

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 60, No 1 (2009)



Location and morphological identification of Myxosporida and evaluation of the effect of freezing and Giemsa staining on the spore length

K. GATZIA (Κ. ΓΚΑΤΖΙΑ), E. TZIRONI (Ε. ΤΖΙΡΩΝΗ),
K. BITCHAVA (Κ. ΜΠΙΤΧΑΒΑ), F.
ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.14913](https://doi.org/10.12681/jhvms.14913)

To cite this article:

GATZIA (Κ. ΓΚΑΤΖΙΑ) Κ., TZIRONI (Ε. ΤΖΙΡΩΝΗ) Ε., BITCHAVA (Κ. ΜΠΙΤΧΑΒΑ) Κ., & ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) F. (2017). Location and morphological identification of Myxosporida and evaluation of the effect of freezing and Giemsa staining on the spore length. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 60(1), 39–50. <https://doi.org/10.12681/jhvms.14913>

■ Location and morphological identification of Myxosporida and evaluation of the effect of freezing and Giemsa staining on the spore length

Gatzia K., Tzironi E., Bitchava K., Athanassopoulou F.

Laboratory of Ichthyology and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Greece

■ Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση των μυξοσποριδίων και εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης και της χρώσης Giemsa στο μέγεθος των σπόρων των μυξοσποριδίων

Κ. Γκατζιά, Ε. Τζιρώνη, Κ. Μπιτσαβά, Φ. Αθανασοπούλου

Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα

ABSTRACT. *Enteromyxum leei*, *Ceratomyxa* spp., *Polysporoplasma sparis* are myxosporea usually found in cultured mediterranean marine fish. The present study refers to the evaluation of the seasonality and prevalence caused by myxosporea infections in cultured sharpnose seabream (*Puntazzo puntazzo* C.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). The main target organ of all infected fish was the intestine and some-times the gallbladder and the kidney were also target organs. The highest prevalence was observed during summer in cultured sharpnose seabream. *P. sparis* has been observed in gilthead seabream, which proved to be the main host of this parasite, but it was also observed in cultured sharpnose seabream. The main target organ in all infected fish was the kidney. The highest prevalence was observed during summer in cultured gilthead seabream. Mature spores of *Ceratomyxa diplodae* were observed in sharpnose seabream. The main target organ of the parasite in cultured fish was the gallbladder. The morphology and size observations of myxosporeans mentioned above were also studied. Freezing in -20°C (for 1 and 6 months) and the effect of Giemsa staining in myxosporean mature spore's size were evaluated. According to the results, 6 months freezing and Giemsa staining reduced significantly the size of mature spores. Finally, the protocol for Giemsa staining for the three different myxosporea species, usually found in cultured mediterranean marine fish, was standardized. Fresh smears were stained by Giemsa, according to protocol used for fresh smears. For *E. leei* the best results were obtained after immersing the smears in the stain for 20 min, for *C. diplodae* after immersing the smears in the stain for 30 min and for *P. sparis* after immersing the smears in the stain for 24 min.

Keywords: Myxosporida, Giemsa staining, aquaculture

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Τα μυξοσποριδία *Enteromyxum leei*, *Ceratomyxa* spp., *Polysporoplasma sparis* είναι από τα σημαντικότερα και πιο συχνά παρατηρούμενα μυξοσποριδία στα εκτρεφόμενα μεσογειακά ευρύαλα ψάρια. Στη συγκεκριμένη έρευνα, αρχικά, έγινε μία εκτίμηση της εποχικότητας και του ποσοστού προσβολής των μυξοσποριδίων που παρασιτούν σε εκτρεφόμενα ψάρια στην Ελλάδα. Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν το έντερο, ενώ ανιχνεύθηκαν, επίσης, σε χοληδόχο κύστη και νεφρό. Το καλοκαίρι, το στατιστικά μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής παρατηρείται στη χιόνια. Το *P. sparis* παρατηρήθηκε σε τσιπούρα που αποτελεί τον κύριο ξενιστή του παρασίτου, ενώ παρατηρήθηκε σε μικρότερα ποσοστά προσβολής και σε εκτρεφόμενη χιόνια. Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν ο νεφρός. Το καλοκαίρι παρατηρείται το στατιστικά

Correspondence: Athanassopoulou F.

Laboratory of Ichthyology and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly, 224 Trikalon str., Karditsa 431 00, Greece, e-mail: eathan@vet.uth.gr

Αλληλογραφία: Φ. Αθανασοπούλου

Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τριγάλων 224, 431 00, Καρδίτσα, e-mail: eathan@vet.uth.gr

Submission date: 31.03.2009

Approval date: 26.06.2009

Ημερομηνία υποβολής: 31.03.2009

Ημερομηνία εγκρίσεως: 26.06.2009

μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής στην τσιπούρα. Ωριμοί σπόροι του παρασίτου *Ceratomyxa diplodae* παρατηρήθηκαν σε χιόνια. Το κύριο όργανο στόχος του παρασίτου, που προσβλήθηκε στα εκτρεφόμενα ψάρια στην παρούσα έρευνα, ήταν η χοληδόχος κύστη. Επίσης, έγινε παρατήρηση της μορφολογίας και μέτρηση των σπόρων των παραπάνω μυξοσποριδίων. Στη συγκεκριμένη έρευνα, μελετήθηκε επίσης η επίδραση της κατάψυξης στους -20°C (για 1 και 6 μήνες) και της χρώσης *Giemsa* στο μέγεθος των σπόρων των μυξοσποριδίων που ανιχνεύτηκαν. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η κατάψυξη για 6 μήνες και η χρώση *Giemsa* μείωσαν σημαντικά το μέγεθος των ώριμων σπόρων. Τέλος, έγινε τυποποίηση των τριών διαφορετικών ειδών μυξοσποριδίων που παρατηρήθηκαν με χρώση *Giemsa*. Τα επιχρίσματα της παρασιτολογικής εξέτασης βάφτηκαν με *Giemsa* σύμφωνα με δεδομένο πρωτόκολλο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, για το *E. leei*, ο ιδανικός χρόνος παραμονής του επιχρίσματος στο διάλυμα *Giemsa* για ικανοποιητική χρώση των σπόρων ήταν 20 min, για το *C. diplodae* ήταν 30 min και για το *P. sparis* ήταν 24 min.

Λέξεις ευρετηρίασης: Μυξοσπορίδια, χρώση *Giemsa*, υδατοκαλλιέργειες

Η παρούσα εργασία προέρχεται από το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Κτηνιατρικής με ειδίκευση στα «Παθολογικά προβλήματα εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών»

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τη ραγδαία ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών ακολουθήσε η εμφάνιση παθολογικών προβλημάτων, κυρίως βακτηριακής ή παρασιτικής αιτιολογίας, τα οποία δυσκολεύουν την ομαλή ανάπτυξη των ψαριών και 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. Τα νοσήματα που είναι περισσότερο γνωστά προσβάλλουν τα ψάρια εκτροφής με μεγαλύτερη ένταση και συχνότητα, εξαιτίας της μεγάλης ιχθυοπυκνότητας εμφανίζονται και μπορούν να μελετηθούν καλύτερα οι διάφορες φάσεις τους (παθογένεια, αιτιολογία και πρόληψη κ.λπ.).

Ιδιαίτερα σημαντικά είναι τα νοσήματα που οφείλονται στα μυξοσπορίδια. Τα μυξοσπορίδια είναι μια μεγάλη κατηγορία πρωτόζωων παρασίτων, τα οποία προκαλούν σοβαρά παθολογικά προβλήματα σε καλλιεργούμενα ψάρια, αλλά και εκτεταμένες αλλοιώσεις και θνησιμότητες σε άγρια ψάρια. Παρασιτούν με μεγάλη ένταση και ορισμένα από αυτά είναι πολύ παθογόνα. Εκτός, όμως, από αυτές τις παθολογικές αλλοιώσεις δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθούν άλλες δυσμενείς επιδράσεις στα ψάρια (Jadwiga 1991).

Το ποσοστό προσβολής στα ψάρια από τα παράσιτα αυτά ποικίλλει από περιοχή σε περιοχή. Μπορεί να είναι πολύ υψηλό (100%) έως και πολύ χαμηλό. Σε εύκρατα κλίματα, η μόλυνση των ψαριών από τα μυξοσπορίδια μπορεί να είναι μεγάλης διάρκειας, ενώ ορισμένα είδη μυξοσποριδίων παρουσιάζουν αξιο-

σημείωτη εποχιακή διακύμανση (Lom and Dykova 1995).

Η μόλυνση των ψαριών προέρχεται συνήθως μετά από κατάποση σπόρων. Η μετάδοση πραγματοποιείται άμεσα από ψάρι σε ψάρι μετά από κατάποση σπόρων ή παρασιτικών μορφών, που περιέχονται στα απεκκρίματα των μολυσμένων ψαριών. Αργότερα, αποδείχθηκε πειραματικά ότι οι σπόροι του παρασίτου *Myxobolus cerebralis* για να μεταδοθούν με επιτυχία απαιτούν έναν ενδιάμεσο ξενιστή (Wolf and Markiw 1984). Ο ενδιάμεσος αυτός ξενιστής μπορεί να είναι ένα σκουλήκι *Triactinomyxon* του γένους *Tubifex*. Η μόλυνση, σύμφωνα με τους Markiw (1989) και Yokoyama (1993), μπορεί να προέρχεται ακόμα και από διείσδυση στο δέρμα ή στο επιθήλιο των βραγχίων.

Τα πιο σημαντικά μυξοσπορίδια που παρατηρούνται στα εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη είναι τα: *Enteromyxum leei* Diamant (Lom and Dykon_ 1995), *Myxobolus* sp., *Sphaerospora* sp., *Polysporoplasma sparis* (Sitjà – Bobadilla and Álvarez-Pellitero 1995), *Ceratomyxa* sp., *Kudoa* sp. και *Henneguya* sp.. Τα κυριότερα μυξοσπορίδια των μεσογειακών ειδών που έχουν βρεθεί, καθώς και τα είδη των ξενιστών και τα όργανα ανεύρεσής τους, φαίνονται στον Πίνακα 1.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός και η μορφολογική ταυτοποίηση των μυξοσποριδίων στα είδη τσιπούρα και χιόνια, που είναι πιο ευπαθή στις μυξοσποριδιάσεις, καθώς επίσης και η εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης και της χρώσης *Giemsa* στο μέγεθος των σπόρων των μυξοσποριδίων.

Table 1. Main Myxosporidia parasites of Mediterranean fish.
Πίνακας 1. Τα κυριότερα μυξοσποριδία παράσιτα των μεσογειακών ειδών.

| Είδος Παράσιτου | Είδος Ψαριού | Ξενιστή Όργανο Στόχος |
|------------------------------------|---|---|
| <i>Enteromyxum leei</i> | <i>Diplodus puntazzo</i> C. | Έντερο |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | Χοληδόχος κύστη |
| | <i>Pagrus pagrus</i> L. | Ήπαρ |
| | <i>Pagrus major</i> T. | Βράγχια |
| | <i>Diplodus sargus</i> C. | Νεφρός |
| <i>Myxobolus</i> sp. | <i>Diplodus puntazzo</i> C. | Νεφρός |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | Χοληδόχος κύστη |
| | <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. | Όρχεις |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | Νεφρός Πάγκρεας Χοληδόχος κύστη Έντερο |
| <i>Polysporoplasma sparis</i> . | <i>Sparus aurata</i> L. | Νεφρός |
| | <i>Diplodus puntazzo</i> C. | |
| <i>Ceratomyxa</i> sp. | <i>Dentex dentex</i> L. | Χοληδόχος κύστη |
| | <i>Diplodus puntazzo</i> C. | Έντερο |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | |
| | <i>Pagrus pagrus</i> L. <i>Dicentrarchus labrax</i> L. | |
| <i>Kudoa</i> sp. | <i>Diplodus sargus</i> C. | Σωματικοί και |
| | <i>Dicentrarchus labrax</i> L. | καρδιακοί μύες |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | Βράγχια |
| | <i>Pagellus acarne</i> R. | Ήπαρ Νεφρός Περιτόναιο Μεσεντέριο |
| <i>Henneguya</i> sp. | <i>Diplodus puntazzo</i> C. | Χοληδόχος κύστη |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | Βράγχια |
| <i>Leptotheca sparidarum</i> n sp. | <i>Dentex dentex</i> L. | Νεφρός |
| | <i>Sparus aurata</i> L. | Έντερο |

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Προκειμένου να εκτιμηθεί η κατάσταση της Μυξοσποριδίασης και η επίδραση της κατάψυξης και της χρώσης *Giemsa* στο μέγεθος των ώριμων σπόρων των μυξοσποριδίων σε εκτρεφόμενα ψάρια της χώρας μας, ελήφθησαν ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών της οικογένειας Sparidae, που αποτελούν ένα μεγάλο μέρος της ελληνικής ιχθυοκαλλιεργητικής παραγωγής. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στον Αμβρακικό κόλπο και συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα είδη τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) και χιόνα (*Diplorus puntazzo*

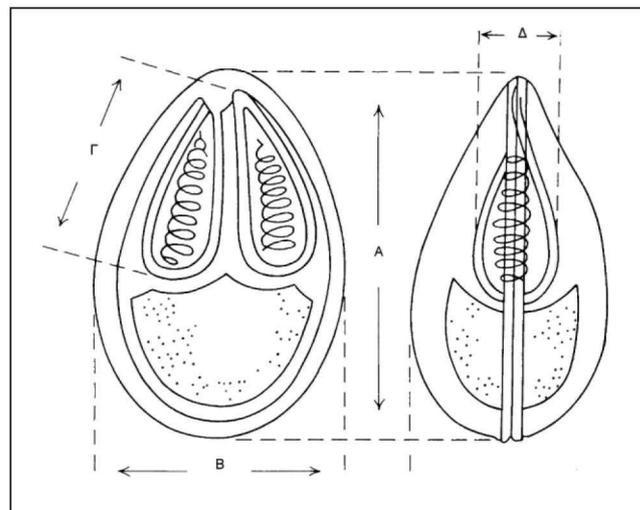


Figure 1. Method of measurements of the dimensions of spores.
Εικόνα 1. Μέθοδος μέτρησης διαστάσεων σπόρων.

L.), που είναι πιο ευπαθή στις μυξοσποριδιάσεις. Είχαν διάρκεια ένα έτος (χειμώνας 2006, άνοιξη 2007, καλοκαίρι 2007 και φθινόπωρο 2007) και ήταν εποχιακές. Συγκεκριμένα, το δείγμα λαμβανόταν τον πρώτο μήνα κάθε εποχής (Δεκέμβριο, Μάρτιο, Ιούνιο και Σεπτέμβριο).

Όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά εξετάστηκαν μακροσκοπικά για την εκτίμηση της εξωτερικής τους εικόνας. Βράγχια, δέρμα και εσωτερικά όργανα (ο εντερικός σωλήνας, η χοληδόχος κύστη, το ήπαρ, ο σπλήνας, η καρδιά, οι γονάδες, ο εγκέφαλος και ο νεφρός) εξετάστηκαν για μυξοσποριδία.

Τον πιο διαδεδομένο τρόπο περιγραφής παρασιτικών μολύνσεων αποτελεί ο υπολογισμός του ποσοστού προσβολής, κυρίως γιατί απαιτεί μόνο ανίχνευση της παρουσίας των παρασίτων και όχι καταμέτρησή τους (Bush et al. 1997). Το % ποσοστό προσβολής υπολογίστηκε από τον αριθμό των ξενιστών που ήταν μολυσμένοι από κάποιο παράσιτο προς τον αριθμό όλων των ξενιστών που εξετάστηκαν για το ίδιο παράσιτο. Σε κάθε δείγμα ψαριού παρατηρήθηκαν δέκα τυχαία οπτικά πεδία.

Η ταυτοποίηση των παρασίτων έγινε αμέσως μετά την ανεύρεσή τους, μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων και σε συνδυασμό με τα μονιμοποιηθέντα παρασκευάσματα με βάση τις κλειδές των Yamaguti (1963) και Athanassopoulou (1990). Η μέτρηση των παρασίτων πραγματοποιήθηκε με μεθόδους που έχουν περιγράψει οι Lom and Arthur (1980), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Συγκε-

Table 2. Duration of Giemsa staining of Myxosporida spores.**Πίνακας 2.** Χρόνοι παραμονής των μυξοσποριδίων σε διάλυμα Giemsa.

| Είδη μυξοσποριδίων | Χρόνος παραμονής των σπόρων στο διάλυμα Giemsa |
|--------------------|---|
| <i>C. diplodae</i> | 10', 15', 18', 20', 22', 24', 26', 28', 30', 33'. |
| <i>E. leei</i> | |
| <i>P. sparis</i> | |

κρυμένα, υπολογίστηκε το μήκος ως η απόσταση ανάμεσα στο κορυφαίο και το κατώτερο σημείο του σπόρου (Α), το πλάτος (Β) ως η μεγαλύτερη απόσταση ανάμεσα στα όρια των ραφών, το μήκος (Γ) και το πλάτος (Δ) των πολικών καψών.

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ώριμους σπόρους των μυξοσποριδίων που ανιχνεύθηκαν στα εκτρεφόμενα ψάρια που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, έγιναν μετρήσεις σε νωπούς σπόρους, σε σπόρους που διατηρήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C) για έναν και έξι μήνες και σε μονιμοποιημένους σπόρους (βαμμένους με *Giemsa*).

Η χρώση *Giemsa* εφαρμόζεται για την παρατήρηση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων μυξοσποριδίων. Στη συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκαν 10 διαφορετικοί χρόνοι παραμονής του κάθε είδους μυξοσποριδίου στο διάλυμα της χρωστικής. Στον Πίνακα 2 φαίνονται αναλυτικά οι χρόνοι παραμονής του κάθε είδους μυξοσποριδίου στη χρωστική.

Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της μείωσης του μεγέθους των σπόρων εξαιτίας της κατάψυξης και της χρώσης *Giemsa*, χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμές (non parametric test, NPT), καθώς οι μετρήσεις δεν πληρούσαν τα κριτήρια ώστε να γίνει η δοκιμή ANOVA (Analysis of Variance, ANOVA). Τα κριτήρια αφορούσαν στην κατανομή της συχνότητας των δεδομένων και στην ισοδυναμία των διακυμάνσεων ανάμεσα στις ομάδες (groups) των τιμών (Zar 1996). Για τον έλεγχο της κατανομής της συχνότητας των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή των Kolmogorov-Smirnov και διαπιστώθηκε ότι τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τον έλεγχο της ισοδυναμίας των διακυμάνσεων έγινε η δοκιμή του Levene και βρέθηκε ότι οι διακυμάνσεις μεταξύ των ομάδων τιμών δεν είναι όμοιες. Τα δεδομένα λογαριθμήθηκαν ώστε να επιτευχθεί η κανονι-

**Figure 2.** *E. leei* spore in smear of *D. puntazzo* in intestine (Fresh preparation, x400).

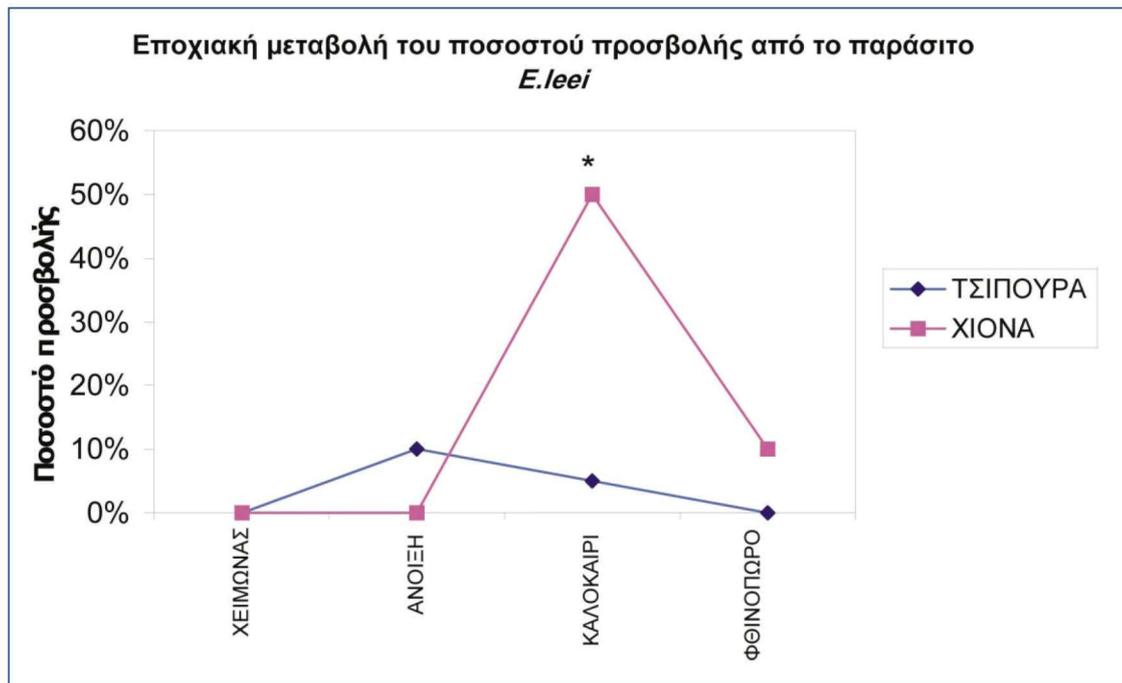
Εικόνα 2. Σπόρος του παράσιτου *E. leei* σε επίχρισμα εντέρου εκτρεφόμενης χιόνας (Νωπό παρασκεύασμα, x 400).

κή κατανομή της συχνότητας των αποτελεσμάτων. Για τους λόγους αυτούς χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή των Games-Howell, κατά την οποία δεν απαιτείται η ισοδυναμία των διακυμάνσεων ανάμεσα στα δεδομένα των ομάδων. Για τη σύγκριση των ποσοστών προσβολής από μυξοσπορίδια στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες και τη διακρίβωση της εποχιακής μεταβλητότητας χρησιμοποιήθηκε το χ^2 κριτήριο του Pearson. Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Windows ver. 13.0) για λειτουργικό σύστημα Windows XP και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για $P < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εποχιακή κατανομή των μυξοσποριδίων στα εκτρεφόμενα ψάρια

Το παράσιτο *E. leei* (Εικόνα 2) παρατηρήθηκε και στα δύο εκτρεφόμενα είδη ψαριών που εξετάστηκαν (τσιπούρα και χιόνα). Στην τσιπούρα παρατηρήθηκε την άνοιξη και το καλοκαίρι σε ποσοστά 10% και 5%, αντίστοιχα, ενώ στη χιόνα εμφανίστηκε για πρώτη φορά το καλοκαίρι στο μεγαλύτερο στατιστικά ποσοστό 50% ($\chi^2 = 16,69$ $df = 1$ $P = 0$), ενώ το φθινόπωρο μειώθηκε σε 10%. Στο γράφημα 1 φαίνεται η μεταβολή του ποσοστού προσβολής από το παράσιτο *E. leei* στην τσιπούρα και τη χιόνα.



Graph 1. Seasonal change of *E. leei* prevalence.

Γράφημα 1. Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού προσβολής από το παράσιτο *E. Leei*.

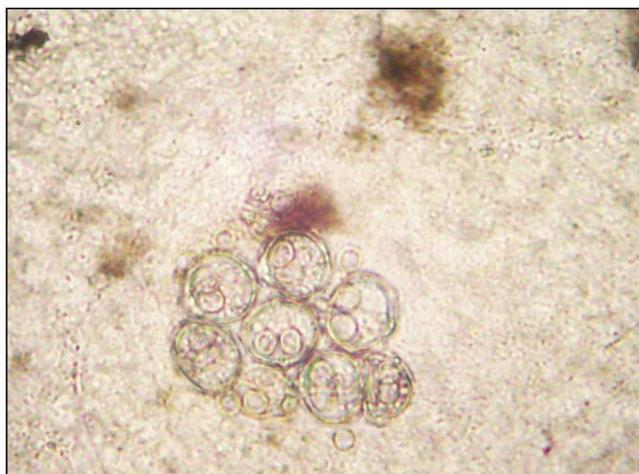


Figure 3. Mature *P. sparitis* spore in smear of kidney of sea bream. (Fresh preparation, x400).

Εικόνα 3. Ωριμοί σπόροι του παρασίτου *P. sparitis* σε επίχρισμα νεφρού εκτρεφόμενης τσιπούρας (Νωπό παρασκεύασμα, x 400).

Το μυξοσπορίδιο *P. sparitis* (Εικόνα 3.) παρατηρήθηκε και στα δύο εκτρεφόμενα είδη, τσιπούρα και χιόνα. Στην τσιπούρα παρατηρήθηκε σε όλες τις εποχές. Η παρασίτωση ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά το χειμώνα σε χαμηλό ποσοστό προσβολής (2%), το οποίο αυξήθηκε σταδιακά από την άνοιξη σε 10% μέχρι το καλοκαίρι που έφτασε το στατιστικά μεγαλύτερο ποσοστό 30% ($\chi^2=8,204$ $df=1$ $P=0,004$). Στη χιόνα, το *P. sparitis* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το κα-



Figure 4. Mature *C. diplodae* spores in smear of gall bladder of *D. puntazzo*. (Fresh preparation, x400)

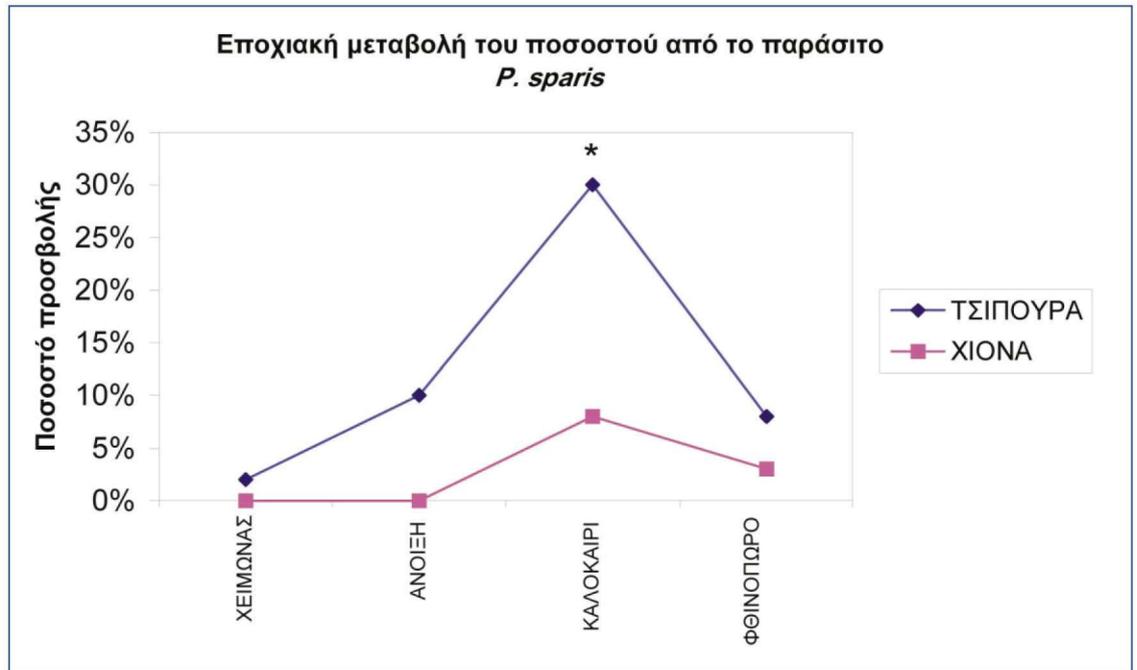
Εικόνα 4. Ωριμοί σπόροι του παρασίτου *C. diplodae* σε επίχρισμα χοληδόχου κύστης εκτρεφόμενης χιόνας (Νωπό παρασκεύασμα, x 400).

λοκαίρι σε ποσοστό 8%, το οποίο μειώθηκε σε 3% το φθινόπωρο, διαφορά όμως που δεν είναι στατιστικά σημαντική. Στο γράφημα 2 φαίνεται η μεταβολή του ποσοστού προσβολής από το παράσιτο *P. sparitis* στην τσιπούρα και τη χιόνα.

Το παράσιτο *C. diplodae* (Εικόνα 4) παρατηρήθηκε μόνο στην εκτρεφόμενη χιόνα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το χειμώνα σε ποσοστό προσβολής 8% και αυξήθηκε σε 17% την άνοιξη, δια-

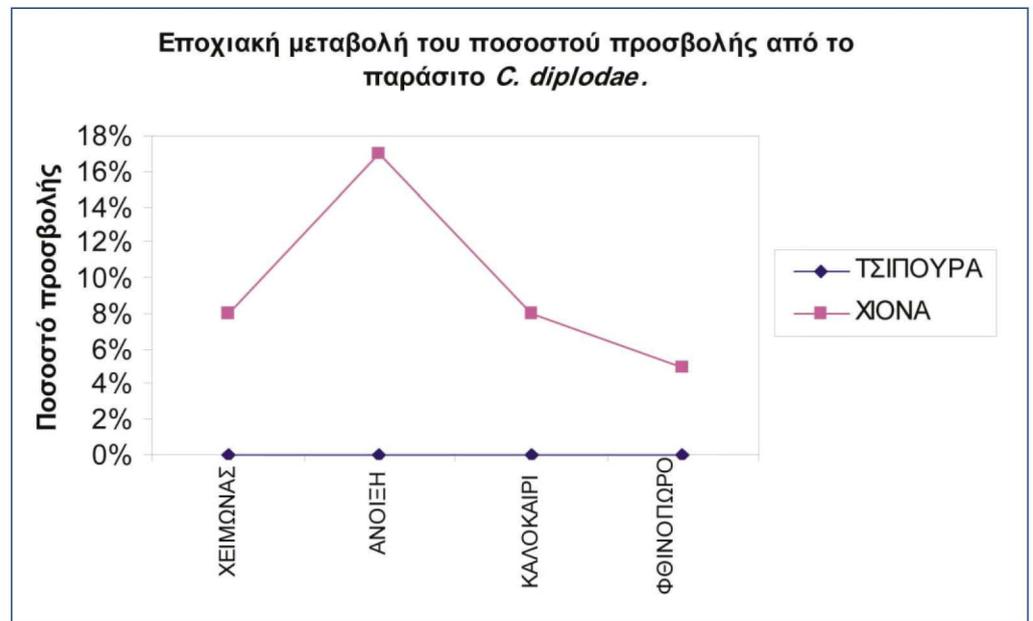
Graph 2. Seasonal change of *P. sparis* prevalence.

Γράφημα 2. Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού προσβολής από το παράσιτο *P. sparis*.



Graph 3. Seasonal change of *C. diplodae* prevalence.

Γράφημα 3. Εποχιακή μεταβολή του ποσοστού προσβολής από το παράσιτο *C. diplodae*.



φορά όμως που δεν είναι στατιστικά σημαντική. Από το καλοκαίρι άρχισε να μειώνεται σε 8% και το φθινόπωρο έφτασε 5%, διαφορά που δεν είναι οριακά στατιστικά σημαντική. Στη τσιπούρα το παράσιτο δεν ανιχνεύθηκε. Στο γράφημα 3 φαίνεται η μεταβολή του ποσοστού προσβολής από το παράσιτο *C. diplodae* στη χίονα.

Εντοπισμός και μορφολογική ταυτοποίηση των μυξοσποριδίων

Το παράσιτο *E. lei* βρέθηκε στο έντερο της εκτρεφόμενης χίονας και της τσιπούρας, στο οποίο αναγνωρίστηκαν όλα τα στάδια εξέλιξής του, τροφωζώιτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι. Το σχήμα των ώριμων σπόρων ήταν ελλειψοειδές και στο διπύ-

Table 3. Measurements of *E. leei* spores.**Πίνακας 3.** Διαστάσεις του παρασίτου *E. leei*.

| | Μήκος | Πλάτος | Μήκος Π.Κ. 1 | Πλάτος Π.Κ. 1 | Μήκος Π.Κ. 2 | Πλάτος Π.Κ. 2 | Απόσταση Π.Κ. |
|---|------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|
| <i>E. leei</i> ΝΩΠΙΟΙ ΣΠΟΡΟΙ (n=50) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 10,5±0,05 | 20,75 ±0,43 | 3,75±0,18 | 8,4± 0,22 | 3,75±0,18 | 7,75±0,18 | 2,25 ±0,2 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (10-12,5) | (17,5 – 30) | (2,5 – 5) | (5 – 10) | (2,5 - 5) | (5 - 10) | (0 - 5) |
| <i>E. leei</i> (ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΙ ΣΠΟΡΟΙ 1 ΜΗΝΟΣ) (n=50) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 9,85±0,08 | 20±0,41 | 3,6±0,18 | 8,25±0,22 | 3,55±0,18 | 7,5±0,21 | 2,05±0,20 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (7,5 – 10) | (17,5 – 30) | (2,5 – 5) | (5 – 10) | (2,5 – 5) | (5 – 10) | (0 – 5) |
| <i>E. leei</i> (ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΙ ΩΡΙΜΟΙ ΣΠΟΡΟΙ 6 ΜΗΝΩΝ) (n=50) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 8,5±0,25 | 18,45±0,30 | 2,8±0,12 | 8,1±0,15 | 2,8±0,12 | 8,05±0,30 | 2,85±0,21 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (5 – 10) | (15 – 22,5) | (2,5 – 5) | (7,5 – 10) | (2,5 – 5) | (5 -10) | (0 – 5) |
| <i>E. leei</i> (ΣΠΟΡΟΙ ΜΕ ΧΡΩΣΗ <i>GIEMSA</i>) (n=50) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 8,00±0,26 | 17,1±0,32 | 3,05±0,15 | 7,75 ±0,18 | 2,83±0,13 | 7,85±0,21 | 3,65 ± 0,26 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (5 – 12,5) | (12,5 – 22,5) | (2,5 – 5) | (5 – 10) | (1,25 – 5) | (5 – 10) | (0 – 7,5) |

(Μ.Ο. = Μέσος όρος, Τ.Α. = Τυπική απόκλιση, Π.Κ. = Πολική κάψα)

ρηνο σπορόπλασμα παρατηρήθηκαν δύο επιμήκεις απιοειδείς πολικές κάψες τοποθετημένες αντιδιαμετρικά στις άκρες του ώριμου σπόρου. Οι σποροβλάστες ήταν δίσποροι, ενώ οι τροφοζωίτες ήταν μικροί και κυκλικοί. Στον πίνακα 3 φαίνονται συγκεντρωτικά οι διαστάσεις των ώριμων σπόρων μετά από κατάψυξη και χρώση *Giemsa*.

Κύστεις με τροφοζωίτες και ώριμους σπόρους του παρασίτου *P. sparis* παρατηρήθηκαν κυρίως στα νεφρικά σωμάτια και σε λίγες περιπτώσεις στον ενδιάμεσο συνδετικό ιστό και στα μελανομακροφάγα κέντρα του νεφρού (MMC) σε εκτρεφόμενα ψάρια, χιόνια και τσιπούρα. Το σχήμα των τροφοζωιτών και των ώριμων σπόρων ήταν ωοειδές με πλάτος μεγαλύτερο απ' ό,τι το μήκος. Οι τροφοζωίτες ήταν δίσποροι, ενώ σε κάθε ώριμο σπόρο περιέχονταν δύο ισομεγέθεις, σφαιρικές πολικές κάψες. Στον πίνακα 4 φαίνονται συγκεντρωτικά οι διαστάσεις των ώριμων σπόρων μετά από κατάψυξη και χρώση *Giemsa*.

Σε εκτρεφόμενη χιόνια παρατηρήθηκαν τροφοζωίτες, σποροβλάστες και ώριμοι σπόροι του παρασίτου *C. diplodae* στη χοληδόχο κύστη. Το σχήμα των ώρι-

μων σπόρων ήταν τοξοειδές με επιμήκεις άκρες, ενώ στο σπορόπλασμα παρατηρήθηκαν δύο ισομεγέθεις σφαιρικές πολικές κάψες τοποθετημένες στο κέντρο του σποροπλάσματος, η μία κοντά στην άλλη. Οι σποροβλάστες ήταν δίσποροι, ενώ οι τροφοζωίτες ήταν μικροί και κυκλικοί. Στον πίνακα 5 φαίνονται συγκεντρωτικά οι διαστάσεις των ώριμων σπόρων μετά από κατάψυξη και χρώση *Giemsa*.

Εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης και της χρώσης *Giemsa* στο μέγεθος των σπόρων των μυξοσποριδίων

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι το μέγεθος των ώριμων σπόρων των μυξοσποριδίων επηρεάζεται τόσο από την κατάψυξη όσο και από τη μονιμοποίησή τους με χρώση *Giemsa*.

Συγκεκριμένα, στο παράσιτο *E. leei* μετά τον πρώτο μήνα της κατάψυξης παρατηρείται μικρή μείωση του μεγέθους κατά 0,65μ (μήκος) και 0,75 μ (πλάτος), ενώ κατά τον έκτο μήνα η μείωση είναι μεγαλύτερη κατά 2μ (μήκος) και 2,30μ (πλάτος). Κατά τη χρώση *Giemsa* το μέγεθος των σπόρων μειώνεται περισσό-

Table 4. Measurements of *P. sparis* spores.**Πίνακας 4.** Διαστάσεις του παρασίτου *P. sparis*.

| | Μήκος | Πλάτος | Μήκος Π.Κ. 1 | Πλάτος Π.Κ. 1 | Μήκος Π.Κ. 2 | Πλάτος Π.Κ. 2 | Απόσταση Π.Κ. |
|--|-------------|-------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|
| <i>P. sparis</i> ΝΩΠΙΟΙ ΣΠΟΡΟΙ | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 16,95±0,35 | 17,9±0,31 | 5,85±0,17 | 5,5±0,19 | 5,05±0,17 | 5,05±0,15 | 0,11±0,02 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (7,5 – 20) | (12,5 – 20) | (5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (0 – 0,25) |
| <i>P. sparis</i> (ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΙ ΣΠΟΡΟΙ 1 ΜΗΝΟΣ) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 15,95±0,38 | 17±0,36 | 5,85±0,17 | 5,5±0,19 | 5,05±0,17 | 5,05±0,15 | 0,11±0,02 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (7,5 – 20) | (10 – 20) | (5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (0 – 0,25) |
| <i>P. sparis</i> (ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΙ ΩΡΙΜΟΙ ΣΠΟΡΟΙ 6 ΜΗΝΩΝ) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 14,45±0,35 | 15,4±0,31 | 4,9±0,10 | 4,85±0,13 | 4,8±0,12 | 4,75±0,13 | 0,11±0,02 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (5 – 17,5) | (10 – 17,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (2,5 – 7,5) | (0 – 0,25) |
| <i>P. sparis</i> (ΣΠΟΡΟΙ ΜΕ ΧΡΩΣΗ <i>GIEMSA</i>) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 13,7±0,32 | 14,75±0,38 | 4,8±0,10 | 4,8±0,10 | 4,8±0,10 | 4,8±0,10 | 1,1±0,18 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (10 – 17,5) | (10 – 20) | (2,5 – 5) | (2,5 – 5) | (2,5 – 5) | (2,5 – 5) | (0 – 2,5) |

Table 5. Measurements of *C. diplodae* spores.**Πίνακας 5.** Διαστάσεις του παρασίτου *C. diplodae*.

| | Μήκος | Πλάτος | Μήκος Π.Κ. 1 | Πλάτος Π.Κ. 1 | Μήκος Π.Κ. 2 | Πλάτος Π.Κ. 2 | Απόσταση Π.Κ. |
|--|---------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|---------------|
| <i>C. diplodae</i> ΝΩΠΙΟΙ ΣΠΟΡΟΙ | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 7,93±0,19 | 19,9 ±0,46 | 3,7±0,03 | 3,75± 0,04 | 3,73±0,03 | 3,75±0,04 | 0,93 ±0,17 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (5,75-12) | (12,5 - 25) | (2,5 – 3,75) | (2,5 – 5) | (2,5 – 3,75) | (2,5 - 5) | (0 – 2,5) |
| <i>C. diplodae</i> (ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΙ ΣΠΟΡΟΙ 1 ΜΗΝΟΣ) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 6,68±0,19 | 18,65±0,46 | 3,7±0,03 | 3,75±0,04 | 3,73±0,03 | 3,75±0,04 | 0,93±0,17 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (4,5 – 10,75) | (11,25 – 23,75) | (2,5 – 3,75) | (2,5 – 5) | (2,5 – 3,75) | (2,5 – 5) | (0 – 2,5) |
| <i>C. diplodae</i> (ΚΑΤΕΨΥΓΜΕΝΟΙ ΩΡΙΜΟΙ ΣΠΟΡΟΙ 6 ΜΗΝΩΝ) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 5,93±0,19 | 17,95±0,43 | 2,45±0,03 | 2,5±0,04 | 2,48±0,03 | 2,5±0,04 | 0,93±0,17 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (3,75 – 10) | (12,5 – 25) | (1,25 – 2,5) | (1,25 – 3,75) | (1,25 – 2,5) | (1,25 – 3,75) | (0 – 2,5) |
| <i>C. diplodae</i> (ΣΠΟΡΟΙ ΜΕ ΧΡΩΣΗ <i>GIEMSA</i>) | | | | | | | |
| Μ.Ο. ± Τ.Α. | 4,75±0,16 | 14,4±0,38 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 0,05±0,05 |
| ΕΛΑΧΙΣΤΟ - ΜΕΓΙΣΤΟ | (2,5 – 7,5) | (10 – 22,5) | (2,5 – 2,5) | (2,5 – 2,5) | (2,5 – 2,5) | (2,5 – 2,5) | (0 – 2,5) |

(Μ.Ο. = Μέσος όρος, Τ.Α. = Τυπική απόκλιση, Π.Κ. = Πολική κάψα)

τερο συγκριτικά με την κατάψυξη, δηλαδή κατά 2,5μ (μήκος) και 3,65μ (πλάτος).

Στο παράσιτο *P. sparis* μετά τον πρώτο μήνα της κατάψυξης παρατηρείται μικρή μείωση του μεγέθους κατά 1μ (μήκος) και 0,90 μ (πλάτος), ενώ κατά τον έκτο μήνα η μείωση είναι μεγαλύτερη κατά 2,5μ (μήκος) και 2,5μ (πλάτος). Κατά τη χρώση *Giemsa* το μέγεθος των σπόρων μειώνεται περισσότερο συγκριτικά με την κατάψυξη, δηλαδή κατά 3,25μ (μήκος) και 3,15μ (πλάτος).

Τέλος, στο παράσιτο *C. diplodae* μετά τον πρώτο μήνα της κατάψυξης παρατηρείται μικρή μείωση του μεγέθους ($F=51,79$, $P=0$, ANOVA) κατά 1,25μ (μήκος) και 1,25 μ (πλάτος), ενώ κατά τον έκτο μήνα η μείωση είναι μεγαλύτερη κατά 2μ (μήκος) και 1,95μ (πλάτος). Κατά τη χρώση *Giemsa* το μέγεθος των σπόρων μειώνεται περισσότερο συγκριτικά με την κατάψυξη, δηλαδή κατά 3,18μ (μήκος) και 5,5μ (πλάτος).

Από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η κατάψυξη των σπόρων για έξι μήνες και η χρώση *Giemsa* μείωσαν σημαντικά το μέγεθός τους σε σχέση με το μέγεθος των νωπών σπόρων.

Τυποποίηση χρώσης *Giemsa* για εξέταση μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων των μυξοσποριδίων

Μετά από δοκιμαστική παραμονή των μονιμοποιημένων παρασκευασμάτων προέκυψε ότι ο χρόνος που απαιτείται για την ικανοποιητική χρώση του κάθε μυξοσποριδίου στο διάλυμα της χρωστικής *Giemsa* είναι για το *E. leei*: 20 min, για το *P. Sparis*: 24 min και για το *C. diplodae* 30 min.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εποχιακή κατανομή και εντοπισμός των μυξοσποριδίων στα εκτρεφόμενα ψάρια.

➤ *Enteromyxum leei* (Diamant, Lom & Dyková, 1994)

Στην παρούσα μελέτη, το *E. leei* παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενα ψάρια χιόνα και τσιπούρα. Η χιόνα αποδείχθηκε ο κύριος ξενιστής του παρασίτου όπου παρατηρήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής, γεγονός αναμενόμενο, αφού το είδος αυτό θεωρείται το πιο ευαίσθητο είδος στην παρασίτωση από *E. leei* (Athanassopoulou et al., 1999, Rigos et al. 1999). Το έντερο είναι το πρώτο όργανο στόχος του παρασίτου και σε περιπτώσεις εκτεταμένων μολύνσεων το παράσιτο μπορεί να παρατηρηθεί και σε άλλα όργανα (Athanassopoulou et al. 1999, Rigos et al. 1999, Merella et al. 2005). Από την παρούσα έρευνα προέ-

κυψε ότι το καλοκαίρι είναι η εποχή που ευνοεί την έξαρση των μυξοσποριδιάσεων. Τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής του παρασίτου *E. leei* παρατηρήθηκαν τις εποχές με τις υψηλότερες θερμοκρασίες, γεγονός που υποστηρίζεται και από άλλους ερευνητές (Athanassopoulou et al. 1999, Rigos et al. 1999, Merella et al. 2005), σύμφωνα με τους οποίους τα ποσοστά θνησιμότητας από *E. leei* συνήθως αυξάνονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 22 °C και μειώνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15 °C.

➤ *Polysporoplasma sparis* (Sitjà-Bobadilla & Álvarez – Pellitero, 1995)

Το *P. sparis* παρατηρήθηκε σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και χιόνα. Η τσιπούρα αναφέρεται ως ο κύριος ξενιστής του παρασίτου (Palenzuela et al. 1999, Rigos et al. 1999, Mladineo 2003, Athanassopoulou et al. 2004). Το κύριο όργανο στόχος σε όλα τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν ο νεφρός και ειδικότερα τα νεφρικά σωμάτια (Athanassopoulou et al. 2004). Στα μολυσμένα ψάρια ανιχνεύθηκαν όλα τα στάδια εξέλιξης του παρασίτου, το κυρίαρχο όμως στάδιο ήταν οι ώριμοι σπόροι.

Το παράσιτο *P. sparis* παρατηρήθηκε στα περισσότερα μολυσμένα ψάρια σε όλες τις εποχές, αλλά τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν τόσο στα εκτρεφόμενα όσο και στα άγρια ψάρια τις εποχές με τις υψηλές θερμοκρασίες, όπως αυτό έχει παρατηρηθεί ξανά στην Ελλάδα (Rigos et al. 1999, Athanassopoulou et al. 2004, Karagouni et al. 2005). Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα συμπεράσματα του Palenzuela et al. (1999), οι οποίοι βρήκαν το παράσιτο σε εκτρεφόμενη τσιπούρα χωρίς όμως να παρατηρηθεί διαφορά στο ποσοστό προσβολής μεταξύ εποχών. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες εκτροφής των ψαριών που εξετάστηκαν, δεδομένου ότι τα ψάρια στην παρούσα έρευνα προέρχονταν από εντατική εκτροφή σε κλωβούς, ενώ στην περίπτωση του Palenzuela et al. (1999) τα ψάρια προέρχονταν από ημιεντατικά συστήματα εκτροφής σε δεξαμενές.

➤ *Ceratomyxa* spp.

Όλα τα στάδια εξέλιξης των παρασίτων *C. diplodae* παρατηρήθηκαν σε χιόνα, χωρίς όμως να έχουν ενοχοποιηθεί για θνησιμότητες. Το κύριο όργανο στόχος των ειδών *Ceratomyxa* στην παρούσα έρευνα ήταν η χοληδόχος κύστη, η οποία αποτελεί το κύριο όργανο στόχος σε μολυσμένη τσιπούρα, χιόνα και

φαγκρί (Álvarez-Pellitero and Sitzà-Bobadilla 1993, Fiest and Ronga 1996, Company et al. 1999, Rigos et al. 1999, Mladineo 2003, Merella et al. 2005). Σε περιπτώσεις εκτεταμένων παρασιτώσεων σε συναγρίδα και λαβράκι αυτό βρέθηκε σε έντερο (Álvarez-Pellitero and Sitzà-Bobadilla 1993, Rigos et al. 1997, 1999), νηκτική κύστη, πάγκρεας και μεσεντέριο (Álvarez-Pellitero and Sitzà-Bobadilla 1993).

Το παράσιτο *Ceratomyxa* sp. παρατηρήθηκε σε όλες σχεδόν τις εποχές στην εκτρεφόμενη χιόνα, τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής ανιχνεύθηκαν, όμως, το καλοκαίρι. Το μεγαλύτερο ποσοστό προσβολής παρατηρήθηκε τους καλοκαιρινούς μήνες στην περίπτωση μολυσμένης συναγρίδας με μυξοσπορίδιο του γένους *Ceratomyxa* (Company et al. 1999), ενώ το χειμώνα, τα μεγαλύτερα ποσοστά προσβολής παρατηρήθηκαν σε λαβράκι (Álvarez-Pellitero and Sitzà-Bobadilla 1993), σε εκτρεφόμενη χιόνα (Merella et al. 2005), σε τσιπούρα και στο είδος *Pagellus bogaraveo* B. (Mladineo 2003).

Μορφολογική ταυτοποίηση των μυξοσποριδίων

Στην παρούσα εργασία περιγράφηκε η μορφολογία και μετρήθηκαν οι διαστάσεις των σπόρων των μυξοσποριδίων *E. leei*, *P. sparis* και *C. diplodae*, που ανιχνεύθηκαν σε μεσογειακά εκτρεφόμενα ψάρια. Οι σπόροι του *E. leei*, που ανιχνεύθηκαν σε εκτρεφόμενες χιόνες, δεν διέφεραν μορφολογικά από τους σπόρους του ίδιου παρασίτου, όπως τους έχουν περιγράψει άλλοι ερευνητές (Le Breton and Marques 1995). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε διαφορά στο μέγεθος, αφού οι σπόροι ήταν μεγαλύτεροι συγκριτικά με τους σπόρους του ίδιου παρασίτου που έχουν παρατηρηθεί σε εκτρεφόμενη χιόνα από άλλους ερευνητές (Le Breton and Marques 1995). Επίσης, ήταν μεγαλύτεροι και από τους σπόρους του ίδιου παρασίτου που έχει παρατηρηθεί σε άλλα είδη ψαριών, όπως τσιπούρα (Diamant 1992, 1998, Diamant et al. 1994, Sakiti et al. 1996, Padrós et al. 2001), φαγκρί (Le Breton and Marques 1995), σαργό (Padrós et al. 2001), καθώς και ψάρια ενυδρείου, *Symphodus tinca*, *Symphodus mediterraneus*, *Halobatrachus didactylus*, *Scartella cristata*, *Coris julis*, (Padrós et al. 2001). Η διαφορά αυτή στο μέγεθος μπορεί να οφείλεται αφενός στη διαφορετική γεωγραφική κατανομή των σπόρων και αφετέρου στο γεγονός ότι οι μετρήσεις τους σε άλλες μελέτες δεν πραγματοποιήθηκαν σε νωπούς σπόρους, αλλά σε μονιμοποιημένους σπόρους, χωρίς όμως να

αναφέρεται η επίδραση των μέσων μονιμοποίησης στο μέγεθος των σπόρων. Αντιθέτως, το μέγεθος των σπόρων του *E. leei* που μετρήθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα είναι παρόμοιο με άλλα είδη του γένους *Myxidium*, όπως το *Myxidium elmatbouli* στο είδος *Tylosurus choram* (Ali et al. 2006), *Myxidium tuan-fengensis* στο είδος *Letobotia taeniops* (Gong et al. 2003) και *Myxidium giganteum* στο είδος *Raja miraletus* (Kpatch et al. 1996).

Οι σπόροι του μυξοσποριδίου *P. sparis*, που ανιχνεύθηκαν σε εκτρεφόμενες τσιπούρες, δεν διέφεραν μορφολογικά από τους σπόρους του ίδιου παρασίτου, όπως έχουν περιγραφεί από άλλους ερευνητές (Sitja-Bobadilla and Álvarez-Pellitero 1992, Sitja-Bobadilla and Álvarez-Pellitero 1995, Palenzuela et al. 1999). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε διαφορά στο μέγεθος των σπόρων, καθώς οι σπόροι που μετρήθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα είχαν διαστάσεις μικρότερες.

Για το μυξοσπορίδιο *C. diplodae* δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για τη μορφολογία και το μέγεθος των σπόρων. Οι σπόροι του *C. diplodae*, που ανιχνεύθηκαν σε εκτρεφόμενες χιόνες, δεν διέφεραν μορφολογικά και είχαν παρόμοιες διαστάσεις με τους σπόρους του ίδιου παρασίτου σε άλλο είδος ξενιστή (λαβράκι) (Sitja-Bobadilla and Álvarez-Pellitero, 1993). Παρόμοιες διαστάσεις έχουν αναφερθεί και για άλλα είδη του γένους *Ceratomyxa*, όπως τα *C. acadensis* (Mavor 1916), *C. pacifica* (Kovaleva and Gaevskaya 1983), ενώ έχουν αναφερθεί και μικρότερα είδη, όπως τα *C. taenia* (Davis 1917), *C. angusta* (Meglitsch 1960) και *C. labrakis* (Sitja-Bobadilla and Álvarez-Pellitero 1993).

Εκτίμηση της επίδρασης της κατάψυξης και της χρώσης Giemsa στο μέγεθος των σπόρων των μυξοσποριδίων

Η κατάψυξη είναι ένας συνηθισμένος τρόπος διατήρησης των δειγμάτων μέχρι την επεξεργασία τους, εξαιτίας του γεγονότος ότι οι δειγματοληψίες γίνονται στο πεδίο, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η άμεση επεξεργασία των δειγμάτων (Garner et al. 2005, Yurakhno et al. 2007).

Επίσης, είναι δυνατόν οι σπόροι να μονιμοποιηθούν με διάφορα μέσα, όπως φορμόλη, αιθανόλη, αλκοόλη με HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) και να βαφτούν με χρώσεις Αιματοξυλίνη-Εοσίνη, Gram, Giemsa (Padrós et al. 2001). Ο χρόνος συντήρησης στην κατάψυξη και ο τρόπος μονιμοποίησης μπορεί

να επηρεάσει το μέγεθος των σπόρων και τη μορφολογία των μυξοσποριδίων, με αποτέλεσμα οι μετρήσεις του μεγέθους των σπόρων να μην είναι αντικειμενικές.

Σύμφωνα με τη μελέτη, σημαντική είναι η επίδραση της κατάψυξης για το χρονικό διάστημα των έξι μηνών, καθώς και της χρώσης *Giemsa* στο μέγεθος των ώριμων σπόρων των μυξοσποριδίων *E. leei*, *P. sparis* και *C. diplodae*, που ανιχνεύθηκαν σε μεσογειακά εκτρεφόμενα ψάρια. Συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι σε όλες τις περιπτώσεις η κατάψυξη ενός μηνός μείωσε λίγο το μέγεθος των σπόρων, όχι όμως σημαντικά. Αντιθέτως, η κατάψυξη έξι μηνών

μείωσε σημαντικά το μέγεθος των σπόρων, γεγονός που παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της επεξεργασίας με χρώση *Giemsa*.

Από τα αποτελέσματα αυτά, συμπεραίνουμε ότι οι μετρήσεις του μεγέθους των σπόρων που γίνονται μέσα στο χρονικό διάστημα του ενός μηνός μπορεί να είναι αντικειμενικές. Αντιθέτως, οι μετρήσεις δεν πρέπει να γίνονται σε σπόρους κατεψυγμένους για έξι μήνες ή και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, καθώς επίσης και σε σπόρους μυξοσποριδίων που έχουν υποστεί ορισμένη επεξεργασία, διότι το μέγεθός τους έχει μειωθεί σημαντικά και οι τιμές δεν είναι πραγματικές. ■

REFERENCES - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ali M., Abdel - Baki A., Sakran T. (2006) *Myxidium elmatbouli* n. sp. and *Ceratomyxa ghaffari* n. sp. (Myxozoa: Myxosporae) Parasitic in the Gallbladder of the Red Sea Houndfish *Tylosurus chorum* (Rüppell, 1837) (Teleostei: Belonidae) from the Red Sea, Egypt. *Acta Protozool*, 45: 97-103.
- Álvarez-Pellitero P., Sitzà-Bobadilla A. (1993) *Ceratomyxa* spp. (Protozoa: Myxosporae) infections in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Spanish Mediterranean area. *J Fish Biol*, 42:889-901.
- Athanassopoulou F. (1990) A study of the Myxosporae infections of *R. rutilus* L. with special reference to *Myxidium rhodei* Leger, 1905 in the renal tissue. Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling.
- Athanassopoulou F., Prapas Th., Rodger H. (1999) Diseases of *Puntazzo puntazzo* C. in marine aquaculture systems in Greece. *J Fish Dis*, 22:215-218.
- Athanassopoulou F., Karagouni E., Dotsika E., Ragias V., Tavla J., Christofiloyannis P. (2004) Efficacy and toxicity of orally administrated anti-coccidial drugs for innovative treatments of *Polysporoplasma sparis* infection in *Sparus aurata* L. *J App Icht*, 20(5): 345-354.
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M., Shostak A. W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol*, 83: 575-583.
- Company R., Sitzà-Bobadilla A., Pujalte M. J., Garay E., Álvarez-Pellitero P., Pérez-Sánchez J. (1999) Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *J Fish Dis*, 22:299-309.
- Davis H. S. (1917) The myxosporidia of the Beaufort region, a systematic and biological study. *Bull US Bur Fish* 35:199-252.
- Diamant A. (1992) A new pathogenic histozoic Myxidium (Myxosporae) in cultured gilt - head sea bream *Sparus aurata* L. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 12:64-66.
- Diamant A. (1998) Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporae). *Aquaculture*, 162:33-39.
- Diamant A., Lom J., Dyková I. (1994) *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporae of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Dis Aquat Org*, 20:137-141.
- Fiest S. W., Ronga E. (1996) Distribution and prevalence of gall bladder myxosporae parasites in dab (*Limnada limnada* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.) in UK coastal waters. *Bull Eur Assf Fish Pathol*, 16(5): 176-180.
- Garner M. M., Bartholomew J. L., Whipples C. M., Nordhausen R. W., Raiti P. (2005) Renal Myxozoanosis in Crowned River Turtles *Hardella thurjii*: Description of the Putative Agent *Myxidium hardella* n. sp. by Histopathology, Electron Microscopy, and DNA Sequencing. *Vet Pathol*, 42: 589-595.
- Gong X., Lu Y., Wang (2003) Description of two new myxosporae species parasitic in freshwater fishes from the Yangtze River in China. *Acta Protozool*, 42: 239-243.
- Jadwiga G. (1991) Marine fish parasitology, an outline. Polish Scientific Publishers, Warszawa.
- Karagouni E., Athanassopoulou F., Tsagozis P., Ralli E., Moustakareas T., Lytra K., Dotsika E. (2005) The impact of a successful anti-myxosporae treatment on the phagocyte functions of juvenile and adult *Sparus aurata* L. *International Journal of Immunology and Pharmacology* 18(1): 121-132.
- Kovaleva A. A., Gaevskaia V. (1983) First data on fish myxosporidia of the south-eastern Pacific open waters. *Vestnik Zoologii* 1: 6-11.
- Kpatch T. K., Diebakate C., Toguebaye B. S. (1996) Myxosporidia (Myxozoa, Myxosporae) of the genera *Sphaeromyxa* Thelohan, 1892, *Myxidium* Buetschli, 1882, *Zschokkella* Auerbach, 1910, *Bipteria* Kovaljova, Zubtchenko & Krasin, 1983 and *Leptotheca* Thelohan, 1895 parasites of fish from the coast of Senegal (West Africa). *J Afr Zool*, 110:309-317.
- Le Breton A., Marques A. (1995) Occurrence of an histozoic Myxidium infection in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 15:210-212.
- Lom J., Arthur J. R. (1989) A guideline for preparation of species description in Myxosporae. *J Fish Dis*, 12: 151-156.
- Lom J., Dykov I. (1995) Myxosporae (Phylum Myxozoa). In: Woo PTK (ed) *Fish diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infection*. Cab International UK, p97.
- Markiw M.E. (1989) Portals of entry for salmonid whirling diseases in rainbow trout. *Dis Aquat Org*, 6: 7-10.
- Mavor J. K. (1916) On the life - history of *Ceratomyxa acadensis*, a new species of Myxosporidia from the eastern coast of Canada. *Proc Amer Acad Arts Sci*, 51:549-578.
- Meglitsch, P. (1960) Some coelozoic myxosporidia from New Zealand fishes I. General, and family *Ceratomyxidae*. *Transactions of the Royal Society of New Zealand* 88: 265-356.

- 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). *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 25(4): 140-147.
- Mladineo I. (2003) Myxosporidean infections in Adriatic cage-reared fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 23:13-123.
- Padrós F., Palenzuela O., Hispano C., Tosas O., Zarza C., Crespo S., Álvarez - Pellitero P. (2001) Myxidium leei (Myxozoa) infections in aquarium - reared Mediterranean fish species. *Dis Aquat Org*, 47:57-62
- Palenzuela O., Álvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. (1999) Glomerular disease associated with *Polysporoplasma sparisi* (Myxozoa) infections in cultured gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Parasit Res*, 118:245-126.
- Rigos G., Grigorakis K., Christophiligiannis M., Nengas I., Alexis M. (1997) *Ceratomyxa* spp. (Myxosporea) infections in cultured common dentex from Greece. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 17:174-176
- Rigos G., Christophiligiannis P., Yiagnisi M., Andriopoulou A., Koutsodimou M., Nengas M., Alexis M. (1999) Myxosporean infections in Greek mariculture. *Aquacult Intern*, 7:361-364.
- Sakiti N., Tarer V., Jacquemin D., Marques A. (1996) Présence en Méditerranée occidentale d' une Mixosporidie histozoïque pathogène dans les élevages du daurade, *Sparus aurata*. *Ann Sci Nat Zool Paris*, 17:123-127.
- Sitjà-Bobadilla A., Álvarez-Pellitero P. (1992) *Sphaerospora* (Myxosporea: Bivalvulida) infection in cultured head sea bream, *Sparus aurata* L.: a preliminary report. *J Fish Dis*, 15:339-343.
- Sitjà-Bobadilla A., Álvarez-Pellitero P. (1993) Light and electron microscopical description of *Ceratomyxa labralis* n. sp. and a redescription of *C. diplodae* (Myxosporae:Bivalvulida) from wild and cultured Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostei: Serranidae). *Sys Parasitol*, 26: 215-223.
- Sitjà-Bobadilla A., Álvarez-Pellitero P. (1995) Light and electron microscopic description of *Polysporoplasma ng* (Myxosporea), *Polysporoplasma sparisi* nsp. and *Polysporoplasma mugilisi* nsp. from *Liza aurata* L. *Eur J Parasitol*, 31(1):77-89.
- Wolf K., Markiw M. E. (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, 255: 1149-1452.
- Yamaguti S. (1963) *Systema Helminthum* Vol. I-II. Interscience Publishers, New York.
- Yokoyama H. (1993). Studies on the life cycle of some myxosporeans. Ph.D. Thesis, The University of Tokyo, Tokyo.
- Yurakhno V. M., Ovcharenko M. O., Holzer A. S., Sarabeev V. L., Balbuena J. A. (2007) *Kudoa unicapsula* n. sp. (Myxosporea: Kudoidae) a parasite of the Mediterranean mullets *Liza ramada* and *L. aurata* (Teleostei: Mugilidae). *Parasitol Res*, 101(6): 1671.
- Zar J. H. (1996) *Biostatistical Analysis*, 3rd Edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.