Abraham, Grieve & Mika-Grieve 1988, Bier και συν. 1986, Harn, Cianci & Caulfield 1988, Vignali, Quentin & Taylor 1989), ενώ άλλα φέρουν στην επιφάνεια τους μόρια γλυκοπρωτεϊνών/υποδοχέων C3bι και επιτρέπουν την ενεργοποίηση του

συμπληρώματος με την εναλλακτική οδό (Abraham και συν. 1988, Bier και συν. 1986, Fattah, Maizels, McLaren & Spry 1986, Harn και συν. 1988, Vignali και συν. 1989)

Τα προϊόντα μεταβολισμού των προνυμφών ορισμένων παρασίτων περιλαμβάνουν πρωτεΐνες από τις οποίες έλκονται τα εωσινόφιλα κύτταρα και διαβρώνουν με τα ένζυμά τους το επιδερματίδιο των παρασίτων. Ορισμένα όμως παράσιτα αποφεύγουν τις βλάβες του επιδερματιδίου τους από τα εωσινόφιλα κύτταρα (Fattah και συν. 1986, Klesius, Haynes, Cross & Ciordia 1986) με την ενεργητική και έγκαιρη απομάκρυνση τμημάτων του γλυκοκάλυκά τους όπου προσκολλώνται σινόφιλα κύτταρα (Lightowlers & Rikkard 1988).

Τα παράσιτα που διαφεύγουν τους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας, αντιμετωπίζονται με τους ειδικούς μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή (Χαραλαμπίδης 1994).

1.4.4 Αμυντικοί μηχανισμοί των ψαριών

Το ενδιαφέρον για τη μελέτη των αμυντικών μηχανισμών των ψαριών προέκυψε από την ανάγκη ανάπτυξης εργαλείων για την εξασφάλιση της καλής υγείας των ψαριών προκειμένου να υποστηριχθεί η ραγδαία ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών, αλλά και από την ανάγκη να απαντηθούν ερωτήματα σχετικά με την εξέλιξη της ανοσίας των σπονδυλωτών. Η μελέτη των μηχανισμών έμφυτης ανοσίας κατά των παρασίτων στους οστεϊχθύες παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της εξελικτικής, βιοχημικής και γενετικής πολυπλοκότητας των ευκαρυωτικών παρασίτων σε σχέση με τους ιούς και τα βακτήρια, αλλά και εξαιτίας της ποικιλίας των αντιπαρασιτικών μηχανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν. Παρ' όλα αυτά, οι αντικειμενικές δυσκολίες που παρουσιάζονται κατά την προσαρμογή των παρασίτων στις εργαστηριακές συνθήκες, δεν έχουν επιτρέψει μέχρι σήμερα την εκτεταμένη

μελέτη της έμφυτης ανοσίας των ψαριών έναντι των παρασίτων. Αποτελεί όμως δεδομένο, ότι η έμφυτη ανοσία παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ψαριών έναντι των παρασίτων ή άλλων μολυσματικών παραγόντων, σε σύγκριση με τον αντίστοιχο ρόλο αυτής στα ομοιόθερμα σπονδυλωτά (Anderson 1992, Yano 1996). Θεωρείται επίσης πιθανό, ότι η αργή ανάπτυξη και η περιορισμένη ποικιλότητα των μηχανισμών επίκτητης ανοσίας που εκδηλώνονται στους ποικιλόθερμους οργανισμούς αποτέλεσαν αίτιο φυσικής επιλογής των ατόμων ή των πληθυσμών που κατείχαν φυσικούς μηχανισμούς αντίστασης έναντι των ασθενειών (Pastoret, Griebel, Basin & Gonaerts 1998). Η φυσική αντίσταση που παρατηρείται στα ψάρια κατά τη διάρκεια μολύνσεων με ισχυρά λοιμογόνα στελέχη παρασίτων αποτελεί τη βάση των παραπάνω υποθέσεων, ενώ η μακρόχρονη επιβίωση των μη λοιμογόνων παρασίτων στο αφιλόξενο περιβάλλον του ξενιστή εισηγείται επιπλέον και την πιθανότητα προσαρμογής των ίδιων των παρασίτων.

Η ικανότητα των ψαριών να ελαχιστοποιούν τις επιπτώσεις ή να αντιμετωπίζουν επιτυχώς τις παρασιτικές μολύνσεις είναι αποτέλεσμα τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας. Ενώ έχει αποδειχθεί η συμβολή του εναλλακτικού μονοπατιού συμπληρώματος κατά την επαγωγή της έμφυτης ανοσίας έναντι των παρασίτων σε διάφορους ιστούς των ψαριών, απαιτείται ακόμη σημαντική έρευνα για τον προσδιορισμό του ρόλου άλλων χυμικών ή κυτταρομεσολαβητικών παραγόντων, ιδιαίτερα σε είδη που δεν ανήκουν στην οικογένεια των σαλμονοειδών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση του ρόλου περιβαλλοντικών ή διατροφικών παραγόντων και η πιθανότητα επίδρασης αυτών στη διαμόρφωση της έμφυτης αντι-παρασιτικής απόκρισης (Wahli, Verlhac, Gabaudan Schuerp & Meier 1998, Weeks, Warinner, Mason & McGinnis 1986, Weeks, Keisler, Warinner & Mathews 1998). Η τροποποίηση της ανοχής στις ασθένειες με τη χρήση εμβολίων έχει προσφέρει ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διαχείριση της καλής υγείας των ψαριών στις υδατοκαλλιέργειες. Όμως παραμένει άγνωστος ο τρόπος με τον οποίο οι παράγοντες έμφυτης και επίκτητης ανοσίας αλληλεπιδρούν προκειμένου να

αναπτυχθούν προστατευτικές αποκρίσεις, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται πολυδύναμα εμβόλια. Επιπλέον, χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση εάν η εφαρμογή ανοσοτροποποιητικών ουσιών στη διατροφή ή στα εμβόλια μπορεί να συνεισφέρει στην ενίσχυση της μη ειδικής αντιπαρασιτικής άμυνας (Jones 2001).

Η ολοκληρωμένη γνώση του βιολογικού κύκλου, της μετάδοσης και της αλληλεπίδρασης των Μυξοσποριδίων με τον ξενιστή είναι πολύ σημαντικά στην εφαρμογή προφύλαξης και μέτρων ελέγχου για τις μυξοσποριδιάσεις. Παρ' όλα αυτά, η εγκατάσταση των παρασίτων στις ιχθυοκαλλιέργειες μερικές φορές θεωρείται αναπόφευκτη λαμβάνοντας υπόψη τον εύκολο τρόπο μετάδοσης, το εύρος των ξενιστών και τη φύση ορισμένων ιχθυοκαλλιεργητικών χειρισμών και συνθηκών. Ως εκ τούτου, η μελέτη των ανοσολογικών αποκρίσεων και των μηχανισμών που εμπλέκονται στην άμυνα των ψαριών στις παρασιτικές μολύνσεις είναι εξαιρετικής σημασίας, προκειμένου να αναπτυχθούν περαιτέρω τρόποι ελέγχου βασισμένοι στην ανοσοπροφύλαξη.

Η ανάμιξη των μηχανισμών έμφυτης ανοσίας στις ανοσολογικές αποκρίσεις των ψαριών στις μολυσματικές ασθένειες θεωρείται δεδομένη. Στην έκφραση αυτών των μη-ειδικών μηχανισμών συμμετέχουν διάφοροι χυμικοί παράγοντες όπως είναι οι αντιπρωτεάσες, οι λυσίνες (λυσοζύμη, χυτινάσες, μη ειδικές λυσίνες) ή το συμπλήρωμα και ορισμένοι από αυτούς υπάρχουν στις βλεννώδεις εκκρίσεις και δρουν σαν πρώτη γραμμή άμυνας (Dalmo, Ingebrigtsen & Bogwald 1997, Robertsen 1999, Yano 1996). Επιπλέον, διάφορα κυτταρικά στοιχεία, όπως είναι τα φαγοκυτταρικά κύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα) και τα φυσικά κυτοτοξικά κύτταρα (NCC) φαίνεται να εμπλέκονται στις μη ειδικές αποκρίσεις. Οι αναφορές για τις αποκρίσεις επίκτητης ανοσία είναι λιγοστές, αλλά έχουν περιγραφεί σε διάφορες μολύνσεις ψαριών, περιλαμβανομένων και αρκετών παρασιτώσεων (Evelyn 1996, Secombes & Chappell 1996, Woo 1996). Σχετικά με τις μυξοσποριδιακές παρασιτώσεις, οι πληροφορίες για τις ανοσολογικές αποκρίσεις τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας είναι ακόμα λιγότερες. Μόνο λίγα

δεδομένα είναι διαθέσιμα για τον PKX οργανισμό (MacConnell, Smith, Hedrick & Speer 1989, Saulnier & Kinkelin 1996) *Myxobolus cerebralis* Hofer 1903 (Adkison, Levine & Hedrick 1997, Griffin & Davies 1978), *Myxobolus arcticus* Pugachev & Khokhlov 1979 (Furuta, Ogawa & Wakabayashi 1993) και την *Sphaerospora dicentrarchi* (Muñoz, Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 2000α, Muñoz, Álvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla 2000β).

Στην περίπτωση των ψαριών της οικογένειας Sparidae, υπάρχουν μερικές πρόσφατες πληροφορίες για το ανοσολογικό σύστημα της τσιπούρας που σχετίζονται με μη-ειδικές ανοσολογικές αποκρίσεις ενάντια σε βακτήρια (Cuesta, Esteban & Meseguer 1999, Esteban, Mulero, Muñoz & Meseguer 1998, Mulero & Meseguer 1998, Ortuño, Esteban & Meseguer 2000, Sunyer & Tort 1995). Επιπλέον, πολύ πρόσφατα, ευρέθη ότι διάφοροι χυμικοί παράγοντες μη-ειδικής ανοσίας, όπως η λυσοζύμη και τα οξειδία του αζώτου και κυτταρικές λειτουργίες όπως η φαγοκυτταρική ικανότητα των μακροφάγων επηρεάζονται κατά τις μυξοσποριδίασεις τόσο στη χίονα όσο και στην τσιπούρα (Karagouni και συν. 2005α,β). Επιπλέον, υπάρχουν μερικά δεδομένα για τη σχέση των μη-ειδικών ανοσολογικών αποκρίσεων με τη διατροφή (Nengas και συν. 2000)

1.4.5 Μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα

Οι δύο τύποι κυκλοφορούντων φαγοκυττάρων, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα, είναι κύτταρα του αίματος που επιστρατεύονται στις εστίες της λοίμωξης, όπου αναγνωρίζουν και φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς, ώστε να φονεύουν ενδοκυττάρια. Τα ουδετερόφιλα ανήκουν στην κατηγορία των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και είναι τα πλέον πολυάριθμα λευκοκύτταρα στο αίμα, φθάνοντας τις 4.000 έως 10.000 ανά mm³. Η παραγωγή των ουδετερόφιλων από το μυελό των οστών αυξάνεται ταχύτατα στις λοιμώξεις και ο

αριθμός τους μπορεί να φτάσει έως τις 20.000 ανά mm^3 αίματος. Η παραγωγή των ουδετερόφιλων διεγείρεται από ορισμένες κυτταροκίνες, όπως οι παράγοντες διέγερσης αποικιών (colony stimulating factors), που παράγονται από πολλούς κυτταρικούς τύπους στις λοιμώξεις και δρουν στα πολυδύναμα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των πρόδρομων μορφών των ουδετερόφιλων. Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα που αποκρίνονται στις περισσότερες λοιμώξεις, ειδικά σε βακτηριακές και μυκητιασικές λοιμώξεις. Φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς που βρίσκονται στην κυκλοφορία και εξαγγειώνονται γρήγορα προς τους ιστούς στις εστίες της λοίμωξης, όπου μπορούν επίσης να φαγοκυτταρώσουν μικροοργανισμούς και τελικά πεθαίνουν σε λίγες ώρες.

Τα μονοκύτταρα είναι λιγότερο άφθονα από τα ουδετερόφιλα, αριθμώντας 500 με 1000 ανά mm^3 αίματος. Και αυτά φαγοκυτταρώνουν μικροοργανισμούς στο αίμα και στους ιστούς. Αντίθετα από τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα που εξαγγειώνονται στους ιστούς επιβιώνουν στις θέσεις αυτές για μακρές περιόδους. Στους ιστούς, τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Τα μονοκύτταρα του αίματος και τα μακροφάγα των ιστών είναι δύο διακριτά στάδια στη φάση ωρίμανσης του ίδιου κυτταρικού τύπου, που αποτελούν το σύστημα των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων (mononuclear phagocyte system). Τα μόνιμα τοπικά μακροφάγα βρίσκονται στους συνδετικούς ιστούς και σε κάθε όργανο του σώματος, όπου εξυπηρετούν τις ίδιες λειτουργίες με τα μονοπύρηννα φαγοκύτταρα που επιστρατεύονται από την κυκλοφορία του αίματος.

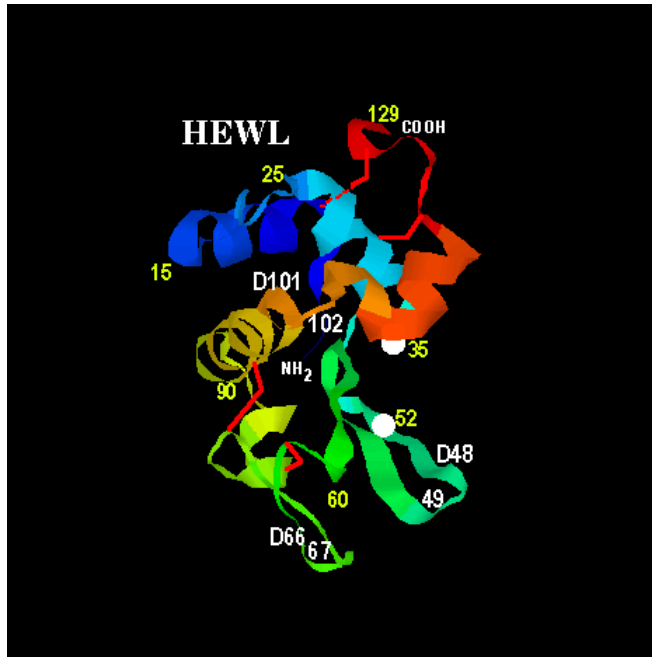
Τα ουδετερόφιλα και τα μονοπύρηννα μεταναστεύουν σε εξωαγγειακές εστίες της λοίμωξης συνδεόμενα με ενδοθηλιακά μόρια προσκόλλησης και αποκρινόμενα σε χημειοτακτικές ουσίες που παράγονται μετά από επαφή με μικροοργανισμούς. Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα αναγνωρίζουν τους μικροοργανισμούς στο αίμα και στους εξωαγγειακούς ιστούς μέσω επιφανειακών υποδοχέων που είναι ειδικό για προϊόντα μικροοργανισμών.

Η αναγνώριση των μικροοργανισμών από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα οδηγεί στη φαγοκυττάρωση των μικροοργανισμών και στην ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων, ώστε να φονεύσουν τους φαγοκυτταρωμένους οργανισμούς.

Εκτός από το να φονεύουν φαγοκυτταρωμένους μικροοργανισμούς, τα μακροφάγα εκτελούν και άλλες λειτουργίες, πολύ σημαντικές στην άμυνα κατά των λοιμώξεων. Τα μακροφάγα παράγουν κυτταροκίνες που είναι σημαντικοί μεσολαβητές στην άμυνα του ξενιστή. Τα μακροφάγα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες και ένζυμα που εξυπηρετούν την επιδιόρθωση των ιστών που έχουν υποστεί βλάβες και την αντικατάστασή τους με συνδετικό ιστό. Τα μακροφάγα επίσης διεγείρουν τα Τ λεμφοκύτταρα αλλά και αποκρίνονται σε παράγωγα αυτών (Abbas & Lichtman 2004).

1.4.6 Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στο λεύκωμα του αυγού, στο δάκρυ και σε άλλες βιολογικές εκκρίσεις και είναι ευρύτατα διαδεδομένη στα διάφορα είδη ζώων και φυτών. Η λυσοζύμη είναι ένα πολυπεπτίδιο 129 αμινοξέων με μοριακό βάρος 14,4 Kda. Είναι θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη με ισοηλεκτρικό σημείο εστίασης που κυμαίνεται από 10,7 έως 11,0 ανάλογα με την προέλευσή της. Η τριτοταγής δομή προσδίδει στο μόριο της λυσοζύμης ωοειδή μορφή, που αποτελείται από 5-7 σχηματισμούς α-έλικας και 3 σχηματισμούς β-πτυχωσης. Στη μια πλευρά του μορίου της σχηματίζεται σχισμή στο βάθος της οποίας βρίσκεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην Εικ. 1-1 απεικονίζεται η τρισδιάστατη δομή του μορίου της λυσοζύμης.



Εικόνα 1-1. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου της λυσοζύμης.

Η λυσοζύμη είναι γνωστή για τη δράση της εναντίον των βακτηρίων. Είναι υπεύθυνη για την καταστροφή του πολυσακχαρικού τοιχώματος πολλών ειδών βακτηρίων προσφέροντας προστασία από ένα μεγάλο εύρος Gram θετικών βακτηρίων και λιγότερο από Gram αρνητικά βακτήρια, εξαιτίας των διαφορών στη δομή των μεμβρανών τους. Η λειτουργία της λυσοζύμης είναι να υδρολύει τον β(1-4) γλυκοσυδικό δεσμό ανάμεσα στο N-ακετυλομουραμικό οξύ (N-acetylmuramic acid, NAM) και την N-ακετυλογλυκοζαμίνη (N-acetylglucosamine, NAG) του πεπτιδογλυκανικού στρώματος του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Εκτός από τη βακτηριολυτική δράση, η λυσοζύμη έχει και άλλες λειτουργίες όπως:

- απενεργοποίηση συγκεκριμένων ιών σχηματίζοντας αδιάλυτα συμπλέγματα
- αύξηση της φαγοκυτταρικής δράσης των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων και μακροφάγων
- διέγερση του πολλαπλασιασμού και των κυτταροτοξικών λειτουργιών των μονοκυττάρων
- αντικαρκινική δράση

- αντιφλεγμονώδη δράση

Η λυσοζύμη θεωρείται ο σπουδαιότερος βακτηριοκτόνος παράγοντας. Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Fleming το 1922, δείχνοντας τη μεγάλη κατανομή του στους ιστούς και τις εκκρίσεις του σώματος (Fleming 1922). Το ένζυμο βρίσκεται φυσιολογικά στο πλάσμα (5-9gm/l) και μόνο σε πολύ μικρές ποσότητες στα ούρα (Harrison, Parker & DeSilva 1973). Η λυσοζύμη βρέθηκε σε πολύ υψηλή συγκέντρωση στα λυσοσώματα των ουδετερόφιλων κυττάρων, τα οποία τείνουν να συγκεντρώνονται σε περιοχές όπου υπάρχει οξεία φλεγμονή. Το χαμηλό pH στις περιοχές αυτές (3 έως 6) είναι ιδανικό για την ενεργοποίησή της. Υψηλές συγκεντρώσεις λυσοζύμης βρίσκονται στα λευκοκύτταρα, ουδετερόφιλα κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα ή μακροφάγα και χαμηλές εάν υπάρχουν λεμφοκύτταρα (Finch, Lamphere & Jablon 1964).

Πρόσφατα υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη δράση της λυσοζύμης ως εργαλείο διάγνωσης στις λευχαιμίες (Osserman & Lawlor 1966), τις νεφρικές ασθένειες (Prockop & Davidson 1964) και τη διάκριση ανάμεσα στη βακτηριακή και την ιογενή μηνιγγίτιδα (Klockars, Reitamo, Weber & Kerttula 1978).

Η λυσοζύμη υπάρχει στον ορό και στη βλέννα των ψαριών, αλλά κυρίως σχετίζεται με τα λευκοκύτταρα και ιστούς πλούσιους σε αυτά, όπως ο νεφρός, ο σπλήνας και το έντερο. Τα περιτοναϊκά μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα του αίματος περιέχουν λυσοζύμη και τα τελευταία θεωρείται ότι είναι η πηγή της λυσοζύμης του ορού (Ellis 2001).

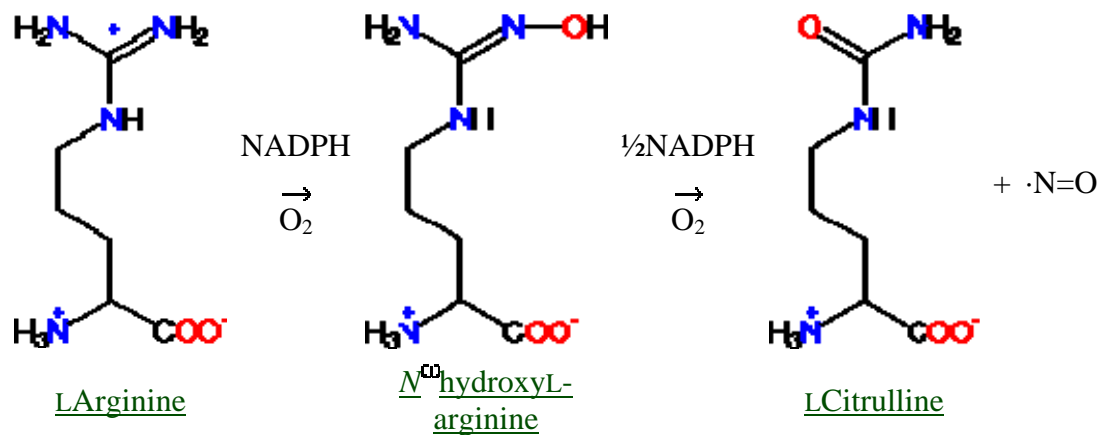
Τα διάφορα είδη ψαριών έχουν διαφορετικές ποσότητες λυσοζύμης στους ιστούς τους και στα υγρά των ιστών. Η πέστροφα εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (Lie, Evensen, Sorensen & Frogsadal 1989), ενώ είδη της οικογένειας του βακαλάου έχουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση (Grinde, Lie, Poppe & Salte 1988, Lie και συν. 1989). Η λυσοζύμη διασπά πεπτιδογλυκάνες στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα (Ellison & Giehl 1991), και έχει παρατηρηθεί αύξηση της συγκέντρωσής της στο σολομό του Ατλαντικού (Engstad, Robertsen & Frivold 1992), στην πέστροφα

(Jorgensen, Sharp, Secombes & Robertsen 1993) και σε άλλα ψάρια ως απόκριση σε διάφορες γλυκάνες στις λοιμώξεις (Robertsen 1999). Η λυσοζύμη επίσης παράγεται στο ήπαρ αλλά και σε εξω-ηπατικές περιοχές, αν και ο μηχανισμός της σύνθεσης και της έκκρισής της δεν είναι ακόμα γνωστός (Bayne & Gerwick 2001). Η λυσοζύμη στα ψάρια εμφανίζεται σε δύο μορφές, εκ των οποίων η μία εμφανίζεται ως περισσότερο βακτηριοκτόνος σε σχέση με την αντίστοιχη λυσοζύμη των ανώτερων σπονδυλωτών (Grinde 1989).

Η λυσοζύμη έχει αντιβακτηριακή δράση, κυρίως εναντίον Gram⁺ βακτηρίων, προκαλώντας τη λύση τους καθώς επίσης μπορεί να δρα και ως οψωνίνη. Το ειδικό υπόστρωμα της λυσοζύμης είναι το β-(1-4) linked N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-muramic acid peptidoglycan. Αυτό διαμορφώνει το κυτταρικό τοίχωμα ορισμένων βακτηρίων και όταν αυτό λυθεί, τότε το βακτηριακό κύτταρο διαρρηγνύεται εξαιτίας της αύξησης της οσμωτικής πίεσης. Λυσοζύμη η οποία έχει απομονωθεί από ορισμένα είδη ψαριών παρουσίασε την ικανότητα να προκαλεί λύση σημαντικών παθογόνων των ψαριών, όπως το *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* και *Aeromonas hydrophila* (Grinde 1989).

1.4.7 NO

Το μονοξειδίο του αζώτου (NO) είναι ένα άχρωμο αέριο και έντονα ενεργό μόριο με μικρή διάρκεια ζωής και μοριακό βάρος 30 Da. Παράγεται μέσα στα κύτταρα με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση του NO. Όλοι οι τύποι του ενζύμου παράγουν NO από την αργινίνη με τη βοήθεια μορίων οξυγόνου και NADPH. Το NO διαχέεται ελεύθερα στις κυτταρικές μεμβράνες, αντιδρά με πολλά μόρια και αναλώνεται μόλις συντίθεται. Έτσι το NO δρα με ένα παρακρινή ή και αυτοκρινή τρόπο επηρεάζοντας μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται πολύ κοντά στο σημείο παραγωγής του. Στην Εικ. 1-2 απεικονίζεται η παραγωγή NO από την αργινίνη.



Εικόνα 1-2. Παραγωγή NO από την αργινίνη.

Το μονοξείδιο του αζώτου συμμετέχει σε πολλές χημικές αντιδράσεις, ενώ δρα και σε πολλούς ιστούς και ρυθμίζει μία μεγάλη ποικιλία βιολογικών λειτουργιών του καρδιαγγειακού συστήματος, του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος, του αναπαραγωγικού και του ανοσοποιητικού συστήματος, καταστρέφοντας τους παθογόνους μικροοργανισμούς μέσα στα λυσοσώματα των μακροφάγων.

Η ενεργοποίηση των μακροφάγων, επίσης, συνοδεύεται από την επαγωγή της συνθετάσης του NO και την ακολουθούσα απελευθέρωση των NO (Mac Micking, Xie & Nathan 1997). Το NO είναι ένας σημαντικός αγγελιοφόρος και η δράση του ασκείται σε αρκετά βιολογικά συστήματα, όπως είναι το ανοσολογικό, το νευρικό και το καρδιαγγειακό (Bredt & Snyder 1994, Dawson & Dawson 1995). Εξαιτίας της ανάμειξής του σε αυτά τα συστήματα, το ενδιαφέρον για τη μέτρηση των NO σε βιολογικούς ιστούς και υγρά είναι έντονο. Ένας τρόπος για να διερευνηθεί ο σχηματισμός των NO, είναι να μετρηθούν τα NO²⁻, που είναι ένα από τα δύο αρχικά, σταθερά και μη-ασταθή προϊόντα διάσπασης των NO. Αυτή η ανάλυση βασίζεται στη χημική αντίδραση η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Griess το 1879 (Griess 1879).

Η επαγόμενη παραγωγή των NO από τα μακροφάγα των ψαριών ερευνάται τελευταία. Παρά το ότι η ιδιοσυστατική σύνθεση των NO έχει καταδειχθεί στο κεντρικό νευρικό σύστημα των ψαριών (Bruning, Hattwig & Mayer 1996, Holmqvist & Ekstrom 1997), μόνο μία μελέτη έχει παρουσιαστεί πριν το 1995 ότι τα ψάρια κατέχουν την επαγόμενη μορφή του ενζύμου. Οι Schoor και Plum (1991), έδειξαν επαγόμενη παραγωγή NO, χρησιμοποιώντας ενζυμικές και ιστοχημικές τεχνικές σε ομογενοποιημένους ιστούς νεφρού από γατόψαρο μολυσμένο με το βακτήριο *Edwardsiella ictaluri*. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή NO μπορεί να μειωθεί μετά από έκθεση μίας κυτταρικής σειράς μακροφάγων κυττάρων χρυσόψαρου σε βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (Wang, Shen, Neumann & Belosevic 1995), επίδραση που έχει παρατηρηθεί σε διάφορα θαλάσσια είδη (Mulero & Meseguer 1998, Neumann, Fagan & Belosevic 1995, Tafalla & Novoa 2000, Yin, Lam & Sin 1997). Επίσης, έχει γίνει μερική ανάλυση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων του iNOS από μακροφάγα χρυσόψαρου και πέστροφας, και έχει διαπιστωθεί ομολογία που φτάνει σχεδόν το 70% (Campos-Perez, Ward, Grabiwski, Ellis & Secombes 2000, Laing, Hardie, Aartsen, Grabowski & Secombes 1999, Laing, Grabiwski, Belosevic & Secombes 1996) με την αλληλουχία της iNOS που προέρχεται από μακροφάγα θηλαστικών (Neuman, Stafford, Barreda, Ainsworth & Belosevic 2001).

Σε αντίθεση με τα θηλαστικά όπου έχουν γίνει πολλές μελέτες, υπάρχουν σχετικά λίγες μελέτες που να εξετάζουν την κυτταροτοξική κυτοτοξική ικανότητα των μακροφάγων των ψαριών *in vitro* δια μέσου των NO. Πρόσφατα, ο Yin και οι συν., (Yin και συν. 1997) έδειξαν ότι ενεργοποιημένα μακροφάγα του γατόψαρου με παράγοντες ενεργοποίησης των μακροφάγων (MAF) ήταν βακτηριοκτόνα ενάντια στο βακτήριο *Aeromonas hydrophila* και η κυτταροτοξική δράση τους μπορούσε τουλάχιστον μερικώς να παρεμποδιστεί με τη χρήση αναστολέων αργινίνης που παρεμποδίζουν τη σύνθεση των NO. Τα μακροφάγα των ψαριών πρέπει να ωριμάσουν και να διαφοροποιηθούν για να παράγουν NO ως απόκριση στην ενδοκυτταρική μόλυνση. Τα μακροφάγα του χρυσόψαρου μολυσμένα με *Leishmania*

major, ένα αποκλειστικά ενδοκυτταρικό παθογόνο πρωτόζωο των μακροφάγων των θηλαστικών, παράγουν NO ακόμη και απουσία επιπρόσθετου μηνύματος από κυτταροκίνη (Neumann 1999, Stafford, Neumann & Belosevic 1999). Η επαγωγή αυτής της αντίδρασης φαίνεται να εξαρτάται από την αναγνώριση του ξένου κυττάρου (παρασιτικό κύτταρο) από τα μακροφάγα, αφού η φαγοκυττάρωση πλαστικών σφαιριδίων δεν είναι ικανή να επάγει την παραγωγή των NO στα ίδια κύτταρα (Neumann 1999, Karagouni και συν. 2005α,β). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις στα μακροφάγα των θηλαστικών, τα οποία εκτός του παράσιτου για την επαγωγή των NO έχουν ανάγκη και από ένα συνδιεγερτικό μήνυμα, όπως το μήνυμα δια μέσου της ιντερφερόνης γ (INF- γ). Παρόμοιες επιδράσεις έχουν, επίσης, παρατηρηθεί στα μακροφάγα που είναι μολυσμένα με gram⁺ βακτήριο *Mycobacterium chelonae* (Marsden & Secombes 1997) ή μικροσπορίδια (Neuman και συν. 2001).

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικά πρωτόκολλα

2.1.1 Μελέτη των μυξοσποριδιάσεων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Ρόλος των άγριων ψαριών στη μετάδοση των παρασίτων (Μυξοσποριδίων).

Προκειμένου να εκτιμηθεί η κατάσταση της Μυξοσποριδίασης στη χώρα μας, ελήφθησαν δείγματα τόσο από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών της οικογένειας Sparidae, που αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της ελληνικής ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής, όσο και από άγρια ψάρια τα οποία μπορεί να αποτελούν πιθανούς φορείς μετάδοσης της παρασίτωσης.

2.1.1.1 Περιοχή δειγματοληψίας

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στον Αμβρακικό Κόλπο, περιοχή η οποία θεωρήθηκε αντιπροσωπευτική, αφενός εξαιτίας των ιχθυοκαλλιεργητικών μονάδων που έχουν αναπτυχθεί και αφετέρου, εξαιτίας του αλιευτικού πλούτου. Ο Αμβρακικός κόλπος είναι ο μεγαλύτερος κόλπος της Βορειοδυτικής Ελλάδας. Καλύπτει 405Km και οι λιμνοθάλασσες κατά μήκος της ακτογραμμής καταλαμβάνουν συνολικά έκταση 60 Km² ([http²](#)). Στην ουσία είναι μία κλειστή λεκάνη, της οποίας η μοναδική δίοδος επικοινωνίας με το Ιόνιο Πέλαγος είναι ένα στενό κανάλι 600m πλάτους και 5m βάθους, μέσω του οποίου ανανεώνονται τα νερά του κόλπου με πολύ αργό ρυθμό, με μία διαδικασία που ολοκληρώνεται μέσα σε ένα χρόνο.

Ο κόλπος είναι μία θερμή και πλούσια θάλασσα, που βρίσκεται μεταξύ της Νότιας Ηπείρου και της Βόρειας Αιτωλοακαρνανίας. Οι νομοί που τον περιβάλλουν είναι ο νομός Πρέβεζας από τα δυτικά, ο νομός Άρτας από τα βόρεια και ο νομός Αιτωλοακαρνανίας από τα ανατολικά και τα νότια ([http³](#)). Η τοπογραφία αποτελείται από τρία βραχώδη βουνά ανάμεσα στις λιμνοθάλασσες και η περιοχή περιτριγυρίζεται από βουνά στη βόρεια και ανατολική πλευρά. Περιβάλλεται από

γόνιμες πεδιάδες, λιμνοθάλασσες και βάλτους. Ο Αμβρακικός είναι ένας υγρότοπος διεθνούς σημασίας και μία επιφάνεια 250.000 στρεμμάτων προστατεύεται από τη συνθήκη Ramsar.

Στα βόρεια ο υγρότοπος του κόλπου βρίσκεται ανάμεσα στις εκβολές δύο μεγάλων ποταμών, του Λούρου και του Αράχθου, οι οποίοι με τις ιζηματογενείς αποθέσεις συνδυασμένες με τις ανθρωπογενείς επιδράσεις, δημιούργησαν ένα μοναδικό μωσαϊκό από ρηχές λιμνοθάλασσες, αλμυρά έλη και βάλτους.

Στα νότια, οι όχθες του κόλπου είναι βραχώδεις και το βάθος του νερού είναι μεγαλύτερο. Στα νοτιοανατολικά, είναι ο κόλπος της Αμφιλοχίας, ο οποίος, δυστυχώς, είναι μολυσμένος από τα αστικά απόβλητα. Η παρουσία του φυτοπλαγκτού και του ζωοπλαγκτού αποδεικνύει ότι η λεκάνη είναι ποσοτικά πιο πλούσια, αλλά ποιοτικά πιο φτωχή συγκριτικά με άλλες παρόμοιες περιοχές της Ελλάδας (<http>³). Οι υγρότοποι του Αμβρακικού κόλπου αποτελούν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα το οποίο αποτελείται από τα ρηχά θαλάσσια νερά του Κόλπου. Υπάρχουν τρεις κύριες λιμνοθάλασσες στα βόρεια, (Ροδιά, Τσουκαλιό και Λογαρού) και μερικές μικρότερες κατά μήκος της συνολικής ακτής του κόλπου (<http>²).

Η πλευρά του κόλπου με τις πιο ενδιαφέρουσες μορφολογικές και οικολογικές όψεις είναι η βόρεια, επειδή σχηματίζει πολυάριθμες λιμνοθάλασσες, όπως οι λιμνοθάλασσες Τσουκαλιό, Ροδιά, Λογαρού, Άργιλος, Κόφτρα, Παλιομπούκα στην Άρτα, Τσόπελι, Μάζομα, Πογονίτσα, Βαθύ στην Πρέβεζα, Κατάφουρκο και Βόνιτσα στην Αιτωλοακαρνανία και οι λίμνες Σαλτίνι και Βουλκαρία στην Αιτωλοακαρνανία. Αυτές οι λιμνοθάλασσες με τη σταθερή ανταλλαγή στη δομή ξηράς και θάλασσας, παρέχουν ένα καταφύγιο για ένα μεγάλο αριθμό σπάνιων πουλιών (<http>³). Στην Εικ. 2.1.1 φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας.



Εικ. 2.1.1 Σημεία δειγματοληψίας εκτρεφόμενων ιχθύων.

2.1.1.2 Πειραματικά ψάρια – Πρωτόκολλο δειγματοληψιών

Άγρια ψάρια

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις εποχιακές δειγματοληψίες, οι οποίες διήρκησαν τρία χρόνια, από το χειμώνα του 2003 έως και το φθινόπωρο του 2005. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβανόταν δείγμα τουλάχιστον 150 ψαριών τα οποία εξετάζονταν νεκροσκοπικά και παρασιτολογικά για Μυξοσπορίδια σε νωπή μορφή, και όταν αυτό δεν ήταν δυνατό τα ψάρια καταψύχονταν στους -20°C .

Τα ψάρια τα οποία επιλέχθηκαν ήταν ψάρια τα οποία ενδημούσαν στην περιοχή. Από αυτά προτιμήθηκαν κυρίως ψάρια της οικογένειας Sparidae, στην οποία ανήκουν τα πιο συχνά καλλιεργούμενα είδη ψαριών στις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες και στα οποία παρατηρούνται οι μεγαλύτερες θνησιμότητες

εξαιτίας των μυξοσποριδιάσεων, καθώς επίσης και ο κέφαλος της οικογένειας Mugilidae, είδος στο οποίο επίσης έχουν παρατηρηθεί Μυξοσπορίδια, χωρίς όμως μεγάλες θνησιμότητες. Στον Πίν. 2.1.1 φαίνονται αναλυτικά τα είδη και ο ακριβής αριθμός των άγριων ψαριών σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία.

Η δειγματοληψία έγινε με τη βοήθεια αλιευτικής βάρκας γύρω από τις ιχθυοκαλλιεργητικές μονάδες στις οποίες έγιναν οι δειγματοληψίες των εκτρεφόμενων ψαριών.

Πίνακας 2.1.1 Τα είδη και ο ακριβής αριθμός των άγριων ψαριών σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία

	Είδος ψαριού						
	Κέφαλος	Τσιπούρα	Λυθρίνι	Μουσμούλι	Γόπα	Σπάρος	Σαργός
ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2003	50	-	-	-	50	50	50
ΑΝΟΙΞΗ 2003	-	-	30	30	50	40	50
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2003	50	50	-	-	50	-	50
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2003	-	30	50	30	40	-	50
ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2004	50	-	50	-	50	-	-
ΑΝΟΙΞΗ 2004	50	-	50	-	50	-	-
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2004	40	30	40	-	40	-	-
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2004	30	30	40	-	50	-	-
ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2005	50	50	-	-	50	-	-
ΑΝΟΙΞΗ 2005	50	-	50	-	50	-	-
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2005	50	50	-	-	50	-	-
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2005	50	50	-	-	50	-	-

Στα άγρια ψάρια τα οποία αλιεύθηκαν δεν περιλαμβάνονταν οι άγριοι σαργοί εξαιτίας της δυσκολίας αλίευσής τους. Για το λόγο αυτό χίλιοι σαργοί τοποθετήθηκαν

σε τέσσερις πειραματικούς κλωβούς σε λιμνοθάλασσα στη Δυτική Ελλάδα, αναπτύχθηκαν χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση και χαρακτηρίστηκαν σαν άγριοι σαργοί.

Εκτρεφόμενα ψάρια

Σε εκτρεφόμενα ψάρια πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από τρεις μονάδες εκτροφής (M.E. 1, M.E. 2, M.E. 3) στον Αμβρακικό κόλπο (Εικ. 2.1.1). Σε κάθε μονάδα λαμβανόταν δείγμα από 60 τσιπούρες και 60 χιόνες, οι οποίες εξετάζονταν νεκροσκοπικά και παρασιτολογικά για Μυξοσπορίδια σε νωπή μορφή, και όταν αυτό δεν ήταν δυνατό τα ψάρια καταψύχονταν στους -20°C.

Τα ψάρια αυτά επιλέχθηκαν ως τα πιο ευπαθή στις μυξοσποριδιάσεις και ιδιαίτερα το είδος χιόνα (που είναι το είδος με τις μεγαλύτερες θνησιμότητες εξαιτίας του Μυξοσποριδίου *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dykonά 1994). Από κάθε μονάδα λαμβάνονταν τέσσερις εποχιακές δειγματοληψίες και συνολικά πραγματοποιήθηκαν δώδεκα δειγματοληψίες, στη διάρκεια των τριών χρόνων από το φθινόπωρο του 2002 έως και το Καλοκαίρι του 2005.

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πέντε εποχιακές δειγματοληψίες σε σαργό εκτρεφόμενο από το φθινόπωρο του 2002 έως και το φθινόπωρο του 2003 μόνο σε μία από τις τρεις μονάδες εκτροφής (M.E. 3). Οι δειγματοληψίες του εκτρεφόμενου σαργού πραγματοποιήθηκαν μόνο στη μονάδα εκτροφής 3 (M.E. 3), γιατί αυτό το είδος ψαριού δεν καλλιεργούνταν στις άλλες δύο μονάδες (M.E. 2, M.E. 3) στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες, ενώ οι δειγματοληψίες ήταν περιορισμένες γιατί η μονάδα εκτροφής 3 δεν καλλιέργησε σαργό μετά το φθινόπωρο του 2003. Στον Πίν. 2.1.2 φαίνονται αναλυτικά τα είδη και ο ακριβής αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία.

Πίνακας 2.1.2 Τα είδη και ο ακριβής αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών σε κάθε εποχιακή δειγματοληψία.

	Μονάδα Εκτροφής 1		Μονάδα Εκτροφής 2		Μονάδα Εκτροφής 3		
	Τσιπούρα	Χιόνα	Τσιπούρα	Χιόνα	Τσιπούρα	Χιόνα	Σαργός
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2002	60	60	60	60	60	60	60
ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2003	60	60	60	60	60	60	60
ΑΝΟΙΞΗ 2003	60	60	60	60	60	60	60
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2003	60	60	60	60	60	60	60
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2003	60	60	60	60	60	60	60
ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2004	60	60	60	60	60	60	
ΑΝΟΙΞΗ 2004	60	60	60	60	60	60	
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2004	60	60	60	60	60	60	
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ 2004	60	60	60	60	60	60	
ΧΕΙΜΩΝΑΣ 2005	60	60	60	60	60	60	
ΑΝΟΙΞΗ 2005	60	60	60	60	60	60	
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ 2005	60	60	60	60	60	60	

2.1.2 Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με *E. Ieei* σε χιόνα και μελέτη ορισμένων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας που αναπτύσσονται κατά τη μόλυνση.

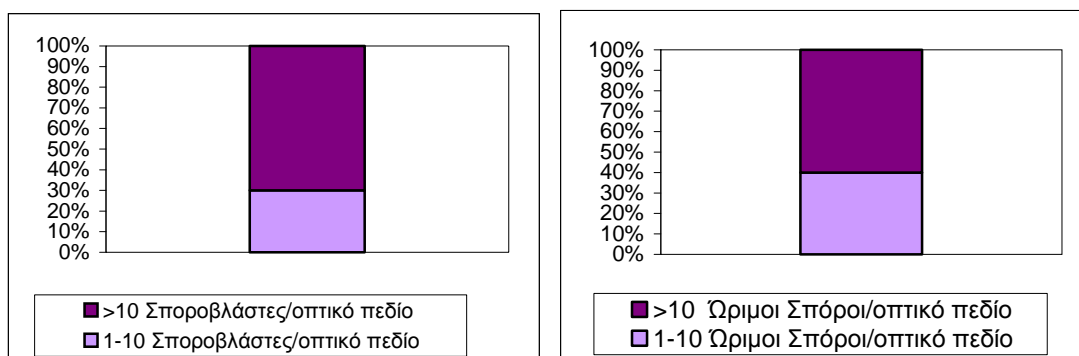
2.1.2.1 Πειραματικά ψάρια

Δότες (Ομάδα Δ)

Ως δότες χρησιμοποιήθηκαν χιόνες μέσου βάρους 60g, προερχόμενες από κλωβούς εμπορικής μονάδας, στην Βορειοδυτική Ελλάδα. Στα ψάρια-δότες, το ποσοστό προσβολής ήταν 100% και η θνησιμότητα κυμαινόταν από 40-60%. Τα ψάρια αυτά παρουσίαζαν τα τυπικά κλινικά συμπτώματα της μυξοσποριδίασης, όπως εντερίτιδα, ανορεξία, έντονη απίσχνανση και τοπικό αποχρωματισμό συνοδευόμενο από απώλεια λεπιών κάτω από το ραχιαίο πτερύγιο.

Η παρασίτωση επιβεβαιώθηκε μετά από παρασιτολογική εξέταση 100 ψαριών από τον κλωβό της μονάδας που περιείχε συνολικά περίπου 3000 ψάρια, σε νωπά παρασκευάσματα από ξέσματα εντερικού επιθηλίου, καθώς και με χρώση Giemsa. Όπως φαίνεται στο Γράφ. 2.1.1, η ένταση της παρασίτωσης που παρουσίαζαν τα ψάρια – δότες ήταν υψηλή (>10 στάδια παράσιτου ανά οπτικό πεδίο, 400x), με περισσότερους από 10 σποροβλάστες ή ώριμους σπόρους ανά οπτικό πεδίο σε συχνότητα 70% και 60% αντίστοιχα, εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό την καταλληλότητά τους ως δότες αφού από αυτά τα στάδια προέρχεται το μολυσματικό στάδιο του παράσιτου, τα αρχικά μολυσματικά κύτταρα.

Επίσης, στα ψάρια-δότες, πραγματοποιήθηκε νεκροσκοπική, βακτηριολογική, παρασιτολογική και ιστολογική εξέταση για άλλους παθογόνους οργανισμούς εκτός από το Μυξοσπορίδιο *E. Ieei*, για να εξασφαλιστεί η αποφυγή μετάδοσης άλλων μη επιθυμητών παθογόνων, τα οποία θα μπορούσαν να περιπλέξουν τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων. Μετά την ολοκλήρωση των εξετάσεων, διαπιστώθηκε ότι το *E. Ieei* στον εντερικό σωλήνα και στη χοληδόχο κύστη ήταν ο μόνος παθογόνος οργανισμός που ανιχνεύτηκε στα ψάρια δότες.



Γράφημα 2.1.1 Οι μπάρες παρουσιάζουν τη συχνότητα των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου, σε κάθε οπτικό πεδίο σε ψάρια δότες (n=10). Υπολογίστηκαν 10 τυχαία οπτικά πεδία (μεγέθυνση x400) ανά παρασκεύασμα. Η ένταση της παρασίτωσης ταξινομήθηκε σε 2 επίπεδα: 1-10 (σποροβλάστες ή ώριμοι σπόροι) ανά οπτικό πεδίο και >10 (σποροβλάστες ή ώριμοι σπόροι) ανά οπτικό πεδίο. Είναι προφανής η υψηλή ένταση >10 ανά οπτικό πεδίο σποροβλαστών και ώριμων σπόρων σε συχνότητες 70% και 60% αντίστοιχα.

Δέκτες

Για την πειραματική μόλυνση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ομάδες, Α, Β, μη μολυσμένων ψαριών (χιόνες) που χαρακτηρίζονται σαν “δέκτες”.

Ομάδα Α (Χιόνες, μέσου βάρους 50g)

Η πρώτη ομάδα ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες μυξοσποριδίασης αποτελούνταν από υγιείς χιόνες (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777) μέσου βάρους 50g. Τα ψάρια αυτά (n=1000) διατηρήθηκαν σε χερσαίες τσιμεντένιες δεξαμενές, χωρητικότητας 8m³, ανοιχτού κυκλώματος, σε υφάλμυρο νερό γεώτρησης, απαλλαγμένο από παθογόνους οργανισμούς και σταθερής θερμοκρασίας 21±1°C, από το βάρος των 2g (βάρος στο οποίο μεταφέρθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό), μέχρι το βάρος των 50g (χρονικό διάστημα 9 μηνών). Έτσι, τα ψάρια της ομάδας Α ήταν ψάρια τα οποία είχαν αναπτυχθεί αποκλειστικά (από το στάδιο της εκκόλαψης μέχρι το βάρος των 50g) σε νερό γεώτρησης. Στο διάστημα αυτό, τα ψάρια ταΐζονταν έξι φορές την εβδομάδα με τροφή υπό μορφή συμπύκτων (ειδική για χιόνα) ακολουθώντας πρόγραμμα διατροφής προτεινόμενο από εμπορική εταιρία

ιχθυοτροφών. Το βάρος των 50g ήταν το επιθυμητό για τα ψάρια δέκτες, αφενός γιατί έχει αποδειχθεί ότι τα ψάρια αυτού του μεγέθους είναι πιο ευπαθή και αφετέρου γιατί είναι το ελάχιστο μέγεθος στο οποίο είναι δυνατό να γίνει αιμοληψία στα ψάρια. Κατά το χρονικό διάστημα των εννέα μηνών που τα ψάρια διατηρήθηκαν σε νερό γεώτρησης, πραγματοποιούνταν εβδομαδιαία νεκροσκοπική, βακτηριολογική, παρασιτολογική και ιστολογική εξέταση.

Ομάδα Β (Χιόνες, μέσου βάρους 150g, που είχαν θεραπευτεί από *E. ictyi*, μετά από χορήγηση κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής)

Η δεύτερη ομάδα ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες μυξοσποριδίασης αποτελούνταν από υγιείς χιόνες μέσου βάρους 150g, τα οποία παλιότερα είχαν μολυνθεί με φυσική μόλυνση με το Μυξοσπορίδιο *E. ictyi*, σε ποσοστό προσβολής 100% και είχαν θεραπευτεί μετά από χορήγηση κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής. Τα ψάρια αυτά (n=1000) μολύνθηκαν όταν είχαν μέσο βάρος 15g πριν από 12 μήνες, θεραπεύτηκαν και επέζησαν. Η θεραπευτική αγωγή που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο συνδυασμός δύο φαρμάκων, σαλινομυκίνη (70mg/Kg σωματικού βάρους x 60 ημέρες) και αμπρόλιο (100mg/Kg σωματικού βάρους x 60 ημέρες) και η θεραπεία πραγματοποιήθηκε σε χερσαίες τσιμεντένιες δεξαμενές, χωρητικότητας 8m³, ανοιχτού κυκλώματος, σε υφάλμυρο νερό γεώτρησης, απαλλαγμένο από παθογόνους οργανισμούς και σταθερής θερμοκρασίας 21±1°C. Η θεραπεία με το συνδυασμό σαλινομυκίνη και αμπρόλιο διήρκεσε 60 ημέρες και μείωσε το αρχικό ποσοστό προσβολής κατά 60% και την αρχική θνησιμότητα σε 0%. Μετά από τη θεραπεία αυτή, τα ψάρια εξετάζονταν αρχικά κάθε εβδομάδα και κατόπιν κάθε μήνα και βρέθηκαν υγιή.

Μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας τα θεραπευμένα αυτά ψάρια αναπτύχθηκαν σε χερσαίες τσιμεντένιες δεξαμενές, χωρητικότητας 8m³, ανοιχτού κυκλώματος, σε υφάλμυρο νερό γεώτρησης, απαλλαγμένο από παθογόνους οργανισμούς και σταθερής θερμοκρασίας 21±1°C, για έντεκα μήνες από το βάρος

των 15g (βάρος μετά την θεραπεία) μέχρι το βάρος των 150g. Στο διάστημα αυτό τα ψάρια ταΐζονταν έξι φορές την εβδομάδα με τροφή με σύμπηκτα, κατάλληλα για χιόνα ακολουθώντας πρόγραμμα διατροφής προτεινόμενο από εμπορική εταιρία ιχθυοτροφών. Για το χρονικό διάστημα των έντεκα μηνών που τα ψάρια διατηρήθηκαν σε νερό γεώτρησης, πραγματοποιούνταν εβδομαδιαία αρχικά και κατόπιν μηνιαία νεκροσκοπική, βακτηριολογική, παρασιτολογική και ιστολογική εξέταση.

2.1.2.2 Τρόποι πειραματικής μόλυνσης

Οι πειραματικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με δύο τρόπους α) με συνύπαρξη και β) με στομαχικό καθετήρα

Με συνύπαρξη

Ο τρόπος αυτός πραγματοποιήθηκε με την συνύπαρξη δοτών και δεκτών στην ίδια πειραματική δεξαμενή. Στην περίπτωση αυτή, είναι απαραίτητο τα ψάρια δέκτες να διακρίνονται από τα ψάρια δότες είτε με σήμανση είτε με το να είναι χωρισμένα σε διαφορετικά σημεία της πειραματικής δεξαμενής, προς αποφυγή της ανάμειξής τους. Η αναλογία ανάμεσα στους δότες και στους δέκτες που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα είναι 1:3, δότες και δέκτες αντίστοιχα, βασισμένη σε βιβλιογραφικές αναφορές (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrot 1997, Redondo και συν. 2002). Σκοπός αυτού του τρόπου πειραματικής μόλυνσης είναι η εξάπλωση της παρασίτωσης μέσω του νερού, ή μέσω της κατάποσης των διαφόρων σταδίων του Μυξοσποριδίου που απελευθερώνονται με τα περιττώματα ή ακόμη και με ανιούσα μόλυνση. Ο τρόπος αυτός πειραματικής μόλυνσης είναι ίσως ο πιο αξιόπιστος γιατί μιμείται το φυσικό τρόπο μετάδοσης της παρασίτωσης, αφού στους κλωβούς εκτροφής η μετάδοση της παρασίτωσης γίνεται κυρίως μέσω του νερού, της

κατάποσης των περιπτώσεων και της κατανάλωσης των νεκρών μολυσμένων ψαριών.

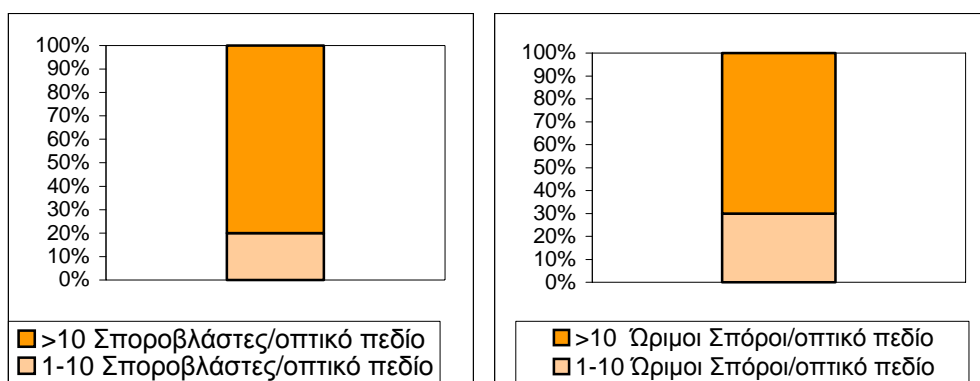
Με στομαχικό καθετήρα

Ο τρόπος αυτός πειραματικής μόλυνσης πραγματοποιήθηκε με την χορήγηση μολυσματικού υλικού από ψάρια μολυσμένα σε ψάρια υγιή κατευθείαν στον στόμαχο με την βοήθεια στομαχικού καθετήρα. Η ποσότητα του μείγματος που χορηγήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε έτσι ώστε, αφενός μεν να μπορεί να διατηρηθεί στο στόμαχο του ψαριού (0,2ml) και να μην αποβληθεί, αφετέρου δε να περιέχει σποροβλάστες και ώριμους σπόρους σε αυξημένη ένταση. Επίσης, το μήκος του στομαχικού καθετήρα μετρήθηκε και επιλέχθηκε πριν την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης μετά από νεκροψία.

Οι εντερικοί σωλήνες που αποτέλεσαν το μείγμα που χορηγήθηκε με καθετήρα στην συγκεκριμένη πειραματική μόλυνση προέρχονταν από τα ψάρια δότες (ομάδα Δ) εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό την ύπαρξη μολυσματικών σταδίων του παράσιτου τόσο σε ικανοποιητικό ποσοστό προσβολής όσο και σε αυξημένη ένταση. Συγκεκριμένα, 30 ψάρια από την ομάδα Δ θανατώθηκαν και αφαιρέθηκαν οι εντερικοί τους σωλήνες, οι οποίοι κατόπιν λειοτριβήθηκαν σε φυσιολογικό ορό και μετρήθηκε η συχνότητα των σποροβλαστών και ώριμων σπόρων. Υπολογίστηκαν 10 τυχαία οπτικά πεδία (μεγέθυνση x400) ανά παρασκευάσμα. Η ένταση της παρασίτωσης ταξινομήθηκε σε 2 επίπεδα: 1-10 (σποροβλάστες ή ώριμοι σπόροι) ανά οπτικό πεδίο και >10 (σποροβλάστες ή ώριμοι σπόροι) ανά οπτικό πεδίο. Είναι προφανής η υψηλή ένταση >10 ανά οπτικό πεδίο σποροβλαστών και ώριμων σπόρων σε συχνότητες 80% και 70% αντίστοιχα (Γράφημα 2.1.2).

Για τους χειρισμούς αυτούς χορηγήθηκε στα ψάρια αναισθητικό (βενζοκαΐνη), έτσι ώστε τα ψάρια να βρίσκονται σε μία κατάσταση ηρεμίας. Στο Γράφ. 2.1.2 φαίνεται η ένταση και η συχνότητα των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων σε

κάθε σταγόνα του μείγματος που χορηγήθηκε με στομαχικό καθετήρα στα υγιή ψάρια δέκτες.



Γράφημα 2.1.2 Οι μπάρες παρουσιάζουν τη συχνότητα των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων που παρατηρήθηκαν σε κάθε σταγόνα του μείγματος που χορηγήθηκε σε στομαχικό καθετήρα στα υγιή ψάρια δέκτες. Υπολογίστηκαν 10 τυχαία οπτικά πεδία (μεγέθυνση x400) ανά παρασκεύασμα. Η ένταση της παρασίτωσης ταξινομήθηκε σε 2 επίπεδα: 1-10 (σποροβλάστες ή ώριμοι σπόροι) ανά οπτικό πεδίο και >10 (σποροβλάστες ή ώριμοι σπόροι) ανά οπτικό πεδίο. Είναι προφανής η υψηλή ένταση >10 ανά οπτικό πεδίο σποροβλαστών και ώριμων σπόρων σε συχνότητες 80% και 70% αντίστοιχα.

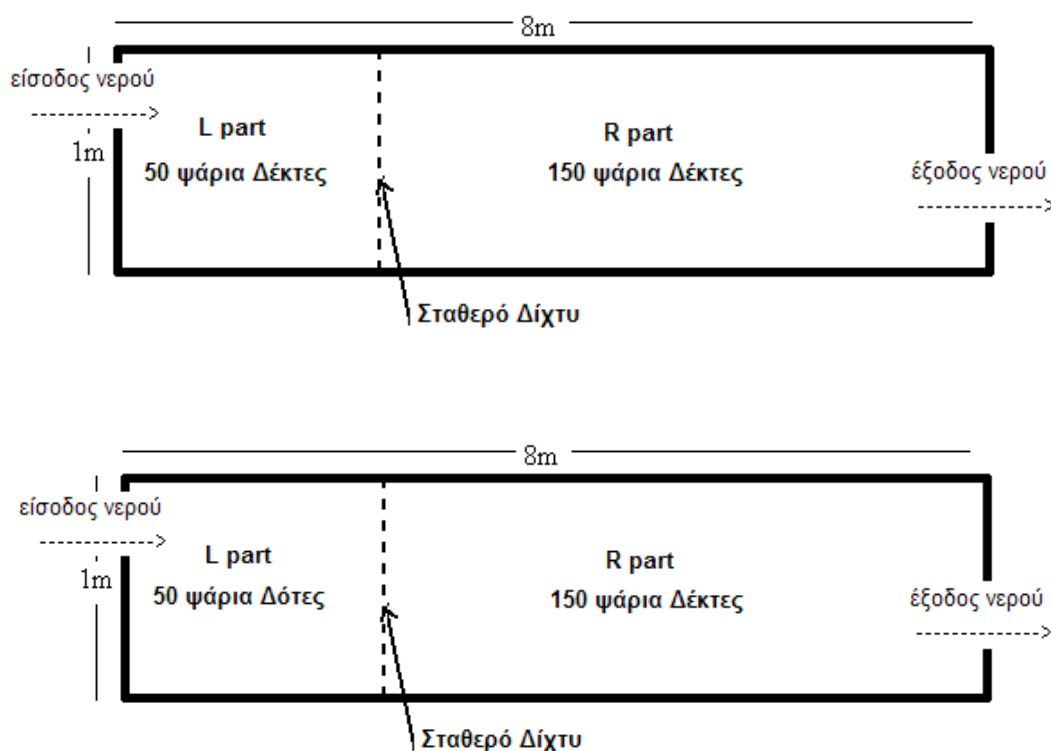
2.1.2.3 Πειραματικές δεξαμενές

Πειραματικές δεξαμενές συνύπαρξης

Η πειραματική μόλυνση και των δύο ομάδων ψαριών δεκτών (Ομάδες Α, Β), πραγματοποιήθηκε σε χερσαίες τσιμεντένιες δεξαμενές, χωρητικότητας 8m³, ανοιχτού κυκλώματος, σε υφάλμυρο νερό γεώτρησης, απαλλαγμένο από παθογόνους οργανισμούς και σταθερής θερμοκρασίας 21±1°C. Στις πειραματικές μολύνσεις με συνύπαρξη, κάθε δεξαμενή χωρίστηκε σε δύο μέρη (ένα για κάθε ομάδα ψαριών-δεκτών και ένα για τα ψάρια-δότες) με ένα σταθερό δίχτυ, με κατάλληλο άνοιγμα ματιού εξασφαλίζοντας την κυκλοφορία του νερού και στα δύο μέρη των δεξαμενών, έτσι ώστε τα ψάρια-δέκτες να είναι εκτεθειμένα στο μολυσμένο με το Μυξοσπορίδιο νερό, χωρίς όμως να έρχονται σε επαφή με τα ψάρια-δότες.

Πειραματική δεξαμενή Σ-Α

Στην πειραματική αυτή δεξαμενή, 50 ψάρια δότες της ομάδας Δ (χιόνες, μέσου βάρους 60g) τοποθετήθηκαν στο αριστερό μέρος της δεξαμενής (μέρος L) και εγκλιματίστηκαν για τρεις ημέρες, πριν την τοποθέτηση των ψαριών δέκτων. 150 ψάρια δέκτες της ομάδας Α (χιόνες, μέσου βάρους 50g) τοποθετήθηκαν στο δεξιό μέρος της δεξαμενής (μέρος R) (Εικ. 2.1.2).



Εικ. 2.1.2 Κάτοψη πειραματικών δεξαμενών και δεξαμενών μαρτύρων. Οι τσιμενένιες δεξαμενές είναι χωρητικότητας 8 τον. και ανοιχτού κυκλώματος, με συνεχή παροχή ($4\text{m}^3/\text{ώρα}$) νερού γεώτρησης απαλλαγμένο από παθογόνους οργανισμούς. Το βάθος της δεξαμενής είναι 1m. Το σταθερό δίχτυ χωρίζει την κάθε δεξαμενή σε δύο μέρη εξασφαλίζοντας την κυκλοφορία του μολυσμένου νερού αλλά και την αποφυγή επαφής των ψαριών μεταξύ τους (δότες με δέκτες).

Πειραματική δεξαμενή Σ-B

Στην πειραματική αυτή δεξαμενή, 50 ψάρια δότες της ομάδας Δ (χιόνες, μέσου βάρους 60g) τοποθετήθηκαν στο αριστερό μέρος της δεξαμενής (μέρος L) και εγκλιματίστηκαν για μία ημέρα, πριν την τοποθέτηση των ψαριών δεκτών. 150 ψάρια δέκτες της ομάδας Β (χιόνες, μέσου βάρους 150g) τοποθετήθηκαν στο δεξί μέρος της δεξαμενής (Μέρος R) (Εικ. 2.1.2).

Δεξαμενή μαρτύρων Μ-Σ-A

Για την πειραματική δεξαμενή της συνύπαρξης Σ-A δημιουργήθηκε μία δεξαμενή με ψάρια μάρτυρες (χιόνες, μέσου βάρους 50g). Στη δεξαμενή αυτή και στη θέση των 50 ψαριών δοτών στο αριστερό μέρος της δεξαμενής τοποθετήθηκαν 50 ψάρια υγιή. Δημιουργήθηκε δηλαδή μία πειραματική δεξαμενή με 200 ψάρια-δέκτες της ομάδας Α (χιόνες, μέσου βάρους 50g) (Εικ. 2.1.2).

Δεξαμενή μαρτύρων Μ-Σ-B

Για την πειραματική δεξαμενή της συνύπαρξης Σ-B δημιουργήθηκε μία δεξαμενή με ψάρια μάρτυρες (χιόνες, μέσου βάρους 150g). Στη δεξαμενή αυτή και στην θέση των 50 ψαριών δοτών στο αριστερό μέρος της δεξαμενής τοποθετήθηκαν 50 ψάρια υγιή. Δημιουργήθηκε δηλαδή μία πειραματική δεξαμενή με 200 ψάρια-δέκτες της ομάδας Β (χιόνες, μέσου βάρους 150g) (Εικ. 2.1.2).

Πειραματικές δεξαμενές χορήγησης του μολυσματικού υλικού με στομαχικό καθετήρα

Πειραματική δεξαμενή νο-A

Στην πειραματική αυτή δεξαμενή, 200 ψάρια δέκτες της ομάδας Α (χιόνες, μέσου βάρους 50g) τοποθετήθηκαν και εγκλιματίστηκαν για τρεις ημέρες, πριν την χορήγηση του μολυσματικού υλικού με στομαχικό καθετήρα. 0,2ml από το διάλυμα

μολυσμένων εντερικών σωλήνων και φυσιολογικού ορού χορηγήθηκε με στομαχικό καθετήρα σε ψάρια αναισθητοποιημένα με βενζοκαΐνη. Η αναισθητοποίηση των ψαριών έγινε σε νερό ίδιο με το νερό των συνθηκών της πειραματικής μόλυνσης.

Δεξαμενή μαρτύρων M-vo-A

Για την πειραματική δεξαμενή vo-A, της πειραματικής μόλυνσης μέσω του στόματος δημιουργήθηκε μία δεξαμενή με ψάρια μάρτυρες (χιόνες, μέσου βάρους 50g). Στην πειραματική αυτή δεξαμενή, 200 ψάρια δέκτες της ομάδας A (χιόνες, μέσου βάρους 50g) τοποθετήθηκαν και εγκλιματίστηκαν για τρεις ημέρες. Στις χιόνες χορηγήθηκαν μόνο 0,2ml φυσιολογικού ορού με στομαχικό καθετήρα, αφού προηγουμένως αναισθητοποιήθηκαν με αναισθητικό. Η αναισθητοποίηση των ψαριών έγινε σε νερό ίδιο με το νερό των συνθηκών της πειραματικής μόλυνσης.

2.1.2.4 Εξετάσεις πριν την έναρξη των πειραματισμών

Πριν την έναρξη του πειράματος, έγινε δειγματοληψία 10 ψαριών από κάθε πειραματική δεξαμενή και από κάθε δεξαμενή μαρτύρων. Σε κάθε ψάρι έγινε νεκροσκοπική, βακτηριολογική, παρασιτολογική και ιστολογική εξέταση. Υλικό από νεφρό και σπλήνα ενοφθαλμίστηκε σε Tryptone Soy Agar (TSA) και Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) για βακτηριολογική εξέταση με μεθόδους που έχουν περιγραφεί από τους Roberts & Shepherd (1997). Επίσης, πραγματοποιήθηκε παρασιτολογική εξέταση με μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων όλων των οργάνων (βραγχίων, δέρματος, εγκεφάλου, πεπτικού σωλήνα, νεφρού, καρδιάς, χοληδόχου κύστης, ήπατος και σπλήνα, με μεθόδους που έχει περιγράψει ο Roberts (1989). Οι εξετάσεις απέβησαν αρνητικές, γεγονός που εξασφαλίζει τη μη ύπαρξη παθογόνων πριν την έναρξη των πειραματικών μολύνσεων και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων όσον αφορά την εξειδικευμένη επιδιωκόμενη παρασιτική μόλυνση στις ελεγχόμενες συνθήκες του πειράματος.

2.1.2.5 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν την 5^η, 12^η, 19^η, 26^η, 40^η και 55^η ημέρα από την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης. Σε κάθε δειγματοληψία 10 ψάρια λαμβάνονταν από κάθε πειραματική δεξαμενή (Δεξαμενές Σ-A, Σ-B, Δεξαμενή νο-A) και από κάθε δεξαμενή μαρτύρων (Δεξαμενές μαρτύρων Μ-Σ-A, Μ-Σ-B, Μ-νο-A).

Οι θάνατοι και η παρουσία κλινικών συμπτωμάτων καταγράφονταν καθημερινά κατά τη διάρκεια του πειράματος στα ψάρια δέκτες και στους μάρτυρες. Τα ψάρια δέκτες και τα ψάρια μάρτυρες θανατώνονταν με υπερδοσολογία αναισθητικού.

Σε κάθε δειγματοληψία, σε όλες τις πειραματικές δεξαμενές και τις δεξαμενές των μαρτύρων γινόταν νεκροσκοπική εξέταση σε όλα τα ψάρια του δείγματος (15 ψάρια), παρασιτολογική εξέταση σε 10 ψάρια και ιστολογικές εξετάσεις σε 5 ψάρια. Στα ψάρια της πειραματικής μόλυνσης με συνύπαρξη, (δεξαμενές Σ-A και Σ-B), πραγματοποιήθηκε επιπλέον αιμοληψία από 5 ψάρια προκειμένου να γίνει μέτρηση παραμέτρων μη ειδικής ανοσίας στον ορό του αίματος, ο οποίος διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την επεξεργασία του. Το ίδιο έγινε και στις αντίστοιχες δεξαμενές μάρτυρες Μ-Σ-A και Μ-Σ-B.

2.1.2.6 Συνθήκες εκτροφής κατά την διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών μολύνσεων, οι συνθήκες εκτροφής ήταν ίδιες με τις μέχρι τότε συνθήκες ανάπτυξης και συνοψίζονται στον Πίν. 2.1.3. Η ανανέωση του νερού ήταν 4m³ ανά ώρα.

Πίνακας 2.1.3 Συνθήκες εκτροφής κατά τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης

Θερμοκρασία	21±1°C
Αλατότητα	35‰
Παροχή νερού	4m ³ ανά ώρα
Οξυγόνο	9 ppm
pH	8
Φωτοπερίοδος	Φυσική

Όλα τα ψάρια ταΐζονταν έξι φορές την εβδομάδα με σύμπηκτα κατάλληλα για χιόνα, σύμφωνα με πρόγραμμα διατροφής προτεινόμενο από εμπορική εταιρία ιχθυοτροφών. Οι δεξαμενές καθαρίζονταν, όταν κρίνονταν απαραίτητο.

2.1.3 Εφαρμογή πειραματικών θεραπειών κατά την παρασίτωση με *E. leei* σε χιόνα.

2.1.3.1 Πειραματικά ψάρια

Οι χιόνες που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα, είχαν μέσο βάρος 15g και προήλθαν από κλωβό μονάδας παραγωγής στην βορειοδυτική Ελλάδα, όπου διαγνώστηκε μόλυνση με *E. leei* συνοδευόμενη από έντονα κλινικά συμπτώματα (έντονη εντερίτιδα, ανορεξία, απίσχναση, αποχρωματισμός και απώλεια λεπιών στην περιοχή του ραχιαίου πτερυγίου) και από υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Τα ψάρια αυτά ήταν φυσικά μολυσμένα με το Μυξοσπορίδιο *E. leei*, σε ποσοστό προσβολής 100%, το οποίο επιβεβαιώθηκε μετά από παρασιτολογική

εξέταση (n=100) με την παρουσία τροφοζωιτών, σποροβλαστών και ώριμων σπόρων του παράσιτου σε νωπά παρασκευάσματα του εντερικού επιθηλίου.

2.1.3.2 Πειραματικές δεξαμενές

3000 μολυσμένες χιόνες βάρους 15g μεταφέρθηκαν από εμπορική μονάδα σε τρεις δεξαμενές συνολικά. Δημιουργήθηκαν δύο πειραματικές δεξαμενές για τις δύο θεραπευτικές αγωγές (δεξαμενές Θ-A και Θ-B) και μία τρίτη δεξαμενή (Θ-K), στην οποία τοποθετήθηκαν τα ψάρια μάρτυρες και δεν εφαρμόστηκε καμία θεραπευτική αγωγή.

Πειραματική δεξαμενή Θ-A

Στη δεξαμενή αυτή τοποθετήθηκαν 1000 ψάρια M.B. 15g φυσικά μολυσμένα με το Μυξοσπορίδιο σε ποσοστό προσβολής 100% *E. izei*. Στη δεξαμενή αυτή χορηγήθηκε ο συνδυασμός σαλινιμυκίνης και αμπρόλιου (SA) ενσωματωμένος στην τροφή με μωρουνέλαιο.

Πειραματική δεξαμενή Θ-B

Στη δεξαμενή αυτή τοποθετήθηκαν 1000 ψάρια M.B. 15g φυσικά μολυσμένα με το Μυξοσπορίδιο σε ποσοστό προσβολής 100% *E. izei*. Στη δεξαμενή αυτή χορηγήθηκε το φάρμακο φουματζιλίνη (F) ενσωματωμένο στην τροφή με μωρουνέλαιο.

Πειραματική δεξαμενή Θ-K

Στη δεξαμενή αυτή τοποθετήθηκαν 1000 ψάρια M.B. 15g φυσικά μολυσμένα με το Μυξοσπορίδιο σε ποσοστό προσβολής 100% *E. izei*. Στη δεξαμενή αυτή χορηγήθηκε τροφή με μωρουνέλαιο χωρίς ενσωματωμένο φάρμακο.

Κάθε πειραματική δεξαμενή ήταν χωρητικότητας 8m³, τσιμενένια, ανοιχτού κυκλώματος με υφάλμυρο νερό γεώτρησης, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς, σε θερμοκρασία 21±1°C, αλατότητα 30‰ και pH 7.

2.1.3.3 Θεραπευτικές αγωγές

Δύο διαφορετικές θεραπευτικές αγωγές χρησιμοποιήθηκαν ως εξής: α) αμπρόλιο και σαλινομυκίνη (AS), σε δόσεις 70 και 100mg/Kg της βιομάζας αντίστοιχα φάρμακα χρησιμοποιούμενα για τη θεραπεία σπορόμορφων παρασίτων σε άλλα είδη (κυρίως στην πτηνοτροφία) και β) φουματζιλίνη, (F), σε δόση 6mg/Kg βιομάζας. Και τα δύο φάρμακα χορηγήθηκαν για 55 ημέρες. Τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν φάρμακα που κυκλοφορούν στο εμπόριο και τα αναλυτικά στοιχεία τους φαίνονται στον Πίν. 2.1.4. Τα φάρμακα ενσωματώθηκαν σε εμπορικά σύμπηκτα με τη χρησιμοποίηση μωρουνέλαιου ως μέσου ενσωμάτωσης και με την βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα. Η ομάδα των ψαριών στα οποία δεν εφαρμόστηκε θεραπεία ταΐζονταν ακριβώς με την ίδια τροφή με χρησιμοποίηση μωρουνέλαιου, όπου όμως δεν είχε χορηγηθεί φαρμακευτική ουσία. Σε όλες τις πειραματικές δεξαμενές η τροφή που χορηγούνταν παρασκευαζόταν αυθημερόν και τα ψάρια ταΐζονταν με το χέρι, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η λήψη όλης της απαραίτητης δόσης.

Πίνακας 2.1.4 Στοιχεία φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν				
Δραστική ουσία	Συντόμευση	Εμπορική σύνθεση	Εμπορική ονομασία	Εταιρία
Φουματζιλίνη (Fumagillin dicyclohexylamine)	F	Στοματικό διάλυμα (20mg/g)	Fumidil®	CEVA
Σαλινομυκίνη (Salinomycine sodium)	S	Medicated premix (12%)	Salinomycin	Haechst
Αμπρόλιο (Amprolium)	A	Medicated premix (50%)	Amprolium	Veterin

2.1.3.4 Εξέταση των ψαριών πριν την έναρξη των δειγματοληψιών

Τα ψάρια εγκλιματίστηκαν για 7-10 ημέρες πριν τη μεταφορά στις πειραματικές δεξαμενές. Πριν την έναρξη του πειράματος, έγινε δειγματοληψία 30 ψαριών (10 από κάθε μία από τις δύο πειραματικές δεξαμενές θεραπειών και 10 από την δεξαμενή με τα ψάρια μάρτυρες) μετά από αναισθησία, προκειμένου να γίνουν βακτηριολογικές και παρασιτολογικές εξετάσεις. Δείγματα νεφρού και σπλήνα ενοφθαλμίστηκαν σε Tryptone Soy Agar (TSA) και Thiosulphate Citrate Bile Salt Agar (TCBS) για βακτηριολογική εξέταση σύμφωνα με μεθόδους που έχουν περιγραφεί από τους Roberts & Shepherd (1997). Νωπά παρασκευάσματα από ξέσματα και επιχρίσματα εσωτερικών οργάνων (εντερικού σωλήνα, χοληδόχου κύστης, νεφρού, ήπατος, σπλήνας και καρδιάς) και βραγχίων, εξετάστηκαν σε ψάρια που θανατώθηκαν εκείνη τη στιγμή σύμφωνα με μεθόδους που έχουν περιγραφεί από τους Roberts & Shepherd (1997), εξασφαλίζοντας ότι το ποσοστό προσβολής είχε διατηρηθεί στο 100% ακριβώς πριν την έναρξη του πειράματος.

2.1.3.5 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών

Οχτώ εβδομαδιαίες δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε κάθε πειραματική δεξαμενή. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν 10 υπό θεραπεία ψάρια από κάθε μία από τις πειραματικές δεξαμενές των θεραπειών (δεξαμενές Θ-A και Θ-B) και 10 ψάρια μάρτυρες (δεξαμενή Θ-K) στα οποία γινόταν νεκροσκοπική εξέταση σε όλα τα ψάρια του δείγματος (15 ψάρια), παρασιτολογική εξέταση σε 10 ψάρια και ιστολογικές εξετάσεις σε 5 ψάρια. Κατά τη διάρκεια του πειράματος οι θνησιμότητες και η παρουσία κλινικών συμπτωμάτων καταγράφονταν καθημερινά όπως καταγραφόταν το βάρος των ψαριών. Τα ψάρια θανατώνονταν με υπερβολική δόση αναισθητικού.

2.1.3.6 Συνθήκες εκτροφής κατά τη διάρκεια των πειραματικών θεραπειών

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών μολύνσεων, οι συνθήκες εκτροφής ήταν ίδιες με τις μέχρι τότε συνθήκες ανάπτυξης και συνοψίζονται στον Πίν. 2.1.5. Η ανανέωση του νερού ήταν 4m³ ανά ώρα.

Πίνακας 2.1.5. Συνθήκες εκτροφής κατά τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης	
Θερμοκρασία	21±1°C
Αλατότητα	35‰
Παροχή νερού	4m ³ ανά ώρα
Οξυγόνο	9 ppm
pH	8
Φωτοπερίοδος	Φυσική

Όλα τα ψάρια ταΐζονταν έξι φορές την εβδομάδα με σύμπηκτα κατάλληλα για χιόνια, σύμφωνα με πρόγραμμα διατροφής προτεινόμενο από εμπορική εταιρία ιχθυτροφών. Οι δεξαμενές καθαρίζονταν, όταν κρίνονταν απαραίτητο.

2.2 Ανίχνευση παρασίτων

2.2.1 Μακροσκοπική και νεκροσκοπική εξέταση

Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, αρχικά εξετάστηκαν μακροσκοπικά για την εκτίμηση της εξωτερικής τους εικόνας. Επίσης, πριν τη λήψη των νωπών παρασκευασμάτων για παρασιτολογική εξέταση, έγινε

παρατήρηση και εξέταση της γενική εικόνας των βραγχίων, της στοματικής κοιλότητας και όλων των εσωτερικών οργάνων.

2.2.2 Παρασιτολογική εξέταση

Η παρασιτολογική εξέταση των ψαριών έγινε με μεθόδους που έχουν περιγράψει οι Athanassopoulou (1990) και Roberts (1989) και περιλάμβανε τα εξής στάδια:

A. Εξέταση νωπών παρασκευασμάτων

Βράγχια, δέρμα και εσωτερικά όργανα εξετάστηκαν για Μυξοσπορίδια. Τα εσωτερικά όργανα τα οποία εξετάστηκαν ήταν: ο εντερικός σωλήνας, η χοληδόχος κύστη, το ήπαρ, ο σπλήνας, η καρδιά, οι γονάδες, ο εγκέφαλος και ο νεφρός. Τα ψάρια εξετάστηκαν τόσο για Μυξοσπορίδια όσο και για άλλα παράσιτα.

Βράγχια: Οι πρώτες δεξιές και αριστερές βραγχιακές ασίδες απομακρύνονταν από το σώμα κάθε ψαριού και ξέσματα και των δύο επιφανειών των δύο βραγχιακών ασίδων λαμβάνονταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες είχε ήδη τοποθετηθεί μία σταγόνα φυσιολογικού ορού, και καλύπτονταν με καλυπτρίδα.

Δέρμα: Στη βάση του ραχιαίου και των πλευρικών πτερυγίων απομακρύνονταν τα λέπια προσεκτικά και ξέσματα δέρματος λαμβάνονταν και τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες είχε ήδη τοποθετηθεί μία σταγόνα φυσιολογικού ορού, για παρατήρηση.

Εντερικός σωλήνας: Απομακρυνόταν όλος ο εντερικός σωλήνας από το στόμαχο μέχρι και το απευθυσμένο. Ο εντερικός σωλήνας χωριζόταν σε δύο ίσα μέρη. Ξέσματα του επιθηλίου του στομάχου, του πρόσθιου και του τελευταίου μισού τμήματος του εντερικού σωλήνα λαμβάνονταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες είχε ήδη τοποθετηθεί μία σταγόνα φυσιολογικού ορού, και καλύπτονταν με καλυπτρίδα για μικροσκοπική παρατήρηση.

Χοληδόχος κύστη: Η χοληδόχος κύστη απομακρυνόταν προσεκτικά, έτσι ώστε να μην σπάσει, και 3-4 σταγόνες τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες και καλύπτονταν με καλυπτρίδα. Ξέσματα επίσης από το βλεννογόνο εξετάζονταν για μικροσκοπική παρατήρηση.

Νεφρός: Τεμάχια από τον οπίσθιο νεφρό απομακρύνονταν και λυοτριβούνταν σε αντικειμενοφόρες πλάκες, και αφού το επίχρισμα καλύπτονταν με καλυπτρίδα, ακολουθούσε η μικροσκοπική τους εξέταση.

B. Εξέταση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων

Για την καλύτερη παρατήρηση των μυξοσποριδίων εφαρμόστηκε χρώση Giemsa (για επιχρίσματα) η οποία περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

1. Στέγνωμα στου επιχρίσματος
2. 2 min μεθανόλη
3. Διάλυμα Giemsa (1 μέρος Giemsa σε 9 μέρη διαλύματος φωσφορικών αλάτων (pH 6,8) για 20-25´.
4. 4 sec μεθανόλη
5. Διαφοροποίηση σε απεσταγμένο νερό για 2-5´

6. 4 sec μεθανόλη
7. 1-2 min 70% αλκοόλη
8. 1-2 min απόλυτη αλκοόλη
9. 1-2 min απόλυτη αλκοόλη
10. 2 min ξυλόλη
11. Προσθήκη καλυπτρίδας με Entellan

Διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH 6.8)

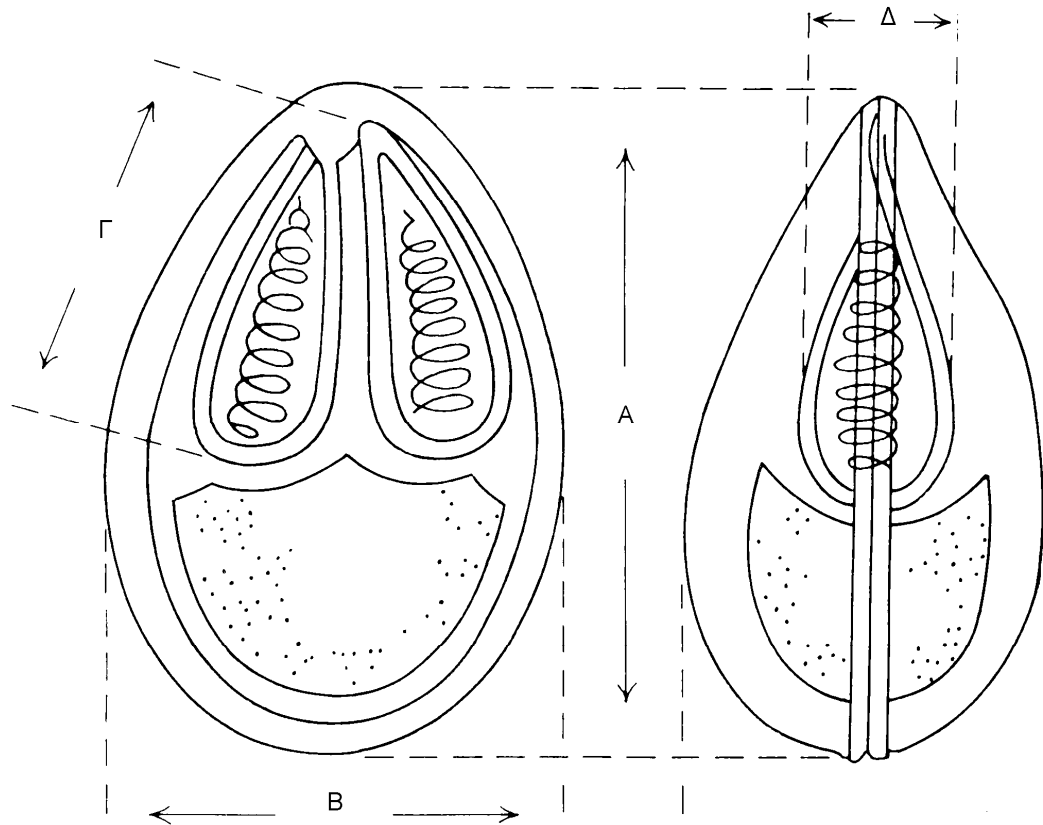
0,68g disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4 (anhydrous)

0,32g potassium dihydrogen phosphate KH_2PO_4

1000ml απεσταγμένο νερό

Γ. Ταυτοποίηση παρασίτων

Η ταυτοποίηση των παρασίτων έγινε αμέσως μετά την ανεύρεσή τους, μετά την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων και σε συνδυασμό με τα μονιμοποιηθέντα παρασκευάσματα με βάση τις κλείδες (Yamagouti 1963, Athanassoroulou 1990). Η μέτρηση των παρασίτων πραγματοποιήθηκε με μεθόδους που έχουν περιγράψει οι Lom & Arthur (1980), όπως φαίνεται στην Εικ. 2.1.3. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε το μήκος ως η απόσταση ανάμεσα στο κορυφαίο και το κατώτερο σημείο του σπόρου (Α), το φάρδος (Β) ως η μεγαλύτερη απόσταση ανάμεσα στα όρια των ραφών, το μήκος (Γ) και το φάρδος (Δ) των πολικών καψών.



Εικ. 2.1.3 Μέθοδος μέτρησης διαστάσεων σπόρων

Δ. Υπολογισμός ποσοστού προσβολής (*prevalence*)

Ο υπολογισμός του ποσοστού προσβολής είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος περιγραφής παρασιτικών μολύνσεων, κυρίως γιατί απαιτεί μόνο ανίχνευση της παρουσίας των παρασίτων και όχι καταμέτρησή τους (Bush, Lafferty, Lotz & Shostak 1997). Το ποσοστό προσβολής εκφράστηκε με ποσοστό % και υπολογίστηκε από τον αριθμό των ξενιστών που ήταν μολυσμένοι από κάποιο παράσιτο προς τον αριθμό όλων των ξενιστών που εξετάστηκαν για το παράσιτο αυτό. Σε κάθε δείγμα ψαριού παρατηρήθηκαν δέκα τυχαία οπτικά πεδία.

E. Υπολογισμός έντασης (intensity)

Η ένταση της παρασίτωσης παρατηρήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί η αύξηση του αριθμού των παρασίτων και όχι μόνο η ανίχνευσή τους, όπως έγινε με το ποσοστό προσβολής (Bush και συν. 1997). Ο υπολογισμός της έγινε από την καταμέτρηση των παρασίτων σε κάθε δείγμα ψαριού ξεχωριστά. Στη συγκεκριμένη εργασία η ένταση της παρασίτωσης ορίστηκε σε τέσσερα επίπεδα και κάθε δείγμα ψαριού το οποίο εξετάστηκε κατατάχθηκε σε ένα από τα επίπεδα αυτά. Τα επίπεδα έντασης τα οποία ορίστηκαν φαίνονται στον Πίν. 2.1.6.

Πίνακας 2.1.6 Επίπεδα έντασης της παρασίτωσης	
Επίπεδο 1	1-5 Μυξοσπορίδια ανά οπτικό πεδίο
Επίπεδο 2	6-10 Μυξοσπορίδια ανά οπτικό πεδίο
Επίπεδο 3	11-15 Μυξοσπορίδια ανά οπτικό πεδίο
Επίπεδο 4	>15 Μυξοσπορίδια ανά οπτικό πεδίο

2.2.3 Ιστοπαθολογική εξέταση

Ιστοί από όλα τα εσωτερικά όργανα, το κεφάλι και τους μυς των πειραματικών ψαριών μονιμοποιήθηκαν με 10% ουδέτερη φορμόλη (Roberts 1987). Μετά από γρήγορη απασβεστοποίηση παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές οι οποίες, χρωματίστηκαν με Haematoxylin-eosin, σύμφωνα με γνωστή μεθοδολογία (Drury & Wallington 1980). Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου κρίθηκε απαραίτητο σε ιστολογικές τομές νεφρού πραγματοποιήθηκαν και οι χρώσεις Giemsa, Ziehl-Nielsen, Gram και Von Kossa (Drury & Wallington 1980).

Haematoxylin-eosin

1. Ξυλόλη για 5 min.
2. Ξυλόλη για 5 min.
3. Απόλυτη αλκοόλη για 5 min.
4. Απόλυτη αλκοόλη για 5 min.
5. Αλκοόλη 96° για 1 min.
6. Αλκοόλη 96° για 1 min.
7. Αλκοόλη 70° για 1 min.
8. Νερό για 1 min.
9. Αιματοξυλίνη για 12 min.
10. Νερό (τρεχούμενο) για 5 min.
11. Όξινη αλκοόλη 1% για 1-2 εμβαπτίσεις.
12. Νερό (τρεχούμενο) για 5 min.
13. Εωσίνη για 10 min.
14. Ξέπλυμα με νερό βρύσης.
15. Αλκοόλη 70° για 1 εμβαπτίση.
16. Αλκοόλη 96° για 1 εμβαπτίση.
17. Αλκοόλη 96° για 2 εμβαπτίσεις.
18. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
19. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
20. Ξυλόλη για 2 min.
21. Ξυλόλη για 5 min.

Χρώση Giemsa

1. Ξυλόλη για 5 min.
2. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
3. Μεθανόλη για 1 min.
4. Ξέπλυμα

5. Giemsa (1:10) για 20 min.
6. Απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής.
7. Μεθανόλη για 30 min.
8. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
9. Απόλυτη αλκοόλη για 1 min.
10. Ξυλόλη για 5 min.

Χρώση Ziehl-Nielsen

1. Ξυλόλη για 5 min
2. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
3. Μεθανόλη για 1 min.
4. Νερό
5. Χρώση με Φουξίνη για 30 min σε κλίβανο στους 60°C.
6. Ξέπλυμα με tap water.
7. Διαφοροποίηση με όξινη αλκοόλη για 2 min.
8. Νερό
9. Χρώση με Μπλε του μεθυλενίου για 1 min.
10. Νερό
11. Απόλυτη αλκοόλη για 2 min.
12. Απόλυτη αλκοόλη για 1 min.
13. Ξυλόλη για 5 min.
14. Τοποθέτηση καλυπτρίδας και μονιμοποίηση με Entelan

Φουξίνη

- 1g βασική φουξίνη
- 10ml απόλυτη αλκοόλη

- 100ml υδατικό διάλυμα φαινόλης 5%. Ζεσταίνουμε σε υδατόλουτρο μέχρι να γίνει διαυγές διάλυμα. Διηθούμε πριν τη χρώση και πριν χρησιμοποιηθεί ζεσταίνεται στον κλίβανο στους 56°C.

Μπλε του μεθυλενίου

- Μπλε του μεθυλενίου 1g
- Glacial acetic acid 1cm³
- Απόλυτη αλκοόλη 20cm³
- Απεσταγμένο νερό 80cm³

Όξινη αλκοόλη 1%

- 99ml αλκοόλη 96%
- 1ml διάλυμα HCl 37%

Tap water

- 1000ml νερό
- 3,5g sodium bicarbonate
- 20g magnesium sulphate

Χρώση Gram

1. Τοποθετούμε τις τομές στο νερό.
2. Χρώση με Crystal-violet για 2-3 min.
3. Ξέπλυμα της τομής με Gram's iodine και χρώση με Gram's iodine για 2-3 min.
4. Αποχρωματισμός της τομής σε απόλυτη αλκοόλη ή ακετόνη.
5. Χρώση σε υδατικό διάλυμα 1% με neutral red για 2-3 min.
6. Ξέπλυμα σε νερό.
7. Στέγνωμα και αφυδάτωση σε aniline-xylene.
8. Ξυλόλη, τοποθέτηση καλυπτρίδας και μονιμοποίηση με Entelan

Διάλυμα Crystal-violet

- 2g Crystal-violet
- 20ml αλκόολη 95%
- 0,8g Ammonium oxalate
- 80ml απεσταγμένο νερό

Gram's iodine

- 1g Iodine crystals
- 2g Potassium iodine
- 300ml απεσταγμένο νερό

Aniline-xylene

- 2 μέρη Aniline
- 1 μέρος ξυλόλη

Χρώση Von Kossa

1. Ξυλόλη για 5 min
2. Απόλυτη αλκόολη για 2 min.
3. Μεθανόλη για 1 min.
4. Ξέπλυμα των τομών πολλές φορές με απεσταγμένο νερό.
5. Silver nitrate 2% για 40 min (στο σκοτάδι).
4. Ξέπλυμα πολλές φορές με απεσταγμένο νερό.
5. Treat me 2,5% sodium thiosulphate ('hypo') για 5 min.
6. Ξέπλυμα με tap water.
7. Neutral red nuclear stain για 30 min.
8. Μεθανόλη για 2 min.
9. Απόλυτη αλκόολη για 2 min.
10. Απόλυτη αλκόολη για 1 min.
11. Ξυλόλη για 5 min
12. Τοποθέτηση καλυπτρίδας και μονιμοποίηση με Entelan

2.3 Προσδιορισμός ανοσολογικών παραγόντων

2.3.1 Αιμοληψία

Στα ψάρια έγινε αιμοληψία προκειμένου να μελετηθεί η χυμική ανοσολογική αντίδραση. Η αιμοληψία έγινε από την ουραία φλέβα, μετά από αναισθητοποίηση με φαινοξυαιθανόλη 0,2ml/lit. Οι σύριγγες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των 2,5ml. Σε κάθε αιμοληψία λαμβάνονταν 2ml αίμα από κάθε ψάρι μέσου βάρους 50g και 2ml αίμα από κάθε ψάρι μέσου βάρους 150g. Στα δείγματα αίματος γινόταν φυγοκέντρηση στα 1300g για 10' και ο ορός κάθε δείγματος καταψύχονταν στους -80°C μέχρι την χρησιμοποίησή του για την μέτρηση λυσοζύμης και NO.

2.3.2 Προσδιορισμός Λυσοζύμης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λυσοζύμης έγινε με μία τροποποιημένη μέθοδο βασισμένη στη λύση του ευαίσθητου στη λυσοζύμη Gram⁺ βακτηρίου *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) (Lie και συν. 1989). Σε συγκεκριμένες θέσεις δισκίων μικροτιλοδότησης τοποθετήθηκαν 100 μl λυοφιλοποιημένων βακτηρίων συγκέντρωσης 0,2 mg/ml σε υδατικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,05 M, pH 6,2, και επώασθηκαν με 100 μl διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων των ορών που είχαν συλλεχθεί κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η μείωση στην απορρόφηση στα 450 nm μετρήθηκε στα 5 και 15 λεπτά στους 25° C. Ως μία μονάδα της δράσης της λυσοζύμης καθορίστηκε η μείωση της απορρόφησης κατά 0,001/min. Η ποσοτικοποίηση της δράσης της λυσοζύμης στον ορό καθορίστηκε από μία πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από συγκεκριμένες συγκεντρώσεις καθαρής λυσοζύμης αυγού (Sigma).

2.3.3 Προσδιορισμός NO

Η ανίχνευση της συγκέντρωσης των νιτρικών υπολογίστηκε από την Griess αντίδραση (Green, Wagner, Glogowski, Skipper, Wishnok & Tannenbaum 1982). 100μl από κάθε πλάσμα και 50 μl από 1% sulfanilamide (Sigma) και 0,1% N-naphthylethylene-diamine dihydrochloride (Sigma) σε 1,25% H₃PO₄ τοποθετήθηκαν σε δισκία μικροπιλοδότησης 96 φρεατίων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτάδι. Η οπτική πυκνότητα υπολογίστηκε από ELISA reader (Dynatech MRX, West Sussex, England) στα 550 nm. Η μοριακή συγκέντρωση των νιτρικών στον ορό υπολογίστηκε από τις πρότυπες καμπύλες που προκύπτουν από γνωστές συγκεντρώσεις NaNO₂ (Sigma).

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Windows ver. 12.0) και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για $P < 0,05$.

Ανάλυση της διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA) ή μη-παραμετρικά κριτήρια (non parametric test, NPT) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των στατιστικά σημαντικών διαφορών των επιπέδων προσβολής από Μυξοσπορίδια στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες και προκειμένου να εκτιμηθεί η στατιστική σημαντικότητα στις αλλαγές του ποσοστού προσβολής εξαιτίας της επίδρασης των διαφορετικών θεραπευτικών αγωγών που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια των ημερών στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες αλλά και ανάμεσα στις ομάδες των υπό θεραπεία ψαριών και των ψαριών μαρτύρων. Η επίδραση των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής μελετήθηκε χρησιμοποιώντας το Γενικό Γραμμικό Μοντέλο

επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (General Lineal Model (GLM) of repeated measures (GLM-RM) ή GLM univariate analysis (two-way ANOVA). Όπου κρίθηκε απαραίτητο, post hoc Games-Howell κριτήριο εφαρμόστηκαν προκειμένου να εμφανιστούν οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα υπό θεραπεία και μη ψάρια. Λόγω των διαφορετικών διακυμάνσεων, one-way ANOVA με το στατιστικό τεστ Welch statistic, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθούν οι διαφορές στη θνησιμότητα για την περίοδο των 56 ημερών. Το NPT Kruskal-Wallis χ^2 κριτήριο χρησιμοποιήθηκε για να συγκρίνει και τη διαφορά βάρους ανάμεσα στα υπό θεραπεία και μη ψάρια. Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της συσχέτισης (Pearson correlation test) ανάμεσα στις μεταβολές του ποσοστού προσβολής και της έντασης της μόλυνσης από τα διάφορα στάδια ανάπτυξης των Μυξοσποριδίων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

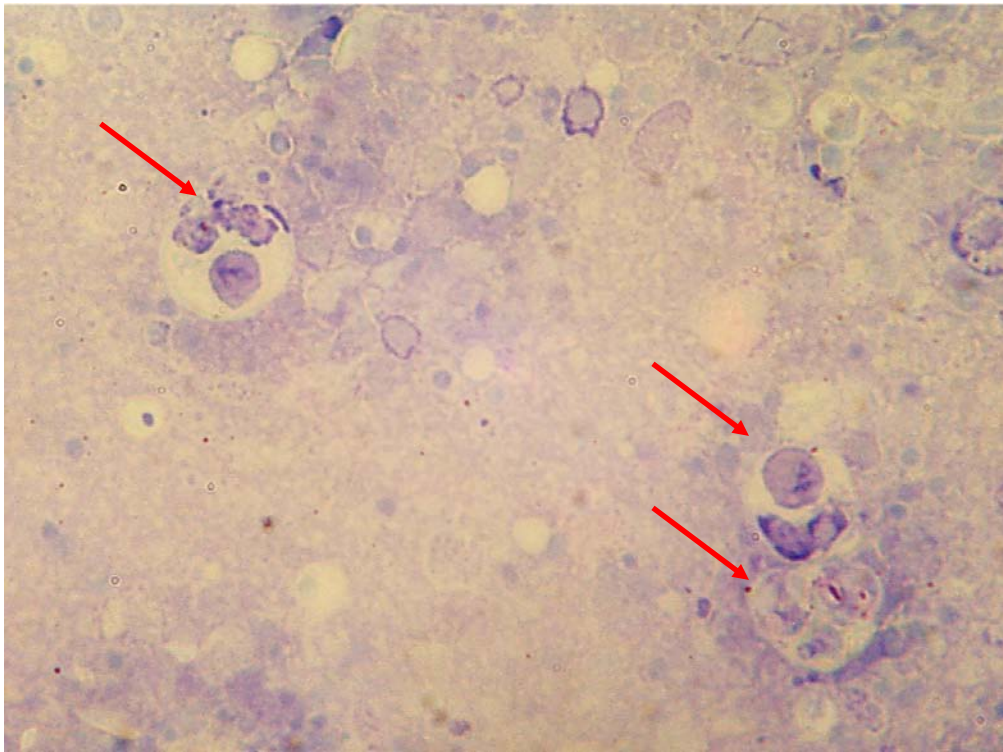
3.1 Μελέτη των μυξοσποριδιάσεων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Ρόλος των άγριων ψαριών στη μετάδοση των παρασίτων.

Στο μέρος αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών που έγιναν σε άγρια και εκτρεφόμενα ψάρια στον Αμβρακικό κόλπο από το έτος 2002 έως το 2005, με σκοπό την εκτίμηση της κατάστασης των Μυξοσποριδιάσεων στην περιοχή, τόσο στις ιχθυοκαλλιέργειες των ψαριών της οικογένειας Sparidae, που αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της ελληνικής ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής, όσο και στα άγρια ψάρια τα οποία μπορεί να αποτελούν πιθανούς φορείς μετάδοσης της παρασίτωσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ανιχνεύτηκαν διάφορα είδη Μυξοσποριδίων, όπως *Enteromyxum leei* Diamant, Lom & Dyková 1994, *Polysporoplasma sparidis* Sitjà-Bobadilla & Alvarez - Pellitero 1995, *Ceratomyxa* sp., *Myxobolus* sp., *Henneguya* sp. και *Kudoa* sp.

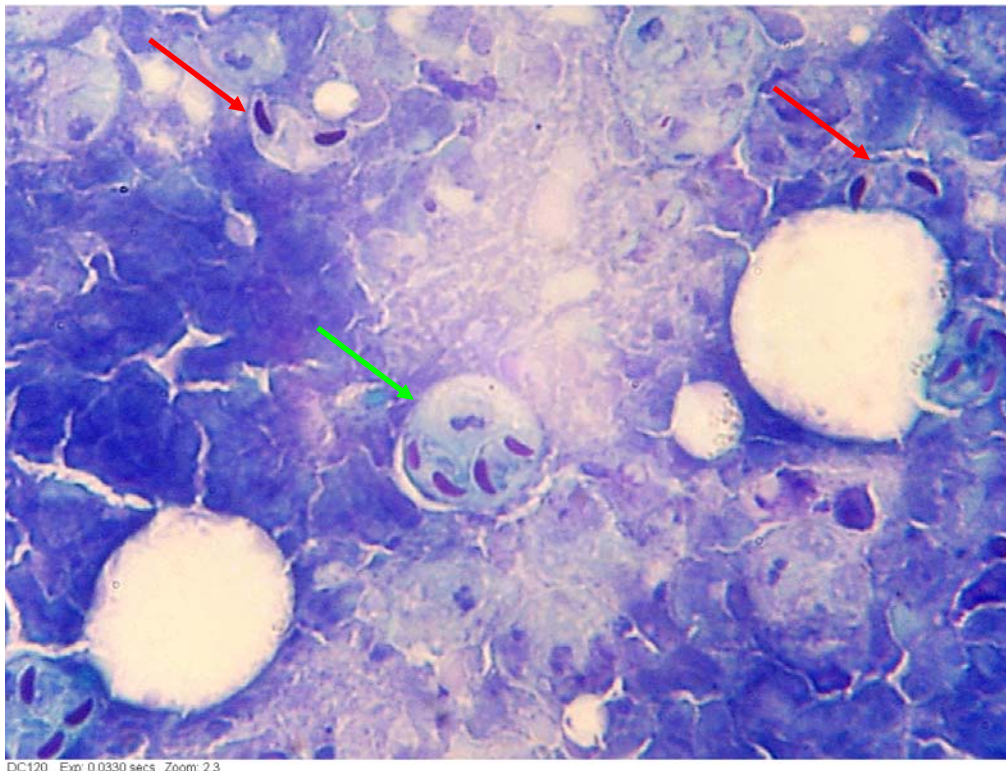
3.1.1 *E. leei*

3.1.1.1 Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου *E. leei*

Το παράσιτο *E. leei* βρέθηκε σε εκτρεφόμενη χιόνα, τσιπούρα και σαργό καθώς και σε άγριο κέφαλο και άγρια τσιπούρα. Το κύριο όργανο στόχος του παράσιτου σε όλα τα μολυσμένα ψάρια ήταν το έντερο, στο οποίο αναγνωρίστηκαν όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου, όπως τροφοζώιτες (Εικ. 3.1.1), σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι (Εικ. 3.1.2). Ώριμοι σπόροι παρατηρήθηκαν επίσης στο νεφρό και στη χοληδόχο κύστη σε εκτρεφόμενη χιόνα, τσιπούρα και σαργό.



Εικόνα 3.1.1 Τροφοζώιτες (→) του παράσιτου *E. leei* σε επίχρισμα εντέρου εκτρεφόμενης χιόνας (Giemsa, x 400).



Εικόνα 3.1.2 Ωριμοι σπόροι (→) και σποροβλάστες (→) του παράσιτου *E. leei* σε επίχρισμα εντέρου εκτρεφόμενης χιόνας (Giemsa, x 400).

Το σχήμα των ώριμων σπόρων ήταν ελλειψοειδές και στο διπύρρηνο σπορόπλασμα παρατηρήθηκαν δύο επιμήκεις απιοειδείς πολικές κάψες τοποθετημένες αντιδιαμετρικά στις άκρες του ώριμου σπόρου. Οι σποροβλάστες ήταν δίσποροι, ενώ οι τροφοζώιτες ήταν μικροί και κυκλικοί. Στον Πίν. 3.1.1 φαίνονται οι διαστάσεις του παράσιτου στον τυπικό ξενιστή. Με χρώση Giemsa οι πολικές κάψες βάφτηκαν σκούρο μπλε και το σπορόπλασμα ροζ.

Πίνακας 3.1.1: Διαστάσεις του παράσιτου *E. leei* στον τυπικό ξενιστή (μm)

Παράσιτο	Παρασιτούμενο όργανο	Ώριμοι σπόροι (n=30)		Τροφοζώιτες (n=30)	
		Πλάτος (X±SD)	Μήκος (X±SD)	Πλάτος (X±SD)	Μήκος (X±SD)
<i>E. leei</i>	Έντερο	6± 0,72	17±0,8	10±0,2	22±0,6
	Χολ. κύστη	6± 0,72	17,3±0,8	11± 0,4	21±0,3

3.1.1.2 Εποχιακή κατανομή του *E. leei*

Εκτρεφόμενα Ψάρια

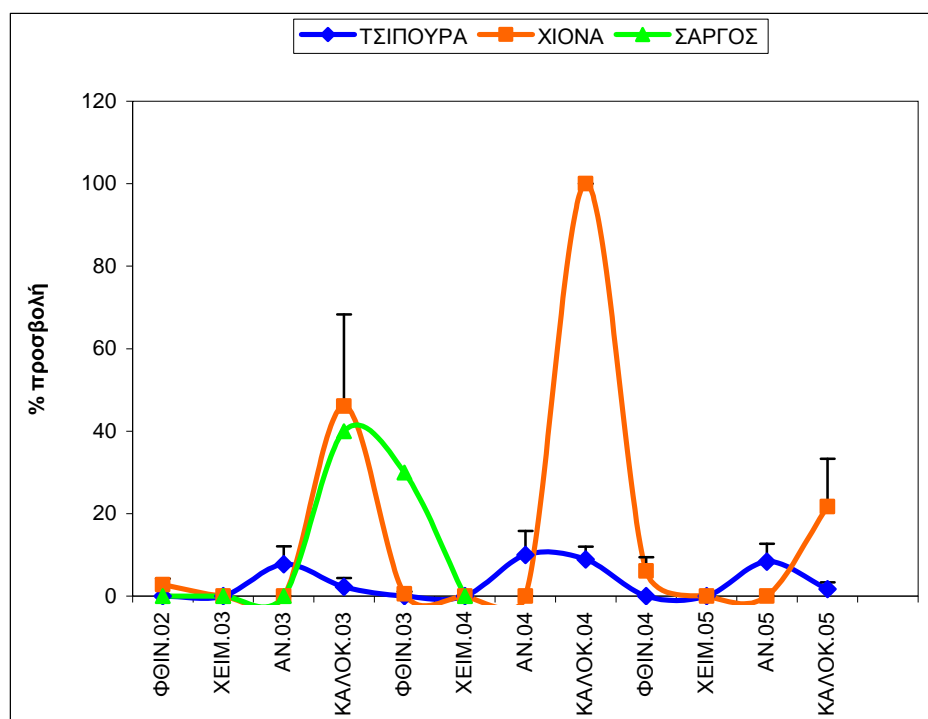
Το παράσιτο *E. leei* παρατηρήθηκε σε όλα τα εκτρεφόμενα είδη που εξετάστηκαν (τσιπούρα, χιόνα και σαργός). Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στο μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

Στην τσιπούρα, το παράσιτο *E. leei* παρατηρήθηκε σε κάθε χρονιά δειγματοληψίας (2003, 2004, 2005) τόσο την άνοιξη όσο και το καλοκαίρι. Την άνοιξη και το καλοκαίρι του 2003 το ποσοστό ήταν χαμηλό 7,78±4,34% και 2,22±2,22%, αντίστοιχα. Την άνοιξη του 2004 παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής 10±5,77% το οποίο μειώθηκε σε 8,89±3,09% το καλοκαίρι του ίδιου έτους, ενώ το

2005 το ποσοστό προσβολής άρχισε να αυξάνεται την άνοιξη σε $8,83 \pm 4,41\%$ και μειώθηκε σε $1,67 \pm 1,67\%$ το καλοκαίρι του ίδιου έτους (Γράφ. 3.1.1).

Στη χιόνα, *E. leei* ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2002 σε ποσοστό προσβολής $2,78 \pm 1,47\%$. Το χειμώνα και την άνοιξη δεν ανιχνεύτηκαν παράσιτα ενώ το καλοκαίρι του 2003 το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε σε $46,11 \pm 22,2\%$. Το ποσοστό προσβολής άρχισε να μειώνεται από το φθινόπωρο του 2003 φτάνοντας το $0,55 \pm 0,55\%$, το 0% το χειμώνα και την άνοιξη του 2004, ενώ το καλοκαίρι του ίδιου έτους αυξήθηκε απότομα σε 100%. Το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε $6,11 \pm 3,38\%$ το φθινόπωρο του ίδιου έτους, ενώ μέχρι την άνοιξη του 2005 έφτασε το 0% και αυξήθηκε ξανά σε $21,67 \pm 11,67\%$ το καλοκαίρι του 2005 (Γράφ. 3-1).

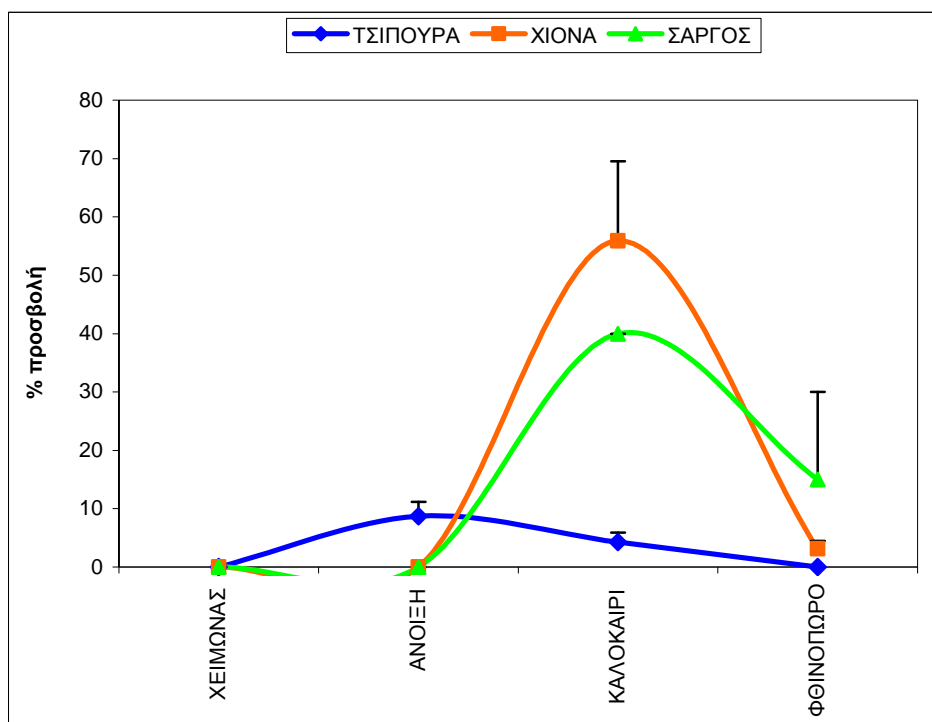
Στον εκτρεφόμενο σαργό το παράσιτο *E. leei* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το καλοκαίρι και το φθινόπωρο του 2003 σε ποσοστά προσβολής 40% και 30% αντίστοιχα, ενώ τις επόμενες χρονιές δεν πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες (Γράφ. 3.1.1).



Γράφημα 3.1.1 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *E. leei* στα εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε μία σημαντική επίδραση της εποχής στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της παρασίτωσης σε όλα τα εκτρεφόμενα είδη που μελετήθηκαν ($F_{3,74} = 3,058$, $P = 0,033$, ANOVA) (Γράφ. 3.1.2). Συγκεκριμένα, το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής για τη χιόνα ανιχνεύτηκε το καλοκαίρι ($55,93 \pm 13,64\%$) με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις άλλες εποχές ($F_{3,26} = 12,111$, $P < 0,001$, ANOVA). Το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής για την τσιπούρα ανιχνεύτηκε την άνοιξη ($8,7 \pm 2,47\%$) και παρά το γεγονός ότι και το καλοκαίρι διαπιστώθηκε ποσοστό προσβολής $4,26 \pm 1,66\%$, η διαφορά μεταξύ των δύο εποχών ήταν στατιστικά σημαντική ($F_{3,26} = 21,341$, $P < 0,001$, ANOVA). Στην περίπτωση του σαργού επίσης παρατηρήθηκε εποχικότητα στην εμφάνιση του *E. iberi* με κρίσιμη εποχή ανάπτυξης της παρασίτωσης το καλοκαίρι (40%), ο μικρός όμως αριθμός των πειραματικών δεδομένων δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

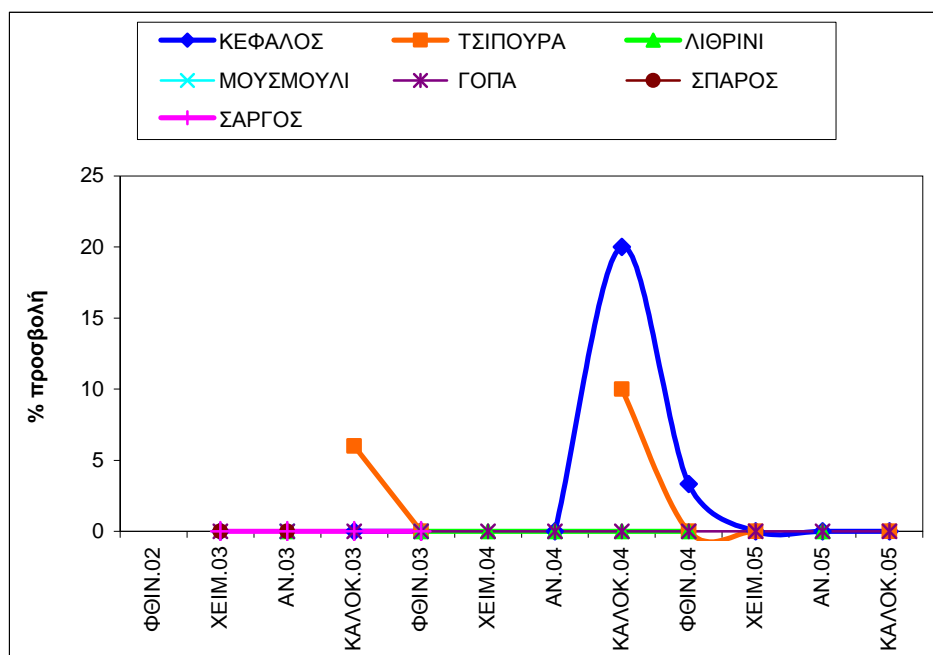
Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών εκτρεφόμενων ειδών που μελετήθηκαν, επομένως παρά το υψηλότερο ποσοστό που παρουσιάζει η εκτρεφόμενη χιόνα τους καλοκαιρινούς μήνες και τα τρία είδη ψαριών μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί ξενιστές του παράσιτου στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.



Γράφημα 3.1.2 Μεταβολή των συνολικών ποσοστών προσβολής του *E. leei* στα εκτρεφόμενα ψάρια.

Άγρια ψάρια

Το παράσιτο *E. leei* ανιχνεύτηκε επίσης και σε άγρια ψάρια, τσιπούρα και κέφαλο, κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες (Γράφ. 3.1.3). Συγκεκριμένα, στον κέφαλο το παράσιτο ανιχνεύτηκε μόνο το καλοκαίρι του 2004 σε ποσοστό προσβολής 20% και συνεχίστηκε μέχρι το φθινόπωρο σε χαμηλό ποσοστό 3,33%. Στην τσιπούρα *E. leei* παρατηρήθηκε σε δύο καλοκαιρινές δειγματοληψίες και το μεγαλύτερο ποσοστό (10%) διαπιστώθηκε το καλοκαίρι του 2004, εποχή με τις μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Στο λιθρίνι, το μουσμούλι, τη γόπα, το σπάρο και το σαργό το παράσιτο *E. leei* δεν ανιχνεύτηκε σε καμία εποχιακή δειγματοληψία.



Γράφημα 3.1.3. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *E. leei* στα άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

3.1.1.3 Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του *E.*

leei

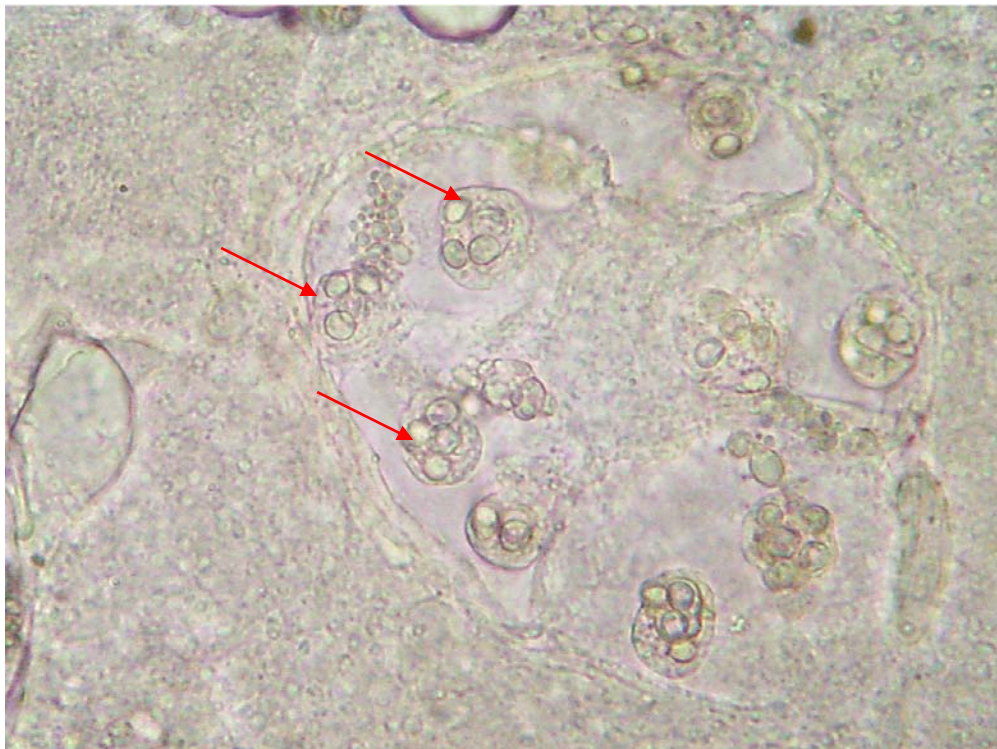
Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι ο κέφαλος και η άγρια τσιπούρα είναι σημαντικοί ξενιστές του *E. leei*, καθόσον το ετήσιο ποσοστό προσβολής τους δε διέφερε σημαντικά από το ετήσιο ποσοστό προσβολής των εκτρεφόμενων ειδών σε αντίθεση με τα άλλα άγρια ψάρια που μελετήθηκαν ($3,89 \pm 1,09$, $P = 0,035$, Games-Howell test), όπου βεβαίως το *E. leei* δεν ανιχνεύτηκε σε καμία δειγματοληψία. Αξιοσημείωτο είναι ότι το καλοκαίρι το παράσιτο παρατηρήθηκε συγχρόνως τόσο στα εκτρεφόμενα είδη τα οποία εξετάστηκαν όσο και σε άγρια ψάρια. Τα συνολικά ποσοστά προσβολής του παράσιτου για τα εκτρεφόμενα και τα άγρια ψάρια φαίνονται στον Πίνακα 3.1.2. Επομένως, τόσο ο κέφαλος όσο και η άγρια τσιπούρα θα μπορούσαν να σημαντικοί θεωρηθούν ξενιστές του *E. leei* και πιθανοί φορείς του παράσιτου από ή προς τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Πίνακας 3.1.2 Συνολικά ποσοστά προσβολής των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών										
<i>E. leei</i>	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ			ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΨΑΡΙΑ						
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΧΙΟΝΑ	ΣΑΡΓΟΣ	ΚΕΦΑΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΛΙΘΡΙΝΙ	ΜΟΥΣΜΟΥΛΙ	ΓΟΠΑ	ΣΠΑΡΟΣ	ΣΑΡΓΟΣ
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		0,00%	0,00%	0,00%
ΑΝΟΙΞΗ	8,70%	0,00%	0,00%	0,00%		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	4,26%	55,93%	40,00%	6,67%	5,33%	0,00%		0,00%		0,00%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	0,00%	3,15%	15,00%	1,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		0,00%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	3,24%	14,77%	13,75%	2,08%	1,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

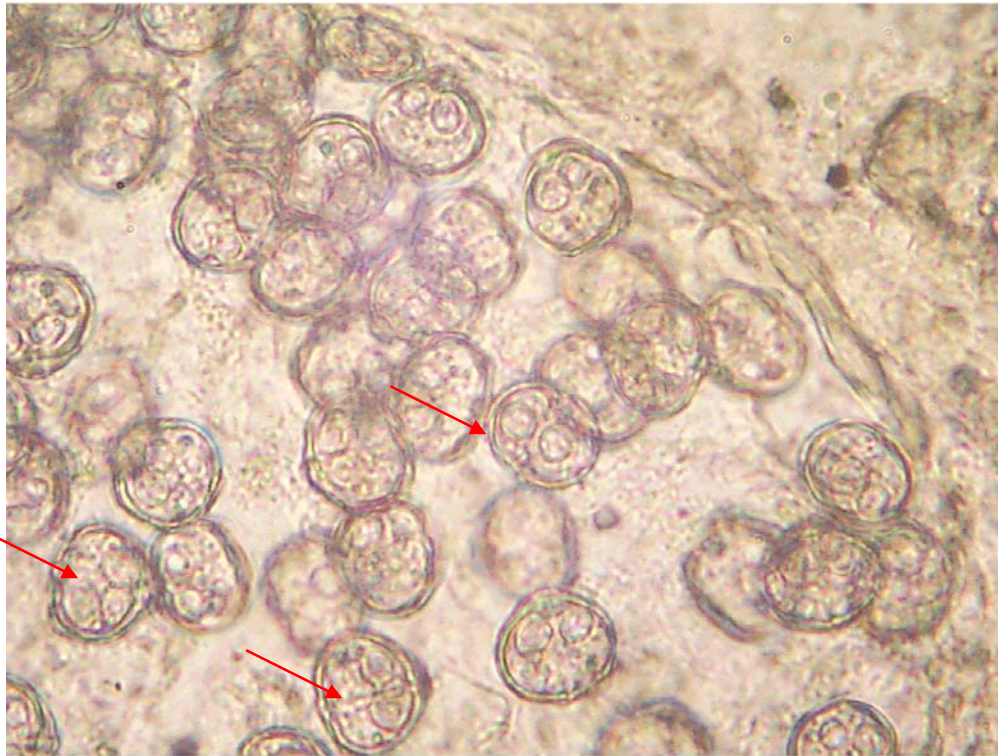
3.1.2 *P. sparis*

3.1.2.1 Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου *P. sparis*

Κύστεις με τροφοζωίτες (Εικ. 3.1.3) και ώριμους σπόρους (Εικ. 3.1.4, 3.1.5) του παράσιτου *P. sparis* παρατηρήθηκαν κυρίως στα νεφρικά σωμάτια και σε λίγες περιπτώσεις στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό και στα μελανομακροφάγα κέντρα του νεφρού (MMC) σε εκτρεφόμενα ψάρια, χιόνα και τσιπούρα και σε άγρια ψάρια, κέφαλο και λιθρίνι.

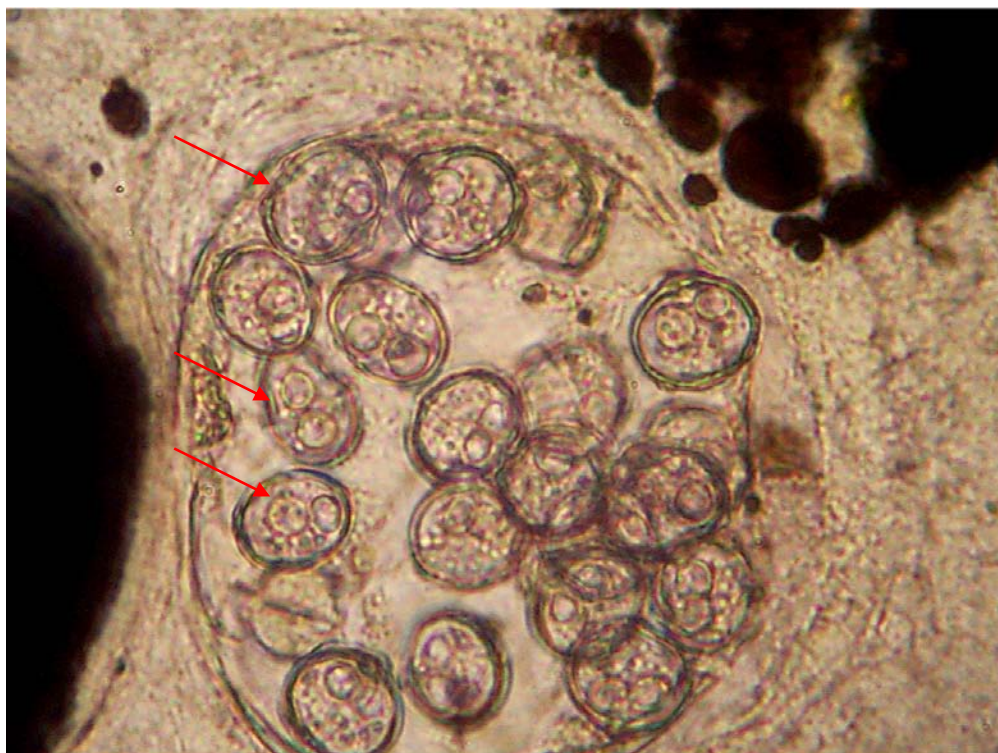


Εικόνα 3.1.3 Τροφοζωίτες (→) του παράσιτου *P. sparis* σε νεφρικό σωμάτιο, σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενης τσιπούρας, (x400).



DC120 Exp: 0.0139 secs Zoom: 2.8

Εικόνα 3.1.4 Ωριμοί σπόροι (→) του παράσιτου *P. sparix*, σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενης τσιπούρας, (x400).



DC120 Exp: 0.0090 secs Zoom: 2.8

20/2/04 PRAPAS SEA BREAM KIDNEY P. SPARIS

Εικόνα 3.1.5 Ωριμοί σπόροι (→) του παράσιτου *P. sparix* σε νεφρικό σωμάτιο, σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενης τσιπούρας, (x400).

Το σχήμα των τροφοζωιτών και των ώριμων σπόρων ήταν ωοειδές με πλάτος μεγαλύτερο από ό,τι το μήκος. Οι τροφοζώιτες ήταν δίσποροι, ενώ σε κάθε ώριμο σπόρο περιέχονταν δύο ισομεγέθεις, σφαιρικές πολικές κάψες. Στον Πίν. 3.1.3 φαίνονται οι διαστάσεις του παράσιτου στον τυπικό ξενιστή. Με χρώση Giemsa οι πολικές κάψες βάφτηκαν σκούρο μπλε και το σπορόπλασμα ροζ.

Πίνακας 3.1.3: Διαστάσεις του παράσιτου *P. sparix* στον τυπικό ξενιστή (μm)

Παράσιτο	Παρασιτούμενο όργανο	Ώριμοι σπόροι (n=30)	
		Πλάτος ($\bar{X} \pm SD$)	Μήκος ($\bar{X} \pm SD$)
<i>P. sparix</i>	Νεφρικό σωματίο	20 \pm 0,4	19,5 \pm 0,1

3.1.2.2 Εποχιακή κατανομή του *P. sparix*

Εκτρεφόμενα ψάρια

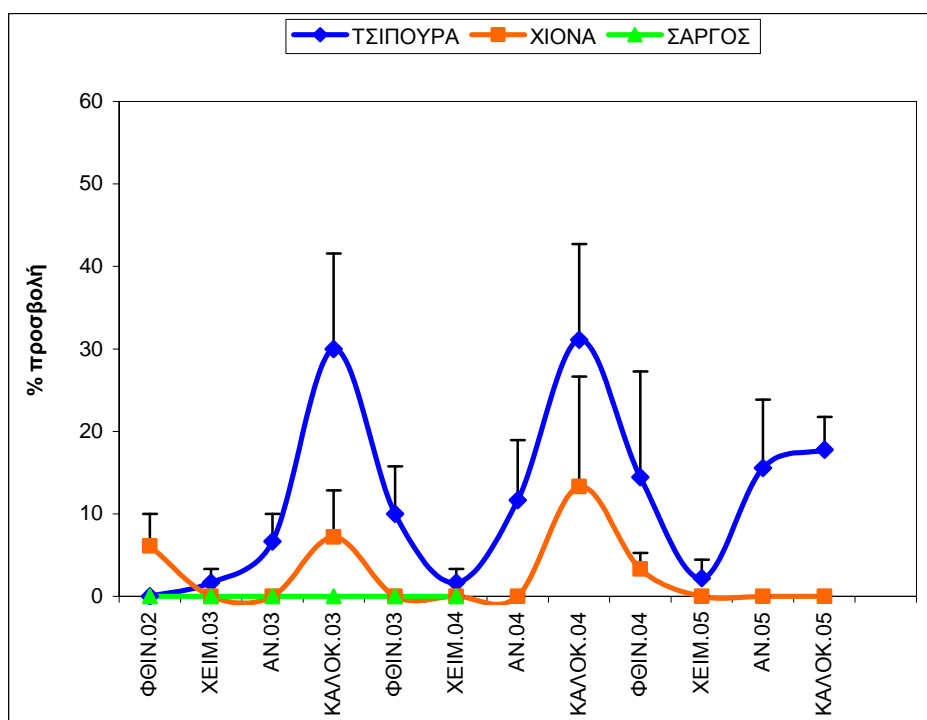
Το Μυξοσπορίδιο *P. sparix* παρατηρήθηκε στα εκτρεφόμενα είδη τσιπούρα και χιόνα. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

Στην τσιπούρα, το παράσιτο *P. sparix* παρατηρήθηκε σε όλες σχεδόν τις εποχές σε κάθε χρονιά δειγματοληψίας (2003, 2004, 2005). Η παρασίτωση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το χειμώνα του 2003 σε χαμηλό ποσοστό προσβολής (1,67 \pm 1,67%), το οποίο αυξήθηκε σταδιακά από την άνοιξη του ίδιου έτους σε 6,67 \pm 3,33%, μέχρι το καλοκαίρι του 2003 που έφτασε το 30 \pm 11,55%. Η παρασίτωση εξελίχθηκε με παρόμοιο τρόπο και τη δεύτερη χρονιά ξεκινώντας από 10 \pm 5,77% το φθινόπωρο του 2003, ποσοστό που μειώθηκε σε 1,67 \pm 1,67% το

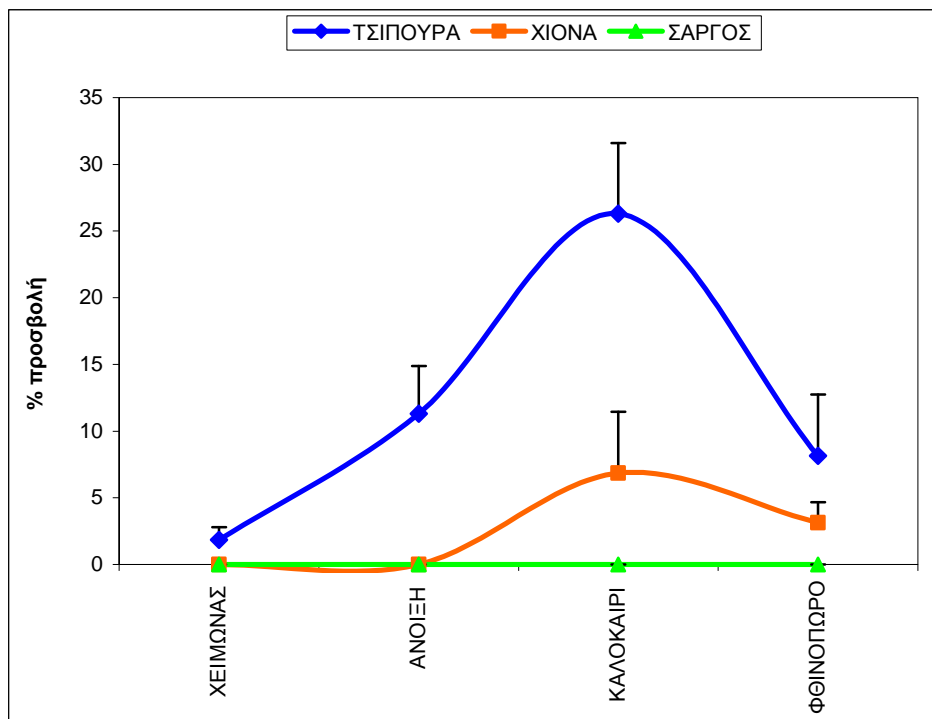
χειμώνα του 2004. Το ποσοστό προσβολής άρχισε να αυξάνεται ξανά σταδιακά από $11,6\pm 7,26\%$ την άνοιξη του 2004 σε $31,1\pm 11,6\%$ το καλοκαίρι, ενώ από το φθινόπωρο του ίδιου έτους άρχισε να μειώνεται ($14,44\pm 12,81\%$) φτάνοντας το $2,22\pm 2,22\%$ το χειμώνα του 2005. Την άνοιξη και το καλοκαίρι του 2005 άρχισε πάλι να αυξάνεται σταδιακά φτάνοντας το $15,5\pm 8,3\%$ και $17,7\pm 4,01\%$ αντίστοιχα (Γράφ. 3.1.4).

Στη χιόνα, το *P. sparis* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2002 σε ποσοστό προσβολής $6,11\pm 3,89\%$ και εμφανίστηκε πάλι σε χαμηλό ποσοστό $7,22\pm 5,64\%$ το καλοκαίρι του 2003. Από το φθινόπωρο του 2003 έως και το καλοκαίρι του 2004 δεν παρατηρήθηκε, ενώ εμφανίστηκε πάλι σε ποσοστά $13,3\pm 13,33\%$ και $3,33\pm 1,92\%$ το καλοκαίρι και το φθινόπωρο του 2005, αντίστοιχα, (Γράφ. 3.1.4).

Στον εκτρεφόμενο σαργό το παράσιτο *P. sparis* δεν παρατηρήθηκε.



Γράφημα 3.1.4 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *P. sparis* στα εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.



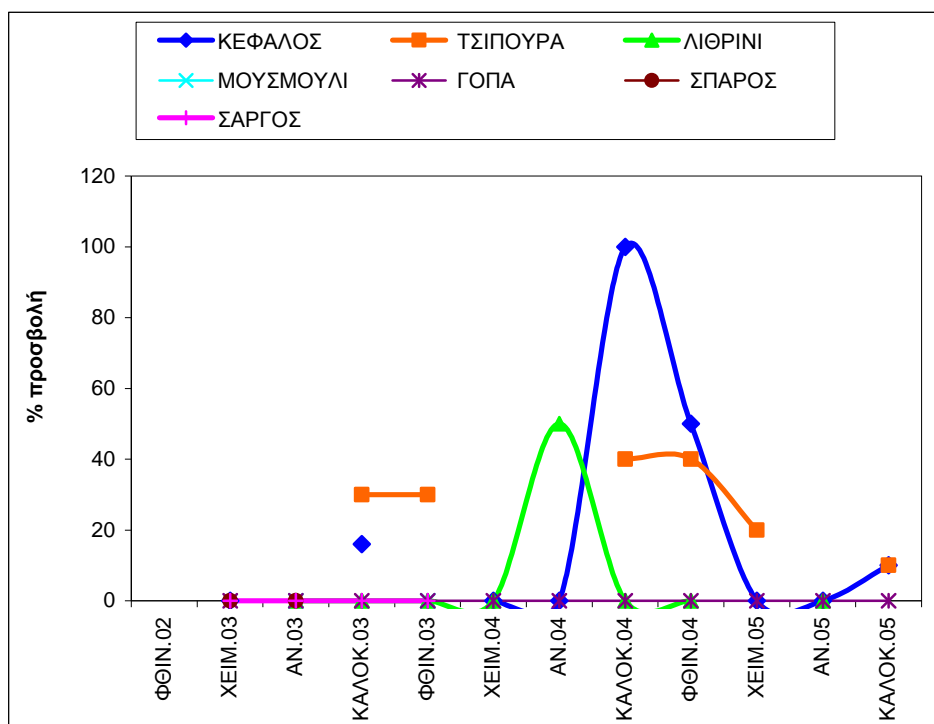
Γράφημα 3.1.5. Μεταβολή των συνολικών ποσοστών προσβολής του *P. sparis* στα εκτρεφόμενα ψάρια.

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν αποκάλυψε καμία σημαντική επίδραση της εποχής στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της παρασίτωσης για το σύνολο των εκτρεφόμενων ειδών που μελετήθηκαν (Γράφ. 3.1.5). Το μεγαλύτερο συνολικό ποσοστό προσβολής για την τσιπούρα ανιχνεύτηκε το καλοκαίρι (26,3±5,31%) με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τις άλλες εποχές ($F_{3,26} = 5,450, P = 0,005, ANOVA$). Παρομοίως, το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής για τη χιόνα ανιχνεύτηκε το καλοκαίρι (6,85±4,6%), ενώ και το φθινόπωρο ανιχνεύτηκε μικρότερο ποσοστό (3,15±1,53%) η διαφορά όμως μεταξύ των δύο εποχών δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($P > 0,05$).

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους, συγκριτικά και με τα τρία εκτρεφόμενα είδη ψαριών που εξετάστηκαν (χιόνα, τσιπούρα και σαργό), διαπιστώθηκε ότι το *P. sparis* παρασιτεί στη χιόνα και την τσιπούρα, με την τελευταία να εμφανίζεται ως ο κύριος ξενιστής του παράσιτου ($11,28 \pm 3,10$, $P = 0,022$, Games-Howell test). Τα ποσοστά προσβολής της τσιπούρας σε κάθε περίπτωση ήταν στατιστικά μεγαλύτερα από αυτά της χιόνας, στην οποία στις περισσότερες περιπτώσεις ανιχνεύτηκε μόνο στις καλοκαιρινές δειγματοληψίες, όταν τα ποσοστά προσβολής στην τσιπούρα ήταν τα μέγιστα.

Άγρια ψάρια

Το παράσιτο *P. sparis* ανιχνεύτηκε επίσης και σε άγρια ψάρια -τσιπούρα, κέφαλο και σε μία περίπτωση σε λιθρίνι- σε όλες σχεδόν τις εποχές δειγματοληψίας αλλά κυρίως τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες (Γράφ. 3.1.6). Συγκεκριμένα, στον κέφαλο ανιχνεύτηκε κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες και σε ορισμένες περιπτώσεις η παρασίτωση συνεχίστηκε μέχρι το φθινόπωρο. Το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (100%) παρατηρήθηκε το καλοκαίρι του 2004, εποχή με τις μεγαλύτερες παρατηρούμενες θερμοκρασίες και η παρασίτωση συνεχίστηκε μέχρι το φθινόπωρο του ίδιου έτους σε υψηλό για την εποχή ποσοστό (50%). Στην άγρια τσιπούρα, το *P. sparis* ανιχνεύτηκε το καλοκαίρι και το φθινόπωρο κάθε έτους δειγματοληψίας (2003, 2004, 2005) στα ίδια ποσοστά 30%, 40% και 10% αντίστοιχα, ενώ σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε και το χειμώνα του 2005 σε ποσοστό 20%. Στο λιθρίνι, το παράσιτο *P. sparis* παρατηρήθηκε μόνο την άνοιξη του 2004 σε αυξημένο ποσοστό προσβολής (50%), ενώ στο μουσμούλι, στη γόπα, στο σπάρο και στον άγριο αργό το παράσιτο *P. sparis* δεν παρατηρήθηκε σε καμία εποχιακή δειγματοληψία.



Γράφημα 3.1.6 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *P. sparis* στα άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

3.1.2.3 Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του *P. sparis*

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι ο κέφαλος, η άγρια τσιπούρα και το λιθρίνι είναι σημαντικοί ξενιστές του *P. sparis*, καθόσον το ετήσιο ποσοστό προσβολής τους δε διέφερε σημαντικά από το ετήσιο ποσοστό προσβολής της εκτρεφόμενης τσιπούρας, που όπως αποδείχθηκε προηγουμένως είναι ο σημαντικότερος ξενιστής του *P. sparis* ($14,28 \pm 2,71$, $P = 0,000$, Games-Howell test), σε αντίθεση με τα άλλα άγρια ψάρια που μελετήθηκαν, όπου βεβαίως το *P. sparis* δεν ανιχνεύτηκε σε καμία δειγματοληψία.

Αξιοσημείωτο είναι ότι το καλοκαίρι παρατηρήθηκε συγχρόνως σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και χιόνα, σε άγριο κέφαλο και άγρια τσιπούρα, το φθινόπωρο παρατηρήθηκε συγχρόνως σε εκτρεφόμενη και άγρια τσιπούρα, ενώ την άνοιξη

παρατηρήθηκε συγχρόνως σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και άγριο λιθρίνι. Τα συνολικά ποσοστά προσβολής του παράσιτου για τα εκτρεφόμενα και τα άγρια ψάρια φαίνονται στον Πίν. 3.1.4. Από την παρατήρηση των ποσοστών προσβολής σε κάθε εποχή ξεχωριστά φαίνεται ότι στα άγρια ψάρια η παρασίτωση σε κάθε εποχή προηγείται της παρασίτωσης στα εκτρεφόμενα και συμβαίνει σε μεγαλύτερο ποσοστό, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μολυσμένα άγρια ψάρια θα μπορούσαν να θεωρηθούν σημαντικοί ξενιστές του *P. sparis* και πιθανοί φορείς του παράσιτου από ή προς τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς, ενώ το γεγονός ότι στο σύνολο των εποχών το ποσοστό προσβολής της άγριας τσιπούρας (24,44%) είναι στατιστικά μεγαλύτερο από αυτό της εκτρεφόμενης χιόνας ($22,71 \pm 5,03$, $P = 0,04$, Games-Howell test) υποδηλώνει ότι η άγρια τσιπούρα θα μπορούσε να θεωρηθεί σημαντικός ξενιστής του παράσιτου και φορέας για τα εκτρεφόμενα ψάρια.

Πίνακας 3.1.4 Συνολικά ποσοστά προσβολής των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών

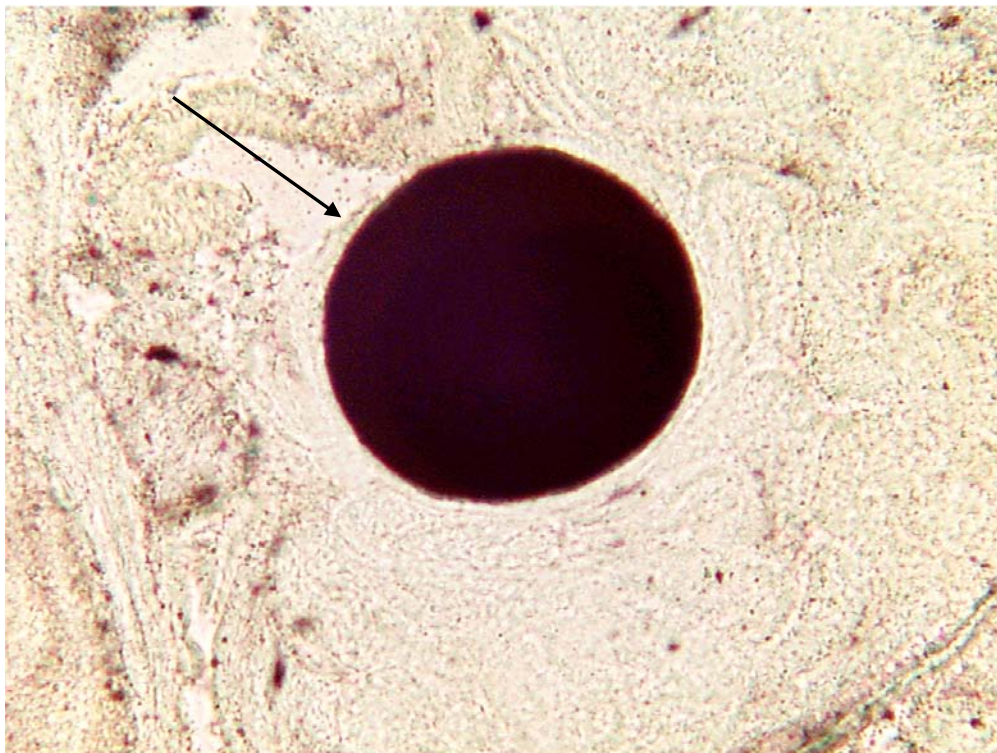
<i>P. sparis</i>	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ			ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΨΑΡΙΑ						
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΧΙΟΝΑ	ΣΑΡΓΟΣ	ΚΕΦΑΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΛΙΘΡΙΝΙ	ΜΟΥΣΜΟΥΛΙ	ΓΟΠΑ	ΣΠΑΡΟΣ	ΣΑΡΓΟΣ
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	1,85±0,94%	0,00%	0,00%	0,00%	20,00%	0,00%		0,00%	0,00%	0,00%
ΑΝΟΙΞΗ	11,30±3,57%	0,00%	0,00%	0,00%		16,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	26,30±5,31%	6,85±4,6%	0,00%	42,00%	26,67%	0,00%		0,00%		0,00%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	8,15±4,59%	3,15±1,53%	0,00%	30,00%	26,67%	0,00%	0,00%	0,00%		0,00%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	11,90%	2,50%	0,00%	18,00%	24,44%	4,17%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

3.1.2.4 Άλλες αλλοιώσεις που σχετίζονται με την παρασίτωση από *P. sparis*

Στα εκτρεφόμενα και άγρια μολυσμένα ψάρια με *P. sparis* παρατηρήθηκαν δύο αλλοιώσεις στο νεφρό, οι οποίες ενδέχεται να σχετίζονται με την παρασίτωση από *P. sparis*. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι η ύπαρξη μελανομακροφάγων κέντρων περιχαρακωμένων με συνδετικό ιστό (MMC-ΣΥΝΔ) σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και σε άγρια τσιπούρα και λιθρίνι και ουρολιθίαση στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και χιόνα και σε άγριο κέφαλο και λιθρίνι.

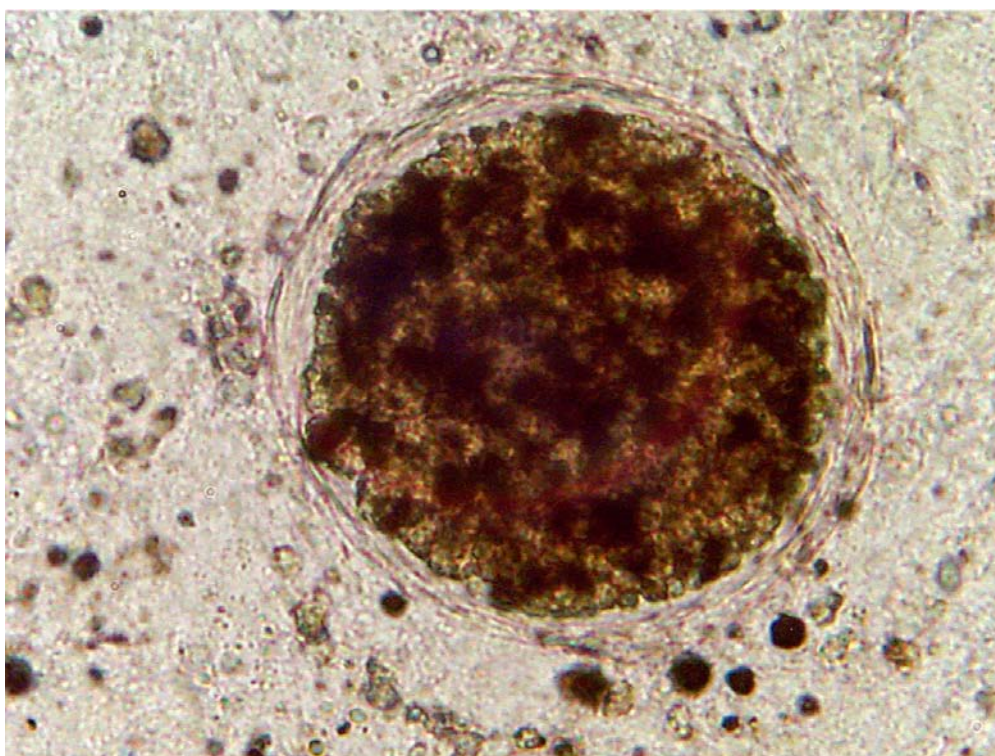
Μελανομακροφάγα κέντρα περιχαρακωμένα με συνδετικό ιστό (MMC-ΣΥΝΔ)

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε μόνο αύξηση του μεγέθους των μελανομακροφάγων κέντρων χωρίς εμφανή μολυσματικό παράγοντα με παράλληλη περιχαρακωση από διπλή μεμβράνη συνδετικού ιστού. Οι αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και σε άγρια τσιπούρα και λιθρίνι. Μετά από χρώση Giemsa, Ziehl-Nielsen, Gram βρέθηκαν σε λίγες περιπτώσεις ανώριμα στάδια και σπόροι του παράσιτου *P. sparis* (Εικόνες 3.1.6, 3.1.7, 3.1.8).



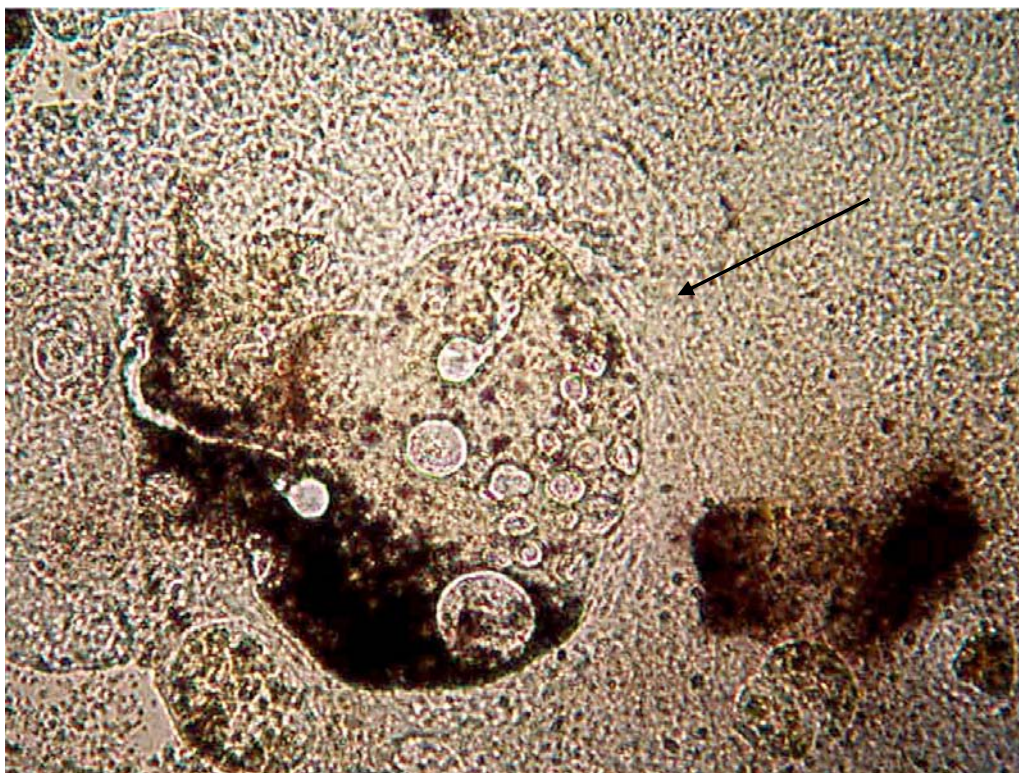
DC120 Exp 0 0127 secs Zoom 2.8
19/12/02 SARGUS SELONTA BOURLIA 2 KIDNEY MMC-SYND

Εικόνα 3.1.6 Μελανομακροφάγο κέντρο (→) περιχαρακωμένο με συνδετικό ιστό (αρχικό στάδιο), σε επίχρισμα νεφρού τσιπούρας, x250.



DC120 Exp: 0.1600 secs Zoom: 2.3
19/12/02 SARGUS SELONTA BOURLIA 2 KIDNEY CYSTES

Εικόνα 3.1.7 Μελανομακροφάγο κέντρο (→) περιχαρακωμένο με διπλή μεμβράνη συνδετικού ιστού, σε επίχρισμα νεφρού τσιπούρας x400.



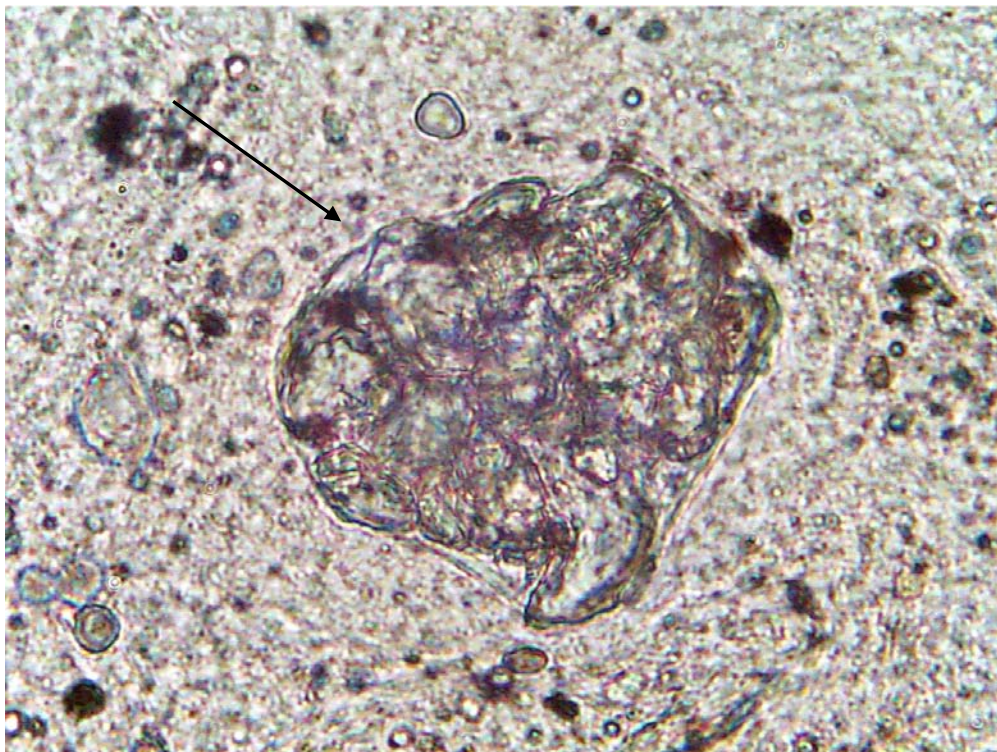
DC120 Exp: 0.0037 secs Zoom: 2.8
6/7/03 ΧΙΟΝΙΑ ΜΠΡΟΥΓΟΣ KIDNEY CYST

Εικόνα 3.1.8 Μελανομακροφάγο κέντρο (→) με τροφοζωίτες *P. sparis* σε επίχρισμα νεφρού τσιπούρας, x250.

Ουρολιθίαση

Ουρολιθίαση παρατηρήθηκε στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό του νεφρού σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και χιόνα και σε άγριο κέφαλο και λιθρίνι.

Ελεύθεροι, άμορφοι κρύσταλλοι παρατηρήθηκαν στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό του νεφρού σε νωπά επιχρίσματα νεφρού. Στα δείγματα αυτά έγινε και ιστοπαθολογική εξέταση μετά από χρώσεις Haematoxylin-Eosin (H&E) και Von Kossa. Με τη χρώση (H&E) οι κρύσταλλοι βάφτηκαν μπλε σκούρο, ενώ με τη χρώση Von Kossa βάφτηκαν μαύροι εξαιτίας της ύπαρξης ασβεστίου. Στις Εικόνες 3.1.9 φαίνονται ελεύθεροι, άμορφοι κρύσταλλοι στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό του νεφρού σε νωπά επιχρίσματα νεφρού.



DC120 Exp 0.0792 secs Zoom 2.3
19/12/02 SARGUS SELONTA ΘΟΥΡΛΙΑ 2 KIDNEY CALC-FREE

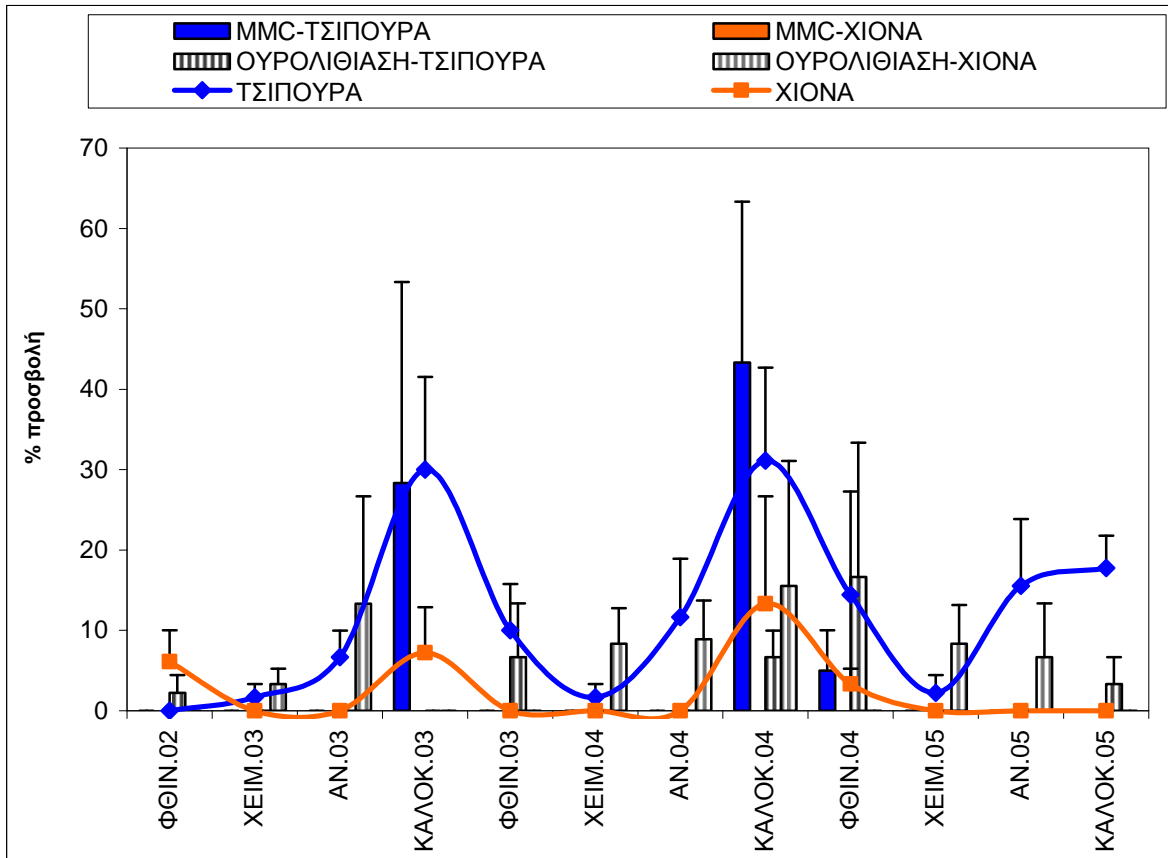
Εικόνα 3.1.9 Ελεύθεροι κρύσταλλοι σε επίχρισμα νεφρού τσιπούρας, x400.

Εποχιακή κατανομή παρατήρησης των αλλοιώσεων MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης στα μολυσμένα με P. sparix εκτρεφόμενα ψάρια

Η αλλοίωση MMC-ΣΥΝΔ, παρατηρήθηκε σε μολυσμένη με *P.sparix* εκτρεφόμενη τσιπούρα. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες,

για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005). Στην τσιπούρα, MMC-ΣΥΝΔ παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το καλοκαίρι του 2003 σε ποσοστό προσβολής $28,33\pm 25\%$. Τη δεύτερη χρονιά η αλλοίωση εξελίχθηκε με παρόμοιο τρόπο ξεκινώντας το καλοκαίρι του 2004 σε ποσοστό προσβολής $43,33\pm 20\%$, ποσοστό το οποίο μειώθηκε σε $5\pm 5\%$ το φθινόπωρο του ίδιου έτους (Γράφ. 3.1.7).

Ουρολιθίαση παρατηρήθηκε σε μολυσμένη με *P. sparix* εκτρεφόμενη τσιπούρα και χιόνα. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005). Στη τσιπούρα, ουρολιθίαση ανιχνεύτηκε σε κάθε φθινοπωρινή δειγματοληψία (2003, 2004, 2005) σε ποσοστά προσβολής $2,22\pm 2,22\%$, $6,67\pm 6,67\%$ και $16,67\pm 16,67\%$ αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκε σε δύο από τις τρεις καλοκαιρινές δειγματοληψίες (2004, 2005) σε ποσοστά προσβολής $6,67\pm 3,33\%$ και $3,33\pm 3,33\%$ αντίστοιχα (Γράφ. 3.1.7). Στη χιόνα, ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το χειμώνα του 2003 σε ποσοστό προσβολής $3,33\pm 1,92\%$, ποσοστό το οποίο αυξήθηκε σε $13,3\pm 13,33\%$ την άνοιξη του ίδιου έτους. Την επόμενη χρονιά (2004) ανιχνεύτηκε το χειμώνα και την άνοιξη σε παρόμοια ποσοστά, $8,33\pm 4,41$ και $8,89\pm 4,84\%$ αντίστοιχα, ενώ το καλοκαίρι το ποσοστό αυξήθηκε σε $15,55\pm 15,55\%$. Το φθινόπωρο του 2004 η αλλοίωση αυτή δεν ανιχνεύτηκε, ενώ το χειμώνα και την άνοιξη του 2005 ανιχνεύτηκε σε ποσοστά $8,33\pm 4,81\%$ και $6,67\pm 6,67\%$ αντίστοιχα (Γράφ. 3.1.7).



Γράφημα 3.1.7 Μεταβολή του ποσοστού εμφάνισης των αλλοιώσεων MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης στα μολυσμένα με *P. sparis* εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν αποκάλυψε σημαντική επίδραση της εποχής στην εμφάνιση των δύο αλλοιώσεων, παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκε κάποια εποχικότητα στην εμφάνιση της αλλοίωσης MMC-ΣΥΝΔ, με κρίσιμη εποχή το καλοκαίρι. Αντιθέτως, η παρασίτωση από *P. sparis* εμφάνισε εποχικότητα, με κρίσιμη εποχή το καλοκαίρι, συγκριτικά με τις άλλες εποχές ($F_{3,26} = 5,450$, $P = 0,005$, ANOVA). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το *P. sparis* και οι αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν συγχρόνως το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, τόσο στην εκτρεφόμενη τσιπούρα όσο και στην εκτρεφόμενη χιόνα.

Τα συνολικά ποσοστά εμφάνισής τους στα δύο εκτρεφόμενα είδη φαίνονται στους Πίνακες 3.1.5. και 3.1.6. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για το σύνολο των εποχών αποκάλυψε ότι τόσο στην εκτρεφόμενη τσιπούρα όσο και στην εκτρεφόμενη χιόνα το ποσοστό εμφάνισης του παράσιτου *P. sparis* και των αλλοιώσεων (MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης) δεν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους και επομένως οι δύο

αλλοιώσεις (MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίαση) ενδέχεται να σχετίζονται με την παρασίτωση από το *P. sparis* και στα δύο εκτρεφόμενα είδη.

Πίνακας 3.1.5 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *P. sparis* και των αλλοιώσεων, MMC-ΣΥΝΔ και της ουρολιθίασης στην εκτρεφόμενη τσιπούρα.

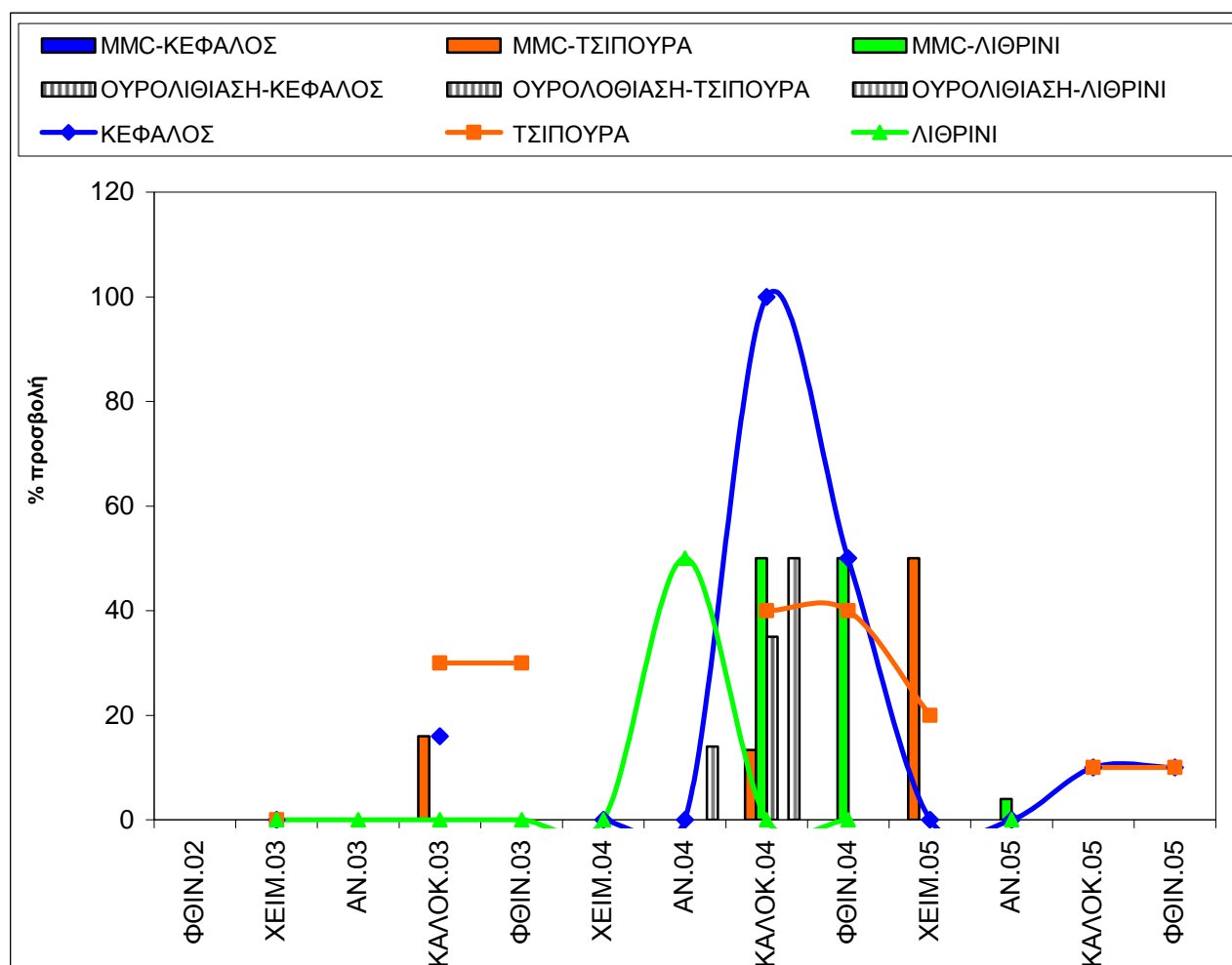
	<i>P. sparis</i>	MMC-ΣΥΝΔ	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	1,85±0,94%	0,00%	0,00%
ΑΝΟΙΞΗ	11,30±3,57%	0,00%	0,00%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	26,30±5,31%	31,67±12,36%	3,33±1,67%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	8,15±4,59%	3,33±2,2%	8,52±5,64%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	11,90±3,60%	8,75±7,68%	2,96±2,01%

Πίνακας 3.1.6 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *P. sparis* και της ουρολιθίασης στην εκτρεφόμενη χιόνα.

	<i>P. sparis</i>	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	6,66±2,13%
ΑΝΟΙΞΗ	0,00%	9,63±4,62%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	6,85±4,6%	5,18±5,18%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	3,15±1,53%	0%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	2,50±1,53%	5,37±2,01%

Εποχιακή κατανομή παρατήρησης των αλλοιώσεων MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης στα μολυσμένα με *P. sparis* άγρια ψάρια

Η αλλοίωση MMC-ΣΥΝΔ ανιχνεύτηκε σε μολυσμένα με *P. sparis* άγρια ψάρια, τσιπούρα και λιθρίνι. Στην άγρια τσιπούρα, MMC-ΣΥΝΔ ανιχνεύτηκε σε δύο καλοκαιρινές δειγματοληψίες (2003 και 2004) σε ποσοστά προσβολής 16% και 13,33% αντίστοιχα, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρήθηκε το χειμώνα του 2005 (50%) (Γράφ. 3.1.8). Στο λιθρίνι, MMC-ΣΥΝΔ ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 50% το καλοκαίρι και το φθινόπωρο του 2004 ενώ μέχρι την άνοιξη του 2004, μειώθηκε σε 4% (Γράφ. 3.1.8).



Γράφημα 3.1.8 Μεταβολή του ποσοστού εμφάνισης των αλλοιώσεων MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης στα μολυσμένα με *P. sparis* άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Ουρολιθίαση ανιχνεύτηκε σε μολυσμένα με *P. sparis* άγρια ψάρια, σε λιθρίνι και σε μία περίπτωση σε κέφαλο. Συγκεκριμένα, στον κέφαλο ουρολιθίαση παρατηρήθηκε μόνο το καλοκαίρι του 2004 και σε ποσοστό προσβολής 35%, ενώ στο λιθρίνι ουρολιθίαση παρατηρήθηκε την άνοιξη και το καλοκαίρι του 2004 σε ποσοστά 14% και 50% αντίστοιχα (Γράφ. 3.1.8).

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν αποκάλυψε σημαντική επίδραση της εποχής και του συνόλου των εποχών στην εμφάνιση των δύο αλλοιώσεων, όπως και του *P. sparis*. Αξιοσημείωτο είναι ότι, το *P. sparis* και οι αλλοιώσεις συγχρόνως παρατηρήθηκαν το καλοκαίρι στην περίπτωση του κέφαλου, την άνοιξη στην περίπτωση του λιθρινιού και το χειμώνα και το καλοκαίρι στην περίπτωση της άγριας τσιπούρας. Τα συνολικά ποσοστά εμφάνισής τους στα δύο εκτρεφόμενα είδη φαίνονται στον Πίνακες 3.1.7., 3.1.8 και 3.1.9. Επομένως, οι δύο αλλοιώσεις (MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίαση) ενδέχεται να σχετίζονται με την παρασίτωση από το *P. sparis* και στα τρία είδη άγριων ψαριών.

Πίνακας 3.1.7 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *P. sparis* και της ουρολιθίασης στον κέφαλο.

	<i>P. sparis</i>	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	0%
ΑΝΟΙΞΗ	0,00%	0%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	42,00%	11,67%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	30,00%	0%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	18,00%	2,92%

Πίνακας 3.1.8 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *P. sparis* και των αλλοιώσεων, MMC-ΣΥΝΔ και της ουρολιθίασης στο λιθρίνι.

	<i>P. sparis</i>	MMC-ΣΥΝΔ	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	0%	0%
ΑΝΟΙΞΗ	16,67%	1,33%	4,67%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	0,00%	50%	50%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	0,00%	25%	0%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	4,17%	19,08%	13,67%

Πίνακας 3.1.9 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *P. sparis* και MMC-ΣΥΝΔ στην άγρια τσιπούρα.

	<i>P. sparis</i>	MMC-ΣΥΝΔ
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	20,00%	50%
ΑΝΟΙΞΗ		
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	26,67%	9,78%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	26,67%	0%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	24,44%	19,93%

3.1.3 *Myxobolus* sp.

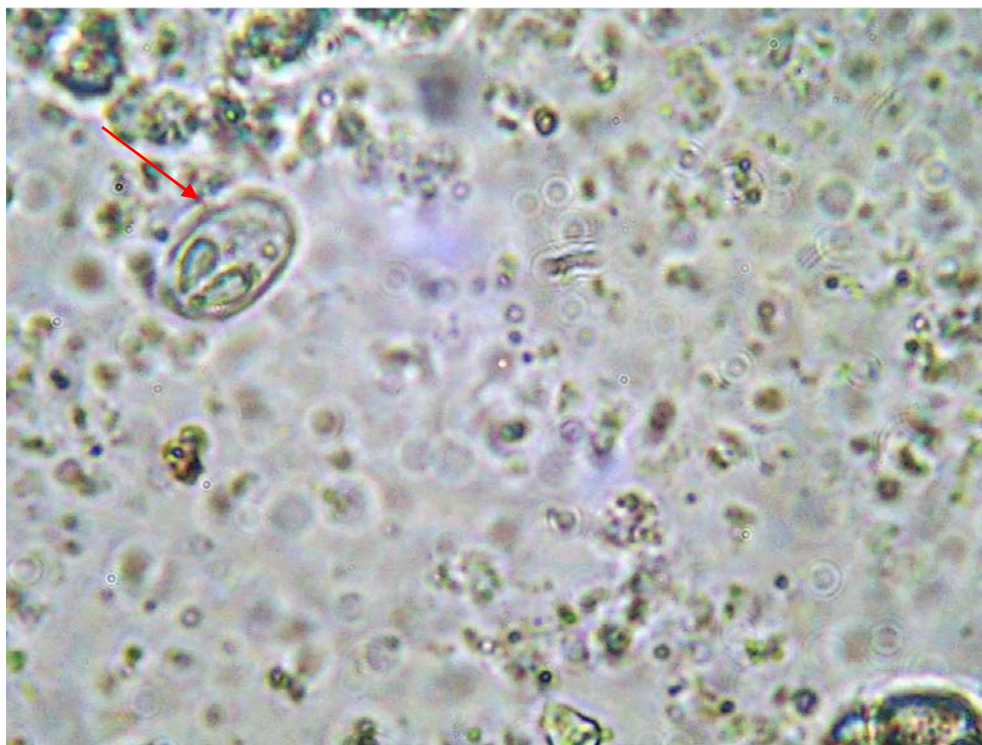
3.1.3.1 Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου *Myxobolus* sp.

Το Μυξοσπορίδιο *Myxobolus* sp. παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενα ψάρια (χιόνα και σαργό) και σε άγρια (σαργό και κέφαλο). Τροφοζωίτες (Εικ. 3.1.10) και ώριμοι σπόροι (Εικ. 3.1.11) του παράσιτου *Myxobolus* sp. παρατηρήθηκαν στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό και στα μελανομακροφάγα κέντρα (MMC) του νεφρού σε εκτρεφόμενη χιόνα και σαργό. Επίσης, ώριμοι σπόροι του ίδιου παράσιτου (Εικ. 3.1.12) ανιχνεύτηκαν σε νεφρό άγριου σαργού και σε έντερο και χοληδόχο κύστη άγριου κέφαλου.



DC120 Exp: 0.1400 secs Zoom: 2.8

Εικόνα 3.1.11 Τροφοζωίτης (→) του παράσιτου *Myxobolus* sp. σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενου σαργού (x 400).



DC120 Exp: 0.1400 secs Zoom: 2.8

Εικόνα 3.1.12 Ωριμος σπόρος (→) του παράσιτου *Myxobolus* sp. σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενου σαργού (x 400).



DC120 Exp: 0.0214 secs Zoom: 2.3

Εικόνα 3.1.13 Ωριμοι σπόροι (→) του παράσιτου *Myxobolus* sp. σε επίχρισμα εντέρου αγρίου κεφάλου (x 400).

Το σχήμα των ώριμων σπόρων ήταν απιοειδές και στο σπορόπλασμα παρατηρήθηκαν δύο απιοειδείς ανισομεγέθεις πολικές κάψες. Στον Πίν. 3.1.10 φαίνονται οι διαστάσεις του παράσιτου στον τυπικό ξενιστή. Με χρώση Giemsa οι πολικές κάψες βάφτηκαν σκούρο μπλε και το σπορόπλασμα ροζ.

Πίνακας 3.1.10: Διαστάσεις του παράσιτου *Myxobolus* sp. στον τυπικό ξενιστή (μm),

Παράσιτο	Παρασιτούμενο όργανο	Ωριμοι σπόροι (n=30)		Τροφοζωίτες (n=30)	
		Πλάτος ($\bar{X} \pm SD$)	Μήκος ($\bar{X} \pm SD$)	Πλάτος ($\bar{X} \pm SD$)	Μήκος ($\bar{X} \pm SD$)
<i>Myxobolus</i> sp.	Νεφρός	6 \pm 0,72	14 \pm 0,8	16,5 \pm 8,9	38,3 \pm 9,6

3.1.3.2 Εποχιακή κατανομή του *Myxobolus* sp.

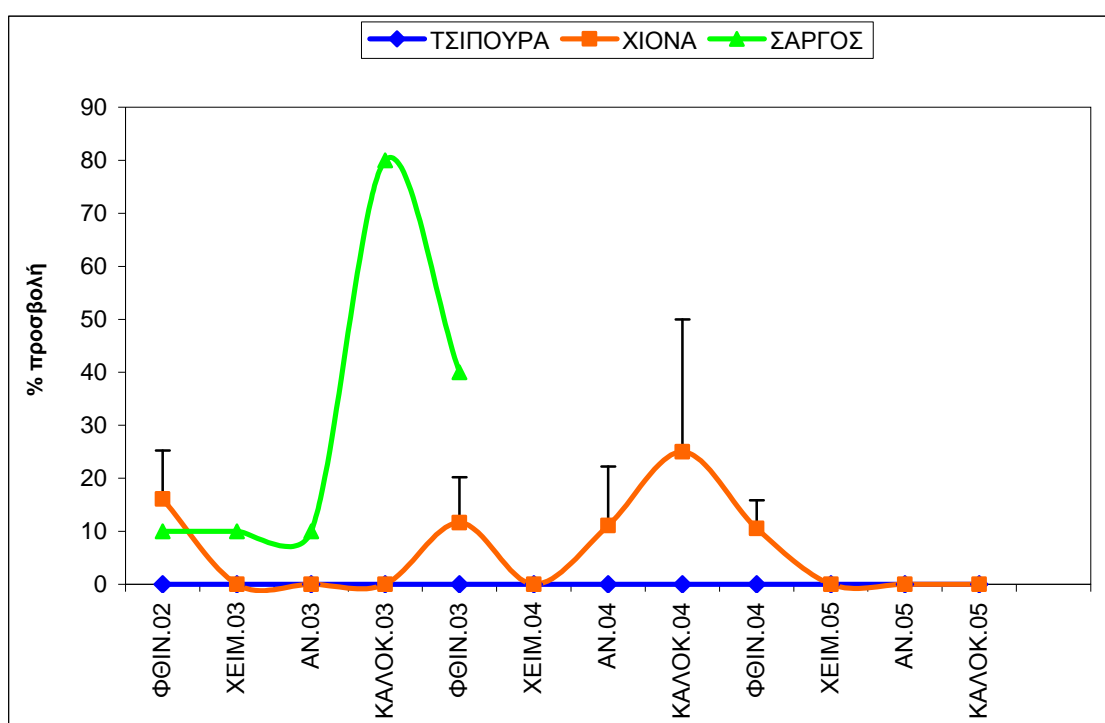
Εκτρεφόμενα ψάρια

Το παράσιτο *Myxobolus* sp. παρατηρήθηκε στα εκτρεφόμενα είδη χιόνα και σαργός. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

Στη χιόνα, *Myxobolus* sp. ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2002 σε ποσοστό προσβολής 16,11 \pm 9,14%. Το ποσοστό αυτό μειώθηκε σε 0% μέχρι και το καλοκαίρι του 2003, ενώ το φθινόπωρο του 2003 αυξήθηκε ξανά σε 11,66 \pm 8,55%. Το χειμώνα του 2004 δεν ανιχνεύτηκε, ενώ από την άνοιξη του 2004 άρχισε να αυξάνεται σταδιακά (11,11 \pm 11,11%) μέχρι το καλοκαίρι ίδιου έτους που παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (25 \pm 25%). Από το φθινόπωρο του 2004 άρχισε να μειώνεται (10,55 \pm 5,3%) και από το χειμώνα του 2005 μέχρι και το καλοκαίρι του 2005 που ολοκληρώθηκαν οι δειγματοληψίες δεν ανιχνεύτηκε ξανά (Γράφ. 3.1.9).

Στον εκτρεφόμενο σαργό το παράσιτο *Myxobolus* sp. ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2002 σε ποσοστό προσβολής 10%, το οποίο διατηρήθηκε το χειμώνα και την άνοιξη του 2003. Το καλοκαίρι του 2003 αυξήθηκε απότομα σε 80% και το φθινόπωρο του 2003 μειώθηκε σε 40%, ενώ τις επόμενες χρονιές δεν πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες (Γράφ. 3.1.9).

Στην εκτρεφόμενη τσιπούρα το παράσιτο *Myxobolus* sp. δεν ανιχνεύτηκε.

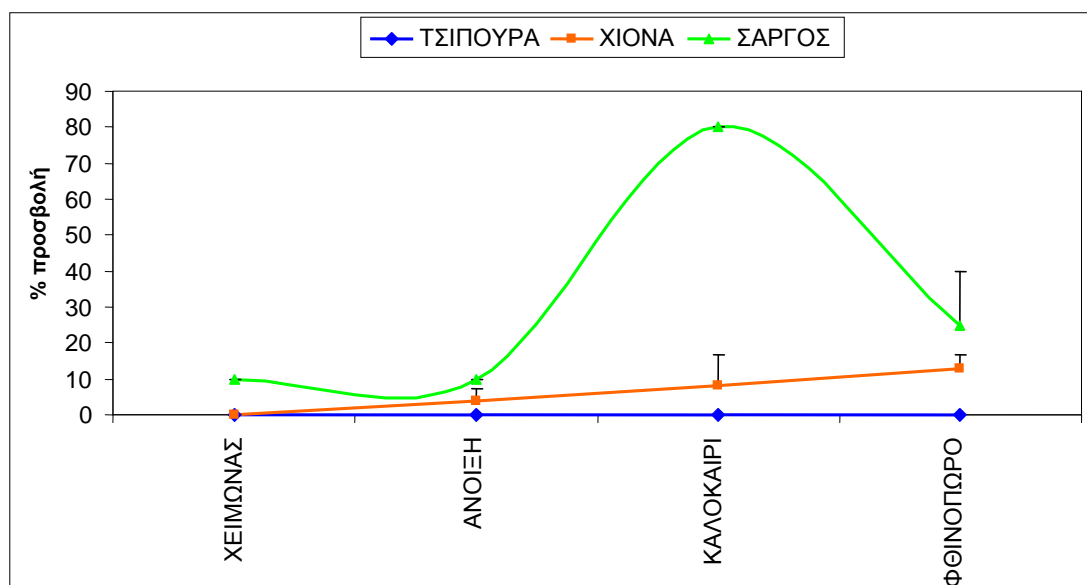


Γράφημα 3.1.9 . Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Myxobolus* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στην περίπτωση του σαργού παρατηρήθηκε εποχικότητα στην εμφάνιση του *Myxobolus* sp. με κρίσιμη εποχή ανάπτυξης της παρασίτωσης το καλοκαίρι (80%), ο μικρός όμως αριθμός των πειραματικών δεδομένων δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της εποχής στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της παρασίτωσης στην περίπτωση της χιόνας (Γράφ. 3.1.10).

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ψαριών που

μελετήθηκαν. Επομένως, παρά το υψηλότερο ποσοστό που παρουσιάζει ο εκτρεφόμενος σαργός τους καλοκαιρινούς μήνες και τα τρία είδη ψαριών μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί ξενιστές του παράσιτου στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.



Γράφημα 3.1.10. Μεταβολή των συνολικών ποσοστών προσβολής του *Myxobolus* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια.

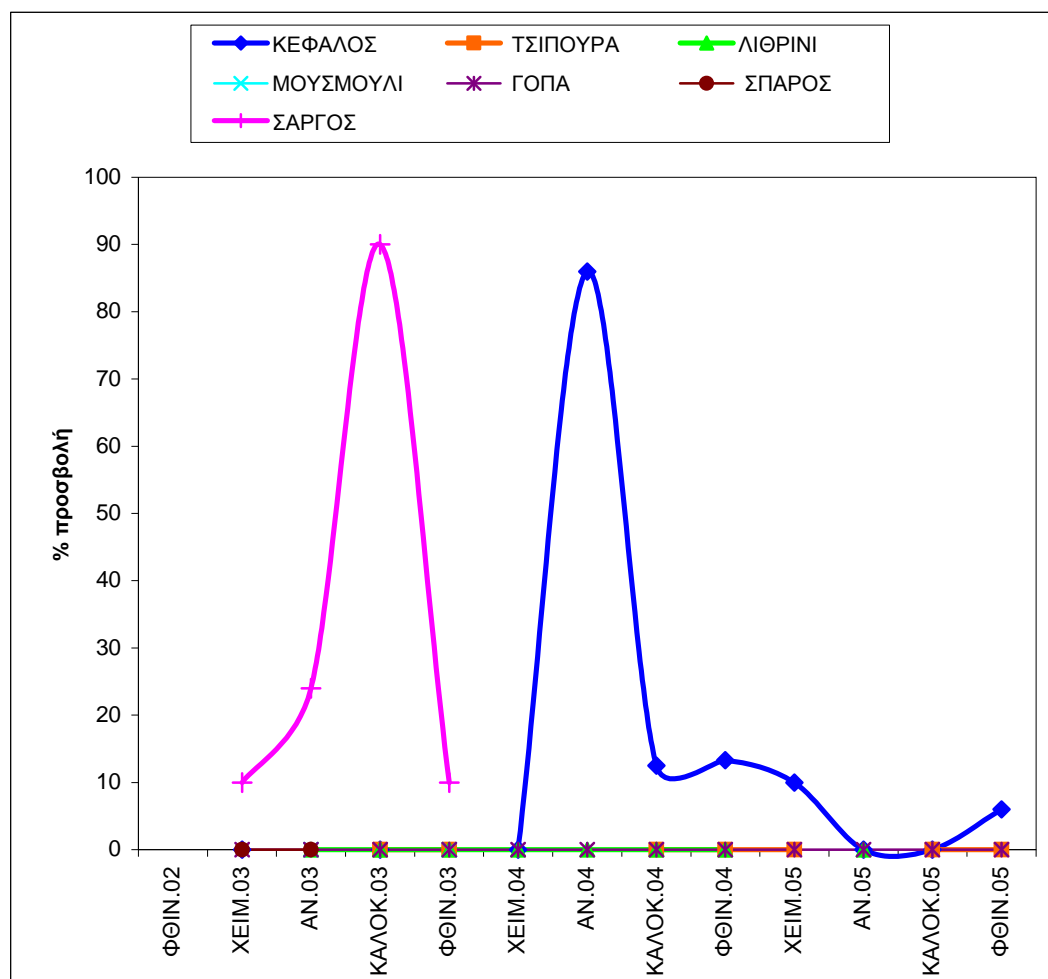
Άγρια ψάρια

Το παράσιτο *Myxobolus* sp. ανιχνεύτηκε επίσης και σε άγρια ψάρια, σαργό και κέφαλο. Η παρασίτωση από *Myxobolus* sp. εμφάνισε εποχικότητα, με κρίσιμη εποχή το καλοκαίρι για τον άγριο σαργό και την άνοιξη για τον κέφαλο, η στατιστική όμως ανάλυση των αποτελεσμάτων και ο μικρός αριθμός των πειραματικών δεδομένων δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Συγκεκριμένα, στον κέφαλο παρατηρήθηκε πρώτη φορά την άνοιξη του 2004 σε υψηλό ποσοστό 86±% και μειώθηκε σταδιακά μέχρι το χειμώνα του 2005 σε ποσοστό 10%, ενώ το φθινόπωρο του ίδιου έτους παρατηρήθηκε σε ποσοστό 6% (Γράφ. 3.1.11).

Στο σαργό, το *Myxobolus* sp. ανιχνεύτηκε σε όλες τις εποχές του πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία. Το χειμώνα η παρασίτωση ξεκίνησε σε χαμηλό ποσοστό 10% και αυξήθηκε σταδιακά φτάνοντας το μέγιστο ποσοστό προσβολής

(90%) το καλοκαίρι του 2003, ενώ το φθινόπωρο του ίδιου έτους μειώθηκε σε 10% (Γράφ. 3.1.11).

Στην άγρια τσιπούρα, στο λυθρίνι, στο μουσμούλι, στη γόπα και στο σπάρο *Myxobolus* sp. δεν παρατηρήθηκε σε καμία εποχιακή δειγματοληψία.



Γράφημα 3.1.11 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Myxobolus* sp. στα άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

3.1.3.3. Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του *Myxobolus* sp.

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι η παρασίτωση στα άγρια ψάρια εμφανίζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής συγκριτικά με τα εκτρεφόμενα ψάρια ($F_{9,74} = 6,685$, $P = 0,000$, ANOVA). Αξιοσημείωτο είναι ότι το

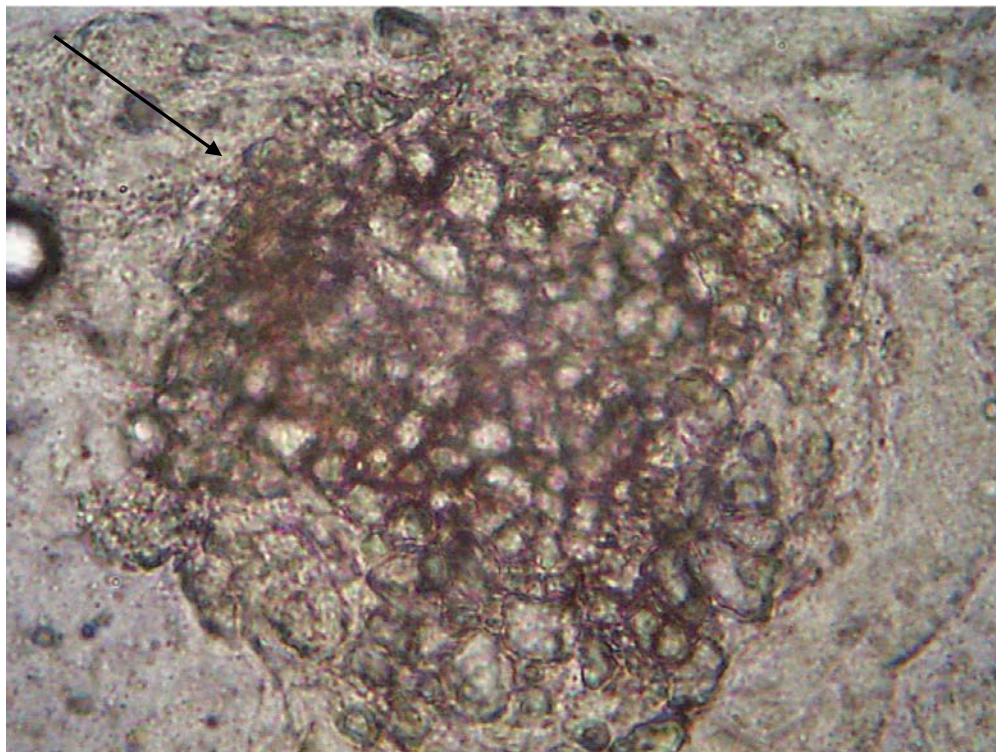
παράσιτο αυτό παρατηρήθηκε συγχρόνως στα εκτρεφόμενα ψάρια χιόνα και σαργό και στα άγρια ψάρια κέφαλο και σαργό το φθινόπωρο και το καλοκαίρι. Τα συνολικά ποσοστά προσβολής του παράσιτου για τα εκτρεφόμενα και τα άγρια ψάρια φαίνονται στον Πίν. 3.1.11. Επομένως, τόσο ο κέφαλος όσο και ο άγριος σαργός θα μπορούσαν να θεωρηθούν ξενιστές του *Myxobolus* sp. και πιθανοί φορείς του παράσιτου προς τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Πίνακας 3.1.11 Τα συνολικά ποσοστά προσβολής των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών

<i>Myxobolus</i> sp.	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ			ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΨΑΡΙΑ						
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΧΙΟΝΑ	ΣΑΡΓΟΣ	ΚΕΦΑΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΛΙΘΡΙΝΙ	ΜΟΥΣΜΟΥΛΙ	ΓΟΠΑ	ΣΠΑΡΟΣ	ΣΑΡΓΟΣ
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	0,00%	10,00%	3,33%	0,00%	0,00%		0,00%	0,00%	10,00%
ΑΝΟΙΞΗ	0,00%	3,70±3,70%	10,00%	43,00%		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	24,00%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	0,00%	8,33±8,33%	80,00%	4,17%	0,00%	0,00%		0,00%		90,00%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	0,00%	12,77±4,04%	25,00%	9,67%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		10,00%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	0,00%	6,20±4,01%	31,25%	15,04%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	33,50%

3.1.3.4 Άλλες αλλοιώσεις που σχετίζονται με την παρασίτωση από *Myxobolus* sp.

Στα εκτρεφόμενα (χιόνα και σαργό) και άγρια (κέφαλο και σαργό) μολυσμένα ψάρια με *Myxobolus* sp. παρατηρήθηκε μία αλλοίωση στο νεφρό, η οποία ενδέχεται να σχετίζεται με την παρασίτωση από *Myxobolus* sp. Συγκεκριμένα, ουρολιθίαση παρατηρήθηκε στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό, η οποία ήταν ίδιας μορφολογίας με αυτή που παρατηρήθηκε και στην περίπτωση από *P. sparis*.

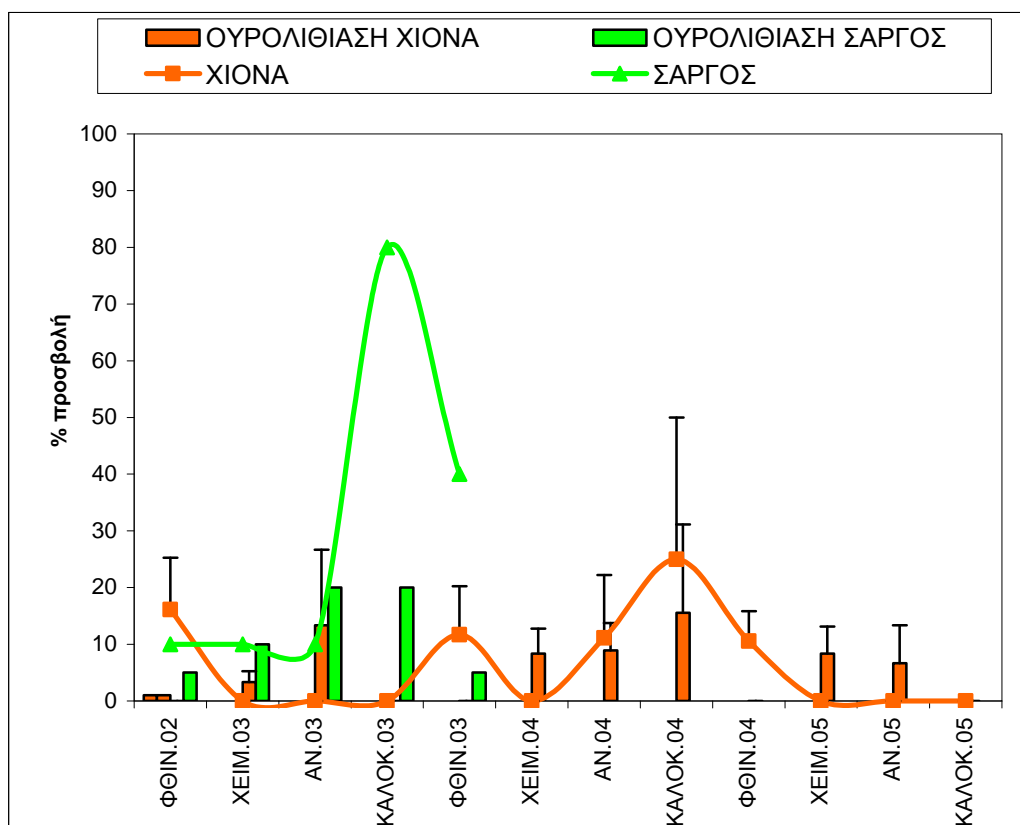


DC120 Exp 0.0302 secs Zoom 2.3
19/12/02 SARGUS SELONTA BOURLIA 2 CALC-FREE

Εικόνα 3.1.13 Ελεύθεροι κρύσταλλοι σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενου σαργού, x400.

Εποχιακή κατανομή παρατήρησης ουρολιθίασης στα μολυσμένα με Myxobolus sp. εκτρεφόμενα ψάρια

Ουρολιθίαση παρατηρήθηκε σε μολυσμένη με *Myxobolus* sp. εκτρεφόμενη χιόνα και σαργό. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στην περίπτωση της χιόνα για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005) και της μίας μονάδας εκτροφής στην περίπτωση του σαργού για το έτος 2003, που πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες. Στον εκτρεφόμενο σαργό, ουρολιθίαση παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2002 σε ποσοστό προσβολής 5%, ποσοστό που αυξήθηκε σε 10% και 20% το χειμώνα και την άνοιξη του 2003 αντίστοιχα. Το καλοκαίρι του 2003 διατηρήθηκε στο ποσοστό 20%, ενώ το φθινόπωρο του 2003 μειώθηκε σε 5% (Γράφ. 3.1.12). Στη χιόνα, ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το χειμώνα του 2003 σε ποσοστό προσβολής 3,33%, ποσοστό το οποίο αυξήθηκε σε 13,3% την άνοιξη του ίδιου έτους. Την επόμενη χρονιά (2004) ανιχνεύτηκε το χειμώνα και την άνοιξη σε παρόμοια ποσοστά, 8,33% και 8,89% αντίστοιχα, ενώ το καλοκαίρι το ποσοστό αυξήθηκε σε 15,5%. Το φθινόπωρο του 2004 η αλλοίωση αυτή δεν ανιχνεύτηκε ενώ τον χειμώνα και την άνοιξη του 2005 ανιχνεύτηκε, σε ποσοστά 15,5% και 17,7% αντίστοιχα (Γράφ. 3.1.12).



Γράφημα 3.1.12 Μεταβολή του ποσοστού εμφάνισης των αλλοιώσεων MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης, στα μολυσμένα με *Myxobolus* sp. εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν αποκάλυψε σημαντική επίδραση της εποχής και του συνόλου των εποχών στην εμφάνιση της ουρολιθίασης. Ομοίως, η παρασίτωση από *Myxobolus* sp. στον εκτρεφόμενο σαργό αν και εμφάνισε εποχικότητα, με κρίσιμη εποχή το καλοκαίρι, ο μικρός όμως αριθμός των πειραματικών δεδομένων δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, όπως και στην περίπτωση της χιόνας. Τα συνολικά ποσοστά εμφάνισής τους στα δύο εκτρεφόμενα είδη φαίνονται στους Πίνακες 3.1.12 και 3.1.13. Επομένως, η αλλοίωση αυτή ενδέχεται να σχετίζεται με την παρασίτωση από το *Myxobolus* sp. και στα δύο εκτρεφόμενα είδη.

Πίνακας 3.1.12 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *Mycobolus* sp. και της ουρολιθίασης στην εκτρεφόμενη χιόνα.

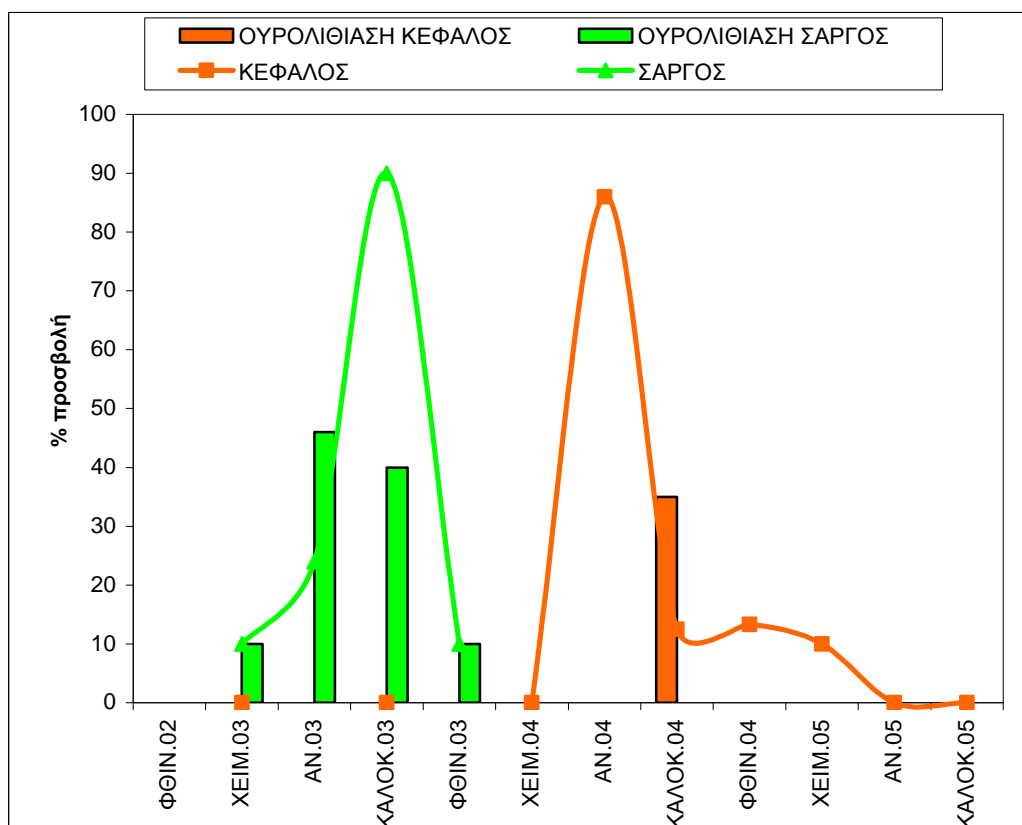
	<i>Mycobolus</i> sp.	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	6,66±2,13%
ΑΝΟΙΞΗ	3,70±3,70%	9,63±4,62%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	8,33±8,33%	5,18±5,18%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	12,77±4,04%	0%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	6,20±4,01%	5,37±2,01%

Πίνακας 3.1.13 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *Mycobolus* sp. και της ουρολιθίασης στον εκτρεφόμενο σαργό.

	<i>Mycobolus</i> sp.	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	10%	10%
ΑΝΟΙΞΗ	10%	20%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	80%	20%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	25%	5%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	31,25%	13,75%

*Εποχιακή κατανομή παρατήρησης ουρολιθίασης στα μολυσμένα με *Mycobolus* sp. άγρια ψάρια*

Ουρολιθίαση παρατηρήθηκε σε μολυσμένο με *Mycobolus* sp. άγριο κέφαλο και σαργό. Στον άγριο σαργό ουρολιθίαση παρατηρήθηκε σε όλες τις εποχές του πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία. Το χειμώνα η παρασίτωση ξεκίνησε σε χαμηλό ποσοστό 10% και αυξήθηκε σταδιακά φτάνοντας το μέγιστο ποσοστό προσβολής 46% και 40% την άνοιξη και το καλοκαίρι αντίστοιχα, ενώ το φθινόπωρο του ίδιου έτους μειώθηκε σε 10% (Γράφ. 3.1.13). Στον κέφαλο ουρολιθίαση παρατηρήθηκε μόνο το καλοκαίρι του 2004 (Γράφ. 3.1.13).



Γράφημα 3.1.13 Μεταβολή του ποσοστού εμφάνισης των αλλοιώσεων MMC-ΣΥΝΔ και ουρολιθίασης στα μολυσμένα με *Myxobolus* sp. άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν αποκάλυψε σημαντική επίδραση της εποχής και του συνόλου των εποχών στην εμφάνιση της ουρολιθίασης. Ομοίως, η παρασίτωση από *Myxobolus* sp. αν και εμφάνισε εποχικότητα, με κρίσιμη εποχή το καλοκαίρι για τον άγριο σαργό και την άνοιξη για τον κέφαλο, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και ο μικρός αριθμός των πειραματικών δεδομένων δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Τα συνολικά ποσοστά εμφάνισής τους στα δύο άγρια είδη φαίνονται στους Πίνακες 3.1.14 και 3.1.15. Επομένως, η αλλοίωση αυτή ενδέχεται να σχετίζεται με την παρασίτωση από το *Myxobolus* sp. και στα δύο είδη άγριων ψαριών.

Πίνακας 3.1.14 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *Myxobolus* sp. και της ουρολιθίασης στον άγριο σαργό.

	<i>Myxobolus</i> sp.	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	10%	10%
ΑΝΟΙΞΗ	24%	46%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	90%	40%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	10%	10%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	33,50%	26,50%

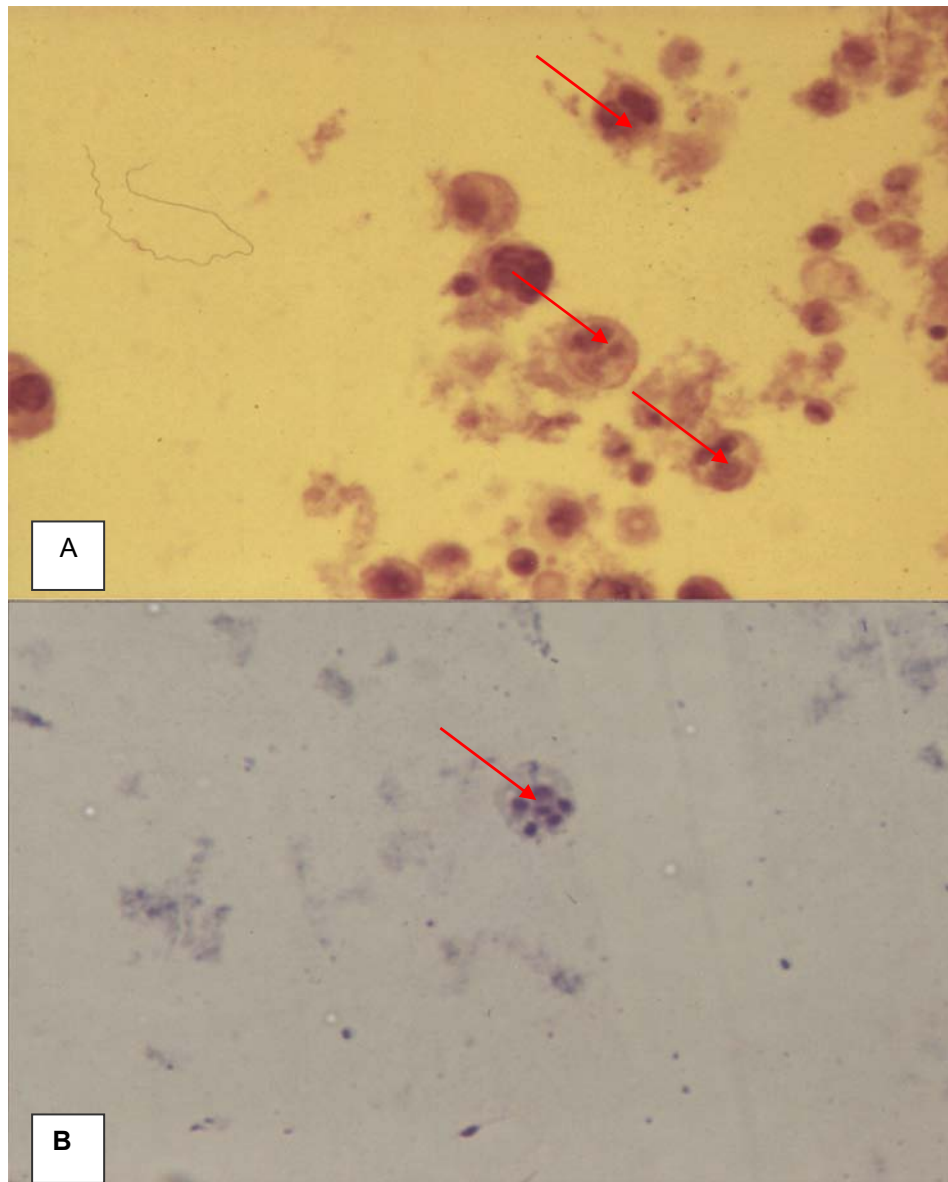
Πίνακας 3.1.15 Συνολικά ποσοστά εμφάνισης του *Myxobolus* sp. και της ουρολιθίασης στον άγριο κέφαλο

	<i>Myxobolus</i> sp.	Ουρολιθίαση
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	3,33%	0%
ΑΝΟΙΞΗ	43%	0%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	4,17%	11,67%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	9,67%	0%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	15,04%	2,92%

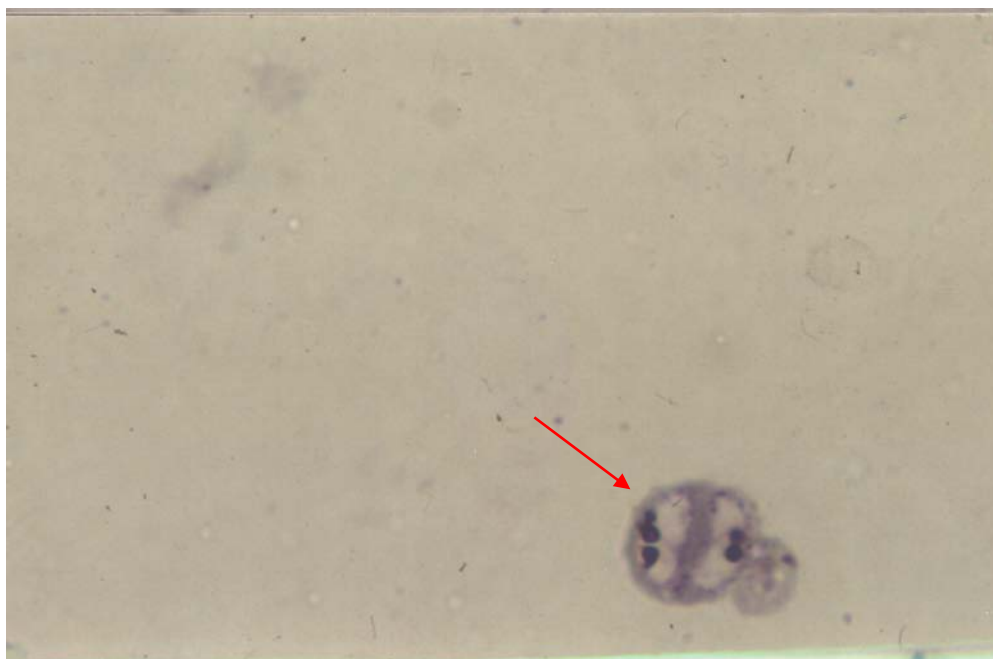
3.1.4 *Ceratomyxa* sp.

3.1.4.1 Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου *Ceratomyxa* sp.

Τροφοζωίτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι του παράσιτου *Ceratomyxa diplodae* Lubat, Radujkovic, Marques & Bouix 1989 (Εικόνες 3.1.14 A, B, 3.1.15, 3.1.16) και *Ceratomyxa sparusaurati* Sitjà-Bobadilla, Palenzuela & Alvarez-Pellitero 1995 (Εικ. 3.1.17) παρατηρήθηκαν στη χοληδόχο κύστη σε εκτρεφόμενη χιόνα, εκτρεφόμενη και άγρια τσιπούρα αντίστοιχα.



Εικόνα 3.1.14 Τροφοζωίτες (→) του παράσιτου *C. diplodae* σε επιχρίσματα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης χιόνας (A. χρώση H & E, B. χρώση Giemsa x 400).



Εικόνα 3.1.15 Σποροβλάστες (→) του παράσιτου *C. diplodae* σε επίχρισμα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης χιόνας (Giemsa, x 400).



Εικόνα 3.1.16 Ωριμοι σπόροι (→) του παράσιτου *C. diplodae* σε επίχρισμα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης χιόνα (x400).



Εικόνα 3.1.17 Ωριμος σπόρος (→) του παράσιτου *C. sparusaurati* σε επίχρισμα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης τσιπούρας (x 400).

Επίσης ένα μη ταυτοποιημένο είδος *Ceratomyxa* ανιχνεύτηκε στη χοληδόχο κύστη άγριας γόπας.

Το σχήμα των ώριμων σπόρων ήταν τοξοειδές με επιμήκεις άκρες, ενώ στο σπορόπλασμα παρατηρήθηκαν δύο ισομεγέθεις σφαιρικές πολικές κάψες τοποθετημένες στο κέντρο του σποροπλάσματος, η μία κοντά στην άλλη. Οι σποροβλάστες ήταν δίσποροι ενώ οι τροφοζωίτες ήταν μικροί και κυκλικοί. Στον Πίν. 3.1.16 φαίνονται οι διαστάσεις του παράσιτου στον τυπικό ξενιστή. Με χρώση Giemsa οι πολικές κάψες βάφτηκαν σκούρο μπλε και το σπορόπλασμα ροζ.

Πίνακας 3.1.16: Διαστάσεις του παράσιτου *C. diplodae* στον τυπικό ξενιστή (μm)

Παράσιτο	Παρασιτούμενο όργανο	Ωριμοί σπόροι (n=30)	
		Πλάτος ($\bar{X} \pm SD$)	Μήκος ($\bar{X} \pm SD$)
<i>C. diplodae</i>	Έντερο	7±0,3	17± 0,2
	Χολ. κύστη	7±0,3	17±0,2

3.1.4.2 Εποχιακή κατανομή του *Ceratomyxa* sp.

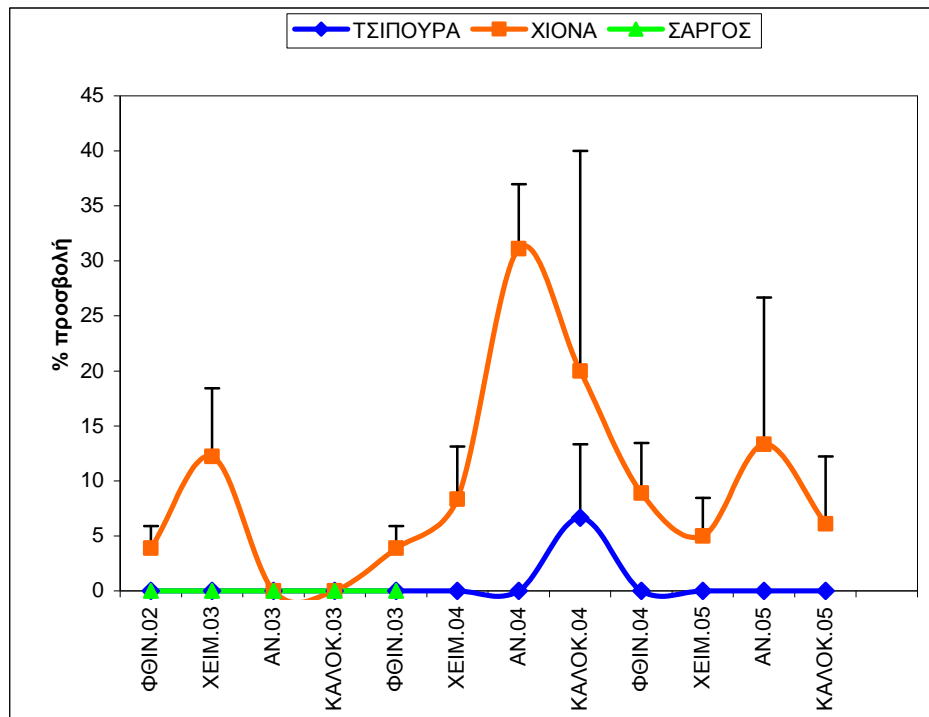
Εκτρεφόμενα ψάρια

Το παράσιτο *Ceratomyxa* sp. παρατηρήθηκε στα εκτρεφόμενα είδη, τσιπούρα και χιόνα που εξετάστηκαν. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή, αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

Στη χιόνα, το *C. diplodae* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2002 σε ποσοστό προσβολής 3,89±2% και αυξήθηκε σε 12,2±6,19% το χειμώνα του 2003. Την άνοιξη και το καλοκαίρι του 2003 δεν ανιχνεύτηκε, ενώ το φθινόπωρο του 2003 το ποσοστό προσβολής άρχισε να αυξάνεται (3,89±2%) και μέχρι την άνοιξη του 2004 έφτασε το 31,1±5,88%. Από το καλοκαίρι του ίδιου έτους το ποσοστό άρχισε να μειώνεται (20±20%), ενώ το φθινόπωρο του 2004 και τον χειμώνα του 2005 έφτασε σε 8,89±4,55% και 5±3,47% αντίστοιχα. Την άνοιξη του 2005 το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε σε 13,33±13,33%, ενώ το καλοκαίρι του 2005 μειώθηκε ξανά σε 6,11±6,11% (Γράφ. 3.1.15).

Στην τσιπούρα, το *C. sparusaurati* παρατηρήθηκε μόνο το καλοκαίρι του 2004 σε ποσοστό προσβολής 6,67±6,67% (Γράφ. 3.1.15).

Στον εκτρεφόμενο σαργό, το παράσιτο *Ceratomyxa* sp. δεν παρατηρήθηκε.

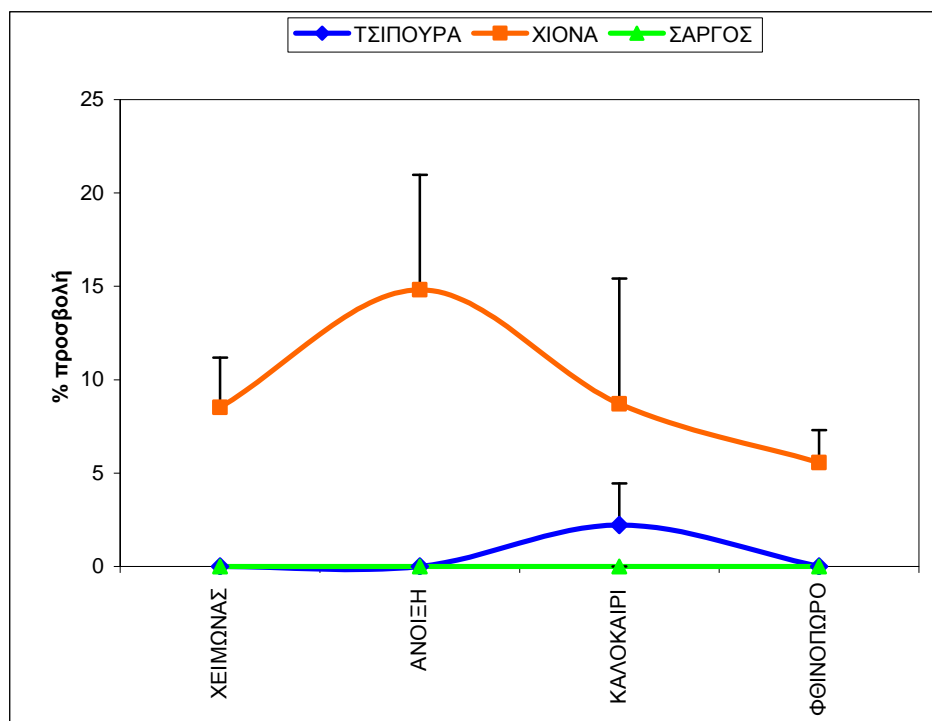


Γράφημα 3.1.15 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Ceratomyxa* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στην περίπτωση της εκτρεφόμενης χιόνας παρατηρήθηκε κάποια εποχικότητα στην εμφάνιση του *C. diplodae* με κρίσιμη εποχή ανάπτυξης της παρασίτωσης την άνοιξη ($14,81 \pm 6,16\%$), όμως η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε μία μη σημαντική επίδραση της εποχής στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της παρασίτωσης (Γράφ. 3.1.16). Στην περίπτωση της εκτρεφόμενης τσιπούρας μία μικρή αύξηση του ποσοστού προσβολής του *C. sparusaaurati* παρατηρήθηκε το καλοκαίρι ($2,22 \pm 2,22\%$), ο μικρός όμως αριθμός των πειραματικών δεδομένων εξαιτίας του ότι παρατηρήθηκε μόνο σε μία μεμονωμένη περίπτωση, δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους, το Post hoc Games-Howell τεστ διαχωρίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά μόλυνσης μεταξύ εκτρεφόμενης χιόνας και τσιπούρας ($8,84 \pm 2,44$, $P = 0,026$, Games-Howell

test). Επομένως, η εκτρεφόμενη χιόνα μπορεί να θεωρηθεί ο σημαντικότερος ξενιστής του παράσιτου αυτού στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.



Γράφημα 3.1.16 Μεταβολή των συνολικών ποσοστών προσβολής του *Ceratomyxa* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια.

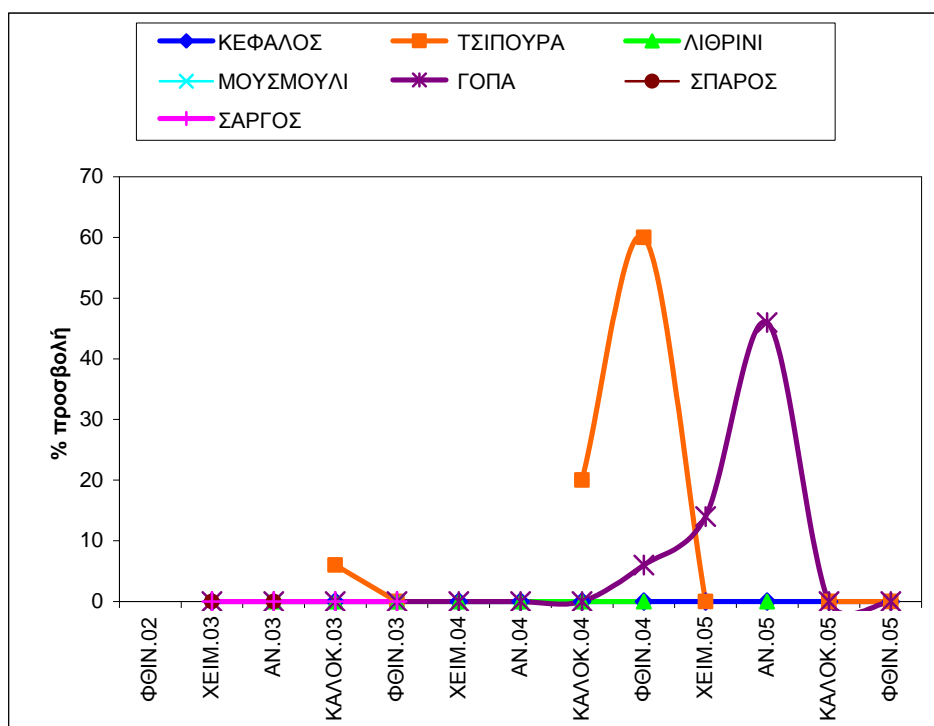
Άγρια ψάρια

Το παράσιτο *Ceratomyxa* sp. ανιχνεύτηκε επίσης και σε άγρια ψάρια, τσιπούρα και κέφαλο (Γράφ. 3.1.17). Συγκεκριμένα, στην τσιπούρα το παράσιτο *C. sparusaaurati* ανιχνεύτηκε σε δύο καλοκαιρινές δειγματοληψίες (2003 και 2004) σε ποσοστά 6% και 20% αντίστοιχα, ενώ το φθινόπωρο του 2004 ανιχνεύτηκε το μεγαλύτερο παρατηρούμενο ποσοστό (60%).

Στη γόπα, ένα μη ταυτοποιημένο είδος του γένους *Ceratomyxa* ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το φθινόπωρο του 2004 σε χαμηλό ποσοστό 6% και αυξήθηκε σταδιακά τον χειμώνα (14%) και την άνοιξη του ίδιου έτους (46%), ενώ από καλοκαίρι του 2004 δεν ανιχνεύτηκε ξανά.

Στα άγρια ψάρια, τσιπούρα και γόπα, παρά το γεγονός ότι ανιχνεύτηκαν δύο κρίσιμες εποχές ανάπτυξης της παρασίτωσης από *Ceratomyxa* sp. (φθινόπωρο 2004 στην άγρια τσιπούρα, 60% και άνοιξη 2005 στην άγρια γόπα, 46%) ο μικρός αριθμός των πειραματικών δεδομένων, εξαιτίας του ότι το παράσιτο ανιχνεύτηκε μόνο σε δύο μεμονωμένες περιπτώσεις, δεν επέτρεψε την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την εμφάνιση κάποιας εποχικότητας.

Στον κέφαλο, στο λιθρίνι, στο σπάρο, στο μουσμούλι και στον άγριο σαργό το παράσιτο *Ceratomyxa* sp. δεν ανιχνεύτηκε.



Γράφημα 3.1.17 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Ceratomyxa* sp. στα άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

3.1.4.3 Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του *Ceratomyxa* sp.

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά προσβολής των μολυσμένων ψαριών (άγρια και εκτρεφόμενα) για το σύνολο των εποχών, έτσι τα μολυσμένα άγρια ψάρια μπορούν να θεωρηθούν εξίσου σημαντικοί ξενιστές του παράσιτου όπως και η εκτρεφόμενη χιόνα η οποία είναι ο σημαντικότερος εκτρεφόμενος ξενιστής του *Ceratomyxa* sp. ($8,84 \pm 2,44$, $P = 0,026$, Games-Howell test).

Αξιοσημείωτο είναι ότι το παράσιτο ανιχνεύτηκε συγχρόνως τόσο στα εκτρεφόμενα είδη τα οποία εξετάστηκαν όσο και σε άγρια ψάρια. Συγκεκριμένα, το φθινόπωρο ανιχνεύτηκε στην εκτρεφόμενη χιόνα και την άγρια τσιπούρα ενώ την άνοιξη στην εκτρεφόμενη χιόνα και την άγρια γόπα. Τα συνολικά ποσοστά προσβολής του παράσιτου για τα εκτρεφόμενα και τα άγρια ψάρια φαίνονται στον Πίν. 3.1.17. Επομένως, τόσο τα άγρια όσο και τα εκτρεφόμενα ψάρια θα μπορούσαν να θεωρηθούν ξενιστές του *Ceratomyxa* sp. και πιθανοί φορείς του παράσιτου από και προς τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Πίνακας 3.1.17 Συνολικά ποσοστά προσβολής των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών										
<i>Ceratomyxa</i> sp.	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ			ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΨΑΡΙΑ						
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΧΙΟΝΑ	ΣΑΡΓΟΣ	ΚΕΦΑΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΛΙΘΡΙΝΙ	ΜΟΥΣΜΟΥΛΙ	ΓΟΠΑ	ΣΠΑΡΟΣ	ΣΑΡΓΟΣ
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	8,52±2,68%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		4,67%	0,00%	0,00%
ΑΝΟΙΞΗ	0,00%	14,81±6,16%	0,00%	0,00%		0,00%	0,00%	15,33%	0,00%	0,00%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	2,22±2,22%	8,70±6,72%	0,00%	0,00%	8,67%	0,00%		0,00%		0,00%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	0,00%	5,55±1,76%	0,00%	0,00%	20,00%	0,00%	0,00%	2,00%		0,00%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	0,56±0,55%	9,40±4,33%	0,00%	0,00%	9,56%	0,00%	0,00%	5,50%	0,00%	0,00%

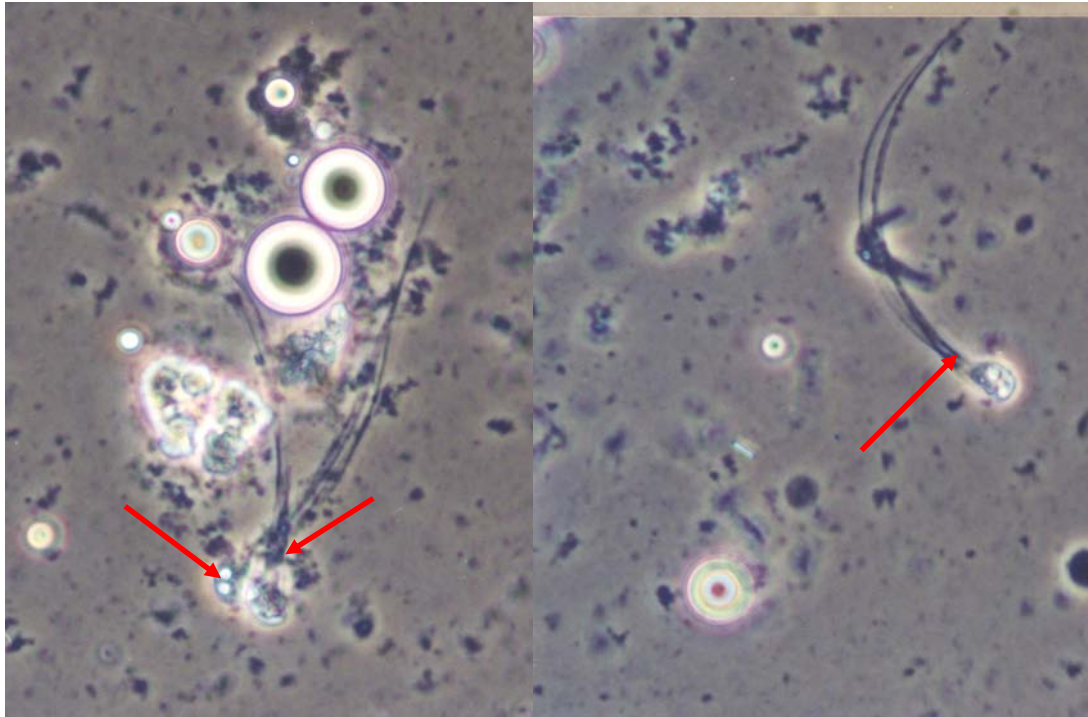
3.1.5 *Henneguya* sp.

3.1.5.1 Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου *Henneguya* sp.

Τροφοζώιτες και ώριμοι σπόροι του παράσιτου *Henneguya* sp. (Εικόνες 3.1.18, 3.1.19) παρατηρήθηκαν στη χοληδόχο κύστη σε εκτρεφόμενη χιόνα και σε άγρια τσιπούρα.



Εικόνα 3.1.18 Όριμοι σπόροι (→) του παράσιτου *Henneguya* sp., σε επίχρισμα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης χιόνας (x 400).



Εικόνα 3.1.19 Ωριμοι σπόροι (→) του παράσιτου *Henneguya* sp., σε επίχρισμα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης χιόνας (αντίθεση φάσης x 400).

Το σχήμα των ώριμων σπόρων ήταν κυκλικό, ελλειψοειδές ή ατρακτοειδές, με δύο ουραίες προεκτάσεις. Το σποροόπλασμα ήταν διπύρρηνο και παρατηρήθηκαν δύο απιοειδείς πολικές κάψες. Οι τροφοζωίτες ήταν μεγαλύτεροι σε μέγεθος και με σχήμα παρόμοιο με αυτό των ώριμων σπόρων. Στον Πίν. 3.1.18 φαίνονται οι διαστάσεις του παράσιτου στον τυπικό ξενιστή. Με χρώση Giemsa οι πολικές κάψες βάφτηκαν σκούρο μπλε και το σποροόπλασμα ροζ.

Πίνακας 3.1.18: Διαστάσεις του παράσιτου *Henneguya* sp. στον τυπικό ξενιστή (μm)

Παράσιτο	Παρασιτούμενο όργανο	Ωριμοι σπόροι (n=30)	
		Πλάτος ($\bar{X} \pm SD$)	Μήκος ($\bar{X} \pm SD$)
<i>Henneguya</i> sp.	Χοληδόχος κύστη	5,9±0,8	74,7±10,1

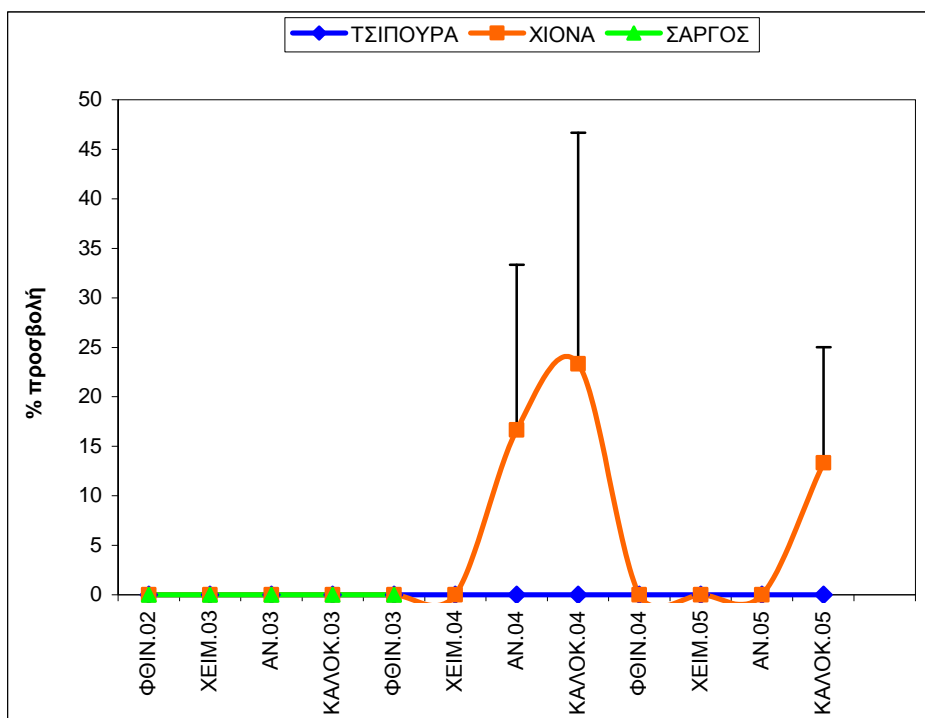
3.1.5.2 Εποχιακή κατανομή του *Henneguya* sp.

Εκτρεφόμενα ψάρια

Το παράσιτο *Henneguya* sp. παρατηρήθηκε μόνο σε εκτρεφόμενη χιόνα, σε μία από τις τρεις μονάδες εκτροφής. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή αφορά στον μέσο όρο των ποσοστών των τριών μονάδων εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

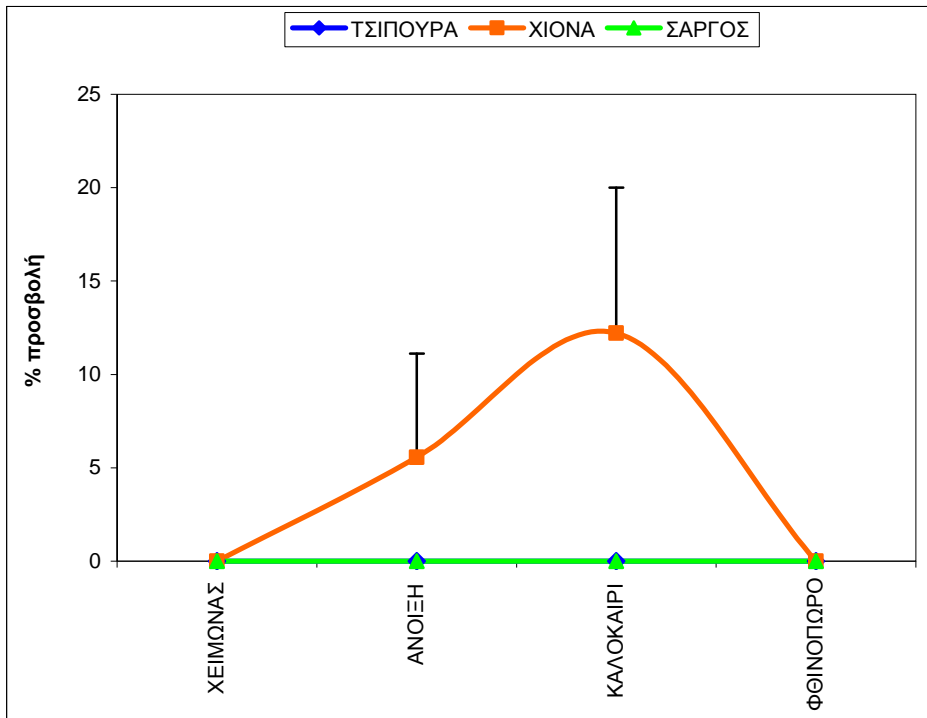
Εμφανίστηκε για πρώτη φορά την άνοιξη του 2004 σε ποσοστό προσβολής $16,67 \pm 16,67\%$ και το καλοκαίρι του ίδιου έτους αυξήθηκε σε $23,33 \pm 23,33\%$. Στις επόμενες δειγματοληψίες δεν ανιχνεύτηκε μέχρι το καλοκαίρι του 2005 που εμφανίστηκε ξανά σε ποσοστό $13,33 \pm 13,33\%$ (Γράφ. 3.1.18).

Στην εκτρεφόμενη τσιπούρα και στον εκτρεφόμενο σαργό το παράσιτο *Henneguya* sp. δεν παρατηρήθηκε.



Γράφημα 3.1.18 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Henneguya* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι, αν και φαίνεται να εμφανίζεται εποχικότητα στην ανάπτυξη της παρασίτωσης από *Henneguya* sp. στην εκτρεφόμενη χιόνα, δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της εποχής στην εμφάνιση και την ανάπτυξη της παρασίτωσης (Γράφ. 3.1.19).

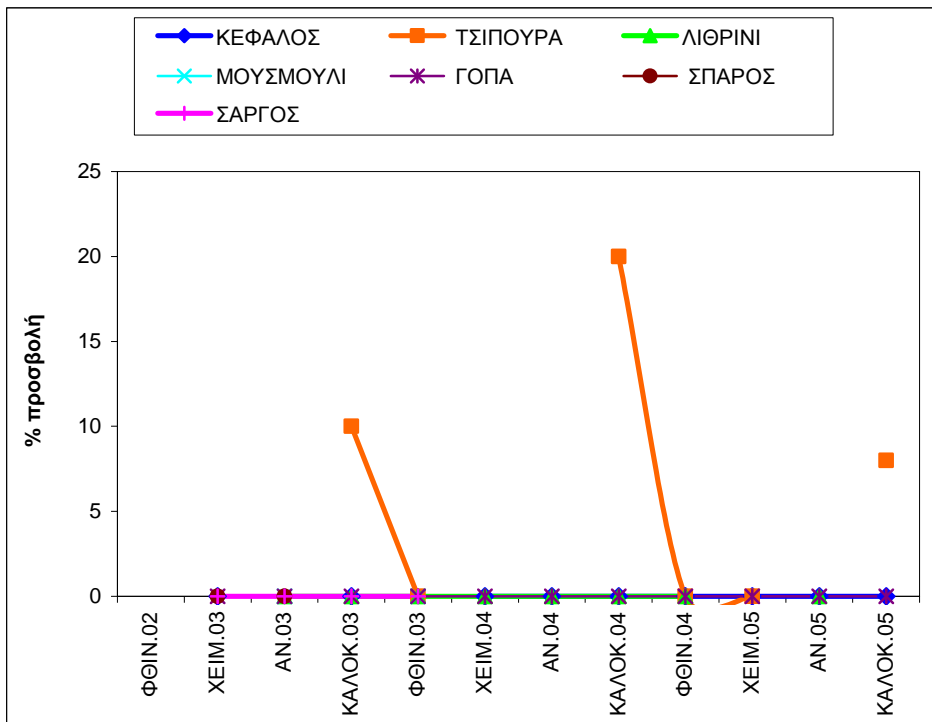


Γράφημα 3.1.19 Μεταβολή των συνολικών ποσοστών προσβολής του *Henneguya* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια.

Άγρια ψάρια

Το παράσιτο *Henneguya* sp. ανιχνεύτηκε επίσης και σε άγρια τσιπούρα (Γράφ. 3.1.20). Συγκεκριμένα, το παράσιτο παρατηρήθηκε κάθε καλοκαίρι (2003, 2004, 2005) σε ποσοστά προσβολής 10%, 20% και 8% αντίστοιχα.

Στον κέφαλο, στο λιθρίνι, στο μουσμούλι, στη γόπα, στο σπάρο και στον άγριο σαργό το παράσιτο *Henneguya* sp. δεν ανιχνεύτηκε.



Γράφημα 3.1.20 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Henneguya* sp. στα άγρια ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

3.1.5.3 Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση του *Henneguya* sp.

Σε σχέση με την επιβάρυνση του παράσιτου στο σύνολο των εποχών του έτους η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι τόσο η άγρια τσιπούρα όσο και η εκτρεφόμενη χιόνα είναι το ίδιο σημαντικοί ξενιστές του *Henneguya* sp. καθόσον δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ψαριών για το σύνολο των εποχών ($F_{9,86} = 0,659$, $P = 0,744$, ANOVA). Αξιοσημείωτο είναι ότι το καλοκαίρι το παράσιτο παρατηρήθηκε συγχρόνως τόσο στην εκτρεφόμενη χιόνα όσο και στην άγρια τσιπούρα. Τα συνολικά ποσοστά προσβολής του παράσιτου για τα εκτρεφόμενα και τα άγρια ψάρια φαίνονται στον Πίν. 3.1.19. Επομένως, τόσο η άγρια τσιπούρα όσο και η εκτρεφόμενη χιόνα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ξενιστές του *Henneguya* sp. και πιθανοί φορείς του παράσιτου από ή προς τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Πίνακας 3.1.19 Συνολικά ποσοστά προσβολής των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών										
<i>Henneguya</i> sp.	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΨΑΡΙΑ			ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ ΣΕ ΑΓΡΙΑ ΨΑΡΙΑ						
	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΧΙΟΝΑ	ΣΑΡΓΟΣ	ΚΕΦΑΛΟΣ	ΤΣΙΠΟΥΡΑ	ΛΙΘΡΙΝΙ	ΜΟΥΣΜΟΥΛΙ	ΓΟΠΑ	ΣΠΑΡΟΣ	ΣΑΡΓΟΣ
ΧΕΙΜΩΝΑΣ	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		0,00%	0,00%	0,00%
ΑΝΟΙΞΗ	0,00%	5,56±5,56%	0,00%	0,00%		0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ	0,00%	12,22±7,78%	0,00%	0,00%	12,67%	0,00%		0,00%		0,00%
ΦΘΙΝΟΠΩΡΟ	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		0,00%
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΟΣΒΟΛΗΣ	0,00%	4,44±3,33%	0,00%	0,00%	4,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

3.1.6 *Kudoa* sp.

3.1.6.1 Μορφολογική ταυτοποίηση του παράσιτου *Kudoa* sp.

Το παράσιτο *Kudoa* sp. παρατηρήθηκε σε μυικό ιστό μόνο στην περίπτωση του εκτρεφόμενο σαργού (Εικ. 3.1.20).



Εικόνα 3.1.20 Όριμοι σπόροι (→) του παράσιτου *Kudoa* sp., σε επίχρισμα μυικού ιστού εκτρεφόμενου σαργού (Giemsa x 400).

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν ώριμοι σπόροι αστεροειδούς σχήματος με ένα μόνο σπορόπλασμα στο οποίο περιέχονται δύο ανισομεγέθεις πυρήνες και τέσσερις απιοειδείς ισομεγέθεις πολικές κάψες. Στον Πίν. 3.1.20 φαίνονται οι διαστάσεις του παράσιτου στον τυπικό ξενιστή. Με χρώση Giemsa οι πολικές κάψες βάφτηκαν σκούρο μπλε και το σπορόπλασμα ροζ.

Πίνακας 3.1.20: Διαστάσεις του παράσιτου *Kudoa* sp. στον τυπικό ξενιστή (μm)

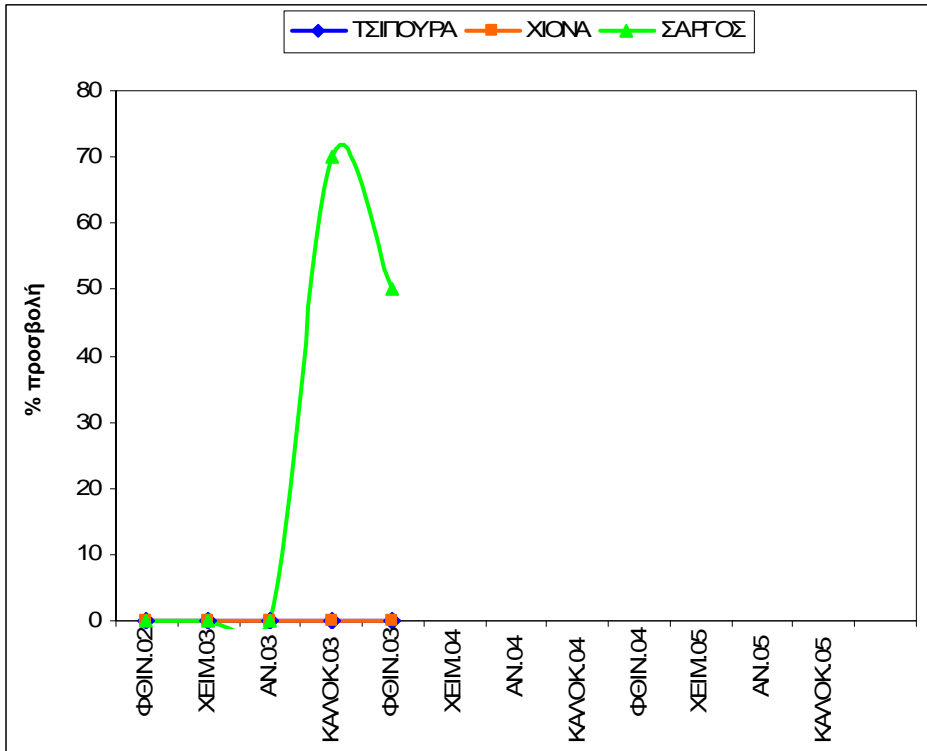
Παράσιτο	Παρασιτούμενο όργανο	Ωριμοί σπόροι (n=30)	
		Φάρδος ($\bar{X} \pm SD$)	Μήκος ($\bar{X} \pm SD$)
<i>Kudoa</i> sp.	Μυϊκός ιστός	7,94±0.9	5,41±0.4

3.1.6.2 Εποχιακή κατανομή του *Kudoa* sp.

Εκτρεφόμενα ψάρια

Το παράσιτο *Kudoa* sp. ανιχνεύτηκε μόνο στην περίπτωση του εκτρεφόμενου σαργού. Το συνολικό ποσοστό προσβολής για κάθε εποχή αφορά στο ποσοστό της μίας από τις τρεις μονάδες εκτροφής στις οποίες πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες, για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

Η παρασίτωση ξεκίνησε από το καλοκαίρι του 2003 σε ποσοστό προσβολής 70% και συνεχίστηκε μέχρι και τους φθινοπωρινούς μήνες του ίδιου έτους σε ποσοστό προσβολής 50% (Γράφ. 3.1.21).



Γράφημα 3.1.21 Μεταβολή του ποσοστού προσβολής του *Kudoa* sp. στα εκτρεφόμενα ψάρια σε κάθε εποχή δειγματοληψίας.

Άγρια ψάρια

Στα άγρια ψάρια που εξετάστηκαν το παράσιτο δεν ανιχνεύτηκε.

3.1.7 Σύνοψη των Μυξοσποριδίων παρασίτων που ανιχνεύτηκαν στα εκτρεφόμενα και άγρια είδη ψαριών που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα

Στους παρακάτω πίνακες συνοψίζονται τα είδη των μυξοσποριδίων παρασίτων τα οποία ανιχνεύτηκαν στα εκτρεφόμενα και στα άγρια είδη ψαριών τα οποία εξετάστηκαν για το χρονικό διάστημα των τριών ετών (2002-2005).

Πίνακας 3-1. Είδη των Μυξοσποριδίων τα οποία ανιχνεύτηκαν στα εκτρεφόμενα ψάρια				
Είδος Μυξοσποριδίου	Ξενιστής	Μέγιστο ποσοστό προσβολής (%)	Εποχή	Όργανο στόχος
<i>E. leei</i>	Τ, ΧΙ, Σ	55,93(ΧΙ)	Κ	Έντερο
<i>P. sparís</i>	Τ, ΧΙ	26,3 (Τ)	Κ	Νεφρός
<i>Ceratomyxa</i> sp.	Τ, ΧΙ	14,81(ΧΙ)	Α	Χολ. Κύστη
<i>Myxobolus</i> sp.	ΧΙ, Σ	80(Σ)	Κ	Νεφρός
<i>Henneguya</i> sp.	ΧΙ	12,22 (ΧΙ)	Κ	Χολ. Κύστη
<i>Kudoa</i> sp.	Σ	70 (Σ)	Κ	Μυϊκός ιστός

Α: άνοιξη, Κ: καλοκαίρι,
Τ: Τσιπούρα, ΧΙ: Χιόνα, Σ: Σαργός

Πίνακας 3-2. Είδη των Μυξοσποριδίων τα οποία ανιχνεύτηκαν στα άγρια ψάρια				
Είδος Μυξοσποριδίου	Ξενιστής	Μέγιστο ποσοστό προσβολής (%)	Εποχή	Όργανο στόχος
<i>E. leei</i>	ΚΕ, Τ	6,67 (ΚΕ)	Κ	Έντερο
<i>P. sparís</i>	ΚΕ, Τ, Λ	42 (ΚΕ)	Κ	Νεφρός
<i>Ceratomyxa</i> sp.	Τ, Γ	20 (Τ)	Φ	Χολ. Κύστη
<i>Myxobolus</i> sp.	ΚΕ, Σ	90 (Σ)	Κ	Νεφρός
<i>Henneguya</i> sp.	Τ	12,67 (Τ)	Κ	Χολ. Κύστη
<i>Kudoa</i> sp.	-	-	-	-

Φ:φθινόπωρο, Κ: καλοκαίρι,
Τ: Τσιπούρα, Χ: Χιόνα, Σ: Σαργός, ΚΕ: Κέφαλος, Λ: Λιθρίνι, Γ: Γόπα

Συμπερασματικά, τα παράσιτα αυτά βρέθηκε να παρασιτούν σε μεγάλο ποσοστό σε εκτρεφόμενα και άγρια είδη, όπως τσιπούρα, χιόνα και σαργός, καθώς επίσης και άγριο κέφαλο, λιθρίνι και γόπα. Το μέγιστο ποσοστό προσβολής διαπιστώθηκε ότι επηρεαζόταν από την εποχή, ενώ το όργανο στόχος του κάθε παράσιτου ήταν διαφορετικό. Από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι τα περισσότερα είδη Μυξοσποριδίων παρατηρήθηκαν τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, το καλοκαίρι παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής για όλα τα Μυξοσπορίδια σε όλα τα είδη ψαριών που μελετήθηκαν, άγρια και εκτρεφόμενα, συγκριτικά με τις άλλες τρεις εποχές ($P < 0,05$). Μάλιστα, οι διαφορές επιπέδων προσβολής ακολουθούν τη αύξουσα σειρά με την άνοιξη ($6,01 \pm 1,89$, $P = 0,009$, Games-Howell test), το φθινόπωρο ($6,97 \pm 1,80$, $P = 0,001$, Games-Howell test) και του χειμώνα ($8,85 \pm 1,70$, $P = 0,000$, Games-Howell test), ενώ υπήρξε οριακά στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ άνοιξης και χειμώνα ($2,84 \pm 1,10$, $P = 0,049$, Games-Howell test).

3.2 Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με *E. leei* σε χιόνα και μελέτη ορισμένων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας που αναπτύσσονται κατά τη μόλυνση.

Μέχρι σήμερα για τα θαλάσσια Μυξοσπορίδια, σε αντίθεση με τα Μυξοσπορίδια των γλυκών υδάτων, έχουν αναφερθεί λιγοστές μελέτες που περιγράφουν έναν ολοκληρωμένο βιολογικό κύκλο που να περιπλέκει φάσεις τόσο ενδιάμεσων ξενιστών όσο και Μυξοσποριδίων (Markiw & Wolf 1983, Wolf & Markiw 1984, Kent και συν. 2001). Σχετικά με τα θαλάσσια Μυξοσπορίδια, ένας ολοκληρωμένος κύκλος που να περιπλέκει φάσεις τόσο Ακτινοσποριδίων όσο και Μυξοσποριδίων έχει περιγραφεί μόνο στην περίπτωση του Μυξοσποριδίου *Ellipsomyxa gobii* Køie 2003 (Køie και συν. 2004), ενώ μολυσμένα Ακτινοσπορίδια έχουν βρεθεί στο θαλάσσιο βένθος (ολιγόχαιτους και πολύχαιτους) (Ikeda 1912, Hallett και συν. 1999, Køie 2000, 2002).

Επιτυχείς πειραματικές μολύνσεις θαλάσσιων ειδών, άμεσες από ψάρι σε ψάρι, έχουν πραγματοποιηθεί σε πολύ λίγες περιπτώσεις, οφειλόμενες όχι μόνο σε ώριμους σπόρους, αλλά και σε άλλα στάδια ανάπτυξης των Μυξοσποριδίων, π.χ. στην περίπτωση του Μυξοσποριδίου *Enteromyxum scophthalmi* Palenzuela, Redondo & Alvarez-Pellitero 2002 στο καρκάνι, (Redondo, Palenzuela, Riaza, Macías & Álvarez-Pellitero 2002), και του *E. leei* στην τσιπούρα (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrodt 1997) κ.α.

Στο μέρος αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης ενός πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με *E. leei* σε χιόνα, με σκοπό τη μελέτη της μετάδοσης και της παθογένειας του Μυξοσποριδίου αυτού και την εξέταση της ανοσολογικής αντίδρασης και των μηχανισμών που σχετίζονται με την άμυνα των ψαριών στην παρασίτωση από το συγκεκριμένο παράσιτο, προκειμένου να αναπτυχθούν μέτρα προφύλαξης. Επίσης, έγινε για πρώτη φορά μία προσπάθεια

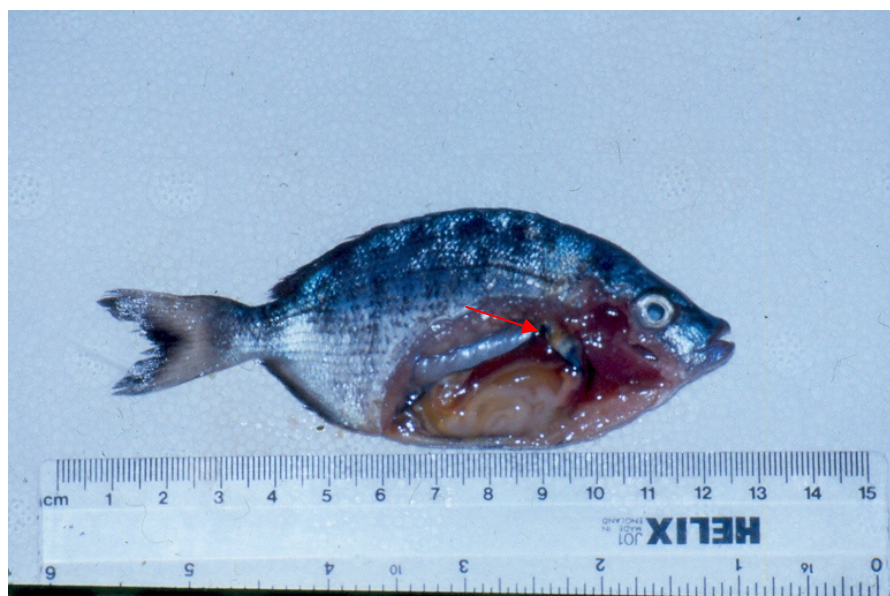
πειραματικής μόλυνσης του Μυξοσποριδίου *E. leei* σε χιόνα θεραπευμένη από το ίδιο παράσιτο.

3.2.1 Ανάλυση της πειραματικής μόλυνσης με συνύπαρξη

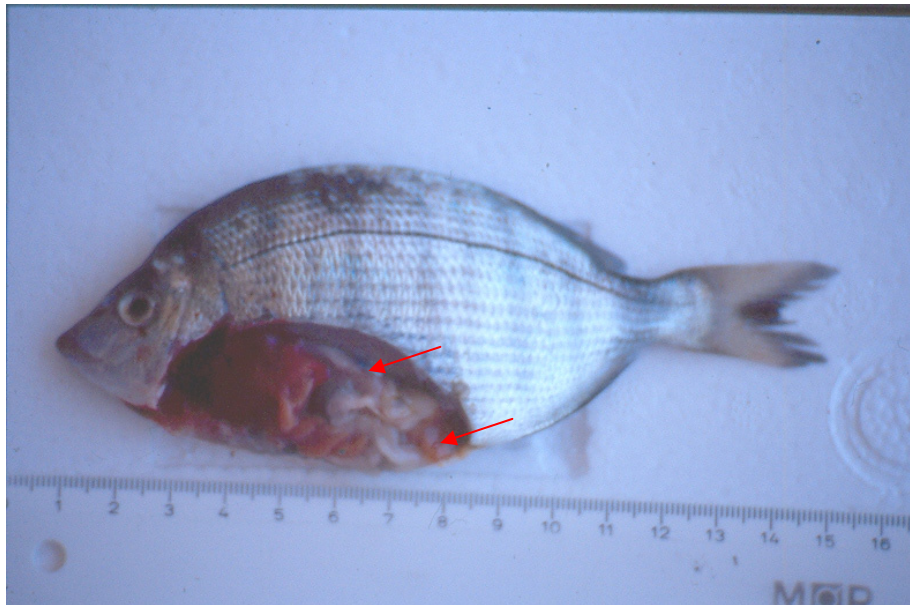
3.2.1.1 Πειραματική δεξαμενή συνύπαρξης με ψάρια δέκτες υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.

Προσδιορισμός της επίδρασης της πειραματικής μόλυνσης όσον αφορά τα ευρήματα της μακροσκοπικής παρατήρησης και νεκροτομικής εξέτασης

Στη διάρκεια των 55 ημερών του πειράματος δεν παρατηρήθηκαν εξωτερικές αλλοιώσεις στα ψάρια. Κατά τη νεκροψία όμως παρατηρήθηκαν στα μολυσμένα ψάρια τοπικές αιμορραγίες, διάταση του εντέρου και τυροειδές περιεχόμενο στον εντερικό σωλήνα, την 40^η και 55^η ημέρα, καθώς επίσης και διογκωμένη χοληδόχος κύστη (Εικόνες 3.2.1, 3.2.2). Τα ψάρια κρατήθηκαν και παρατηρήθηκαν 65-70 ημέρες μετά την μόλυνση.



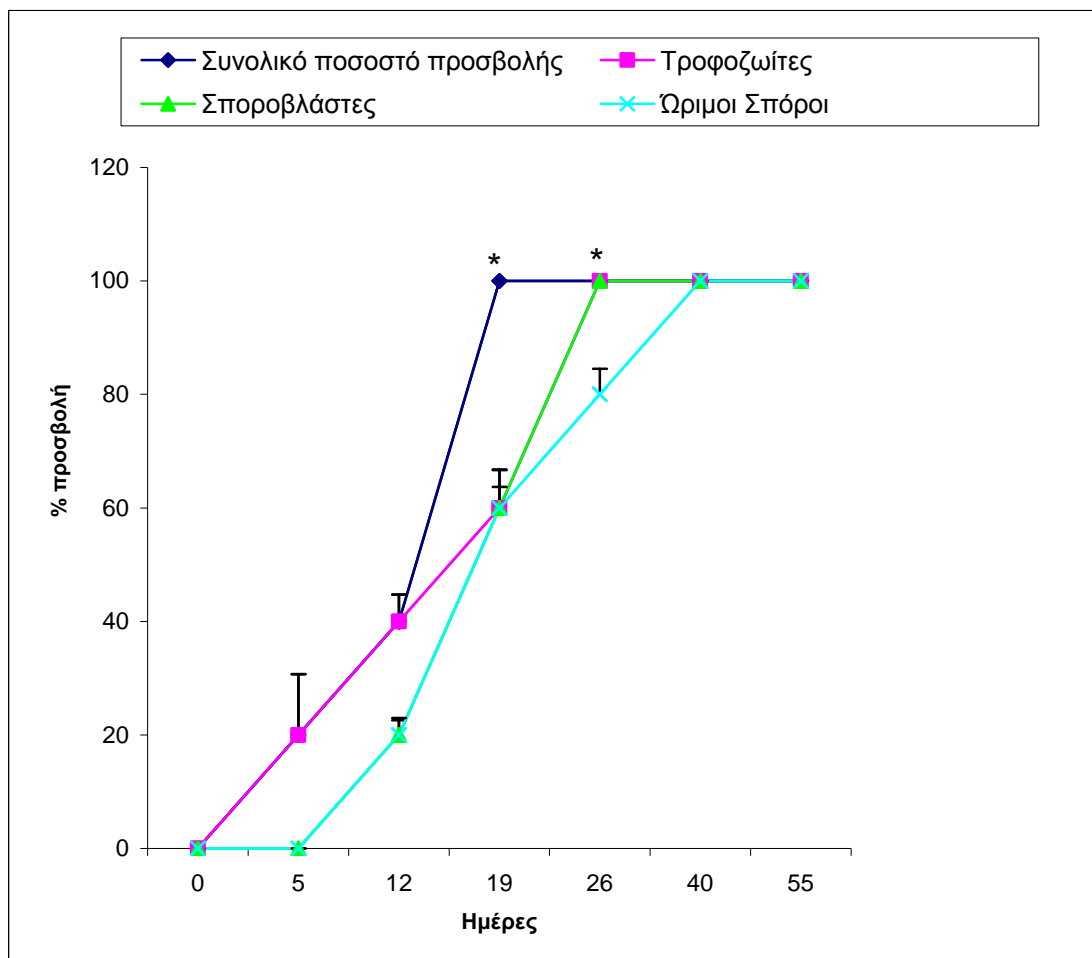
Εικόνα 3.2.1 Χιόνα προσβεβλημένη με το μυξοσπορίδιο *E. leei*. Παρατηρείται διάταση της χοληδόχου κύστης.



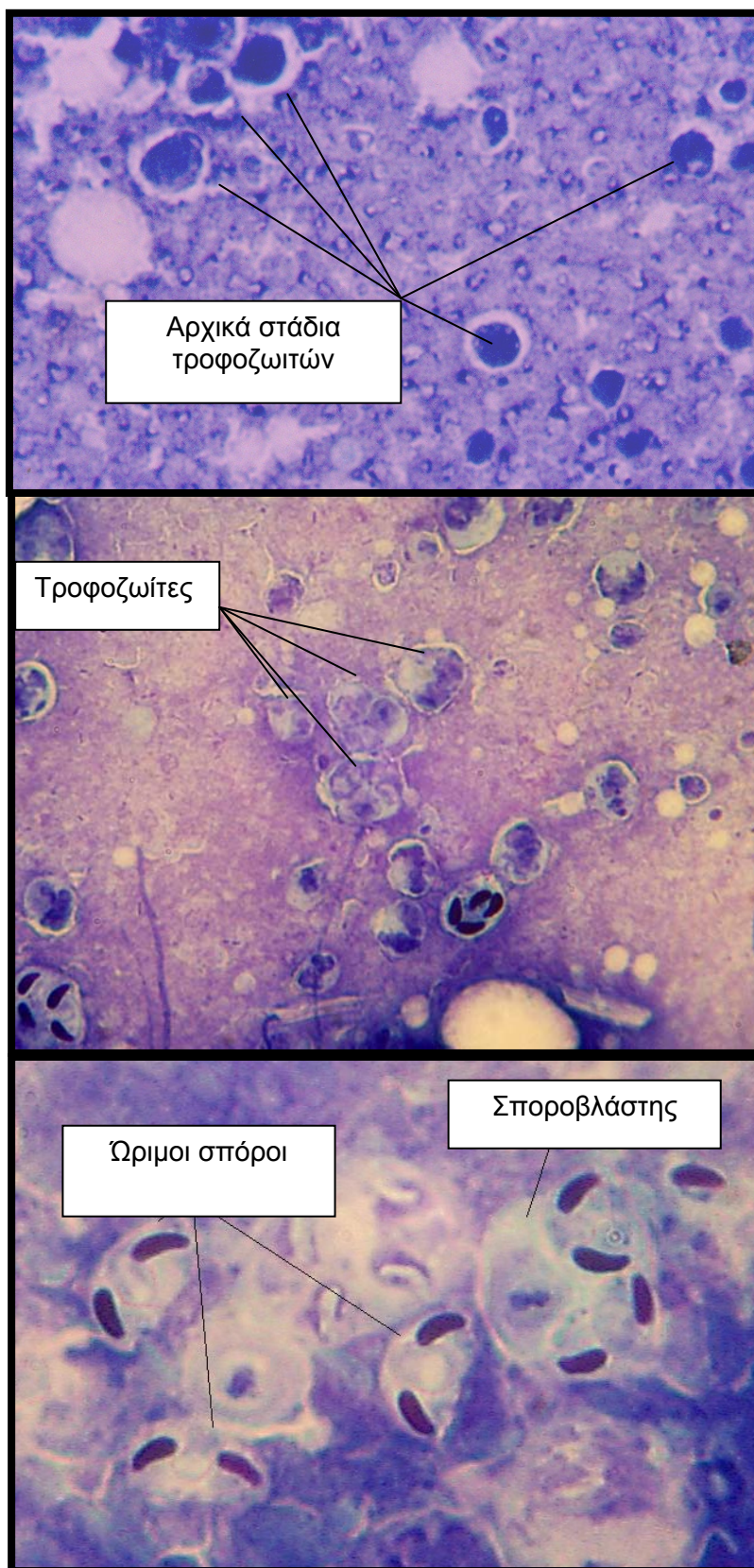
Εικόνα 3.2.2 Χιόνα προσβεβλημένη με το μυξοσπορίδιο *E. leei*. Παρατηρούνται τοπικές αιμορραγίες στο έντερο.

Προσδιορισμός της επίδρασης της πειραματικής μόλυνσης στο ποσοστό προσβολής από όλα τα στάδια ανάπτυξης του E. leei

Ψάρια μολυσμένα με το Μυξοσπορίδιο *E. leei* παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την 5^η ημέρα της πειραματικής μόλυνσης σε συνολικό ποσοστό προσβολής 20%. Ως συνολικό ποσοστό προσβολής αναφέρεται το σύνολο μολυσμένων ψαριών από όλα τα στάδια ανάπτυξης του παράσιτου (τροφοζώιτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι), ανεξαρτήτως από το στάδιο ανάπτυξης του, ή τη συνύπαρξη περισσότερων από ένα σταδίων, προς το συνολικό αριθμό των ψαριών του δείγματος. Στην Εικ. 3.2.3α φαίνονται όλα τα στάδια ανάπτυξης του *E. leei* που παρατηρήθηκαν στον εντερικό σωλήνα. Την 19^η ημέρα το συνολικό ποσοστό έφτασε το 100% και διατηρήθηκε στο υψηλό αυτό επίπεδο μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου (ημέρα 55) (Γράφ. 3.2.1). Όλα τα στάδια ανάπτυξης του Μυξοσποριδίου (τροφοζώιτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι) ανιχνεύτηκαν στο μέσο και τελευταίο τμήμα του εντέρου.



Γράφημα 3.2.1. Επίδραση της πειραματικής μόλυνσης στο συνολικό ποσοστό προσβολής και στο ποσοστό προσβολής από κάθε στάδιο ξεχωριστά (τροφοζώιτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι) που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου σε υγιή ψάρια δέκτες (n=10), μέσου βάρους 50g. Κάθε σημείο αναπαριστά το $\bar{X} \pm SD$ δέκα τυχαίων οπτικών πεδίων από κάθε δείγμα ψαριού σε κάθε δειγματοληψία.



Εικόνα 3.2.3. Τροφοζώιτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι, σε επιχρίσματα εντέρου χιόνας προσβεβλημένης με *E. leei*, Giemsa, x250, x400.

Ανάλυση των σταδίων ανάπτυξης του παράσιτου αποκάλυψε ότι, τροφοζωίτες παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την 5^η ημέρα, σε ποσοστό προσβολής 20%, το οποίο αυξήθηκε στο 40% και στο 60% την 12^η ημέρα και 19^η ημέρα αντίστοιχα. Την 26^η ημέρα έφτασε το 100% και διατηρήθηκε στο επίπεδο αυτό μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.2.1).

Το ποσοστό προσβολής από σποροβλάστες αυξήθηκε για πρώτη φορά την 12^η ημέρα από 20% σε 100% την 26^η και διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.2.1).

Το ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους αυξήθηκε από 20% την 12^η ημέρα σε 60% την 19^η ημέρα, ενώ από την 26^η ημέρα έφτασε το 100% και διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.2.1).

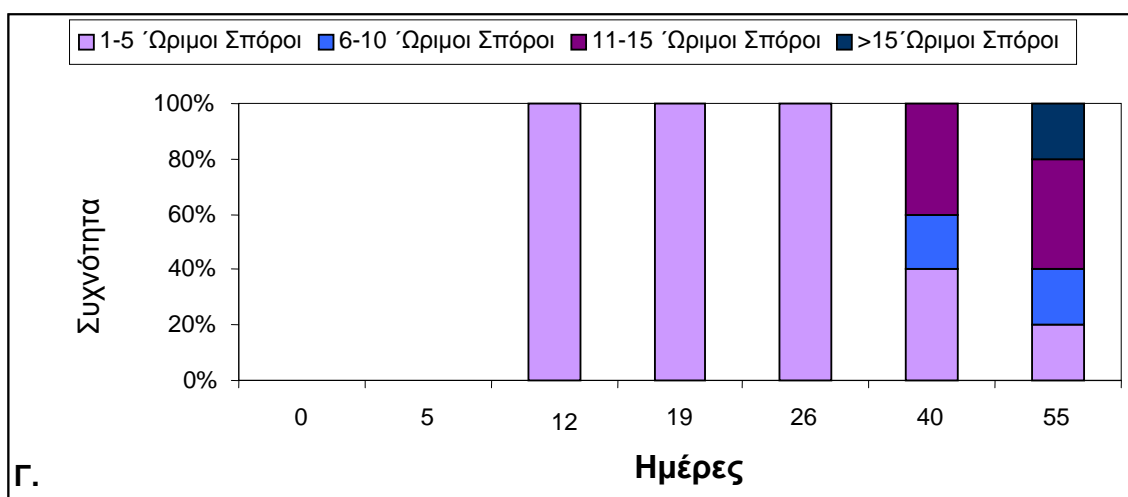
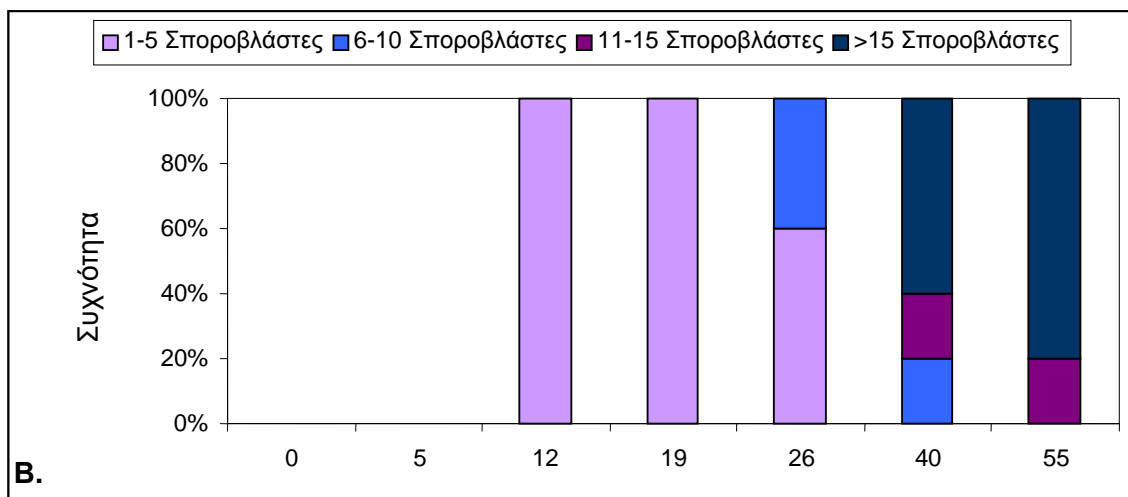
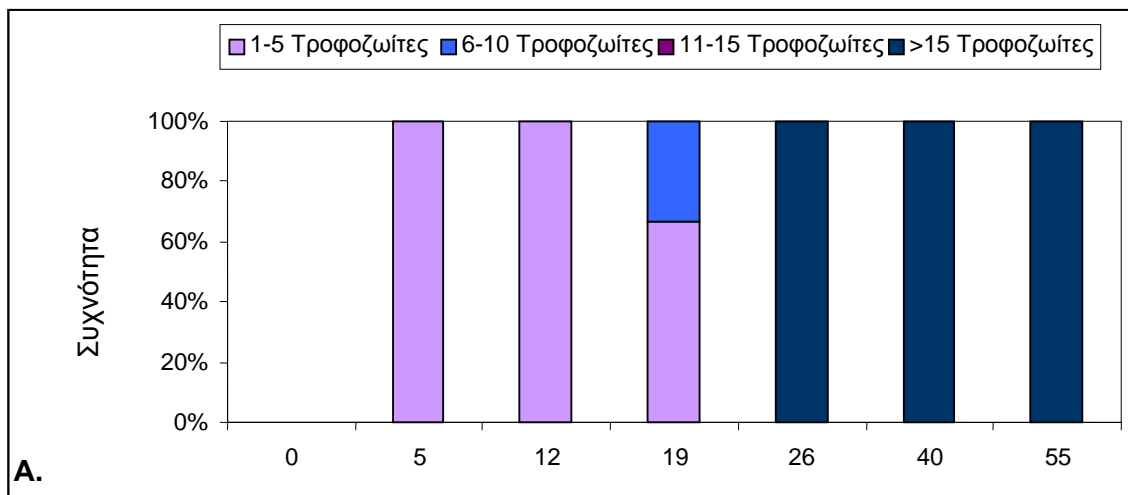
Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των τριών σταδίων ανάπτυξης του παράσιτου κατά την εξέλιξη της μόλυνσης. Ειδικότερα, αύξηση του ποσοστού προσβολής των τροφοζωιτών προκάλεσε αύξηση του ποσοστού προσβολής των σποροβλαστών και η τελευταία των ώριμων σπόρων με χρονική υστέρηση μίας εβδομάδας, γεγονότα που συσχετίζονται ισχυρά μεταξύ τους (τροφοζωίτες – σποροβλάστες: $r=0,984$, $p<0,01$, σποροβλάστες – ώριμοι σπόροι: $r=0,988$, $p<0,01$). Επίσης, φαίνεται ότι το ποσοστό προσβολής από τροφοζωίτες αυξάνεται σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, γεγονός που εξηγείται εξαιτίας αφενός της λήψης νέων μολυσματικών μορφών (πλασμωδίων) από το περιβάλλον και αφετέρου της αυτομόλυνσης, όπως επιβεβαιώνεται και από τη θετική συσχέτιση της μεταβολής μεταξύ των ποσοστών προσβολής των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων με τους τροφοζωίτες (σποροβλάστες – τροφοζωίτες: $r=0,984$, $p<0,01$, ώριμοι σπόροι – τροφοζωίτες: $r=0,971$, $p<0,01$).

Προσδιορισμός της επίδρασης της πειραματικής μόλυνσης στην ένταση των σταδίων ανάπτυξης του παράσιτου

Στην περίπτωση των τροφοζωιτών, παρατηρήθηκε χαμηλή ένταση (1-5 Μυξοσπορίδια / οπτικό πεδίο), μέχρι την 12^η και 19^η ημέρα σε συχνότητες 100% και 70%, αντίστοιχα. Τροφοζώιτες σε μέση ένταση (6-10/οπτικό πεδίο) παρατηρήθηκαν την 19^η ημέρα σε συχνότητα 30%, ενώ η υψηλότερη ένταση (> 15 ανά οπτικό πεδίο) παρατηρήθηκε την 26^η ημέρα σε συχνότητα 100% και διατηρήθηκε στο υψηλό αυτό επίπεδο μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.2.2 Α).

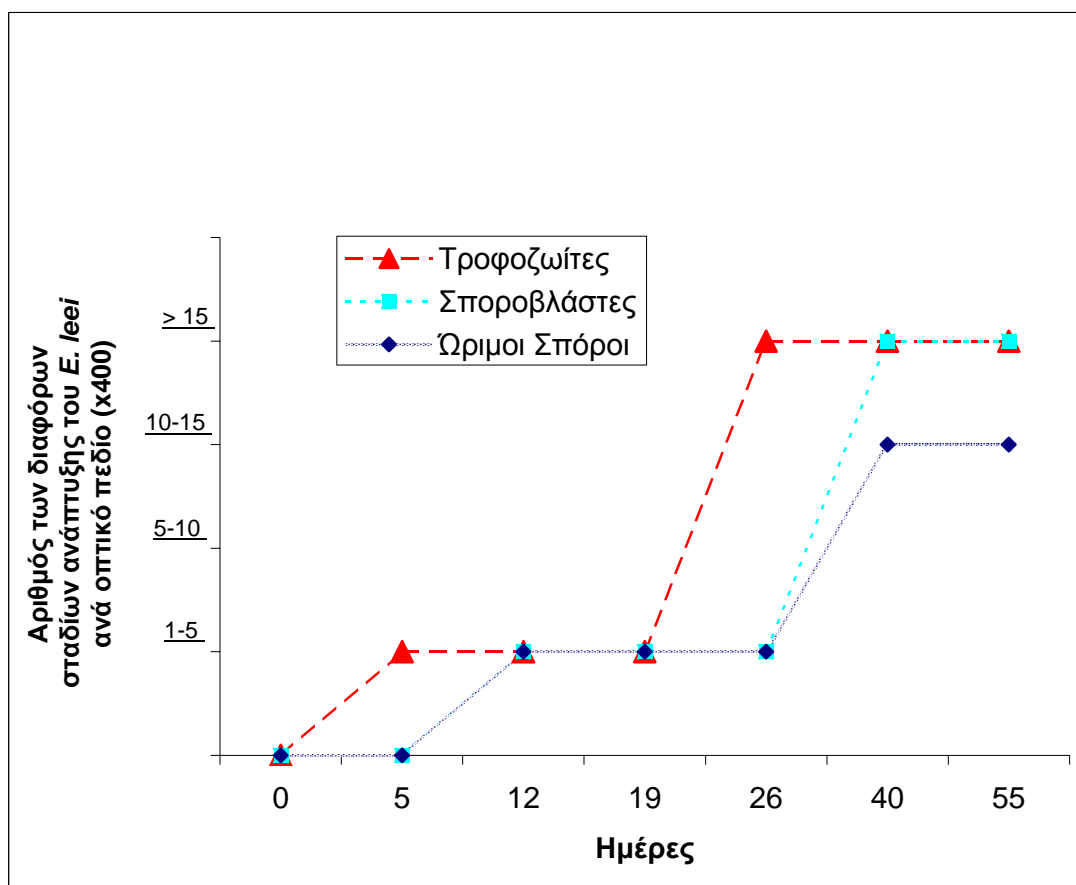
Στην περίπτωση των σποροβλαστών, χαμηλή ένταση (1-5 /οπτικό πεδίο) παρατηρήθηκε την 19^η και 26^η ημέρα σε συχνότητα 100% και 60%, αντίστοιχα. Σποροβλάστες σε ένταση 6-10/οπτικό πεδίο παρατηρήθηκαν την 26^η και 40^η ημέρα σε συχνότητα 40% και 20% αντίστοιχα και σε ένταση 11-15/οπτικό πεδίο παρατηρήθηκαν την 40^η και 55^η ημέρα σε συχνότητα 20%. Η υψηλότερη ένταση (>15/οπτικό πεδίο), παρατηρήθηκε την 40^η και 55^η ημέρα σε συχνότητα 60% και 80% αντίστοιχα (Γράφ. 3.2.2 Β).

Στη περίπτωση των ώριμων σπόρων, χαμηλή ένταση (1-5/οπτικό πεδίο) παρατηρήθηκε μέχρι τις ημέρες 26^η, 40^η και 55^η ημέρα σε συχνότητα 100%, 40% και 20% αντίστοιχα. Ωριμοί σπόροι σε ένταση 6-10/οπτικό πεδίο παρατηρήθηκαν την 40^η και 55^η ημέρα σε συχνότητα 20% ενώ σε ένταση 11-15/οπτικό πεδίο παρατηρήθηκαν την 40^η και 55^η ημέρα σε συχνότητα 40%. Η υψηλότερη ένταση (>15/οπτικό πεδίο) παρατηρήθηκε την 55^η ημέρα σε συχνότητα 20% (Γράφ. 3.2.2 Γ).



Γράφημα 3.2.2 .Επίδραση της πειραματικής μόλυνσης στην ένταση και την συχνότητα του κάθε σταδίου ξεχωριστά (Α. τροφοζώιτες, Β. σποροβλάστες και Γ. ώριμοι σπόροι) που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου σε υγιή ψάρια δέκτες (n=10), μέσου βάρους 50g. Στις στήλες παρουσιάζεται η συχνότητα όλων των σταδίων του μυξοσποριδίου ανά οπτικό πεδίο σε κάθε δειγματοληψία. Κάθε σημείο αναπαριστά το μέσο όρο (X) δέκα τυχαίων οπτικών πεδίων από κάθε δείγμα ψαριού σε κάθε δειγματοληψία.

Στο Γράφ. 3.2.3, παρουσιάζεται η μέγιστη παρατηρούμενη ένταση κάθε σταδίου ανάπτυξης σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας. Είναι προφανές ότι στην αρχή της παρασίτωσης παρατηρήθηκε χαμηλή ένταση σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, ακολουθούμενη από απότομη αύξηση της έντασης των τροφοζωιτών την 26^η ημέρα η οποία προκάλεσε την αύξηση της έντασης των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων την 40^η ημέρα, γεγονός που αποδεικνύει το σημαντικό ρόλο των πλασμωνδίων σε μυξοσποριδιάσεις υψηλής έντασης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, όπως προέκυψε και από τη συσχέτιση των ποσοστών προσβολής, σύμφωνα με τα οποία διαπιστώθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της παρατηρούμενης αύξησης της μέγιστης έντασης των τροφοζωιτών σε σχέση με αυτή των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων (τροφοζωίτες – σποροβλάστες $r = 0,789$, $P < 0,05$, τροφοζωίτες – ώριμοι σπόροι: $r = 0,804$, $P < 0,05$).



Γράφημα 3.2.3 Επίδραση της πειραματικής μόλυνσης στην μέγιστη ένταση κάθε σταδίου ανάπτυξης του μυξοσποριδίου (τροφοζωίτες, σποροβλάστες, ώριμοι σπόροι) που παρατηρήθηκε σε νωπά παρασκευάσματα από ξέσματα εντέρου, στα υγιή ψάρια δέκτες (n=10), μέσου βάρους 50g.

Εντοπισμός παρασίτων σε άλλα όργανα εκτός του εντερικού σωλήνα

Ωριμοί σπόροι παρατηρήθηκαν σε χαμηλή ένταση (1-5/οπτικό πεδίο) στη χοληδόχο κύστη των ψαριών δεκτών σε ποσοστό προσβολής 20% την 55^η ημέρα. Δεν παρατηρήθηκαν άλλα παράσιτα ή παθογόνοι παράγοντες κατά τη διάρκεια του πειράματος. Ωριμοί σπόροι ή άλλα στάδια ανάπτυξης του Μυξοσποριδίου δεν παρατηρήθηκαν σε άλλα όργανα.

Ιστοπαθολογική Εξέταση

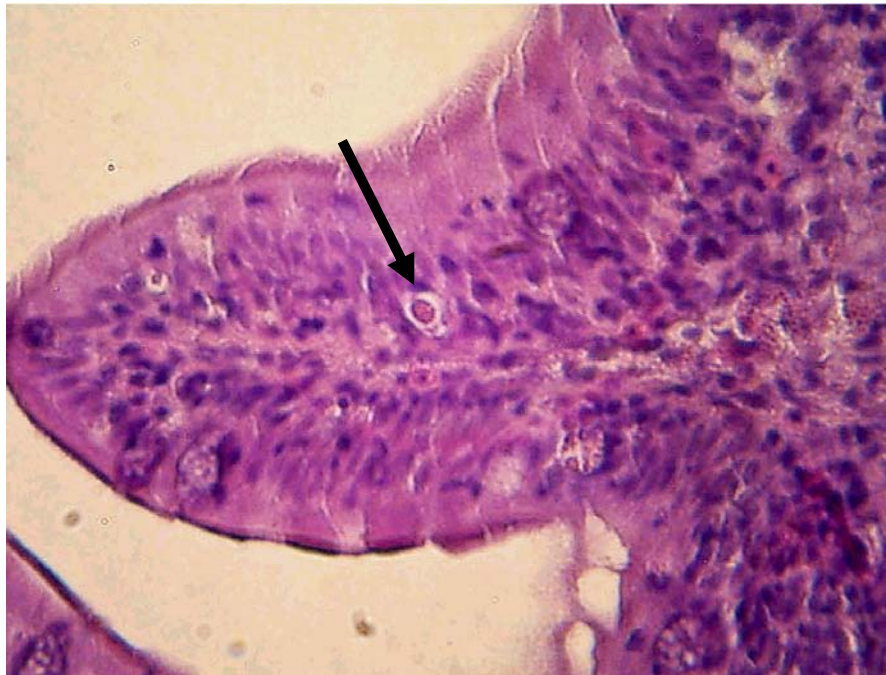
Ψάρια δότες

Τα ψάρια δότες βρέθηκαν στο τέλος των πειραμάτων μολυσμένα με το *E. 1eei* σε μεγάλη ένταση στο έντερο (μέσος αριθμός συνολικών σταδίων ανά οπτικό πεδίο: 400x= >15). Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις αφορούσαν το επιθήλιο του λεπτού εντέρου όπου παρατηρήθηκε εκφύλιση, απόπτωση και νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων των λαχνών, με απώλεια της φυσιολογικής δομής του εντέρου. Επίσης παρατηρήθηκαν αιμορραγίες στον βλεννογόνο. Φλεγμονώδης αντίδραση παρατηρήθηκε μόνο από τους τροφοζωίτες στο βλεννογόνο και αυτή παρατηρήθηκε μέχρι το παράσιτο να φτάσει το στάδιο του σποροβλάστη. Το επιθήλιο της χοληδόχου κύστης βρέθηκε εκφυλισμένο και όλα τα στάδια του παράσιτου ήταν παρόντα μαζί με κρυστάλλους μέσα στην κοιλότητα της χοληδόχου κύστης.

Ψάρια δέκτες

Αλλοιώσεις βρέθηκαν μόνο στα ψάρια που μολύνθηκαν με συνύπαρξη όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία τροφοζωιτών την 5^η ημέρα μετά την μόλυνση σε χαμηλή ένταση (Εικ. 3.2.4). Την 12^η ημέρα, λίγοι σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι βρέθηκαν στις ιστολογικές τομές (Εικ. 3.2.5). Αυτά τα στάδια δημιουργούσαν συσσωρεύματα στο επιθήλιο του εντερικού βλεννογόνου χωρίς αντίδραση του ξενιστή και δεν υπήρχαν αλλοιώσεις στο επιθήλιο. Από την 19^η ημέρα και μετέπειτα, τα παράσιτα βρέθηκαν εγκατεστημένα μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και όλα τα στάδια του *E. 1eei* ήταν εύκολα αναγνωρίσιμα (Εικ. 3.2.6) με ελάχιστη βλάβη του επιθηλίου. Από την 26^η ημέρα, τα παρασιτικά στάδια ήταν ακόμα σε μέτρια ένταση και το εντερικό επιθήλιο άρχισε να αποκολλιέται (Εικ. 3.2.7) και μέχρι την 40^η ημέρα όλα τα στάδια ήταν σε μεγάλη ένταση (>15 ανά οπτικό πεδίο, 400x). Την 55^η ημέρα παρατηρήθηκε έντονη απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων και άμορφης μάζας μαζί με παράσιτα

στον αυλό καθώς και μερική κενοτοποίηση του επιθηλίου και του συνδετικού ιστού.
Αλλοιώσεις δεν βρέθηκαν σε άλλα όργανα.



DC120 Exp: 0 0380 secs Zoom: 2.3
INTESTINE-E IEEI-H&E

Εικόνα 3.2.4 Τροφοζώιτες του *E. Ieiei* (→) σε επιθήλιο εντέρου των ψαριών δεκτών 5 ημέρες μετά την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης H&E, X400.



DC120 Exp: 0 0392 secs Zoom: 2.3
INTESTINE-E IEEI-H&E

Εικόνα 3.2.5 Σποροβλάστες (→) και άλλα στάδια ανάπτυξης του *E. Ieiei* σε επιθήλιο εντέρου των ψαριών δεκτών 12 ημέρες μετά την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης H&E, X400.



DC120 Exp: 0.0165 secs Zoom: 2.3
INTESTINE-E. LEEI-H&E

Εικόνα 3.2.6 Σποροβλάστες και άλλα στάδια ανάπτυξης (→) του *E. leei* σε επιθήλιο εντέρου των ψαριών δεκτών 19 ημέρες μετά την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης H&E, X400.



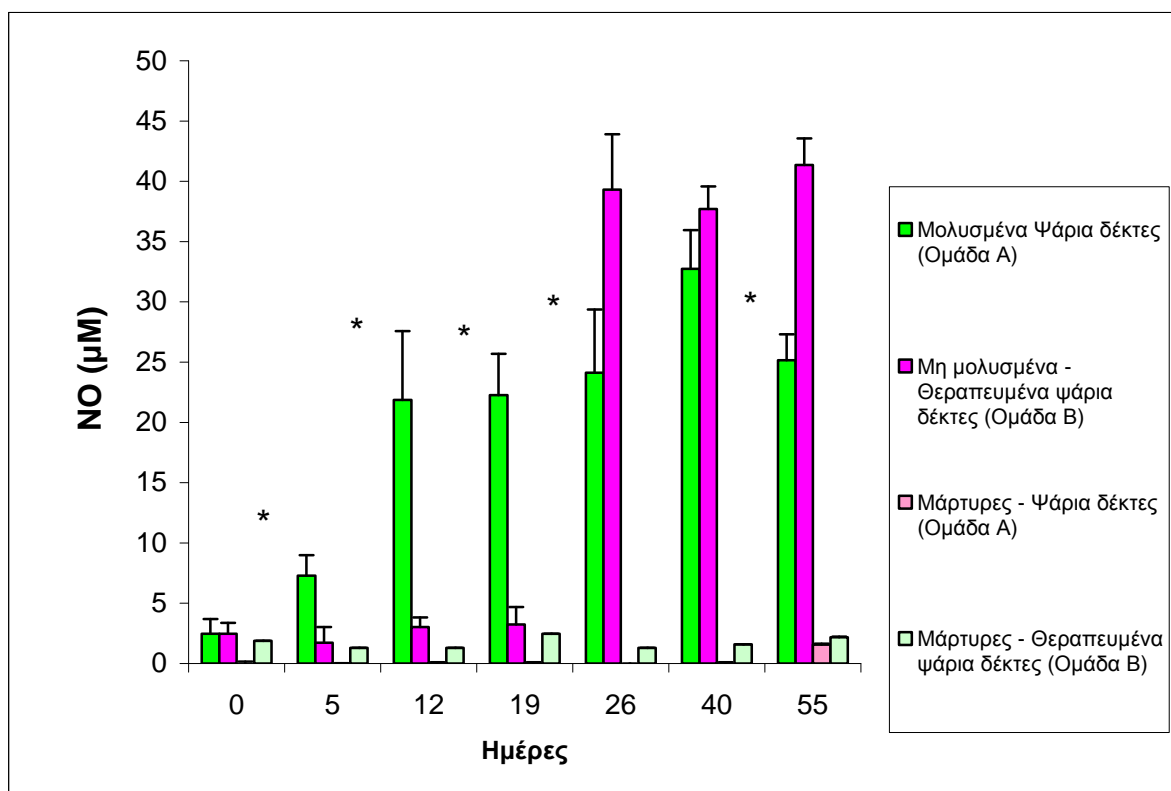
DC120 Exp: 0.0392 secs Zoom: 2.3
INTESTINE-E. LEEI-H&E

Εικόνα 3.2.7 Σποροβλάστες και άλλα στάδια ανάπτυξης του *E. leei* σε επιθήλιο εντέρου των μολυσμένων ψαριών δεκτών, 26 ημέρες μετά την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης H&E, X400.

Προσδιορισμός της επίδρασης της πειραματικής μόλυνσης σε ορισμένους ανοσολογικούς παράγοντες

Προκειμένου να υπολογιστεί η επίδραση της πειραματικής μόλυνσης στην ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, δύο παράμετροι της μη ειδικής ανοσίας, οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες νιτρικών ριζών και η λυσοζύμη, προσδιορίστηκαν στον ορό του αίματος τόσο των υγιών-μολυσμένων ψαριών δεκτών (χιόνες, μέσου βάρους 50g, πειραματική δεξαμενή: Σ-A) όσο και των μη μολυσμένων υγιών ψαριών (χιόνες, μέσου βάρους 150g, πειραματική δεξαμενή: Σ-B) που είχαν θεραπευθεί από το Μυξοσπορίδιο *E. leei* και συγκρίθηκαν με τα ψάρια μάρτυρες της κάθε δεξαμενής (δεξαμενή M-Σ-A και δεξαμενή M-Σ-B) σε κάθε δειγματοληψία.

Στην περίπτωση των υγιών-μολυσμένων ψαριών δεκτών, η έκκριση των νιτρικών αυξήθηκε σταδιακά κατά την διάρκεια των 19 πρώτων ημερών, ενώ μία δεύτερη σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε επίσης μετά την 26^η ημέρα από την έναρξη της πειραματικής μόλυνσης (Γράφ. 3.2.4). Στην περίπτωση των θεραπευμένων μη μολυσμένων ψαριών δεκτών, η έκκριση των NO αυξήθηκε ξαφνικά την 19^η ημέρα η οποία διατηρήθηκε στο ίδιο υψηλό επίπεδο για το υπόλοιπο της πειραματικής μόλυνσης. Αντίθετα, στον ορό του αίματος των ψαριών μαρτύρων των υγιών ψαριών δεκτών και των θεραπευμένων ψαριών δεκτών η έκκριση NO- ήταν κοντά ή κάτω από το όριο ανίχνευσής τους, αντίστοιχα.



Γράφημα 3.2.4 Επίδραση της πειραματικής μόλυνσης στην παραγωγή νιτρικών στα ψάρια δέκτες της πειραματική μόλυνσης και στα ψάρια μάρτυρες. Παρουσιάζεται η μέση συγκέντρωση NO και η τυπική απόκλιση στον ορό του αίματος από κάθε ομάδα ψαριών (n=10) σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα μολυσμένα ψάρια δέκτες της ομάδας A και στα μη-μολυσμένα ψάρια δέκτες της ομάδας B σημειώνονται με * (Games-Howell test, $p < 0.05$).

Αντίθετα, λυσοζύμη δεν ανιχνεύτηκε στον ορό αίματος σε καμία από τις ομάδες ψαριών δεκτών και ψαριών μαρτύρων που εξετάστηκαν.

Προσδιορισμός της επίδρασης της πειραματικής μόλυνσης στο ποσοστό θνησιμότητας

Παρατηρήθηκε ένα μόνο νεκρό ψάρι την 54 ημέρα. Το ψάρι αυτό παρουσίαζε απίσχναση, απώλεια λεπιών στη περιοχή κάτω από το ραχιαίο πτερύγιο και εκτεταμένη αιμορραγία στο έντερο ήταν εμφανής.

3.2.1.2 Πειραματική δεξαμενή συνύπαρξης με ψάρια δέκτες υγιείς χιόνες μέσου βάρους 150g, τα οποία στο παρελθόν είχαν μολυνθεί με φυσική μόλυνση με το *E. Ieei* και είχαν θεραπευτεί.

Από τα ψάρια της ομάδας αυτής, εξετάστηκαν 60 ψάρια συνολικά. Κανένα ψάρι δεν μολύνθηκε με το Μυξοσπορίδιο *E. Ieei*, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρασιτολογικής και ιστολογικής εξέτασης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στη διάρκεια του πειράματος.

3.2.1.3 Πειραματική δεξαμενή μαρτύρων με ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.

60 ψάρια μάρτυρες εξετάστηκαν συνολικά. Κανένα ψάρι δεν μολύνθηκε με το Μυξοσπορίδιο *E. Ieei*, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρασιτολογικής και ιστολογικής εξέτασης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στη διάρκεια του πειράματος.

3.2.1.4 Πειραματική δεξαμενή μαρτύρων με ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 150g, τα οποία στο παρελθόν είχαν μολυνθεί με φυσική μόλυνση με το *E. Ieei* και είχαν θεραπευτεί.

60 ψάρια μάρτυρες εξετάστηκαν συνολικά. Κανένα ψάρι δεν μολύνθηκε με το Μυξοσπορίδιο *E. Ieei*, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρασιτολογικής και ιστολογικής εξέτασης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στη διάρκεια του πειράματος.

3.2.2 Πειραματική μόλυνση με στομαχικό καθετήρα

3.2.2.1 Πειραματική δεξαμενής μόλυνσης με στομαχικό καθετήρα σε ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.

Από τα ψάρια της ομάδας αυτής, εξετάστηκαν 60 ψάρια συνολικά. Κανένα ψάρι δεν βρέθηκε μολυσμένο με το Μυξοσπορίδιο *E. ileyi*, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρασιτολογικής και ιστολογικής εξέτασης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στη διάρκεια του πειράματος.

3.2.2.2 Πειραματική δεξαμενή μαρτύρων με ψάρια υγιείς χιόνες μέσου βάρους 50g.

Στην ομάδα αυτή 60 ψάρια μάρτυρες εξετάστηκαν συνολικά. Κανένα ψάρι δεν μολύνθηκε με το Μυξοσπορίδιο *E. ileyi*, σύμφωνα με τα ευρήματα της παρασιτολογικής και ιστολογικής εξέτασης. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στη διάρκεια του πειράματος.

3.3 Εφαρμογή πειραματικών θεραπειών κατά την παρασίτωση με *E. leei* σε χιόνα.

Το συνεχές και αυξανόμενο ποσοστό θνησιμότητας που προκαλείται από το *E. leei*, σχετίζεται και με την απουσία μίας κατάλληλης θεραπείας για τα Μυξοσπορίδια. Σε αντίθεση με τις θεραπείες στα θηλαστικά, η χρήση θεραπευτικών αντιπαρασιτικών φαρμάκων στα ψάρια είναι περιορισμένη. Έρευνες σχετικά με την θεραπεία αντι-μυξοσποριδιακών/ μικροσποριακών φαρμάκων επικεντρώνονται κυρίως στα σαλμονοειδή (Hedrick και συν. 1991, Kent & Dawe 1994, Speare, Athanassopoulou, Daley & Sanchez 1999), ενώ λίγες έρευνες έχουν γίνει στα μεσογειακά ψάρια (Athanassopoulou και συν. 2003, Rigos και συν. 2000, Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero 1992γ, Athanassopoulou και συν. 2004a,b, Karagouni και συν. 2005a,b). Πρόσφατα, ο συνδυασμός σαλινομυκίνη και αμπρόλιο αποδείχθηκε ως η πιο επιτυχής και ασφαλής θεραπεία σε περιπτώσεις χιόνας μολυσμένης με το Μυξοσπορίδιο *Myxobolus* sp. καθώς και τσιπούρας μολυσμένης με το Μυξοσπορίδιο *P. sparix* (Athanassopoulou και συν. 2004α,β, Karagouni και συν. 2005α,β).

Στο μέρος αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής δύο πειραματικών θεραπειών (φουματζιλίνη & αμπρόλιο και σαλινομυκίνη) σε χιόνα μολυσμένη από το Μυξοσπορίδιο *E. leei*, με σκοπό να εκτιμηθεί η αντι-μυξοσποριδιακή δράση των φαρμάκων αυτών, που διατίθενται στο εμπόριο για άλλα είδη ζώων, σε χιόνες φυσικά μολυσμένες με το Μυξοσπορίδιο *E. leei*.

3.3.1 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών όσον αφορά τα ευρήματα της μακροσκοπικής παρατήρησης και νεκροτομικής εξέτασης

Τα ψάρια παρουσίαζαν απίσχναση και περιοχές με χαρακτηριστική περιγεγραμμένη αλλοίωση με απώλεια λεπιών στη ραχιαία και πλευρική επιφάνεια του σώματος. Το έντερο, που είναι το κύριο όργανο στόχος του *E. ictal* παρουσίαζε εκτεταμένη νέκρωση και εντοπισμένη αιμορραγία του βλεννογόνου, διάταση και πολτώδες τυροειδές περιεχόμενο. Η χοληδόχος κύστη ήταν επίσης διατεταμένη και το ήπαρ παρουσίαζε ελαφρύ αποχρωματισμό.

3.3.2 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής

3.3.2.1 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής από τροφοζώιτες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Γράφ. 3.3.1A), το ποσοστό προσβολής από τροφοζώιτες και στις τρεις περιπτώσεις ξεκίνησε από 40%, μόνο όμως στην περίπτωση χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη, το ποσοστό έφτασε το 0% την 35 ημέρα, όταν το αντίστοιχο ποσοστό στις πειραματικές δεξαμενές με φουματζιλίνη και χωρίς θεραπεία, παρέμεινε 40%. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε αυτή τη διαπίστωση και έδειξε ότι το ποσοστό προσβολής από τροφοζώιτες στην περίπτωση χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη από την 28^η ημέρα και μετά μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με την ομάδα των ψαριών χωρίς θεραπεία ή με την ομάδα ψαριών που θεραπεύτηκαν με φουματζιλίνη ($21 \pm 3,1$, $P = 0,000$, Games-Howell test).

3.3.2.2 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής από σποροβλάστες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Γράφ. 3.3.1B), το ποσοστό προσβολής από σποροβλάστες και στις τρεις περιπτώσεις ξεκίνησε από υψηλά ποσοστά, μόνο όμως στην περίπτωση χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη το ποσοστό μειώθηκε απότομα από την 7η ημέρα, ενώ από την 35η ημέρα έφτασε το 0%, όταν τα αντίστοιχα ποσοστά στις πειραματικές δεξαμενές με φουματζιλίνη και χωρίς θεραπεία ήταν πολύ υψηλότερα και παρόμοια μεταξύ τους. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε αυτή την παρατήρηση και έδειξε ότι το ποσοστό προσβολής από σποροβλάστες στην περίπτωση χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με την περίπτωση που δεν χορηγήθηκε θεραπευτική αγωγή ($32,2 \pm 4,2$, $P = 0,000$, Games-Howell test), και επομένως συγκριτικά και με την περίπτωση που χορηγήθηκε φουματζιλίνη, αφού δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις περιπτώσεις που χορηγήθηκε φουματζιλίνη και στις περιπτώσεις που δε χορηγήθηκε θεραπευτική αγωγή. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη είναι πιο αποτελεσματική συγκριτικά με την θεραπεία με φουματζιλίνη.

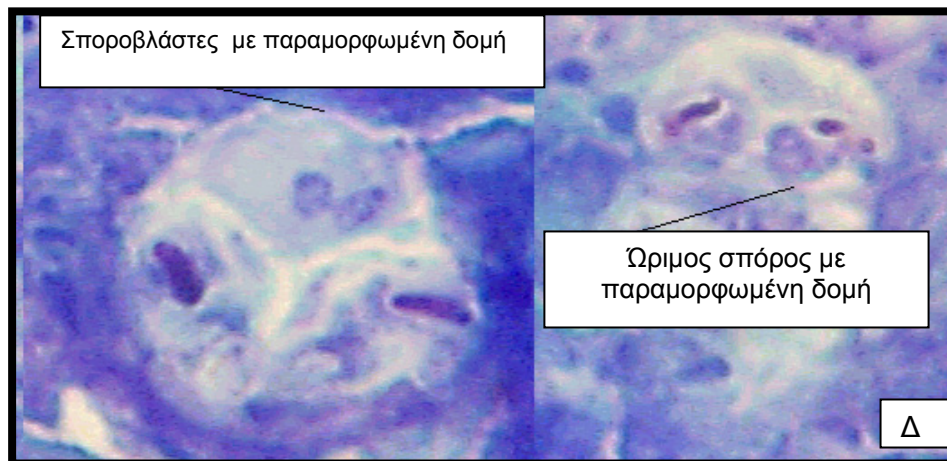
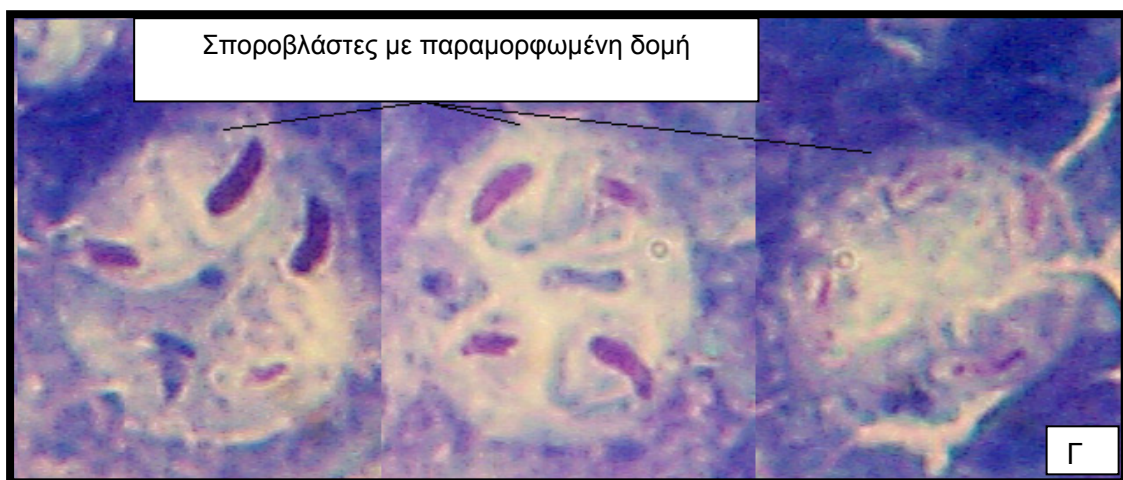
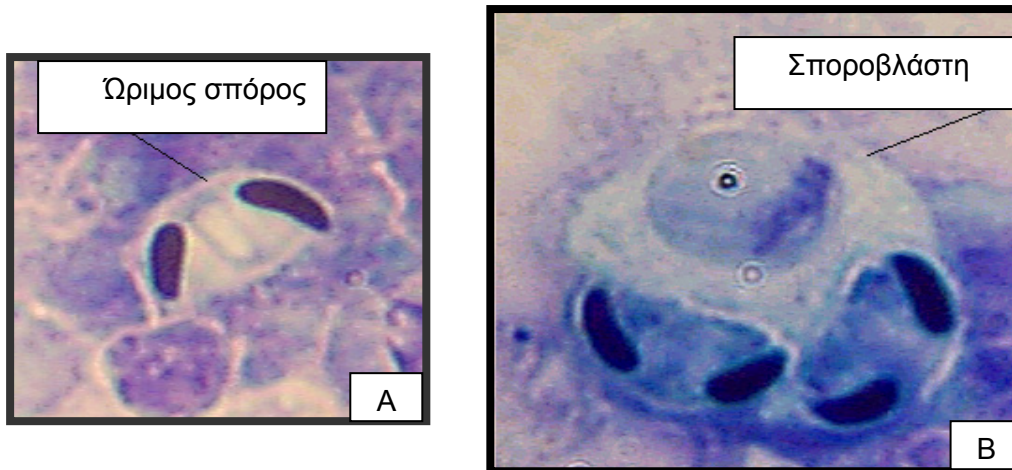
Μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι στην ομάδα ψαριών που θεραπεύτηκαν με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη ανιχνεύτηκε ένας σημαντικός αριθμός σποροβλαστών με παραμορφωμένη δομή, οι οποίοι άρχισαν να εμφανίζονται την 14^η ημέρα σε ποσοστό προσβολής 40% και έφτασαν σε ποσοστό προσβολής 100% την 28^η ημέρα και μέχρι το τέλος της πειραματικής διαδικασίας μειώθηκαν σταδιακά στο 30% (Γράφ. 3.3.2A). Αντιθέτως, στην ομάδα ψαριών χωρίς θεραπεία δεν παρατηρήθηκαν ανάλογες παραμορφώσεις, ενώ στην ομάδα ψαριών που θεραπεύτηκαν με φουματζιλίνη σποροβλάστες με παραμορφωμένη δομή παρατηρήθηκαν μετά την 35^η ημέρα και κυμάνθηκαν από 20-40%.

3.3.2.3 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στο ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους

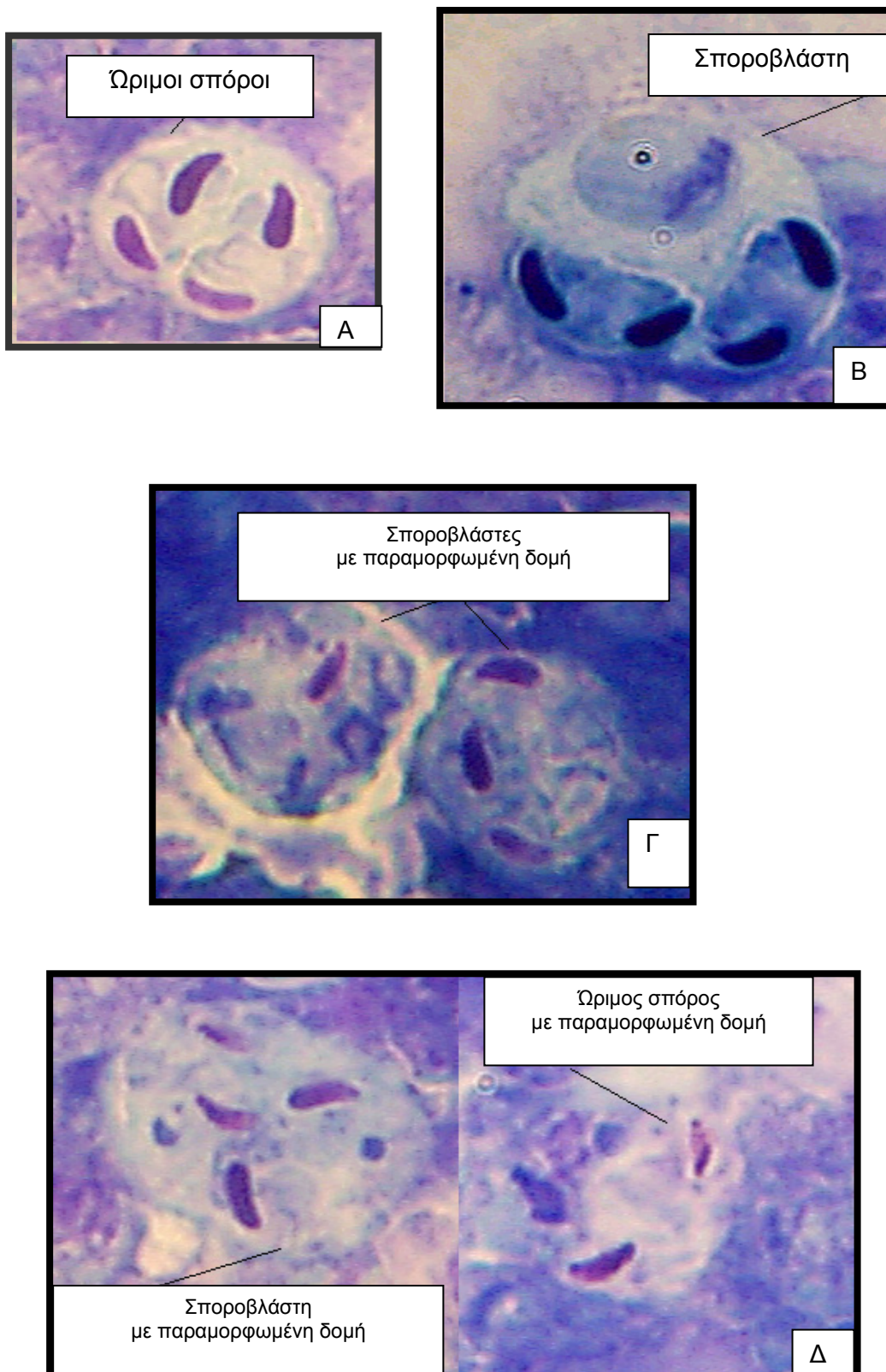
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, (Γράφ. 3.3.1Γ), το ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους και στις τρεις περιπτώσεις ξεκίνησε από υψηλά επίπεδα, μόνο όμως στην περίπτωση χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη, το ποσοστό μειώθηκε απότομα από την 7η ημέρα, ενώ από την 42η ημέρα έφτασε το 0%, όταν το αντίστοιχο ποσοστό στις πειραματικές δεξαμενές με φουματζιλίνη και χωρίς θεραπεία ήταν σημαντικά υψηλότερο. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι, από την 7η ημέρα το ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους των ψαριών στα οποία χορηγήθηκε θεραπεία με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη μειώθηκε περισσότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό των ψαριών στα οποία χορηγήθηκε φουματζιλίνη και αυτό μειώθηκε περισσότερο συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό των ψαριών στα οποία δεν χορηγήθηκε θεραπεία. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους μειώθηκε σημαντικά στην περίπτωση χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη ($42,2 \pm 1,12$, $P = 0,000$, Games-Howell test), όπως και στην περίπτωση που χορηγήθηκε φουματζιλίνη ($13,3 \pm 1,1$, $P = 0,000$, Games-Howell test), συγκριτικά με την περίπτωση που δεν χορηγήθηκε θεραπευτική αγωγή. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι και οι δύο θεραπείες είχαν αποτέλεσμα, η θεραπεία όμως με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη είναι πιο αποτελεσματική συγκριτικά με την θεραπεία με φουματζιλίνη, αφού μείωσε περισσότερο και σε μικρότερο χρονικό διάστημα το ποσοστό προσβολής από ώριμους σπόρους.

Επιπλέον, στην πειραματική δεξαμενή χορήγησης θεραπευτικής αγωγής με αμπρόλιο και σαλινιμυκίνη, παρατηρήθηκαν ώριμοι σπόροι με παραμορφωμένη δομή (Γράφ. 3.3.2B), από την 14^η ημέρα και σε ποσοστό προσβολής 40%, το οποίο έφτασε στο 80% και μειώθηκε σε 20% μέχρι το τέλος της θεραπείας. Επίσης, στην περίπτωση της πειραματικής δεξαμενής με φουματζιλίνη, παρατηρήθηκαν ώριμοι

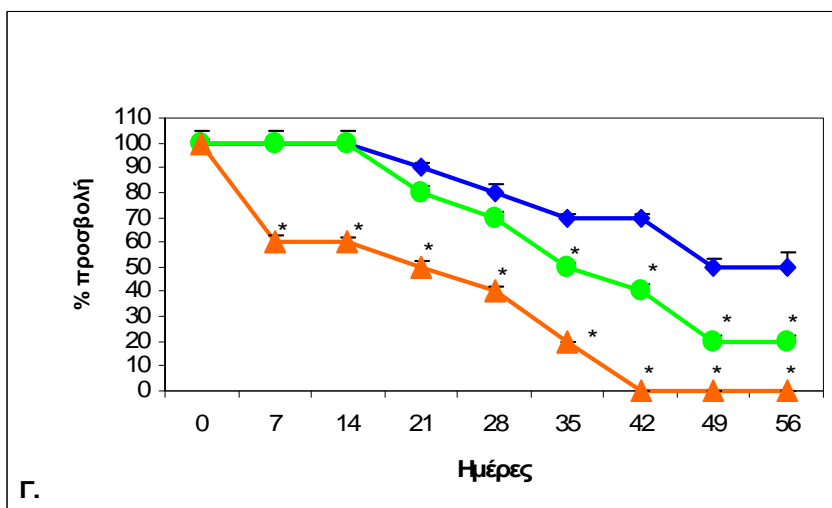
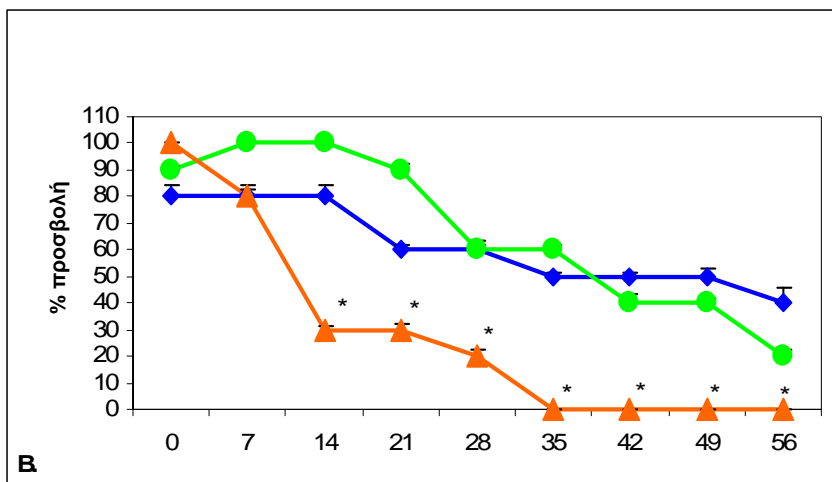
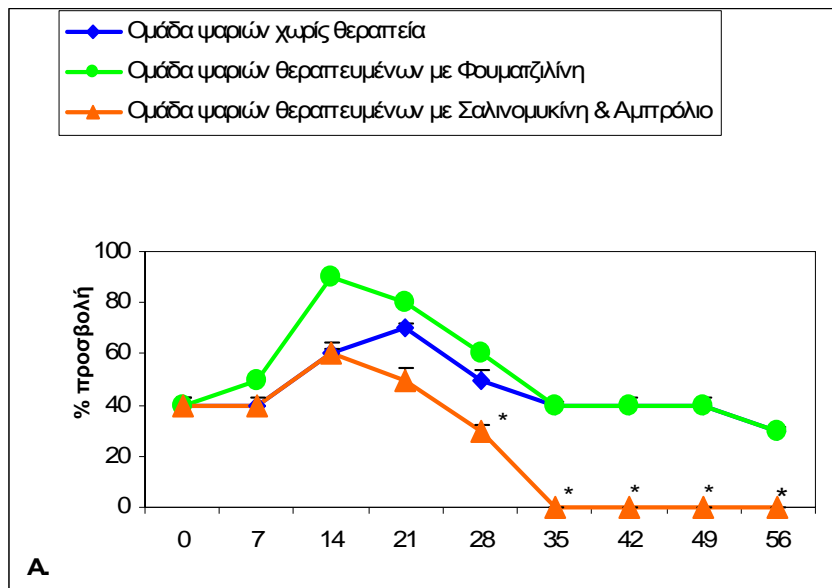
σπόροι με παραμορφωμένη δομή (Γράφ. 3.3.2B), από την 28^η ημέρα και σε αρχικό ποσοστό προσβολής 10%, ποσοστό το οποίο αυξήθηκε σε 30% αντίστοιχα μέχρι το τέλος της θεραπείας. Στις Εικόνες 3.3.1 και 3.3.2 φαίνεται η μορφή των ώριμων σπόρων του παράσιτου στην αρχή της θεραπευτικής αγωγής, πριν την παρατήρηση των παραμορφωμένων σταδίων εξέλιξης του παράσιτου, και οι παραμορφωμένες δομές που παρατηρήθηκαν στη διάρκεια των δύο θεραπειών.



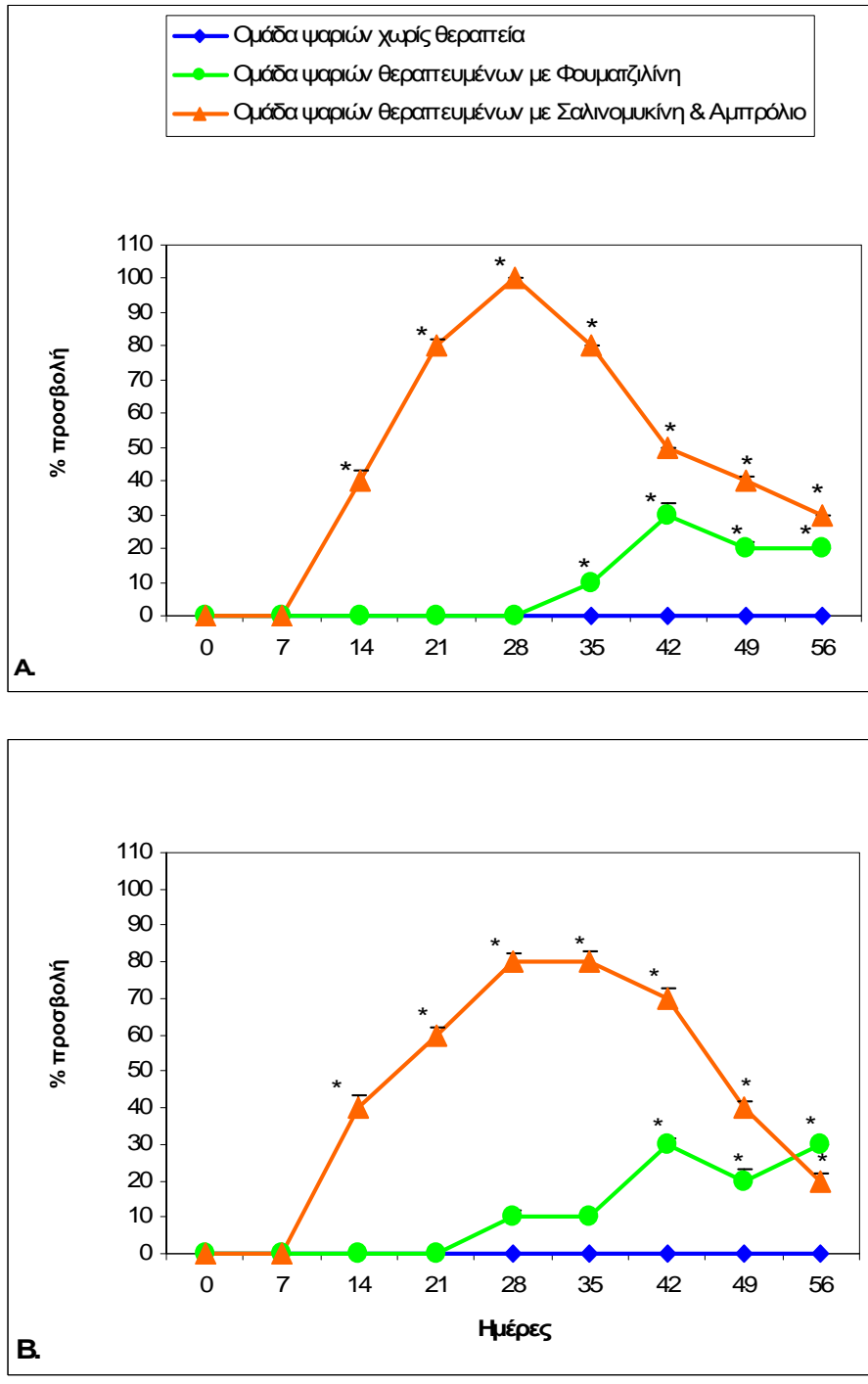
Εικόνα 3.3.1 Σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι του παράσιτου στην πειραματική δεξαμενή με αμπρόλιο και σαλινομυκίνη. Α. Κανονικές μορφές των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων Β., Γ., Δ. Παραμορφωμένες μορφές των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων. Giemsa, x400.



Εικόνα 3.3.2 Σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι του παράσιτου στην πειραματική δεξαμενή με φουματζιλίνη. Α. Κανονικές μορφές των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων Β., Γ., Δ. Παραμορφωμένες μορφές των σποροβλαστών και των ώριμων σπόρων. Giemsa, x400.



Γράφημα 3.3.1 Μεταβολή των ποσοστών προσβολής από κάθε στάδιο ανάπτυξης του *E. coli* ξεχωριστά (Α: τροφοζώιτες, Β: σποροβλάστες και Γ: ώριμοι σπόροι) που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές και στα ψάρια χωρίς θεραπεία (n=10). Κάθε σημείο αναπαριστά το $\bar{X} \pm SD$ δέκα τυχαίων οπτικών πεδίων από κάθε δείγμα ψαριού σε κάθε δειγματοληψία. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με * (Games-Howell test, $p < 0.05$).



Γράφημα 3.3.2 Μεταβολή των ποσοστών προσβολής από κάθε στάδιο ανάπτυξης του *E. coli* με παραμορφωμένη δομή (Α: σποροβλάστες και Β: ώριμοι σπόροι) που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές (n=10). Κάθε σημείο αναπαριστά το $\bar{X} \pm SD$ δέκα τυχαίων οπτικών πεδίων από κάθε δείγμα ψαριού σε κάθε δειγματοληψία. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με * (Games-Howell test, $p < 0.05$).

3.3.3 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στην ένταση της παρασίτωσης

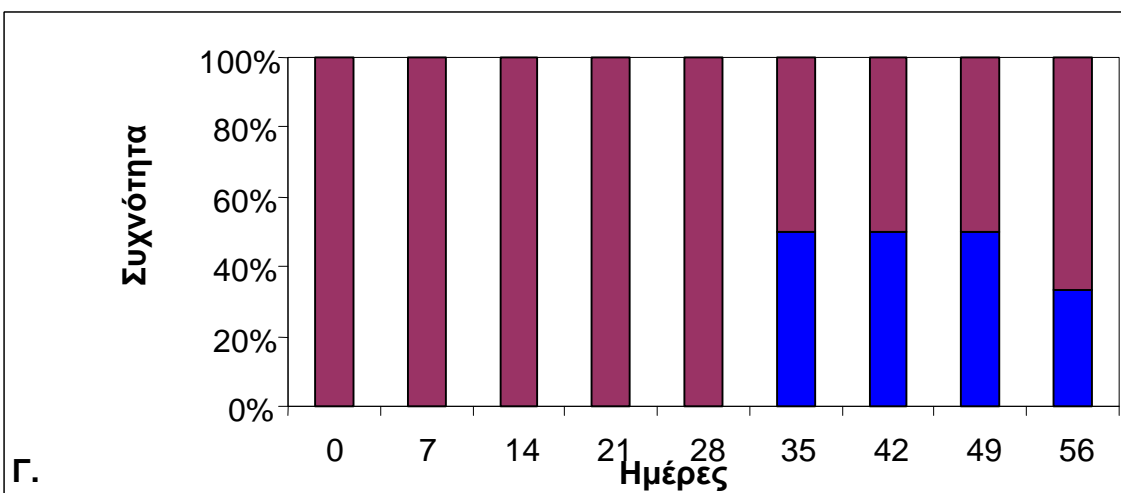
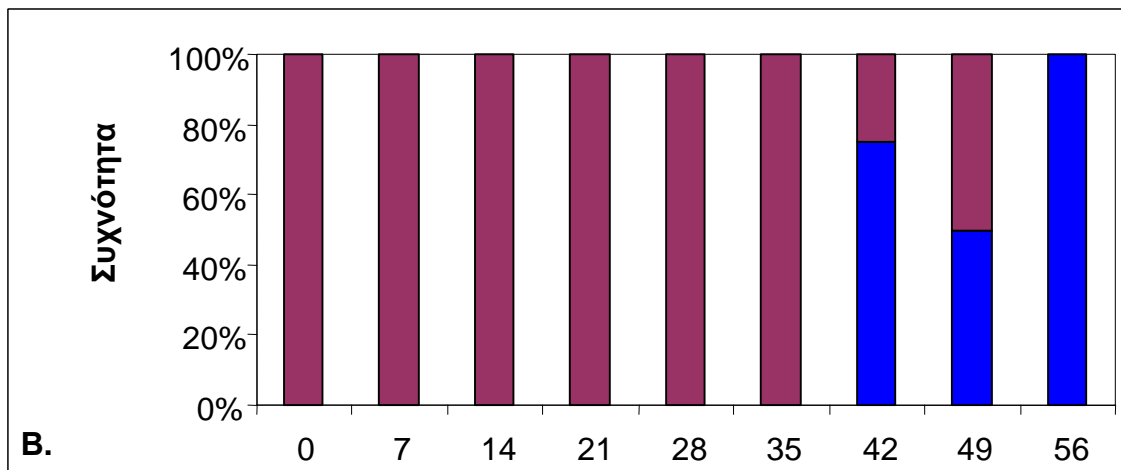
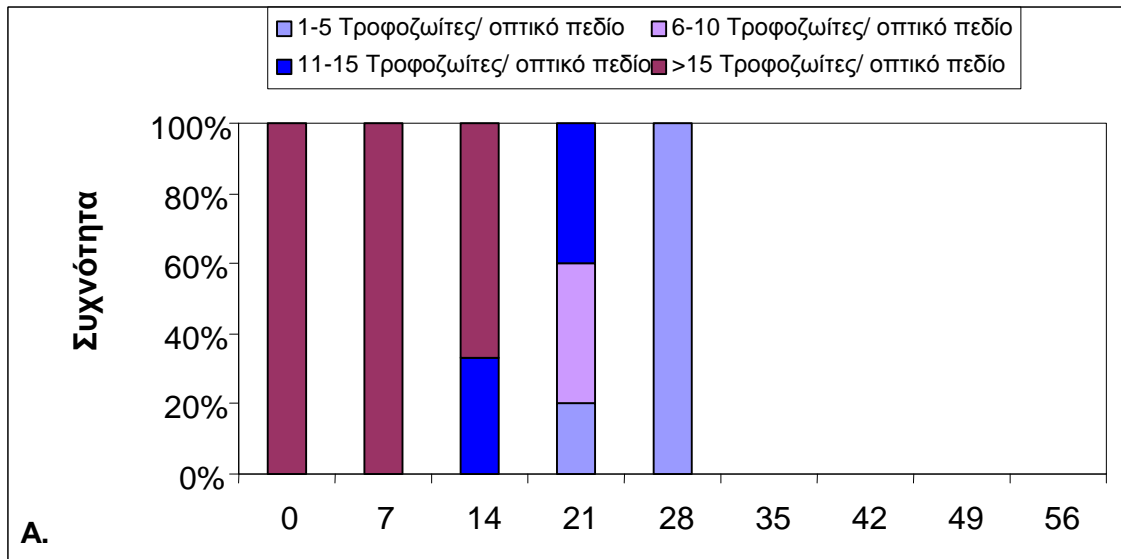
Η ένταση της παρασίτωσης υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρατήρηση όλων των σταδίων ανάπτυξης του μυξοσποριδίου σε νωπά παρασκευάσματα από ξέσματα εντερικού επιθηλίου του οπίσθιου τμήματος του εντερικού σωλήνα.

Στην περίπτωση της θεραπείας με αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη, η αρχική ένταση των τροφοζωιτών ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 1-5/οπτικό πεδίο σε συχνότητα 100%, την 28^η ημέρα, τελευταία ημέρα που παρατηρήθηκαν τροφοζώιτες (Γράφ. 3.3.3A). Στην περίπτωση της θεραπείας με φουματζιλίνη, η αρχική ένταση των τροφοζωιτών ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 10-15/οπτικό πεδίο σε συχνότητα 100% στο τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.3B). Στην περίπτωση των ψαριών στα οποία δεν εφαρμόστηκε θεραπεία η αρχική ένταση των τροφοζωιτών ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 10-15/οπτικό πεδίο σε συχνότητα 100%, και διατηρήθηκαν στη ίδια ένταση και σε συχνότητα 70% μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.3.3Γ).

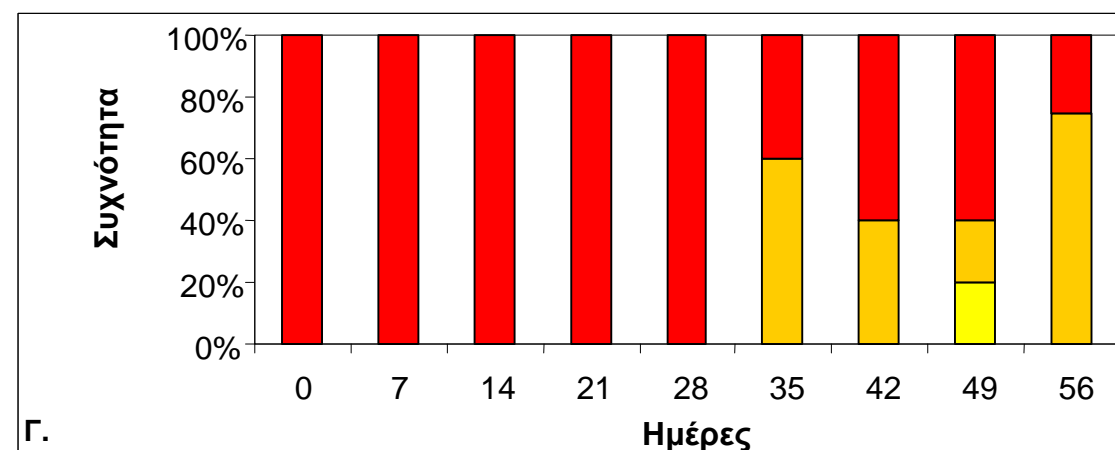
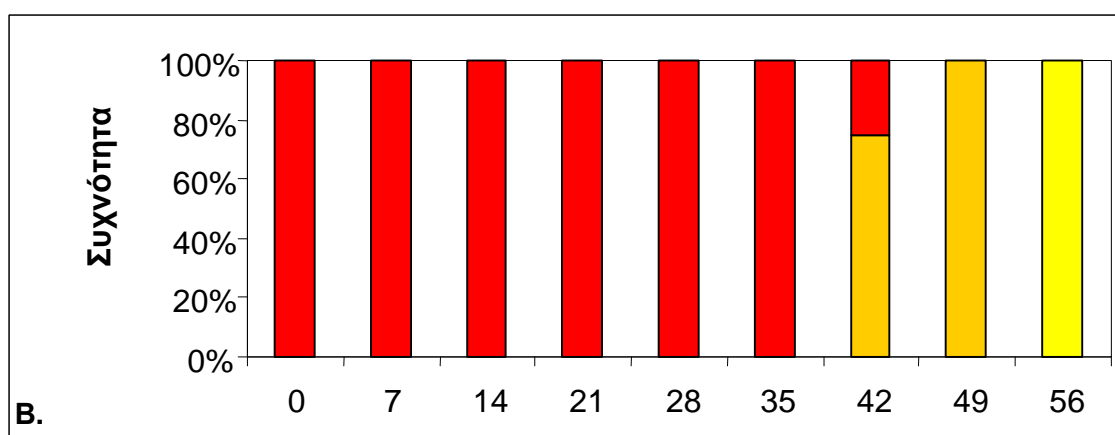
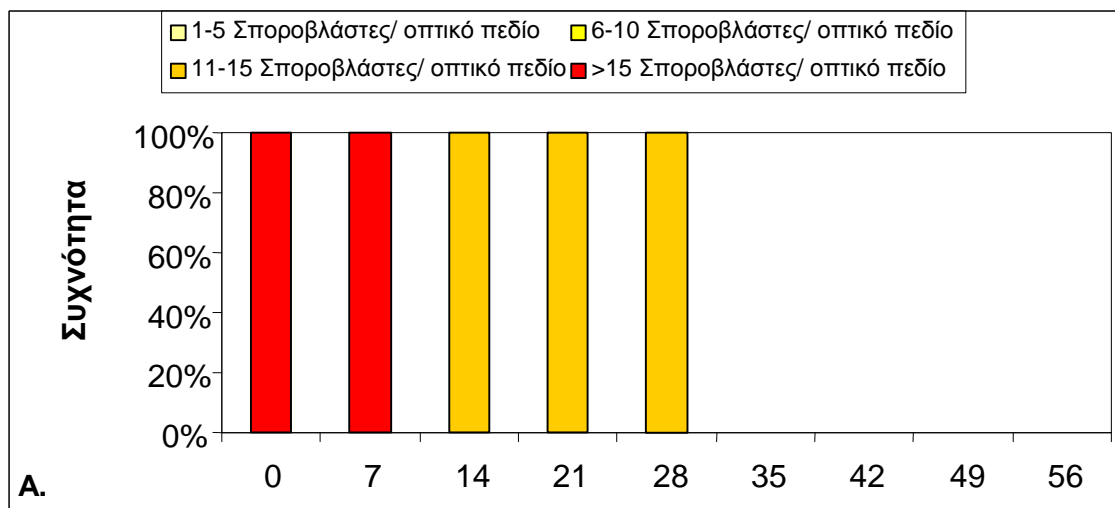
Η αρχική ένταση των σποροβλαστών, στην περίπτωση της θεραπείας με αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη, ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 11-15/οπτικό πεδίο σε συχνότητα 100% την 28^η ημέρα, που είναι η τελευταία μέρα που παρατηρήθηκαν φυσιολογικοί καλοσηματισμένοι σποροβλάστες (Γράφ. 3.3.4A). Σποροβλάστες με παραμορφωμένη δομή παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε χαμηλή ένταση (1-5/οπτικό πεδίο) και σε συχνότητα 100% την 14^η ημέρα. Η έντασή τους έφτασε το υψηλότερο επίπεδο (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% την 28^η ημέρα και μειώθηκε σε 6-10/οπτικό πεδίο και σε συχνότητα 100% στο τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.5A). Στην περίπτωση της θεραπείας με φουματζιλίνη, η αρχική ένταση των σποροβλαστών ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 6-10/οπτικό πεδίο σε συχνότητα 100%, στο τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.4B). Σποροβλάστες με

παραμορφωμένη δομή σε χαμηλή ένταση (1-5/οπτικό πεδίο) και σε συχνότητα 100% παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την 35^η ημέρα, ενώ η έντασή τους έφτασε σε υψηλό επίπεδο (6-10/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 50% στο τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.5B). Στην περίπτωση των ψαριών στα οποία δεν εφαρμόστηκε θεραπεία, η αρχική ένταση των σποροβλαστών ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και διατηρήθηκε στο ίδιο υψηλό επίπεδο και σε συχνότητα 30% και 40% αντίστοιχα μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.3.4Γ).

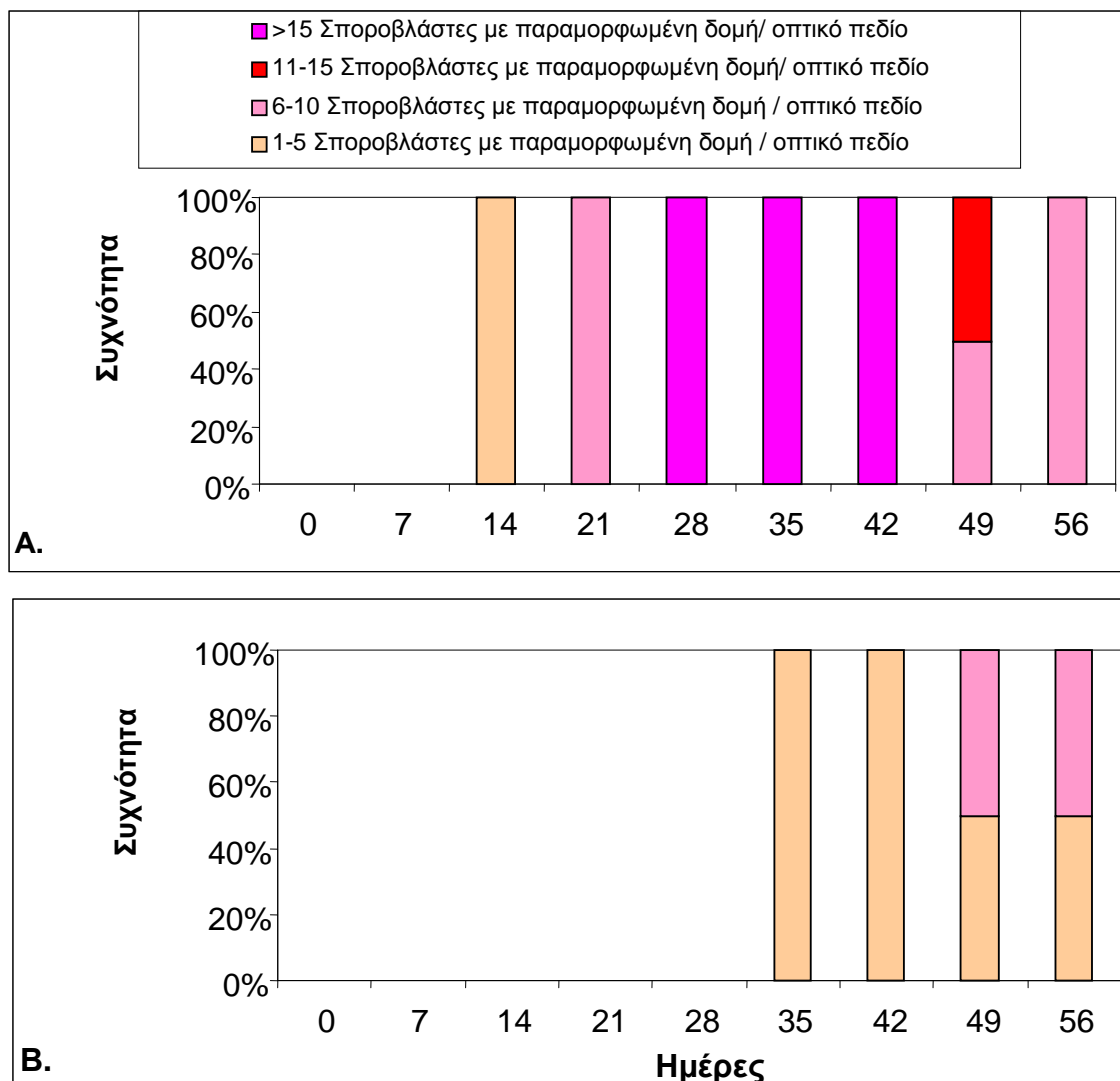
Η αρχική ένταση των ώριμων σπόρων, στην περίπτωση της θεραπείας με αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη, ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 6-10/ οπτικό πεδίο και σε συχνότητα 100% την 35^η ημέρα, που είναι η τελευταία ημέρα που παρατηρήθηκαν φυσιολογικοί καλοσχηματισμένοι σπόροι. (Γράφ. 3.3.6A). Ώριμοι σπόροι με παραμορφωμένη δομή σε χαμηλή ένταση (1-5/οπτικό πεδίο) και σε συχνότητα 100% παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την 14^η ημέρα. Η έντασή τους έφτασε το υψηλότερο επίπεδο (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 30% και μειώθηκε σε 6-10/ οπτικό πεδίο και σε συχνότητα 100% στο τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.7A). Στην περίπτωση της θεραπείας με φουματζιλίνη, η αρχική ένταση των ώριμων σπόρων ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και μειώθηκε σε 11-15/ οπτικό πεδίο και σε συχνότητα 100% την 42^η ημέρα, μέχρι το τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.6B). Ώριμοι σπόροι με παραμορφωμένη δομή σε χαμηλή ένταση (1-5/οπτικό πεδίο) και σε συχνότητα 100% παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά την 28^η ημέρα. Η έντασή τους έφτασε σε υψηλό επίπεδο (6-10/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% μέχρι το τέλος της πειραματικής θεραπείας (Γράφ. 3.3.7B). Στην περίπτωση των ψαριών στα οποία δεν εφαρμόστηκε θεραπεία, η αρχική ένταση των ώριμων σπόρων ήταν υψηλή (>15/οπτικό πεδίο) σε συχνότητα 100% και διατηρήθηκε στο ίδιο υψηλό επίπεδο και σε συχνότητα 30% και 40% αντίστοιχα μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.3.6Γ).



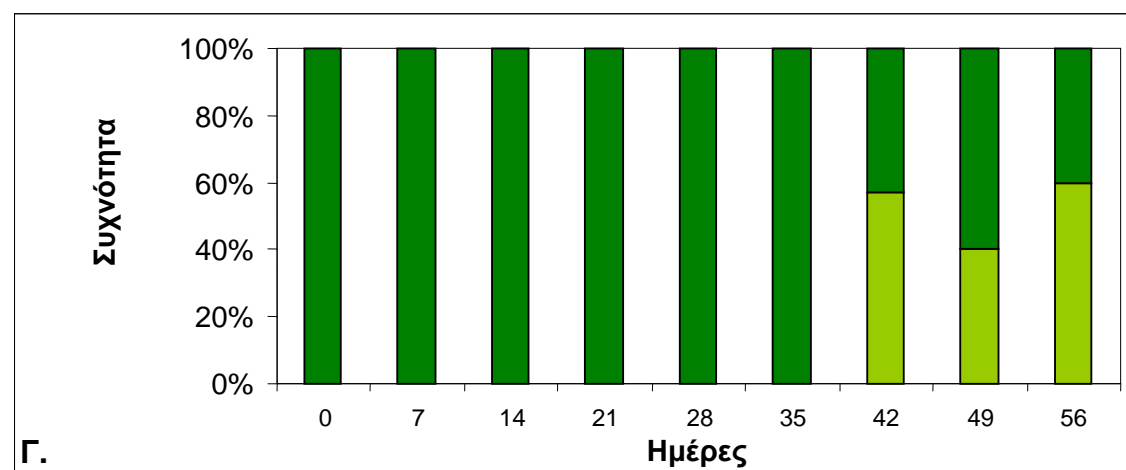
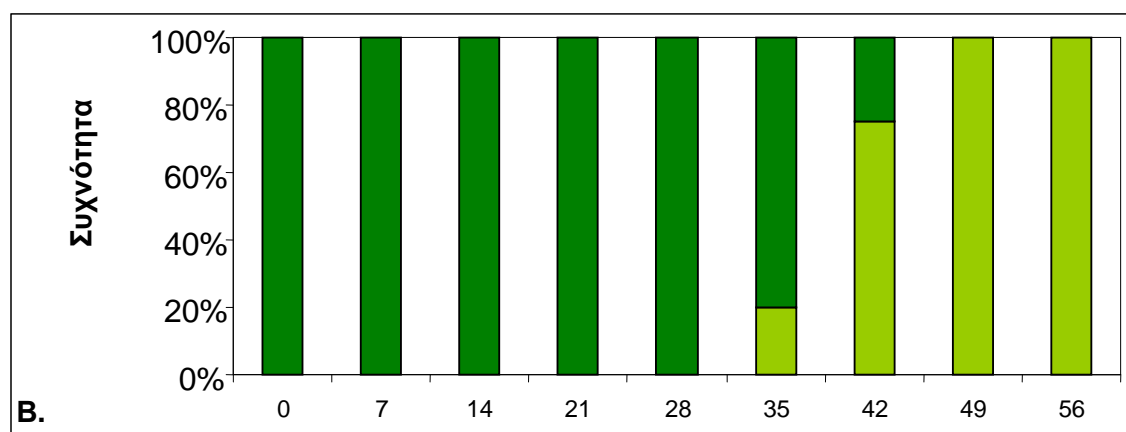
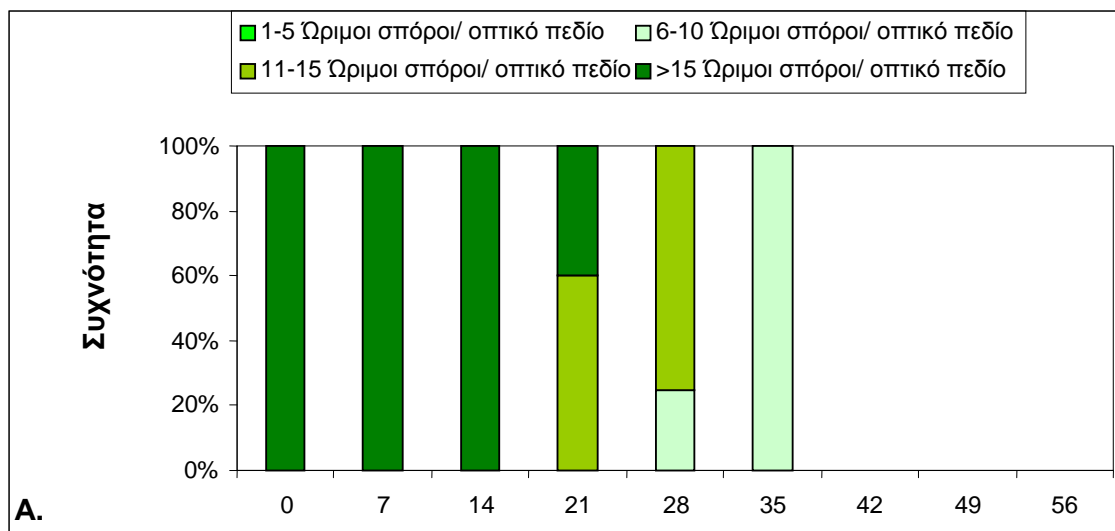
Γράφημα 3.3.3 Επίδραση των θεραπειών στην ένταση και τη συχνότητα των τροφοζωιτών που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές αμπρόλιο & σαλινομυκίνη (Α) και φουματζιλίνη (Β) και στα ψάρια χωρίς θεραπεία (Γ). Στις στήλες παρουσιάζεται η συχνότητα των τροφοζωιτών σε κάθε δειγματοληψία (n=10).



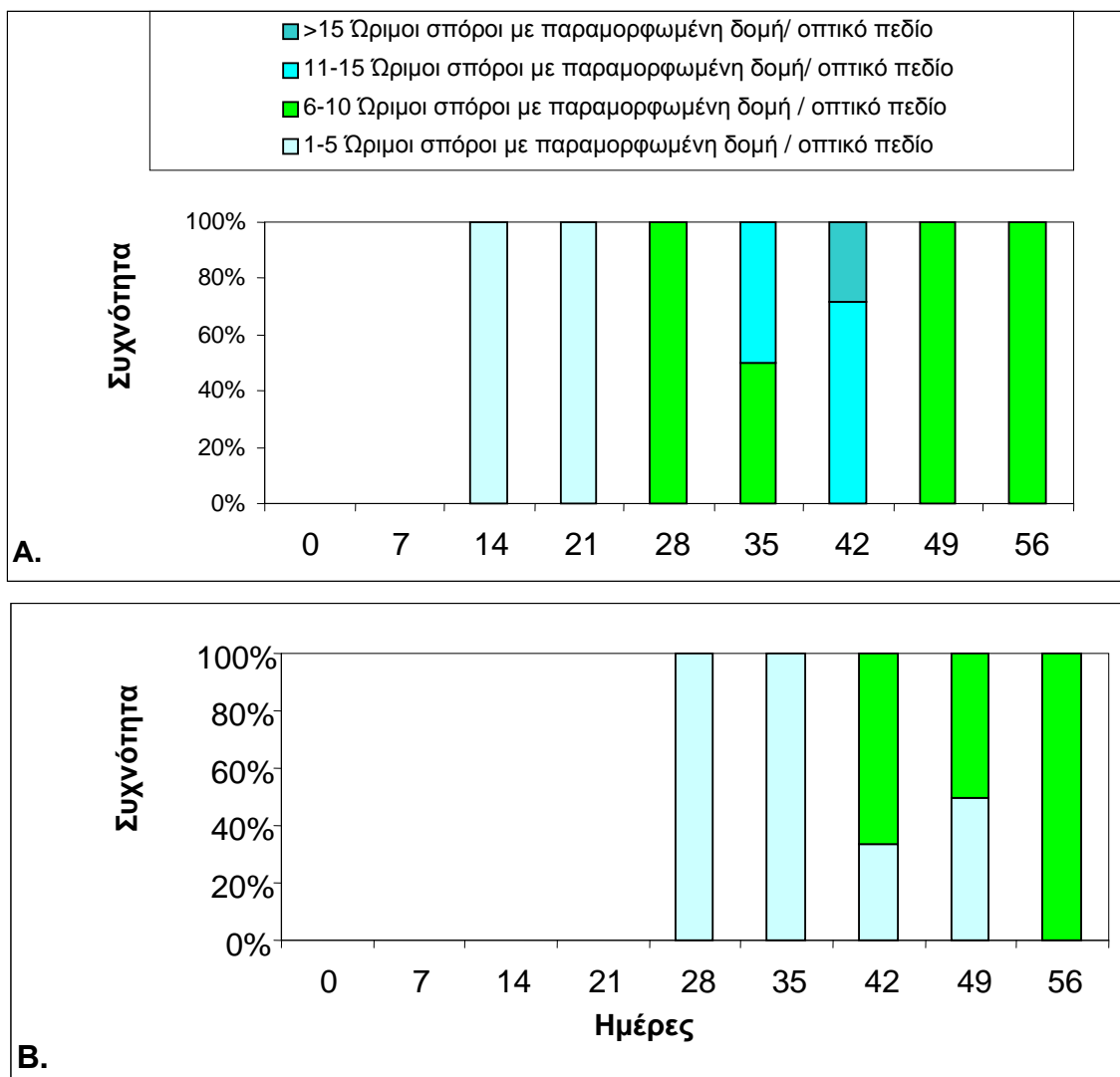
Γράφημα 3.3.4 Επίδραση των θεραπειών στην ένταση και τη συχνότητα των σποροβλαστών που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές αμπρόλιο & σαλινομυκίνη (Α) και φουματζιλίνη (Β) και στα ψάρια χωρίς θεραπεία (Γ). Στις στήλες παρουσιάζεται η συχνότητα των σποροβλαστών, σε κάθε δειγματοληψία (n=10).



Γράφημα 3.3.5 Επίδραση των θεραπειών στην ένταση και τη συχνότητα των σποροβλαστών με παραμορφωμένη δομή, που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές αμπρόλιο & σαλινομυκίνη (Α) και φουματζιλίνη (Β). Στις στήλες παρουσιάζεται η συχνότητα των σποροβλαστών με παραμορφωμένη δομή σε κάθε δειγματοληψία (n=10).



Γράφημα 3.3.6 Επίδραση των θεραπειών στην ένταση και τη συχνότητα των ώριμων σπόρων που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές αμπρόλιο & σαλινομυκίνη (Α) και φουματζιλίνη (Β) και στα ψάρια χωρίς θεραπεία (Γ). Στις στήλες παρουσιάζεται η συχνότητα των ώριμων σπόρων σε κάθε δειγματοληψία (n=10).

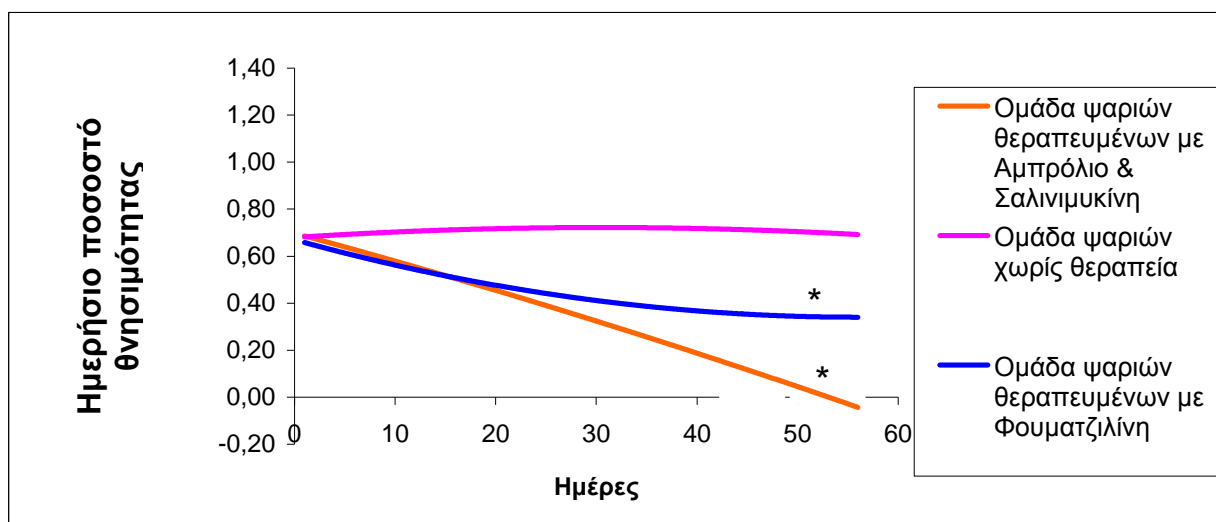


Γράφημα 3.3.7 Επίδραση των θεραπειών στην ένταση και τη συχνότητα των ώριμων σπόρων με παραμορφωμένη δομή, που παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντερικού επιθηλίου στα ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν οι δύο θεραπευτικές αγωγές αμπρόλιο & φαλινομυκίνη (Α) και φουματζιλίνη (Β). Στις στήλες παρουσιάζεται η συχνότητα των ώριμων σπόρων με παραμορφωμένη δομή σε κάθε δειγματοληψία (n=10).

3.3.4 Προσδιορισμός της επίδρασης των θεραπειών στην ανάπτυξη και στο ποσοστό θνησιμότητας

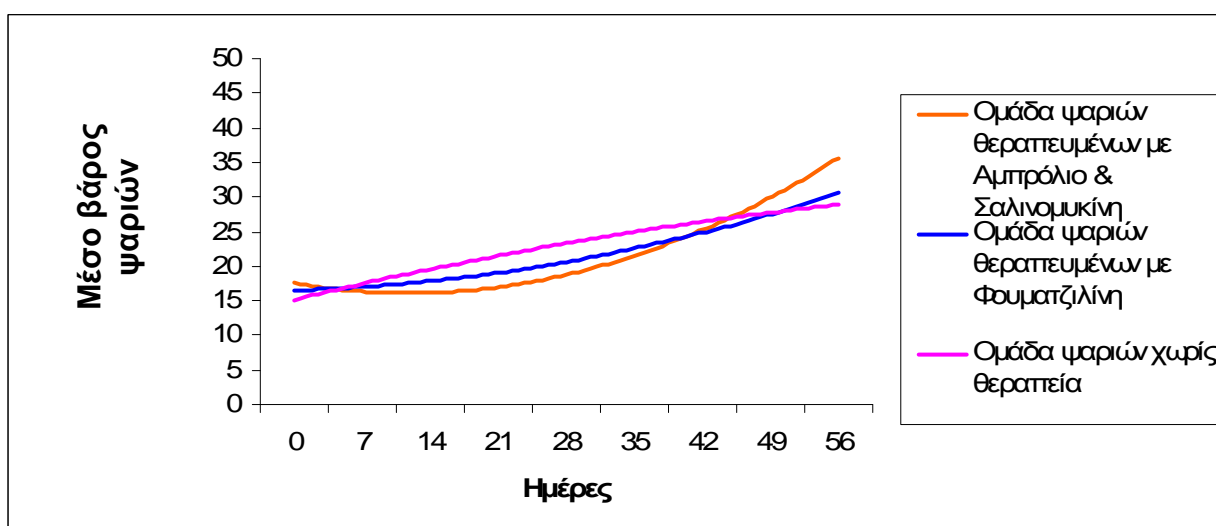
Σε όλα τα νεκρά ψάρια παρατηρήθηκε εκτεταμένη απίσχναση, αποχρωματισμός και απώλεια λεπιών στην ραχιαία επιφάνεια του σώματός τους καθώς και εκτεταμένη αιμορραγία του εντερικού επιθηλίου.

Στην ομάδα στην οποία πραγματοποιήθηκε θεραπεία με αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη, το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ήταν 18,82%. Στην περίπτωση αυτή, το αρχικό ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 0,7% και μειώθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος την 55^η ημέρα σε 0%. Στην ομάδα στην οποία πραγματοποιήθηκε θεραπεία με φουματζιλίνη το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ήταν 25,04%. Στην περίπτωση αυτή το αρχικό ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 0,8% και μειώθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος την 55^η ημέρα σε 0,13%. Αντιθέτως, στην ομάδα στην οποία δεν πραγματοποιήθηκε θεραπεία το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ήταν 39,7%. Στην περίπτωση αυτή, το αρχικό ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας ήταν 0,6% και παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο μέχρι το τέλος του πειράματος (Γράφ. 3.3.8). Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι το ποσοστό συνολικής θνησιμότητας μεταξύ των τριών ομάδων παρουσίαζε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($F_{2,107}=30,66$, $P = 0,000$, ANOVA).



Γράφημα 3.3.8 Μεταβολή του ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας (γραμμή τάσης) στις δύο θεραπευμένες ομάδες ψαριών και στην δεξαμενή των ψαριών χωρίς θεραπεία. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με * (Games-Howell test, $p < 0.05$).

Όσον αφορά την ανάπτυξη των ψαριών -και θεωρώντας το βάρος τους ως το βασικό δείκτη ανάπτυξης- δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκαν οι θεραπευτικές αγωγές και στα ψάρια στα οποία δεν εφαρμόστηκε καμία θεραπευτική αγωγή, όπως επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική ανάλυση (Γράφ. 3.3.9).



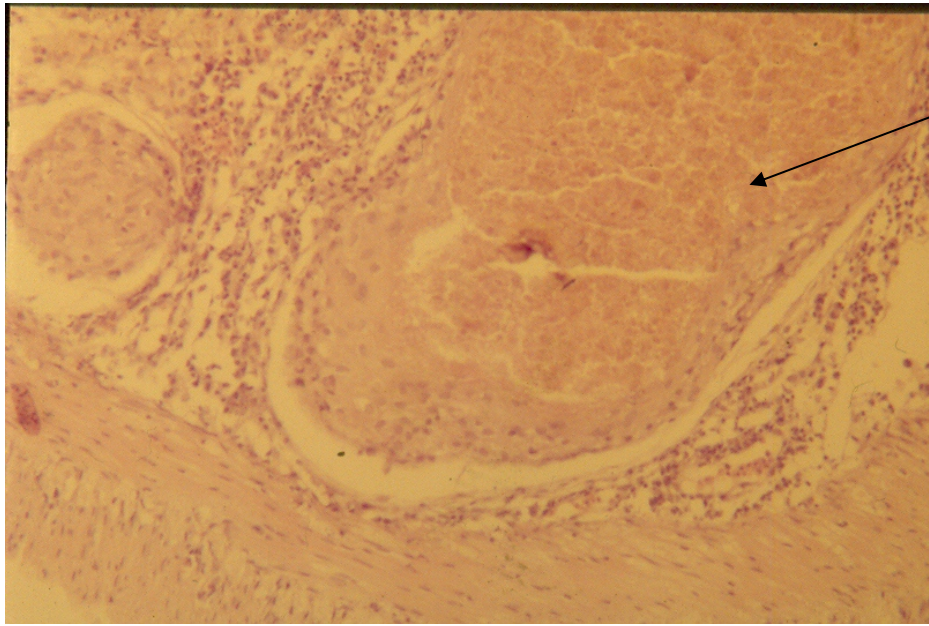
Γράφημα 3.3.9 Αλλαγές του μέσου βάρους των ψαριών που εξετάστηκαν από τις δύο θεραπευμένες ομάδες ψαριών και των ψαριών χωρίς θεραπεία. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με * (Games-Howell test, $p < 0.05$).

3.3.5 Εκτίμηση της τοξικότητας με ιστοπαθολογική εξέταση

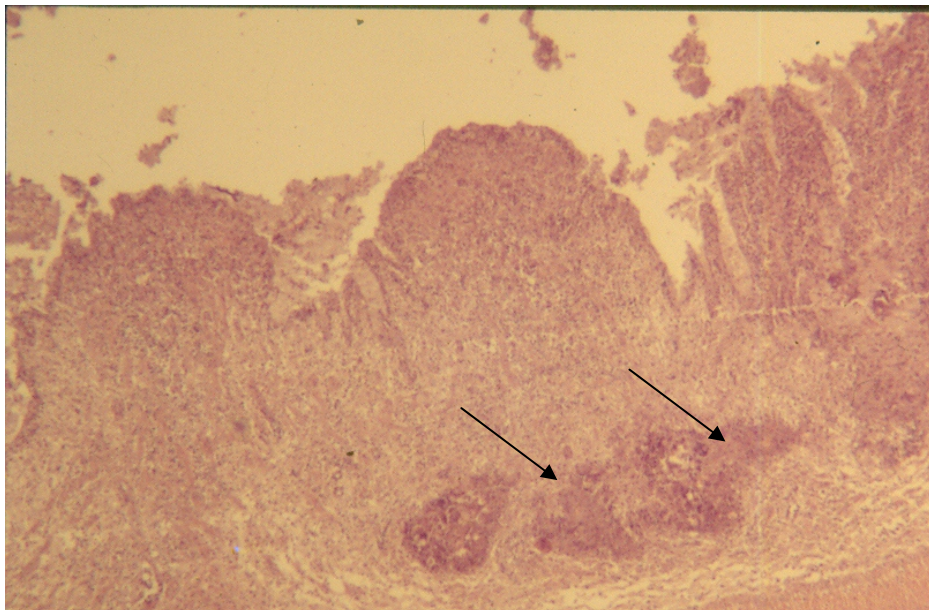
Σε όλα τα πειράματα, τα μολυσμένα ψάρια πριν την έναρξη των θεραπειών καθώς και τα ψάρια μάρτυρες χωρίς θεραπεία στο τέλος των πειραμάτων, βρέθηκαν μολυσμένα με το *E. Iaei* σε μεγάλη ένταση στο έντερο (μέσος αριθμός συνολικών σταδίων ανά οπτικό πεδίο: >15, x 400).

Οι μικροσκοπικές αλλοιώσεις αφορούσαν το επιθήλιο του λεπτού εντέρου όπου παρατηρήθηκε εκφύλιση, απόπτωση και νέκρωση των επιθηλιακών κυττάρων των λαχνών, με απώλεια της φυσιολογικής δομής του εντέρου (Εικ. 3.3.3). Επίσης παρατηρήθηκαν αιμορραγίες στον βλεννογόνο (Εικ. 3.3.4). Φλεγμονώδης αντίδραση παρατηρήθηκε μόνο από τους τροφοζώιτες στο βλεννογόνο και αυτή παρατηρήθηκε μέχρι το παράσιτο να φτάσει το στάδιο του σποροβλάστη. Το επιθήλιο της χοληδόχου κύστης βρέθηκε εκφυλισμένο και όλα τα στάδια του παράσιτου ήταν παρόντα μαζί με κρυστάλλους μέσα στην κοιλότητα της χοληδόχου κύστης.

Έγινε επίσης σύγκριση μεταξύ των ιστολογικών τομών όλων των ψαριών των πειραμάτων με τομές υγιών ψαριών. Σε αντίθεση με τα ψάρια μάρτυρες χωρίς θεραπεία, στα ψάρια που χορηγήθηκε θεραπεία με αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη, παρατηρήθηκαν ελάχιστοι σπόροι ελεύθεροι στον εντερικό αυλό στο τέλος της θεραπείας, ενώ δεν παρατηρήθηκαν παθολογικές αλλοιώσεις σε κανένα άλλο όργανο. Αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν μόνο σε ψάρια που χορηγήθηκε θεραπεία με φουματζιλίνη σε δόσεις 6mgKgBW^{-1} για 6 εβδομάδες στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό του νεφρού όπου υπήρχε ελαφρά φλεγμονώδης αντίδραση. Σε λίγες περιπτώσεις βρέθηκε αιμορραγία και συμφόρηση του ήπατος. Σε όλα τα ψάρια της θεραπείας παρατηρήθηκε πάχυνση της κάψας των νεφρικών σωματίων.



Εικόνα 3.3.3 Ιστολογικό παρασκεύασμα εντέρου χιόνας, προσβεβλημένης με *E. lei*. Παρατηρούνται απώλεια φυσιολογικής δομής του εντέρου και σχηματισμός κοκκιωματώδους αντίδρασης. H&E, x400.



Εικόνα 3.3.4 Ιστολογικό παρασκεύασμα εντέρου χιόνας, προσβεβλημένης με *E. lei*. Παρατηρούνται απώλεια φυσιολογικής δομής του εντέρου και σχηματισμός κοκκιωματώδους αντίδρασης και αιμορραγίες. H&E, x400.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη των μυξοσποριδιάσεων στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Ρόλος των άγριων ψαριών στη μετάδοση των παρασίτων.

4.1.1 Ξενιστές και εποχικότητα Μυξοσποριδίων

Enteromyxum leei Diamant, Lom & Dyková 1994

Η παρασίτωση με *E. leei* είναι μία ασθένεια η οποία είναι υπεύθυνη για σημαντικές απώλειες στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες. Το Μυξοσπορίδιο αυτό αρχικά ανιχνεύθηκε σε εκτρεφόμενη τσιπούρα σε δεξαμενές, στην Κύπρο και στο Ισραήλ και προκάλεσε σοβαρές απώλειες (Diamant 1992, Diamant και συν. 1994). Στις τελευταίες περιπτώσεις, όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου παρατηρήθηκαν καθόλο το μήκος του εντερικού σωλήνα, ενώ σε μια περίπτωση, ώριμοι σπόροι παρατηρήθηκαν και στην ουροδόχο κύστη. Μετά την πρώτη αυτή αναφορά, το παράσιτο αυτό σχετίστηκε με θνησιμότητες όχι μόνο στην τσιπούρα αλλά και σε άλλα είδη της οικογένειας Sparidae, στο Ισραήλ, στη Γαλλία, στην Ιταλία, στην Ισπανία, στην Τουρκία και στην Ελλάδα. Στο Ισραήλ, η μυξοσποριδίαση από *E. leei* εξελίχθηκε σε μία από τις πιο σοβαρές ασθένειες που επηρέασαν την παραγωγή της τσιπούρας, ενώ διαγνώσθηκε και σε άλλα καλλιεργούμενα είδη ψαριών, όπως στη χιόνα (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777), στο φαγκρί *Pagrus pagrus* Linnaeus 1758 (Diamant 1995) και στο είδος *Sciaenops ocellatus* Linnaeus 1766 στο έντερο του οποίου παρατηρήθηκαν όλα τα στάδια του παράσιτου σε ποσοστό προσβολής 40% (Diamant 1998). Επίσης, έχει διαγνωσθεί και σε άγρια είδη ψαριών της Μεσογείου και της Ερυθράς Θάλασσας, σε άγρια κεφαλοειδή (Paperna 1998) και σε 25 διαφορετικά είδη μεσογειακών ψαριών τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ενυδρείου και βρέθηκαν μολυσμένα στον εντερικό σωλήνα (Padros, Palenzuela, Hispano, Tosas, Zarza, Crespo & Álvarez-Pellitero 2001). Τα πιο έντονα μολυσμένα

από αυτά ήταν είδη των οικογενειών Labridae και Blenniidae, ενώ στα είδη της οικογένειας Sparidae το ποσοστό προσβολής ήταν χαμηλό.

Στη Γαλλία, το παράσιτο αρχικά ανιχνεύτηκε σε τσιπούρα (Sakiti, Tarer, Jacquemin & Marques 1996) και κατόπιν η ασθένεια διαγνώσθηκε και σε ιχθύδια χιόνας σε μονάδα εκτροφής στην Κορσική, προκαλώντας αυξημένες θνησιμότητες (Tarer, Sakiti, Le Breton & Marques 1996).

Στην Ιταλία, η μυξοσποριδίαση αυτή ανιχνεύτηκε τη δεκαετία του 90 σε τσιπούρα και χιόνα σε αυξημένα ποσοστά προσβολής, επηρεάζοντας αρνητικά την ανάπτυξη των μολυσμένων ψαριών και προκαλώντας θνησιμότητες της τάξεως του 5-10% (Ghittino unpublished data). Πρόσφατα στην Ιταλία, το παράσιτο *E. leei* παρατηρήθηκε σε αυξημένο ποσοστό προσβολής (41%) σε εντατικά εκτρεφόμενες χιόνες (σε κλωβούς) μέσου βάρους 25g. Το παράσιτο ανιχνεύτηκε στον εντερικό σωλήνα και μόνο στην περίπτωση αυξημένων ποσοστών προσβολής παρατηρήθηκε και στη χοληδόχο κύστη, ενώ τα μέγιστα ποσοστά προσβολής εμφανίστηκαν το φθινόπωρο σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 22°C (Merella, Cherchi, Salati & Garippra 2005).

Στην Ισπανία, το παράσιτο αρχικά ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 1999, σε τσιπούρα μέσου βάρους 200-300g και σε χιόνα (Padros, Crespo, Álvarez-Pellitero & Palenzuela unpublished data). Πρόσφατα ένα άλλο Μυξοσπορίδιο, το *Enteromyxum scopthalmi*, Palenzuela, Redondo & Álvarez-Pellitero 2002 το οποίο σχετίζεται μορφολογικά με το *E. leei*, παρατηρήθηκε στον πεπτικό σωλήνα και στη χοληδόχο κύστη σε καλλιεργούμενο καλκάνι (*Psetta maxima* Linnaeus 1758) διαφόρων μεγεθών (84-290g), προκαλώντας εντερίτιδα και αυξημένες θνησιμότητες (Palenzuela, Redondo & Álvarez-Pellitero 2002, Redondo και συν. 2002)

Στην Ελλάδα, μόλυνση από *E. leei* περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1995 από τους Le Breton και Marques σε εντακτική μονάδα πάχυνσης χιόνας, τσιπούρας και φαγκριού, όπου το ποσοστό της θνησιμότητας έφτασε το 40%. Σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, στο έντερο χιόνας μέσου βάρους 30-60g παρατηρήθηκαν όλα

τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου (τροφοζώιτες, σποβοβλάστες και ώριμοι σπόροι), ενώ στη χοληδόχο κύστη και στο στόμαχο παρατηρήθηκαν μόνο ώριμοι σπόροι. Στο φαγκρί (*Pagrus major* Temminck & Schlegel 1843) μέσου βάρους 350g ώριμοι σπόροι, ίδιου μεγέθους με αυτούς που παρατηρήθηκαν στη χιόνα, παρατηρήθηκαν στο έντερο και στη χοληδόχο κύστη σε ιδιαίτερα αυξημένο ποσοστό προσβολής (90%), ενώ στην μολυσμένη τσιπούρα το κύριο όργανο στόχος ήταν το έντερο. Μεγάλες επιδημίες με αυξημένες θνησιμότητες παρατηρήθηκαν από το 1995 έως το 1997 προκαλώντας σοβαρές απώλειες στην καλλιέργεια των ψαριών της οικογένειας Sparidae. Οι μεγαλύτερες θνησιμότητες (80% της παραγωγής των ειδών αυτών) παρατηρήθηκαν σε εντατικά εκτρεφόμενη χιόνα τους καλοκαιρινούς μήνες, σε βαθμό που να καθιστούν πλέον το είδος αυτό ασύμφορο για εντατική καλλιέργεια (Αθανασοπούλου και συν. 1998, Athanassopoulou και συν. 1999, Rigos και συν. 1999). Το πιο ευπαθές μέγεθος ψαριών ήταν ψάρια βάρους 20-85g (Rigos και συν. 1999). Το κύριο όργανο στόχος ήταν το έντερο και η χοληδόχος κύστη και λιγότερο τα βράγχια. Ωριμοί σπόροι του παράσιτου παρατηρήθηκαν σε όλα τα όργανα στόχους, ενώ τροφοζώιτες και σποροβλάστες παρατηρήθηκαν μόνο στο έντερο (Athanassopoulou και συν. 1999, Rigos και συν. 1999). Επίσης, η ασθένεια αυτή έχει θεωρηθεί επικίνδυνη και για τα νέα καλλιεργούμενα είδη στην Ελλάδα, σαργό και λιθρίνι, προκαλώντας αυξημένες θνησιμότητες (Álvarez-Pellitero μη δημοσιευμένα στοιχεία).

Στην παρούσα μελέτη, το *E. leei* παρατηρήθηκε τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενη χιόνα και τσιπούρα, ενώ για πρώτη φορά διεθνώς ο εκτρεφόμενος σαργός θεωρήθηκε σημαντικός ξενιστής του παράσιτου. Η χιόνα αποδείχθηκε ο κύριος ξενιστής του παράσιτου όπου παρατηρήθηκαν και οι μεγαλύτερες θνησιμότητες και τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής, γεγονός αναμενόμενο, αφού το είδος αυτό θεωρείται το πιο ευαίσθητο είδος στην παρασίτωση από *E. leei* (Αθανασοπούλου και συν. 1998,

Athanassopoulou και συν. 1999, Rigos και συν. 1999). Το μέγεθος των μολυσμένων ψαριών κυμαινόταν από 50-100g, επιβεβαιώνοντας με τον τρόπο αυτό την μέχρι τώρα επικρατούσα άποψη, ότι τα ψάρια μεγέθους 20-85g είναι πιο ευπαθή (Rigos και συν. 1999). Στην παρούσα έρευνα επίσης, το *E. Iaei* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα σε άγρια τσιπούρα και άγριο κέφαλο που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια, ενώ μέχρι τώρα έχει παρατηρηθεί σε λίγα θαλασσινά είδη εκτός της οικογένειας Sparidae, όπως το *Sciaenops ocellatus* L. (Diamant 1998), σε διάφορα άλλα άγρια κεφαλοειδή (Paperna 1998) και σε 25 διαφορετικά είδη μεσογειακών ψαριών τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ενυδρείου (Padros και συν. 2001).

Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν το έντερο. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν μεγάλα ποσοστά προσβολής σε εκτρεφόμενη χιόνα και σαργό, παρατηρήθηκε επίσης στη χοληδόχο κύστη και στα βράγχια. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με άλλους ερευνητές που υποστηρίζουν ότι το έντερο είναι το πρώτο όργανο στόχος του παράσιτου και ότι σε περιπτώσεις εκτεταμένων μολύνσεων το παράσιτο μπορεί να παρατηρηθεί και σε άλλα όργανα (Αθανασοπούλου και συν. 1998, Athanassopoulou και συν. 1999, Merella και συν. 2005, Rigos και συν. 1999). Στην παρούσα έρευνα αναφέρεται επίσης για πρώτη φορά διεθνώς, ότι ο νεφρός αποτελεί όργανο στόχο του παράσιτου, αφού ώριμοι σπόροι του παράσιτου παρατηρήθηκαν στους νεφρούς σε έντονα μολυσμένη εκτρεφόμενη χιόνα.

Από την παρούσα έρευνα προέκυψε ότι το καλοκαίρι είναι η εποχή που ευνοεί την έξαρση των μυξοσποριδιάσεων. Τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής του παράσιτου *E. Iaei* παρατηρήθηκαν, τόσο στα εκτρεφόμενα όσο και στα άγρια ψάρια, τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες, γεγονός που υποστηρίζεται και από άλλους ερευνητές (Αθανασοπούλου και συν. 1998, Athanassopoulou και συν. 1999, Merella και συν. 2005, Rigos και συν. 1999) σύμφωνα με τους οποίους τα ποσοστά θνησιμότητας από *E. Iaei* συνήθως αυξάνονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των

22°C και μειώνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C. Συγκεκριμένα, στην εκτρεφόμενη χιόνα και στον εκτρεφόμενο σαργό, τα μεγαλύτερα συνολικά ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν το καλοκαίρι, στην εκτρεφόμενη τσιπούρα την άνοιξη, ενώ στα άγρια μολυσμένα ψάρια (τσιπούρα και κέφαλο) το παράσιτο παρατηρήθηκε κυρίως το καλοκαίρι.

Στην παρούσα έρευνα, το παράσιτο παρατηρήθηκε το καλοκαίρι συγχρόνως τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια, σε ποσοστά προσβολής που δεν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους. Έτσι, αποδείχθηκε για πρώτη φορά διεθνώς ότι μπορεί να υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στα άγρια και στα εκτρεφόμενα ψάρια και μάλιστα τα άγρια ψάρια ενδέχεται να αποτελούν φορείς μετάδοσης του παράσιτου *E. leei*. Η μετάδοση του παράσιτου ανάμεσα στα άγρια και στα εκτρεφόμενα ψάρια μέχρι τώρα δεν είχε επιβεβαιωθεί, αν και το παράσιτο έχει παρατηρηθεί σε λίγα θαλασσινά είδη εκτός της οικογένειας Sparidae, όπως το *Sciaenops ocellatus* L. (Diamant 1998), σε άγρια κεφαλοειδή (Paperna 1998) και σε 25 διαφορετικά είδη μεσογειακών ψαριών τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες ενυδρείου (Padros και συν. 2001).

Polysporoplasma sparis Sitjà-Bobadilla & Álvarez – Pellitero 1995

Το Μυξοσπορίδιο *P. sparis* είναι επίσης ένα παράσιτο που έχει παρατηρηθεί στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες. Παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τους Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero (1995) στην Ισπανία σε τσιπούρα, αν και αρχικά ονομάστηκε *Sphaerospora* sp. (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992α). Το 1999 ο Palenzuela και συν. μελέτησαν την παρασίτωση από *P. sparis* στην Ισπανία σε διαφορετικά συστήματα εκτροφής και βρήκαν το παράσιτο μόνο σε ημι-εντακτικά συστήματα εκτροφής και σε ψάρια μεγαλύτερα των 51g, χωρίς να παρατηρηθεί διαφορά στο ποσοστό προσβολής μεταξύ εποχών.

Στην Αδριατική, το Μυξοσπορίδιο παρατηρήθηκε στους νεφρούς σε εντακτικά καλλιεργούμενη (σε κλωβούς) χιόνα και τσιπούρα μέσου βάρους 250g. Ο κύριος

ξενιστής αποδείχθηκε η τσιπούρα με ποσοστά προσβολής που κυμαίνονταν από 7,14% έως 100%. Το καλοκαίρι και το φθινόπωρο ήταν οι εποχές που παρατηρήθηκαν τα μέγιστα ποσοστά προσβολής στην τσιπούρα, ενώ σποροβλάστες του παράσιτου παρατηρήθηκαν σε χιόνα σε αυξημένο ποσοστό προσβολής (36%) την άνοιξη (Mladineo 2003).

Στην Ελλάδα, έρευνες αναφέρουν (Athanassopoulou και συν. 2004α, Karagouni και συν. 2005β, Rigos και συν. 1999), ότι η εντατικά καλλιεργούμενη τσιπούρα (σε κλωβούς) είναι ο κύριος ξενιστής του παράσιτου, με εξαίρεση μία περίπτωση όπου παρατηρήθηκε και σε μυτάκι (Rigos και συν. 1999). Στην τσιπούρα έχει παρατηρηθεί σε διάφορα μεγέθη σε πολλά εντατικά συστήματα εκτροφής σε υψηλά ποσοστά προσβολής που φτάνουν έως και το 93% και αυξημένη ένταση της παρασίτωσης την καλοκαιρινή περίοδο (Athanassopoulou και συν. 2004α, Karagouni και συν. 2005β). Το όργανο στόχο του παράσιτου και στα δύο είδη ψαριών ήταν ο νεφρός (Athanassopoulou και συν. 2004α, Rigos και συν. 1999).

Στην παρούσα έρευνα, το *P. sparix* παρατηρήθηκε τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια. Συγκεκριμένα, το παράσιτο παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και χιόνα, με την τσιπούρα να αποτελεί τον κύριο ξενιστή του παράσιτου. Το γεγονός αυτό είναι σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνητών που αναφέρουν την τσιπούρα ως τον κύριο ξενιστή του παράσιτου (Athanassopoulou και συν. 2004α, Mladineo 2003, Palenzuela και συν. 1999, Rigos και συν. 1999). Επίσης, στην παρούσα έρευνα για πρώτη φορά διεθνώς παρατηρήθηκε σε άγρια ψάρια, όπως τσιπούρα, κέφαλο και σε μία περίπτωση σε λιθρίνι, που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια.

Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν ο νεφρός και ειδικότερα τα νεφρικά σωμάτια. Το παράσιτο παρατηρήθηκε επίσης και στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό, ενώ σε λίγες περιπτώσεις σπόροι του *P. sparix* βρέθηκαν και σε μελανομακροφάγα κέντρα στο νεφρό περιχαρακωμένα με διπλή μεμβράνη

συνδεδετικού ιστού, όπως έχει παρατηρηθεί προηγουμένως και από άλλους ερευνητές (Athanassoroulou και συν. 2004α). Στα μολυσμένα ψάρια ανιχνεύτηκαν όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου, το κυρίαρχο όμως στάδιο ήταν οι ώριμοι σπόροι.

Στην παρούσα έρευνα, το παράσιτο *P. sparis* παρατηρήθηκε στα περισσότερα μολυσμένα ψάρια σε όλες τις εποχές, αλλά τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν τόσο στα εκτρεφόμενα όσο και στα άγρια ψάρια τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως αυτό έχει παρατηρηθεί ξανά στην Ελλάδα (Athanassoroulou και συν. 2004α, Karagouni και συν. 2005β, Rigos και συν. 1999). Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα συμπεράσματα του Palenzuela και συν. (1999), οι οποίοι βρήκαν το παράσιτο σε εκτρεφόμενη τσιπούρα χωρίς όμως να παρατηρηθεί διαφορά στο ποσοστό προσβολής μεταξύ εποχών. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες εκτροφής των ψαριών που εξετάστηκαν, αφού τα ψάρια στη παρούσα έρευνα προέρχονταν από εντακτική εκτροφή σε κλωβούς, ενώ στην περίπτωση του Palenzuela και συν. (1999) τα ψάρια προέρχονταν από ημι-εντακτικά συστήματα εκτροφής σε δεξαμενές. Όπως είναι γνωστό, τα εντακτικά συστήματα εκτροφής χαρακτηρίζονται συχνά από ιδιαίτερα υψηλή ιχθυοφόρτιση, χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου, συσσώρευση υπολειμμάτων τροφών, λανθασμένους χειρισμούς από την πλευρά των εκτροφέων και υψηλή σε λιπαρά διατροφή (Nengas και συν. 2000). Όλες αυτές οι συνθήκες προκαλούν στρες στα εκτρεφόμενα ψάρια μειώνοντας την αμυντική τους ικανότητα και σε συνδυασμό με αυξημένη θερμοκρασία ευνοούν τη γρήγορη εξέλιξη του βιολογικού κύκλου των παρασίτων και την έξαρση των ασθενειών.

Επίσης, αποδείχθηκε για πρώτη φορά διεθνώς ότι τα άγρια ψάρια μπορεί να αποτελούν φορείς μετάδοσης του παράσιτου *P. sparis*. Στις εποχές με αυξημένες θερμοκρασίες το παράσιτο παρατηρήθηκε συγχρόνως τόσο σε εκτρεφόμενα ψάρια όσο και σε άγρια ψάρια. Επίσης, στα άγρια ψάρια τα ποσοστά προσβολής είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα από αυτά των εκτρεφόμενων. Ειδικά, στην περίπτωση της τσιπούρας, το ποσοστό προσβολής της άγριας τσιπούρας είναι

στατιστικά μεγαλύτερο από αυτό της εκτρεφόμενης, αποδεικνύοντας ότι η άγρια τσιπούρα μπορεί να αποτελεί φορέα της παρασίτωσης στην εκτρεφόμενη. Η εκδοχή αυτή επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση των ποσοστών προσβολής σε κάθε εποχή ξεχωριστά, αφού στην άγρια τσιπούρα η παρασίτωση αυτή σε κάθε εποχή προηγείται της παρασίτωσης στην εκτρεφόμενη, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε κάθε εποχή η άγρια τσιπούρα μολύνεται πρώτη και σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταδίδοντας την παρασίτωση και στα εκτρεφόμενα ψάρια. Από την παρατήρηση των ποσοστών προσβολής του άγριου κέφαλου φαίνεται ότι και ο άγριος κέφαλος μολύνεται πρώτος και σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκριτικά με τα εκτρεφόμενα ψάρια μεταδίδοντάς τους την παρασίτωση.

Myxobolus sp.

Το *Myxobolus* sp. είναι ένα Μυξοσποριδίο παράσιτο που έχει παρατηρηθεί σε εκτρεφόμενα και άγρια ψάρια (Athanasopoulou και συν. 2004β, Bahri, Marques, Coste, Bouix & Ben Hassine 1995, Eiras & D' Souza 2004, Karagouni και συν. 2005α, Mladineo 2003, Παπαθανασίου 2004, Rothwell, Virgona, Callinan, Nicholls & Langdon 1997). Στην Αδριατική, ένα άλλο αταυτοποίητο είδος *Myxobolus* παρατηρήθηκε σε έντερο εντατικά εκτρεφόμενης χιόνας μέσου βάρους 250g (σε κλωβούς) σε πολύ χαμηλό ποσοστό (10%) την άνοιξη (Mladineo 2003). Αναφορές ειδών *Myxobolus* sp. έχουν γίνει και σε άγριο κέφαλο (Bahri & Marques 1996, Eiras & D' Souza 2004, Fall, Kratcha, Diebakate, Faye & Toguebaye 1997, Fall & Toguebaye 1999, Faye, Kratcha, Debacate, Landsberg & Lom 1991, Lom & Dyková 1994). Συγκεκριμένα, κύστες των ειδών *Myxobolus exiguus* Thelohan 1985 και *Myxobolus episquamalis* Egusa, Maeno & Sorimachi 1990 παρατηρήθηκαν σε κέφαλο διαφορετικών μεγεθών προσβάλλοντας τα λέπια και τα πτερύγια από τους Bahri και συν. (1995) και Rothwell και συν. (1997) αντίστοιχα, ενώ έξαρση του παράσιτου *Myxobolus episquamalis* σε κέφαλο παρατηρήθηκε την άνοιξη (Rothwell

και συν. 1997). Επίσης, όλα τα στάδια εξέλιξης του είδους *Myxobolus goensis* Eiras & D' Souza 2004 έχουν παρατηρηθεί σε βραγχιακά νημάτια κεφαλοειδών στην Ινδία (Eiras & D' Souza 2004). Επίσης, αταυτοποίητα είδη *Myxobolus* έχουν απομονωθεί, σε μία μόνο περίπτωση, από χοληδόχο κύστη λαβρακιού (Paperna & Baudin Laurencin 1979), από τον εντερικό σωλήνα του είδους *Diplodus annularis* Linnaeus 1758 σε χαμηλό ποσοστό προσβολής (3,8%) (Radujkovic & Raibaut 1989), ενώ το είδος *Myxobolus etropi* Rajendran, Vijayan & Alavandi 1998 παρατηρήθηκε στον αορτικό κώνο σε θαλασσινά τροπικά ψάρια (Rajendran, Vijaya & Alavandi 1998).

Στην Ελλάδα, το παράσιτο έχει παρατηρηθεί στο νεφρό εντατικά εκτρεφόμενης χιόνας. Το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (80%) παρατηρήθηκε το καλοκαίρι σε χιόνες, μέσου βάρους 20g, ενώ το ποσοστό προσβολής μειώθηκε (15%) σε μικρές χιόνες, μέσου βάρους 20g και μεγάλες χιόνες μέσου βάρους 165g, το φθινόπωρο και την άνοιξη αντίστοιχα (Athanasopoulou και συν. 2004β, Karagouni και συν. 2005α). Επίσης, αταυτοποίητα είδη *Myxobolus* έχουν παρατηρηθεί σε άγρια ψάρια στην Ελλάδα σε διάφορα ποσοστά προσβολής. Τα είδη στα οποία παρατηρήθηκε το παράσιτο ήταν ο κακαρέλος *Diplodus vulgaris* Geoffroy Saint-Hilaire 1817 (33,33%), το λιθρίνι *Pagellus erythrinus* Linnaeus 1758 (100%), *Diplodus annularis* L. (16,67%), *Serranus scriba* Linnaeus 1758 (20%), *Boops salpa* Linnaeus 1758 (100%) και ο σαργός *Diplodus sargus* Cetti 1777 (100%). Σε όλες τις περιπτώσεις το κύριο όργανο στόχος ήταν ο νεφρός, ενώ τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν το καλοκαίρι, εκτός από την περίπτωση του άγριου σαργού που παρατηρήθηκε την άνοιξη (Παπαθανασίου 2004).

Στην παρούσα έρευνα, το ίδιο είδος *Myxobolus* παρατηρήθηκε τόσο σε εκτρεφόμενα όσο και σε άγρια ψάρια που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενη χιόνα και σαργό αλλά και σε άγριο κέφαλο και σαργό.

Για πρώτη φορά διεθνώς βρέθηκαν αταυτοποίητα είδη του παράσιτου σε εκτρεφόμενο σαργό, στον οποίο παρατηρήθηκαν και τα μεγαλύτερα ποσοστά

προσβολής από όλα τα εκτρεφόμενα ψάρια. Στην εκτρεφόμενη χιόνα έχει παρατηρηθεί ξανά και από άλλους ερευνητές στην Ελλάδα (Athanassopoulou και συν. 2004β, Karagouni και συν. 2005α). Οι κύστεις του παράσιτου που παρατηρήθηκαν στα δύο αυτά εκτρεφόμενα είδη (χιόνα και σαργός) ήταν παρόμοιες μεταξύ τους (τόσο στο μέγεθος όσο και στην μορφολογία) αλλά και με κύστεις που έχουν παρατηρηθεί ξανά σε χιόνα (Athanassopoulou και συν. 2004β). Στην έρευνά μας, στην εκτρεφόμενη χιόνα το παράσιτο παρατηρήθηκε σε ψάρια βάρους μεγαλύτερο των 50g, μέγεθος το οποίο όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί ευπαθές, αφού σύμφωνα με προηγούμενη έρευνά μας το παράσιτο έχει παρατηρηθεί εξίσου και σε εκτρεφόμενες χιόνες μικρότερου μεγέθους (Golomazou, Athanassopoulou F, Karagouni E. & Kokkokiris 2006). Επίσης, είναι η πρώτη φορά που το παράσιτο αυτό αναφέρεται σε κέφαλο στην Ελλάδα, αν και σε άλλες χώρες υπάρχουν αναφορές άλλων ειδών *Myxobolus* σε κεφαλοειδή (Bahri & Marques 1996, Eiras & D' Souza 2004, Fall και συν. 1997, Faye και συν. 1999, Rothwell και συν. 1997). Επίσης, παρατηρήθηκε σε άγριο σαργό σε υψηλό ποσοστό προσβολής, όπως έχει παρατηρηθεί ξανά στην Ελλάδα (Παπαθανασίου 2004).

Το κύριο όργανο στόχος στα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια (σαργός και χιόνα) αλλά και στον άγριο σαργό, ήταν ο ενδιάμεσος συνδετικός ιστός και τα μελανομακροφάγα κέντρα (MMC) του νεφρού όπου παρατηρήθηκαν τροφοζώιτες και ώριμοι σπόροι του παράσιτου. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα μέχρι τώρα ευρήματα άλλων ερευνητών στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα οποία ο νεφρός είναι το κύριο όργανο στόχος μολυσμένης εκτρεφόμενης χιόνας (Athanassopoulou και συν. 2004β) και άγριων ψαριών (Παπαθανασίου 2004). Στον άγριο κέφαλο, ώριμοι σπόροι του ίδιου παράσιτου παρατηρήθηκαν μόνο σε έντερο και χοληδόχο κύστη, εύρημα το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα, αφού μέχρι τώρα σε κεφαλοειδή άλλα είδη *Myxobolus* έχουν αναφερθεί σε λέπια και πτερύγια (Bahri και συν. 1995, Rothwell και συν. 1997) αλλά και σε βράγχια (Eiras & D' Souza 2004). Σύμφωνα με άλλους ερευνητές άλλα είδη *Myxobolus* έχουν παρατηρηθεί σε έντερο

στο είδος *Diplodus annularis* L. (Radujkovic & Raibaut 1989) και σε εκτρεφόμενη χιόνα στην Αδριατική (Mladineo 2003), ενώ στη χοληδόχο κύστη το παράσιτο έχει παρατηρηθεί σε λαβράκι (Paperna & Baudin-Laurencin 1979).

Αξιοσημείωτο είναι ότι τις εποχές με τις υψηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν και τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής τόσο σε εκτρεφόμενα είδη όσο και σε άγρια ψάρια. Πολύ μεγάλα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν το καλοκαίρι για τον εκτρεφόμενο και άγριο σαργό, ενώ στον άγριο κέφαλο μεγάλο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε την άνοιξη. Η διαπίστωση αυτή είναι σύμφωνη πάλι με τις ανακοινώσεις άλλων ερευνητών, σύμφωνα με τους οποίους έξαρση του παράσιτου σε διάφορα είδη εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών έχει παρατηρηθεί κυρίως το καλοκαίρι (Athanasopoulou και συν. 2004β, Karagouni και συν. 2005α) και την άνοιξη (Mladineo 2003, Rothwell και συν. 1997).

Στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε για πρώτη φορά διεθνώς ότι τα άγρια ψάρια μπορεί να αποτελούν φορείς μετάδοσης του παράσιτου *Myxobolus* sp. Το παράσιτο αυτό παρατηρήθηκε συγχρόνως σε εκτρεφόμενα και σε άγρια ψάρια το φθινόπωρο και το καλοκαίρι. Επίσης, στα άγρια ψάρια η παρασίτωση εμφανίζεται σε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής συγκριτικά με τα εκτρεφόμενα ψάρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα άγρια ψάρια μπορεί να αποτελούν φορείς μετάδοσης του συγκεκριμένου παράσιτου. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του σαργού, το ποσοστό προσβολής του άγριου σαργού είναι στατιστικά μεγαλύτερο από αυτό του εκτρεφόμενου, αποδεικνύοντας ότι τα άγρια ψάρια είναι πιο ευαίσθητα στην παρασίτωση από τα εκτρεφόμενα. Η εκδοχή αυτή επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση των ποσοστών προσβολής σε κάθε εποχή ξεχωριστά, αφού στον άγριο σαργό η παρασίτωση σχεδόν σε κάθε εποχή προηγείται της παρασίτωσης στον εκτρεφόμενο, γεγονός που δείχνει ότι ο άγριος σαργός μολύνεται πρώτος και σε μεγαλύτερο ποσοστό πιθανόν μεταδίδοντας έτσι την παρασίτωση και στα εκτρεφόμενα ψάρια.

Ceratomyxa sp.

Αρκετά είδη Μυξοσποριδίων του γένους *Ceratomyxa* έχουν παρατηρηθεί σε θαλασσινά ψάρια (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993β). Σύμφωνα με τους Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla (1993β), τα παράσιτα *Ceratomyxa labracis* Sitzà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993 και *Ceratomyxa diplodae* Lubat, Radujkovic, Marques & Bouix 1989 παρατηρήθηκαν σε λαβράκι στη χοληδόχο κύστη, ενώ σε έντονες παρασιτώσεις παρατηρήθηκε και σε έντερο, νυκτική κύστη, πάγκρεας και μεσεντέριο. Κυρίαρχο στάδιο εξέλιξης του παράσιτου ήταν οι τροφοζωίτες και τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν το χειμώνα. Το ίδιο αυτό παράσιτο (*C. diplodae*) παρατηρήθηκε επίσης στη Σαρδηνία σε καλλιεργούμενη χιόνα (μέσου βάρους 25g) σε κλωβούς. Το κύριο όργανο στόχος ήταν η χοληδόχος κύστη και λιγότερο παρατηρήθηκε στο έντερο, ενώ τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν τους χειμερινούς μήνες (Merella και συν. 2005).

Το παράσιτο *Ceratomyxa sparusaurati* Sitjà-Bobadilla, Palenzuela, Álvarez-Pellitero 1995 παρατηρήθηκε σε διάφορα συστήματα εκτροφής από τον Palenzuela και συν. (1997), προκαλώντας όμως χαμηλές θνησιμότητες. Στην περίπτωση αυτή το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε σε ημι-εντατικά συστήματα εκτροφής (59,9%) σε τσιπούρες μεγέθους 400g και σε εντατικά συστήματα εκτροφής (44,1%) σε τσιπούρες μεγέθους 1000g, τους καλοκαιρινούς μήνες. Όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου βρέθηκαν στη χοληδόχο κύστη, ενώ σε πολύ βαριές μολύνσεις βρέθηκαν επίσης και σε παγκρεατικό ιστό, σε χοληδόχους πόρους, σε σπλήνα καθώς και ελεύθερα στην κυκλοφορία του αίματος. Το παράσιτο *C. sparusaurati* παρατηρήθηκε επίσης στην Αδριατική σε εκτρεφόμενα σε κλωβούς είδη όπως στο *Pagellus bogaraveo* Brönnich 1768 (μέσου βάρους 200g) και στην τσιπούρα μέσου βάρους 255g σε υψηλή ένταση κυρίως το χειμώνα. Το όργανο στόχος του παράσιτου ήταν η χοληδόχος κύστη, όπου παρατηρήθηκαν όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου (Mladineo 2003).

Ένα άλλο είδος, το *Ceratomyxa arcuata* Thélohan 1892, παρατηρήθηκε σε χοληδόχο κύστη στο είδος *Merlangius merlangus* Linnaeus 1758 στη Βόρεια Θάλασσα (Fiest & Ronga 1996), ενώ όλα τα στάδια εξέλιξης ενός αταυτοποίητου είδους *Ceratomyxa* παρατηρήθηκαν σε καλλιεργούμενη συναγρίδα *Dentex dentex* Linnaeus 1758 στην Ισπανία, προκαλώντας θνησιμότητες κυρίως σε ιχθύδια μέσου βάρους 3,6g. Το κύριο όργανο στόχος στην περίπτωση αυτή ήταν η χοληδόχος κύστη και τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν τους καλοκαιρινούς μήνες (Company και συν. 1999). Επίσης ένα αταυτοποίητο είδος *Ceratomyxa* έχει παρατηρηθεί σε άγρια κεφαλοειδή στις μεσογειακές ακτές του Ισραήλ (Dzikowski, Paperna & Diamant 2003).

Στην Ελλάδα, διάφορα είδη *Ceratomyxa* έχουν παρατηρηθεί σε συναγρίδα, τσιπούρα, χιόνα, φαγκρί και λαβράκι από διάφορους ερευνητές προκαλώντας θνησιμότητες. Το παράσιτο *C. diplodae* παρατηρήθηκε σε λαβράκι διαφόρων μεγεθών, στη χοληδόχο κύστη και στο έντερο, ενώ έχει παρατηρηθεί και σε χοληδόχο κύστη και έντερο χιόνας (Αθανασοπούλου και συν. 1998). Επίσης, σε καλλιεργούμενη συναγρίδα έχουν βρεθεί όλα τα στάδια του παράσιτου *C. diplodae* προκαλώντας θνησιμότητες και σε μία περίπτωση παρατηρήθηκε και *C. labracis*. Τα παράσιτα αυτά (*C. diplodae* και *C. labracis*) στη συναγρίδα παρατηρήθηκαν κυρίως σε χοληδόχο κύστη και έντερο, με τους σπόρους να είναι το κυρίαρχο στάδιο (Rigos και συν. 1997, 1999). Στην Ελλάδα, σε εντατικά εκτρεφόμενες ενήλικες χιόνες έχει βρεθεί το παράσιτο *C. sparusaurati* (Rigos και συν. 1999) προκαλώντας θνησιμότητες, ενώ σε τσιπούρα (μέσου βάρους 40g και 400g) έχει παρατηρηθεί πιο συχνά (Αθανασοπούλου και συν. 1998, Rigos και συν. 1999) προσβάλλοντας κυρίως τη χοληδόχο κύστη και το έντερο αλλά με χαμηλές θνησιμότητες. Το παράσιτο αυτό έχει παρατηρηθεί επίσης στη χοληδόχο κύστη σε φαγκρί (μέσου βάρους 250g) (Αθανασοπούλου και συν. 1998).

Στην παρούσα έρευνα, όλα τα στάδια εξέλιξης των παρασίτων *C. diplodae* και *C. sparusaurati* παρατηρήθηκαν σε χιόνα και τσιπούρα αντίστοιχα, χωρίς όμως να

έχουν παρατηρηθεί θνησιμότητες εξαιτίας αυτών των παρασίτων. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, τα παράσιτα αυτά έχουν παρατηρηθεί ξανά στην Ελλάδα, προκαλώντας όμως θνησιμότητες όταν υπάρχουν ταυτόχρονα στον ξενιστή (Αθανασοπούλου και συν. 1998, Rigos και συν. 1999). Επίσης, στην παρούσα έρευνα, αταυτοποίητα είδη του γένους *Ceratomyxa* αναφέρθηκαν για πρώτη φορά διεθνώς στα άγρια ψάρια τσιπούρα και γόπα.

Το κύριο όργανο στόχος των ειδών *Ceratomyxa* που παρατηρήθηκαν τόσο στα εκτρεφόμενα όσο και στα άγρια ψάρια στην παρούσα έρευνα, ήταν η χοληδόχος κύστη. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματα άλλων ερευνητών σύμφωνα με τους οποίους η χοληδόχος κύστη ήταν το κύριο όργανο στόχος σε μολυσμένη τσιπούρα, χιόνα και φαγκρί (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993β, Αθανασοπούλου και συν. 1998, Company και συν. 1999, Fiest & Ronga 1996, Merella και συν. 2005, Mladineo 2003, Rigos και συν. 1999). Σε περιπτώσεις εκτεταμένων παρασιτώσεων σε συναγρίδα και λαβράκι αυτό βρέθηκε σε έντερο (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993β, Rigos και συν. 1997, 1999), νυκτική κύστη, πάγκρεας και μεσεντέριο (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993β).

Στην παρούσα έρευνα, το παράσιτο *Ceratomyxa* sp. παρατηρήθηκε σε όλες σχεδόν τις εποχές στα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια (τσιπούρα και χιόνα) και στα άγρια ψάρια (τσιπούρα και γόπα) χωρίς να παρουσιάζει εποχικότητα, διαπίστωση η οποία έχει ήδη αναφερθεί και από την Bartholomew (1998). Εποχικότητα έχει παρατηρηθεί, αντίθετα, σε ορισμένες περιπτώσεις σε διάφορα είδη ψαριών, όχι όμως στην Ελλάδα. Το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε τους καλοκαιρινούς μήνες στην περίπτωση μολυσμένης συναγρίδας με Μυξοσπορίδιο του γένους *Ceratomyxa* (Company και συν. 1999), ενώ το χειμώνα, τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν σε λαβράκι (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993β), σε εκτρεφόμενη χιόνα (Merella και συν. 2005), σε τσιπούρα και στο είδος *Pagellus bogaraveo* B. (Mladineo 2003).

Επίσης, στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στα άγρια και στα εκτρεφόμενα ψάρια, αφού το παράσιτο αυτό παρατηρήθηκε συγχρόνως σε εκτρεφόμενα και σε άγρια ψάρια σε εποχές με αυξημένες θερμοκρασίες σε ποσοστά προσβολής όμως, που δεν είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικά μεταξύ τους.

Henneguya sp.

Είδη Μυξοσποριδίων του γένους *Henneguya* έχουν παρατηρηθεί τόσο σε ψάρια γλυκού νερού όσο και σε θαλασσινά ψάρια. Ένα είδος *Henneguya* έχει βρεθεί ότι μπορεί να παρασιτεί και σε πολλά διαφορετικά όργανα των ξενιστών (Kostoïngue, Diebakate, Faye & Toguebaye 2001, Eiras 2002). Ως επί το πλείστον όμως, είναι παράσιτα που παρασιτούν στα βράγχια των ξενιστών, όπως στην περίπτωση της άγριας τσιπούρας με χαμηλό ποσοστό προσβολής (4,16%) στην Τυνησία (Bahri, Hassine & Marques 1996), του εκτρεφόμενου σε κλωβούς φαγκριού το καλοκαίρι (Yokohama, Itoh & Tanaka 2005) και άγριων κεφαλοειδών (Faye και συν. 1999), ενώ έχει βρεθεί να παρασιτεί και στην καρδιά φαγκριού εκτρεφόμενου σε κλωβούς το καλοκαίρι (Yokohama 2005) και σε άγρια κεφαλοειδή (Faye, Kratcha, Fall & Toguebaye 1997) προκαλώντας αυξημένες θνησιμότητες. Σύμφωνα με τον Roubal (1994), το παράσιτο παρατηρήθηκε σε θαλασσινά ψάρια του είδους *Acanthopagrus australis* Gónther 1859 της οικογένειας Sparidae όπου, όταν το παράσιτο εντοπιζόταν στο στέλεχος των βραγχίων η παρασίτωση παρουσίαζε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής το καλοκαίρι (26,3%), ενώ, αντιθέτως, στην περίπτωση της παρασίτωσης στα βραγχιακά νημάτια το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε το χειμώνα (17,9%). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, παρατηρήθηκε επίσης στον γαστρεντερικό σωλήνα (2,1%), στα πτερύγια, στον κερατοειδή χιτώνα και στην στοματική κοιλότητα. Το κυρίαρχο στάδιο εξέλιξης του παράσιτου ήταν τα πλασμώδια και λιγότερο οι ώριμοι σπόροι.

Επίσης, σπόροι του παράσιτου έχουν βρεθεί σε εντατικά καλλιεργούμενη τσιπούρα στην Ιταλία την άνοιξη, στα βράγχια και στον αρτηριακό κώνο, προκαλώντας χαμηλές θνησιμότητες (Caffara, Marcer, Florio, Quaglio & Fioravanti 2003). Το παράσιτο έχει παρατηρηθεί και στα βράγχια και στον αρτηριακό κώνο σε καλλιεργούμενο κινέζικο λαβράκι *Lateolabrax* sp., προκαλώντας σοβαρές θνησιμότητες (Yokoyama, Kawakami, Yasuda & Tanaka 2003). Επίσης, έχει παρατηρηθεί στο μεσενέριο, στην επιφάνεια των κοιλιακών οργάνων και στην καρδιά σε ευρύαλα ψάρια του είδους *Eleginops maclovinus* Cuvier 1830 (κεφαλοειδές) τον χειμώνα (Brickle, Kalavati & MacKenzie 2005). Σε άγρια είδη ψαριών σε ποτάμια στη Γαλλία σπόροι και πλασμώδια του παράσιτου έχουν βρεθεί στα βράγχια (Kabre, Sakiti, Marques & Sawadogo 1997). Σε ψάρια γλυκού νερού, όλα τα στάδια εξέλιξης του παράσιτου έχουν αναφερθεί στη Βραζιλία. Στην περίπτωση αυτή το παράσιτο παρατηρήθηκε στα βράγχια, κυρίως σε ενήλικα ψάρια και λιγότερο σε ιχθύδια. Η παρασίτωση ξεκίνησε την άνοιξη σε ποσοστό 83% και συνεχίστηκε μέχρι το χειμώνα που παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (100%) (Barassa, Cordeiro & Arana 2003).

Στην παρούσα έρευνα, το Μυξοσπορίδιο *Henneguya* παρατηρήθηκε σε άγρια τσιπούρα, ενώ είναι η πρώτη φορά διεθνώς που γίνεται αναφορά του παράσιτου αυτού σε εκτρεφόμενη χιόνα. Το όργανο στόχος του παράσιτου στην παρούσα έρευνα ήταν η χοληδόχος κύστη για την οποία υπάρχει μόνο μία βιβλιογραφική αναφορά για το είδος *Henneguya kwangtungensis* Chen 1998 στο είδος *Mylopharyngodon piceus* Richardson 1846 στην Κίνα (Eiras 2002). Η παρασίτωση στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε μόνο την άνοιξη και το καλοκαίρι, γεγονός που πιθανό να δείχνει ότι η εξέλιξη της παρασίτωσης επηρεάζεται ανάλογα με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως εξάλλου έχει ήδη παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές για το ίδιο γένος του παράσιτου (Caffara και συν. 2003, Dykonά & Lom 1978, Roubal 1994, Yokoyama, Itoh & Tanaka 2005). Το αντίθετο, όμως, έχει παρατηρηθεί από άλλους ερευνητές σύμφωνα με τους οποίους, το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής

παρατηρήθηκε το χειμώνα, σε βράγχια, σε μεσεντέριο και σε καρδιά (Roubal 1994, Brickle και συν. 2005).

Επίσης, στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε για πρώτη φορά διεθνώς, ότι υπάρχει αλληλεπίδραση ανάμεσα στα άγρια και στα εκτρεφόμενα ψάρια, αφού το παράσιτο *Henneguya* sp. παρατηρήθηκε συγχρόνως σε εκτρεφόμενα και σε άγρια ψάρια σε εποχές με αυξημένες θερμοκρασίες.

Kudoa sp.

Τα Μυξοσπορίδια παράσιτα του γένους *Kudoa* έχουν βρεθεί σε θαλασσινά ψάρια και ως επί το πλείστον προσβάλλουν τους μυϊκούς ιστούς των ψαριών (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α, Maeno και συν. 1993, Moran, Whitaker, Kent 1999β, Whitaker και συν. 1996), υποβαθμίζοντας έτσι την ποιότητα των μεταποιημένων προϊόντων (Whitaker & Kent 1991) λόγω της γαλακτοματοειδούς υφής που παίρνουν οι παρασιτούμενοι μύες. Έχουν παρατηρηθεί επίσης σε μικρότερο βαθμό στα βράγχια (Joy 1972) καθώς και στους καρδιακούς μυς (Kabata & Whitaker 1986, 1989) σε ψάρια γλυκού νερού.

Σε θαλασσινά ψάρια, ώριμοι σπόροι του Μυξοσποριδίου αυτού έχουν βρεθεί στο μυϊκό ιστό του είδους *Sebastes paucispinis* Ayres 1854 στην Καλιφόρνια την άνοιξη κατά τη μεταποίηση των ψαριών (Whitaker και συν. 1996), σε πλατύψαρα στην Ιταλία το Σεπτέμβριο σε χαμηλό ποσοστό προσβολής (2%) (Pellizzato & Canzonier 1985), σε θαλασσινά ψάρια του Ατλαντικού Ωκεανού (*Dentex macrophthalmus* Bloch 1791, *Dentex maroccanus* Valenciennes 1830, *Pagellus acarne* Risso 1827 και *Trachurus trachurus* Linnaeus 1758) σε μυϊκό ιστό και γονάδες (Afonso, Charouco & Cruz e Silva 2005). Επίσης έχει παρατηρηθεί σε είδη του γένους *Clupea* κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες (Langdon, Thorne & Fletcher 1992), σε άγριο *Merluccius productus* Ayres 1855 (Kabata & Whitaker 1986) και σε μυϊκό ιστό, σε περικάρδιο, μυοκάρδιο, ήπαρ, νεφρικό ιστό του καλλιεργούμενου είδους *Coryphaena hippurus* Linnaeus 1758 σε κλωβούς (Langdon 1991). Επίσης

ώριμοι σπόροι έχουν παρατηρηθεί και σε μυικό ιστό χταποδιού (*Paroctopus dofleini*) την άνοιξη (Yokoyama & Masuda 2001).

Το παράσιτο αυτό έχει επίσης παρατηρηθεί σε διάφορα καλλιεργούμενα ψάρια σε κλωβούς στις ιαπωνικές ακτές. Το *Kudoa amamiensis* Egusa & Nakajima 1980 έχει βρεθεί ότι παρασιτεί σε μυικό ιστό του είδους *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel 1845 (Egusa & Nakajima 1978, 1980), ενώ το είδος *Kudoa pericardialis* Nakajima & Egusa 1978 έχει βρεθεί στην περικαρδιακή κοιλότητα στον ίδιο ξενιστή (Nakajima & Egusa 1978). Στα είδη *Pagrus major* T. και *Oplegnatus punctatus* Temminck & Schlegel 1844 έχει παρατηρηθεί το *Kudoa iwatai* Egusa & Shiomitsu 1983 σε μυικό ιστό ενώ το *Kudoa shiomitsu* Egusa & Shiomitsu 1983 στην περικαρδιακή κοιλότητα και στην περιτοναϊκή κοιλότητα του είδους *Takifugu rubripes* Temminck & Schlegel 1850 (Egusa & Shiomitsu 1983).

Είδη του γένους *Kudoa* έχουν παρατηρηθεί και σε μεσογειακά είδη. Στη Γαλλία και στο Ισραήλ, σε καλλιεργούμενη τσιπούρα τόσο ηλικίας 1 και 3 ετών (όπου προσβάλλει το νεφρικό ιστό, το περιτόναιο και το μεσεντέριο) (Paperna 1982), όσο και σε ιχθύδια τσιπούρας (Arfara, Bozzeta, Prearo & Ghittino 1995, Paperna 1982), ενώ έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη ψαριών, όπως ο κέφαλος (*Mugil cephalus* L.) (Maeno και συν. 1993).

Στην Ελλάδα, έχει παρατηρηθεί στο μυικό ιστό του εντέρου σε λαβράκι καλλιεργούμενο σε κλωβούς, χωρίς αξιοσημείωτες όμως θνησιμότητες (Rigos και συν. 1999).

Αυτή είναι η πρώτη φορά διεθνώς που παρατηρείται είδος του Μυξοσποριδίου του γένους *Kudoa* σε σαργό. Μέχρι τώρα είδη του γένους *Kudoa* έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα μεσογειακά είδη, όπως σε εκτρεφόμενη τσιπούρα (Arfara και συν. 1995), σε κέφαλο *Mugil cephalus* Linnaeus 1758 (Maeno και συν. 1993), σε *Pagrus major* T., *Pagellus acarne* R. και δύο είδη του γένους *Dentex* (Afonso και συν. 2005).

Στην παρούσα έρευνα, το παράσιτο βρέθηκε να παρασιτεί στο μυικό ιστό, όπως και στις περισσότερες περιπτώσεις που αναφέρθηκε από άλλους ερευνητές. Η παρασίτωση ξεκίνησε από το καλοκαίρι και συνεχίστηκε μέχρι και τους φθινοπωρινούς μήνες, χωρίς να αναφερθούν αξιοσημείωτες θνησιμότητες. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε εκτρεφόμενο λαβράκι (Rigos και συν. 1999). Από τα ευρήματα άλλων ερευνητών προκύπτει ότι η παρασίτωση εμφανίζεται κυρίως σε εποχές με αυξημένες θερμοκρασίες (Σεπτέμβριος) σε πλατύψαρα στην Ιταλία (Pellizzato & Canzonier 1985), σε θαλασσινά ψάρια του είδους *Sebastes paucispinis* A. στην Καλιφόρνια την άνοιξη (Whitaker και συν. 1996) και σε είδη του γένους *Clupea* κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες στην Αυστραλία (Langdon και συν. 1992).

Στην παρούσα έρευνα, το παράσιτο *Kudoa* sp. παρατηρήθηκε μόνο σε εκτρεφόμενα ψάρια και επομένως, δεν ήταν δυνατό να εκτιμηθεί η κατάσταση στα άγρια ψάρια. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τους Álvarez-Pellitero και Sitzà-Bobadilla (1993α), μολυσμένα άγρια ψάρια που αλιεύτηκαν σε περιοχές γύρω από κλωβούς όπου υπήρχαν μολυσμένα εκτρεφόμενα ψάρια, έχει βρεθεί ότι αποτελούν φορείς μετάδοσης της παρασίτωσης. Το παράσιτο *K. amamiensis* βρέθηκε να παρασιτεί τόσο σε εκτρεφόμενο *Seriola quinqueradiata* T. όσο και σε άγρια κοραλλιογενή ψάρια από περιοχή γύρω από τα μολυσμένα εκτρεφόμενα ψάρια (Álvarez-Pellitero & Sitzà-Bobadilla 1993α). Επίσης, σύμφωνα με τον Langdon και συν. 1992, τα άγρια ψάρια του γένους *Clupea* αποτελούν τους πιθανούς φορείς μετάδοσης του *Kudoa thyrsites* Gilchrist 1924 στο καλλιεργούμενα ψάρια του είδους *Coryphaena hippurus* L.

4.1.2 Αλληλεπίδραση άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών στη μετάδοση των Μυξοσποριδίων

Το ενδεχόμενο της μετάδοσης των ασθενειών ανάμεσα στα άγρια και στα εκτρεφόμενα ψάρια έχει απασχολήσει πολλούς επιστήμονες. Σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση των παθογόνων παραγόντων των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών. Είναι πιθανό δηλαδή, να μεταδίδεται η μόλυνση των ιχθύων των εκτροφών από παθογόνους παράγοντες που φέρουν οι άγριοι ιχθύες που ζουν γύρω από τις μονάδες ή και το αντίστροφο (Harvell, Aronson, Baron, Connel, Dobson, Ellner, Gerber, Kim, Kuris, McCallum, Lafferty, McKay, Porter, Pascual, Smith, Sutherland & Ward 2004, Reno 1998). Σύμφωνα με τους Paperna (1987) και Blanc (1997) η πρωταρχική πηγή μόλυνσης μπορεί να είναι τα άγρια ψάρια, ενώ στη Νορβηγία, όπου εκτρέφεται σε μεγάλο βαθμό ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar* Linnaeus 1758), έχει παρατηρηθεί μετάδοση σοβαρών παρασιτώσεων και γενικότερα ασθενειών από τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς στους άγριους (Heggberget, Johnsen, Hindar, Jonsson, Hansen, Hvidsten & Jensen 1993). Έχει βρεθεί όμως, ότι και οι άγριοι πληθυσμοί σαλμονειδών αποτελούν κύρια πηγή μόλυνσης των εκτρεφόμενων σολομών (McVicar 1997). Επίσης, σε μία άλλη μελέτη που έγινε στη Φινλανδία, βρέθηκε ότι τα παράσιτα των ιχθύων της εκτροφής προέρχονταν από τους ιχθύς της λίμνης που προμήθευε με νερό την εκτροφή και η μετάδοση των παρασίτων πραγματοποιούνταν μέσω του νερού. Η εκτροφή από μόνη της, δεν ήταν σε θέση να επηρεάσει το παρασιτικό φορτίο των ιχθύων της λίμνης που ήταν αποδέκτης των υδάτων της, αν και ορισμένα εξωπαράσιτα, που εντοπίστηκαν σε μεγάλα ποσοστά στους ιχθύς της λίμνης, ίσως να προέρχονταν από την εκτροφή (Valtonen & Koskivaara 1994).

Σχετικά με τη μετάδοση των Μυξοσποριδίων μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι μέχρι σήμερα οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην

μελέτη των Μυξοσποριδίων που παρατηρούνται στις υδατοκαλλιέργειες λόγω κυρίως της οικονομικής τους σημασίας. Σύμφωνα με την Bartholomew (2002) το Μυξοσπορίδιο *Kudoa thyrsites* ήταν ενδημικό παράσιτο στο βορειοδυτικό ωκεανό και αποτελούσε ανέκαθεν πρόβλημα της αλιείας. Με την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών το Μυξοσπορίδιο αυτό παρατηρήθηκε και στα εκτρεφόμενα ψάρια, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι τα άγρια ψάρια αποτελούσαν τους φορείς μετάδοσής του. Κάτι παρόμοιο παρατηρήθηκε από την ίδια ερευνήτρια (Bartholomew 2002) και στην περίπτωση του *Myxobolus cerebralis* Hofner 1903 σε καλλιέργεια σαλμονοειδών στην Γερμανία. Πολλές αναφορές υπάρχουν σε Μυξοσπορίδια που έχουν παρατηρηθεί σε άγριους πληθυσμούς ψαριών, ελάχιστες όμως από αυτές αφορούν τα μεσογειακά είδη ψαριών. Σχετικά με τη μετάδοση των Μυξοσποριδίων ανάμεσα στα εκτρεφόμενα και τα άγρια ψάρια στη Μεσόγειο δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία καμία αναφορά. Το ενδεχόμενο τα άγρια ψάρια να είναι φορείς μετάδοσης των Μυξοσποριδίων στα εκτρεφόμενα ψάρια ενισχύεται αν λάβουμε υπόψη τη γρήγορη εξάπλωση των Μυξοσποριδίων και τις πληροφορίες που υπάρχουν σήμερα για τον άμεσο βιολογικό κύκλο ορισμένων θαλασσιών Μυξοσποριδίων και τη μετάδοσή τους μέσω του μολυσμένου νερού (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrot 1997, Redondo και συν. 2002).

Από την παρούσα έρευνα προέκυψε μία εκτίμηση της κατάστασης της ασθένειας αυτής (μυξοσποριδίασης) στη χώρα μας, τόσο για τις ιχθυοκαλλιέργειες των ψαριών της οικογένειας Sparidae, που αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της ελληνικής ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής, όσο και για τα άγρια ψάρια τα οποία διαβιούν γύρω από τις υδατοκαλλιέργειες.

Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις, αποδείχθηκε ότι τα άγρια ψάρια αποτελούν φορείς των Μυξοσποριδίων στα εκτρεφόμενα ψάρια. Αυτό προέκυψε αφενός από τον συγχρονισμό της παρασίτωσης ανάμεσα σε εκτρεφόμενα και άγρια ψάρια και αφετέρου από τα στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής των άγριων ψαριών συγκριτικά με αυτά των εκτρεφόμενων. Έτσι αποδείχθηκε ότι

υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των εκτρεφόμενων και των άγριων ψαριών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ποσοστά προσβολής των άγριων ψαριών ήταν μικρότερα συγκριτικά με αυτά των εκτρεφόμενων (χωρίς όμως να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά), γεγονός που αποτελεί επίσης ένδειξη της αλληλεπίδρασής τους σε συνδυασμό με το συγχρονισμό της εμφάνισης των παρασίτων στα άγρια και στα εκτρεφόμενα ψάρια.

Η έξαρση των μυξοσποριδιάσεων παρατηρήθηκε τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, το καλοκαίρι παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής (στατιστικά σημαντικά) για όλα τα Μυξοσπορίδια σε όλα τα είδη ψαριών που μελετήθηκαν (άγρια και εκτρεφόμενα) ενώ τα επίπεδα προσβολής ακολουθούν την φθίνουσα σειρά άνοιξη, φθινόπωρο και χειμώνας. Η εποχή έξαρσης των μυξοσποριδιακών παρασιτώσεων συμπίπτει με την εποχή που παρατηρείται η μέγιστη ανάπτυξη των ψαριών, που είναι πολύ σημαντική για κάθε επιχείρηση. Αυτό το εύρημα γίνεται ακόμη πιο σημαντικό από το γεγονός ότι στα προσβεβλημένα ψάρια μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξής τους, λόγω μίας πιθανής οργανικής δυσλειτουργίας των οργάνων στα οποία παρασιτούν τα Μυξοσπορίδια, όπως έχει αποδειχθεί και σε προηγούμενη έρευνά μας (Golomazou και συν. 2006).

Είναι γνωστό ότι, τις εποχές με αυξημένες θερμοκρασίες ευνοείται η εξέλιξη του βιολογικού κύκλου ορισμένων παρασίτων (Reno 1998). Επίσης, η θερμοκρασία του νερού έχει βρεθεί ότι επηρεάζει την αμυντική λειτουργία του οργανισμού των ψαριών (Colorni 2004). Χαμηλές θερμοκρασίες του νερού σε είδη ψαριών που διαβιούν σε ζεστά νερά, όπως είναι τα μεσογειακά είδη ψαριών, καταστέλλουν τους μηχανισμούς ειδικής ανοσίας των ψαριών και έχουν θεωρηθεί υπεύθυνες για ασθένειες όπως το χειμερινό σύνδρομο της εκτρεφόμενης τσιπούρας στη Μεσόγειο (Bono, Borghesan, Commuzzi, Ceschia & Giorgetti 1995, Padros, Tort & Crespo 1996). Στις χαμηλές αυτές θερμοκρασίες τα ψάρια αναπτύσσουν πιο ανθεκτικούς μηχανισμούς μη ειδικής ανοσίας οι οποίοι δρουν πιο γρήγορα. Επίσης, το καλοκαίρι είναι μία εποχή, ειδικά στις μεσογειακές χώρες, που παρατηρείται απότομη αύξηση

της θερμοκρασίας και ευνοείται η εξέλιξη του βιολογικού κύκλου των Μυξοσποριδίων. Οι θερμοκρασιακές αυτές μεταβολές, σε συνδυασμό με τις εντατικές συνθήκες εκτροφής (Colorni 2004), όπως η ιδιαίτερα υψηλή ιχθυοφόρτιση, τα χαμηλά επίπεδα διαλυμένου οξυγόνου από συσσώρευση υπολειμμάτων τροφών λόγω λανθασμένων χειρισμών των εκτροφένων και η υψηλή σε λιπαρά διατροφή, προκαλούν στρες στα εκτρεφόμενα ψάρια με αποτέλεσμα να μειώνεται η αμυντική τους ικανότητα και να ευνοείται η εξέλιξη του βιολογικού κύκλου των παρασίτων και η έξαρση των ασθενειών. Η αυξημένη ιχθυοπυκνότητα παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη γρήγορη μετάδοση των παρασιτώσεων εξαιτίας του ότι είναι μία κατάσταση που προκαλεί στρες στα εκτρεφόμενα ψάρια (Colorni 2004), καθώς επίσης και εξαιτίας του ρυθμού μετάδοσης των παρασιτώσεων που είναι ανάλογος της συχνότητας επαφής των μολυσμένων ψαριών με τα υγιή (Reno 1998). Η αυξημένη σε λιπαρά διατροφή έχει επίσης ενοχοποιηθεί ότι επηρεάζει τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας. Ειδικά για το *E. ictyoi*, παρατηρήθηκε ότι, σε εκτροφές όπου η διατροφή της χιόνας είναι χαμηλή σε λιπαρά, η νόσος είτε απουσίαζε τελείως, είτε είχε ηπιότερη μορφή ακόμα και όταν σε παρακείμενες εκτροφές, η νόσος παρουσίαζε έξαρση με μεγάλες θνησιμότητες (Αθανασοπούλου και συν. 1998). Στις εκτροφές που έχουν παρατηρηθεί προβλήματα, η διατροφή ήταν πάντα αυξημένη σε λιπαρά. Σιτηρέσια με πολύ υψηλά επίπεδα λιπιδίων επηρεάζουν τους μηχανισμούς της μη ειδικής ανοσίας στη χιόνα, ενώ τα υψηλά επίπεδα κυτταρινών όταν αυτά χρησιμοποιούνται σε σιτηρέσια υψηλά σε λιπαρά φαίνεται ότι βελτιώνουν την ανοσία του ψαριού (Nengas και συν. 2000).

4.2 Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μόλυνσης με *E. leei* σε χιόνα και μελέτη ορισμένων παραγόντων της έμφυτης ανοσίας που αναπτύσσονται κατά τη μόλυνση.

Οι έρευνες σχετικά με τη μετάδοση και το βιολογικό κύκλο των Μυξοσποριδίων είναι σχετικά λίγες. Οι περισσότερες έρευνες αφορούν κυρίως τη μετάδοση και το βιολογικό κύκλο Μυξοσποριδίων των εσωτερικών υδάτων. Επιτυχή πειράματα άμεσης πειραματικής μόλυνσης έχουν παρατηρηθεί στα παράσιτα *Myxobolus cerebralis* (Príhoda 1983, Uspenskaya 1978), *Ceratomyxa shasta* Noble 1950 (Bower 1985, Ibarra, Gall & Hedrick 1991, Schafer 1968), *Sphaerospora renicola* Dyková & Lom 1982 (Odening, Walter & Bockardt 1989, Molnár & Kovács-Gayer 1986) και *Tetracapsula bryosalmonae* Canning, Curry, Fiest, Longshaw & Okamura 1999 (PKX οργανισμός) (Hedrick, MacConnell & Kinkelin 1993). Αντίθετα, αποτυχία άμεσης μόλυνσης ψαριών με Μυξοσπορίδια έχει παρατηρηθεί στις περιπτώσεις του *Myxobolus cerebralis* (El-Matbouli & Hofmann 1989, Markiw & Wolf 1983), *Myxobolus insidiosus* Wyatt & Pratt 1963 (Wyatt 1978), *Myxobolus cotti* El-Matbouli & Hoffmann 1987 (El-Matbouli & Hofmann, 1989), *Myxidium oviforme* Parisi 1912 (Walliker 1968) και *Sphaerospora renicola* (Grossheider & Körting 1993). Η συμμετοχή ενός ενδιάμεσου ξενιστή, ενός ακτινοσποριδίου, στο βιολογικό κύκλο των Μυξοσποριδίων, όπως έχει αναφερθεί από τους Markiw και Wolf (1983) για πρώτη φορά και Wolf και Markiw (1984) για το *M. cerebralis* έχει παρατηρηθεί έκτοτε σε πολλά είδη γλυκών νερών μετά από πειραματικές μολύνσεις (Kent και συν. 2001). Σχετικά με τα θαλάσσια Μυξοσπορίδια, μερικά ακτινοσπορίδια έχουν βρεθεί στο θαλάσσιο βένθος (ολιγόχαιτοι και πολύχαιτοι) (Hallett και συν. 1999, Ikeda 1912, Køie 2000, 2002) και μέχρι σήμερα ένας ολοκληρωμένος κύκλος που να περιπλέκει φάσεις τόσο ακτινοσποριδίων όσο και Μυξοσποριδίων έχει περιγραφεί μόνο στην περίπτωση του Μυξοσποριδίου *Ellipsomyxa gobii* Køie 2003 (Myxozoa:

Ceratomyxidae) στο είδος *Pomatoschistus microps* Krøyer 1838 το οποίο χρησιμοποιεί το είδος *Nereis* spp. (Annelida: Polychaeta) σαν ενδιάμεσο ξενιστή (Køie και συν. 2004). Προσπάθειες άμεσης πειραματικής μόλυνσης με τα Μυξοσπορίδια *Sphaerospora* spp. (Sitzà-Bobadilla 1991) και *Kudoa thyrssites* (Moran και συν. 1999β) σε θαλασσινά ψάρια, απέβησαν ανεπιτυχείς. Παρόλα αυτά, επιτυχείς πειραματικές μολύνσεις με θαλάσσια Μυξοσπορίδια αναφέρθηκαν στις περιπτώσεις του *K. thyrssites* με έγχυση αίματος από μολυσμένα ψάρια (Moran και συν. 1999β) του *E. leei* στην τσιπούρα με συνύπαρξη με μολυσμένα ψάρια (Diamant 1997) και του *K. onivora* Swearer & Robertson 1999 σε είδη της οικογένειας Labridae μέσω της κατάποσης μολυσμένων ωοθηκών (Swearer & Robertson 1999).

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε άμεση μετάδοση του *E. leei* μέσω συνύπαρξης με μολυσμένα ψάρια. Αυτός ο τρόπος πειραματικής μόλυνσης αποδείχθηκε ο πλέον αποτελεσματικός, αφού παρατηρήθηκε μία πλήρης εξέλιξη της παρασίτωσης με την παρατήρηση όλων των σταδίων εξέλιξης του παράσιτου στο χρονικό διάστημα των δύο περίπου μηνών που διήρκησε το πείραμα. Χαρακτηριστικό ήταν το γεγονός ότι, οι ώριμοι σπόροι ήταν λιγότεροι από τα άλλα στάδια εξέλιξης του παράσιτου, ενώ οι τροφοζώιτες, που είναι το πρώτο στάδιο εξέλιξης των αρχικών κυττάρων, ήταν το επικρατέστερο στάδιο. Αυτά τα αρχικά κύτταρα με τη χαρακτηριστική μορφολογία που περιλαμβάνει δευτερογενή και τριτογενή κύτταρα θεωρούνται το αρχικό μολυσματικό στάδιο του παράσιτου και προέρχονται από ώριμους σπόρους και σποροβλάστες. Αξιοσημείωτη ήταν η απότομη αύξηση του ποσοστού προσβολής από τροφοζώιτες την 19^η ημέρα, η οποία εξηγείται αφενός με την πρόσληψη νέων παρασίτων μέσω του νερού από το μολυσματικό περιβάλλον της πειραματικής δεξαμενής αλλά και με την αυτομόλυνση των ψαριών. Ο εντοπισμός των παρασίτων στο εντερικό επιθήλιο ευνοεί την απελευθέρωσή τους στο νερό. Αυτά τα στάδια πιθανό να είναι ικανά να επιβιώνουν στο θαλασσινό νερό και η βιωσιμότητά τους ενδέχεται να διατηρείται εξαιτίας της απελευθέρωσής τους μαζί με τα υπολείμματα του βλεννογόνου που περιέχουν και

καλύπτουν τα παρασιτικά στάδια. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα άλλων επιτυχών άμεσων πειραματικών μολύνσεων από άλλους ερευνητές, όπου και εκεί οι ώριμοι σπόροι δεν ήταν το κυρίαρχο στάδιο, όπως στην περίπτωση του *E. leei* στην τσιπούρα (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrodt, 1997) και στο *Sciaenops ocellatus* (Diamant 1998) ή στην περίπτωση του *E. scopthalmi* στο καλκάνι (Redondo και συν. 2002), παράσιτο το οποίο σχετίζεται πολύ στενά με το *E. leei* σύμφωνα με μορφολογικά και μοριακά δεδομένα (Palenzuela και συν. 2002).

Επίσης, για πρώτη φορά διεθνώς, εξετάστηκαν σε χιόνες μολυσμένες με το *E. leei*, παράγοντες έμφυτης ανοσίας προκειμένου να διαπιστωθεί η ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών κατά του παράσιτου. Μέχρι τώρα έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την έμφυτη ή επίκτητη ανοσολογική απόκριση των ψαριών σε ορισμένα παράσιτα (Buchman, Sign, Nielsen & Dalgaard 2001, Jones 2001, Sign, Lindenstrøm & Buchmann 2004α,β, Woo 1996, 2001). Δεν υπάρχουν όμως μέχρι σήμερα βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη χυμική ανοσία στη χιόνα. Περιγραφές ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων οφειλόμενες σε Μυξοσπορίδια αποτελούν ένδειξη ότι μερικά από τα παράσιτα αυτά είναι ικανά να προκαλέσουν την ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή (Lom, Dykoná & Fiest 1989, MacConnell και συν. 1989, Sitzà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1993γ, Ventura & Paperna 1984), αλλά δεν υπάρχουν στοιχεία που να διευκρινίζουν τους ανοσολογικούς μηχανισμούς στους οποίους υπόκεινται αυτές οι αλλοιώσεις. Μερικές αναφορές υποστηρίζουν την ανάπτυξη ανοσίας μέσω ειδικών αντισωμάτων κατά τη διάρκεια των μυξοσποριδιακών μολύνσεων (Cuesta, Muñoz, Rodriguez, Salinas Sitzà-Bobadilla, Álvarez -Pellitero, Esteban & Meseguer 2006, Futura και συν. 1993, Muñoz και συν. 2000α, 2000β). Παρόλα αυτά, ανεξάρτητα από την ειδική ή μη ειδική ανοσία που προκύπτει από τις μυξοσποριδιάσεις, μία συγκεκριμένη ανοσολογική κατάσταση μπορεί να αναπτυχθεί με την εξέλιξη της παρασίτωσης. Για παράδειγμα, τσιπούρες σοβαρά μολυσμένες με Μυξοσπορίδια εμφάνισαν μία κατάσταση ανοσοκαταστολής, η οποία διαπιστώθηκε με τη μείωση της φαγοκυτταρικής δράσης μακροφάγων του νεφρού (Karagouni και

συν. 2005β). Επίσης, έχει μελετηθεί η ανοσολογική αντίδραση πειραματικά μολυσμένης τσιπούρας εκτεθειμένης στο παράσιτο *E. leei*. Η λυτική ικανότητα του συμπληρώματος και η συγκέντρωση της υπεροξειδάσης στον ορό, όπως και η έκφραση διαφόρων κυτταροκινών στα κύτταρα της κεφαλής του νεφρού, φαίνεται να επηρεάστηκαν από την έκθεση των ψαριών στο παράσιτο, παρά του ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα μολυσμένα και μη ψάρια τα οποία αποτέλεσαν τους δέκτες της πειραματικής μόλυνσης (Cuesta και συν. 2006).

Στην παρούσα έρευνα εξετάστηκαν δύο παράγοντες της έμφυτης ανοσίας, τα NO και η λυσοζύμη, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της παρασίτωσης στην αμυντική ικανότητα του ξενιστή. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της έκκρισης NO από τα μονοκύτταρα του αίματος, των οποίων η συγκέντρωση αυξήθηκε σταδιακά στον ορό από την 5^η ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση και συνεχίστηκε έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας. Παρασιτικά αντιγόνα τα οποία πιθανότατα απελευθερώθηκαν από τα μακροφάγα προκάλεσαν την ενεργοποίηση της σύνθεσης των NO με αποτέλεσμα την έκκριση δραστικών ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων του αζώτου (NO), (Laing και συν. 1999, Neumann και συν. 1995, Schoor & Plum 1994) Τα μόρια αυτά ασκούν κυτταροτοξική δράση εναντίον πολλών παθογόνων των ψαριών (Yin και συν. 1997). Αντίθετα, στα φυσιολογικά ψάρια, τα επίπεδα NO παρέμειναν χαμηλά καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, η επίδραση της παρασίτωσης στα μονοκύτταρα και στα ουδετερόφιλα του αίματος, (πληθυσμοί κυττάρων που επίσης επηρεάζουν μηχανισμούς μη ειδικής αντίδρασης), υπολογίστηκε από τη μέτρηση της συγκέντρωσης λυσοζύμης στον ορό του αίματος. Η λυσοζύμη έχει ανιχνευτεί στο αίμα, στη βλέννα και σε όργανα ψαριών και η συγκέντρωσή της αυξάνεται από μολύνσεις ή έκθεση σε ξένα σώματα (Fletcher & White 1973, Lie και συν. 1989, Murray & Fletcher 1976,) και επίσης επιδεικνύει βακτηριοκτόνο δράση κατά των σημαντικών παθογόνων των ψαριών (Ellis 1999, 2001, Grinde 1989). Στην παρούσα εργασία δεν ανιχνεύτηκαν ποσότητες λυσοζύμης στον ορό του αίματος των

μολυσμένων ψαριών παρά το γεγονός ότι σε φυσικές μολύνσεις που χαρακτηρίζονταν από μέτρια ένταση, του ίδιου ψαριού με το Μυξοσπορίδιο *Myxobolus* sp, είχε παρατηρηθεί αύξηση έκκρισης της λυσοζύμης (Karagouni και συν. 2005α). Στο ίδιο πείραμα στις μολυσμένες χιόνες με χαμηλή ή υψηλή ένταση παρασίτωσης η ποσότητα της λυσοζύμης του ορού ήταν από μέτρια έως πολύ λίγη, δείχνοντας με τον τρόπο αυτό ότι ο μηχανισμός έκκρισης της λυσοζύμης είναι πιθανό να επηρεάζεται από την ένταση της μυξοσποριδιακής μόλυνσης. Οι μολυσμένες χιόνες με *E. 1aei* του πειράματος της πειραματικής μόλυνσης που περιγράφεται στην παρούσα εργασία εμφάνισαν χαμηλής έντασης παρασίτωση μέχρι την 19^η ημέρα ακολουθούμενη από υψηλής έντασης παρασίτωση και επομένως δεν παρατηρήθηκε έκκριση λυσοζύμης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, σύμφωνα με τις προηγούμενες παρατηρήσεις αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού η λυσοζύμη ανιχνεύτηκε κυρίως σε μεσαίας έντασης μυξοσποριδιάσεις (Karagouni και συν. 2005α).

Επίσης, για πρώτη φορά διεθνώς εξετάστηκε το ενδεχόμενο μετάδοσης του παράσιτου σε ψάρια θεραπευμένα από το ίδιο παράσιτο, στα οποία όμως η μόλυνση δεν ανιχνεύτηκε. Το μεγάλο μέγεθος των ψαριών (150g) μπορεί να αποτελεί μία πιθανή αιτία μη εξέλιξης της μόλυνσης, αφού σύμφωνα με το Rigos και συν. (1999) τα ψάρια είναι πιο ευάλωτα όταν έχουν μέγεθος 20-85g. Σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στο πρότυπο έκκρισης των NO μεταξύ των μολυσμένων ψαριών και των θεραπευμένων ψαριών που δε μολύνθηκαν. Στα ψάρια αυτά (χιόνες 150g), στα οποία διαπιστώθηκε μία απότομη και υψηλή έκκριση NO μετά την 26^η ημέρα, η οποία διατηρήθηκε κατά το υπόλοιπο της πειραματικής μόλυνσης, σε αντίθεση με τα μολυσμένα όπου τα NO παράχθηκαν από τα αρχικά στάδια της μόλυνσης, δεν έδωσαν όμως πολύ υψηλά επίπεδα έκκρισης κατά την εξέλιξη της παρασίτωσης. Είναι προφανές ότι στην ομάδα αυτή η έκθεση των ανοσοαρμόδιων κυττάρων πιθανώς σε αντιγόνα του παράσιτου ενεργοποίησε τους αμυντικούς μηχανισμούς με διαφορετικό τρόπο. Επιπλέον, η ανάπτυξη ανοσοσυμπλεγμάτων μεταξύ των παρασιτικών αντιγόνων και των ειδικών αντισωμάτων που πιθανόν να έχουν

αναπτυχθεί εναντίον του παράσιτου κατά την προηγούμενη μόλυνση, ενδέχεται να επάγει μηχανισμούς προστατευτικής ανοσίας, υποδηλώνοντας την πιθανή συμμετοχή κυττάρων που σχετίζονται με την ανοσολογική μνήμη στα ψάρια.

Η άμεση μετάδοση του παράσιτου ευνοεί τη γρήγορη εξάπλωση της παρασίτωσης προκαλώντας σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις στις ιχθυοκαλλιέργειες. Ο άμεσος βιολογικός κύκλος αυξάνει το ενδεχόμενο εμπλοκής άγριων ψαριών – φορέων στην εύκολη μετάδοση της παρασίτωσης μεταξύ των ψαριών. Στην περίπτωση του *E. ictii*, περισσότερα από 20 είδη ψαριών που ανήκουν σε 10 οικογένειες είναι ύποπτα ότι προσβάλλονται από το παράσιτο (Padros και συν. 2001). Αυτό το γεγονός σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες των μεσογειακών νερών (Athanassopoulou και συν. 1999, Rigos και συν. 1999), την υψηλή σε λιπαρά διατροφή (Nengas και συν. 2000) και την πιθανότητα ύπαρξης και ενδιάμεσων ξενιστών, δείχνει ότι μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες στην εξάπλωση της ασθένειας. Η έγκαιρη διάγνωση είναι απαραίτητη έτσι ώστε να περιοριστεί το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Όπως αποδείχθηκε, οι 55 ημέρες που διήρκησε το πείραμα είναι χρονικό διάστημα καθοριστικής σημασίας γιατί οι θνησιμότητες είναι περιορισμένες. Έτσι, προνοείται η χορήγηση οποιασδήποτε θεραπείας και περιορίζονται σημαντικά οι θνησιμότητες των ψαριών.

4.3 Εφαρμογή πειραματικών θεραπειών κατά την παρασίτωση με *E. leei* σε χιόνα.

Η θεραπεία των Μυξοσποριδίων είναι ένα πολύ δύσκολο εγχείρημα (Molnár 1993). Μέχρι τώρα έχουν δοκιμαστεί πειραματικά διάφορες θεραπείες από ερευνητές όπως φουματζιλίνη, σαλινομυκίνη μόνη της ή σε συνδυασμό με αμπρόλιο, τολτραζουρίλη, ESB₃ και ριγανέλαιο (Athanassopoulou και συν. 2004α,β).

Η φουματζιλίνη και το ανάλογό της TNP-470 έχουν δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στον έλεγχο των Μικροσποριδίων και των Μυξοσποριδίων σε διάφορα είδη ψαριών (Hedrick και συν. 1988, 1991, Higgings & Kent, 1988, Kent & Dawe 1994, Molnár και συν. 1987, Speare, Athanassopoulou, Daley & Sanchez 1999). Το φάρμακο αυτό έχει αποδειχτεί αποτελεσματικό ενάντια στα *Myxidium giardi* Cérède 1906 (Szekely, Molnár & Baska 1988), *Thelohanellus hovorkai* Achmeron 1960 και *Sphaerospora renicola* στον κοινό κυπρίνο κατά την μολυσματική περίοδο (Molnár και συν. 1987, Yokoyama, Liyanage, Sugai & Wakabayashi 1999) ή ενάντια σε τροφοζώιτες ή πιο αναπτυγμένα πλασμώδια του *Hoferellus carassi* Achmeron 1960 (Yokoyama, Ogawa & Wakabayashi 1990) σε χρυσόψαρο, ενάντια στο *Myxobolus cerebralis* και PKX στην πέστροφα (El-Matbouli & Hoffman 1991) και ενάντια στο Μυξοσπορίδιο *Sphaerospora testicularis* Sitja-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1990 στο λαβράκι (Sitja-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992γ). Παρ' όλα αυτά, η φουματζιλίνη είναι ένα φάρμακο με υψηλό κόστος και έχει αποδειχθεί από πολλούς ερευνητές ότι έχει τοξικές επιδράσεις σε υψηλές δόσεις (Athanassopoulou και συν. 2004α,β). Οι επιδράσεις αυτές που ποικίλουν από ανορεξία μέχρι και θάνατο (Sitja-Bobadilla & Álvarez-Pellitero 1992γ), ενώ οι πιο κοινές παρατηρούμενες επιδράσεις είναι η μείωση της ανάπτυξης στην πέστροφα κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Kent & Dawe 1994), η μείωση του ενδιάμεσου συνδετικού νεφρικού ιστού και η κενотоποίηση στο επιθήλιο των ουροφόρων σωληναρίων του σολομού

(Hedrick και συν. 1988). Οι Sitzà-Bobadilla και Álvarez-Pellitero (1992γ) βρήκαν τοξικές επιδράσεις σε λαβράκι, οι οποίες συνέπιπταν με μείωση της αιμογλοβίνης, του αιματοκρίτη και του αριθμού των ερυθροκυττάρων, χωρίς όμως οι αλλαγές αυτές να συνοδεύονται από ιστολογικές ανωμαλίες και έτσι θεωρήθηκαν ανατρέψιμες (Hedrick και συν. 1991, Lauren, Wishkovsky, Hedrick & Hinton 1989, Sovenyi 1992, Wishkovsky, Groff, Lauren, Toth & Hedrick 1990). Μία σημαντική έρευνα σχετικά με την τοξικότητα και την φαρμακοκινητική της φουματζιλίνης στην πέστροφα παρουσιάστηκε από τους Lauren και συν. (1989), οι οποίοι ανέφεραν ότι υψηλές δόσεις του φαρμάκου είναι θανατηφόρες, προκαλώντας αιμορραγία και συμφόρηση του ήπατος, ενώ χαμηλές δόσεις προκαλούν ανατρέψιμες αλλαγές στον αιμοποιητικό ιστό μόνο στους νεφρούς (απλαστική αναιμία). Η θεραπεία με φουματζιλίνη είναι παρατεταμένης διάρκειας και θεωρείται ακριβή. Παρ' όλα αυτά είναι το μόνο φάρμακο που έχει συνταγογραφηθεί για την θεραπεία του *E. 1aei* και Μικροσποριδίων και θεωρείται ασφαλές για τα ψάρια της οικογένειας Sparidae (Athanassoroulou και συν. 2003) όταν χρησιμοποιείται σε δόσεις μικρότερες των 10mg/Kg σωματικού βάρους. Ο Rigos και συν. (2000) ανέφεραν μόνο ασήμαντες αλλαγές σε αιματολογικές παραμέτρους σε τσιπούρα στην οποία εφαρμόστηκε θεραπεία για τριάντα ημέρες χωρίς ένδειξη τοξικότητας στους 22°C σε δόσεις 0,33 και 0,66mg/Kg σωματικού βάρους. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες της Athanassoroulou και συν. (2004α,β) η φουματζιλίνη ήταν ασφαλής σε δόσεις <6mg/Kg σωματικού βάρους, αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματική από άλλα φάρμακα (όπως αμπρόλιο & σαλινομυκίνη) για τη θεραπεία τσιπούρας μολυσμένης με το Μυξοσπορίδιο *P. sparis* και χιόνας η οποία ήταν μολυσμένη με το Μυξοσπορίδιο *Myxobolus* sp.

Η σαλινομυκίνη και αμπρόλιο έχουν χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία για τον έλεγχο κοκκιδίων σε ζώα (Coombs & Muller 2002) αλλά δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα και την ανοσολογική αντίσταση των φαρμάκων αυτών στα μεσογειακά ψάρια. Η σαλινομυκίνη είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας που ανήκει στα ιονοφόρα. Είναι ένας υψηλά λιπόφιλος πολυαιθέρας ο

οποίος συγκεντρώνεται στις κυτταρικές μεμβράνες και καταλύει γρήγορα την μετακίνηση του καλίου διαταράσσοντας την εσωκυτταρική ισορροπία και θανατώνοντας ευαίσθητους μικροοργανισμούς (Russell & Houlihan 2003). Προκαλεί συρρίκνωση του περιβλήματος, κενотоποίηση του κυτοπλάσματος και καταστροφή των μιτοχονδρίων (Kinashi, Otake & Yonahara 1973). Η χορήγηση σαλινομυκίνης από το στόμα είχε καταστροφικές επιπτώσεις στο κυτταρόπλασμα των τροφοζωιτών και στα προσπορογονικά και πανσποροβλαστικά στάδια του Μυξοσποριδίου *Henneguya* sp. το οποίο παρασιτούσε στα βράγχια του είδους *Gnathonemus petersii* Gónther 1862 και προκάλεσε συρρίκνωση των πλασμωνδίων και παραμόρφωση των πολικών καψών του παράσιτου (Dohle, Schmahl, Raether, Schmidt & Ritter 2002).

Το αμπρόλιο είναι ένα ανάλογο της θειαμίνης (βιταμίνη B1) προκαλώντας μία ανταγωνιστική παρεμπόδιση της χρήσης της θειαμίνης από τα παράσιτα. Επιδρά στα αρχικά στάδια παραγωγής του παράσιτου εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των μεροζωιτών. Μπορεί επίσης να εμποδίσει την ανάπτυξη των αναπαραγωγικών σταδίων και της σπορογένεσης των ωοκύστεων. Το αμπρόλιο είναι ένα από πιο ασφαλή αντι-κοκκιδιακά φάρμακα το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην πτηνοτροφία (Hamamoto, Koike & Machida 2000). Παρ' όλα αυτά, το φάρμακο αυτό βρέθηκε αναποτελεσματικό ως μόνη θεραπεία ενάντια σε παρασιτικές ασθένειες οφειλόμενες σε πρωτόζωα (Tojo & Santamarina 1998α,β,γ) και στο *Loma salmonae* Putz, Hoffman et Dunbar 1965 στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) (Speare και συν. 1999).

Στα πειράματα της ενότητας αυτής, παρουσιάστηκε μία προσπάθεια σύγκρισης δύο αντιπαρασιτικών θεραπευτικών αγωγών, της φουματζιλίνης (F) και του συνδυασμού αμπρόλιο και σαλινομυκίνη (AS), με βάση την αλλαγή του ποσοστού προσβολής και της έντασης όλων των σταδίων ανάπτυξης καθώς και την μεταβολή του ποσοστού θνησιμότητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού προσβολής, της συχνότητας όλων των σταδίων ανάπτυξης του Μυξοσποριδίου και του ποσοστού

θνησιμότητας στα μολυσμένα ψάρια στα οποία εφαρμόστηκαν και οι δύο διαφορετικές θεραπευτικές αγωγές (φουματζιλίνη και αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη) συγκριτικά με τα ψάρια στα οποία δεν εφαρμόστηκε θεραπευτική αγωγή. Επιπλέον, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι με παραμορφωμένη δομή παρατηρήθηκαν μόνο στις δύο θεραπευμένες ομάδες και όχι στα ψάρια που δεν δέχτηκαν θεραπεία. Η θεραπεία με φουματζιλίνη αποδείχθηκε λιγότερο αποτελεσματική συγκρινόμενη με την αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη. Παρ' όλα αυτά, η φουματζιλίνη διατήρησε την ένταση της παρασίτωσης σε χαμηλότερο επίπεδο, συγκριτικά με τα ψάρια στα οποία δεν έγινε θεραπεία, μειώνοντας τόσο το ποσοστό προσβολής όσο και το ποσοστό θνησιμότητας. Ο θεραπευτικός συνδυασμός αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη μείωσε το ποσοστό προσβολής και διατήρησε την ένταση της μόλυνσης σε χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τα θεραπευμένα με φουματζιλίνη ψάρια και με τα μη θεραπευμένα, μειώνοντας παράλληλα και το ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας σε 0% μέσα σε χρονικό διάστημα 55 ημερών, ενώ το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ήταν 18,82% . Στην περίπτωση της θεραπείας με φουματζιλίνη το ποσοστό θνησιμότητας μειώθηκε σε 0,13% στις 55 ημέρες που διήρκησε το πείραμα και το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ήταν 25,04%. Τα συνολικά ποσοστά θνησιμότητας που παρατηρήθηκαν και στις δύο θεραπευτικές αγωγές (φουματζιλίνη και αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη) ήταν πολύ μεγαλύτερα συγκριτικά με τα συνολικά ποσοστά θνησιμότητας που παρατηρήθηκαν κατά την εφαρμογή των ίδιων θεραπευτικών αγωγών στις περιπτώσεις χιόνας μολυσμένης με *Mycobolus* sp. (Athanasopoulou και συν. 2004β, Karagouni και συν. 2005α) και τσιπούρας μολυσμένης με *Polysporoplasma sparis* (Athanasopoulou και συν. 2004α, Karagouni και συν. 2005β), διαφορά όμως που οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι το *E. izei* είναι το πιο παθογόνο Μυξοσπορίδιο που παρατηρείται στα μεσογειακά εκτρεφόμενα ψάρια (Athanasopoulou και συν. 1999). Επιπλέον, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι με παραμορφωμένη δομή παρατηρήθηκαν πιο νωρίς στην περίπτωση της θεραπείας με αμπρόλιο & σαλινιμυκίνη παρά στην περίπτωση της θεραπείας με φουματζιλίνη.

Επίσης, στην περίπτωση της θεραπείας με αμπρόλιο & σαλιμιμυκίνη σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι παρατηρήθηκαν μόνο μέχρι την 28^η και 35^η ημέρα, αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση της θεραπείας με φουματζιλίνη παρατηρήθηκαν μέχρι το τέλος του πειράματος. Επομένως, η σύγκριση της αποτελεσματικότητας της δράσης των δύο θεραπευτικών αγωγών που εφαρμόστηκαν δείχνει αφενός τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της αμπρόλιο & σαλιμιμυκίνη και αφετέρου την ταχύτερη δράση της.

Οι συνδυαστικές θεραπείες είναι γνωστές και αποτελεσματικές κυρίως στην πτηνοτροφία (Coombs & Muller 2002), ενώ για πολλά χρόνια η τυπική θεραπεία της κοκκιδίωσης των ζώων και των ανθρώπων βασιζόταν στην συνεργατική δράση ανταγωνιστών του φολικού οξέος με σουλφοναμίδες (Haberhorn 1996). Το γεγονός ότι αμπρόλιο χρησιμοποιήθηκε σε συνδυαστική θεραπεία με σαλινομυκίνη και όχι μόνο του μπορεί να εξηγεί το γεγονός ότι στην παρούσα έρευνα είχε τα καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τις περιπτώσεις που είχε εφαρμοστεί ως μόνη θεραπεία ενάντια σε παρασιτικές ασθένειες οφειλόμενες σε πρωτόζωα (Tojo & Santamarina 1998α,β,γ) και στο *Loma salmonae* στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) (Speare και συν. 1999). Ο συνδυασμός αμπρόλιο & σαλιμιμυκίνη έχει αποδειχτεί αποτελεσματικός στην περίπτωση του *Myxobolus* sp. σε χιόνα (Athanasopoulou και συν. 2004β, Karagouni και συν. 2005α) και του *Polysporoplasma sparis* σε τσιπούρα (Athanasopoulou και συν. 2004α, Karagouni και συν. 2005β). Στις περιπτώσεις αυτές, ο συνδυασμός αμπρόλιο & σαλιμιμυκίνη δεν προκάλεσε ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα όργανα των υπό θεραπεία ψαριών για τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές θεραπείες.

Συνοψίζοντας, είναι η πρώτη φορά που ο συνδυασμός αμπρόλιο & σαλιμιμυκίνη αποδείχθηκε ασφαλής και αποτελεσματική θεραπεία ενάντια στο Μυξοσπορίδιο *E. leei* που παρασιτεί σε χιόνα και μπορεί να θεωρηθεί ένα αποτελεσματικό και πολλά υποσχόμενο φάρμακο για θεραπείες Μυξοσποριδίων στα εντατικά καλλιεργούμενα μεσογειακά είδη ψαριών. Αυτός ο συνδυασμός δεν

προκάλεσε ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στα όργανα των θεραπευμένων ψαριών για τις δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική θεραπεία. Η αποτελεσματικότητα μπορεί να οφείλεται τόσο στην άμεση κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου στο παράσιτο όσο και στην ανοσοδιεγερτική επίδραση στην έμφυτη ανοσία και άμυνα του ξενιστή, καταλήγοντας στην εξάλειψη του παράσιτου από αποτελεσματικούς αμυντικούς μηχανισμούς όπως έχει παρατηρηθεί και για τα είδη *P. sparix* και *Myxobolus sp.* για την τσιπούρα και τη χιόνα αντίστοιχα (Karagouni και συν. 2005α,β). Μία τέτοια αποτελεσματική θεραπεία θα μπορούσε να εφαρμοστεί ίσως και προληπτικά εμποδίζοντας σημαντικές απώλειες σε ψάρια, ειδικά κατά τη διάρκεια της καθοριστικής αρχικής περιόδου της παρασίτωσης, που το ποσοστό θνησιμότητας είναι ακόμα πολύ χαμηλό, πρόταση που έχει υποστηριχτεί και από άλλους ερευνητές. Ο Hedrick και συν. (1988) πρότεινε ότι η φουματζιλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο προφύλαξης σε περιπτώσεις έντονων μολύνσεων, προστατεύοντας από αυξημένες απώλειες και ο Molnár και συν. (1987) πρότεινε τη χορήγηση φουματζιλίνης πριν το ξέσπασμα μυξοσποριδιακών μολύνσεων σε κυπρίνο, εξασφαλίζοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής είναι:

Τα Μυξοσπορίδια είναι παράσιτα τα οποία παρασιτούν ευρέως στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες και προκαλούν σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις σε αυτές. Ξενιστές των Μυξοσποριδίων είναι τόσο εκτρεφόμενα όσο και άγρια ψάρια. Το *E. leei* επιβεβαιώθηκε ότι είναι το πιο παθογόνο Μυξοσπορίδιο το οποίο παρασιτεί στα ελληνικά καλλιεργούμενα είδη προκαλώντας σοβαρές απώλειες κυρίως στο είδος χιόνα. Στην παρούσα έρευνα, το *E. leei* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα σε άγρια τσιπούρα και άγριο κέφαλο που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια, ενώ αναφέρεται για πρώτη φορά διεθνώς ότι ο εκτρεφόμενος σαργός θεωρήθηκε σημαντικός ξενιστής του παράσιτου. Επίσης, αναφέρεται για πρώτη φορά διεθνώς ότι ο νεφρός αποτελεί όργανο στόχο του παράσιτου. Το *P. sparis* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά διεθνώς σε άγρια ψάρια, τσιπούρα, κέφαλο και σε μία περίπτωση σε λιθρίνι που αλιεύθηκαν γύρω από τις μονάδες στις οποίες εντοπίστηκαν τα εκτρεφόμενα μολυσμένα ψάρια. Αταυτοποίητα είδη του *Myxobolus* sp. βρέθηκαν για πρώτη φορά διεθνώς σε εκτρεφόμενο σαργό. Επίσης, είναι η πρώτη φορά που το παράσιτο αυτό αναφέρεται σε άγριο κέφαλο, μόνο σε έντερο και χοληδόχο κύστη, στην Ελλάδα.

- Αταυτοποίητα είδη του *Ceratomyxa* sp. αναφέρθηκαν για πρώτη φορά διεθνώς στα άγρια ψάρια τσιπούρα και γόπα.
- Το Μυξοσπορίδιο *Henneguya* sp. αναφέρθηκε για πρώτη φορά διεθνώς σε εκτρεφόμενη χιόνα.
- Το Μυξοσπορίδιο *Kudoa* sp. αναφέρθηκε για πρώτη φορά διεθνώς σε σαργό.

- Υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των άγριων και των εκτρεφόμενων ψαριών όσον αφορά την μετάδοση των Μυξοσποριδίων και τα άγρια ψάρια μπορεί να αποτελούν φορείς μετάδοσης ορισμένων από τα παράσιτα αυτά στα εκτρεφόμενα ψάρια.
- Από την παρούσα έρευνα προέκυψε ότι το καλοκαίρι είναι η εποχή που ευνοεί την έξαρση των μυξοσποριδιάσεων, αφού παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής τόσο στα εκτρεφόμενα όσο και στα άγρια ψάρια.
- Ο βιολογικός κύκλος του *E. leei* στο είδος χιόνα είναι άμεσος, ακολουθώντας το μοντέλο της ανάπτυξης που έχει μέχρι τώρα παρατηρηθεί και στην τσιπούρα.
 - Η μετάδοση του παράσιτου γίνεται μέσω του μολυσμένου νερού. Τα παράσιτα αυτά βρίσκονται στο εντερικό επιθήλιο, γεγονός που ευνοεί την απελευθέρωσή τους στο νερό και την διείσδυση τους μέσω του στόματος ή και με ανιούσα μόλυνση από την έδρα, στον οργανισμό του ψαριού. Η μόλυνση υγιών ψαριών μπορεί να ξεκινήσει σε χρονικό διάστημα πέντε ημερών από τη στιγμή που τα ψάρια θα βρεθούν σε μολυσμένο περιβάλλον.
 - Το έντερο είναι το πρώτο όργανο “στόχος” του παράσιτου.
 - Το πειραματικό μοντέλο συνύπαρξης που χρησιμοποιήθηκε αποδείχθηκε επιτυχές.
 - Η επίδραση της παρασίτωσης στην αμυντική ικανότητα του ξενιστή αποδείχθηκε από την ενεργοποίηση της έκκρισης NO από τα μονοκύτταρα του αίματος στα μολυσμένα ψάρια.
 - Η μη επιτυχής πειραματική μόλυνση στις θεραπευμένες χιόνες ίσως αποτελεί μία ένδειξη ανάπτυξης αμυντικών μηχανισμών προστασίας.

- Στο χρονικό διάστημα των 55 ημερών που διήρκησε το πείραμα, η παρασίτωση βρίσκεται ακόμα σε αρχικά στάδια, γεγονός που εξηγεί την μη ανάπτυξη του παράσιτου σε άλλα όργανα στόχους και τις μηδενικές θνησιμότητες, ευνοώντας τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής.

- Ο συνδυασμός αμπρόλιο και σαλινομικίνη μπορεί να είναι μία πολλά υποσχόμενη, οικονομικά συμφέρουσα και ασφαλής θεραπεία για το *E. leei*, που μπορεί να περιορίσει τόσο το ποσοστό προσβολής και την ένταση της παρασίτωσης όσο και τις θνησιμότητες.

Προοπτικές

Προτάσεις για περαιτέρω ερευνητική δραστηριότητα, ως συνέχεια των ευρημάτων της παρούσας διατριβής, είναι οι παρακάτω:

- ⇒ Ανίχνευση των μυξοσποριδιάσεων με μοριακές τεχνικές.
- ⇒ Μελέτη του βιολογικού κύκλου και άλλων Μυξοσποριδίων εκτός του *E. leei*.
- ⇒ Μελέτη του χρόνου αναμονής και των κατάλοιπων των φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Αθανασοπούλου Φ, Παπαδοπούλου Γ, Λύτρα Κ (1998). Αξιοσημείωτες μολύνσεις από μυξοσπορίδια σε εντατικά καλλιεργούμενα ψάρια της Ελλάδας. *Αλιευτικά Νέα* 204: 66-69.
- Λύτρα Κ (1997). Πειραματική μόλυνση σε *Puntazzo puntazzo* μολυσμένα με μυξοσπορίδια. *Αλιευτικά Νέα* 195: 56-59.
- Παπαθανασίου Γ (2004). *Παρασιτικό φορτίο ιχθύων αλμυρών υδάτων*. Μεταπτυχιακή Εργασία Ειδίκευσης, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- Παπουτσόγλου Σ (1997). *Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Υπουργείο Γεωργίας (2000). *Ο αλιευτικός τομέας στην Ελλάδα*. Ενημερωτικό έντυπο, Γενική Διεύθυνση Αλιείας, Αθήνα.
- Χαραλαμπίδης ΣΘ (1994). *Ανοσολογία παρασιτώσεων*. 1^η έκδ. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Χατζηπέτρου-Κουρουνάκη Λ (1987). *Ανοσοβιολογία*. 2^η έκδ. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

- Abbas AK, Lichtman AH (2004). *Βασική ανοσολογία: Λειτουργίες και δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος*. Μετάφραση: Σαμάρκος Μ, 1st edn. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, USA.
- Abella I, Le Breton M (1996). *Parasitofauna of cultured Sparidae. Fish health management in sea bass and sea bream farming*. A training manual for the aquaculture industry, National Aquaculture Centre, Malta, pp. 215-222.
- Abraham D, Grieve RB, Mika-Grieve M (1988). *Dirofilaria immitis*: Surface properties of third- and fourth-stage larvae. *Experimental parasitology* 65: 157-167.
- Adkison MA, Levine RP, Hedrick RP (1997). Investigation into the immune response of rainbow trout to *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *Proceedings of Whirling disease symposium*, Montana. pp. 137-145.
- Afonso F, Charouco AM, Cruz e Silva MP (2005). Presence of Myxosporidians (Myxosporea) of the genus *Kudoa*, in fishes caught in the southeast Atlantic Ocean. *Proceedings of the 12th EAFP International Conference*, Copenhagen.
- Álvarez-Pellitero P (1995). Protozoan parasites of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., from different culture systems in Spain. *Journal of Fish Diseases* 18: 105-115.
- Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (1993α). Pathology of Myxosporea in marine fish culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 17: 229-238.
- Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (1993β). *Ceratomyxa* spp. (Protozoa: Myxosporea) infections in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Spanish Mediterranean area. *Journal of Fish Biology* 42: 889-901.

- Amandi A, Holt RA, Fryer JL (1985). Observations on *Myxobolus insidiosus* (Myxozoa: Myxosporidia) a parasite of salmonid fishes. *Fish Pathology* 20: 287-304.
- Anderson DP (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 281-307.
- Arfara S, Bozzeta E, Prearo M, Ghittino C (1995). Cases of kudoasis in cultured juvenile gilthead sea bream. *III Convegno Nazionale di Societa Italiana di Pathologia Ittica* 7: 12-17.
- Athanassopoulou F (1990). *A study of the Myxosporidian infections of R. rutilus L. with special reference to Myxidium rhodei Leger, 1905 in the renal tissue*. Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling.
- Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Ragias V, Tavla J, Christofilloyanis P (2004α). Efficacy and toxicity of orally administered anticoccidial drugs innovative treatments of *Polysporoplasma sparis* Sitzà-Bobadilla and Álvarez-Pellitero 1985 infection in *Sparus aurata* L. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 345-354.
- Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Ragias V, Tavla J, Christofilloyianis P, Vatsos I (2004β). Efficacy and toxicity of orally administered anticoccidial drugs innovative treatments of *Myxobolus* sp. infection in *Puntazzo puntazzo*. *Diseases of Aquatic Organisms* 62: 217-226.
- Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E, Vatsos J, Christofilloyiannis P, Lytra K, Dourala N (2003). Novel treatments of Myxosporidia in Mediterranean fish and immunological response. *Proceedings of the EAFP meeting*, Malta
- Athanassopoulou F, Prapas Th, Rodger H (1999). Diseases of *Puntazzo puntazzo* C. in marine aquaculture systems in Greece. *Journal of Fish Diseases* 22: 215-218.

- Bahri S, Hassine OKB, Marques A (1996). *Henneguya* sp. (Myxosporea, Bivalvulida) infecting the gills of wild gilthead sea bream *Sparus aurata* L., from the coast of Tunisia. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 16(2): 51-53.
- Bahri S, Marques A (1996). Myxosporean parasites of the genus *Myxobolus* from *Mugil cephalus* in Ichkeul lagoon, Tunisia: description of two new species. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 115-122.
- Bahri S, Marques A, Coste F, Bouix G, Ben Hassine OK (1995). Presence of cutaneous myxosporidian in Tunisian *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 15: 54-57.
- Barassa B, Cordeiro NS Arana S (2003). A new species of *Henneguya*, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brasil, with comments on histopathology and seasonality. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(6): 761-765.
- Bartholomew JL (1998). Host Resistance to infection by the Myxosporean Parasite *Ceratomyxa shasta*: A review. *Journal of Aquatic Animal Health* 10: 112-120 .
- Bayne CJ, Gerwick L (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 725-743.
- Bier OG, da Silva DW, Goetze D, Mota I (1986). *Funtamentals of Immunology*. 6th Edn. Springer-Verlag, Berlin.
- Blanc G (1997). Introduced pathogens in European aquatic ecosystems: theoretical aspects and realities. *Bulletin Francais de la Pêche de la Pisciculture*. 344-5: 489-515.
- Bovo G, Borghesan F, Commuzzi M, Ceschia G, Giorgetii G (1995). "Winter Disease" in reared sea bream: preliminary observations. *Bolletino Societa Italiana di Patologia Ittica* 17: 2-11.

- Bower SM (1985). *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa: Myxosporea) in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): Experimental transmission and natural infections in the Fraser River, British Columbia. *Canadian Journal of Zoology* 63: 1737-1740.
- Bredt DS, Snyder SH (1994). Nitric Oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry* 63: 175.
- Brickle P, Kalavati C, MacKenzie K (2005). A new species of the genus *Henneguya* (Myxosporea: Bivalvulida) from the Falklands mullet, *Eleginops maclovinus* (Valenciennes) (Teleostei: Eleginopidae) in the falkland islands. *Proceedings of the 12th EAFP International Conference*, Copenhagen.
- Bruning G, Hattwig K, Mayer B (1996). Nitric oxide synthase in the peripheral nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell and Tissue Research* 284: 87-98.
- Buchman K, Sign J, Nielsen CV, Dalgaard M (2001). Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology* 100: 105-116.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* 83: 575-583.
- Caffara M, Marcer F, Florio D, Quaglio F, Fioravanti ML (2003). Heart infection due to *Henneguya* sp. (Myxozoa, Myxosporea) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured in Italy. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 23(3): 108-112.
- Campos-Perez JJ, Ward M, Grabiwski PS, Ellis AE, Secombes CJ (2000). The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout

Oncorhynchus mykiss after challenge with the Gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology* 99: 153-161.

- Colomi A (2004). Diseases of Mediterranean fish species: Problems, research and prospects. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 24(1): 22-32.
- Company R, Sitzà-Bobadilla A, Pujalte MJ, Garay E, Álvarez-Pellitero P, Pérez-Sánchez J (1999). Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *Journal of Fish Diseases* 22: 299-309.
- Coombs GH, Muller S (2002). Recent advances in the search of new anti-coccidial drugs. *International Journal of Parasitology* 32: 497-508.
- Croft SL (1997). The current status of antiparasite chemotherapy. *Parasitology* 114: 3-15.
- Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J (1999). Natural cytotoxic activity of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment by flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71: 161-171.
- Cuesta A, Muñoz P, Rodríguez A, Salinas I, Sitzà-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P, Esteban MA, Meseguer J (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate defence against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasitology* 132: 95-104.
- Current WL (1979). *Henneguya adipose* Minchew (Myxosporida) in the channel catfish: ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis. *Journal of Protozoology* 26: 209-217.
- Current WL, Janovy JJr (1977). Sporogenesis in *Henneguya exilis* infecting the channel catfish: an ultrastructural study. *Protistologica* 13: 157-167.

- Current WL, Janovy JJr, Knight SA (1979). *Myxosoma funduli* Kudo (Myxosporida) in *Fundulus kansae*: ultrastructure of plasmodium wall and of sporogenesis. *Journal of Protozoology* 26: 574-583.
- Dalmo RA, Ingebrigtsen K, Bogwald J (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20: 241-273.
- Dawson TM, Dawson VL (1995). Nitric Oxide: actions and pathological roles. *The Neuroscientist* 1: 7.
- Desser SS, Paterson WB (1978). Ultrastructural and cytochemical observations on sporogenesis of *Myxobolus* sp. (Myxosporida: Myxobolidae) from the common shiner *Notropis cornutus*. *Journal of Protozoology* 25: 314-326.
- Diamant A (1992). A new pathogenic histozoic *Myxidium* (Myxosporea) in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 12: 64-66.
- Diamant A (1995). *Myxidium leei* (Myxosporea) infections in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti) and common sea bream *Pagrus pagrus* (L.) (Sparidae). *Proceedings of IVth International Symposium of Fish Parasitology*. Munich, Germany.
- Diamant A (1997). Fish – to – fish transmission of a marine myxosporean. *Diseases of Aquatic Organisms* 30: 99-105.
- Diamant A (1998). Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporea). *Aquaculture* 162: 33-39.

- Diamant A, Lom J, Dyková I (1994). *Myxidium leei* n. sp. a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 20: 137-141.
- Diamant A, Wajsbrodt N (1997). Experimental transmission of *Myxidium leei* in gilt head sea bream *Sparus aurata*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 17(3/4): 99 -103.
- Dohle A, Schmahl G, Raether W, Schmidt H, Ritter G (2002). Effects of orally administered chemotherapeutics (quinine, salinomycin) against *Henneguya* sp. Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite in the tapir fish *Gnathonemus petersii* Günther, 1862 (Teleostei). *Parasitological Research* 88: 861-867.
- Drury RA, Wallington EA (1980). *Carleton's Histological Techniques*. Oxford University Press, Oxford, pp. 520.
- Dyková I, Lom J (1978). Histopathological changes in fish gills infected with myxosporidian parasites of the genus *Henneguya*. *Journal of Fish Biology* 12: 191-202.
- Dyková I, Lom J (1988). *Chloromyxum reticulatum* (Myxozoa, Myxosporea) in the liver of burbot (*Lota lota* L.) and its migration to the final site of infection. *European Journal of Protistology* 23: 258-261.
- Dzikowski R, Paperna I, Diamant A (2003). Use of fish parasite species richness indices in analyzing anthropogenically impacted coastal marine ecosystems. *Helgoland Marine Research* 57: 220-22.
- Egusa S, Nakajima K (1978). Kudoasis of cultured yellow-tail. *Fish Pathology* 13: 1-7.
- Egusa S, Nakajima K (1980). *Kudoa amamiensis* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) found in cultured yellow-tails and wild damselfishes from

- Amani-Ohshima and Okinawa, Japan. *Fish Bulletin of the Japanese Society of scientific Fisheries* 46: 1193-1198.
- Eiras JC (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporaea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology* 52: 43-54.
 - Eiras JC, D' Souza J (2004). *Myxobolus goensis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporaea, Myxobolidae), a parasite of the gills of *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae) from Goa, India. *Parasite* 11(3): 243-248.
 - Egusa S, Shiomitsu T (1983). Two new species of the genus *Kudoa* (Myxosporaea: Multivalvulida) from marine cultured fishes in Japan. *Fish Pathology* 18:163-171.
 - Ellis AE (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 291-308.
 - Ellis AE (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 827-839
 - Ellison RT, Giehl TJ (1991). Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *Journal of Clinical Investigation* 88:1080-1091.
 - El-Matbouli M, Hofmann RW (1989). Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bispogony via tubificid worms. *Parasitological Research* 75: 461-464.
 - El-Matbouli M, Hoffmann RW (1991). Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by fumagillin. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 109-113.
 - El-Matbouli M, Fischer-Scherl T, Hoffmann RW (1992). Present knowledge of the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some Myxosporaea important for freshwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 367-402.

- Engstad RE, Robertsen B, Frivold E (1992). Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish and Shellfish Immunology* 2: 287-297.
- Esteban MA, Mulero V, Muñoz J, Meseguer J (1998). Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leucocytes of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) by flow cytometry and electron microscopy. *Cell and Tissue Research* 293: 133-141.
- Evelyn TPT (1996). *Infection and disease*. In: G Iwama & T Nakanishi (eds) *The Fish Immune System*, Academic Press, San Diego, pp. 339-366.
- Fall M, Kpatcha KT, Diebakate C, Faye N, Toguebaye BS (1997). Observations sur des myxosporidies ([Myxozoa](#)) du genre *Myxobolus* parasites de *Mugil cephalus* (poisson, teleosteen) du Senegal. *Parasite* 2: 173-180.
- FAO (2002). *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Sofia.
- FAO (2004). *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Sofia.
- Fattah DI, Maizels RM, McLaren DJ, Spry CJF (1986). *Toxacara canis*: Interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Experimental Parasitology* 61: 421-431.
- Faye N, Kpatcha TK, Debacate C, Fall M, Toguebaye BS (1999). Gill infections due to Myxosporean (Myxozoa) parasites in fishes from Senegal with description of *Myxobolus Hani* sp. n. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 19(1): 14-16.
- Faye N, Kpatcha TK, Fall M, Toguebaye BS (1997). Heart infection due to Myxosporean (Myxozoa) parasites in marine and estuarine fishes from Senegal. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 17(3/4): 115-117.

- Fiest SW (1997). Pathogenicity of renal myxosporeans of fish. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 17:209-214.
- Fiest SW, Ronga E (1996). Distribution and prevalence of gall bladder myxosporean parasites in dab (*Limnada limnada* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) in UK coastal waters. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 16(5): 176-180.
- Finch SC, Lamphere JP, Jablon S (1964). The relationship of serum lysozyme to leukocytes and other constitutional factors. *Yale Journal of Biology and Medicine* 36: 350.
- Fleming A (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of Royal Society* 93: 306.
- Fletcher TC, White A (1973). Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) *Experientia* 29: 283-285.
- Futura T, Ogawa K, Wakabayashi H (1993). Humoral immune response of carp *Cyprinus carpio* to *Myxobolus artus* (Myxozoa, Myxobolidae) infection. *Journal of Fish Diseases* 43: 441-450.
- Golomazou E, Athanassopoulou F, Karagouni E, Kokkokiris L (in press). Seasonality and impact on health and growth of a new recorded *Myxobolus* species, infecting cultured sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* C. in Greece. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*.
- Grassé PP, Lavette A (1978). La myxosporidie *Sphaeromyxa sabrazesi* et le nouvel embranchement des Myxozoaires (Myxozoa). Recherches sur l' état pluricellulaire primitive et considerations phylogénétiques. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie* 20: 193-285.

- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126: 131-138.
- Grell KG (1973). *Protozoologie (Protozoology)*, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.
- Griess P (1879). Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen" *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 12: 426-428.
- Griffin BR, Davies EM (1978). *Myxosoma cerebralis*: detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 35: 1186-1190.
- Grinde B (1989). Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish. *Journal of Fish Diseases* 12: 95-104.
- Grinde B, Lie O, Poppe T, Salte R (1988). Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* 18: 299-304.
- Grossheider G, Körting W (1993). Experimental transmission of *Sphaerospora renicola* to common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms* 16: 91-95.
- Haberkorn A (1996). Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and perspectives. *Parasitological Research* 82: 193-199.
- Hallett SL, Erseus C, Lester RJG (1999). Actinosporeans (Myxozoa) from marine oligochaetes of the Great Barrier. *Systematic Parasitology* 44: 49-57.
- Hamamoto K, Koike R, Machida Y (2000). Bioavailability of amprolium in fasting and nonfasting chickens after intravenous and oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23: 9-12.

- Harrison JF, Parker RW, DeSilva KL (1973). Lysozymuria and acute disorders of renal function. *Journal of Clinical Pathology* 26: 278.
- Harvell D, Aronson R, Baron N, Connel J, Dobson A, Ellner S, Gerber L, Kim K, Kuris A, McCallum H, Lafferty K, McKay B, Porter J, Pascual M, Smith G, Sutherland K, Ward J (2004). The rising tide of ocean diseases: unsolved problems and research priorities. *Frontiers in ecology and Environment* 2(7): 375-382.
- Handman E, McConville MJ, Goding JW (1987). Carbohydrate antigens a possible parasite vaccines. A case for the *Leishmania glycolipid*. *Immunology Today* 8: 181-185.
- Harn DA, Cianci KML, Caulfield JP (1988). *Schistosoma mansoni*: Immunization with cercarial glycocalyx preparation increases the adult worm burden. *Experimental Parasitology* 68: 108-110.
- Hedrick RP, Groff JM, Baxa DV (1991). Experimental infections with *Enterocytozoon salmonis* Chilmonczyk, Cox, Hedrick (Microsporea): an intranuclear microsporidium from Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases of Aquatic Organisms* 10:103-108.
- Hedrick RP, Groff JM, Foley P, McDowell T (1988). Oral administration of Fumagillin DCH protects Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* from experimentally-induced proliferative kidney disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 165-168.
- Hedrick RP, MacConnell E, Kinkelin P (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. In: M Faisal & F M Hetrick (eds) *Annual review of fish diseases* Pergamon Press, New York, pp. 277-290.
- Heggberget TG, Johnsen BO, Hindar K, Jonsson B, Hansen LP, Hvidsten NA, Jensen AJ (1993). Interactions between wild and cultured Atlantic

- salmon: a review of the Norwegian experience. *Fisheries Research* 18: 123-146.
- Higgins MJ, Kent ML (1988). TNP-470, the analogue of fumagillin DCH, controls PKX in naturally infected sockeye salmon, *Oncorhynchus necra* (Walbaum), underyearlings. *Journal of Fish Diseases* 21:455-457.
 - Holmqvist B, Ekstrom P (1997). Subcellular localisation of neuronal nitric oxide synthase in the brain of a teleost: An immunoelectron and confocal microscopical study. *Brain Research* 745: 67-82.
 - Ibarra AM, Gall GA, Hedrick RP (1991). Susceptibility of two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to experimentally induced infections with the myxosporean *Ceratomyxa Shasta*. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 191-194.
 - Ikeda J (1912). Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. I. The life history of a new Actinomyxidian, *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. *Archiv für Protistenkunde* 25: 240-242.
 - Jadwiga G (1991). *Marine fish parasitology, an outline*. Polish Scientific Publishers, Warszawa.
 - James SL, Glaven J, Goldenberg S, Meltzer MS, Pearce E (1990). Tumour necrosis factor (TNF) as a mediator of macrophage helminthotoxic activity. *Parasite Immunology* 12: 1-13.
 - Jones SRM (2001). The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 841-852.

- Jorgensen JB, Sharp GJE, Secombes CJ, Robertsen B (1993). Effect of yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages *Fish and Shellfish Immunology* 3: 167-277.
- Joy JE (1972). A new species of *Kudoa* (Myxosporidea: Chloromyxidae) from the spot, *Leiostomus xanthurus* Lacépède, in Clear Lake, Texas. *Journal of Protozoology* 19: 264-265.
- Kabata Z, Whitaker DJ (1986). Distribution of two species of *Kudoa* (Myxozoa: Multivalvulida) in offshore population of the Pacific hake, *Merluccius productus* (Ayres, 1855) *Canadian Journal of Zoology* 64: 2103-2110.
- Kabata Z, Whitaker DJ (1989). *Kudoa thyrsites* (Gilchrist, 1924) (Myxozoa) in the cardiac muscle of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Zoology* 67: 341-342.
- Kabre BG, Sakiti NG, Marques A, Sawadogo L (1997). Presence of Myxosporeans (Myxozoa, Myxosporidia) of the genus *Henneguya* (Thelohan 1882), parasites of fishes caught in fisheries of Burkina-Faso. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 17(2): 43-46.
- Karagouni E, Athanassopoulou F, Lytra A, Komis C, Dotsika E (2005α). Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary Parasitology* 134: 215-228.
- Karagouni E, Athanassopoulou F, Tsagozis P, Ralli E, Moustakareas T, Lytra K, Dotsika E (2005β). The impact of a successful anti-myxosporean treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *International Journal of Immunology and Pharmacology* 18(1): 121-132.

- Kent M, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hallet SL, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Lester RJG, Longshaw M, Palenzuela O, Xiao L (2001). Recent advances in our knowledge of Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 395-413.
- Kent ML, Dawe S (1994). Efficacy of fumagillin DCH against experimentally induced *Loma salmonae* infections. *Diseases of Aquatic Organisms* 20: 231-233.
- Kinashi H, Otake N, Yonahara H (1973). The structure of salinomycin, a new member of the polyether antibiotics. *Tetrahedron Letters* 499: 4955-4958.
- Klesius PH, Haynes TB, Cross DA, Ciordia H (1986). *Ostertagia ostertagi*: Excretory secretory chemotactic substance from infective larvae as cause of eosinophil locomotion. *Experimental Parasitology* 61: 120-125.
- Køie M (2000). First record of an actinosporean (Myxozoa) in a marine polychaete annelid. *Journal of Parasitology* 86: 871-872.
- Køie M (2002). Spirorchid and serpulid polychaetes are candidates as invertebrate host for Myxozoa. *Folia Parasitologica* 49: 160-162.
- Køie M, Whipps CM, Kent ML (2004). *Ellipsomyxa gobii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) in common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Annelida: Polychaeta) as invertebrate hosts. *Folia Parasitologica* 51: 14-18.
- Kostoïngue B, Diebakate C, Faye N, Toguebaye BS (2001). Presence of Myxosporidea (Myxozoa: Myxosporidia) of the Genus *Henneguya* Thelohan, 1892 in Freshwater Fishes from Chad (Central Africa). *Acta Protozoologica* 40: 117-123.
- Klockars M, Reitamo S, Weber T, Kerttula Y (1978). Cerebrospinal fluid lysozyme in bacterial and viral meningitis. *Acta Medica Scandinavica* 203: 71.

- Laing KJ, Grabiwski PS, Belolsevic M, Secombes CJ (1996). A partial sequence for nitric oxide synthase from the goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. *Immunology and Cell Biology* 74: 374-379.
- Laing KJ, Hardie LJ, Aartsen W, Grabowski PS, Secombes CJ (1999). Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 71-85.
- Landsberg JH, Lom J (1991). Taxonomy of the genera of the *Myxobolus/Myxosoma* group (Myxobolidae, Myxosporea), current listing of species and revision of synonyms. *Systematic Parasitology* 18: 165-186.
- Langdon JS (1991). Myoliquefaction post-mortem ("milky flesh") due to *Kudoa thyrsites* (Gilchrist) (Myxosporea: Multivalvulida) in mahi mahi, *Coryphaena hippurus* L. *Journal of Fish Diseases* 15: 459-471.
- Langdon JS, Thorne T, Fletcher WJ (1992). Reservoir hosts and new clupeoid host records for the myoliquefactive myxosporean parasite *Kudoa thyrsites* (Gilchrist). *Journal of Fish Diseases* 15: 459-471.
- Lauren D, Wishkovsky JG, Hedrick R, Hinton D (1989). Toxicity and pharmacokinetics of antibiotic Fumagillin in yearling rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 98: 444-453.
- Le Breton A, Marques A (1995). Occurrence of an histozoic *Myxidium* infection in two marine culture species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 15(6): 210-212.
- Lie O, Evensen O, Sorensen A, Frogsadal E (1989). Study of lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 1-5.
- Lightowlers MW, Rickard MD (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* 96: 123-166.

- Lom J (1974). *Current status of Myxo- and Microsporides. Progress in Protozoology*, Clermont-Ferrand.
- Lom J (1984). Diseases caused by Protistans. In: O Kinne (ed) *Diseases of marine animals*. Vol. IV. Part I. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, pp. 114-168.
- Lom J (1987). Myxosporea: a new look at long known parasites of fish. *Parasitology Today* 3:327-332.
- Lom J (1990). Phylum Myxozoa. In Margolis L, Corliss JO, Melkonian M & Chapman DJ (eds) *Handbook of Protoctista*. Jones & Bartlett Publishers, Boston, pp. 36-52.
- Lom J, Arthur JR (1989). A guideline for preparation of species description in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases* 12: 151-156.
- Lom J, Dyková I (1988). Sporogenesis and spore structure in *Kudoa lunata* (Myxosporea, Multivalvulida). *Parasitology Research* 74: 521-530.
- Lom J, Dyková I (1994). Studies on protozoan parasites of Australian fishes. III. Species of the genus *Myxobolus* Bütschli, 1882. *European Journal of Protistology* 30: 431-439.
- Lom J, Dyková I (1995). Myxosporea (Phylum Myxozoa). In: Woo PTK (ed) *Fish diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infection*. Cab International UK, p97.
- Lom J, Noble ER (1984). Revised classification of the Myxosporea Bütschli, 1881. *Folia Parasitologica* 31: 193-205.
- Lom J, de Puytorac P (1965). Observations sur l' ultrastructure des trophozoites de myxosporidies. *Compte Rendu de l' Academie des Sciences* 260: 2588-2590.

- Lom J, Dyková I, Fiest S (1989). Myxosporea-induced xenoma formation in pike (*Esox lucius* L.) renal corpuscles associated with *Myxidium lieberkunhi* infection. *European Journal of Protistology* 24: 271-280.
- Lom J, Dyková I, Lhotakova S (1983). Fine structure of *Sphaerospora renicola* Dyková and Lom 1982 a myxosporean from carp kidney and comments on the origin of pansporoblast. *Protistologica* 18: 489-502.
- MacConnell E, Smith CE, Hedrick RP, Speer CA (1989). Cellular inflammatory response of rainbow trout to the protozoan parasite that causes proliferative kidney disease. *Journal of Aquatic Animal Health* 1: 108-118.
- Mac Micking J, Xie QW, Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15: 323-350.
- Maeno Y, Nagasawa K, Sorimachi M (1993). *Kudoa intestinalis* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from the intestinal musculature of the striped mullet, *Mugil cephalus*, from Japan. *Journal of Parasitology* 79: 190-192.
- Marsden MJ, Secombes CJ (1997). The influence of vaccine preparation on the induction of antigen specific responsiveness in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 455-469.
- Markiw ME (1989). Portals of entry for salmonid whirling diseases in rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*. 6: 7-10.
- Markiw ME (1991). Whirling disease: earliest susceptible age of rainbow trout to the triactinomyxid of *Myxobolus cerebralis*. *Aquaculture* 1: 1-6.
- Markiw ME, Wolf K (1983). *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa, Myxosporea) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worms (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *Journal of Parasitology* 30: 561-564.

- McVicar AH (1997). Disease and parasite implications of the coexistence of wild and cultured Atlantic salmon populations. *ICES Journal of Marine Science* 54: 1093-1103.
- Mejiholm O, Dalgaard P (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34: 27.
- Merella P, Cherchi S, Salati F, Garippa G (2005). Parasitological survey of sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) reared in sea cages in Sardinia (western Mediterranean). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 25(4): 140-147.
- Mladineo I (2003). Myxosporidean infections in Adriatic cage-reared fish. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 23: 113-123.
- Molnár K (1993). Recent achievements in the chemotherapy of myxosporean infections of fish. *Acta Veterinaria Hungarica* 41:51-58
- Molnár K, Baska F, Szekely C (1987). Fumagillin an efficacious drug against renal sphaerosporosis of the common carp. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 187-190.
- Molnár K, Kovács-Gayer E (1986). Experimental induction of *Sphaerospora renicola* (Myxosporea) infection in common carp (*Cyprinus carpio*) by transmission of SB-protozoans. *Journal of Applied Ichthyology* 2: 86-94.
- Moran JDW, Whitaker DJ, Kent ML (1999α). A review of the myxosporean genus *Kudoa* and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture* 172: 163-196.
- Moran JDW, Whitaker DJ, Kent ML (1999β). Natural and laboratory transmission of the marine Myxozoan parasite *Kudoa thyrsites* to Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 11: 10-115.

- Mulero V, Meseguer J (1998). Functional characterization of a macrophage-activating factor produced by leucocyte of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 8: 143-156.
- Muñoz P, Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (2000α). Modulation of the in vitro activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Fish and Shellfish Immunology* 10: 567-581.
- Muñoz P, Sitjà-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (2000β). Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology* 120: 465-477.
- Murray CK, Fletcher TC (1976). The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology* 9: 329-334.
- Nakajima K, Egusa S (1978). *Kudoa pericardialis* n. sp. (Myxosporidae: Chloromyxidae) from cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel. *Fish Bulletin of the Japanese Society of scientific Fisheries* 44: 117-120.
- Nengas J, Alexis M, Koutsodimou M, Athanassopoulou F, Dotsika E, Karagouni E, Kourtis G, Rigos G (2000). Effects of diet composition on growth feed utilization and immune system of the sheephead bream (*Puntazzo puntazzo*). *Proceedings of 9th International symposium on nutrition and feeding in fish*. Miyazaki, Japan.
- Neumann NF (1999). *Regulation of antimicrobial mechanisms of macrophages of the goldfish (Carassius aurata L.)*. Ph.D. Thesis dissertation, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

- Neumann NF, Fagan D, Belosevic M (1995). Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 19: 473-482.
- Neuman NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense *Developmental and Comparative Immunology* 25: 807-825.
- Noble ER (1966). Myxosporidia in deepwater fishes *Journal of Parasitology* 52: 685-690.
- Odening K, Walter G, Bockardt I (1989). Zum Infektionsgeschehen bei *Sphaerospora renicola* (Myxosporidia). *Angew Parasitologia* 30: 131-140.
- Ortuño J, Esteban MA, Meseguer J (2000). Kinetics of hydrogen peroxide production during *in vitro* respiratory burst of sea bream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. *Fish and Shellfish Immunology* 10: 725-729.
- Osserman EF, Lawlor DP (1966). Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 124: 921.
- Padros F, Palenzuela O, Hispano C, Tosas O, Zarza C, Crespo S, Álvarez-Pellitero P (2001). *Myxidium leei* (Myxozoa) infections in aquarium-reared Mediterranean fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 47(1): 57-62.
- Padros F, Tort L, Crespo S (1996). Winter disease on the gilthead sea bream *Sparus aurata*: some evidences of a multifactorial etiology. In: Chatain B, Saroglia M, Sweetman J, Lavens P (eds) *International Workshop on*

“Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects”. Verona, Italy, pp. 305-307.

- Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P, Sitja-Bobadilla A (1999). Glomerular disease associated with *Polysporoplasma sparisi* (Myxozoa) infections in cultured gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Parasitology* 118: 245-126.
- Palenzuela O, Redondo JM, Álvarez-Pellitero P (2002). Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology* 124: 369-379.
- Palenzuela O, Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1997). *Ceratomyxa sparisaurati* (Protozoa: Myxosporidia) infections in cultured gilthead sea bream, *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei), from the Spain: aspects of the host-parasite relationship. *Parasitological Research* 83: 539-548.
- Paperna I (1982). *Kudoa* infection in the glomeruli, mesenteric and peritoneum of cultured *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases* 5: 539-543.
- Paperna I (1987). Solving parasite-related problems in cultured marine fish. *International Journal for Parasitology* 17: 327-336.
- Paperna I (1991). Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annual Review of Fish Diseases* 1:155-194.
- Paperna I (1998). Mariculture versus environment: risks and impacts. *Biologia Marina Mediterranea* 5: 381-389.
- Paperna I, Baudin-Laurencin F (1979). Parasitic infections of sea bass, *Dicentrarchus labrax* and gilthead sea bream, *Sparus aurata* in mariculture facilities in France. *Aquaculture* 16: 173-175.
- Pastoret PP, Griebel P, Basin H, Govaerts A (1998). *Handbook of vertebrate immunology*. Academic Press, London, pp. 673.

- Pellizzato M, Canzonier WJ (1985). *Kudoa* (Protozoa: Myxosporida) in flatfish of Venice Lagoon (Italy). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 5(2): 21-22.
- Příhoda J (1983). Experimental infection of rainbow trout fry with *Myxosoma cerebralis* Hoffer, 1903. *Proceedings of the first international symposium of ichthyoparasitology "Parasites and parasitic diseases of fish"*. Institute of Parasitology of the Czechoslovak Academy of Sciences, České Budejovice, Czechoslovakia, p. 98.
- Prockop DJ, Davidson WD (1964). A study of urinary and serum lysozyme in patients with renal disease. *New England Journal of Medicine* 270: 269.
- Raabe Z (1964). *Zarys Protozoologii* (An Outline of Protozoology), PWN, Warszawa.
- Radujkovic BM, Raibaut A (1989). Faune des parasites se poissons des côtes du Montenegro (Adriatique Sud). *Acta Adriatica* 30(1-2): 1-324.
- Rajendran KV, Vijayan KK, Alavandi SV (1998). Cardiac myxosporiosis of pearlspot, *Etroplus suratensis* (Bloch), due to *Myxobolus etroplis* sp. *Journal of Fish Diseases* 21: 169-176.
- Redondo JM, Palenzuela O, Rianza A, Macías Á, Álvarez-Pellitero P (2002). Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of Turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Parasitology* 88(3): 482-488.
- Reno PW (1998). Factors involved in the dissemination of diseases in fish population. *Journal of Aquatic Animals Health* 10: 160-171.
- Rigos G, Christophiligiannis P, Yiagnisi M, Andriopoulou A, Koutsodimou M, Nengas M, Alexis M (1999). Myxosporean infections in Greek mariculture. *Aquaculture International* 7: 361-364.

- Rigos G, Christophiligiannis P, Yiagnisi M, Andriopoulou A, Koutsodimou M, Nengas M, Alexis M (2000). Toxicity and digestibility of fumagillin DCH in gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Journal of Fish Diseases* 23(2): 161-164.
- Rigos G, Grigorakis K, Christophiligiannis M, Nengas I, Alexis M (1997). *Ceratomyxa* spp. (Myxosporea) infections in cultured common dentex from Greece. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 17:174-176.
- Roberts RJ (1989). *Fish pathology*. Bailliere, Tindall, London.
- Roberts RJ, Shepherd CJ (1997). *Handbook of trout and salmon diseases*. Fishing News Books, Oxford.
- Robertsen B (1999). Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 269-290.
- Roitt I, Brostoff J, Male D (1987). *Immunology*. Gower Medical Publishing, London, England.
- Rothwell JT, Virgona JL, Callinan RB, Nicholls PJ, Langdon JS (1997). Occurrence of cutaneous infections of *Myxobolus episquamalis* (Myxozoa: Myxobolidae) in sea mullet *Mugil cephalus*, in Australia. *American Veterinary Journal* 75(5): 349
- Roubal FR (1994). Histopathological and ecological aspects of *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea) infections in *Acanthopagrus australis* (Günther) (Pisces: Sparidae) from Moreton Bay, Australia. *Journal of Fish Diseases* 17: 495-512.
- Russell JB, Houlihan AJ (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 65-74.

- Sakiti N, Jacquemin D, Marques A (1994). Presence en Méditerranée occidentale d'une Myxosporidie histozoïque pathogène parasite du tube digestif de la daurade en aquaculture. *Poster GPLF*, Nice.
- Sakiti N, Tarer V, Jacquemin D, Marques A (1996). Présence en Méditerranée occidentale d'une Mixosporidie histozoïque pathogène dans les élevages du daurade, *Sparus aurata*. *Annales des Sciences Naturelles (Zoologie)* 17: 123-127.
- Saulnier D, de Kinkelin P (1996). Antigenic and biochemical study of PKX, the myxosporean causative agent of proliferative kidney disease of salmonid fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 27: 103-114.
- Schafer WE (1968). Studies on the epizootiology of the myxosporidan *Ceratomyxa chasta* Noble. *California Fishing Game* 54: 90-99.
- Schoor WP, Plum JA (1991). Induction of nitric oxide synthase in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by *Edwardsiella ictaluri*. *Diseases of Aquatic Organisms* 19: 153-155.
- Secombes CJ, Chappell LH (1996). Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. *Annual Review of Fish Diseases* 6: 167-177.
- Sign J, Lindenstrøm T, Buchmann K (2004α). The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 27: 409-417.
- Sign J, Lindenstrøm T & Buchmann K (2004β). Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish and Shellfish Immunology* 17: 75-86.

- Sitzà-Bobadilla A (1991). *Estudio de las parasitosis por Sphaerosporidae (Protozoa: Myxosporea: Bivalvulida) en la lubina (Dicentrarchus labrax L.)*. Ph.D. Thesis, Univesidad de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1992α). *Sphaerospora* (Myxosporea: Bivalvulida) infection in cultured gilt head sea bream, *Sparus aurata* L.: a preliminary report. *Journal of Fish Diseases* 15: 339-343.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1992β). Light and electron microscopic description of *Sphaerospora dicentrarchi* n. sp. (Myxosporea: Sphaerospora) from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Protozoology* 39: 273-281.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1992γ). Effect of fumagillin treatment on sea bass *Dicentrarchus labrax* parasitized by *Sphaerospora testicularis* (Myxosporea: Bivalvulida). *Diseases of Aquatic Organisms* 14: 171-178.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1993α). Pathology of Myxosporea in marine fish culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 17: 229-238.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1993β). Population dynamics of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitja-Bobadilla et Álvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitja-Bobadilla et Álvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) infections in wild and cultured Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Parasitological Research* 106: 39-45.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1993γ). Pathogenic effects of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitja-Bobadilla et Álvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitja-Bobadilla et Álvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: a light and electron microscopy study. *Parasitological Research* 106: 39-45.

- Sitjà-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1993). Light and electron microscopical description of *Ceratomyxa labralis* n. sp. and a redescription of *C. diplodae* (Myxosporae:Bivalvulida) from wild and cultured Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostei: Serranidae). *Systematic Parasitology* 26: 215-223.
- Sitja-Bobadilla A, Álvarez-Pellitero P (1995). Light and electron microscopic description of *Polysporoplasma* ng. (Myxosporea), *Polysporoplasma sparis* ns. and *Polysporoplasma mugilis* nsp. from *Liza aurata* L. *European Journal of Parasitology* 31: 77-89.
- Sivropoulou A, Papanicolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras Th, Arsenakis M (1996). Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1202-1205.
- Sovenyi JF (1992). Effects of fumagillin on the haemopoietic organs and susceptibility of common carp to erythrodermatitis. *Journal of Fish Diseases* 15: 255-260.
- Speare D, Athanassopoulou F, Daley J, Sanchez JG (1999). A preliminary investigation of alternatives to fumagillin for the treatment of *Loma salmonae* in rainbow trout. *Journal of Comparative Pathology* 121: 241-148.
- Stadnyk AW, Gauldie J (1991). The acute phase protein response during parasitic infection. In: Ash C, Gallagher RB. *Immunoparasitology Today*. Elsevier Trends Journals, Cambridge.
- Stafford J, Neumann NF, Belosevic M (1999). Inhibition of macrophage activity by mitogen-induced goldfish leukocyte deactivating factor. *Developmental and Comparative Immunology* 23: 585-596.
- Stehr C, Whitaker DJ (1986). Host parasite interaction of the myxosporeans *Kudoa paniformis* Kabata and Whitaker, 1981 and *Kudoa thyrsites* (Gilchrist,

- 1924) in the muscle of Pacific whiting, *Merluccius productus* (Ayers): an ultrastructural study. *Journal of Fish Diseases* 9: 505-517.
- Sunyer JO, Tort L (1995). Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45: 333-345.
 - Swearer SE, Robertson DR (1999). Life history, pathology, and description of *Kudoa ovivora* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea): An ovarian parasite of Caribbean labroid fishes. *Journal of Parasitology* 85: 337-353.
 - Szekely C, Molnár K, Baska F (1988). Efficacy of fumagillin against *Myxidium giardi* Ceppe, 1906 infection of the European eel (*Anguilla*): new observations on myxidiosis of imported glass eels. *Acta Veterinaria Hungarica* 36: 239-246.
 - Tafalla C, Novoa B (2000). Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology* 24: 623-631.
 - Tarer V, Sakiti N, Le Breton A, Marques A (1996). *Myxidium leei*, a pathogen myxosporidian for sparids in Mediterranean aquaculture. *Ichthyophysiological Acta* 9: 127-139.
 - Titus RG, Sherry B, Cerami A (1991). The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites. In: Ash C, Gallagher RB *Immunoparasitology Today*. Elsevier Trends Journals, Cambridge.
 - Tojo JL, Santamarina MT (1998a). Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. I. *Hexamita salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 51-56.

- Tojo JL, Santamarina MT (1998β). Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. II. *Gyrodactylus* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 187-193.
- Tojo JL, Santamarina MT (1998γ). Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. III. *Ichthyobodo necator*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33: 195-199.
- Uspenskaya AV (1978). Biological features of the spore stage of *Myxosoma cerebralis* (Myxosporidia: Myxosomatidae). *Parazitologiya* 12: 15-20 (In Russian).
- Uspenskaya AV (1982). New data on the life cycle and biology of Myxosporidia. *Archiv für Protistenkunde* 126: 309-338.
- Uspenskaya AV (1984). *Cytology of Myxosporidia* (in Russian). Nauka Publishing House, Leningrad, 122p.
- Valtonen ET, Koskivaara M (1994). Relationships between the parasites of some wild and cultured fishes in two lakes and a fish farm in central Finland. *International Journal for Parasitology* 24: 109-118.
- Ventura MT, Paperna I (1984). Histopathology of *Myxidium giardi* Cepede, 1906 infection in European eels, *Anguilla anguilla* L., in Portugal. *Aquaculture* 43: 357-368.
- Vignali AD, Quentin DB, Taylor MG (1989). Immunity to *Schistosoma mansoni* in vivo: contradiction or clarification? *Immunology Today* 10: 410-416.
- Wahli T, Verlhac V, Gabaudan J, Schuep W, Meier W (1998). Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and diseases resistance

- of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 21: 127-137.
- Walliker D (1968). Studies on *Myxidium oviforme*, a myxosporidian parasite of Irish salmon, *Salmo salar*. *Parasitology* 58: 839-844.
 - Wang R, Shen Q, Neumann NF, Belosevic M (1995). Establishment and characterization of a macrophage cell line from the gold-fish. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 329-346.
 - Weeks BA, Keisler AS, Warinner JE, Mathews ES (1998). Preliminary evaluation of macrophage pinocytosis as a technique to monitor fish health. *Marine Environmental Research* 22: 205.
 - Weeks BA, Warinner JE, Mason PL, McGinnis DS (1986). Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages. *Journal of Fish Biology* 28: 653-658.
 - Weidner E, Overstreet RM (1979) Sporogenesis of a myxosporidian with motile spores. *Cell and Tissue Research* 201: 331-342.
 - Whitaker DJ, Kent ML (1991). Myxosporean *Kudoa thyrsites*: A Cause of Soft Flesh in Farm-Reared Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 3: 291-294.
 - Whitaker DJ, Kent ML, Sakanari JA (1996). *Kudoa miniauriculata* n. sp. (Myxozoa, Myxosporae) from the musculature of Bocaccio (*Sebastes paucispinis*) from California. *Journal of Parasitology* 82(2): 312-315.
 - Wishkovsky JG, Groff JM, Lauren D, Toth RJ, Hedrick R (1990). Efficacy of fumagillin against proliferative kidney disease and its side effects in rainbow trout fingerlings. *Fish Pathology* 25: 141-146.
 - Wolf K, Markiw ME (1984). Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225: 1449-1452.

- Woo PTK (1996). Protective immune response of fish to parasitic flagellates. *Annual Review of Fish Diseases* 6:121-131.
- Woo PTK (2001). Cryptobiosis and its control in North American fishes. *International Journal of Parasitology* 31: 566-574.
- Wyatt EJ (1978). Studies on the epizootiology of *Myxobolus insidiosus* Wyatt and Pratt, 1963 (Protozoa: Myxosporida). *Journal of Fish Diseases* 1: 233-240.
- Yamaguti S (1963). *Systema Helminthum* Vol. I-II. Interscience Publishers, New York.
- Yano T (1996). The nonspecific immune system: humoral defense. In: G Iwama & T Nakanishi (eds) *The fish immune system: organism pathogen and environment*. Academic Press, San Diego, pp. 105-107.
- Yin Z, Lam TJ Sin YM (1997). Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish *Clarias gariepinus*, as a defense against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 93-104
- Yokoyama H (1993). *Studies on the life cycle of some myxosporeans*. Ph.D. Thesis, The University of Tokyo, Tokyo.
- Yokohama H (2005). Pathology associated with cardiac infection with *Henneguya* spp. in marine fishes. *Proceedings of the 12th EAFP International Conference*, Copenhagen.
- Yokohama H, Itoh N, Tanaka S (2005). *Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 28(8): 479-487.
- Yokoyama H, Kawakami H, Yasuda H, Tanaka S (2003). *Henneguya lateolabracis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporidia), the causative agent of cardiac

henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. *Fisheries Science* 69: 1116-1120.

- Yokoyama H, Liyanage YS, Sugai A, Wakabayashi H (1999). Efficacy of fumagillin against haemorrhagic thelohanellosis caused by *Thelohanellus hovorkai* (Myxosporidia: Myxozoa) in coloured carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases* 22: 243-245.
- Yokoyama H, Masuda K (2001). *Kudoa* sp. (Myxozoa) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific giant octopus *Paroctopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 21(6): 266-268.
- Yokoyama H, Ogawa K, Wakabayashi H (1990). Chemotherapy with fumagillin and toltrazuril against kidney enlargement disease of goldfish caused by myxosporean *Hoferellus carassii*. *Fish Pathology* 25: 157-163.
- [http¹ : http://www.fao.org](http://www.fao.org)
- [http² : http://www.wetlands.org/RDB/Ramsar_Dir/Greece/Gr009d99.txt](http://www.wetlands.org/RDB/Ramsar_Dir/Greece/Gr009d99.txt)
- [http³ : http://www.ac-nantes.fr/peda/disc/svt/euroforum/actionpz.htm](http://www.ac-nantes.fr/peda/disc/svt/euroforum/actionpz.htm)