



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Μεσογειακή Υδατοκαλλιέργεια

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

"Επίδραση διατροφικών πρόσθετων στην παρασίτωση της τσιπούρας από το παράσιτο

Enteromyxum leei"

Γεώργιος Ντε Βρις

Βόλος 2024

Επίδραση διατροφικών πρόσθετων στην παρασίτωση της τσιπούρας από το παράσιτο *Enteromyxum leei*

Επίδραση διατροφικών πρόσθετων στην παρασίτωση της τσιπούρας από το παράσιτο *Enteromyxum leei*

(Effect of food additives on enteromyxosis in gilthead seabream)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ε. Γκολομάζου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Π.Θ.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Γκολομάζου Ελένη, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΠΘ, Επιβλέπουσα.
- 2) Παναγιωτάκη Π., Υδατοκαλλιέργιες, Καθηγήτρια ΠΘ, Μέλος.
- 3) Καραπαναγιωτίδης Ι., Διατροφή Υδροβίων Ζωϊκών Οργανισμών, Αν. Καθηγητής ΠΘ, Μέλος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επιβλέπουσά μου, Δρ Ε. Γκολομάζου, η οποία μου έδωσε την δυνατότητα να ξεκινήσω μαζί της αυτή τη Διπλωματική Εργασία. Μου πρόσφερε μια προοπτική, καθορίζοντας έτσι την μελλοντική μου πορεία και τις μελλοντικές μου επιλογές. Την ευχαριστώ επίσης για την άριστη καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας και της συγγραφής της εργασίας, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις υποδείξεις.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, για την πρόθυμη συνδρομή τους τόσο σε επιστημονικά όσο και σε τεχνικά θέματα που με απασχολούσαν. Ευχαριστώ επίσης την κα Ε. Αντωνιάδου, για την συμβολή της στη διεξαγωγή των απαραίτητων πειραμάτων και μετρήσεων.

Επιθυμώ τέλος να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένειά μου, που στάθηκε το στήριγμά μου σε όλη την πορεία των σπουδών μου. Τους γονείς μου, Ρέινολντ και Σωτηρία, που με την αμέριστη αγάπη, φροντίδα και συμπαράστασή τους ήταν δίπλα σε κάθε βήμα μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την μητέρα μου, που δεν με άφησε ποτέ να απογοητευτώ και με την εμπειρία της συνέβαλλε επιστημονικά στην εργασία αυτή. Επίσης, τον αδελφό μου, Αλέξανδρο, που με παρότρυνε και με ενθάρρυνε κάθε στιγμή.

Περίληψη

Η παρούσα εργασία μελέτησε την επίδραση διατροφικών πρόσθετων στην παρασίτωση της τσιπούρας από το παράσιτο *Enteromyxum leei*.

Το μυξοσπορίδιο παράσιτο *Enteromyxum leei* ανιχνεύτηκε σε νωπά παρασκευάσματα οπίσθιου τμήματος του εντέρου τα οποία εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Το ποσοστό προσβολής της παρασίτωσης αξιολογήθηκε σε τυχαία δείγματα ($n = 10$) από κάθε πειραματική ομάδα (Α, 2Α, Β, 2Β, Γ, Δ) και ομάδα ελέγχου (ΟΕ), σε κάθε χρονικό σημείο. Η ένταση της παρασίτωσης από *E. leei* εκτιμήθηκε επίσης με τον αριθμό μυξοσποριδίων που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο, σε ξέσματα οπίσθιου τμήματος του εντέρου των δειγμάτων από κάθε πειραματική ομάδα ($n = 10$) σε κάθε χρονικό σημείο. Λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των παρασίτων που παρατηρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο, η ένταση της μόλυνσης από *E. leei* ταξινομήθηκε σε 4 επίπεδα: 1+ (1-5 παράσιτα/ οπτικό πεδίο), 2+ (5-10 παράσιτα/ οπτικό πεδίο), 3+(10-15 παράσιτα/ οπτικό πεδίο) και 4+ (> 15 παράσιτα/ οπτικό πεδίο).

Από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι οι διατροφικές παρεμβάσεις επηρέασαν την εξέλιξη της παρασίτωσης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το ποσοστό προσβολής και η έντασης της παρασίτωσης φάνηκε να μεταβάλλονται διαφορετικά για κάθε πειραματική ομάδα σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, με το πέρασμα των ημερών προέκυψε μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης για κάθε πειραματική ομάδες πλην της ΟΕ.

Abstract

The present work studied the effect of nutritional additives on the parasitism of sea bream by the parasite *Enteromyxum leei*.

The myxosporidian parasite *Enteromyxum leei* was detected in fresh hindgut preparations (scrapings) which were examined under an optical microscope. Parasitism infestation rate was assessed in random samples (n = 10) from each experimental group (A, 2A, B, 2B, C, D) and control group (OE), at each time point. The intensity of *E. leei* parasitism was assessed by the number of myxosporidia counted per field of view, in hindgut swabs of samples from each experimental group (n = 10) at each time point. Considering the number of parasites observed per field of view, the intensity of *E. leei* infection was classified into 4 levels: 1+ (1-5 parasites/field of view), 2+ (5-10 parasites/field of view), 3+(10-15 parasites/field of view) and 4+ (> 15 parasites/field of view).

From the present study it emerged that the nutritional interventions affected the infestation rate of the experimental fish in contrast to the control group.

Also, it emerged that the infestation rate and the intensity of parasitism vary differently for each experimental group in contrast to the control group. More specifically, with the passage of days there was a decrease in the infestation rate and the intensity of parasitism for each experimental group except OE.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract	6
Κατάλογος εικόνων	7
1) Εισαγωγή	8
2) <i>Enteromyxum leei</i>	10
2.1 Ταξινόμηση	10
2.2 Παθολογία και κλινικά σημεία	10
2.3 Επιπτώσεις	11
2.4 Διάγνωση	12
2.5 Θεραπείες	12
2.6 Άλλες στρατηγικές ελέγχου	13
2.7 Έρευνα	14
3) Μεθοδολογία	15
4) Αποτελέσματα	17
5) Συζήτηση- Συμπεράσματα	21
6) Βιβλιογραφία	26

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής των πειραματικών ψαριών στη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης. Η ημέρα 0 αντιστοιχεί στην ημέρα έναρξης χορήγησης των διατροφικών παρεμβάσεων.....	17
Εικόνα 2. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης για την κάθε πειραματική ομάδα. Η ημέρα 0 αντιστοιχεί στην ημέρα έναρξης χορήγησης των διατροφικών παρεμβάσεων.....	19

1) Εισαγωγή

Το *Enteromyxum leei* είναι ένα είδος μυξόζωου, ιστοζωικού παρασίτου που μολύνει την εντερική οδό και μερικές φορές συναφή όργανα, όπως η χοληδόχος κύστη και το ήπαρ, αρκετών ειδών τελεοστεων ιχθύων. Τα μυξόζωα είναι μικροσκοπικά μετάζωα. Τα στάδια παρασίτου αυτού του είδους ζουν στον έντερο των ψαριών (Carla Piazzon et al., 2018).

Το *E. leei* έχει μεγάλο εύρος ξενιστών και γεωγραφικό εύρος στα θαλάσσια ψάρια (τουλάχιστον 60 είδη από 22 διαφορετικές οικογένειες) και ακόμη και τα ψάρια του γλυκού νερού έχουν μολυνθεί πειραματικά. Το *E. leei* εμφανίστηκε αρχικά στη Μεσόγειο στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και πιστεύεται ότι εισήχθη στην Ερυθρά Θάλασσα. Η παθογένειά του και ο οικονομικός αντίκτυπός του εξαρτώνται από το είδος ξενιστή. Στην τσιπούρα, εκδηλώνεται ως χρόνια νόσος που προκαλεί ανορεξία, καθυστερημένη ανάπτυξη με απώλεια βάρους, καχεξία, μειωμένη εμπορευσιμότητα και αυξημένη θνησιμότητα. Σε άλλα είδη, δεν προκαλεί σοβαρά συμπτώματα. Στην χιόνα, η μόλυνση έχει ως αποτέλεσμα πολύ υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, τα οποία

έχουν ωθήσει τους ιχθυοκαλλιεργητές να εγκαταλείψουν την καλλιέργεια αυτού του είδους ψαριών (Shin et al., 2018a).

Σκοπός της διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης, της προσθήκης ανοσοενισχυτικών διατροφικών πρόσθετων στο σιτηρέσιο της τσιπούρας για τον περιορισμό της παρασίτωσης από το παράσιτο *Enteromyxum leei*. Στις εργαστηριακές αναλύσεις έγινε εκτίμηση του επιπέδου της παρασίτωσης και υπολογίστηκε το ποσοστό προσβολής και η ένταση στις διαφορετικές διατροφικές ομάδες (Sekiya et al., 2016). Από την διατριβή αναμένεται να προκύψουν συμπεράσματα που θα συσχετίσουν καινοτόμα διατροφικά πρωτόκολλα την εντερομύξωση των εκτρεφόμενων ιχθύων και θα μπορούν να αξιοποιηθούν για την καλύτερη εφαρμογή τους σε πραγματικές συνθήκες.

2) *Enteromyxum leei*

2.1 Ταξινόμηση

Το *Enteromyxum leei* προηγουμένως περιγραφόταν ως *Myxidium leei*, και αρχικά αναφέρθηκε σε καλλιεργημένη τσιπούρα (GSB) (*Sparus aurata*) από τη νότια Κύπρο. Η μορφολογία των μυξοσπορίων αυτού του παρασίτου διαφέρει ελαφρώς από τα άλλα της οικογένειας Myxidiidae: οι πολικές κάψουλες βρίσκονται στα άκρα και είναι επιμήκεις και όχι υποσφαιρικές (όπως στο *Myxidium*). Σήμερα, το γένος αποτελείται από μόνο τρία εντερικά είδη από ξενιστές θαλάσσιων ψαριών: *E. leei*, *E. scopththalmi* και *E. fugu* (Carla Piazzon et al., 2018).

2.2 Παθολογία και κλινικά σημεία

Οι συνήθεις παρατηρήσεις πεδίου περιλαμβάνουν απώλεια όρεξης, χαμηλούς ρυθμούς μετατρεψιμότητας της τροφής και δυσκολίες στην επίτευξη εμπορικού μεγέθους. Προκαλεί καχεξία και εξασθένιση που γίνεται καλύτερα αντιληπτή σε υποχρόνιες λοιμώξεις σε ήπιες θερμοκρασίες, με τα νεκρά ψάρια να εμφανίζονται συνήθως καχεκτικά. Η εξασθένιση μπορεί να είναι ανεπαίσθητη σε πολύ ευαίσθητα είδη ή/και σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ. λοιμώξεις από *D. puntazzo* με *E. leei*), γιατί τα ψάρια πεθαίνουν πριν φτάσουν σε καχεκτική κατάσταση. Κατά την ανατομή, τα μακροσκοπικά σημάδια περιλαμβάνουν εντερική εστιακή συμφόρηση και αιμορραγίες, και μπορεί να φαίνεται εύθραυστο και ημιδιαφανές, συχνά γεμάτο με βλενώδες υγρό με μειωμένες περισπλαχνικές εναποθέσεις λίπους, ωχρά εσωτερικά όργανα και περιστασιακά πράσινο ήπαρ. Οι διευρυμένες ή ασυνήθιστα χρωματισμένες χοληδόχοι κύστη είναι συχνές σε ορισμένους ξενιστές (π.χ. *D. puntazzo*) (Álvarez-Pellitero P et al., 2008).

Η ιστοπαθολογία δείχνει την παρουσία μυξοζωικών σταδίων που βρίσκονται μεταξύ των εντεροκυττάρων ή ελεύθερα στον αυλό με υπολείμματα σε σοβαρές λοιμώξεις. Αποσπώνται κομμάτια επιθηλίου που περιέχουν στάδια παρασίτου. Σε προχωρημένες λοιμώξεις με *E. leei*, το έντερο εμφανίζει υπερτροφία του υποβλεννογόνιου ελάσματος και απώλεια της επιθηλιακής δομής, μαζί με έντονη τοπική φλεγμονώδη απόκριση. Αυτές οι εντερικές αλλαγές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών. Η φλεγμονώδης απόκριση ποικίλλει ανάλογα με τον ξενιστή. Γενικά, τα πιο ευαίσθητα είδη παρουσιάζουν πιο έντονη φλεγμονώδη απόκριση και η αποκόλληση του επιθηλίου συμβαίνει νωρίτερα στη μόλυνση (Álvarez-Pellitero P et al., 2008).

2.3 Επιπτώσεις

Οι επιπτώσεις της εντερομύξωσης εξαρτώνται από το είδος των ψαριών, τη θερμοκρασία του νερού και τον τύπο των εγκαταστάσεων που εμπλέκονται στις εγκαταστάσεις εκτροφής. Το *E. leei* αποτελεί απειλή για πολλά άλλα καλλιεργημένα ψάρια, όπως η χίονα, *Diplodus puntazzo*, *Pagellus bogaraveo*, *Pagrus pagrus*, *Pagrus major*. Ωστόσο, ο οικονομικός αντίκτυπος σε παγκόσμια κλίμακα είναι άγνωστος (Sekiya et al., 2016).

Η θερμοκρασία του νερού είναι ένας κρίσιμος παράγοντας κινδύνου για τη μετάδοση και την εμφάνιση της εντερομύξωσης. Έχει αποδειχθεί μια σαφής σχέση μεταξύ μόλυνσης και θερμοκρασίας νερού. Η εμφάνιση της νόσου καθυστερεί σε μεγάλο βαθμό ή ακόμη και καταστέλλεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 15 °C). Ωστόσο, η μόλυνση μπορεί να παραμείνει λανθάνουσα κατά τη διάρκεια της ψυχρότερης περιόδου μέσα στα ψάρια και να επανεμφανιστεί όταν αυξάνεται η θερμοκρασία του νερού. Αυτό έχει σημαντικές συνέπειες, αφού τα ψευδώς αρνητικά (κατά τη διάρκεια του χειμώνα) είναι πηγή του παρασίτου όταν αυξάνονται οι θερμοκρασίες του νερού.

Η εντερομύξωση έχει περιγραφεί σε όλους τους τύπους γεωργικών εγκαταστάσεων (δεξαμενές από σκυρόδεμα/PVC, χωμάτινες λίμνες, θαλάσσια

κλουβιά). Σε χερσαίες εγκαταστάσεις τσιπούρας, άλλοι παράγοντες κινδύνου ή επιβαρυντικοί παράγοντες περιλαμβάνουν: (i) κακή ανταλλαγή νερού και/ή εκ νέου πρόσληψη μολυσμένου νερού εκροής, (ii) συστήματα ανακυκλοφορίας, (iii) παρατεταμένη περίοδος καλλιέργειας απαραίτητη για την παραγωγή μεγάλων ψαριών και (iv) ηλικία/μέγεθος ψαριών κατά την είσοδο σε θαλάσσια κλουβιά. Άλλοι συγγραφείς θεωρούν ότι η εντερομύξωση σχετίζεται με την υπερβολική σίτιση και τη χρήση διαίτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Μια διαίτα που περιείχε φυτικά έλαια ως κύρια πηγή λιπιδίων προκάλεσε χειρότερη έκβαση της νόσου στη χίονα, και αλλαγή από φυτοφάγα σε σαρκοφάγα διαίτα. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο μοναδικός τρόπος οριζόντιας μετάδοσης ευνοεί την εξάπλωση των εντερομυξώσεων σε καλλιεργημένα αποθέματα ψαριών (Sekiya et al., 2016).

2.4 Διάγνωση

Η εντερομύξωση δεν μπορεί να διαγνωστεί απευθείας από τα κλινικά συμπτώματα, καθώς αυτά είναι μη ειδικά. Η διάγνωση συνήθως συνίσταται στην ανίχνευση σπορίων *Enteromyxum* ή άλλων πολλαπλασιαστικών σταδίων σε επιχρίσματα του εντέρου, είτε σε νωπά παρασκευάσματα είτε με χρώση. Η ανίχνευση των σταδίων ανάπτυξης σε επιχρίσματα είναι δύσκολη και απαιτεί σημαντική εμπειρία. Ωστόσο, όταν το παράσιτο είναι σε χαμηλή ένταση η μόλυνση μπορεί να παραλειφθεί.

Πιο πρόσφατα, PCR και *in situ* υβριδισμό (ISH) έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση της εντερομύξωσης. Έχει αναπτυχθεί μια μη θανατηφόρα διαδικασία δειγματοληψίας για την ανίχνευση του *E. leei* με PCR με λήψη δείγματος από το ορθό. Αυτή η διαδικασία έχει υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια (Carla Piazzon et al., 2018).

2.5 Θεραπείες

Επί του παρόντος δεν υπάρχουν εγκεκριμένες θεραπείες για το *E. leei* (Shin et al., 2018a).

2.6 Άλλες στρατηγικές ελέγχου

Η πρόληψη είναι η κύρια εστίαση για τη διαχείριση του *E. leei*. Μόλις εγκατασταθεί το παράσιτο, απαιτούνται επιθετικές ενέργειες που περιλαμβάνουν εξάλειψη μολυσμένων ψαριών, απολύμανση δεξαμενών, θαλάσσιων κλουβιών, λίμνες ξήρανσης κ.λπ (Sekiya et al., 2016).

Καθώς αυτό το παράσιτο δεν μπορεί να επιβιώσει στο γλυκό νερό, έχει προταθεί θεραπεία υποαλατότητας για τον έλεγχο της μόλυνσης. Ορισμένα διατροφικά πρόσθετα έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν τα επίπεδα λοιμώξεων ή/και ορισμένα σημάδια ασθένειας, όπως η απώλεια βάρους (Carla Piazzon et al., 2018).

2.7 Έρευνα

Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας που διεξήχθη σε αυτό το παράσιτο έχει επικεντρωθεί στην τσιπούρα και, πιο πρόσφατα, στο *Paralichthys olivaceus*.

Πρόσφατες προσπάθειες έχουν επικεντρωθεί στη λήψη μεταγραφικών δεδομένων για την εύρεση υποψηφίων εμβολίων και θεραπευτικών στόχων, στην αποκρυπτογράφηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή και στην εύρεση πιθανών διατροφικών λύσεων. Επιπλέον, διεξάγονται επιδημιολογικές μελέτες στη λεκάνη της Μεσογείου για τον προσδιορισμό της πραγματικής επίδρασης της εντερομύξωσης και των παραγόντων ξενιστή/εκμετάλλευσης που ενισχύουν ή μετριάζουν την επέκτασή της.

Όσον αφορά την ανοσολογική απόκριση στην εντερομύξωση της χιόνας, οι ανοσοσφαιρίνες ορού, η λυσοζύμη, οι υπεροξειδάσες και το συμπλήρωμα περιλαμβάνονται στη χημική απόκριση, και τα Β κύτταρα, τα Τ κύτταρα, και τα μελανομακροφάγα δρουν τοπικά και συστηματικά κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης.

Η χρόνια έκθεση στο παράσιτο διεγείρει την έκφραση γονιδίων που σχετίζεται με τη σηματοδότηση ιντερφερόνης, τα αντιγόνα και την παρουσίαση στο έντερο εκτεθειμένων μη παρασιτικών ψαριών, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει την τοπική ενεργοποίηση μηχανισμών ανοσολογικής αντίστασης κατά της μόλυνσης.

Αύξηση των κέντρων των μελανομακροφάγων του σπλήνα κατά τη διάρκεια της εντερομύξωσης μπορεί επίσης να υποδηλώνει την έναρξη μιας επίκτητης ανοσολογικής απόκρισης. Η έκφραση της ιντερλευκίνης (IL) κατά τη διάρκεια της εντερομύξωσης διαμορφώνεται από ένα προφλεγμονώδες σε ένα αντιφλεγμονώδες προφίλ και αυτή η μετατόπιση προφανώς καθοδηγείται από την αύξηση της IL10. (Shin et al., 2018a)

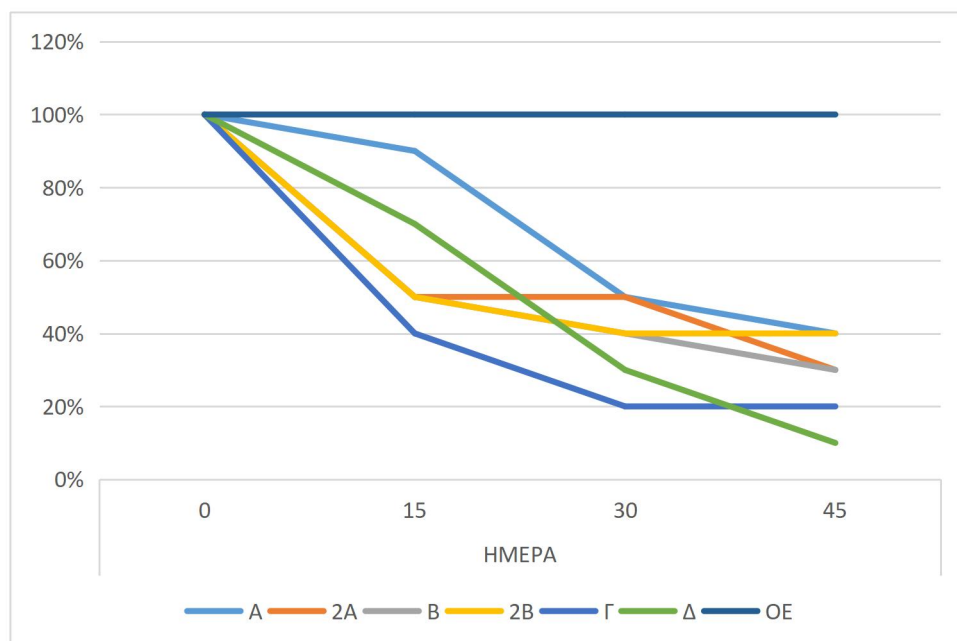
3) Μεθοδολογία

Το μυξοσπορίδιο παράσιτο *Enteromyxum leei* ανιχνεύτηκε σε νωπά παρασκευάσματα οπίσθιου εντέρου (ξέσματα) τα οποία εξετάστηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Το ποσοστό προσβολής της παρασίτωσης αξιολογήθηκε σε τυχαία δείγματα ($n = 10$) από κάθε πειραματική ομάδα (Α, 2Α, Β, 2Β, Γ, Δ) και ομάδα ελέγχου (ΟΕ), σε κάθε χρονικό σημείο. Χρησιμοποιήθηκαν 6 τροφές που περιείχαν μίγμα αιθέριων ελαίων: Α, 2Α, Β, 2Β, Γ και Δ. Η τροφή Α περιείχε ένα εμπορικό σκεύασμα (Α) που αποτελούνταν από μίγμα αιθέριων ελαίων και συγκεκριμένα από έλαιο ρίγανης (*Origanum* sp.), έλαιο γαρυφάλλου (*Eugenia* sp.), έλαιο κανέλας (*Cinnamomum* sp.) και έλαιο θυμαριού (*Syzygium* sp.). Η τροφή 2Α περιείχε τη διπλάσια δόση του μίγματος αιθέριων ελαίων συγκριτικά με την τροφή Α. Η τροφή Β περιείχε ένα εμπορικό σκεύασμα (Β) που αποτελούνταν από το ίδιο μίγμα αιθέριων ελαίων αλλά σε διαφορετικές αναλογίες (άγνωστες για τους συγγραφείς). Η τροφή 2Β περιείχε τη διπλάσια δόση του μίγματος αιθέριων ελαίων συγκριτικά με την τροφή Β. Η τροφή Γ περιείχε μισή ποσότητα από το σκεύασμα Α και μισή από το σκεύασμα Β, ενώ η τροφή Δ περιείχε πάλι μισή ποσότητα από το σκεύασμα Α και μισή από το σκεύασμα Β, αλλά ήταν της μορφής μικροενθυλάκωσης (micro encapsulation).

Η ένταση της παρασίτωσης από *E. leei* εκτιμήθηκε με τον αριθμό μυξοσποριδίων που μετρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο, σε ξέσματα οπίσθιου εντέρου των δειγμάτων από κάθε πειραματική ομάδα ($n = 10$) σε κάθε χρονικό

σημείο. Λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των παρασίτων που παρατηρήθηκαν ανά οπτικό πεδίο, η ένταση της μόλυνσης από *E. leei* ταξινομήθηκε σε 4 επίπεδα: 1+ (1-5 παράσιτα/ οπτικό πεδίο), 2+ (5-10 παράσιτα/ οπτικό πεδίο). 3+(10-15 παράσιτα/ οπτικό πεδίο) και 4+ (> 15 παράσιτα/ οπτικό πεδίο).

4) Αποτελέσματα



Εικόνα 1. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής των πειραματικών ψαριών στη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης. Η ημέρα 0 αντιστοιχεί στην ημέρα έναρξης χορήγησης των διατροφικών παρεμβάσεων.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι οι διατροφικές παρεμβάσεις επηρέασαν το ποσοστό προσβολής των πειραματικών ψαριών σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου, στην οποία το ποσοστό προσβολής παραμένει αμετάβλητο σε κάθε χρονικό σημείο της μελέτης.

Τα ψάρια της ομάδας Γ παρουσίασαν την πιο ραγδαία μείωση του ποσοστού προσβολής τους από *E. leei* έως τη 15^η ημέρα, ενώ στο διάστημα μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας συνεχίζει να μειώνεται με μικρότερο ρυθμό ως την τιμή 40%. Στη συνέχεια, από την 30 ημέρα και ως τη λήξη της μελέτης το ποσοστό προσβολής σταθεροποιείται στο 20%.

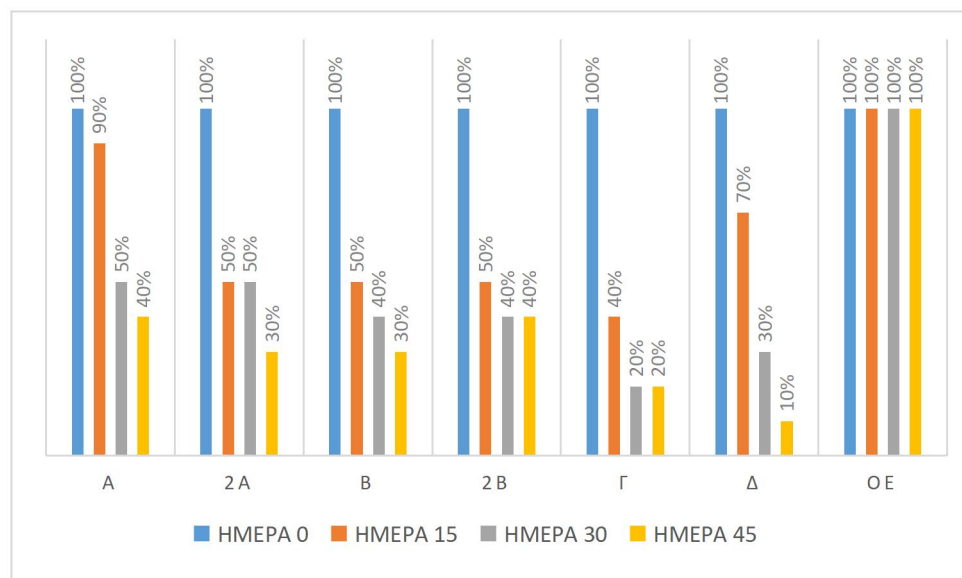
Τα ψάρια των ομάδων 2A, B και 2B παρουσιάζουν την ίδια μείωση στο ποσοστό προσβολής τους από *E. leei* έως την 15^η ημέρα όταν φτάνουν σε ποσοστό 50%, ενώ στη συνέχεια διαφοροποιούνται. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό της ομάδας 2A σταθεροποιείται στο 50% για το χρονικό διάστημα μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας, ενώ στη συνέχεια μειώνεται μέχρι που φτάνει το 30%

την 45^η ημέρα παρατήρησης. Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό των ομάδων B και 2B συνεχίζουν να μειώνονται μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας, με μικρότερο όμως ρυθμό, ενώ από την 30^η ημέρα διαφοροποιούνται με το ποσοστό της ομάδας B να συνεχίζει να μειώνεται με τον ίδιο ρυθμό έως την 45^η ημέρα όταν φτάνει την τιμή 30% και το ποσοστό της ομάδας 2B να σταθεροποιείται στην τιμή 40%.

Το ποσοστό προσβολής των ψαριών της ομάδας Γ καταγράφει μία σχεδόν σταθερή μείωση έως την 30^η ημέρα παρατήρησης όταν φτάνει σε τιμή 30%, ενώ, στη συνέχεια, συνεχίζει να μειώνεται με μικρότερο ρυθμό έως την 45^η ημέρα όταν φτάνει στην τιμή 10%.

Τέλος, το ποσοστό προσβολής των ψαριών της ομάδας Α καταγράφει ένα μικρό ρυθμό μείωσης έως περίπου την 15^η ημέρα όταν φτάνει την τιμή 90%, στη συνέχεια συνεχίζει να μειώνεται κατά τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας μέχρι να φτάσει την τιμή 50%, ενώ, μετά την 30^η ημέρα μειώνεται ξανά ο ρυθμός μείωσής του έως την 45^η ημέρα όταν φτάνει την τιμή 40%.

Σημειώνεται ότι κατά την τελευταία ημέρα παρατήρησης (45^η ημέρα), τα ψάρια της ομάδας Γ καταγράφουν το μικρότερο ποσοστό προσβολής από το εξεταζόμενο παράσιτο, το οποίο ανέρχεται σε 10%, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής αντιστοιχεί στα ψάρια των ομάδων Α και 2B και ανέρχεται σε 40%.



Εικόνα 2. Μεταβολή του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης για την κάθε πειραματική ομάδα. Η ημέρα 0 αντιστοιχεί στην ημέρα έναρξης χορήγησης των διατροφικών παρεμβάσεων.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι το ποσοστό προσβολή και της έντασης της παρασίτωσης μεταβάλλεται διαφορετικά για κάθε πειραματική ομάδα σε αντίθεση με την ομάδα ελέγχου όπου τα δύο μεγέθη παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια του εξεταζόμενου διαστήματος. Πιο συγκεκριμένα, με το πέρασμα των ημερών προκύπτει μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης για κάθε πειραματική ομάδες πλην της ΟΕ.

Πιο αναλυτικά, για την ομάδα Α, καταγράφεται μία μικρή μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης μεταξύ της ημέρας 0, δηλαδή της ημέρας έναρξης χορήγησης των διατροφικών παρεμβάσεων και της 15^{ης} ημέρας, μία σημαντικότερη μείωση μεταξύ 15^{ης} και 30^{ης} ημέρας ενώ μία μικρή μείωση μεταξύ 30^{ης} και 45^{ης} ημέρας.

Για την ομάδα 2Α, καταγράφεται μία σημαντική μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης μεταξύ της ημέρας 0 και της 15^{ης} ημέρας, ενώ στο διάστημα μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας καταγράφεται σταθεροποίηση των προαναφερθέντων μεγεθών. Στο διάστημα μεταξύ

30^{ης}-45^{ης} ημέρας καταγράφεται εκ νέου μία μείωση των εξεταζόμενων μεγεθών.

Για την ομάδα Β καταγράφεται μία σημαντική μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης μεταξύ της ημέρας 0 και της 15^{ης} ημέρας, ενώ κατά τη διάρκεια των επόμενων διαστημάτων (15^η-30^η ημέρα και 30^η-45^η ημέρα) καταγράφονται μικρότερες μειώσεις των εξεταζόμενων ποσοστών.

Για την ομάδα 2B καταγράφεται μία σημαντική μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης μεταξύ της ημέρας 0 και της 15^{ης} ημέρας. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας καταγράφεται μία μικρή μείωση των εξεταζόμενων μεγεθών, ενώ κατά τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ 30^{ης}-45^{ης} ημέρας τα δύο μεγέθη παραμένουν σταθερά.

Για την ομάδα Γ καταγράφεται μία μεγάλη μείωση του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης μεταξύ της ημέρας 0 και της 15^{ης} ημέρας και μία ακόμα σημαντική μείωση κατά τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια του διαστήματος μεταξύ 30^{ης}-45^{ης} ημέρας, τα δύο μεγέθη σταθεροποιούνται σε χαμηλές τιμές.

Τέλος, για την ομάδα Δ καταγράφονται σημαντικές μειώσεις του ποσοστού προσβολής και της έντασης της παρασίτωσης σε όλα τα εξεταζόμενα διαστήματα, δηλαδή μεταξύ της ημέρας 0 και της 15^{ης} ημέρας, μεταξύ 15^{ης}-30^{ης} ημέρας και μεταξύ 30^{ης} -45^{ης} ημέρας.

Σημειώνεται ότι στο τέλος της παρατήρησης, οι μικρότερες τιμές των εξεταζόμενων μεγεθών αντιστοιχούν στην ομάδα Δ και οι μεγαλύτερες στις ομάδες Α και 2Β.

5) Συζήτηση- Συμπεράσματα

Το εντερικό μυξοσποριακό παράσιτο *Enteromyxum leei* προκαλεί σοβαρή εντερίτιδα στη τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Teleostei) που βλάπτει την απορρόφηση θρεπτικών ουσιών προκαλώντας ανορεξία και καχεξία. Στα ψάρια, όπως και στα χερσαία σπονδυλωτά, τα εντερικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την προσκολλημένη έκκριση βλέννας που επικαλύπτει τα επιθηλιακά κύτταρα, η οποία αποτελεί μια πρώτη γραμμή έμφυτης ανοσοποιητικής άμυνας ενάντια στους προσβλητικούς μικροοργανισμούς, αλλά χρησιμεύει επίσης ως υπόστρωμα και πηγή θρεπτικών συστατικών για τη συμπαθητική μικροχλωρίδα.

Όπως προκύπτει από τη διεθνή βιβλιογραφία τα ψάρια με το παράσιτο, σε σύγκριση με τα μη εκτεθειμένα ψάρια, παρουσιάζουν βλεννώδεις εντερικές εκκρίσεις με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκοπρωτεΐνη και βαθμό γλυκοζυλίωσης στο πρόσθιο και στο μέσο έντερο, ενώ τόσο η περιεκτικότητα σε γλυκοπρωτεΐνη όσο και ο βαθμός γλυκοζυλίωσης αυξάνουν στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου, και μάλιστα σημαντικά όσον αφορά στη συνολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες.

Στη διεθνή βιβλιογραφία μελετήθηκε η επίδραση μιας πρακτικής δίαιτας βασισμένης σε φυτικές πρωτεΐνες που περιέχει φυτικά έλαια ως την κύρια πηγή λιπιδίων στο βλεννογόνο υδατάνθρακα του εντέρου σε τσιπούρα *Sparus aurata* που προσβλήθηκε από το μυξοσποριακό παράσιτο *Enteromyxum leei* (Estensoro et al. 2012). Τα ψάρια που τρέφονταν για 9 μήνες είτε με δίαιτα ιχθυελαίου είτε με μείγμα φυτικών ελαίων στο 66% αντικατάστασης (δίαιτα 66VO) εκτέθηκαν σε νερό μολυσμένο με παράσιτα. Ελήφθησαν δείγματα του πρόσθιου, του μέσου και του οπίσθιου εντέρου (AI, MI και PI, αντίστοιχα) για διάγνωση παρασίτων και ιστοχημεία. Τα ψάρια κατηγοριοποιήθηκαν ως μάρτυρες (C, μη εκτεθειμένα), πρώιμα (E) ή όψιμα (L) μολυσμένα.

Η δίαιτα 66VO προκάλεσαν σημαντική μείωση της GC με ουδέτερες και όξινες βλεννίνες στο AI και MI, καθώς και σε εκείνες με καρβοξυλικές βλεννίνες και σιαλικό οξύ στο MI. Οι θειικές βλεννίνες και το σιαλικό οξύ ήταν λιγότερο άφθονα στην AI από ό,τι στους MI και PI στη θεραπεία με C-66VO. Η μόλυνση με *E. leei* είχε ισχυρή επίδραση στον αριθμό των GC, καθώς τα μολυσμένα με E και L ψάρια είχαν σημαντική μείωση των θετικών GC για όλες τις κηλίδες έναντι των ψαριών C στο PI. Παρατηρήθηκαν επίσης επιπτώσεις χρόνου και διαίτας, καθώς οι χαμηλότερες τιμές καταγράφηκαν κυρίως στα ψάρια E-66VO στο PI. Συμπερασματικά, αν και η μείωση του GC προκλήθηκε κυρίως από εντερομύξωση, παρατηρήθηκε επίδραση της διαίτας. Έτσι, η διατροφή μπορεί να είναι ένας προδιαθεσικός παράγοντας που επιδεινώνει την πορεία της νόσου. Από την παραπάνω μελέτη προέκυψε ότι οι αλλαγές στη σύνθεση της βλεννογόνου και αφθονία GC στα πρόσθια και μεσαία τμήματα του εντέρου της τσιπούρας που τρέφεται με τη διατροφή 66VO φαίνεται να είναι ένας από τους παράγοντες που καθιστούν αυτή τη δίαιτα ως προδιαθεσική αιτία που επιδεινώνει την πορεία της νόσου όταν τα ψάρια εκτίθενται στο *Enteromyxum leei*, το καταλυτικό αίτιο.

Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την διαπίστωση ότι ορισμένες λεκτίνες αναστέλλουν την προσκόλληση και την εισβολή των σταδίων του *E. Scophthalmi* στο εντερικό επιθήλιο του καλκανιού (Redondo & Alvarez-Pellitero 2010b), ανοίγουν τον δρόμο για την ανάπτυξη διαιτών, δυνητικά ικανών να προκαλέσουν αλλαγές στη βλεννογόνο του εντέρου των ψαριών, που αποτρέπουν την προσκόλληση και διείσδυση του παρασίτου. Συνεπώς, οι δίαιτες αυτές θα μπορούσαν να συμβάλουν στον έλεγχο της εντερομύξωσης.

Σε μια άλλη μελέτη, αξιολογήθηκαν οι επιδράσεις στην απόδοση ανάπτυξης, στην γονιδιακή έκφραση, στον εντερικό μικροβιόκοσμο και στην αντίσταση στις ασθένειες, χρησιμοποιώντας μια δίαιτα χωρίς FM (Piazzon et al. 2022). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές δίαιτες σε αυτό το πείραμα. Μια δίαιτα ελέγχου (CTRL) και μια πειραματική (NoPAP SANA).

Η δίαιτα ελέγχου (CTRL), περιείχε 10% άλευρα πουλερικών, 20% ιχθυάλευρα (FM) και 54,1% συστατικά φυτικής πρωτεΐνης. Η πειραματική δίαιτα (NoPAP SANA) διαμορφώθηκε ως δίαιτα χωρίς ιχθυάλευρα (FM) και αντιθέτως περιείχε 3% υδρολυμένα υποπροϊόντα υδατοκαλλιέργειας FM, 10% εντομοάλευρα, 15% μικροβιακή βιομάζα, που παράγεται μέσω της ζύμωσης του *Corynebacterium glutamicum* και του *Methylococcus capsulatus* και μειωμένη παροχή φυτικών πρωτεϊνικών πηγών (38%). Επίσης, στην δίαιτα CTRL χρησιμοποιήθηκαν ιχθυέλαια και φυτικά έλαια σε ποσότητες 4,9% και 7,9% αντίστοιχα ως κύριες διαιτητικές πηγές λιπιδίων, ενώ η δίαιτα NoPAP SANA περιείχε FO (2,5%), υποπροϊόντα σολομέλαιου (9,6%) και έλαιο φυκιών (1%) για την παροχή 2% EPA + DHA. Επιπλέον, η δίαιτα NoPAP SANA εμπλουτίστηκε με φωσφορικό μονοασβέστιο, L-τρυπτοφάνη, DL-μεθειονίνη και έναν παράγοντα υγείας του εντέρου SAN-ACORE®GM (0,5%) από την Adisseo (Dendermonde, Βέλγιο). Από αυτήν την μελέτη προέκυψε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στις παραμέτρους που σχετίζονται με τη λοίμωξη μεταξύ των ομάδων που τρέφονταν με δίαιτες CTRL και NoPAP SANA. Πάρα ταύτα παρατηρήθηκε ότι ο πολλαπλασιασμός του *E. leei* έδειξε να καταστέλλεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 30 °C (China et al., 2014).

Σε μια άλλη έρευνα, μελετήθηκαν οι καθυστερήσεις που προκάλεσε η παθητική ανοσοποίηση στο παράσιτο *E. leei* σε άτομα τσιπούρας (Amparo Picard-Sánchez et al. 2020). Συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να προσδιοριστεί εάν η παθητική ανοσοποίηση θα μπορούσε να βοηθήσει στην πρόληψη της εντερομύξωσης σε άτομα τσιπούρας (GSB) και να μελετηθεί λεπτομερώς η φύση αυτών των προστατευτικών αντισωμάτων. Στο πείραμα δόθηκε ορός με ειδικά για το παράσιτο αντισώματα (spAbs) σε ανθεκτικά (SUR) και σε μη ανθεκτικά (NAI) άτομα. Ο ορός δόθηκε εσωτερικά της περιτοναϊκής κοιλότητας (intracoelomically) 24 ώρες πριν από την έναρξη του πειράματος και 9 ημέρες μετά από την ολοκλήρωσή του (dpc). Η δοκιμή διήρκεσε για 23 ημέρες και στη συνέχεια οι ομάδες που έλαβαν τον ορό κατανεμήθηκαν σε ξεχωριστές δεξαμενές με καθαρό νερό. Μια μη-θανατηφόρα διάγνωση του *E. leei* πραγματοποιήθηκε στις 56 dpc. Κατά την τελική δειγματοληψία (100 dpc), συλλέχθηκαν αίμα, ορός και ιστοί για ιστολογία, μοριακή διάγνωση και την

ανίχνευση κυκλοφορούντων αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ψάρια που έλαβαν τον ορό με τα ειδικά για το παράσιτο αντισώματα (spAbs) μολύνθηκαν με το παράσιτο, αλλά παρουσίασαν χαμηλότερα συμπτώματα νόσου και ένταση μόλυνσης από τις άλλες ομάδες, υποδεικνύοντας μεταγενέστερη εγκατάσταση του παρασίτου. Παρ' όλα αυτά, τα ψάρια ήταν σε θέση να παράγουν επαρκή επίπεδα αντισωμάτων spAbs για να αποφευχθεί η επαναμόλυνση των επιζώντων ιχθύων καθώς και να προσδοθεί ορισμένος βαθμός προστασίας κατά την παθητική μεταφορά των αντισωμάτων.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη πάνω στην μετάδοση του *Enteromyxum leei* από ψάρι σε ψάρι, όπου παράμετροι όπως η θερμοκρασία του νερού, ο χρόνος έκθεσης και η πυκνότητα του πληθυσμού επηρέασαν τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας (Amparo Picard-Sánchez et al. 2020). Πραγματοποιήθηκαν δύο δοκιμές σε νερά εκροής σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε χαμηλή θερμοκρασία, η οποία ήταν σταθερή στους 18°C και σε υψηλή, με μέσο όρο 25,6°C. Επίσης, αυτές οι δοκιμές έγιναν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους έκθεσης στα υγρά απόβλητα (1, 3, 5 και 7 εβδομάδες) και σε διαφορετικές πυκνότητες πληθυσμών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 1 εβδομάδα ήταν αρκετή για να μολυνθεί το 100% των ψαριών σε υψηλή θερμοκρασία και το 58,3% σε χαμηλή θερμοκρασία. Όμως, αξίζει να σημειωθεί ότι η υψηλή θερμοκρασία όχι μόνο αύξησε την επικράτηση της λοίμωξης στο οπίσθιο έντερο, αλλά προκάλεσε επιπλέον υψηλότερη παραγωγή ειδικών αντισωμάτων, περιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο την εξέλιξη της λοίμωξης κατά μήκος του εντέρου. Επίσης, όσο μεγαλύτερος ήταν ο χρόνος έκθεσης στο παράσιτο και όσο υψηλότερες ήταν οι πυκνότητες των πληθυσμών, τόσο διευκόλυναν το *E. leei* να μολύνει τους ιχθύες. Συνεπώς, η αποτελεσματική διάγνωση, η μείωση της πυκνότητας των πληθυσμών και η απομάκρυνση των μολυσμένων ψαριών, αποτελούν βασικές πτυχές στη διαχείριση της συγκεκριμένης νόσου στις εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειας.

Συμπερασματικά, από όλες τις παραπάνω αναφερόμενες έρευνες και μελέτες καταλήγουμε ότι ως μέθοδοι και τρόποι μείωσης ή και αποτροπής του *Enteromyxum leei* οι δίαιτες έχουν καθοριστική συνεισφορά σε συνδυασμό με άλλες παρεμβάσεις. Έτσι εκτός από τη χρήση διατροφικών πρόσθετων μπορεί

να εφαρμοστεί επίσης και η ενίσχυση της παθητικής ανοσοποίησης των ψαριών με την χορήγηση ειδικών αντισωμάτων μέσω ορών καθώς και την ρύθμιση διάφορων παραμέτρων, όπως είναι η θερμοκρασία του νερού και η πυκνότητα των πληθυσμών στους κλωβούς.

6) Βιβλιογραφία

Álvarez-Pellitero P (2011) Mucosal intestinal immunity and response to parasite infections in ectothermic vertebrates. Immunology and immune system disorders. Nova Science Publishers, Inc, New York

Álvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Sitjà-Bobadilla A (2008) Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). Parasitology International 57:110–120

Ascencio F, Martínez-Arias W, Romero MJ, Wadstrom T (1998) Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. FEMS Immunol Med Microbiol 20:219–229. doi:10.1111/j.1574-695X.1998.tb01130.x

Balebona MC, Moriñigo MA, Faris A, Krovacek K, Mansson I, Bordas MA, Borrego JJ (1995) Influence of salinity and Ph on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. Aquaculture 132:113–120

Bansil R, Turner BS (2006) Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. Current Opinion in Colloid & Interface Science 11:164–170. doi:10.1016/j.cocis.2005.11.001

Bergstrom KSB, Guttman JA, Rumi M, Ma CX, Bouzari S, Khan MA, Gibson DL, Vogl AW, Vallance BA (2008) Modulation of intestinal goblet cell function during infection by an attaching and effacing bacterial pathogen. Infection and Immunity 76:796–811

Bergstrom KSB, Kisson-Singh V, Gibson DL, Ma CX, Montero M, Sham HP, Ryz N, Huang TN, Velcich A, Finlay BB, Chadee K, Vallance BA (2010) Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. PLoS Pathogens 6. doi:10.1371/journal.ppat.1000902

Bordas MA, Balebona MC, Chabrillon M, Rodriguez-Maroto JM, Morinigo MA (2003) Influence of temperature and salinity on the adhesion to mucous surfaces of gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.) of pathogenic strains of *Vibrio alginolyticus* and *Listonella anguillarum*. Bulletin of the European Association Fish Pathologists 23:273–280

Carrasson M, Grau A, Dopazo LR, Crespo S (2006) A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). Histol Histopathol 21:579–593

Cheng YF, Li MY, Wang SR, Peng HJ, Reid S, Ni NT, Fang H, Xu WF, Wang BH (2010) Carbohydrate biomarkers for future disease detection and treatment. Science China Chem 53:3–20

Cuadrado M (2009) Enteromixosi produïda per *Enteromyxum leei* (Diamant, Lom i Dyková, 1994) en espàrids d'interès comercial del Mediterrani. Ph. D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

Dezfuli BS, Pironi F, Campisi M, Shinn AP, Giari L (2010) The response of intestinal mucous cells to the presence of enteric helminths: their distribution, histochemistry and fine structure. Journal of Fish Diseases 33:481– 488. doi:10.1111/j.1365-2761.2010.01146.x

Diamant A (1997) Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. Diseases of Aquatic Organisms 30(2):99–105

Domeneghini C, Straini RP, Veggetti A (1998) Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. Histol Histopathol 13:359–372

Enss ML, Schmidtwittig U, Heim HK, Sewing KF (1995) Prostaglandin E(2) alters terminal glycosylation of high-molecular-weight glycoproteins released by pig gastric mucous cells in-vitro. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 52:333–340

Estensoro I, Benedito-Palos L, Palenzuela O, Kaushik S, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J (2011) The nutritional background of the host alters the

disease course in a fish-myxosporean system. Veterinary Parasitology 175:141–150. doi:10.1016/j.vetpar.2010.09.015

Estensoro I, Bermúdez R, Losada AP, Quiroga MI, Álvarez-Pellitero P, Sitjà-Bobadilla A (2009) Effect of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) on gastrointestinal neuromodulators and cell apoptosis of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: Book of abstracts of the 14th European Association of Fish Pathologists International Conference, Prague, Czech Republic, p 264

Estensoro I, Caldach-Giner JA, Kaushik S, Pérez-Sánchez J, Sitjà-Bobadilla A (2012b) Modulation of the IgM gene expression and the IgM immunoreactive cell distribution by the nutritional background in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) challenged with *Enteromyxum leei* (Myxozoa). Fish and Shellfish Immunology 33:401–410. doi:10.1016/j.fsi.2012.05.029

Estensoro I, Redondo MJ, Álvarez-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 92:51–58

Estensoro I, Redondo MJ, Salesa B, Kaushik S, Pérez-Sánchez J, Sitjà-Bobadilla A (2012a) Effect of the nutritional background and the infection by the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) on the mucosal carbohydrate pattern of the intestine of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Diseases of Aquatic Organisms. doi:10.3354/dao02486

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 79:219–228

Freeman, M. A., Yanagida, T., & Kristmundsson, À. (2020). A novel histozoic myxosporean, *Enteromyxum caesio n. sp.*, infecting the redbelly yellowtail fusilier, *Caesio cuning*, with the creation of the *Enteromyxidae n. fam.*, to formally accommodate this commercially important genus. Peer Journal, 8, e9529. <https://doi.org/10.7717/peerj.9529>

Hicks SJ, Theodoropoulos G, Carrington SD, Corfield AP (2000) The role of mucins in host–parasite interactions. Part I—protozoan parasites. *Parasitology Today* 16(11):476–481

Huang ZH, Ma AJ, Wang XA (2011) The immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), skin to high water temperature. *Journal of Fish Diseases* 34:619–627

Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports* 12:319–330

Leknes IL (2010) Histochemical study on the intestine goblet cells in cichlid and poeciliid species (Teleostei). *Tissue and Cell* 42:61–64. doi:10.1016/j.tice.2009.09.001

Lodemel JB, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE, Espelid S, Ringo E (2001) Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp *salmonicida*. *Aquaculture Research* 32:935–945. doi:10.1046/j.1365-2109.2001.00621.x

Losada AP, Bermúdez R, Faílde LD, Quiroga MI (2012) Quantitative and qualitative evaluation of iNOS expression in turbot (*Psetta maxima*) infected with *Enteromyxum scophthalmi*. *Fish and Shellfish Immunology* 32:243–248. doi:10.1016/j.fsi.2011.11.007

Magnadottir B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology* 20:137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006

Neuhaus H, van der Marel M, Caspari N, Meyer W, Enss M-L, Steinhagen D (2007a) Biochemical and histochemical effects of perorally applied endotoxin on intestinal mucin glycoproteins of the common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms* 77:17–27. doi:10.3354/dao01836

Neuhaus H, van der Marel M, Caspari N, Meyer W, Enss ML, Steinhagen D (2007b) Biochemical and histochemical study on the intestinal mucosa of the

common carp *Cyprinus carpio* L., with special consideration of mucin glycoproteins. Journal of Fish Biology 70:1523–1534

Palenzuela O (2006) Myxozoan infections in Mediterranean mariculture. Parassitologia 48(1–2):27–29

Pedini V, Scocco P, Gargiulo AM, Ceccarelli P, Lørvik S (2002) Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. Journal of Fish Biology 61:1363–1372. doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb02482.x

Piazzon MC, Estensoro I, Calduch-Giner JA, Del Pozo R, Picard-Sánchez A, Pérez-Sánchez J, Sitjà-Bobadilla A. Hints on T cell responses in a fish-parasite model: *Enteromyxum leei* induces differential expression of T cell signature molecules depending on the organ and the infection status. Parasit Vectors. 2018 Jul 31;11(1):443. doi: 10.1186/s13071-018-3007-1.

Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2009) Lectin histochemical detection of terminal carbohydrate residues in the enteric myxozoan *Enteromyxum leei* parasitizing gilthead seabream *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei): a study using light and transmission electron microscopy. Folia Parasitologica 56:259–267

Redondo MJ, Álvarez-Pellitero P (2010) Carbohydrate patterns in the digestive tract of *Sparus aurata* L. and *Psetta maxima* (L.) (Teleostei) parasitized by *Enteromyxum leei* and *E. scophthalmi* (Myxozoa). Parasitology International 59:445–453

Rigos G, Katharios P (2010) Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. Review of Fish Biology and Fisheries 20:47–70

Roberts SD, Powell MD (2005) The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic and Environmental Physiology 175:1–11. doi:10.1007/s00360-004-0453-1

Rodríguez I, Novoa B, Figueras A (2008) Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 25:239–249. doi:10.1016/j.fsi.2008.05.002

Roussel P, Delmotte P (2004) The diversity of epithelial secreted mucins. Current Organic Chemistry 8:413–437. doi:10.2174/1385272043485846
Sahoo PK, Das Mahapatra K, Saha JN, Barat A,

Sahoo M, Mohanty BR, Gjerde B, Odegard J, Rye M, Salte R (2008) Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology 25:163–169. doi:10.1016/j.fsi.2008.04.003

Sarasquete C, Gisbert E, Ribeiro L, Vieira L, Dinis MT (2001) Glyconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, *Senegal sole*, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. European Journal of Histochemistry 45:267–278

Schroers V, Van der Marel M, Steinhagen D (2008) Influence of carp intestinal mucus molecular size and glycosylation on bacterial adhesion. Diseases of Aquatic Organisms 81:135–142. doi:10.3354/dao01947

Schroers V, Van der Marel M, Neuhaus H, Steinhagen D (2009) Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture 288:184–189

Sekiya, Mariko & Setsuda, Aogu & Sato, Hiroshi & Song, Kicheon & Han, Jung-Kyun & Gyeong Ju, Kim & Yeo, In. (2016). *Enteromyxum leei* (Myxosporea: Bivalvulida) as the cause of myxosporean emaciation disease of farmed olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) and a turbot (*Scophthalmus maximus*) on Jeju Island, Korea. Parasitology Research. 115. 10.1007/s00436-016-5200-5.

Shin S. P., Sohn H. C., Jin C. N., Kang B. J., & Lee J. (2018a). Molecular diagnostics for verifying an etiological agent of emaciation disease in cultured

olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Korea. Aquaculture, 493, 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.041>

Shin S. P., Sohn H. C., Jin C. N., Kang B. J. & Lee J. (2018b). Quantitative investigation of *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) infection and relative condition factor in cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Temminck and Schlegel). Journal of Fish Diseases, 42, 159– 165.
<https://doi.org/10.1111/jfd.12912>

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 24:610–619

Sitjà-Bobadilla A, Diamant A, Palenzuela O, Álvarez-Pellitero P (2007) Effect of 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.). Journal of Fish Diseases 30:243–250

Sitjà-Bobadilla A, Palenzuela O (2012) Enteromyxum species. In: Woo PTK, Buchmann K (eds) Fish parasites: pathology and protection. CAB International, Oxfordshire, pp 163–176

Theodoropoulos G, Hicks SJ, Corfield AP, Miller BG, Carrington SD (2001) The role of mucins in host–parasite interactions: part II— helminth parasites. Trends in Parasitology 17:130–135

Yokoyama, H., Grabner, D., & Shirakashi, S. (2012). Transmission Biology of the Myxozoa. In Health and environment in aquaculture. InTech (pp. 3–42).
<https://doi.org/10.5772/29571>

Yokoyama, H., Lu, M., Mori, K., Satoh, J., Mekata, T., & Yoshinaga, T. (2015). Infection dynamics of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida) in hatchery-produced olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathology., 50, 60–67. <https://doi.org/10.3147/jsfp.50.60> Youn, J., Kim, C., Kim, T

