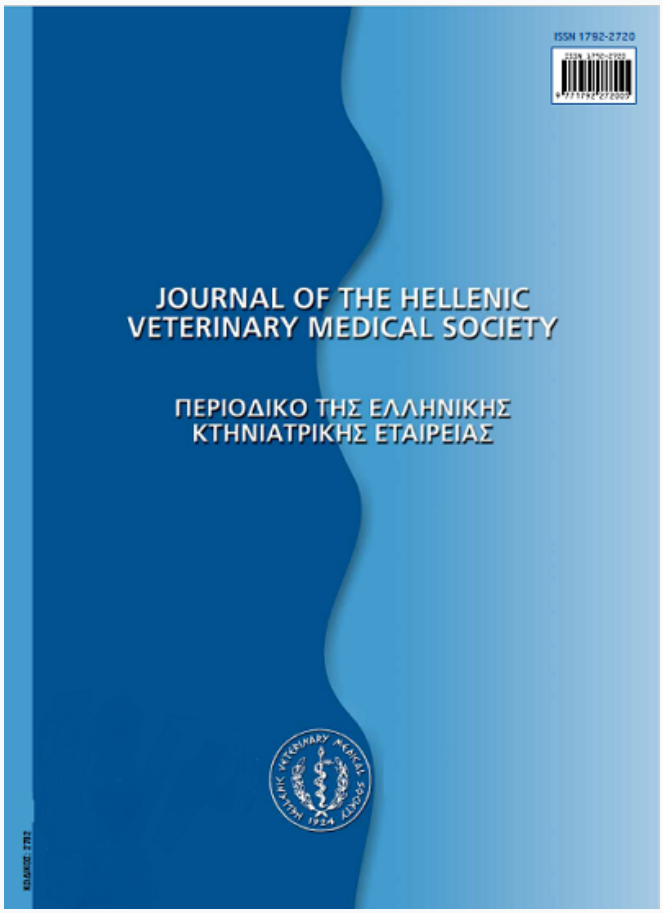
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 54, No 3 (2003)




# Development of an experimental model for Anophryoides haemophila (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a parasite of american lobster Homerus americanus

*F. ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ), D. SPEARE, R. J. CAWTHORN, R. MacMILLAN, B. DESPRES*

doi: 10.12681/jhvms.15335

**To cite this article:**

ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) F., SPEARE, D., CAWTHORN, R. J., MacMILLAN, R., & DESPRES, B. (2017). Development of an experimental model for Anophryoides haemophila (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a parasite of american lobster Homerus americanus. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *54*(3), 201–208. https://doi.org/10.12681/jhvms.15335

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 14/02/2026 07:01:23

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2003, 54(3): 201-208
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2003, 54(3): 201-208

Ερευνητική
Original article

# Ανάπτυξη πειραματικού μοντέλου μελέτης του παρασίτου *Anophryoides haemophila* (Scuticociliatida: Orchitophryidae) σε αστακούς *Homarus americanus*

Φ. Αθανασοπούλου[1], Speare D.[2], Cawthorn R.J.[1,2], MacMillan R.[1,2], Despres B.[3]

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Οι βασικές αλλοιώσεις που αφορούν το βλεφαριδοφόρο παράσιτο *Anophryoides haemophila*, σε πειραματικά μολυσμένους αστακούς παρατηρούνται στα βράγχια και το συνδετικό ιστό, από την 9η εβδομάδα μετά τη μόλυνση. Οι αλλοιώσεις αυτές δε σχετίζονται με τον εμβολιασμό των παρασίτων και ήταν σταθερές σε όλες τις μελέτες έγχυσης παρασίτων (2000, 10000 και 500000 παράσιτα ανά αστακό). Μάλιστα ήταν παρούσες, τόσο σε αστακούς που πέθαναν, όσο και σε αστακούς που θανατώθηκαν. Υψηλότεροι τίτλοι εμβολιασμού είχαν ως αποτέλεσμα υψηλότερους αριθμούς παρασίτων μόνο σε περιοχές των βραγχίων και στο συνδετικό ιστό των περισσοτέρων οργάνων, χωρίς ωστόσο να διεισδύσουν στο παρέγχυμα κανενός οργάνου. Επιπλέον μεγαλύτερος αριθμός παρασίτων στον εμβολιασμό (500.000 ανά αστακό) είχε ως αποτέλεσμα ανάπτυξη ασθένειας βραχύτερης πορείας και έτσι οι αστακοί πέθαιναν μεταξύ 4ης και 6ης εβδομάδας μετά τη μόλυνση. Αυτό δεν παρατηρήθηκε σε εμβολιασμούς των 2.000 και 10.000 παρασίτων ανά αστακό, όπου η θνησιμότητα εμφανίστηκε 11-14 εβδομάδες μετά τη μόλυνση.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** *Anophryoides haemophila*, Αμερικανικός αστακός, *Homarus americanus*, Scuticociliatida, πειραματικές συνθήκες.

[1] Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Τρικάλων 221, Καρδίτσα, 431 00, Ελλάς.
E-mail: eathan@vet.uth.gr -Corresponding author
[2] Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island,Canada, C1A 4P3.
[3] Lobster Health Centre and Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, C1A 4P3.

*Submission date: 30.07.2003*
*Approval date: 19.09.2003*

# Development of an experimental model for *Anophryoides haemophila* (Scuticociliatida: Orchitophryidae), a parasite of american lobster *Homerus americanus.*

Athanassopoulou F.[1], Speare D.[2], Cawthorn R.J.[1,2], MacMillan R.[1,2], Despres B.[3]

**ABSTRACT.** The principal lesions due to the ciliate *Anophryoides haemophila* in experimentally infected lobsters are observed in gills and connective tissue from the 9th week post-infection. These lesions were not related to the inoculum of parasites and were consistent in all inoculum studies (2,000, 10,000 and 500,000 ciliates per lobster) and were present in both euthanized and dead lobsters. The higher inocula resulted only in higher numbers of parasites observed in sections of gills and in the connective tissue of more organs, with no penetration to the parenchyma of any organ. Furthermore, the highest inoculum of ciliates (500,000 per lobster) resulted in a shorter course of disease development and consequently, experimental lobsters died between 4th and 6th week post-infection. This was not observed at inocula of 2,000 and 10,000 ciliates per lobster, where mortality occurred 11-14 weeks post-infection.

**Key words:** *Anophryoides haemophila*, American lobster, *Homarus americanus*, Scuticociliatida, experimental conditions.

[1] Laboratory of Ichthyology & Fish Pathology, University of Thessaly, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, 221 Trikalon str., Karditsa, 431 00 Greece.
E-mail: eathan@vet.uth.gr -Corresponding author
[2] Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island,Canada, C1A 4P3.
[3] Lobster Health Centre and Department of Pathology & Microbiology, Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, C1A 4P3.

*Submission date: 30.07.2003*
*Approval date: 19.09.2003*

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα βλεφαριδοφόρα παράσιτα θεωρούνται ως αιτιολογικοί παράγοντες σημαντικών ασθενειών σε καρκινοειδή που βρίσκονται σε αιχμαλωσία (Morado & Small 1995) και μπορούν να προκαλέσουν απώλειες στον αμερικανικό αστακό (*Homarus americanus*), μέχρι 15% ετησίως (Cawthorn 1997, Lavalee et al., 2001). Η ασθένεια που προκαλειται από το παράσιτο *Anophryoides haemophila*, έχει πρόσφατα περιγραφεί από τους Cawthorn et al., (1996) ως «bumper car disease». Προηγούμενες μελέτες σε ασθένεια που προκλήθηκε πειραματικά σε αστακούς είναι σπάνιες (Sherbourn & Bean, 1991).

Υπάρχει επομένως ανάγκη ανάπτυξης πειραματικών μοντέλων μελέτης της υγείας και των μολυσματικών ασθενειών στους αστακούς. Αυτό θα διευκόλυνε τη σύγκριση και ανάλυση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ερευνών και την εκτίμηση των αποτελεσμάτων των μολυσματικών ασθενειών σε πληθυσμούς οστρακοειδών άγριων και σε αιχμαλωσία. Πρόσφατα, ένα πρόγραμμα μακράς διαρκείας άρχισε στο Πανεπιστήμιο "Prince Edward Island" για την καθιέρωση εργαστηριακών δεδομένων και αιματολογικών παραμέτρων υγιών και ασθενών αστακών και για την εκτίμηση παραγόντων επικινδυνότητας στις εγκαταστάσεις αιχμαλωσίας.

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την καθιέρωση ενός χρήσιμου μοντέλου για τη μελέτη της ασθένειας "bumper car" στους αστακούς, σε περιόδους συνεχούς ανάπτυξης αλλοιώσεων, προκαλούμενων από το βλεφαριδοφόρο παράσιτο *Anophryoides haemophila*, σε ελεγχόμενες πειραματικές συνθήκες. Το μοντέλο αυτό, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε έρευνες που σχετίζονται με την πρόληψη της ασθένειας και τη θεραπεία της.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Προέλευση και διατήρηση αστακών

Αστακοί (μήκους 65,1 mm, βάρους 190-400g) των οποίων η προμήθεια έγινε κατά την άνοιξη και μεταφέρθηκαν στο Aquatic Animal Facility of Atlantic Veterinary College. Οι αστακοί διατηρήθηκαν σε ένα σύστημα 6 δεξαμενών, με αλατόνερο που ανανεωνόταν. Οι δεξαμενές ήταν χωρητικότητας 4770L. Χρησιμοποιήθηκε τεχνητό θαλασσινό νερό (Instant Ocean). Κάθε δεξαμενή είχε 20 αστακούς (με τις δαγκάνες τους δεμένες) σε ατομικά διαμερίσματα, σε κατακόρυφα δοχεία. Η ποιότητα του νερού ελεγχόταν κάθε εβδομάδα ως προς μη ιονισμένη αμμωνία (<0,01mg/L), επίπεδα νιτρικών ιόντων (<20,0 mg/L), νιτρωδη (<0,1 mg/L), pH (7,9-8,4), αλατότητα (29-30 ppt) και συνεχώς για τη θερμοκρασία (2±1˚C). Οι αστακοί δεν ταΐστηκαν κατά τα πειράματα και το σύστημα ελεγχόταν καθημερινώς για ασθενείς ή νεκρούς αστακούς. Οι αστακοί διατηρήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του Καναδικού Συμβουλίου για τη Φροντίδα των Ζώων, σε φωτοπερίοδο 12 ώρες φώς-12 ώρες σκοτάδι. Οι αστακοί που χρησιμοποιήθηκαν, κρατήθηκαν στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Οι αιμολέμφοι 10 αστακών που προορίζονταν για το πεί-

## INTRODUCTION

Ciliate parasites are generally considered as etiologic agents of important diseases of crustaceans (Morado & Small, 1995) and can cause post harvest losses of American lobster (*Homarus americanus*) up to 15% annually (Cawthorn, 1997). "Bumper car" disease is caused by an Anophryoides haemophila, a scuticociliate, recently described by Cawthorn et al. (1996). Previously studies of experimentally induced disease in lobsters are rare (Sherbourne & Bean, 1991).

Overall, there is a significant requirement for development of experimental models of studying health and infectious diseases in lobsters as this would facilitate the comparison and analysis of results among different researchers and to assess the impact of infectious diseases on both wild and captive crustacean populations. Recently, a long term project has started at the University of Prince Edward Island to establish laboratory health data and haematological parameters of healthy and diseased lobsters and to assess risk factors for lobsters in holding facilities.

The present study is part of this project to establish an experimentally useful model for the study of "bumper car disease" in lobsters, in terms of sequential development of lesions arising from the ciliate infection in these standardized experimental conditions. Ultimately, this model could provide useful information related to disease prevention and effective treatment.

## MATERIALS AND METHODS

### Source and maintenance of lobsters

'Canner' lobsters (carapace length 65.1-80.9 mm, weight 190-400 g) were purchased during the spring lobster season period and transported to the Aquatic Animal Facility, Atlantic Veterinary College. Lobsters were held in a system of six tanks, 4770 L capacity, saltwater recirculation system that was equipped with both particle and biological filtration. Artificial seawater was prepared from Instant Ocean. Each tank housed 20 lobsters (all claws banded) in individual compartments in stacked trays. Water quality was monitored weekly for unionized ammonia (<0.01 mg/l), nitrate ion levels (<20.0 mg/l), nitrite ion (<0.1 mg/l), pH (range: 7.9-8.4) and salinity (range: 29-30 ppt), and continuously for temperature (2±1˚C). Lobsters were not fed during the experiments and the system was monitored daily for ill or dead lobsters. Lobsters were maintained in accordance with the Guidelines of the Canadian Council on Animal Care, on a 12h light: 12h dark photoperiod. Lobsters used in both experiments were kept in similar experimental conditions. The haemolymph of ten lobsters of the stock intended for experimentation was examined for ciliate infection and gaffkaemia seven days prior to the initiation of the experiments.

### Pilot study to assess inoculum level and sampling times

Twelve healthy lobsters were used for this experiment.

ραμα, εξετάστηκαν για μόλυνση από βλεφαριδοφόρα παράσιτα και Καφκαιμία, επτά ημέρες πριν από την έναρξη των πειραμάτων.

**Πειραματική πιλοτική μελέτη για την εκτίμηση των επιπέδων έγχυσης και του χρόνου δειγματοληψίας)**

Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 12 αστακοί. Στους αστακούς αυτούς έγινε έγχυση 1.000, 2.000, 10.000, 500.000 παρασίτων ανά αστακό, με ένεση στην αιμολέμφο (3 αστακοί ανά έγχυση). Η αιμολέμφος αφαιρούνταν σε εβδομαδιαία διαστήματα και εξεταζόταν για την παρουσία παρασίτων στο μικροσκόπιο. Σε ίσο αριθμό αστακών έγινε έγχυση αποστειρωμένου θαλασσινού νερού. Οι αστακοί αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως μάρυρες. Ενας αστακός θανατωνόταν ανά εβδομάδα από τον οποίο ελήφθησαν δείγματα για εξετάσεις ιστολογικές, ανοσοϊστοχημικές και ανοσοφθορισμού. Δείγματα επίσης ελήθηκαν από ετοιμοθάνατους αστακούς για εξετάσεις ιστολογικές, ανοσοϊστοχημικές και ανοσοφθορισμού. Η αιμολέμφος λαμβανόταν σε εβδομαδιαία διαστήματα σε ζωντανούς αστακούς και εξεταζόταν σε μικροσκόπιο και με ανοσοφθορισμό για τυχόν παρουσία παρασίτων.

**Προέλευση και διατήρηση των παρασίτων**

Τα παράσιτα *Anophryoides haemophila* προήλθαν από πειραματικά μολυσμένους αστακούς, στο Atlantic Veterinary College. Τα παράσιτα καλλιεργήθηκαν σε 25cm$^3$ δοχεία καλλιέργειας, που περιείχαν 10ml τροποποιημένου ATCC 1651 MA θρεπτικού υλικού (Messick & Small, 1996). Τα παράσιτα ανακαλλιεργήθηκαν σε νέα δοχεία κάθε 14 ημέρες χρησιμοποιώντας 0,5 ml καλλιέργειας σε 9,5 ml νέου υποστρώματος. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν στους 5˚C. Στους αστακούς που χρησιμοποιήθηκαν και στα δυο πειράματα, έγινε έγχυση παρασίτων από την ίδια καλλιέργεια.

**Μέτρηση των παρασίτων πριν από τη μόλυνση**

Ώριμες καλλιέργειες των παρασίτων, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν σε 600G για 5 min, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο. Το ίζημα που προέκυψε αφαιρέθηκε, και τοποθετήθηκε σε 8 ml τεχνητού θαλασσινού νερού και αναδεύτηκε προσεκτικά. Η μέτρηση των παρασίτων που εγχύθηκαν, έγινε με τη χρήση ενός αιμοκυτόμετρου, αφού πρώτα μονιμοποιήθηκαν τα παράσιτα σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλίνης 10%. Για να επιτευχθούν οι δόσεις, που απαιτούνταν για τα πειράματα έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις.

**Συλλογή και μετρήσεις αιμοκυττάρων και παρασίτων**

Η αιμολέμφος λήφθηκε με τρώση του κοιλιακού αιμοφόρου κόλπου και συλλέχθηκε σε σύριγγα 5ml, γεμισμένη με 4,5ml διαλύματος (Cornick & Stewart,1968) και 0,5ml αιμολέμφου, που λήφθηκε από κάθε αστακό. Οι μετρήσεις έγιναν με αιμοκυτόμετρο.

**Ιστοπαθολογία**

Οι ιστοί που αφαιρέθηκαν από μολυσμένους και μη αστακούς, περιλάμβαναν βράγχια, ηπατοπάγκρεας, μύς,

Lobsters were inoculated with 1,000, 10,000 and 500,000 ciliates per animal by intrahaemocoelic injection (three lobsters per inoculum). Haemolymph was removed at weekly intervals and examined for the presence of parasites by light microscopy. An equal number of lobsters was inoculated with sterile seawater and the lobsters were used as controls. Lobsters were not euthanized, but left to die and were sampled at that point for routine histology, immunohistochemistry and immunofluorescence.

Haemolymph was drawn at weekly intervals and examined under light microscopy and immunofluorescence for the presence of parasites.

**Source and maintenance of ciliates**

*Anophryoides haemophila* originated from experimentally infected lobsters at Atlantic Veterinary College. Ciliates were subpassaged in 25cm$^2$ culture flasks containing 10ml of modified ATCC 1651 MA medium (Messick & Small, 1996). Ciliates were subpassaged to new flasks every 14 days by using 0.5 ml of established culture in 9.5 ml of fresh medium. Cultures were maintained at 5˚C. Lobsters used in both experiments were inoculated with ciliates from the same culture.

**Ciliate counts prior to infection**

Established cultures of ciliates were placed in 15 ml centrifuge tubes and spun at 600 G for 5 min in refrigerated centrifuge. The resulting sediment was then removed, resuspended in 8 ml of artificial seawater and gently agitated. Counts of the ciliates were made by using an haemocytometer, after fixing the ciliates in neutral buffered formalin 10%. Appropriate dilutions were then performed in order to obtain the doses required for the experiments.

**Haemocytes and ciliate collection and counts**

Haemolymph was obtained by puncture of the ventral hemal sinus and ciliates were collected, using a 5 ml syringe filled with 4.5 ml of buffer (Cornick & Stewart, 1968) and 0.5 ml of haemolymph which was removed from each lobster. Counts were made by a haemocytometer.

**Histology**

Tissues removed from infected and uninfected lobsters included gills, hepatopancreas, muscles, heart, intestine, antennal gland, stomach and reproductive tissue, haemopoietic tissue, nerve ganglion and epidermis. Tissues were fixed in 1 part glutaraldehyde and 4 parts formalin fixative and processed, according to the method of McDowell & Trump (1976). Lobsters were euthanized via immersion in benzocaine (10% in ethanol) at a dose of 18ml per litre of seawater.

**Immunohistochemistry staining**

Immunoperoxidase staining of ciliates, using a monoclonal antibody (clone 16H2), was used (Cawthorn, unpublished data) to determine the presence of parasites in the organs of lobsters at early stages of the experimental

**Πίνακας 1.** Βιωσιμότητα, συνολικός αριθμός παρασίτων την ώρα του θανάτου και αποτελέσματα ανοσοφθορισμού και ανοσοπεροξειδάσης σε πειραματικά μολυσμένους αστακούς με διαφορετικές δόσεις εμβολιασμού με *Anophryoides haemophila*.

| Αριθμός παρασίτων που ενοφθαλμίστηκαν ανά αστακό | Εβδομάδες μέχρι το θάνατο | Αριθμός παρασίτων ανά ml αιμολέμφου ($x10^6$) | | Θετικό σε δοκιμασία IFAT | Θετικό στην αντίδραση Ανοσοπεροξειδάσης |
|---|---|---|---|---|---|
| | | C | M | | |
| **1000** | 8-10 | 0 | 1,4 (10 εβδομ) | 4 εβδομάδες | ΔΕ |
| **10000** | 10-14 | 0<br>0 | 2 (10 εβδομ)<br>0,9 (14 εβδομ) | 4 εβδομάδες | 4 εβδομάδες |
| **500000** | 4-6 | 0<br>0 | 1,1 (4 εβδομ)<br>1,3 (6 εβδομ) | 1 εβδομάδα | 1 εβδομάδα |

C = μάρτυρας, M = μολυσμένων κατά την ημέρα θανάτου, ΔΕ= δεν έγινε

**Table 1.** Survival, total number of ciliates at time of death and immunofluorescence and immunoperoxidase results of experimentally infected lobsters with different inocula of *Anophryoides haemophila*.

| Number of ciliates inoculated per lobster | Number of weeks till death (weeks) | Number of ciliates per ml of haemolymph ($x10^6$) | | IFAT +ve | Immunoperoxidase +ve |
|---|---|---|---|---|---|
| | | C | M | | |
| **1,000** | 8-10 | 0 | 1.4 (10 w.) | 4 weeks | ND |
| **10,000** | 10-14 | 0<br>0 | 2 (10 w.)<br>0.9 (14 w.) | 4 weeks | 4 weeks |
| **500,000** | 4-6 | 0<br>0 | 1,1 (4 w.)<br>1.3 (6 w.) | 1 week | 1 week |

ND = not done, C = control, M = mortality, W = week

καρδιά, έντερο, πρόσθιο αδένα, στόμαχο και ιστούς από το γεννητικό, αιμοποιητικό ιστό, νευρικά γάγγλια και επιδερμίδα. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε 1 μέρος γλουταραλδεϋδης, 4 μέρη φορμαλίνης, σύμφωνα με τη μέθοδο McDowell & Trump (1976). Οι αστακοί θανατώθηκαν με εμβάπτιση σε βενζοκαΐνη (10% σε αιθανόλη), σε μια δόση 18 ml ανά λίτρο θαλασσινού νερού.

### Χρώση ανοσοϊστοχημείας

Για να καθορισθεί η παρουσία παρασίτων στα όργανα των αστακών σε πρώιμα στάδια των πειραματικών μολύνσεων χρησιμοποιήθηκε χρωστική ανοσοπεροξειδάσης για βλεφαριδοφόρα παράσιτα, η οποία χρησιμοποιεί ένα μονόκλωνο αντίσωμα (clone 16H2) (Cawthorn, unpublished data). Τμήματα ανοσοϊστοχημείας επικολλήθηκαν σε θετικά φορτισμένα slides, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των Speare και των συνεργατών του (1998), για σπόρους του *Loma salmonae*.

infections. Sections for immunochemistry were mounted on positively charged slides, using the method of Speare et al (1998) for *Loma salmonae* spores.

### Immunofluorescence

10 μl of ciliate suspension was air dried on slides with 12 wells and acetone was fixed for 10 min. Slides were then stored at -20°C. Supernatants, from wells containing the clone, were tested by fluorescence antibody (FA). Slides were washed for 1 min in phosphate buffered saline (PBS) to remove salts from the seawater and 20 μl of supernatant was inoculated on each well for 20 min at room temperature (25°C). Slides were then washed with PBS and a second antibody goat antimouse IgG+M+A, labeled with fluorescein (1/100 dilution), was incubated for 20 min at room temperature in the dark, with Evans Blue as a counterstain. Slides were washed again with PBS and mounted with FA mounting fluid.

**Ανοσοφθορισμός**

10 μl από εναιώρημα βλεφαριδοφόρων παρασίτων στέγνωσαν σε δισκία με 12 πηγάδια και μονιμοποιήθηκαν με ακετόνη για 10 min. Τα δισκία διατηρήθηκαν στους 20°C. Επιπλέον, τα πηγαδια που περιείχαν τον κλώνο 16H2, εξετάστηκαν με φθορίζον αντίσωμα (FA). Οι αντικειμενοφόρες πλύθηκαν για 1 min σε διαλυμα φωσφορικού άλατος (PBS), για να αφαιρεθούν τα άλατα από το θαλασσινό νερό και προστέθηκαν επιπλέον 20 μl PBS σε κάθε πηγαδι και αφέθηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Οι αντικειμενοφόρες μετά πλύθηκαν με PBS και επωάστηκαν με δεύτερο αντίσωμα κατσίκας έναντι IgG+IgM+IgA αντισωμάτων ποντικού, συζευγμένου με φλουορεσκεΐνη (διάλυμα 1/100), επωάστηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι με Evans blue χρωστική. Οι αντικειμενοφόρες ξεπλύθηκαν ξανά με PBS, και επικολλήθηκαν με υγρό FA.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Συμπτώματα και νεκροτομικές αλλοιώσεις**

Δεν παρατηρήθηκαν καθόλου κλινικά συμπτώματα σε κανένα αστακό. Οι αστακοί θεωρήθηκαν νεκροί, όταν δεν παρουσίαζαν καμία αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα.

**Πειραματική πιλοτική μελέτη για την εκτίμηση του επιπέδου και του χρόνου δειγματοληψίας**

Ο αριθμός των βλεφαριδοφόρων παρασίτων που βρέθηκαν στην αιμολέμφο νεκρών αστακών, κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με διαφορετικούς αριθμούς έγχυσης παρασίτων, παρουσιάζεται στους Πίνακες 1 και 2. Οι εξετάσεις ανοσοφθορισμού και ανοσοπεροξειδάσης των τμημάτων των ιστών, αποκάλυψαν την παρουσία βλεφαριδοφόρων παρασίτων πρώτα στα βράγχια (εβδομάδα 4) σε όλες τις δόσεις εμβολιασμών, ενώ οι αστακοί, στους οποίους έγινε έγχυση με το μεγαλύτερο αριθμό παρασίτων, αντέδρασαν θετικά στα βράγχια από την πρώτη εβδομάδα.

Οι αριθμοί των παρασίτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Τα παράσιτα αναγνωρίστηκαν με οπτικό μικροσκόπιο, την 5η εβδομάδα. Σε εξέταση ανοσοφθορισμού σε τμήματα ιστών, τα παράσιτα πρωτοεμφανίστηκαν την 4η εβδομάδα μετά τη μόλυνση. Μελέτες ανοσοπεροξειδάσης αποκάλυψαν την παρουσία 1-3 παρασίτων στην 4η εβδομάδα μετά τη μόλυνση, μόνο στα βράγχια (Πίνακας 2). Ωστόσο, αλλοιώσεις δεν παρατηρήθηκαν μέχρι την 5η εβδομάδα μετά τη μόλυνση.

Οι κυριότερες αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν στα βράγχια και στο συνδετικό ιστό από την 9η εβδομάδα μετά τη μόλυνση, για τη μικρότερη έγχυση και στην εβδομάδα 4 για την έγχυση 500.000 παρασίτων. Η ύπαρξη αυτών των αλλοιώσεων δε σχετίζεται με τον αριθμό των παρασίτων που εγχύθηκε, και ήταν παρούσες σε όλες τις μελέτες. Υψηλότερες δόσεις είχαν ως αποτέλεσμα τον αυξημένο αριθμό παρασίτων, σε τμήματα των βραγχίων και στο συνδετικό ιστό των περισσοτέρων οργάνων, χωρίς όμως να διεισδύσουν στο παρέγχυμά τους. Επιπλέον, η υψηλότε-

## RESULTS

**Clinical signs and necropsy**

No clinical signs were observed during the experimental studies and lobsters were considered dead when completely non- responsive to external stimuli.

**Pilot study to assess inoculum level and sumpling times**

The number of ciliates found in haemolymph at death, during infections with different inocula numbers, is shown in Table 1 & 2. Both immunofluorescence and immunoperoxidase testing of tissue sections revealed the presence of ciliates first in the gills (week 4) with most inocula, whereas for the highest inoculum the ciliates reacted positively in gills from the first week.

The ciliate counts in haemolymph are presented in Table 2. The ciliates were recognizable by light microscopy examination at week 5. In immunofluorescence testing in tissue sections, the parasite was first present in the gills at week 4 post-infection, only in the gills (Table 2). No lesions were observed until week 5 post-infection. However, the principal lesions were observed in gills and connective tissue from 9th week post-infection for the lower inocula and at week 4 for the 500,000 ciliate inoculum. These lesions were not related to the inoculum of parasites and were present in all inoculum studies. Higher doses resulted only in higher numbers of parasites observed in sections of gills and in the connective tissue of more organs, with no penetration to the parenchyma of any organ.

Furthermore, the highest inoculum of ciliates (ie. 500,000 per lobster) resulted in a shorter course of disease development: this was not observed at inoculums of 1,000 , 2000 and 10,000 per lobster.

The most characteristic lesions, causing severe pathology in experimentally infected animals, typically occurred at later stages of infection, in the gills and the connective tissue, and are described in detail in another paper (Athanassopoulou et al., unpublished data).

## DISCUSSION

Reports of ciliate infections in wild populations of crustaceans are normally associated with molting periods, localized physical parameters areas (Messick & Small, 1996) and puncture wounds (Sherbourne & Bean, 1991; Morado & Small, 1995). Therefore, it is necessary to make a prediction of an accurate parasite inoculum that initiates infections in nature and to establish a comparative experimental model. Infections in crabs are not useful models for experimental stages in lobsters, because the development of ciliate-induced disease has very different time scale in these hosts (Bang et al., 1972; Armstrong et al., 1981). All naturally reported infections in American lobsters have a comparatively short course of disease, with mortalities occurring at week 6 or 8 post-infection (Aitken & Waddy, 1986).

There are no previous reports of experimental induction

**Πίνακας 2.** Βιωσιμότητα, συνολικός αριθμός παρασίτων *Anophryoides haemophila* την ώρα του θανάτου και αποτελέσματα ανοσοφθορισμού και ανοσοπεροξειδάσης σε πειραματικά μολυσμένους αστακούς με 2000 παράσιτα ανά αστακό.

| Αριθμός παρασίτων που ενοφθαλμίστηκαν ανά αστακό | Εβδομάδες μέχρι το θάνατο | Μέσος αριθμός (χ) παρασίτων ανά ml αιμολέμφου (x10⁶) (SE) | | | Θετικό σε δοκιμασία IFAT | Θετικό στην αντίδραση ε Ανοσοπεροξειδάσης |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | E (N=3) | C (N=3) | M (N=3) | | |
| 2000 | 4-12 εβδομάδες | - | - | - | 4 εβδομάδες (βράγχια) | 4 εβδομάδες (βράγχια) |
| | 6 εβδομάδες | 0 | 0 | 0,09 (+4,1) | | |
| | 7 εβδομάδες | 0 | 0 | 0,07 (+3,5) | | |
| | 9 εβδομάδες | 0,2 (+0,3) | 0 | 0,2 (+4,3) | | |
| | 11 εβδομάδες | 2 (+0,2) | 0 | 0 | | |
| | 12 εβδομάδες | 0 | 0 | 3 (+1,1) | | |

E = ευθανασία, M = μολυσμένων κατά την ημέρα θανάτου, C = μάρτυρες

**Table 2.** Survival, total number of *Anophryoides haemophila* at time of death and immunofluorescence and immunoperoxidase results of experimentally infected lobsters with 2,000 ciliates per lobster.

| Number of ciliates inoculated per lobster | Number of weeks till death (weeks) | Number of ciliates per ml of haemolymph (x10⁶) (SE) | | | IFAT +ve | Immunoperoxidase +ve |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | E (n=3) | C (n=3) | M (n=3) | | |
| 2000 | 4-12 weeks | - | - | - | 4 weeks (gills) | 4 weeks (gills) |
| | 6 weeks | 0 | 0 | 0,09 (±4,1) | | |
| | 7 weeks | 0 | 0 | 0,07 (±3.5) | | |
| | 9 weeks | 0,2 (±0.3) | 0 | 0,2 (±4.3) | | |
| | 11 weeks | 2 (±0.2) | 0 | 0 | | |
| | 12 weeks | 0 | 0 | 3 (±1.1) | | |

E = euthanised, M= mortality, C = control

ρη δόση παρασίτων (500.000/αστακό), είχε ως αποτέλεσμα ταχύτερη εξέλιξη της νόσου. Αυτό δεν παρατηρήθηκε σε δόσεις των 1.000, 2.000 και 10.000 παρασίτων ανά αστακό. Οι πιο χαρακτηριστικές αλλοιώσεις που προκλήθηκαν σε πειραματικά μολυσμένα ζώα, εμφανίστηκαν κυρίως σε μετέπειτα στάδια της μόλυνσης, στα βράγχια και στο συνδετικό ιστό και περιγράφονται σε άλλη εργασία. (Athanassopoulou et al., υπό δημοσίευση).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι αναφορές της μόλυνσης από βλεφαριδοφόρα πα-

of "bumper car" disease in lobsters via laboratory cultured *A. haemophila*. The only experimental infections in lobsters concerned parasitic ciliates and resulted in even more rapid course of the disease, ie. at 33-58 days post-infection (Sherbourne & Bean, 1991). The number of ciliates, injected in the lobsters, which were used in Sherbourne & Bean's (1991) experiments, however, was not calculated. Perhaps these animals received a very high ciliate inoculum, resulting in a short course of the infection. This was documented in our experiments, when an inoculum of

ράσιτα σε άγριους πληθυσμούς καρκινοειδών, φυσιολογικά σχετίζονται με περιόδους απόρριψης του εξωσκελετού κατά τις εκδύσεις, με τοπικές φυσικές παραμέτρους (Messick & Small, 1996) και με πληγές/λύσεις συνεχείας (Sherbourne & Bean, 1991, Morado & Small, 1995). Γι' αυτό χρειάζεται πρόβλεψη του ακριβούς αριθμού παρασίτων, που κατά την έγχυσή τους μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση (στη φύση), και η καθιέρωση ενός πειραματικού μοντέλου. Οι μολύνσεις σε καβούρια, δεν είναι χρήσιμα μοντέλα για πειραματικά στάδια σε αστακούς (Bang et al., 1972, Armstrong et al.., 1981). Όλες οι αναφερόμενες φυσικές μολύνσεις σε αμερικανικούς αστακούς, έχουν συγκριτικά βραχεία πορεία της νόσου, με εμφάνιση θανάτων στις εβδομάδες 6-8 μετά τη μόλυνση (Aitken & Waddy, 1986). Δεν υπάρχουν προηγούμενες αναφορές, πειραματικής πρόκλησης της ασθένειας σε αστακούς, με *A. haemophila*, εργαστηριακής καλλιέργειας. Οι μόνες πειραματικές μολύνσεις στους αστακούς, αφορούσαν βλεφαριδοφόρα παράσιτα και είχαν αποτέλεσμα την ακόμη πιο βραχεία πορεία της νόσου, δηλαδή 33-58 ημέρες μετά τη μόλυνση (Sherbourne & Bean, 1991). Ωστόσο, ο αριθμός των παρασίτων που εγχύθηκαν στους αστακούς, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των Sherbourne & Bean (1991), δεν μετρήθηκε. Ίσως στα άτομα αυτά να έγινε έγχυση πολύ υψηλού αριθμού βλεφαριδοφόρων παρασίτων, με αποτέλεσμα τη βραχεία πορεία της νόσου. Αυτό καταγράφηκε στα πειράματά μας, όταν εφαρμόστηκε έγχυση 500.000 βλεφαριδοφόρων παρασίτων ανά αστακό.

Αποτελέσματα επόμενου πειράματός μας έδειξαν ότι υπό πειραματικές συνθήκες η ασθένεια αναπτύσσεται σε δυο φάσεις (Athanassopoulou et al., unpubl. data) . Μια πρώτη φάση (1-4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση), όπου κανένα παράσιτο δεν ανιχνεύεται στη λέμφο, και μια δεύτερη φάση (5η εβδομάδα και πέρα), οπότε και τα παράσιτα εμφανίστηκαν στη λέμφο και αυξάνονταν σταθερά σε πολύ υψηλούς αριθμούς. Αυτό το πρότυπο έχει υψηλή συσχέτιση με την ξαφνική μείωση του αριθμού των αιμοκυττάρων στην αιμολέμφο, που παρατηρήθηκε την 5η εβδομάδα μετά τη μόλυνση, σε μελέτες μολυσματικότητας με ίδιες εγχύσεις, που έγιναν παράλληλα με αυτά τα πειράματα (Cawthorn, unpublished data). Αυτή η διπλή φάση ανάπτυξης της μόλυνσης, καταγράφηκε από τις ιστοπαθολογικές αλλαγές και τις παρατηρήσεις με ανοσοφθορισμό και ανοσοπεροξειδάση.

Συνεπώς, επειδή η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι αλλοιώσεις δε σχετίζονταν με τις δόσεις, προτείνουμε ότι μια έγχυση 2000 βλεφαριδοφόρων ανά άτομο, επιτρέπει μια βαθμιαία και ικανοποιητική μελέτη της ασθένειας στους αστακούς.

**Ευχαριστίες:** Η έρευνα χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από υποτροφία του ΟΟΣΑ (Postdoctoral Fellowship from the Organization for Economic Development and Cooparation (Europe) στο Lobster Health Research Centre και εν μέρει από το Ιδρυμα Mux Bell Foundation, Canada. ❑

500,000 ciliates/lobster was used.

The results of a further experiment (Athanassopoulou et al., unpublished data) showed that the "bumper car" disease under experimental conditions appears to develop in two phases. A first period (weeks 1- 4 post-infection), where no parasites can be detected in the lymph and a second period (weeks 5 onwards), when parasites appear in the lymph and increase steadily to very high numbers. This pattern is highly correlated with the sudden decrease in haemocyte numbers in the haemolymph, observed at week 5 post-infection in infectivity studies with similar inocula, run in parallel to these experiments (Cawthorn et al, unpublished data). This two-phase development of the infection is documented by the histopathological changes and the immunofluorescence and immunoperoxidase observations.

Consequently, because the present study showed that the lesions were not dose related, we suggest that an inoculum as low as 2,000 ciliates per animal allows a gradual and satisfactory study of this disease in lobsters.

**Acknowledgements:** The current work was partly supported by a Postdoctoral Fellowship from the Organization for Economic Development and Cooparation (Europe). Program funding to the Lobster Health Research Centre was provided by the Mux Bell Foundation, Canada. ❑

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES


Aitken DE, Waddy SL (1986). Environmental influence on recruitment of the American lobster, Homarus americanus: a perspective. Can. J. fish. Aquat. Sci. 43:2258-2270.

Armstrong DA, Burreson EM, Sparks AK (1981). A ciliate infection (Paranophrys sp.) in laboratory – held Dungeness crabs, Cancer magister. J. Invertebr. Pathol. 37:201-209.

Bang FB, Audouin J, Leglise M (1972). Ciliate infection of the blood of the edible crab Cancer pagurus, in holding tanks in Brittany, France. J. Invertabr. Pathol. 20:226-227.

Cawthorn RJ (1997). Overview of the "bumper car" disease – impact on the North American lobster industry. Int. J. Parasitol. 27:167-172.

Cornick JW, Stewart JE (1968). Interaction of the pathogen Gaffkya homari with natural defence mechanisms of Homarus americanus. J. Fish. Res. Brd. Can. 25:695-709.

Lavallee J, Hammell KL, Spangler, ES and Cawthorn RJ (2001). Estimated prevalence of A. viridans and A. Haemophila in American lobsters H. americanus freshly captured in the waters of Prince Edward Island, Canada. Dis. Aquat. Organ. 46:231-236.

McDowell EM, Trump BF (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med. 100:405-414.

Messick GA, Small EB (1996). Mesanophrys chesapeakensis sp., an histophagus ciliate in the blue crab, Callinectes sapidus, and associated histopathology. Inv. Biol. 115:1-12.

Morado JF, Small EB (1995). Ciliate parasites and related diseases of crustacea: A review. Rev. Fisheries Sci. 3:275-354.

Sherbourne S, Bean L (1991). Mortalities of impounded and feral Maine lobsters Homarus americanus H. Milne-Edwards 1837, caused by protozoan ciliate Mugardia (formerly Anophrys = Paranophrys), with initial prevelance data from ten locations along the Maine coast and one offshore area. J. Shellfish Res. 10:315-326.

Speare DJ, Daley J, Markham RJF, Sheppard J, Beaman HJ, Sanchez GJ (1998). Loma salmonae- associated growth rate suppression in rainbow trout (Onchorynchous truttae) occurs during early - onset xenoma dissolution as determined by in situ hybridization and immunohistochemistry. J. Fish Dis. In Press