

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Διαχειριστικές πρακτικές στις ιχθυοκαλλιέργειες
μέσω προληπτικής ανίχνευσης ασθενειών»**

Θεόδωρος Καρατζίνος

ΒΟΛΟΣ 2012

«Διαχειριστικές πρακτικές στις ιχθυοκαλλιέργειες μέσω προληπτικής ανίχνευσης ασθενειών»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Μόνιμη Επίκουρος Καθηγήτρια, Υδατοκαλλιέργειες, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπουσα***,

2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,

3) Νικόλαος Νεοφύτου, Λέκτορας, Υδατοκαλλιέργειες και Περιβάλλον, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα της εργασίας αυτής, κα Παναγιώτα Παναγιωτάκη, Μόνιμη Επίκουρη Καθηγήτρια για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο, Μόνιμο Επίκουρο Καθηγητή και κ. Νικόλαο Νεοφύτου, Λέκτορα για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Επίσης, τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας για την χορήγηση των ψαριών που αποτέλεσαν το δείγμα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους υποψήφιους Διδάκτορες κ. Ε. Μαλανδράκη και κ. Π. Μαρτσικάλη καθώς και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κα. Ο. Ντανταλή και για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *E. leei* είναι ένα σημαντικό μυξοσπορίδιο παράσιτο που προκαλεί δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις στην εκτροφή ψαριών της οικογένειας Sparidae στη Μεσόγειο. Από το 1995, που η εντερομύξωση αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα προέκυψε το ερώτημα για τη βιωσιμότητα της εκτροφής της χιόνας εξαιτίας των υψηλών θνησιμοτήτων που προκαλεί στο συγκεκριμένο είδος. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση της σημασίας της συστηματικής ιχθυοπαθολογικής παρακολούθησης για την έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης καθώς επίσης και η ανάπτυξη και εφαρμογή μίας αξιόπιστης διαγνωστικής μοριακής τεχνικής προκειμένου η διάγνωση να επιτευχθεί εγκαίρως. Το πείραμα ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2010 και ολοκληρώθηκε τον Αύγουστο του ίδιου έτους. Οι δειγματοληψίες ήταν μηνιαίες και κάθε μήνα συλλέγονταν 20 χιόνες τυχαία από τον ίδιο κλωβό. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία του νερού και οι θνησιμότητες, καταγράφονταν καθημερινά. Στα ψάρια πραγματοποιήθηκε παρασιτολογική εξέταση με σκοπό την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της παρασίτωσης τόσο με κλασικές όσο και με σύγχρονες μοριακές τεχνικές. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι το παράσιτο είναι δυνατό να προσβάλει ψάρια πολύ μικρού μεγέθους (M.B.: 2g). Η εντερομύξωση είναι ασθένεια που εμφανίζεται την άνοιξη και παρουσιάζει έξαρση το καλοκαίρι. Το αρχικό στάδιο της παρασίτωσης θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό στην εξέλιξη και στον έλεγχο της παρασίτωσης και όπως αποδείχθηκε συμπίπτει χρονικά με την ένταξη των ψαριών στην πάχυνση. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην εμφάνιση της εντερομύξωσης είναι καθοριστική επηρεάζοντας την έξαρσή της ασθένειας, η εξέλιξη της οποίας είναι ραγδαία. Το μέγιστο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε τον Ιούλιο (45%) σε

θερμοκρασία νερού 24 °C και το μέγιστο ποσοστό θνησιμότητας τον Αύγουστο (19%) σε θερμοκρασία νερού 25,5 °C. Από τη σύγκριση των δύο τεχνικών που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση του παρασίτου προέκυψε ότι η χρήση της μοριακής τεχνικής (qPCR) δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης της ασθένειας σε πολύ πρώιμα στάδια, πολύ νωρίτερα από την κλασική παρασιτολογική εξέταση, δίνοντας πιο αξιόπιστα αποτελέσματα για το ποσοστό προσβολής. Η qPCR αποτελεί ένα σημαντικό και αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του *E. leei* στα αρχικά στάδια εξέλιξής του, που συνεισφέρει στην ορθή ιχθυοκαλλιεργητική πρακτική. Έτσι η συστηματική ιχθυοπαθολογική παρακολούθηση με τη χρήση μίας αξιόπιστης μοριακής διαγνωστικής τεχνικής (qPCR) εξασφαλίζουν τον απαιτούμενο χρόνο προκειμένου να ληφθούν τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα που θα περιορίσουν τις θνησιμότητες της εκτρεφόμενης χιόνας μειώνοντας τις δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις της εντερομύξωσης και αυξάνοντας την παραγωγική δυναμική του συγκεκριμένου είδους.

Λέξεις κλειδιά: εντερομύξωση, χιόνα, έγκαιρη διάγνωση, qPCR

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Παθολογικά προβλήματα στα εκτρεφόμενα ψάρια.....	1
1.2 Τα μυξοσπορίδια	2
1.3 <i>E. ileyi</i> - Επιδημιολογία, κλινικά συμπτώματα, παθολογία, πρόληψη και θεραπεία.....	3
1.4 Η σημασία της διάγνωσης	7
1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	8
1.6 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Διατριβής.....	11
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	12
2.1 Πειραματικά ψάρια.....	12
2.2 Θερμοκρασιακό προφίλ του νερού κατά τη διάρκεια του πειράματος.....	13
2.3 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών	14
2.4 Ανίχνευση παρασίτων.....	15
2.4.1 Μακροσκοπική και νεκροσκοπική εξέταση.....	15
2.4.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	16
2.4.2.1 Εξέταση νωπών παρασκευασμάτων	16
2.4.2.2 Μοριακές τεχνικές.....	20
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1 Μακροσκοπική και νεκροσκοπική εξέταση.....	32
3.2 Παρασιτολογική εξέταση.....	33
3.2.1 Εκτίμηση του ποσοστού προσβολής από το <i>E. ileyi</i> μετά από παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων.....	34
3.2.2 Εκτίμηση του ποσοστού προσβολής από το <i>E. ileyi</i> με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.....	35

VII

3.2.3. Συγκριτική εκτίμηση του ποσοστού προσβολής από το <i>E. leei</i> όπως προέκυψε από τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων και την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.....	36
3.2.4. Εκτίμηση της έντασης της εντερομύξωσης μετά από παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων.....	37
3.2.5. Εκτίμηση της έντασης της εντερομύξωσης με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.....	38
3.2.6. Συγκριτική εκτίμηση της έντασης της εντερομύξωσης όπως προέκυψε από τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων και την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.....	39
3.3 Ποσοστό θνησιμότητας.....	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
4.1 Μελέτη του παρασιτικού φορτίου εντατικά εκτρεφόμενης χιόνας.....	41
4.2 Προσδιορισμός του κατάλληλου χρόνου για να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση.....	43
4.3 Επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στην εξέλιξη της εντερομύξωσης.....	44
4.4 Εφαρμογή μίας αξιόπιστης διαγνωστικής τεχνικής.....	47
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	51
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52
7. ABSTRACT.....	58

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Παθολογικά προβλήματα στα εκτρεφόμενα ψάρια

Την τελευταία 35ετία, έχει αναπτυχθεί στον Ευρωπαϊκό και ιδιαίτερα στο Μεσογειακό χώρο, μεγάλο ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες κάθε τύπου και μορφής και ιδιαίτερα τα τελευταία 25 χρόνια, για τις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες. Η Ελλάδα είναι πρώτη σε παραγωγή λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax* L.) και τσιπούρας (*Sparus aurata* L.) με περισσότερες από 200 μονάδες εκτροφής ενώ, σε πολλές μονάδες της Ελλάδας είναι πλέον εφαρμοσμένη ικανοποιητικά η εντατική εκτροφή νέων ειδών όπως το μυτάκι ή χιόνα (*Diplodus puntazzo* C.), το φαγκρί (*Pagrus pagrus* L.), ο σαργός (*Diplodus sargus* L.), η συναγρίδα (*Dentex dentex* L.), το λιθρίνι (*Pagehus erithrinus* L.) και η γλώσσα (*Solea solea* L.).

Τη ραγδαία όμως ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών ακολούθησε η εμφάνιση παθολογικών προβλημάτων, τα οποία δυσκολεύουν την ομαλή ανάπτυξη των ψαριών κυρίως στα στάδια της προπάχυνσης και της πάχυνσης (κλωβοί), όπου 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 θαλασσινά ψάρια (Alvarez – Pellitero & Sitjà-Bobadilla 1993, Sakiti *et al.* 1994, Alvarez – Pellitero 1995, Abella & Le Breton 1996, Αθανασοπούλου και συν. 1998, Rigos *et al.* 1999) όσο και σε ψάρια γλυκών υδάτων (El-Matbouli *et al.* 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 & Noble 1984, Paperna 1991).

1.2 Τα μυξοσπορίδια

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 να προκαλέσουν εκτεταμένες αλλοιώσεις και θνησιμότητες (Jadwiga 1991). 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 σε 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). Πολλά είδη μυξοσποριδίων έχουν ανιχνευθεί στους ιστούς και την περιτοναϊκή κοιλότητα ψαριών των γλυκών, υφάλμυρων και αλμυρών νερών (Lom & Dykoná 1995). Τα κυριότερα μυξοσπορίδια των μεσογειακών ειδών που έχουν βρεθεί, καθώς και τα είδη ξενιστών και τα όργανα ανεύρεσής τους φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Τα κυριότερα μυξοσπορίδια παράσιτα των μεσογειακών ειδών (Γκολομάζου 2007)

Είδος Παράσιτου	Είδος Ψαριού Ξενιστή
<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.
<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
<i>Sphaerospora</i> sp.	<i>Dicentrarchus labrax</i> L. <i>Sparus aurata</i> L.
<i>Polysporoplasma sparis</i>	<i>Sparus aurata</i> L. <i>Diplodus puntazzo</i> C.
<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.
<i>Kudoa</i> sp.	<i>Diplodus sargus</i> C. <i>Dicentrarchus labrax</i> L. <i>Sparus aurata</i> L. <i>Pagellus acarne</i> R.
<i>Henneguya</i> sp.	<i>Diplodus puntazzo</i> C. <i>Sparus aurata</i> L.
<i>Leptotheca sparidarum</i> n sp.	<i>Dentex dentex</i> L. <i>Sparus aurata</i> L.

1.3 *E. leei* - Επιδημιολογία, κλινικά συμπτώματα, παθολογία, πρόληψη και θεραπεία

Η παρασίτωση με *E. leei* είναι μία ασθένεια η οποία είναι υπεύθυνη για σημαντικές απώλειες στις Μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες. Στην τσιπούρα και στη χιόνα έχει αποδειχθεί ότι ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου είναι άμεσος, από ψάρι σε ψάρι, μάλλον μέσω μορφών που μεταδίδονται μέσω του νερού (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrot 1997, Golomazou *et al.* 2006a). 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 καθιστούν το είδος αυτό ασύμφορο για εντατική καλλιέργεια. Στον Πίνακα 2 φαίνεται η παραγωγή της χιόνας από το 2000 έως το 2009 (FAO 2009). Το 1997 επιδημία της μυξοσποριδίασης αυτής παρουσιάστηκε για δεύτερη φορά, προκαλώντας απώλειες σε χιόνα και τσιπούρα που έφτασαν το 80% της παραγωγής (πάχυνσης) της χιόνας στην Ελλάδα. Τα ποσοστά θνησιμότητας από *E. leei* συνήθως αυξάνονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 22°C και μειώνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C (Rigos *et al.* 1999). Ειδικά σε μικτές, ταυτόχρονες μολύνσεις με τα μυξοσπορίδια *Ceratomyxa diplodae* και *E. leei* η θνησιμότητα είναι πολύ μεγάλη στη χιόνα και στην τσιπούρα (Rigos *et al.* 1999). Μετά τις επιδημίες αυτές, σε επόμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από το 1998 μέχρι το 2001, βρέθηκε ότι το ποσοστό μόλυνσης 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, πάντως, θνησιμότητες λιγότερες από αυτές των προηγούμενων ετών (1995-1997).

Πίνακας 2. Παραγωγή χιόνας (t) από το 2000 έως το 2009 (FAO 2009)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Κροατία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Κύπρος	52	64	11	1	-	-	-	-	-	-
Ιταλία	400	400	-	400	-	-	-	159	50	48
Σλοβενία	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Συνολική Ποσότητα	452	464	11	401	-	-	-	159	50	51

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 και η υψηλή σε λιπαρά διατροφή είναι ένας πολυσυζητημένος πιθανός προδιαθετικός παράγοντας (Nengas *et al.* 2000). Επίσης, το μέγεθος του ψαριού είναι πιθανό να σχετίζεται με την εκδήλωση της ασθένειας αφού τα μικρά ιχθύδια χιόνας (20-85g) θεωρούνται πιο ευαίσθητα.

Στις περιπτώσεις μολύνσεων από το μυξοσπορίδιο *E. leei*, εξωτερικά, τα ψάρια παρουσιάζουν απίσχναση και χαρακτηριστική περιγεγραμμένη αλλοίωση με απώλεια λεπιών στην ραχιαία και πλευρική επιφάνεια του σώματος. Επίσης, το έντερο παρουσιάζει διάταση και πολτώδες τυροειδές περιεχόμενο και η χοληδόχος κύστη είναι επίσης διατεταμένη, ενώ το ήπαρ παρουσιάζει ελαφρύ αποχρωματισμό. Ανώριμες μορφές έχουν παρατηρηθεί σε ξέσματα από τον εντερικό βλεννογόνο, ενώ ώριμοι σπόροι του παρασίτου βρέθηκαν να παρασιτούν στο έντερο, το 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 (Athanassopoulou *et al.* 1999, Golomazou *et al.* 2006a). Τα μολυσμένα ψάρια παρουσιάζουν απίσχναση με διογκωμένες χοληδόχους κύστες και διογκωμένο κοιλιακό τοίχωμα. Περιστασιακά έχει παρατηρηθεί αποχρωματισμένο και πρασινωπό ήπαρ με εμφανή σημάδια λιπώδους εκφύλισης. Στα σπλάχνα των περισσότερων μολυσμένων ψαριών παρατηρούνται σημαντικές ποσότητες λίπους (Rigos *et al.* 1999).

Στα προσβεβλημένα ψάρια, τα μυξοσπορίδια παράσιτα του είδους *E. leei* προκαλούν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στο έντερο, στη χοληδόχο κύστη, στο ήπαρ και στα βράγχια, όπου ώριμοι σπόροι και αρχικά στάδια του παρασίτου προκαλούν

απόπτωση του επιθηλίου με εκτεταμένη νέκρωση και τοπική αιμορραγία (Diamant 1992, Diamant *et al.* 1994, Diamant 1997, Diamant & Wajsbrodt 1997, Athanassopoulou *et al.* 1999, Rigos *et al.* 1999). Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί εκτεταμένη απόρριψη του επιθηλίου και ταυτόχρονα αύξηση των εωσινόφιλων κυττάρων του εντερικού τοιχώματος. Στις περιπτώσεις μικτής μόλυνσης με *C. diplodae*, έχουν παρατηρηθεί στον εντερικό βλεννογόνο, εκτεταμένες φλεγμονώδεις αλλοιώσεις κοκκιωματώδους φύσης, οι οποίες εμπεριείχαν λεμφοκύτταρα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα (Αθανασοπούλου και συν. 1998).

Η θεραπεία των μυξοσποριδίων είναι δύσκολη (Molnar 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 παρασίτου, το οποίο θα πρέπει να διαγνωσθεί έγκαιρα και σωστά από ειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό και να εκτιμηθεί αν πρόκειται για πρωτογενές ή δευτερογενές αίτιο. Η fumagillin (και τα ανάλογά της) είναι ένα αποδεδειγμένα αποτελεσματικό φάρμακο στη θεραπεία μικροσποριδιακών και μυξοσποριδιακών μολύνσεων (Molnar *et al.* 1987, Higgings & Kent 1988, Hedrick *et al.* 1988, Kent & Dawe 1994). Για το παράσιτο *E. leei* έχουν χρησιμοποιηθεί πειραματικά διάφορα θεραπευτικά σκευάσματα (Λύτρα 1997, Athanassopoulou *et al.* 1999, Karagouni *et al.* 2005). Η πειραματική εφαρμογή fumagillin ενάντια στη μυξοσποριδίαση θεωρείται ότι μειώνει τις απώλειες των ψαριών, αν και η πιο αποτελεσματική θεραπευτική αγωγή θεωρείται ο συνδυασμός amprolium - salinomycin (Golomazou *et al.* 2006b).

Πρωταρχικό ρόλο για την εφαρμογή οποιασδήποτε θεραπευτικής αγωγής έχει η σωστή και έγκαιρη διάγνωση. Πριν την εφαρμογή κάποιας θεραπείας, η φυσική κατάσταση των ψαριών θα πρέπει να εξεταστεί και η πρωτογενής ή δευτερογενής

σημασία του παθογόνου παράγοντα να εκτιμηθεί. Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνονται κάποια προληπτικά μέτρα τα οποία θα μειώνουν όσο το δυνατόν, τον κίνδυνο μετάδοσης της παρασίτωσης. Πρέπει επίσης να γίνεται μηνιαίος παρασιτικός έλεγχος στα ευαίσθητα είδη για να αρχίσει έγκαιρα προληπτική θεραπεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μη ειδική πρόληψη (χαμηλές ιχθυοφορτίσεις, σωστή και ισορροπημένη διατροφή και τάισμα, σχολαστικά μέτρα υγιεινής) μειώνουν πολύ την εμφάνιση των παρασιτώσεων. Η χρήση των ανοσοενισχυτικών επίσης βελτιώνει την κατάσταση σημαντικά (Athanasopoulou 2001).

1.4 Η σημασία της διάγνωσης

Η έγκαιρη ταυτοποίηση του παθογόνου παράγοντα με τη χρήση γρήγορων, αξιόπιστων και με μεγάλη ευαισθησία διαγνωστικών μεθόδων φαίνεται να αποτελεί το καλύτερο προληπτικό μέτρο αντιμετώπισης των ασθενειών σε οποιοδήποτε στάδιο της εκτροφής. Ο περιοδικός προληπτικός συστηματικός ιχθυοπαθολογικός έλεγχος σε κρίσιμα σημεία της παραγωγής και σαφέστατα σε κάθε περίπτωση εισερχόμενων βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων στην εκμετάλλευση κρίνεται μείζονος σημασίας. Οι επιστήμονες σήμερα έχουν στη διάθεσή τους αρκετά εργαλεία για να επιτύχει μία έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιήσει κάποια από τις συμβατικές τεχνικές όπως είναι η βακτηριολογική, η παρασιτολογική και η ιστοπαθολογική εξέταση, η νεκροψία και οι διάφορες βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές. Επίσης, μπορεί ανάλογα με την περίπτωση να χρησιμοποιήσει επικουρικά ή αυτόνομα μοριακές τεχνικές όπως αυτές που βασίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων ακολουθιών γενετικού υλικού ή ανοσολογικών παραμέτρων. Ωστόσο σε κάθε περίπτωση μεγάλη σημασία έχει η χρήση εκείνης που προσφέρει την

ακριβέστερη διάγνωση με τα δεδομένα χρονικά περιθώρια και που είναι φυσικά οικονομικά συμφέρουσα. Η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση προϋποθέτει στενή συνεργασία με τα στελέχη των μονάδων υδατοκαλλιεργειών, άρτια τήρηση στοιχείων προηγούμενων περιστατικών, εμπειρία και συνεργασία με ειδικευμένα παθολογικά εργαστήρια. Η θεραπευτική αντιμετώπιση αιτιολογική ή συμπτωματική, έρχεται να μειώσει τον αριθμό των παθογόνων και να ελέγξει την έκταση των θνησιμοτήτων στον ιχθυοπληθυσμό. Συχνά όμως αποτυγχάνει όταν δε συνοδεύεται από τους κατάλληλους ιχθυοκαλλιεργητικούς χειρισμούς που αρκετές φορές αποτελούν το αρχικό αίτιο του περιστατικού. Η εφαρμοσμένη έρευνα στη βιολογία, στη διατροφή και στην ιχθυοπαθολογία των εκτρεφόμενων ειδών είναι σε πρωτογενές επίπεδο σε σχέση με την έρευνα στη βιολογία και στην παθολογία άλλων παραγωγικών ζώων και υπολείπεται πολύ της εξέλιξης της έρευνας της παθολογίας του ανθρώπου. Νέες τεχνικές όμως εφαρμόζονται συνεχώς και το επίπεδο της έρευνας αναβαθμίζεται αλλά όχι με ικανοποιητικούς ρυθμούς για να υποστηρίξει την αλματώδη ανάπτυξη του κλάδου σε παραγωγικό επίπεδο (Πράπας και συν. 2000).

1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Στις μέρες μας πλήθος ερευνητικών ομάδων, χρησιμοποιώντας προηγμένες μεθόδους της μοριακής βιολογίας, ασχολούνται με την αποκωδικοποίηση του γενετικού κώδικα των οργανισμών και τη δημιουργία τραπεζών γενετικού υλικού και γενετικών βιβλιοθηκών. Άλλοι τόσοι όμως ασχολούνται με την εξέλιξη τεχνικών που κάνουν τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση του γενετικού υλικού ευκολότερη. Έτσι σήμερα πολλά από τα παθογόνα των ιχθύων μπορούν να διαπιστωθούν γρήγορα, με ακρίβεια και υψηλή ευαισθησία.

Η PCR χωρίς υπερβολή έφερε μια πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία και στον τρόπο που μελετάται το DNA, μετά από το 1995 που παρουσιάστηκε από τον Karry Mullis, ενώ ο ίδιος τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ το 1993.

Είναι μία σχετικά γρήγορη και πολύ ακριβής μέθοδος πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού και ειδικά μικρών τμημάτων DNA που σε άλλη περίπτωση θα ήταν αδύνατη η μελέτη τους.

Ο πλήρης κύκλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία στάδια:

1. Την αποδιάταξη του DNA (denaturation)
2. Τη προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing)
3. Την επιμήκυνση των εκκινητήρων (extension)

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες. Αρχικά το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C σε δυο μονόκλινα τμήματα. Στη συνέχεια οι εκκινητές (primers) σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από την Taq-πολυμεράση παρουσία των τεσσάρων δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται 30-40 φορές, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την *in vitro* σύνθεση του DNA, καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό περισσότερων από 1 δισεκατομμύριο ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητών απόσταση. Σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται.

Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος, έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα. Μικροποσότητες RNA μπορούν να πολλαπλασιαστούν με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα μεταγραφούν σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR - reverse transcription PCR) (Koo & Jaykus 2000). Έτσι μπορούμε να βγάλουμε χρήσιμα συμπεράσματα ακόμη και από ανάλυση RNA. Παραλλαγές της PCR μπορούμε να πούμε ότι μας κατακλύζουν. Μια από αυτές είναι η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR). Η μέθοδος αυτή εκτός από την εντόπιση συγκεκριμένου γονιδιακού τόπου, μας δίνει εικόνα και για την ποσότητα του συγκεκριμένου γονιδιώματος που έχουμε στο δείγμα (Shariff *et al.* 2000). Μας δίνει δηλαδή τη δυνατότητα τόσο για ποιοτική όσο και για ποσοτική εκτίμηση του δείγματος.

Η όλη διαδικασία των κύκλων και της αυξομείωσης της θερμοκρασίας για τα απαιτούμενα χρονικά διαστήματα προγραμματίζεται και πραγματοποιείται από τους θερμικούς κυκλοποιητές (PCR thermal cyclers). Επίσης, είναι πολύ σημαντικό να έχουν καθοριστεί επακριβώς από τον ερευνητή οι χημικές συνθήκες υπό τις οποίες θα γίνει ο πολλαπλασιασμός του DNA, καθώς και να έχει γίνει σωστή σύνθεση και σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων που θα ξεκινήσουν την αντίδραση (εκκινητές ή DNA primers) τα οποία πρέπει να έχουν έτσι σχεδιαστεί ώστε να είναι απόλυτα συμπληρωματικά στα άκρα των γονιδιακών τόπων που μας ενδιαφέρουν.

Από τη στιγμή που θα πολλαπλασιαστούν τα τμήματα του DNA, μπορούν να σημανθούν και να ανιχνευθούν με πολλές εργαστηριακές τεχνικές (Tijssen 1993). Τα ραδιοϊσότοπα ήταν κάποτε ο κανόνας, αλλά για λόγους ασφαλείας αντικαταστάθηκαν με άλλες. Υπάρχουν μέθοδοι σήμανσεως για κάθε πιθανή εφαρμογή και οι ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται, πέραν του βρωμιούχου αιθιδίου, είναι η βιοτίνη, η

διοξυγενίνη και η ανίχνευση με τη βοήθεια αντισωμάτων που έχουν σημαστεί με τη βοήθεια φθορίζουσών, φωτοχημικών, χρωματογραφικών τεχνικών.

Η PCR είναι πλέον μια τεχνική ρουτίνας και οι πρακτικές της εφαρμογές άπειρες (Paabo *et al.* 1989). Πάρα πολλές είναι επίσης και οι παραλλαγές της μεθόδου για την επίτευξη διαφορετικών στόχων.

1.6 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Διατριβής

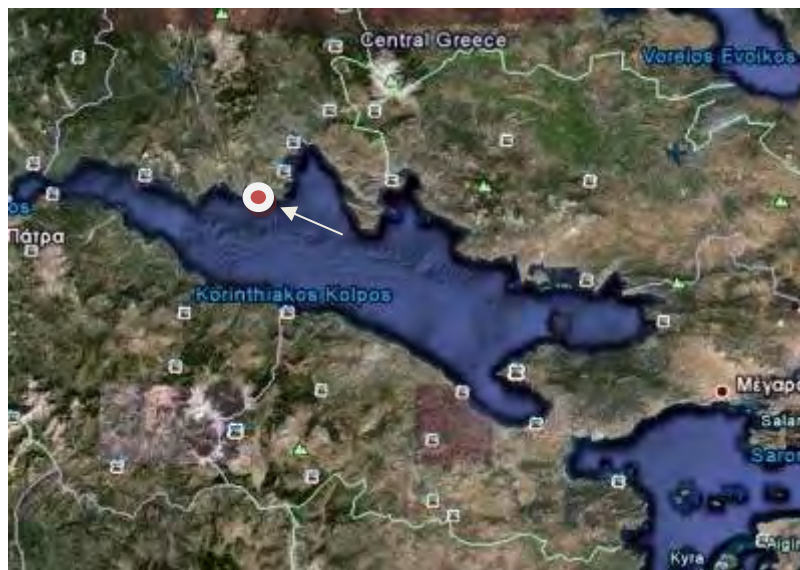
Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έχει ως σκοπό:

- Τη διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στην εξέλιξη της παρασίτωσης από το παράσιτο *E. leei*.
- Την ανάπτυξη και εφαρμογή μίας αξιόπιστης διαγνωστικής μοριακής τεχνικής για την έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης και τον προσδιορισμό της έντασης της παρασίτωσης και σύγκρισή της με την κλασική παρασιτολογική τεχνική.
- Την αξιολόγηση της σημασίας της συστηματικής ιχθυοπαθολογικής παρακολούθησης μίας μονάδας πάχυνσης εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών για την έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης σε χιόνια.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικά ψάρια

Στην παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε ψάρια από μία μονάδα εκτροφής στη βόρεια ακτή του κορινθιακού κόλπου (Εικ. 1), με ιστορικό στην παρασίτωση από το παράσιτο *E. leei*.

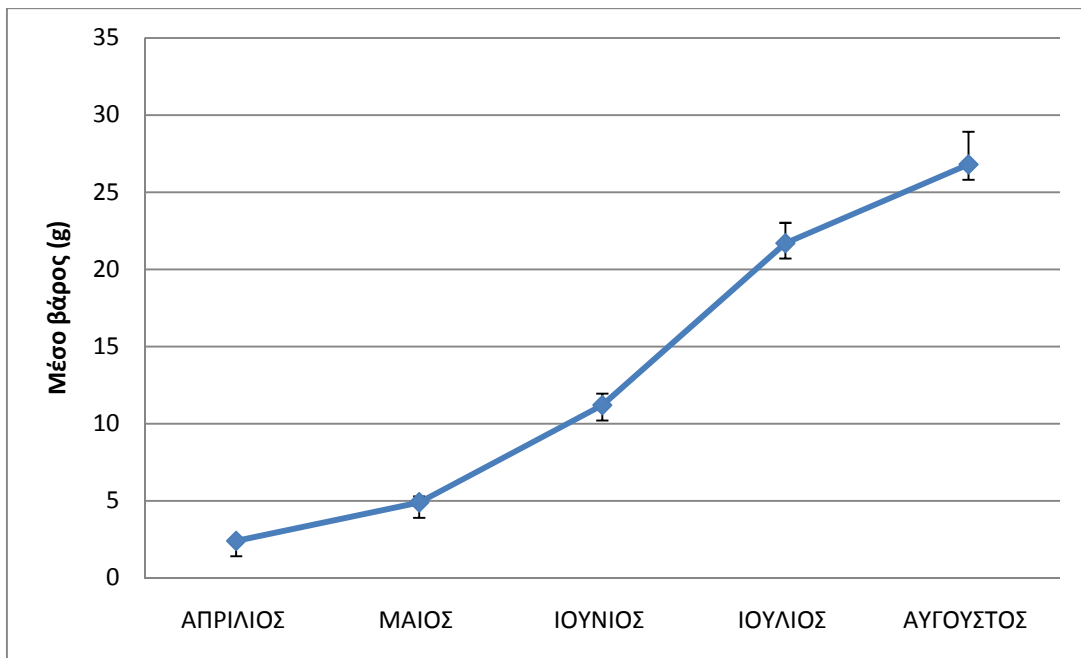


Εικόνα 1. Περιοχή δειγματοληψίας

Το είδος του ψαριού στο οποίο έγιναν οι πειραματισμοί ήταν η χιόνα και επιλέχθηκε ως το πιο ευπαθές στη συγκεκριμένη ασθένεια, αφού σε αυτό έχουν αναφερθεί οι μεγαλύτερες θνησιμότητες εξαιτίας του μυξοσποριδίου *E. leei*. Τα συγκεκριμένα ψάρια εισήχθησαν στην πάχυνση στις 26 Μαρτίου του 2010. Πριν την είσοδό τους στην πάχυνση στα ψάρια έγινε ιχθυοπαθολογικός έλεγχος προκειμένου να διαπιστωθεί ότι είναι απαλλαγμένα από παθογόνους οργανισμούς, σύμφωνα με την

εφαρμοζόμενη ορθή πρακτική. Τα ψάρια ταΐζονταν καθημερινά με σύμπηκτα κατάλληλα για χιόνες.

Τα ψάρια τα οποία αποτέλεσαν το δείγμα εισήχθησαν στην πάχυνση σε βάρος 2g λίγο πριν την έναρξη των δειγματοληψιών. Στη διάρκεια του πειράματος το βάρος των ψαριών αυξήθηκε σταδιακά από $2,4 \pm 0,21g$ τον Απρίλιο, σε $26,8 \pm 2,11g$ τον Αύγουστο. Στο Σχήμα 1 φαίνεται η μεταβολή του μέσου βάρους των ψαριών κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών.

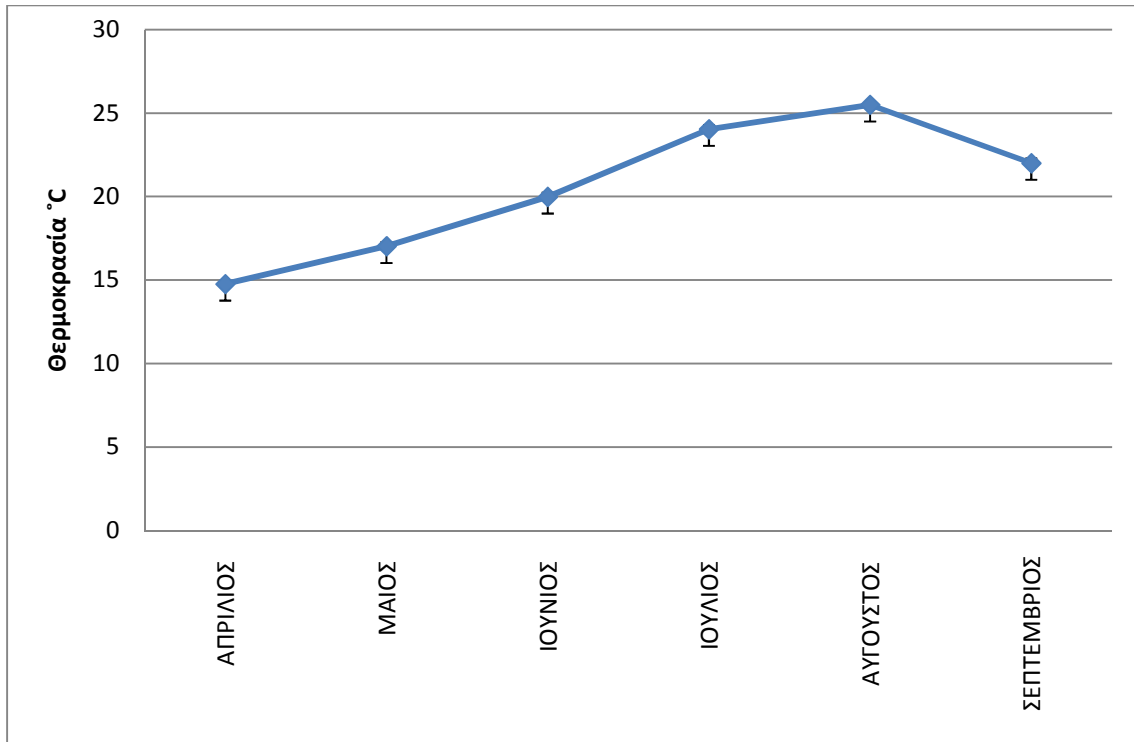


Σχήμα 1. Εξέλιξη του μέσου βάρους των ψαριών κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών

2.2 Θερμοκρασιακό προφίλ του νερού κατά τη διάρκεια του πειράματος

Κατά τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία του νερού καταγράφονταν καθημερινά. Στο Σχήμα 2 φαίνεται η μηνιαία μέση θερμοκρασία σε όλη την περίοδο

δειγματοληψίας. Η μικρότερη θερμοκρασία, παρατηρήθηκε τον Απρίλιο ($14,8 \pm 0,15^{\circ}\text{C}$) ενώ η μεγαλύτερη ($25,5 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$) παρατηρήθηκε τον Αύγουστο. Από την παρατήρηση του θερμοκρασιακού προφίλ φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ήταν ανάλογη της εποχής στην οποία έγινε η δειγματοληψία, ενώ δεν παρατηρήθηκαν μη αναμενόμενες αυξομειώσεις.



Σχήμα 2. Θερμοκρασιακό προφίλ του νερού στην περιοχή δειγματοληψίας.

2.3 Πρωτόκολλο δειγματοληψιών

Το πείραμα ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2010 και ολοκληρώθηκε τον Αύγουστο του ίδιου έτους. Οι δειγματοληψίες ήταν μηνιαίες και το δείγμα λαμβάνονταν την τελευταία ημέρα κάθε μήνα προκειμένου να υπάρχει πρόβλεψη για το μήνα που ακολουθεί. Κάθε μήνα συλλέγονταν 20 ψάρια τυχαία από τον ίδιο κλωβό. Συνολικά ελήφθησαν 100 ψάρια τα οποία καταψύχονταν άμεσα στους -20°C προκειμένου να

εξεταστούν νεκροσκοπικά και παρασιτολογικά για την παρουσία του παρασίτου *E. leei* αλλά και άλλων παρασίτων. Επίσης οι θνησιμότητες καταγράφονταν καθημερινά.

Στον Πίνακα 3 φαίνεται ο ακριβής αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών που αποτέλεσαν το δείγμα και η ημερομηνία κάθε δειγματοληψίας.

Πίνακας 3. Ακριβής αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών και ημερομηνίες δειγματοληψίας

Ημερομηνία Δειγματοληψίας	Αριθμός ψαριών δείγματος
30 Απριλίου 2010	20
31 Μαΐου 2010	20
30 Ιουνίου 2010	20
31 Ιουλίου 2010	20
31 Αυγούστου 2010	20

2.4 Ανίχνευση παρασίτων

2.4.1 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 γενικής εικόνας των βραγχίων, της στοματικής κοιλότητας και όλων των εσωτερικών οργάνων.

2.4.2 Παρασιτολογική εξέταση

Η ανίχνευση του *E. leei* στα ψάρια έγινε με δύο διαφορετικές τεχνικές, την εξέταση νωπών παρασκευασμάτων και τη χρήση της μοριακής τεχνικής qPCR.

2.4.2.1 Εξέταση νωπών παρασκευασμάτων

Βράγχια, δέρμα και τα εσωτερικά όργανα εξετάστηκαν με την μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων. 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.

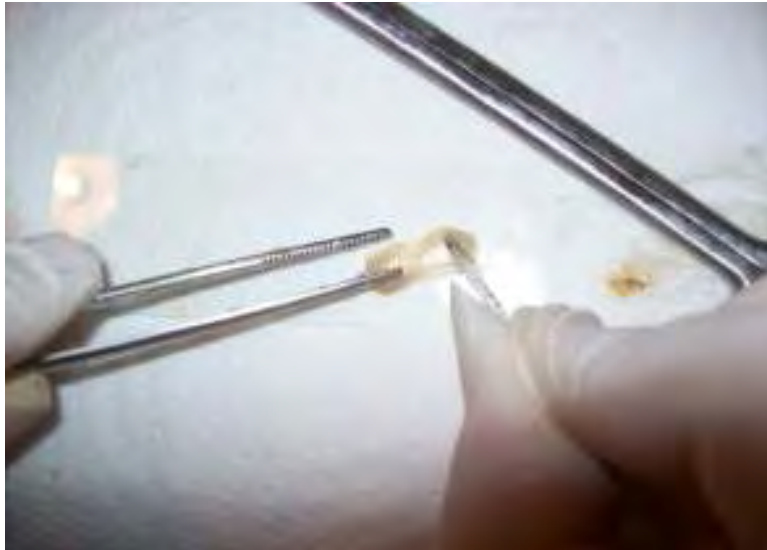
Η παρασιτολογική εξέταση των ψαριών περιλάμβανε τα εξής στάδια (Roberts 1989):

Βράγχια: Τα πρώτα δεξιά και αριστερά βραγχιακά τόξα απομακρύνονταν από το σώμα κάθε ψαριού και ξέσματα και των δύο επιφανειών 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 (Εικ. 2),

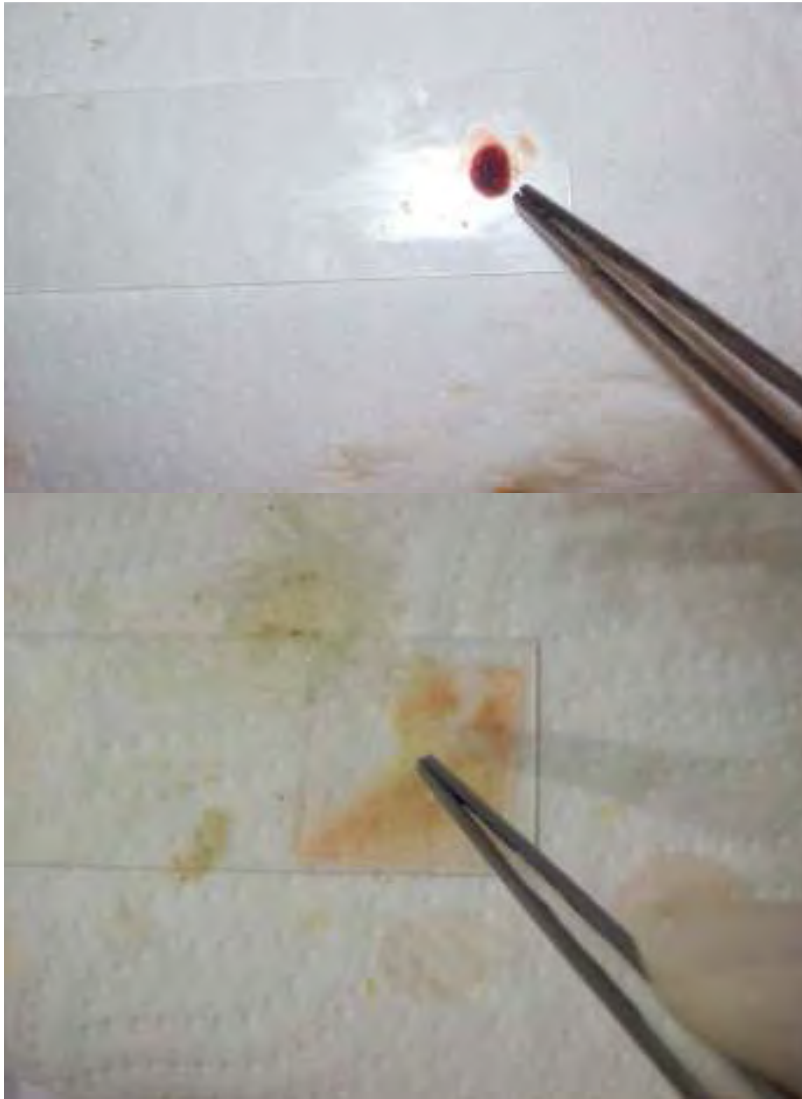
στις οποίες είχε ήδη τοποθετηθεί μία σταγόνα φυσιολογικού ορού και καλύπτονταν με καλυπτρίδα για μακροσκοπική παρατήρηση.



Εικόνα 2. Λήψη ξέσματος από τον πεπτικό σωλήνα.

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 (Εικ. 3), ακολουθούσε η μικροσκοπική τους εξέταση.



Εικόνα 3. Λήψη ξέσματος από τον νεφρό

Ταυτοποίηση παρασίτων

Η ταυτοποίηση των παρασίτων έγινε αμέσως μετά την ανεύρεσή τους με μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων με βάση τις κλείδες (Yamagouti 1963).

Υπολογισμός ποσοστού προσβολής μετά από εξέταση νωπών παρασκευασμάτων

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 *et al.* 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. Κατά την εξέταση των νωπών παρασκευασμάτων μετά από μικροσκοπική παρατήρηση, παρατηρήθηκαν 100 τυχαία οπτικά πεδία σε κάθε δείγμα ψαριού.

Υπολογισμός έντασης μετά από εξέταση νωπών παρασκευασμάτων

Η ένταση της παρασίτωσης προσδιορίστηκε προκειμένου να επιτευχθεί η εκτίμηση του αριθμού των παρασίτων και όχι μόνο η ανίχνευσή τους, όπως έγινε με το ποσοστό προσβολής (Bush *et al.* 1997). Ο υπολογισμός της έγινε από την καταμέτρηση των παρασίτων σε κάθε δείγμα ψαριού ξεχωριστά και σε 100 τυχαία οπτικά πεδία, μετά από μικροσκοπική παρατήρηση. 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 Πίνακα 4.

Πίνακας 4. 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

2.4.2.2 Μοριακές τεχνικές

Προετοιμασία δειγμάτων

Για την ανίχνευση του *E. leei* με τη χρήση της μοριακής τεχνικής qPCR λαμβάνονταν ένα μικρό τμήμα του οπίσθιου εντέρου το οποίο τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες κυβέττες και αποθηκεύονταν στην κατάψυξη (-80°C) μέχρι την επεξεργασία του. Τα δείγματα εντέρου τα οποία λαμβάνονταν από όλα τα ψάρια ήταν ισομεγέθη περίπου 1mm.

Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού του παρασίτου *E. leei* στα δείγματα προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα.

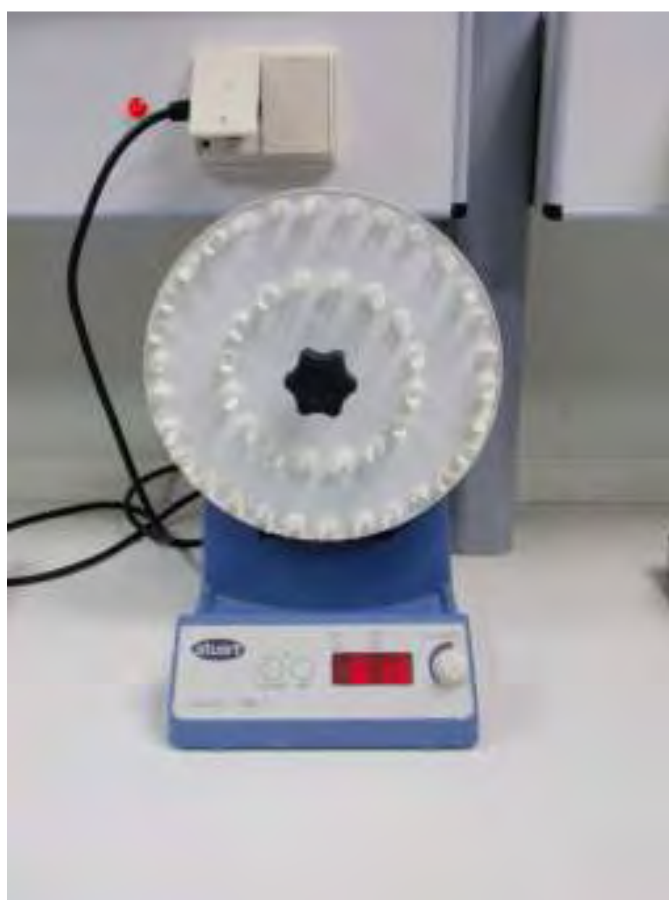
- ✓ 500μl Extraction Buffer (0,1 M EDTA pH 8.00 & 0,05M Tris HCl pH 8.00),
- ✓ 20 μl SDS 10% και
- ✓ 20μl Proteinase K (10mg/ml).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μηχανική λύση του ιστού και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για επώαση σε υδατόλουτρο στους 65⁰C για 3 ώρες (Εικ. 4). Οι κυβέττες απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και αφέθηκαν σε θερμοκρασία

δωματίου για 5 λεπτά. Έπειτα, στα δείγματα προστέθηκαν 600μl διαλύματος φαινόλης – χλωροφορμίου - ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 και ακολούθησε ελαφρά ανάδευση σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα Stuart Rotator SB3 Bibby Scientific Ltd, Stafford Shire UK (Εικ. 5), για 10 λεπτά σε 40 rpm μέχρι να δημιουργηθεί γαλακτώδες, ομογενοποιημένο υγρό. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Eppendorf 580010R AG Hamburg Germany) (Εικ. 6) για 10 λεπτά στις 13.000g στους 4⁰C. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης και αφού το διάλυμα χωρίστηκε σε δύο φάσεις, το υπερκείμενο απομονώθηκε και μεταφέρθηκε σε νέες κυβέττες. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl χλωροφόρμιο και τα δείγματα αφού ανακινήθηκαν ελαφρώς, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 13000g σε θερμοκρασία 4⁰C, με σκοπό να διαχωριστούν οι 2 φάσεις. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα κυβέττα και προστέθηκαν 300μl παγωμένης ισοπροπανόλης και 30μl οξικό νάτριο (3M). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους -20⁰C για 30 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 13000g σε θερμοκρασία 4⁰C για 10 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, στο κάτω μέρος των κυβεττών έχει δημιουργηθεί μια πελλέτα (pellet) από DNA και το υγρό απομακρύνθηκε προσεκτικά ώστε να μην χαθεί η πελλέτα του DNA. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με αιθανόλη 100° και 75° αντίστοιχα και οι κυβέττες με την πελλέτα του DNA τοποθετήθηκαν σε εφαρμογή συνεχούς αρνητικής πίεσης με σκοπό να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης. Ακολούθησε επαναδιάλυση του DNA σε 50μl αποστειρωμένου νερού και μέτρηση της ποσότητας του γενομικού DNA με χρήση nanodrop (Εικ. 7). Το γενομικό DNA αποθηκεύτηκε στους -20⁰C.



Εικόνα 4. Υδατόλουτρο



Εικόνα 5. Περιστρεφόμενος αναδευτήρας Stuart Rotator



Εικόνα 6. Ψυχόμενη φυγόκεντρος



Εικόνα 7. Nanodrop

Σχεδιασμός εκκινητών

Οι δοκιμές qPCR στόχευσαν στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα του πυρηνικού rDNA. Αλληλουχίες από όλα τα γνωστά είδη μυξοσποριδίων χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να σχεδιαστούν οι εκκινητές εξειδικευμένοι για το παράσιτο *E. leei* (Εικ. 8). Το διάγραμμα ροής της μεθόδου σχεδιασμό του ζεύγους εκκινητών φαίνεται στην Εικόνα 9.

Το λογισμικό πρόγραμμα ClustalW 2 χρησιμοποιήθηκε για την ευθυγράμμιση των παραπάνω αλληλουχιών και έγινε οπτική αναγνώριση των εν δυνάμει εξειδικευμένων για το συγκεκριμένο είδος παράσιτου εκκινητών. Τα χαρακτηριστικά των υποψήφιων εκκινητών αξιολογήθηκαν με το λογισμικό OligoAnalyser 3.1 και τέσσερα ζεύγη εκκινητών θεωρήθηκαν τα πιο αξιόπιστα. DNA προερχόμενο από δείγματα ψαριών μολυσμένα με το παράσιτο *E. leei* χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση PCR με τους τέσσερις παραπάνω εκκινητές και το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης. Η ζώνη που προέκυψε αποκόπηκε από τη πηκτή αγαρόζης και καθαρίστηκε με το Nucleospin Extract II (Macherey - Nagel Duren Germany). Στη συνέχεια ακολούθησε εισαγωγή του προϊόντος της PCR σε πλασμιδιακό φορέα PCR2.1-TOPO (Invitrogen Carlsbad, SA USA) και μετασχηματισμός ηλεκτροδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* One Shot Top10. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων έγινε με την προσθήκη ορισμένων νανογραμμάτων πλασμιδιακού DNA σε 100μl δεκτικών κυττάρων. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κυβέττα 0,1 cm και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροδιάτρηση σε Eppendorf Electroporator 2510. Ακολούθησε προσθήκη 250μl SOC Medium (Invitrogen Carlsbad, SA USA). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κυβέττες των 15ml τύπου falcon και επώαστηκε σε αναδευόμενο επωαστήρα για μία ώρα στους 37°C ώστε να πραγματοποιηθεί έκφραση των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά γονιδίων. Στη

συνέχεια 50μl από το παραπάνω κυτταρικό εναιώρημα ενοφθαλμίζονται σε θρεπτικό υπόστρωμα LB agar σε τρυβλίο η Παρασκευή του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Διαδικασία παρασκευής LB agar

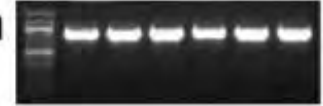
1% τρυπτόνη
0,5% εκχύλισμα μαγιάς
1% NaCl
15g / lit agar
50mg/ml kanamycin
40ml x-gal (40mg/ml)

Το αντιβιοτικό χρησιμοποιείται για την επιλογή μόνο των ανθεκτικών στελεχών σε καναμυκίνη και το x-gal χρησιμοποιείται ως οπτική ένδειξη των κυττάρων που εκφράζουν το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση στο lac οπερόνιο (γονίδιο lacZ). Τα τρυβλία πέτρι επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες, στις οποίες είχε γίνει αναστολή έκφρασης του γονιδίου lacZ. Συνολικά επιλέχτηκαν 10 αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν σε LB broth με 50mg/ml καναμυκίνη. Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίων με το Nucleospin Plasmid (Macherey - Nagel Duren Germany) και αλληλούχιση (Macrogen, Seoul, Korea) η οποία επιβεβαίωσε την εισαγωγή τμημάτων του γονιδιώματος το *E.leei* με αξιοπιστία 100% για ένα ζευγάρι από τους εκκινητές.

Ευθυγράμμιση γνωστών αλληλουχιών SSU rDNA μυξοσποριδίων, για την εύρεση αλληλουχίας συμπληρωματικής του *E. leei*

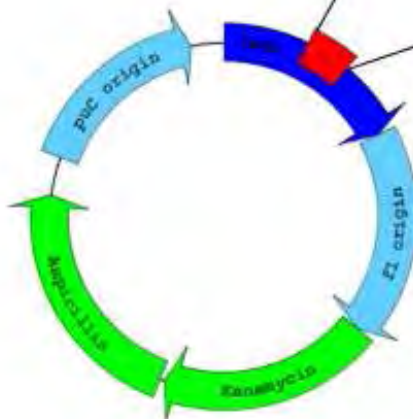


1. Απομόνωση DNA από έντερο
2. Ομογενοποίηση δειγμάτων
3. PCR
4. Ηλεκτροφόρηση



Απομόνωση ζώνης από πηκτή αγαρόζης

Μοριακή κλωνοποίηση



Αποτέλεσμα: *E. leei* SSU rDNA

Εισαγωγή προϊόντων PCR σε πλασμιδιακό φορέα

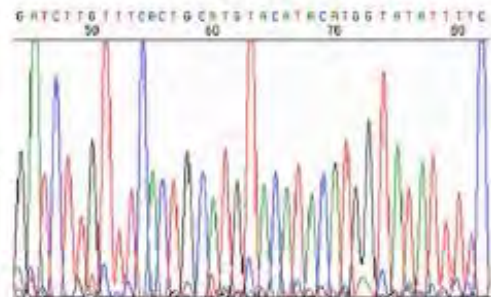
Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (electrocompetent cells)



Επιλογή 10 κλώνων



Αλληλούχιση



Ζεύγος εκκινητών συμπληρωματικοί του *E. leei*

Εικόνα 9. Διάγραμμα ροής της μεθόδου σχεδιασμού του ζεύγους εκκινητών

Ανίχνευση του *E. coli* με qPCR

Οι αντιδράσεις qPCR έγιναν σε κυβέττες 0,5ml υψηλής οπτικής καθαρότητας (Biorad Laboratories California USA) ως εξής:

- 10 µl KapaSYBRFAST qPCR Kit
- 10ng DNA
- 400µm από κάθε εκκινητή
- Νερό, σε αντίδραση τελικού όγκου 20µl

Χρησιμοποιώντας το μέσο MB του πλασμιδίου φορέα και τη σταθερά Avogadro υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων ανά μονάδα όγκου.

Η εφαρμογή της τεχνικής στα υπό εξέταση δείγματα γινόταν κάθε φορά παράλληλα με τα δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων προκειμένου οι συνθήκες της τεχνικής να είναι σταθερές και ίδιες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε εις τριπλούν για το κάθε δείγμα. Η τεχνική έγινε με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή MJ Research και κεφαλή ανάγνωσης Biorad Chromo 4 (Εικ. 10).



Εικόνα 10. Θερμοκυκλοποιητής MJ Research

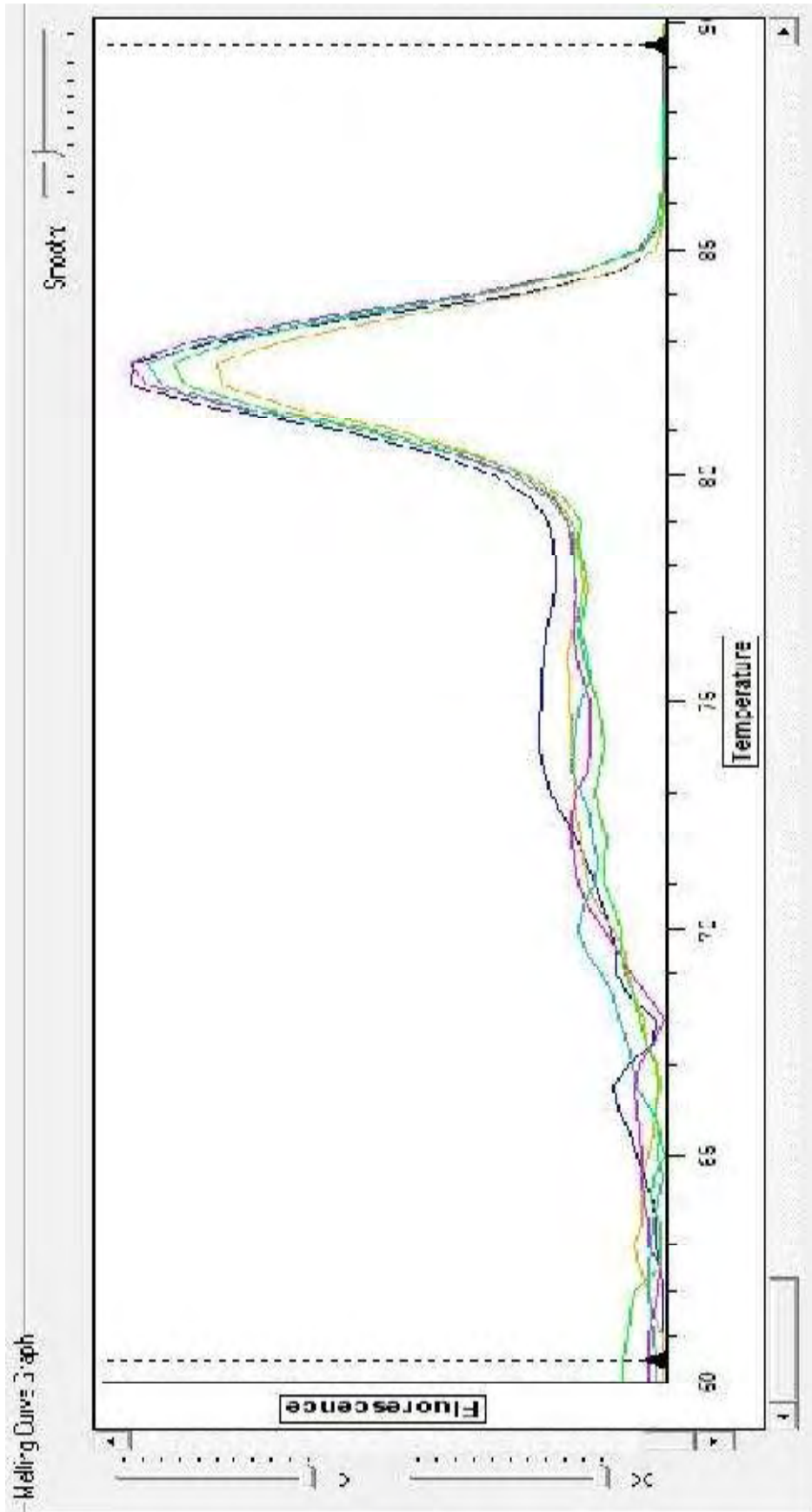
Υπολογισμός ποσοστού προσβολής με qPCR

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, όπως και κατά την παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων. Μολυσμένα θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκε το DNA του παρασίτου *E. leei*.

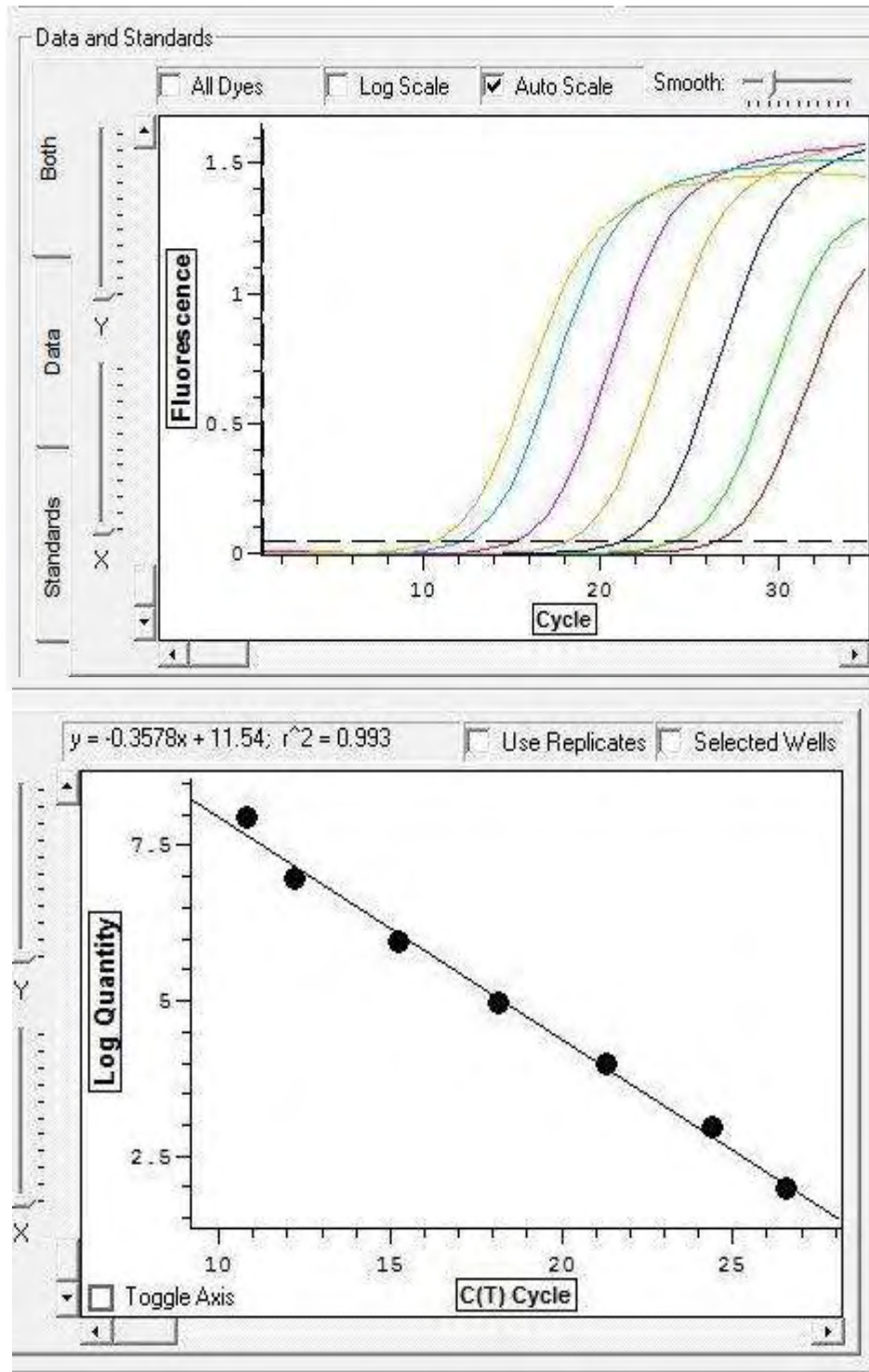
Ποσοτικοποίηση με qPCR

Η ποσοτικοποίηση είναι η διαδικασία που πραγματοποιείται για την εύρεση της ποσότητας του DNA που εξήχθη από το δείγμα. Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίστηκε είτε από τα μεγέθη των ζωνών αυτού σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση είτε διαβάζοντας το φάσμα απορρόφησής του, γνωρίζοντας ότι το δίκλωνο μόριο του DNA απορροφά στα 260nm. Η ποσοτικοποίηση του DNA συμβάλλει στο να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί το προϊόν της εξαγωγής (γενωμικό DNA) ως μήτρα (template) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ενζυμικής ενίσχυσης (PCR).

Η ποσοτικοποίηση έγινε με βάση μία πρότυπη καμπύλη που δημιουργήθηκε από συγκεκριμένες συγκεντρώσεις DNA. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο πλασμίδιο σε 7 διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις. Για τον έλεγχο παραπροϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε καμπύλη αποδιάταξης (Εικ. 11,12).



Εικόνα 11. Κομπύλη αποδιάταξης από 7 διαδοχικές υποδεκαπλασίες αραιώσεις



Εικόνα 12. Πρότυπη καμπύλη. Χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο πλασμίδιο σε 7 διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μακροσκοπική και νεκροσκοπική εξέταση

Κατά τη μακροσκοπική εξέταση των ψαριών στα περισσότερα ψάρια δεν παρατηρήθηκαν εξωτερικές αλλοιώσεις, εκτός ελαχίστων περιπτώσεων που παρατηρήθηκε απώλεια λεπιών στη ραχιαία κυρίως επιφάνεια του σώματος. Κατά τη νεκροψία παρατηρήθηκαν τοπικές αιμορραγίες, διάταση του εντέρου και τυροειδές περιεχόμενο στον εντερικό σωλήνα, καθώς επίσης και διογκωμένη χοληδόχος κύστη (Εικ. 13).



Εικόνα 13. Χιόνα προσβεβλημένη από το παράσιτο *E. leei*

3.2 Παρασιτολογική εξέταση

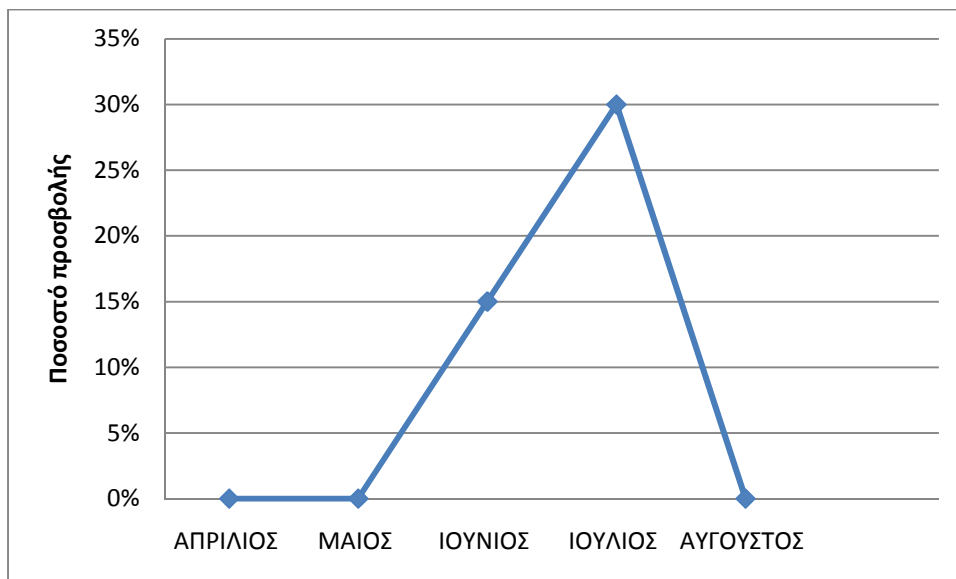
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρασιτολογικής εξέτασης το μοναδικό παράσιτο το οποίο ανιχνεύτηκε στα ψάρια ήταν το παράσιτο *E. leei*. Το συγκεκριμένο παράσιτο ανιχνεύτηκε στο έντερο των υπό εξέταση ψαριών και σε λίγες περιπτώσεις και στη χοληδόχο κύστη. Η ανίχνευση του παρασίτου πραγματοποιήθηκε τόσο με τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων εντέρου όσο και με τη μοριακή τεχνική qPCR. Στην Εικόνα 14 φαίνονται ώριμοι σπόροι του μυξοσποριδίου *E. leei* οι οποίοι παρατηρήθηκαν σε νωπά παρασκευάσματα εντέρου μολυσμένης χιόνας.



Εικόνα 14. Ωριμοι σπόροι του μυξοσποριδίου *E. leei*

3.2.1 Εκτίμηση του ποσοστού προσβολής από το *E. leei* μετά από παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων

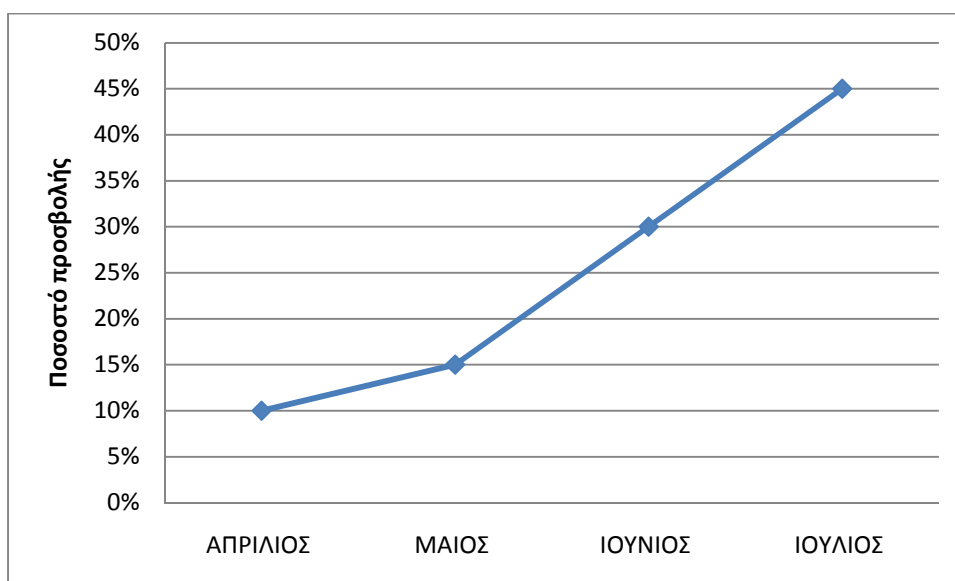
Με την κλασική τεχνική της μικροσκοπικής παρατήρησης νωπών παρασκευασμάτων εντέρου, το παράσιτο *E. leei* ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά τον Ιούνιο σε ποσοστό προσβολής 15%. Το ποσοστό αυτό αυξήθηκε τον Ιούλιο σε 30% ενώ τον Αύγουστο μειώθηκε σε 0%. Το γεγονός ότι οι δειγματοληψίες λαμβάνονταν στο τέλος κάθε μήνα, εξασφαλίζει ότι τα ποσοστά αυτά αποτελούν πρόβλεψη της κατάστασης των ψαριών για τον μήνα που ακολουθεί. Στο Σχήμα 3 φαίνεται η εποχική μεταβολή του ποσοστού προσβολής μετά από μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων εντέρου.



Σχήμα 3. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής μετά από παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων εντέρου.

3.2.2 Εκτίμηση του ποσοστού προσβολής από το *E. leei* με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.

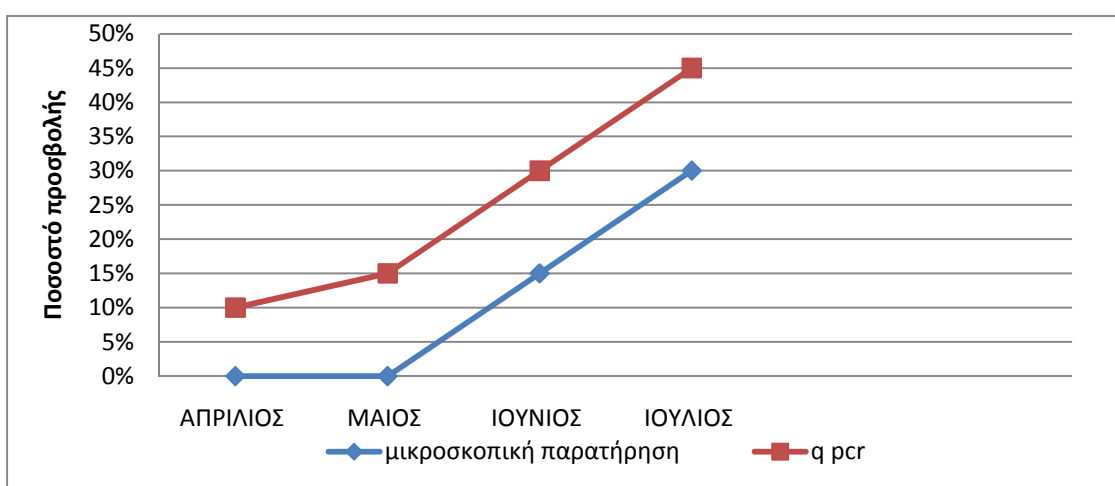
Με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR, ψάρια μολυσμένα με το παράσιτο *E. leei* ανιχνεύθηκαν από τον πρώτο μήνα δειγματοληψίας (Απρίλιο 2010) σε ποσοστό προσβολής 10%, το οποίο διατηρήθηκε και το μήνα Μάιο. Τον Ιούνιο το ποσοστό αυξήθηκε σε 30% ενώ το μήνα Ιούλιο παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής (45%). Η τεχνική αυτή δεν εφαρμόστηκε τον Αύγουστο γιατί η εφαρμογή της είχε ως σκοπό την έγκαιρη διάγνωση, δηλαδή την ανίχνευση των παρασίτων πριν αυτή επιτευχθεί με άλλες τεχνικές. Στο Σχήμα 4 φαίνεται η εποχική μεταβολή του ποσοστού προσβολής μετά από εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.



Σχήμα 4. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής μετά από εφαρμογή qPCR

3.2.3. Συγκριτική εκτίμηση του ποσοστού προσβολής από το *E. leei* όπως προέκυψε από τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων και την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR

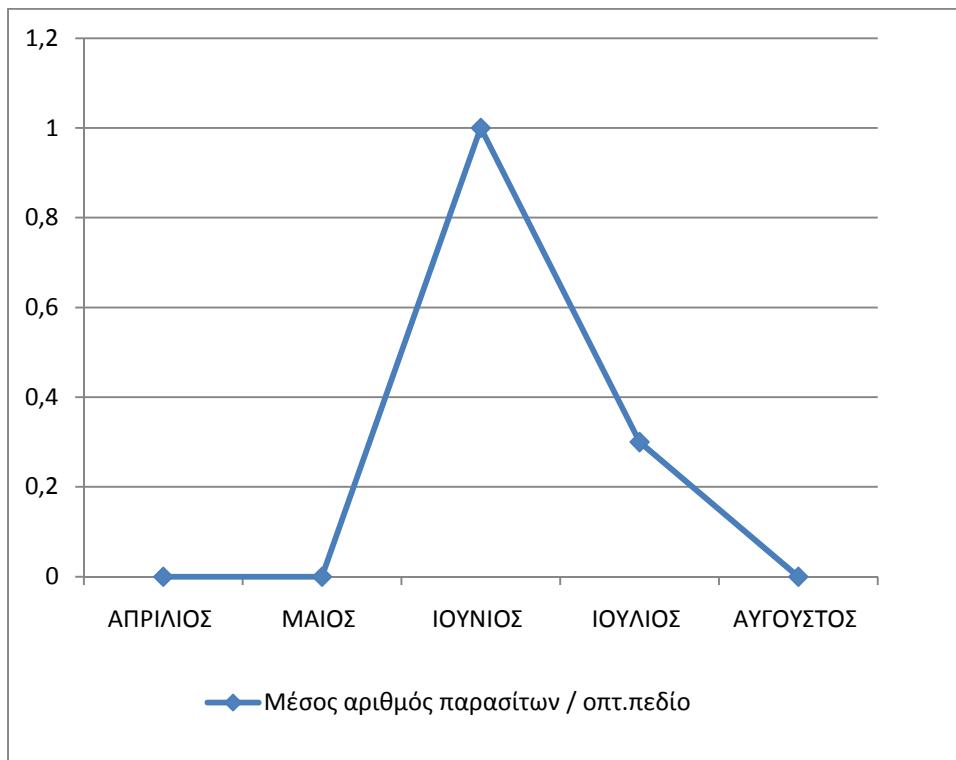
Στο Σχήμα 5 φαίνεται η συγκριτική μεταβολή του ποσοστού προσβολής μετά από εφαρμογή δυο διαφορετικών τρόπων ανίχνευσης του *E. leei*, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω. Από την παρατήρηση του σχήματος προκύπτει ότι η ανίχνευση της παρασίτωσης με τη χρήση της μοριακής τεχνικής qPCR είναι δυνατό να επιτευχθεί νωρίτερα συγκριτικά με την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων. Συγκεκριμένα με τη χρήση της qPCR η ασθένεια ανιχνεύτηκε από το μήνα Απρίλιο ενώ με την κλασική παρασιτολογική τεχνική η ανίχνευση της παρασίτωσης επετεύχθη δύο μήνες αργότερα δηλαδή τον Ιούνιο. Επίσης, με τη μικροσκοπική παρατήρηση το μέγιστο ποσοστό προσβολής το οποίο ανιχνεύτηκε ήταν 30% το μήνα Ιούλιο, ποσοστό το οποίο ήταν μεγαλύτερο (45%) στην περίπτωση που στα δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική qPCR.



Σχήμα 5. Συγκριτική εποχική μεταβολή του ποσοστού προσβολής μετά από εφαρμογή δύο διαφορετικών τρόπων ανίχνευσης του *E. leei*.

3.2.4. Εκτίμηση της έντασης της εντερομούξωσης μετά από παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων

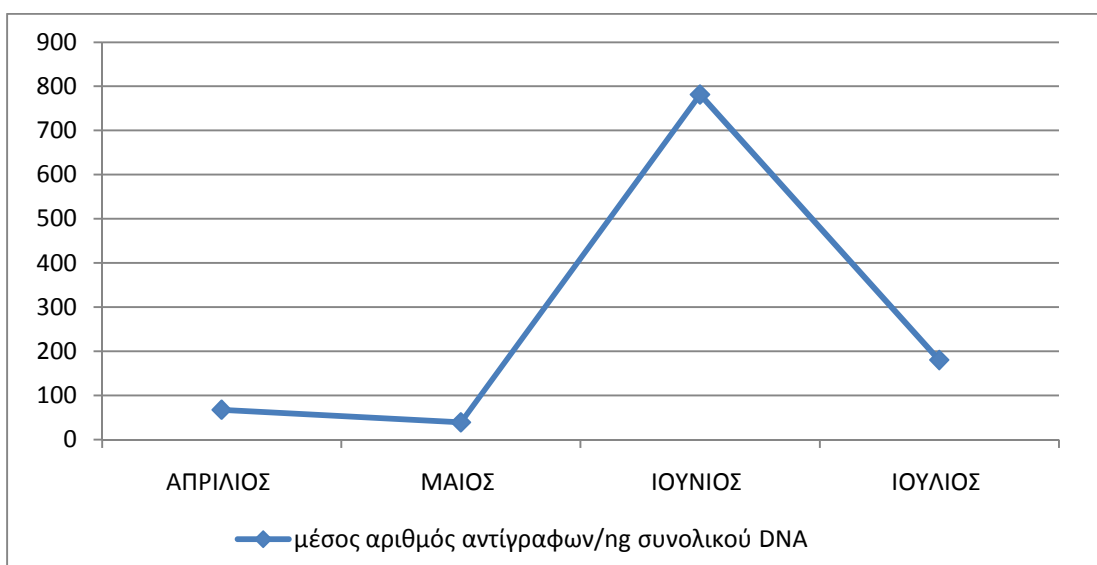
Η ένταση παρασίτωσης υπολογίστηκε αρχικά κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση με τον κλασικό τρόπο της καταμέτρησης των παρασίτων ανά οπτικό πεδίο. Σε όλα τα μολυσμένα ψάρια η μέση ένταση ήταν χαμηλή, δηλαδή παρατηρήθηκαν από 0 έως 5 παράσιτα ανά οπτικό πεδίο, μετά από παρατήρηση 100 οπτικών πεδίων σε κάθε ψάρι. Η μέση ένταση που παρατηρήθηκε, για το σύνολο των ψαριών, ήταν ένα παράσιτο ανά οπτικό πεδίο τον μήνα Ιούνιο και 0,3 παράσιτα τον Ιούλιο. Από την παρατήρηση του Σχήματος 6 φαίνεται ότι η ένταση παρέμεινε σταθερά χαμηλή και δεν παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές μεταξύ των δύο μηνών.



Σχήμα 6. Μεταβολή της μέση ένταση παρασίτωσης η οποία υπολογίστηκε κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων εντέρου.

3.2.5. Εκτίμηση της έντασης της εντερομούξωσης με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.

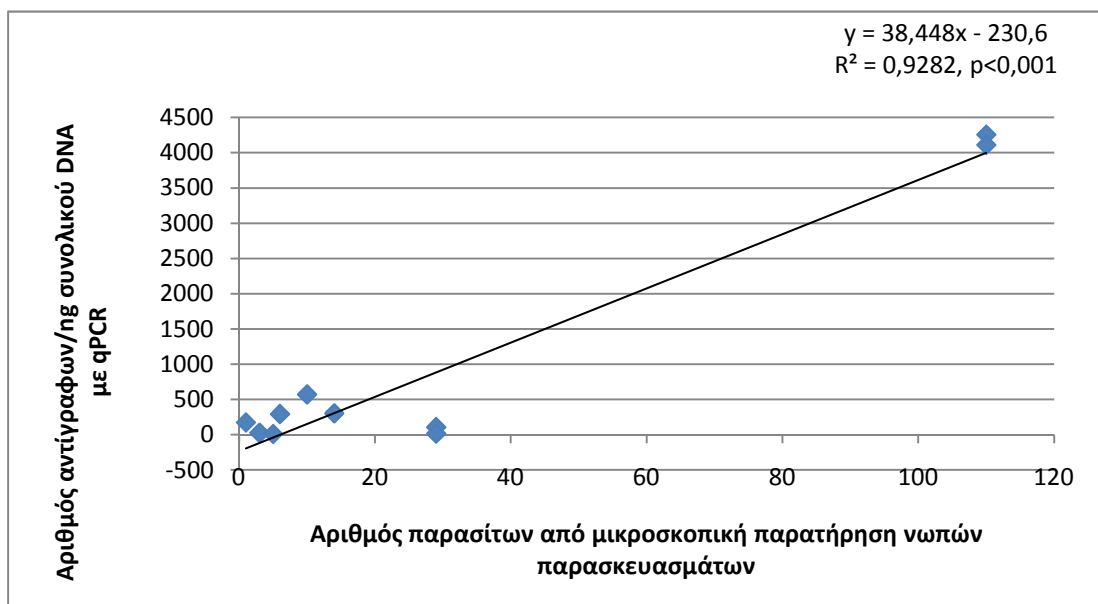
Κατά την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR η ένταση υπολογίστηκε ως μέσος αριθμός αντιγράφων ανά ng συνολικού DNA, για το σύνολο των μολυσμένων ψαριών. Από την παρατήρηση του Σχήματος 7 φαίνεται ότι η μεγαλύτερη ένταση παρασίτωσης παρατηρήθηκε το μήνα Ιούνιο και αντιστοιχούσε σε 781 αντίγραφα ανά ng συνολικού DNA. Κατά την ανάλυση με SybrGreen qPCR προέκυψε ότι όταν πρόκειται για μικρές συγκεντρώσεις του παρασίτου ($n < 10$), η μέθοδος θεωρείται αξιόπιστη σε συγκεκριμένο όριο κύκλων της qPCR ($C_q < 35$).



Σχήμα 7. Μεταβολή της μέση ένταση παρασίτωσης η οποία υπολογίστηκε με την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR.

3.2.6. Συγκριτική εκτίμηση της έντασης της εντερομύξωσης όπως προέκυψε από τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων και την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής qPCR

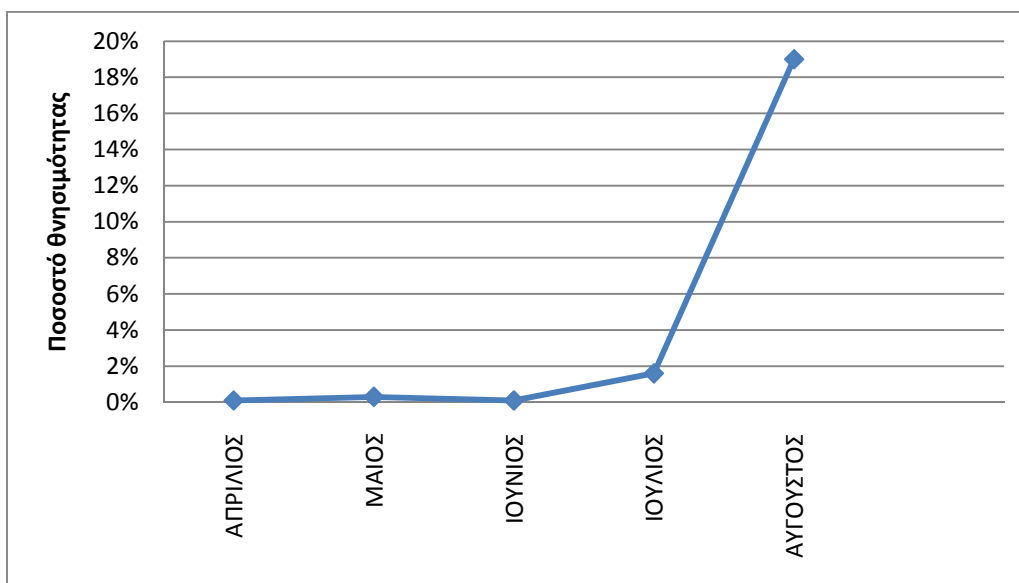
Στο Σχήμα 8 φαίνεται η γραμμική συσχέτιση της έντασης της παρασίτωσης από την εφαρμογή δύο διαφορετικών τρόπων ανίχνευσης του παρασίτου. Από τη συσχέτιση αυτή προέκυψε η γραμμική σχέση $y=38,44x-230,6$ με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0,9282$, $p < 0,001$. Η ένταση όπως αυτή εκτιμήθηκε μετά από μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων και υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων ανά ng συνολικού DNA από την qPCR, δεν είναι δυνατό να συγκριθούν γιατί σε κάθε μία περίπτωση η ένταση υπολογίζεται με διαφορετικές παραμέτρους. Εντούτοις, από την εφαρμογή και των δύο τρόπων ανίχνευση του *E. leei* προέκυψε ότι η μεγαλύτερη ένταση παρασίτωσης παρατηρήθηκε το μήνα Ιούνιο.



Σχήμα 8. Σύγκριση της έντασης της παρασίτωσης από την εφαρμογή της μικροσκοπικής παρατήρησης των νωπών παρασκευασμάτων και της μοριακής τεχνικής qPCR.

3.3 Ποσοστό θνησιμότητας

Στη διάρκεια του πειράματος οι θνησιμότητες των ψαριών καταγράφονταν καθημερινά. Στο Σχήμα 9 φαίνεται το ποσοστό θνησιμότητας κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Από την παρατήρηση του Σχήματος φαίνεται ότι οι θνησιμότητες τους πρώτους μήνες δειγματοληψίας ήταν πολύ χαμηλές και άρχισαν να αυξάνονται τον μήνα Ιούλιο σε ποσοστό 2% ενώ οι μέγιστες μέσες τιμές παρατηρήθηκαν τον Αύγουστο και αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 19%. Οι θνησιμότητες αυτές, δεδομένης της διάγνωσης του μυξοσποριδίου *E. leei* και λαμβάνοντας υπόψη όλο το ιστορικό των υπό εξέταση ψαριών, προκύπτει ότι σχετίζονται άμεσα με τη συγκεκριμένη ασθένεια.



Σχήμα 9. Μεταβολή του ποσοστού θνησιμότητας στη διάρκεια του πειράματος.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μελέτη του παρασιτικού φορτίου εντατικά εκτρεφόμενης χιόνας

Τα μυξοσπορίδια αποτελούν μία πραγματική και δύσκολη απειλή για τις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες. Είναι από τα πιο κοινά παράσιτα των εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών της Μεσογείου και προκαλούν ένα μεγάλο εύρος ασθενειών που σχετίζεται με το είδος του παρασίτου, την ευαισθησία του ξενιστή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις διατροφικές συνήθειες (Rigos *et al.* 1999, Kent *et al.* 2001). Το μυξοσπορίδιο παράσιτο *E. leei* είναι ένα σημαντικό παράσιτο για τα ψάρια της οικογένειας Sparidae, που προκαλεί σοβαρή εντερίτιδα που μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο, προκαλώντας δυσμενείς οικονομικές επιδράσεις στην εκτροφή των συγκεκριμένων ειδών στη Μεσόγειο, προκαλώντας ανορεξία, αναιμία, καχεξία (Palenzuela 2006, Γκολομάζου 2007).

Το συγκεκριμένο παράσιτο θεωρείται ότι είναι υπεύθυνο για σοβαρές επιδημίες στην τσιπούρα και στη χιόνα, ενώ έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 46 είδη ψαριών στη Μεσόγειο, την Ερυθρά θάλασσα και στην Ιαπωνία (Diamant 1995, 1997, 1998, le Breton & Marques 1995, Sakiti *et al.* 1996, Paperna 1998, Zrnčić *et al.* 1998, Padrós *et al.* 2001, Marino *et al.* 2004, Yanagida *et al.* 2004, 2006, 2008, Γκολομάζου και συν. 2005, Γκολομάζου 2007, Yasuda *et al.* 2005, Merrella *et al.* 2005, Diamant *et al.* 2006, Sitjà-Bobadilla *et al.* 2007, Montero *et al.* 2007, Katharios *et al.* 2011). Από το 1995, που η εντερομύξωση αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα προέκυψε το ερώτημα για τη βιωσιμότητα της εκτροφής της χιόνας (le Breton & Marques 1995; Rigos *et al.*, 1999, Γκολομάζου και συν. 2005, Rigos & Katharios 2010). Στο συγκεκριμένο είδος ψαριού καταγράφονται υψηλές θνησιμότητες μέχρι σήμερα υποδεικνύοντας την

ευαισθησία του σε σχέση με άλλα είδη όπως η τσιπούρα, γεγονός που πιθανό να οφείλεται στη καταγεγραμμένη διαφορετική ανοσολογική τους αντίδραση (Munoz *et al.* 2007).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μία συστηματική ιχθυοπαθολογική παρακολούθηση μίας μονάδας πάχυνσης εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης σε χιόνα. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η εντερομύξωση ανιχνεύτηκε στις εκτρεφόμενες χιόνες από τον μήνα Απρίλιο σε χαμηλό ποσοστό και ένταση και χωρίς να παρατηρούνται θνησιμότητες, ενώ παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και το μήνα Μάιο. Το διάστημα αυτό τα ψάρια δεν παρουσίαζαν κλινικά συμπτώματα και δεν παρατηρήθηκαν νεκροτομικές αλλοιώσεις. Τόσο το ποσοστό προσβολής όσο και η ένταση της παρασίτωσης άρχισαν να αυξάνονται από το μήνα Ιούνιο, που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ένταση παρασίτωσης, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε τον Ιούλιο. Το γεγονός ότι οι δειγματοληψίες λαμβάνονταν κατά το τέλος κάθε μήνα αποτελούσε τρόπο έγκαιρης διάγνωσης της ασθένειας και των πιθανών θνησιμοτήτων για τον επόμενο μήνα. Έτσι τον Αύγουστο αν και το παράσιτο δεν ανιχνεύτηκε, εντούτοις παρατηρήθηκαν αυξημένες θνησιμότητες οι οποίες οφείλονταν στο αυξημένο ποσοστό προσβολής που παρατηρήθηκε τον Ιούλιο.

Επομένως με τη συστηματική ιχθυοπαθολογική παρακολούθηση είναι δυνατό να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση μίας ασθένειας πριν την έξαρση της, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα περιορισμού των θνησιμοτήτων.

4.2 Προσδιορισμός του κατάλληλου χρόνου για να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για τον έλεγχο της εντερομύξωσης είναι η έγκαιρη διάγνωση της ασθένειας. Η έγκαιρη διάγνωση είναι σημαντική προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος της ασθένειας και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τους εκτροφείς ψαριών ώστε να ληφθούν τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα, πριν την έξαρση της επιδημίας. Ο προσδιορισμός του κατάλληλου χρόνου για να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση είναι χρήσιμος γιατί η ανίχνευση του *E. ileyi* στα αρχικά στάδια εξέλιξής του θα συνεισφέρει στην ορθή ιχθυοκαλλιεργητική πρακτική, μειώνοντας τα ποσοστά θνησιμότητας. Μέχρι σήμερα το *E. ileyi* συνήθως ανιχνεύεται όταν η ασθένεια έχει ήδη εξαπλωθεί προκαλώντας αυξημένες θνησιμότητες στα μολυσμένα ψάρια.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας έρευνας προέκυψε ότι η εντερομύξωση είναι μία ασθένεια η οποία μεταδίδεται εύκολα και γρήγορα, αφού τόσο το ποσοστό προσβολής όσο και οι θνησιμότητες παρουσίασαν ραγδαία αύξηση. Συγκεκριμένα μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα το ποσοστό προσβολής αυξήθηκε σε 45% και οι θνησιμότητες σε 19%. Η μετάδοση του *E. ileyi* σε υγιή ψάρια είναι δυνατόν να ξεκινήσει σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μικρότερο των πέντε ημερών από την πρώτη επαφή με το παράσιτο, ενώ για διάστημα δύο μηνών είναι πιθανό να μην παρατηρούνται σημαντικές θνησιμότητες (Golomazou *et al.* 2006a). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε στην παρούσα έρευνα αφού μετά από ένα μήνα παραμονής τους στους κλωβούς διαπιστώθηκε η μόλυνση, παρά τη χαμηλή θερμοκρασία του νερού και το μικρό τους μέγεθος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αν και η ασθένεια εμφανίστηκε το μήνα Απρίλιο, έξαρση παρατηρήθηκε τον Ιούλιο και τον Αύγουστο.

Η ραγδαία εξάπλωση του παρασίτου συμβαίνει κατά τη διάρκεια αυτής της κρίσιμης αρχικής περιόδου, λόγω της λήψης νέων παρασιτικών μορφών που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία μέσα στο νερό αλλά και λόγω της αυτομόλυνσης των ψαριών (Golomazou *et al.* 2006a). Η ευκολία αυτή της μετάδοσης σε συνδυασμό με την ύπαρξη ασπόνδυλων, που δρουν ως πιθανοί φορείς του παρασίτου σε συνθήκες εκτροφής σε άμεση γειτνίαση με τους ιχθυοπληθυσμούς, εμποδίζουν τον έλεγχο της ασθένειας (Γκολομάζου 2007). Επίσης, όπως έχει ήδη αποδειχθεί, ο βιολογικός κύκλος του παρασίτου είναι άμεσος και η μετάδοση του γίνεται μέσω του νερού με τη λήψη των μολυσματικών μορφών μέσω του πεπτικού σωλήνα (Golomazou *et al.* 2006a, Diamant *et al.* 2006, Estensoro *et al.* 2010). Έτσι, η μετάδοση του *E. leei* από ψάρι σε ψάρι, χωρίς την αναγκαία ύπαρξη ενός ενδιάμεσου ξενιστή, όπως έχει επιβεβαιωθεί στην τσιπούρα, στο καλκάνι και στη χιόνα από πολλούς ερευνητές (Diamant 1997, Diamant & Wajsbrodt 1997, Redondo *et al.* 2002, Yasuda *et al.* 2002, Golomazou *et al.* 2006a), διευκολύνει την εξέλιξη του βιολογικού κύκλου του παρασίτου και την εύκολη μετάδοσή του.

Επομένως, το αρχικό στάδιο της παρασίτωσης θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό στην εξέλιξη και στον έλεγχο της παρασίτωσης και όπως αποδείχθηκε συμπίπτει χρονικά με την ένταξη των ψαριών στην πάχυνση χωρίς να επηρεάζεται από τη χαμηλή θερμοκρασία του νερού και το μικρό μέγεθος των ψαριών.

4.3 Επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στην εξέλιξη της εντερομύξωσης

Παράλληλα με την έγκαιρη ανίχνευση του παρασίτου πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ασθένειας διαδραματίζουν και οι παράγοντες αυτοί που οδηγούν στην έξαρση της. Η θερμοκρασία του νερού είναι ένας από τους

πολύ σημαντικούς παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο αφού η ασθένεια παρουσιάζει εποχικότητα και παρατηρείται κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες (Ie Breton & Marques 1995, Rigos *et al.* 1999, Yanagida *et al.* 2006, Γκολομάζου 2007).

Από την παρούσα έρευνα επιβεβαιώθηκε ότι η εντερομύξωση είναι ασθένεια η έξαρση της οποίας παρατηρείται το καλοκαίρι, όταν αυξάνεται η θερμοκρασία του νερού. Συγκεκριμένα η μέγιστη ένταση της παρασίτωσης παρατηρήθηκε σε μέση θερμοκρασία 20°C, το μέγιστο ποσοστό προσβολής σε μέση θερμοκρασία 24°C ενώ το μέγιστο ποσοστό θνησιμότητας παρατηρήθηκε σε μέση θερμοκρασία 25,5°C. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, εξάρσεις της εντερομύξωσης έχουν παρατηρηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες του νερού κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Γκολομάζου 2007) γεγονός που εξηγεί και την έξαρση της ασθένειας τον Ιούλιο και τον Αύγουστο όπως προέκυψε από την παρούσα έρευνα. Ωστόσο, μολυσμένα ψάρια παρατηρήθηκαν στη χαμηλότερη θερμοκρασία που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία, δηλαδή από το μήνα Απρίλιο που η μέση θερμοκρασία του νερού έφτανε τους 14,8°C. Στην περίπτωση της τσιπούρας έξαρση της παρασίτωσης έχει παρατηρηθεί σε θερμοκρασίες από 18°C (Ie Breton & Marques 1995) έως 22°C (Rigos *et al.* 1999, Fleurance *et al.* 2008), ενώ στην περίπτωση της χιόνας η ασθένεια έχει καταγραφεί από θερμοκρασίες 18°C και άνω (Γκολομάζου 2007).

Στην παρούσα έρευνα μετά την ολοκλήρωση της έξαρσης της παρασίτωσης τόσο το ποσοστό προσβολής όσο και το ποσοστό θνησιμότητας μειώθηκαν ραγδαία. Αναστολή της εξέλιξης της παρασίτωσης σε μείωση της θερμοκρασίας νερού έχει επιβεβαιωθεί και σε μολύνσεις άλλων ειδών ψαριών με τα παράσιτα *E. fugui* και *E. leei* (Yanagida *et al.* 2006). Η μείωση αυτή του ποσοστού προσβολής εξηγείται αφενός από τις αυξημένες θνησιμότητες του Αυγούστου αλλά και την ικανότητα αυτοίιασης του

οργανισμού. Οι μηχανισμοί ανάρρωσης των μολυσμένων ψαριών είναι πιθανό να επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία του νερού και οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί αυτοϊασης. Ανάρρωση από εντερομύξωση έχει αναφερθεί στο παρελθόν σε διάφορα είδη ψαριών όπως η τσιπούρα, η χιόνα κ.α. (Golomazou *et al.* 2006a, Yanagida *et al.* 2006, Estensoro *et al.* 2010). Σύμφωνα με τους Munoz *et al.* (2007), η ικανότητα για επιτυχή ανάρρωση από την εντερομύξωση είναι πιθανό να σχετίζεται με την ικανότητα του οργανισμού να διατηρεί την υπεροξειδάση στα επίπεδα πριν τη μόλυνση, όπως στην περίπτωση της τσιπούρας. Ωστόσο, ανάμεσα στην τσιπούρα και στη χιόνα έχουν παρατηρηθεί διαφορετικά επίπεδα υπεροξειδάσης κατά την εντερομύξωση. Η διαφορετικότητα αυτή στους μηχανισμούς ανοσίας μέχρι σήμερα θεωρείται ότι έχει άμεση σχέση με την αυξημένη θνησιμότητα της χιόνας συγκριτικά με την τσιπούρα. Παρόλα αυτά τα επίπεδα υπεροξειδάσης είναι πιθανό να σχετίζονται και με άλλους παράγοντες εκτός από το είδος του ψαριού όπως η θερμοκρασία ή η διατροφή και για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να μελετηθεί η πιθανή επίδραση τους στους μηχανισμούς ανοσίας.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην εξέλιξη της εντερομύξωσης είναι σημαντική σε όλη τη διάρκεια του χρόνου, ακόμα και όταν παρατηρείται μείωση της θερμοκρασίας. Καθυστερημένη εξέλιξη της παρασίτωσης ή αδρανής κατάσταση στον ξενιστή σε χαμηλές θερμοκρασίες, δεν έχει αναφερθεί ιδιαίτερος στη διεθνή βιβλιογραφία για τα παράσιτα των ψαριών (Olson 1981, Beaman *et al.* 1999). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Estensoro *et al.* (2010) οι χαμηλές θερμοκρασίες λειτουργούν ανασταλτικά στην εξέλιξη της εντερομύξωσης στην τσιπούρα, ενώ το ποσοστό προσβολής μπορεί να αυξηθεί ξανά την άνοιξη και το καλοκαίρι. Αυτός είναι πιθανώς και ο λόγος για τον οποίο σε ορισμένες περιπτώσεις η εξέλιξη της ασθένειας τους

καλοκαιρινούς μήνες δεν είναι έντονη, αφού αυξομειώσεις της θερμοκρασίας είναι δυνατόν να αναστείλουν την εξέλιξη του παρασίτου. Επίσης κατά τους φθινοπωρινούς και χειμερινούς μήνες είναι πιθανό τα ψάρια να θεωρούνται ως ψευδώς μη μολυσμένα και να αποτελούν φορείς ικανούς να μεταφέρουν τα παράσιτα σε άλλα ψάρια όταν η θερμοκρασία του νερού αρχίσει να αυξάνεται, την άνοιξη και το καλοκαίρι (Estensoro *et al.* 2010). Στο διάστημα αυτό η ικανότητα των παρασίτων να διατηρούν τη μολυσματική τους δράση έχει άμεση σχέση με τη βιωσιμότητά τους και τους παράγοντες που την επηρεάζουν. Η βιωσιμότητα των παρασίτων κατά τους μήνες αυτούς μπορεί να επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους όπως από τον εντοπισμό τους στον εντερικό βλεννογόνο, αφού τα υπολείμματα του εντερικού βλεννογόνου καλύπτουν και προστατεύουν τα παράσιτα, και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Ibarra *et al.* 1992, Yokoyama & Urawa 1997, Yokoyama *et al.* 2007, 2009).

Επομένως, η επίδραση της θερμοκρασίας στην εξέλιξη της εντερομύξωσης είναι καθοριστική επηρεάζοντας τόσο την έξαρσή της όσο και την ικανότητα διατήρησης της βιωσιμότητας των παρασίτων, τομέας όμως που χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

4.4 Εφαρμογή μίας αξιόπιστης διαγνωστικής τεχνικής

Προκειμένου να επιτευχθεί η έγκαιρη ανίχνευση του παρασίτου είναι απαραίτητη η εφαρμογή μίας αξιόπιστης διαγνωστικής τεχνικής. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική διατριβή έγινε προσπάθεια για την ανάπτυξη και εφαρμογή μίας αξιόπιστης διαγνωστικής μοριακής τεχνικής για την έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης και τον προσδιορισμό της έντασης της παρασίτωσης και σύγκρισή της με την κλασική παρασιτολογική τεχνική.

Τα μυξοσπορίδια όπως και τα άλλα παράσιτα συνήθως ανιχνεύονται με τη χρήση των κλασικών παρασιτολογικών τεχνικών που περιλαμβάνουν τη μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων και ιστοπαθολογίας. Η αποτελεσματικότητα και αξιοπιστία της μικροσκοπικής παρατήρησης μπορεί να βελτιωθεί μετά από χρώση των νωπών παρασκευασμάτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα ψάρια θεωρούνται μολυσμένα μόνο όταν παρατηρηθούν ορισμένα από τα στάδια εξέλιξης του παρασίτου (κυρίως οι ώριμοι σπόροι) σε νωπά ή σε ιστολογικά παρασκευάσματα. Η ταυτοποίηση των παρασίτων σε αυτές τις περιπτώσεις γίνεται μόνο από τη χαρακτηριστική μορφολογική δομή του κάθε παρασίτου, χρησιμοποιώντας κλείδες ταυτοποίησης. Το *E. leei* ανιχνεύεται σε νωπά παρασκευάσματα εντέρου με μικροσκοπική παρατήρηση μόνο όταν παρατηρούνται εξελιγμένα στάδια εξέλιξης της παρασίτωσης, όπως ώριμοι σπόροι, διάστημα όμως κατά το οποίο έχει ήδη επιτευχθεί μετάδοση της παρασίτωσης.

Μοριακές τεχνικές βασισμένες στην PCR και στη ανίχνευση DNA θεωρούνται πιο ευαίσθητες και αξιόπιστες συγκριτικά με τη μικροσκοπική παρατήρηση. Η διάγνωση των εντερικών πρωτοζώων βασίζεται κυρίως σε τεχνικές ενίσχυσης γονιδίων (Bretagne & Costa 2006, Murray & Cappello 2008). Σύμφωνα με τους Van Lieshout & Verweij (2010) μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων βασισμένων σε νουκλεϊνικά οξέα έχει περιγραφεί για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντερικών πρωτοζώων και κυρίως η μοριακή τεχνική της qPCR. Η qPCR χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση παρασίτων (Hunt 2011). Με την τεχνική αυτή είναι δυνατό να επιτευχθεί η ποσοτικοποίηση του DNA του παρασίτου, προσφέροντας υψηλού επιπέδου αναλύσεις (Van Lieshout & Verweij 2010). Οι τεχνικές που βασίζονται σε ανίχνευση DNA έχουν περιγραφεί στην ανίχνευση των μυξοσποριδίων στα ψάρια συμπεριλαμβανομένου και του *E. leei* (Fox *et al.* 2000, Cavender *et al.* 2004, Kelley *et al.* 2004, Palenzuela *et al.*

2004, Yanagida *et al.* 2004, 2005, 2008, Hallet & Bartholomew 2006, Sitjà-Bobadilla *et al.* 2007, 2008, Estensoro *et al.* 2010, Hunt 2011).

Για την έγκαιρη ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου παρασίτου μέχρι σήμερα δεν έχει εφαρμοστεί μία αξιόπιστη, εξειδικευμένη και γρήγορη μοριακή τεχνική όπως η qPCR. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε η qPCR για την ανίχνευση του *E. leei* η οποία οδήγησε στην ανίχνευση όλων των σταδίων εξέλιξης του παρασίτου σε όλη τη διάρκεια του βιολογικού του κύκλου, πριν την έξαρση της παρασίτωσης επιτρέποντας την εκτίμηση τόσο του ποσοστού προσβολής όσο και της έντασης της παρασίτωσης. Από τη σύγκριση των δύο τεχνικών που εφαρμόστηκαν προέκυψε ότι η χρήση της μοριακής τεχνικής δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης της ασθένειας σε πολύ πρώιμα στάδια και συγκεκριμένα δύο μήνες νωρίτερα από την κλασική παρασιτολογική εξέταση που βασίζεται σε μικροσκοπική παρατήρηση. Επίσης, κατά τους μήνες που η ασθένεια ανιχνεύτηκε και με τις δύο τεχνικές το ποσοστό προσβολής ήταν μεγαλύτερο στην περίπτωση της εφαρμογής της μοριακής τεχνικής. Η ανάπτυξη αυτής της αξιόπιστης μοριακής τεχνικής προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του *E. leei* στα αρχικά στάδια εξέλιξής του είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που συνεισφέρει στην ορθή ιχθυοκαλλιεργητική πρακτική. Η ευαισθησία της qPCR ήταν σε ικανοποιητικά επίπεδα, παρόλο που δεν μπορεί να διατυπωθεί με βεβαιότητα λόγω ελλείμματος παρομοίων μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία. Από παρόμοιες έρευνες σε φυτά παρατηρήθηκε ότι η τεχνική της qPCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία με τη χρήση SybrGreen παρά με ιχνηθέτες υβριδισμού-υδρόλυσης (TaqMan probes), οι οποίοι εξ ορισμού παρουσιάζονται ως πιο αξιόπιστοι (Suarez *et al.* 2005). Σε κάθε περίπτωση όμως είναι μια μέθοδος που πρέπει να δοκιμαστεί στο μέλλον για το συγκεκριμένο πρωτόζωο.

Αυτό συνίσταται, διότι είναι απαραίτητος ο εντοπισμός και η μοριακή διάγνωση σε πάρα πολύ μικρές συγκεντρώσεις του παρασίτου στον ιστό. Πράγματι, η ακριβής ποσοτικοποίηση αλληλουχιών-στόχων με τη χρήση της qPCR παρουσιάζει ιδιαιτερότητες όταν ο κύκλος ορίου είναι μεγάλος ($C_q > 35$) (Bustin *et al.* 2009). Επιπλέον η σύγκριση με κλασικές τεχνικές, όπως η μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων, δεν είναι πάντα εφικτή λόγω της ανομοιόμορφης διασποράς των παρασιτικών κυττάρων του *E. leei* στο έντερο του ξενιστή. Επίσης η βελτίωση της τεχνικής και η εφαρμογή της χωρίς τη θανάτωση των ψαριών αλλά μόνο με τη λήψη δείγματος βιοψίας, θα εξασφαλίσει έγκαιρη διάγνωση χωρίς τη θανάτωση των ψαριών εξασφαλίζοντας την ευζωία των ψαριών σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με τους κανόνες βιοηθικής (EFSA 2009).

Επομένως, η qPCR αποτελεί ένα σημαντικό και αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο που στοχεύει στην έγκαιρη διάγνωση, δηλαδή εντοπισμό των παρασίτων σε ένα πολύ αρχικό στάδιο, όπου η χημειοθεραπευτική παρέμβαση μπορεί να αποδειχθεί πολύ αποτελεσματική. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης που αποτελεί το κλειδί για τον έλεγχο της, επιτρέποντας στους υπεύθυνους των επιχειρήσεων να υιοθετήσουν όλα τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα μειώνοντας στο ελάχιστο δυνατό τις δυσμενείς οικονομικές επιπτώσεις στην εντατική εκτροφή της χιόνας.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Με τη συστηματική ιχθυοπαθολογική παρακολούθηση είναι δυνατό να επιτευχθεί η έγκαιρη διάγνωση της εντερομύξωσης πριν την έξαρση της, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα περιορισμού των θνησιμοτήτων.
- Εάν η ασθένεια διαγνωσθεί εγκαίρως υπάρχει ο απαιτούμενος χρόνος προκειμένου να ληφθούν τα απαραίτητα προληπτικά μέτρα που θα περιορίσουν τις θνησιμότητες.
- Το αρχικό στάδιο της παρασίτωσης θεωρείται ιδιαίτερα σημαντικό στην εξέλιξη και τον έλεγχο της παρασίτωσης και όπως αποδείχθηκε συμπίπτει χρονικά με την ένταξη των ψαριών στην πάχυνση.
- Μολυσμένα ψάρια παρατηρούνται σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία (14,8°C) δηλαδή από το μήνα Απρίλιο.
- Το παράσιτο είναι δυνατό να προσβάλει ψάρια πολύ μικρού μεγέθους M.B. 2g.
- Η εντερομύξωση εμφανίζεται την άνοιξη και παρουσιάζει έξαρση το καλοκαίρι.
- Η εξέλιξη της ασθένειας είναι ραγδαία και οι θνησιμότητες αυξάνονται ξαφνικά.
- Η επίδραση της θερμοκρασίας στην εξέλιξη της εντερομύξωσης είναι καθοριστική επηρεάζοντας την έξαρσή της ασθένειας.
- Η qPCR αποτελεί ένα σημαντικό και αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο, που επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ασθένειας σε πολύ αρχικά στάδια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

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

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. (1993) Pathology of Myxosporea in marine fish culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17: 229-238

Athanassopoulou F. (2001) The most important parasitic diseases in marine cultured fish in Greece. *Bull Hel Vet Med Soc*, 52(1): 9-17

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

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611–622

Beaman H.J., Speare D.J., Brimacombe M. (1999) Regulatory effects of water temperature on *Loma salmonae* (microspora) development in rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(3): 237-245

Bretagne S., Costa J. (2006) Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2): 221-228

Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83: 575-583

Cavender W.P., Wood J.S., Powell M.S., Overturf K., Cain K.D. (2004) Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) to identify *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*, 60(3): 205-213

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 seabream *Diplodus puntazzo* C. and common seabream *Pagrus pagrus* L. (Sparidae). IV International Symposium of Fish Parasitology, Munich, Germany Oct. 1995. Program and Book Abstract, Abs., vol. 8

Diamant A. (1997) Fish -to-fish transmission of a marine myxospor- 563 ean. *Dis. Aquat. Org.* 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., Wajsbrodt N. (1997) Experimental transmission of *Myxidium leei* in gilt head seabream *Sparus aurata*. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 17(3/4): 99–103
- 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., Ram S., Paperna I. (2006) Experimental transmission of *Enteromyxum leei* to freshwater fish. Diseases of Aquatic Organisms, 72: 171–178
- EFSA (2009) General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish. Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. The EFSA Journal, 954: 1-27
- El-Matbouli M., Fischer-Scherl T., Hoffmann R.W. (1992) Present knowledge of the life cycle, taxonomy, pathology and therapy of some Myxosporidia important for freshwater fish. Annual Review of Fish Diseases, 2: 367-402
- Estensoro Itziar, M., Redondo J., Alvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. (2010) Novel horizontal transmission route for *Enteromyxum leei* (Myxozoa) by anal intubation of gilthead sea bream *Sparus aurata*. Diseases of aquatic organisms, 92(1): 51-58
- FAO (2009) Fisheries and Aquaculture Statistics, p. 231
- Fiest S.W. (1997) Pathogenicity of renal myxosporeans of fish. Bulletin of European Association of Fish Pathologists, 17:209-214
- Fleurance R., Sauvegrain C., Marques A., Le Breton A., Guereaud C., Cherel Y., Wyers M. (2008) Histopathological changes caused by *Enteromyxum leei* infection in farmed sea bream *Sparus aurata*, Diseases of aquatic organisms, 79(3): 219-228
- Fox M.D., Palenzuela O., Bartholomew J.L. (2000) Strategies for the diagnosis of *Ceratomyxa shasta* using the polymerase chain reaction: Comparison of lethal and nonlethal sampling with microscopic examination. Journal of Aquatic Animal Health, 12(2): 100-106
- Golomazou E., Athanassopoulou F., Karagouni E., Tsagozis P., Tsantilas H., Vagianou S. (2006a) Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dykova, 1994 in sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters. Aquaculture, 260(1-4): 44-53
- Golomazou E., Athanassopoulou F., Karagouni E., Vagianou S., Tsantilas H., Karamanis D. (2006b). Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drug treatment on *Enteromyxum leei* infections in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* C.). Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 58(3): 157-169
- Hallett S.L., Bartholomew J.L. (2006) Application of a real-time PCR assay to detect and quantify the myxozoan parasite *Ceratomyxa shasta* in river water samples. Diseases of aquatic organisms, 71(2): 109-118
- 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
- Higgins M.J., Kent M.L. (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

- Hunt P.W. (2011) Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Veterinary parasitology*, 180(1-2): 12-46
- Ibarra A.M., Hedrick R.P., Gall G.A.E. (1992) Inheritance of susceptibility to *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) in rainbow trout and the effect of length of exposure on the liability to develop ceratomyxosis. *Aquaculture*, 104(3-4): 217-229
- Jadwiga G. (1991) *Marine fish parasitology, an outline*. Polish Scientific Publishers, Warszawa
- Karagouni E., Athanassopoulou F., Lytra A., Komis C., Dotsika E. (2005) Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*. *Veterinary parasitology*, 134(3-4): 215-228
- Katharios P., Rigos G., Divanach P. (2011) *Enteromyxum leei* (Myxozoa), a Lethal Intruder of Tropical Pet Fish: First Case in Humphead Wrasse, *Cheilinus undulatus* (Rüppell, 1835). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 20(2): 138-143
- Kelley G.O., Zagmutt-Vergara F.J., Leutenegger C.M., Myklebust K.A., Adkison M.A., McDowell T.S., Marty G.D., Kahler A.L., Bush A.L., Gardner I.A., Hedrick R.P. (2004) Evaluation of five diagnostic methods for the detection and quantification of *Myxobolus cerebralis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 16(3): 202-211
- Kent M.L., Dawe S. (1994) Efficacy of fumagillin DCH against experimentally induced *Loma salmonae* infections. *Diseases of Aquatic Organisms*, 20: 231-233
- Kent M., Andree K.B., Bartholomew J.L., El-Matbouli M., Desser S.S., Devlin R.H., Feist S.W., Hallet S.L., Hedrick R.P., Hoffmann R.W., Khattra J., Lester R.J.G., Longshaw M., Palenzuela O., Xiao L. (2001) Recent advances in our knowledge of Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 48: 395-413
- Koo K., Jaykus L.A. (2000) Selective amplification of bacterial RNA: use of a DNA primer containing mismatched bases near its 3' terminus to reduce falsepositive signals. *Letters App. Microbiol.*, 31: 187-192
- Le Breton A., Marques A. (1995) Occurrence of an histozoic *Myxidium* infection in two marine culture species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 15(6): 210-212
- Lom J., Noble E.R. (1984) Revised classification of the Myxosporea Bütschli, 1881. *Folia Palasitologica*, 31: 193-205
- Lom J., Dyková I. (1995) Myxosporea (Phylum Myxozoa). In: Woo PTK (ed) *Fish diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infection*. Cab International UK, p 97
- Marino F., Macri D., Paruta S., Busalacchi B., Genovese L. & De Vico G. (2004) Black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*) a new susceptible host for *Myxidium leei*. *Extended Abstracts and Short Communications Booklet, Aquaculture Europe 2004, Barcelona, Spain, European Aquaculture Society Special Publication No. 34*, pp. 524-525
- 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 the European Association of Fish Pathologists*, 25: 140-147

- 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
- Montero F., Cuadrado M., Padros F., et al (2007) *Cryptocaryon irritans* and *Enteromyxum leei*, two threats for the culture of *Diplodus puntazzo* in the Mediterranean. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 27: 242-247
- Muñoz P., Cuesta A., Athanassopoulou F., Golomazou H., Crespo S., Padrós F., Sitjà-Bobadilla A., Albiñana G., Esteban M.A., Alvarez-Pellitero P. & Meseguer J. (2007) Sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) humoral immune response against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa), *Fish and Shellfish Immunology*, 23(3): 636-645
- Murray T.S., Cappello M. (2008) The molecular diagnosis of parasitic diseases, *Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(2): 163-164
- 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
- Noble E.R. (1966) Myxosporidia in deepwater fishes. *Journal of Parasitology* 52: 685-690
- Olson R.E. (1981) Effects of low temperature on the development of the microsporidan *Glugea stephani* in English sole (*Parophrys vetulus*). *Journal of wildlife diseases*, 17(4): 559-562
- Paabo S., Higuchi RG, Wilson AC. (1989) Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *Journal of biological Chemistry* 264: 9709-9712
- Padros F., Palenzuela O., Hispano C., Tosas O., Zarza C., Crespo S., Alvarez-Pellitero P. (2001) *Myxidium leei* (Myxozoa) infections in aquarium-reared Mediterranean fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 47(1): 57-62
- Palenzuela O., Agnetti F., Albiñana G., Alvarez-Pellitero P., Athanassopoulou F., Crespo S., Diamant A., Ghittino C., Golomazou E., Le Breton A., Lipshitz A., Marques A., Padrós F., Ram S., Raymond J. (2004) Applicability of PCR screening for the monitoring of *Enteromyxum leei* (myxozoa) infection in Mediterranean aquaculture: an epidemiological survey in sparids facilities. *Aquaculture Europe Meeting 2004, Biotechnologies for Quality*, p. 639-640
- Palenzuela O. (2006) Mixozoan infections in Mediterranean mariculture, *Parassitologia*, 48(1-2): 27-29
- Paperna I. (1998) Mariculture versus environment: risks and impacts. *Biologia Marina Mediterranea* 5: 381-389
- Paperna I. (1991) Diseases caused by parasites in the aquaculture of warm water fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 1:155-194
- Redondo J.M., Palenzuela O., Rianza A., Macías Á., Álvarez-Pellitero P. (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of Turbot *Scophthalmus maximus*. *J. Parasitol.* 88(3): 482-488

- Rigos G., Christophiliogiannis P., Yiagnisi M., Andriopoulou A., Koutsodimou M., Nengas I., Alexis M. (1999) Myxosporean infections in Greek mariculture. *Aquaculture International*, 7(5): 361-364
- Rigos G., Katharios P. (2010) Pathological obstacles of newly introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Rev Fish Bio Fisheries*, 20:47-70
- 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 P.N., Tarer V., Jacquemin D., Marques A. (1996) Présence en Méditerranée occidentale d'une Myxosporidie histozoïque pathogène dans les élevages de daurade, *Sparus aurata* L. *Ann Sci Natur Zool Paris*, 17: 123–127
- Shariff M., Soon S., Lee K.L., Tan LT (2000) Practical problems with PCR detection in Asia: The importance of standardization. *FAO Fisheries Technical Paper 395*: 45-51
- Sitjà-Bobadilla A., Diamant A., Palenzuela O., Álvarez-Pellitero P. (2007) Host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J Fish Dis* 29: 1–8
- Sitjà-Bobadilla A., Calduch-Giner J., Saera-Vila A., Palenzuela O., Álvarez-Pellitero P., Pérez-Sánchez J. (2008) Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish and Shellfish Immunology*, 24(5): 610-619
- Suarez M.B., Walsh K., Boonham N., O'Neill T., Pearson S., Barker I. (2005) Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 890–899
- Tijssen P. (1993) *Hybridisation with Nucleic Acid Probes*, Elsevier, Amsterdam, p. 613.
- Van Lieshout L., Verweij J.J. (2010) Newer diagnostic approaches to intestinal protozoa. *Current opinion in infectious diseases*, 23(5): 488-493
- Yamaguti S (1963). *Systema Helminthum* Vol. I-II. Interscience Publishers, New York.
- Yanagida T., Nomura Y., Kimura T., Fukuda Y., Yokoyama H. & Ogawa K. (2004) Molecular and morphological redescription of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathology* 39: 137–143
- Yanagida T., Freeman M.A., Nomura Y., Takami I., Sugihara Y., Yokoyama H., Ogawa K. (2005) Development of a PCR-based method for the detection of enteric myxozoans causing the emaciation disease of cultured tiger puffer. *Fish Pathology*, 40(1): 22-28
- Yanagida T., Sameshima M., Nasu H., Yokoyama H., Ogawa K. (2006) Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, 29: 561–567

Yanagida T., Yokoyama H., Palenzuela O., et al (2008) Myxosporean emaciation disease of cultured Red Sea Bream *Pagrus major* and spotted Knifejaw *Oplegnathus punctatus*. *Fish Pathol.*, 48:45-48

Yasuda H., Ooyama T., Iwata K., Tun T., Yokoyama H., Ogawa K. (2002) Fish to fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathol.*, 37: 29–33

Yasuda H., Ooyama T., Nakamura A., et al (2005) Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 40: 175-180

Yokoyama H., Urawa S. (1997) Fluorescent labelling of actinospores for determining the portals of entry into fish, *Diseases of aquatic organisms*, 30(3): 165-169

Yokoyama H., Kageyama T., Ohar K., Yanagida T. (2007) *Myxobolus nagaraensis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia) causes abdominal distension of freshwater goby *Rhinogobius* sp. or type from the Nagara River. *Fisheries Science*, 73(3): 633-639

Yokoyama H., Kageyama M., Yanagida T., Ogawa K. (2009) Seawater survival of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) evaluated by in vitro viability and in vivo infectivity assays. *Fish Pathology*, 44(4): 172-177

Zrncic S., Oraic D., Sostaric B., Fillic I. (1998) First occurrence of *Myxidium leei* in cultivated sharp snouted sparus (*Puntazzo puntazzo*) in Croatia. 3rd International Symposium on Aquatic Animal Health, Baltimore, MD

Ελληνική βιβλιογραφία

Λύτρα Κ. (1997) Πειραματική μόλυνση σε *Puntazzo puntazzo* μολυσμένα με μυξοσπορίδια. *Αλιευτικά Νέα*, 195: 56-59

Αθανασοπούλου Φ., Πράπας Α., Σαββίδης Γ., Χριστοφιλογιάννης Π. (2000) Νοσήματα ευρύαλων ψαριών και οστρακοειδών οφειλόμενα σε παράσιτα. Σε: Πρακτικός Οδηγός ασθενειών εκτρεφόμενων ψαριών και οστρακοειδών. Έκδοση Υπουργείου Γεωργίας, Διεύθυνση Αλιευτικών Εφαρμογών και Εισροών Αλιευτικής Παραγωγής, Αθήνα, σελ. 75

Γκολομάζου Ε., Καραγκούνη Ε., Αθανασοπούλου Φ. (2004) Τα κυριότερα Μυξοσπορίδια παράσιτα των εκτρεφόμενων Μεσογειακών ψαριών. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*, 55(4): 342-352

Γκολομάζου Ε. (2007) Μελέτη της εποχικότητας και ποσοστού μόλυνσης των Μυξοσποριδίων σε άγριους πληθυσμούς θαλάσσιων ψαριών και μελέτη ορισμένων ανοσολογικών παραγόντων της έμφυτης ανοσίας σε πειραματικές μολύνσεις χιόνας (*Diplodus puntazzo* C.) με το παράσιτο *Enteromyxum leei*. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 300

ABSTRACT

The myxosporean parasite *Enteromyxum leei* is an important pathogen of the Sparidae family which has a negative economic impact on fish farming throughout the Mediterranean Sea. Since 1995, when enteromyxosis was first reported in Hellas, significant losses in cultured sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo* C.) have been recorded, raising questions about its viable farming. The aim of the present study was the determination of farms' monitoring for enteromyxosis significance on a time-scale schedule basis and the development of a validated diagnostic technique for *Enteromyxum leei* early detection and quantification (qPCR assay).

20 fish (sharpsnout seabream) were collected each month from the same sea cage (April to August 2010). During the experimental procedure, temperature and mortality data were daily recorded. Fish were examined for parasites based on fresh smears microscopic observation and a molecular diagnostic technique. According to the results of the present study small fish (M.W. 2g) can be infected. Enteromyxosis appears during spring while outbreak occurs during summer. The initial stage of the infection is deemed as the most critical point for its development and control and it is proven to coincide with fish accession in sea cages. Myxozoan infection is affected by water temperature while prevalence and mortality rate are rapidly increased. During July prevalence was increased to 45% (water temperature: 24 °C) while during August mortality rate was increased to 19% (water temperature: 25,5 °C). The development of a sensitive, specific and rapid assay like qPCR for *E. leei* detection, would allow the identification of all developmental stages of the parasite throughout its life cycle significantly before outbreak occurs, compared to traditional parasitological technique. Monitoring of sharpsnout sea bream farms for enteromyxosis on a time-scale scheduled

basis by a validated diagnostic technique (qPCR assay), could become the key tool for the control of this infectious disease and could allow stakeholders to adopt all necessary precautionary measures minimizing economic loss in intensive fish farming.

Key words: enteromyxosis, sharpsnout seabream, early diagnosis, qPCR