

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 54, No 4 (2003)



In vivo efficacy of lasalocid and pyrimethamine treatments against *Anophryoides haemophila*, a ciliate pathogen of American lobster *Homarus americanus*

F. ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ),
A. E. CRIBB, R. J. CAWTHORN, R. MacMILLAN, G.
BALDAS (Γ. ΜΠΑΛΝΤΑΣ)

doi: [10.12681/jhvms.15337](https://doi.org/10.12681/jhvms.15337)

To cite this article:

ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) F., CRIBB, A. E., CAWTHORN, R. J., MacMILLAN, R., & BALDAS (Γ. ΜΠΑΛΝΤΑΣ) G. (2017). In vivo efficacy of lasalocid and pyrimethamine treatments against *Anophryoides haemophila*, a ciliate pathogen of American lobster *Homarus americanus*. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 54(4), 297–310. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15337>

Αποτελεσματικότητα των θεραπειών με lasalocid και pyrimethamine σε αμερικανικούς αστακούς (*Homarus americanus*), μολυσμένους με το παράσιτο *Anophryoides haemophila* (scuticociliatida: orchitophryidae)

Φ. Αθανασοπούλου^{1*}, Cribb A.E.²,
Cawthorn R.J.³, MacMillan R.³, Γ. Μπαλντιάς¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Lasalocid και pyrimethamine χορηγήθηκαν σε αμερικανικούς αστακούς μολυσμένους με το παράσιτο *A. haemophila* υπό πειραματικές συνθήκες. Το lasalocid βρέθηκε να είναι πολύ τοξικό και μεγάλη θνησιμότητα παρατηρήθηκε όταν δοθηκε *in vivo* τόσο σε υγιείς όσο και μολυσμένους αστακούς. Η pyrimethamine αποδείχθηκε αποτελεσματική και θεραπεύει τελείως τα παράσιτα ειδικά στο επαναλαμβανόμενο οχήμα. Η θνησιμότητα ήταν πολύ χαμηλή και ο μέσος αριθμός των αιμοκυττάρων παρέμεινε υψηλός, ακόμη και υψηλότερος από τους αρνητικούς μάρτυρες. Το φάρμακο φαίνεται να επιβραδύνει την εμφάνιση των παρασίτων στην αιμοπέδη και να μειώνει τη διασπορά των παρασίτων και στα όργανα (επιποδίτης, ηπατοπάγκρεας). Στα μη μολυσμένα άτομα που χορηγήθηκε το φάρμακο αυτό, ο αριθμός των αιμοκυττάρων ήταν παρόμοιος με τους αρνητικούς μάρτυρες. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν παθολογικές αλλοιώσεις όταν το φάρμακο δόθηκε σε μη μολυσμένα άτομα. Καθώς δεν υπάρχει θεραπεία για τη νόσο, με βάση τα θετικά αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, προτείνουμε ότι η pyrimethamine είναι ένα καλό φάρμακο για τη θεραπεία της νόσου που οφείλεται στο παράσιτο *A. haemophila*.

Λέξεις ευρετηρίασης: *Anophryoides haemophila*, American lobster, *Homarus americanus*, Scuticociliatida, lasalocid, pyrimethamine, chemotherapeutants, *in vivo* experiments.

In vivo efficacy of lasalocid and pyrimethamine treatments against *Anophryoides haemophila*, a ciliate pathogen of American lobster *Homarus americanus*

Athanassopoulou F.^{1*}, Cribb A.E.², Cawthorn R.J.³,
MacMillan R.³, Baldas G.¹

ABSTRACT. Lasalocid and pyrimethamine was administered to American lobsters infected with *A. haemophila*. Lasalocid was found to be toxic and acute mortality was observed, when administered *in vivo* in both infected and uninfected lobsters. Pyrimethamine was found very efficient to treat these ciliates at repeated doses. The mortality was very low and the mean haemocyte counts remained higher than the uninfected control group. The drug seems to delay the appearance of the ciliates in the haemolymph and to lower the spread of these parasites in the epipodite and the hepatopancreas. In uninfected animals treated with this drug, haemocyte counts were similar to uninfected control group. Furthermore, no pathology was observed, when the drug was administered to uninfected lobsters. Since there is no effective treatment for the control of bumper car disease, on the basis of the results of the present study, we suggest that pyrimethamine is a good drug for the treatment of *A. haemophila* infection in lobsters.

Key words: *Anophryoides haemophila*, American lobster, *Homarus americanus*, Scuticociliatida, lasalocid, pyrimethamine, chemotherapeutants, *in vivo* experiments.

¹ Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Τριγιάλων 221, Καρδίτσα, 431 00, Ελλάδα.

E-mail: eathan@vet.uth.gr *Corresponding author

² Department of Anatomy & Physiology, 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.

¹ Laboratory of Ichthyology & Fish Pathology, University of Thessaly, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, 221 Trikalon str., Karditsa, 43100 Greece.

E-mail: eathan@vet.uth.gr *Corresponding author

² Department of Anatomy & Physiology, 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.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ασθένεια που προκαλείται από το παράσιτο *Anophryoides haemophila* ("bumper car disease") έχει μεγάλη οικονομική σημασία στη Β. Αμερική (Cawthorn, 1997). Δεν υπάρχουν μέθοδοι πρόληψης ή θεραπείας της νόσου (Bower et al, 1994). Υπάρχει γενικότερα έλλειψη πληροφόρησης σχετικά με τη χρήση θεραπευτικών ουσιών *in vivo* σε αστακούς. Η μόνη σχετική αναφορά αφορά θεραπεία με εμβάπτυνση χλωραμίνης T και φορμαλίνης (Speare et al, 1996).

Τελευταία έγινε μία μελέτη διαφόρων ουσιών για την καταπολέμηση του παρασίτου *A. haemophila* (Novotny et al, 1996) σε μία προσπάθεια να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα των αντιπρωτοζωικών φαρμάκων εγκεκριμένων για χρήση σε άλλα παραγωγικά ζώα. Η έρευνα αφορούσε την επίδραση των ουσιών στην κινητικότητα του παρασίτου και τη μορφολογία του με παρατήρηση σε απλό μικροσκόπιο, μία μέθοδος που συνήθως είναι υποκειμενική. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με ένα σύστημα τιμών σε κλίμακα που αποτύπωνε την κινητικότητα και κάποιες μορφολογικές αλλαγές των παρασίτων. Η έλλειψη κινητικότητας, πάντως, μπορεί να μην είναι σύγυρη ένδειξη θανάτου του παρασίτου και έτσι η δοκιμή ήταν υποκειμενική. Για τους λόγους αυτούς, μία πιο αποτελεσματική μέθοδος αναπτύχθηκε, η οποία βασιζόταν στην κυτταροτοξικότητα με βάση το tetrazolium και είχε ως σκοπό την αντικειμενική και γρήγορη εκτίμηση των ουσιών *in vitro* (Cribb et al, 1999). Σε αυτή την έρευνα, μία σειρά από ουσίες δοκιμάστηκαν. Δύο ουσίες, το lasalocid και η pyrimethamine αποδείχθηκαν αποτελεσματικές *in vitro*, σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η εκτίμηση της θεραπευτικής ικανότητας *in vivo* αρχικά των δύο αντιπαρασιτικών ουσιών που βρέθηκαν αποτελεσματικές στις παραπάνω δοκιμές *in vitro* (lasalocid και pyrimethamine) για το παράσιτο *A. haemophila* σε αστακούς, οι οποίες χορηγήθηκαν με έγχυση στην αιμοδόμη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προέλευση και διατήρηση αστακών

Η προμήθεια αστακών (βάρους 190-400g) 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 (<20,0mg/L), νιτροδών (<0,1mg/L), pH (7,9-8,4), αλατότητα (29-30ppt) 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

INTRODUCTION

Anophryoides haemophila is the etiologic agent of "Bumper car" disease, an economically important disease of North America lobster industry (Cawthorn, 1997). There are no known methods of preventing or controlling the disease (Bower et al, 1994). In general, there is minimal information on *in vivo* use of chemotherapeutics in lobsters; the only related literature refers to "immersion treatments" with formalin and chloramine T (Speare et al, 1996).

Recently, an *in vitro* study of different chemotherapeutic agents against the ciliate has been conducted (Novotny et al, 1996) in an attempt to assess the efficacy of different antiprotozoan drugs, accepted for use in other food producing animals, on *A. haemophila*. The system assessed the effects of the chemotherapeutics on the ciliate motility and morphology using light microscopic observation, which is normally subjective. The results of this study were assessed with a scoring system based on motility and some morphological changes of the ciliates.

Loss of motility, however, may not be an indication of ciliate death and the assay was subjective, that's why a more effective tetrazolium based cytotoxicity assay was developed for the purpose of an objective and rapid screening of compounds *in vitro* (Cribb et al, 1999). In this investigation, a series of compounds was assessed. Two compounds, lasalocid and pyrimethamine demonstrated *in vitro* efficacy at relatively low concentrations.

The objective of the present study was to assess the therapeutic effect of, initially, the two antiparasitic compounds found to be effective in the *in vitro* trials, lasalocid and pyrimethamine, on the development of *A. haemophila* *in vivo* in lobsters, administered by injection in the haemolymph.

MATERIALS AND METHODS

Source and maintenance of lobsters

"Canner" lobsters (weight 190-400g), kept at the Aquatic Animal Facility, AVC, in plastic trays in one large experimental tank for 4 months prior to this study, were used as experimental animals. No feeding was administered to these animals during this period and no mortalities have been recorded. Lobsters were held in a system of six tanks, 4770 L capacity, with saltwater recirculation 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 (<0.01mg/l), nitrate ion levels (<20.0mg/l), nitrite ion (<0.1mg/l), pH (range: 7.9-8.4), salinity (range: 29-30 ppt) and continuously for temperature (2±1°C) and oxygen (12ppm). 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.

τις οδηγίες του Καναδικού Συμβουλίου για τη Φροντίδα των Ζώων, σε φωτοπερίοδο 12 ώρες φως - 12 ώρες σκοτάδι. Οι αστακοί που χρησιμοποιήθηκαν στα δύο πειράματα, κρατήθηκαν στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Οι αιμολέμφοι 10 αστακών που προορίζονταν για το πείραμα, εξετάστηκαν για μόλυνση από βλεφαριδοφόρα παράσιτα και γαφκέμια, επτά ημέρες πριν από την έναρξη των πειραμάτων.

Πειραματικός σχεδιασμός

Οι αστακοί χωρίστηκαν τυχαία σε ειδικά δοχεία που το καθένα περιείχε μέχρι 6 αστακούς παρόμοιου μεγέθους και βάρους. Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Η αιμολέμφοι 10 αστακών από το stock που θα χρησιμοποιείτο στο πείραμα εξετάστηκε για την παρουσία παρασίτων και του βακτηρίου *Ae. viridans* μία εβδομάδα πριν από την έναρξη των πειραμάτων. Οι αστακοί εγκλιματίστηκαν στα νέα δοχεία τουλάχιστον για 3 ημέρες πριν από τη μόλυνση και εξετάζονταν καθημερινά για αλλαγές συμπεριφοράς ή άλλα συμπτώματα και αυτά αξιολογούνταν με ένα δεδομένο σύστημα (Speare et al., 1996).

Οι αστακοί μολύνθηκαν με δόση 2.000 παρασίτων ανά ζώο κατά το πειραματικό μοντέλο που αναπτύχθηκε σε προηγούμενη εργασία (Athanassopoulou et al, υπό δημοσίευση).

Η αιμολέμφοι αφαιρέθηκε 7 ημέρες πριν από τη μόλυνση, 7 ημέρες μετά τη χορήγηση των φαρμακευτικών ουσιών και έπειτα σε εβδομαδιαία διαστήματα. Η αιμολέμφοι από όλους τους αστακούς, καθώς και τους ετοιμοθάνατους, εξετάστηκε για παρουσία παρασίτων με απλό μικροσκόπιο και για την καταμέτρηση του αριθμού των αιμοκυττάρων με βάση μία μη θανατηφόρο μέθοδο που έχει περιγραφεί από τους Speare et al (1996).

Προέλευση και διατήρηση των παρασίτων

Τα παράσιτα *Anophryoides haemophila* προήλθαν από πειραματικά μολυσμένους αστακούς στο Atlantic Veterinary College. Τα παράσιτα καλλιεργήθηκαν σε 25 cm² δοχεία που περιείχαν 10 ml τροποποιημένου ATCC 1651 MA medium (Messick & Small 1996). Τα παράσιτα ανανεώνονταν με τη χρήση νέων δοχείων και συνεχών εμβολιασμών 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 δύο πειράματα, έγινε έγχυση παρασίτων από την ίδια καλλιέργεια.

Μέτρηση των παρασίτων πριν από τη μόλυνση

Ωριμες καλλιέργειες των παρασίτων τοποθετήθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 15 ml και φυγοκεντρήθηκαν σε 600 g 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 αιμοκυτομέτρου, αφού πρώτα μονιμοποιήθηκαν τα παράσιτα σε ουδέτερο διάλυμα φορμαλίνης 10%.

Experimental design

The animals were divided randomly in trays, each containing up to 6 lobsters of similar size and weight. The experimental design and dose scheme are presented in Table 1. The haemolymph of ten lobsters of the stock, intended for experimentation, were examined for ciliate infection and the bacterium *Ae. viridans*, the causative agent of gaffkaemia, a week before the initiation of the experiments. Animals were acclimated in the new trays for at least 3 days prior to infection. Lobsters were assessed daily for behavioral and other signs and these were scored by a pre-determined system (Speare et al, 1996). Lobsters were inoculated by intrahaemocoelic injection with 2,000 ciliates per animal as described by Athanassopoulou et al (under publication). Haemolymph was removed seven days prior to infection, seven days after the administration of the drug, a week after the administration of the drugs and thereafter at weekly intervals. The haemolymph from lobsters without signs of disease (from all group treatments) as well as from moribund animals was examined for the presence of parasites by light microscopy and haemocyte counts were also taken. For the detection of infection, the non-lethal screening method was used.

Non-lethal screening: From week three onwards, haemolymph samples were examined weekly from all lobsters for haemocyte and ciliate counts, according to the method described by Speare et al (1996). At least 30 parasites from each treated group of lobsters were measured and their morphology was assessed microscopically, according to a previously defined method (Novotny et al, 1996).

Source and maintenance of ciliates:

Live ciliates used for infections of experimental lobsters originated from previously infected lobsters at the Atlantic Veterinary College (AVC). Ciliates were subpassaged in 25 cm² 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 parasites from the same culture.

Ciliate counts prior to infection

Established cultures of ciliates were placed in 15 ml centrifuge tubes and spun at 600g for 5 min in a refrigerated centrifuge. 8 ml of the resulting supernatant 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 ciliates in formalin 10%. Appropriate dilutions were then performed to obtain the dose required for the experiment.

Haemocytes and ciliate collection and counts

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

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 τα παράσιτα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας 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, και στα 2 πειράματα, περιλάμβαναν βράγχια, ηπατοπάγκρεας, μυς, καρδιά, έντερο, πρόσθιο αδένια, στόμαχο και ιστούς από το γεννητικό, αιμοποιητικό ιστό, νευρικά γάγγλια και επιδερμίδα. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε 1 μέρος γλυταραλδεϋδης, 4μέρη φορμαλίνης, σύμφωνα με τη μέθοδο McDowell & Trump (1976). Οι αστακοί θανατώθηκαν με εμβάπτιση σε βενζοκαΐνη (10% σε αιθανόλη), σε μια δόση 18ml ανά λίτρο θαλασσινού νερού.

Παρασκευή και χορήγηση των φαρμάκων

Όλες οι ουσίες πάρθηκαν από την εταιρεία Sigma Chemical Co, Oakville, Ontario. Τα φάρμακα παρασκευάστηκαν διαλύοντας την ουσία σε ίσους όγκους μεθανόλης και προπυλενικής γλυκόλης μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση (Πίνακας 1) και χορηγήθηκαν με έγχυση στην αιμολέμφο σε όγκους αναλόγως του βάρους τους.

Εξήντα έξι αστακοί χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα. Το μέγιστο ποσό των φαρμάκων που εγχύθηκε ήταν μέχρι 0,3 ml /ζώο.

Οι ουσίες lasalocid και pyrimethamine χορηγήθηκαν 7 ημέρες μετά τη μόλυνση. Οι δόσεις της κάθε ουσίας υπολογίστηκαν με βάση τον ολικό όγκο της αιμολέμφου (30% του ολικού βάρους). Οι δόσεις που επιλέχθηκαν και τα σχήματα είναι τα παρακάτω:

1. *Lasalocid* – μονή δόση: 7,7mg /ζώο, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση.

2. *Lasalocid* – διπλή δόση: Η δόση των 7,7 mg /ζώο επανελήφθη μία ακόμη φορά, όταν τα παράσιτα εμφανίζονται στην αιμολέμφο στους θετικούς μάρτυρες.

3. *Pyrimethamine* – απλή δόση: 3,6mg/ζώο, επτά ημέρες μετά τη μόλυνση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Θνησιμότητα

Δεκαεννέα αστακοί πέθαναν μέσα σε 36 ώρες από τη χορήγηση των φαρμάκων (15 μολυσμένοι + θεραπεία με lasalocid και 4 μη μολυσμένοι + θεραπεία με lasalocid). Η θνησιμότητα των υπόλοιπων αστακών φαίνεται στον Πίνακα 2.

Κλινικά συμπτώματα και νεκροτομικές αλλοιώσεις

Μετά την αρχική θνησιμότητα δεν παρατηρήθηκαν καθόλου κλινικά συμπτώματα σε κανέναν αστακό. Λίγο πριν

Πίνακας 1. Πειραματικό σχέδιο θεραπείας των αστακών με lasalocid και pyrimethamine.

Ομάδα	Ολικός αριθμός αστακών/ομάδα	Λαμβανόμενη δόση (mg/άτομο)
(M) Lasalocid- μονή δόση	8	7,7
(M) Lasalocid- διπλή δόση	8	7,7
(M) Pyrimethamine- μονή δόση	8	3,6
(OM) -ve control	8	-
(M) +ve control	8	-
(M) +ve + διαλύτες	8	-
(OM) -ve + διαλύτες	8	-
(OM) Lasalocid	4	7,7
(OM) Pyrimethamine	4	3,6

M = Μολυσμένα με 17,000 παράσιτα, OM = όχι μολυσμένα, διαλύτες = ίση ποσότητα methanol και propylene-glycol

Table 1. Experimental design of lasalocid and pyrimethamine treatments of lobsters.

Group	Total no of lobsters/group	Dose received (mg/animal)
(M) Lasalocid- single	8	7.7
(M) Lasalocid- repeat	8	7.7
(M) Pyrimethamine- single	8	3.6
(OM) -ve control	8	-
(M) +ve control	8	-
(M) +ve + solvents	8	-
(OM) -ve + solvents	8	-
(OM) Lasalocid	4	7.7
(OM) Pyrimethamine	4	3.6

I = Infected with 17,000 ciliates, NI = non-infected, solvents = equal amount of methanol and propylene-glycol

Πίνακας 2. Ποσοστό μόλυνσης, θνησιμότητα και μέσος αριθμός αιμοκυττάρων και παρασίτων (πριν από το θάνατο) κατά τη διάρκεια θεραπείας με διαφορετικά φάρμακα του αμερικανικού αστακού (*Homarus americanus*).

Φάρμακο	n	Ποσοστό Μόλυνσης %	Μέσος αριθμός αιμοκυττάρων (X10 ⁹ /L)	Μέσος αριθμός παρασίτων (X10 ⁶ /L)	Εμφάνιση παρασίτων/εβδομάδα	Θνησιμότητα (%)
Lasalocid μονή δόση	8	100 (1/1)	0.001	TFTC	7	
Lasalocid διπλή δόση	8	0	0	0	-	93,7 15/16
Pyrimethamine μονή δόση	8	50 (4/8)		TFTC	6	
Pyrimethamine διπλή δόση	8	0 0/8	13,57			6,25 1/16
+ve control	8	62,5 5/8	15,47	4.5	5	25 2/8
-ve control	8	0	12,94	-	-	0
-ve Pyrimethamine	4	0 0/4	13,6	-	-	0
-ve Lasalocid	4	-	-	-	-	100 (4/4)
+ve Solvent διαλύτης	8	37,5 3/8	8,25	TFTC	5	0
-ve Solvent διαλύτης	8	0	22	-	-	0

TFTC=πολύ λίγα για να μετρηθούν

από το θάνατο, μερικοί εμφάνισαν αδυναμία στήριξης. Οι αστακοί θεωρήθηκαν νεκροί, όταν δεν παρουσίαζαν καμία αντίδραση σε εξωτερικά ερεθίσματα.

In vivo αποτελεσματικότητα και τοξικότητα

Μετρήσεις αιμοκυττάρων

Οι μετρήσεις των αιμοκυττάρων φαίνονται στα Γράφηματα 1-8.

Στους θετικούς μάρτυρες (infected control group) τα αιμοκύτταρα αυξήθηκαν στην πρώτη εβδομάδα μετά τη μόλυνση, αλλά μετά την αύξηση αυτή υπήρξε μία σταθερή μείωση μέχρι την 7η εβδομάδα. Μετά, ο αριθμός σταθεροποιήθηκε μέχρι τη 10η εβδομάδα μετά τη μόλυνση. (Γράφημα 1α). Ο ελάχιστος αριθμός βρέθηκε 6X10⁹/L. Τα παράσιτα εμφανίστηκαν την 6η εβδομάδα και μετά αυξήθηκαν σταθερά (Γράφημα 1β). Στους αρνητικούς μάρτυρες, (uninfected control group) τα αιμοκύτταρα παρέμειναν σταθερά σε αριθμούς από 12,94 – 21,24X10⁹/L. (Γράφημα 2).

Στους μολυσμένους αστακούς που χορηγήθηκε lasalocid, μόνον ένα άτομο παρέμεινε ζωντανό κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στο ζώο αυτό τα αιμοκύτταρα μειώθηκαν πολύ (από 19 σε 0, 001X10⁹/L) (Γράφημα 3). Τα παράσιτα εμφανίστηκαν την 6η εβδομάδα και μετά αυξήθηκαν σταθερά (Γράφημα 1β). Το ζώο αυτό πέθανε την 7η εβδομάδα. Στα μη μολυσμένα ζώα που χορηγήθηκε το ίδιο φάρμακο, ο αριθμός των αιμοκυττάρων παρέμεινε υψηλός, αλλά υπήρξε σοβαρή διακύμανσή του (Γράφημα 4).

counts were made by an haemocytometer.

Histology

Tissues, removed from recently dead or moribund medicated treated lobsters (gills, mid and hindgut, hepatopancreas, heart, haemopoietic tissue, nerve ganglion, antennal gland, muscles and epidermis), were fixed in 1G4F fixative and processed, according to the method described by Mc Dowell & Trump (1976).

Preparation and administration of drugs

All test compounds were obtained from Sigma Chemical Co, Oakville, Ontario. The drugs were prepared by dissolving the compound in equal volumes of methanol and propylene-glycol to the desired concentration (Table 1) and were administered by intrahaemocoelic injection at volumes, according to their weights.

Sixty six lobsters were used in the present study. The maximum volume injected never exceeded 0.3 ml/animal. Lasalocid and pyrimethamine were administered seven days post -infection (Table 1). The doses of each drug have been calculated to relate to the total haemolymph volume (30% of whole carcass weight). The selected doses and regimes of the drugs were as follows:

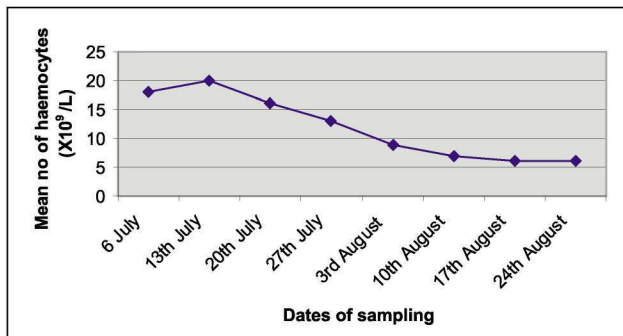
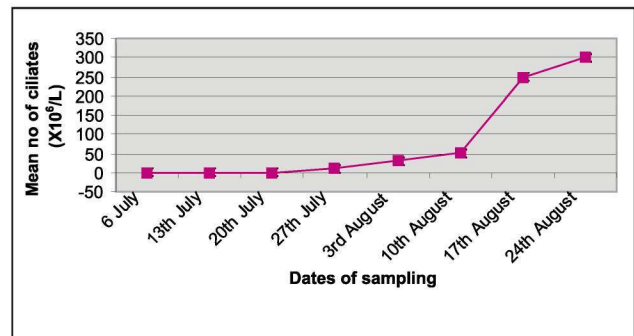
1. *Lasalocid -single dose*: lobsters received a dose of 7.7mg per animal, seven days post-infection.

2. *Lasalocid -repeated scheme*: The 7.7 mg per animal dose was intended to be repeated once more, when ciliates were present in the haemolymph of positive control animals.

Table 2. Prevalence, mortality and mean haemocyte and parasite numbers just before death during different drug treatments of American lobster (*Homarus americanus*).

Drug	n	Prevalence (%)	Mean haemocyte (X10 ⁹ /L)	Mean parasite number (X10 ⁶ /L)	First appearance number	Mortality (%) of parasites (week)
Lasalocid single	8	100 (1/1)	0.001	TFTC	7	
Lasalocid double	8	0	0	0	-	93.7 15/16
Pyrimethamine single	8	50 (4/8)		TFTC	6	
Pyrimethamine double	8	0 0/8	13.57			6.25 1/16
+ve control	8	62.5 5/8	15.47	4.5	5	25 2/8
-ve control	8	0	12.94	-	-	0
-ve Pyrimethamine	4	0 0/4	13.6	-	-	0
-ve Lasalocid	4	-	-	-	-	100 (4/4)
+ve Solvent	8	37.5 3/8	8.25	TFTC	5	0
-ve Solvent	8	0	22	-	-	0

TFTC= Too few to count

**Γράφημα 1α.** Αριθμός αιμοκυττάρων σε μολυσμένους με *A. haemophila* αστακούς (μολυσμένη ομάδα μαρτύρων).**Graph 1a.** Haemocyte counts in *A. haemophila* infected lobsters (infected control group).**Γράφημα 1β.** Αριθμός παρασίτων σε μολυσμένους με *A. haemophila* αστακούς.**Graph 1b.** Ciliate counts in *A. haemophila* infected lobsters (infected control group).

Στους μολυσμένους αστακούς που χορηγήθηκε pyrimethamine, τα αιμοκύτταρα μειώθηκαν αμέσως μετά την έγχυση της ουσίας, αλλά αυξήθηκαν κατόπιν σταθερά μετά από μία εβδομάδα. (από 9,58 σε 13,57X10⁹/L) (Γράφημα 5). Τα παράσιτα εμφανίστηκαν την 6η εβδομάδα, αλλά ο αριθμός τους παρέμεινε χαμηλός κατά τη διάρκεια του πειράματος. Στα μη μολυσμένα ζώα που χορηγήθηκε το ίδιο φάρμακο, ο αριθμός των αιμοκυττάρων παρέμεινε υψηλός (13-16,5X10⁹/L) (Γράφημα 6).

Στους μολυσμένους αστακούς που χορηγήθηκαν διαλύτες, τα αιμοκύτταρα μειώθηκαν αμέσως και σταθερά μετά την έγχυση των διαλυτών (Γράφημα 7), ενώ στους μη μολυσμένους αστακούς που χορηγήθηκαν οι ίδιες ουσίες,

3. *Pyrimethamine* -single dose: lobsters received 3.6 mg per animal, seven days post-infection.

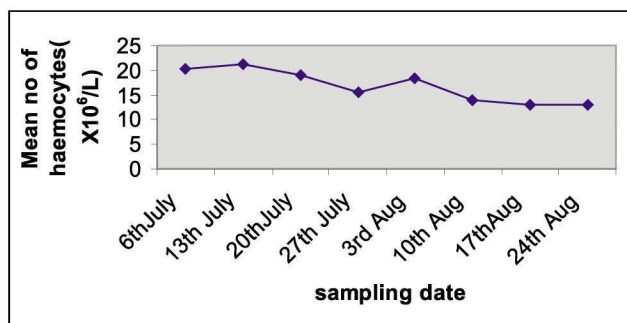
RESULTS

Mortality

Nineteen lobsters died within 36 hours post-administration of drugs (15 infected lobsters + lasalocid treatment and 4 uninfected lobsters + lasalocid treatment). The mortality of the remaining lobsters is presented in Table 2.

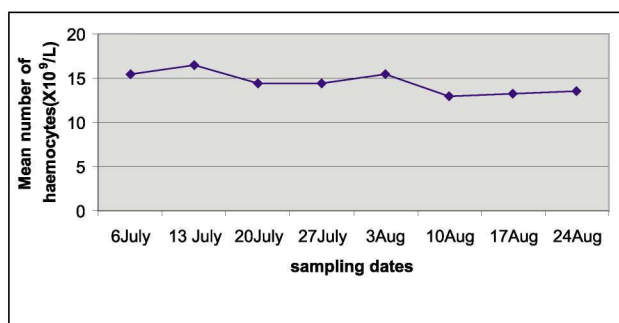
Clinical signs and necropsy

After the initial mortality, no clinical signs were



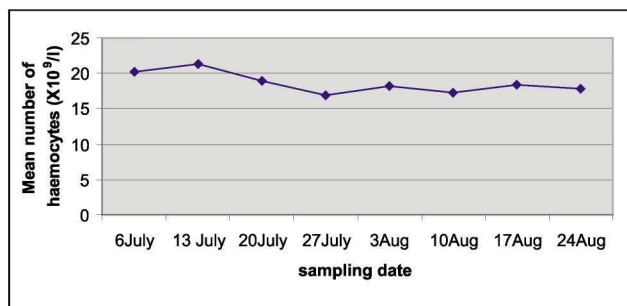
Γράφημα 2. Μέσος αριθμός αιμοκντάρων σε μη μολυσμένη ομάδα μαρτύρων.

Graph 2. Mean number of haemocytes in uninfected control group.



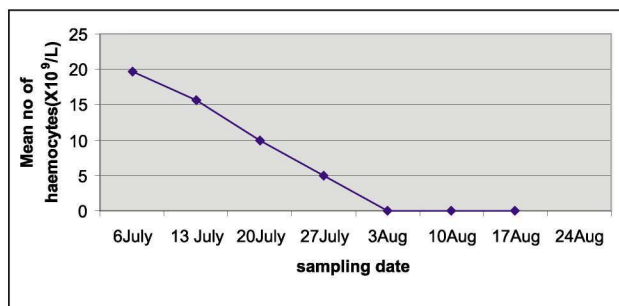
Γράφημα 3. Μέσος αριθμός αιμοκντάρων σε μολυσμένους με *A. haemophila* αστακούς μετά από θεραπεία με pyrimethamine.

Graph 3. Mean number of haemocytes in infected with *A. haemophila* lobsters after treatment with pyrimethamine.



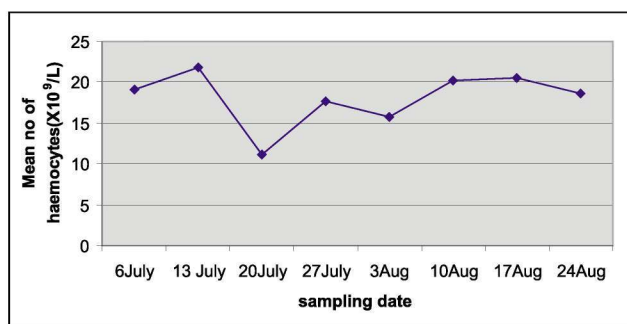
Γράφημα 4. Μέσος αριθμός αιμοκντάρων σε μη μολυσμένους αστακούς μετά από θεραπεία με pyrimethamine.

Graph 4. Mean number of haemocytes in uninfected lobsters after treatment with pyrimethamine.



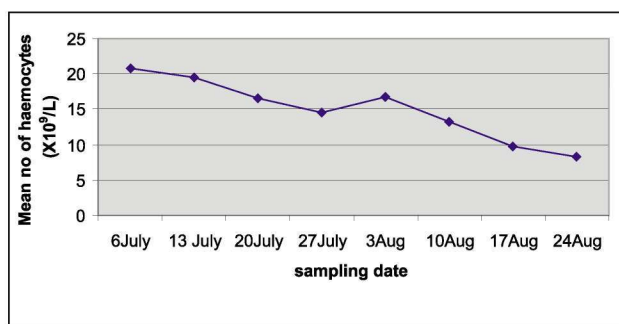
Γράφημα 5. Μέσος αριθμός αιμοκντάρων σε μολυσμένους με *A. haemophila* αστακούς μετά από θεραπεία με lasalocid.

Graph 5. Mean number of haemocytes in infected with *A. haemophila* lobsters after treatment with lasalocid.



Γράφημα 6. Μέσος αριθμός αιμοκντάρων σε μη μολυσμένους αστακούς μετά από θεραπεία με lasalocid

Graph 6. Mean number of haemocytes in uninfected lobsters after treatment with lasalocid.



Γράφημα 7. Μέσος αριθμός αιμοκντάρων σε μολυσμένους με *A. haemophila* αστακούς μετά από έγχυση διαλυτών.

Graph 7. Mean number of haemocytes in infected with *A. haemophila* lobsters after injection of solvents.

ο αριθμός παρέμεινε υψηλός, αλλά υπήρξε διακύμανση κατά τη διάρκεια του πειράματος (Γράφημα 8).

Ιστοπαθολογία

Θετικοί μάρτυρες

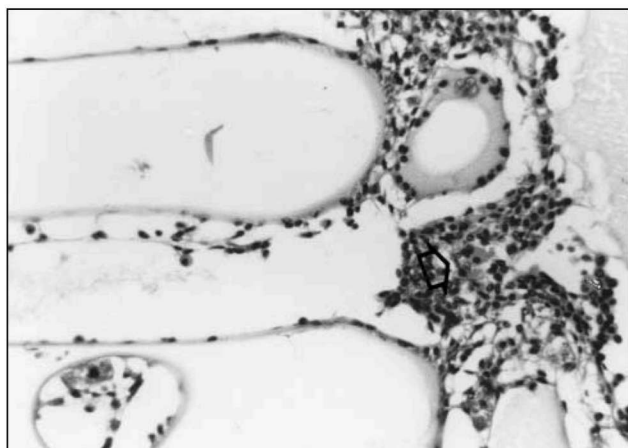
Οι πρώτες αλλοιώσεις εμφανίστηκαν την 5η εβδομάδα στον ιστό των βραγχίων. Τα πρώτα συμπτώματα της αντίδρασης του ξενιστή παρουσιάστηκαν ως μικρές εγκαυμένες περιοχές στα νημάτια των βραγχίων (Εικόνα 1).

observed during the experimental study at lobsters treated with lasalocid and pyrimethamine.

In vivo efficacy and toxicity testing

Haemocyte counts

These are presented in graphs 1- 8. In the infected control group, the haemocytes increased one week post-infection, but following this increase, there was a steady decline until week 7. Thereafter, the counts were steady

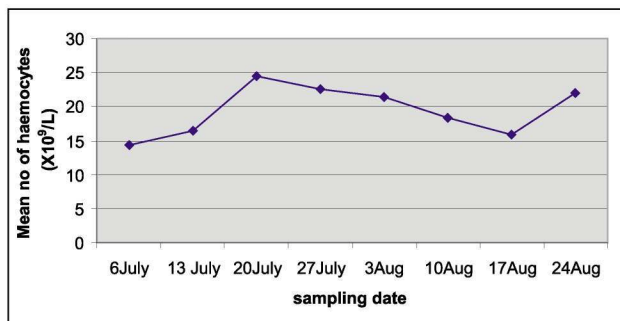


Εικόνα 1. Κοκκιοματώδης αντίδραση στα βράγχια αστακών από πειραματική μόλυνση με *A. haemophila* (5η εβδομάδα μετά τη μόλυνση –τόξα). H&E, 150X.

Figure 1. Granulomatous response in the gill filament due to *A. haemophila* experimental infection (arrows), week 5 post-infection. H&E, 150X.

Την 6η εβδομάδα μετά τη μόλυνση ήταν εμφανής η αυξημένη κυτταρικότητα στα βράγχια με παρουσία μερικών παρασίτων στα απαγωγά αγγεία των νηματίων. Μερικές μικρές εγκλωβισμένες περιοχές παρατηρήθηκαν στα νημάτια, προκαλώντας έτσι μερική καταστροφή του επιθηλίου και των στυλοειδών κυττάρων. Ωστόσο, τα περισσότερα από τα νημάτια διατήρησαν τη φυσιολογική τους δομή. Στο συνδετικό ιστό του ηπατοπαγκρέατος παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των αριθμών των reserve inclusion cells (RIC) των κοκκωδών κυττάρων, αιμοκυττάρων και υαλοειδών κυττάρων. Δυο μικρές φλεγμονώδεις εστίες παρατηρήθηκαν στο μυοκάρδιο ενός αστακού. Αυτές αποτελούνταν από συνάθροιση αιμοκυττάρων, κοκκωδών κυττάρων και εναπόθεση υαλίνης κεντρικά. Ωστόσο, υπήρχε αξιοσημείωτη μείωση των RIC στο συγκεκριμένο ιστό.

Την 7η εβδομάδα μετά τη μόλυνση η νεκροτομική εμφάνιση των βραγχίων ήταν όμοια με της 6ης εβδομάδας. Όμως υπήρχε αύξηση του αριθμού των RIC στο βράγχια και μερικά από αυτά τα κύτταρα διασπάστηκαν σε μικρότερα τμήματα στα βραγχιακά νημάτια. Κανένα παράσιτο δεν ήταν εμφανές στην αιμολέμφο των βραγχίων και των άλλων οργάνων. Το διάφραγμα των νηματίων ήταν ακόμα ακέρατο. Στο ηπατοπάγκρεας και στην καρδιά δε βρέθηκαν αυξημένα RIC, αν και αιμοκύτταρα και αιμολέμφο ήταν παρόντα. Στο στάδιο αυτό δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στο συνδετικό ιστό κανενός οργάνου. Την 9η εβδομάδα μετά τη μόλυνση οι πιο τυπικές αλλοιώσεις εμφανίστηκαν στα βράγχια και στο συνδετικό ιστό, κυρίως του επιποδίου που βρίσκεται κοντά στα βράγχια. Στα βράγχια και συγκεκριμένα στο στέλεχος και στα απαγωγά και προσαγωγά ινίδια υπήρχε μαζική εισβολή παρασίτων (Εικόνα 2). Τα παράσιτα αυτά παρουσίαζαν φυσιολογικές ιδιότητες χρώσης, με διακριτούς και ευκρινώς βασιόφιλα χρωματισμένους μακροπυρήνες και πολλαπλά εωσινόφι-



Γράφημα 8. Μέσος αριθμός αιμοκυττάρων σε μη μολυσμένους αστακούς μετά από έγχυση διαλυτών.

Graph 8. Mean number of haemocytes in uninfected lobsters after injection of solvents.

until week 10 (Graph 1a). The lowest number was $6 \times 10^9/L$. The ciliates appeared on the 6th week and increased steadily thereafter (Graph 1b). In the uninfected control group, the haemocytes remained steady between 12.94 – $21.24 \times 10^9/L$ (Graph 2).

In the lasalocid treated group, only one infected lobster remained alive during the experiment. In this animal, the haemocytes decreased sharply (from 19 to $0.001 \times 10^9/L$) from the day of injection onwards (Graph 3). The ciliates appeared on the 6th week and increased steadily thereafter (Graph 1b). This animal died at 7th week post infection. In the non-infected lobsters treated with lasalocid, the haemocyte counts remained high ($18.63 \times 10^9/L$), but there was a fluctuation throughout the experiment (Graph 4).

In the pyrimethamine treated group, the haemocytes decreased shortly after the injection, but increased steadily after a week (from 9.58 –to $13.57 \times 10^9/L$) (Graph 5). The ciliates appeared on the 6th week, but their numbers were very low throughout the experimental period.

In the non-infected lobsters treated with pyrimethamine, the haemocyte counts remained steadily high (13 – $16.5 \times 10^9/L$) (Graph 6).

Infected lobsters, injected with the solvent, were sharply and steadily declining (Graph 7), whereas in uninfected lobsters, injected with the solvent, the counts remained high, but there was a small fluctuation in the values (Graph 8).

Parasite counts and prevalence of infection

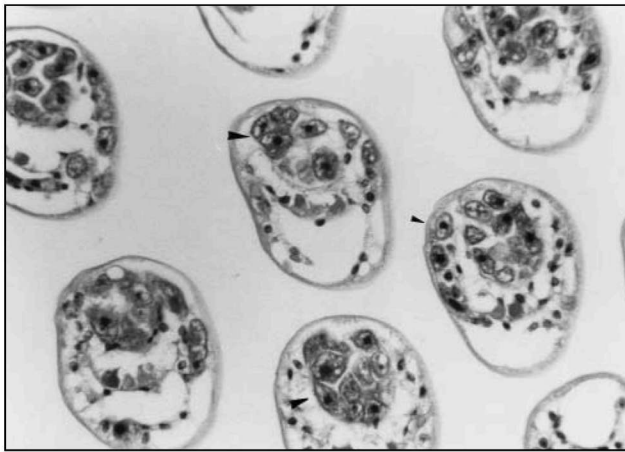
At week 5, parasites started to appear at the haemolymph in the infected control group; these reached $4.5 \times 10^6/L$ just before death (Table 2). In the infected animals, treated with pyrimethamine or solvents, the counts were too low to count.

The prevalence of infection is shown in Table 2. 50% of animals, treated with a single dose of pyrimethamine, developed the infection and none at the double dose. In the infected control group, 5 out of 8 animals developed the infection.

Histopathology

Infected controls

At week 5, the first lesions appeared in the gill tissue,

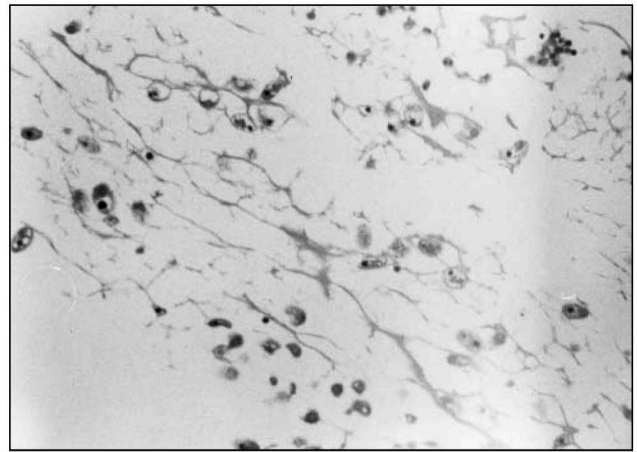


Εικόνα 2. Μαζική εισβολή από *A. haemophila* στο στέλεχος (διάφραγμα) και τα απαγωγά αγγεία των βραγχιακών νημάτων πειραματικά μολυσμένου αστακού (9η εβδομάδα μετά τη μόλυνση). H&E, 150X.

Figure 2. Massive invasion of *A. haemophila* (arrows), in the stem and afferent and efferent vessels of the gill filaments of an experimentally infected lobster, week 9 post-infection. H&E, 150X.

λα κοκκία στο κυτταρόπλασμά τους. Μερικά παράσιτα φαίνονταν ότι τρέφονταν από το βραγχιακό επιθήλιο. Στα νημάτια, τα αποπλατυσμένα και κυλινδρικά επιθηλιακά κύτταρα (στυλοειδή κύτταρα) και το διάφραγμα καταστράφηκαν με αποτέλεσμα την εμφάνιση κοκκιωματώδους όψης. Στο βραγχιακό στέλεχος υπήρχε μια τυπική απώλεια των RIC, των ποδοκυττάρων και των νεφροκυττάρων. Ωστόσο, μερικοί αστακοί εμφάνισαν αυξημένη κυτταρικότητα στην περιοχή αυτή, που περιελάμβανε αιμοκύτταρα και ποδοκύτταρα. Οι αλλοιώσεις στα βραγχιακά νημάτια ήταν ελάχιστες, γεγονός που υποδεικνύει ότι σε αυτό το στάδιο όλες οι αμυντικές λειτουργίες του ξενιστή οδηγήθηκαν πρώτα σε αυτή την περιοχή. Ακόμα, κάποιοι αστακοί την 9η εβδομάδα και όσοι πέθαναν τη 10η εβδομάδα εμφάνισαν μια έντονα οζώδη όψη στο βραγχιακό στέλεχος και ολική απώλεια της αραιής κυτταρικότητας και της δομής του συνδετικού ιστού. Αυτά συνοδεύονταν από τις σοβαρές αλλοιώσεις σε όλα τα νημάτια, γεγονός που αποδεικνύει ότι η άμυνα του ξενιστή είχε καταρριφθεί από τα παράσιτα.

Στο συνδετικό ιστό των περισσότερων οργάνων παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και σταδιακή μείωση των RIC και των ινοκυττάρων (Εικόνα 3). Αυτό ήταν εμφανές από την αρχή της 9ης εβδομάδας μετά τη μόλυνση κοντά στους βραγχιακούς επιποδίτες, όπου και παρατηρήθηκαν οι πιο σημαντικές αλλοιώσεις του συνδετικού ιστού. Αρκετά παράσιτα που είχαν βαφτεί καλά, ήταν παρόντα στο μικρό αριθμό των ινοκυττάρων που είχαν απομείνει. Μερικά παράσιτα διαπιστώθηκε ότι τρέφονται από τον ιστό αυτό, με αποτέλεσμα την καταστροφή μεγάλου τμήματος του συγκεκριμένου οργάνου. Σε μερικές περιπτώσεις υπήρξε τοπική αύξηση των κοκκωδών κυττάρων και αιμοκυττάρων. Σε αργότερα στάδια της μόλυνσης ήταν συχνές οι πολυεστια-



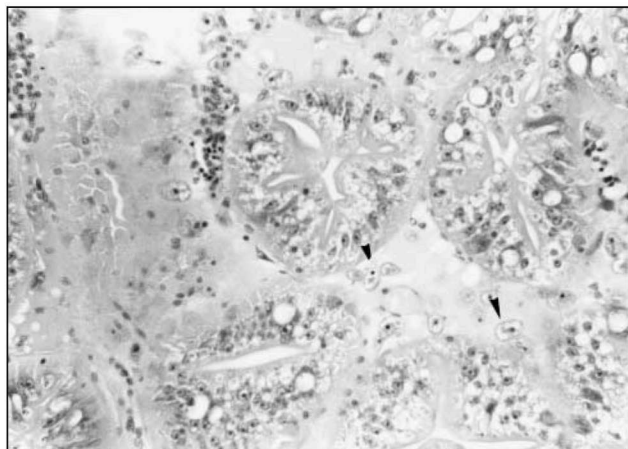
Εικόνα 3. Καταστροφή συνδετικού ιστού επιποδίτη πειραματικά μολυσμένου αστακού (9η εβδομάδα μετά τη μόλυνση) με *A. haemophila*. H&E, 95X.

Figure 3. Destruction of connective tissue of epipodite of an American lobster experimentally infected with *A. haemophila* per animal, week 9 post-infection. H&E, 95X.

where the first signs of host response were evident as small encapsulation areas in the gill filaments (Figure 1).

At week 6 post-infection, increased cellularity in the gill stem was prominent with several parasites seen also in the afferent vessels of the filaments. Most parasites did not stain well and appeared degenerated. Several small encapsulation areas were also seen in the stem and filaments resulted in partial destruction of the flattened epithelium and pillar cells. In the connective tissue of hepatopancreas, a significant increase in numbers of reserve inclusion cells, granulocytes, haemocytes and hyalinocytes was observed. Two small inflammatory foci were seen in the myocardium of one lobster, consisting of an aggregation of haemocytes, granulocytes and hyaline deposition centrally; no parasites were obvious. However, there was a distinct reduction of reserve inclusion cells (RIC) from this tissue. At week 7 post-infection, the gill pathology was similar to week 6; however, there was an increase of numbers of RIC in the gill stem and some of these cells were breaking up into smaller parts in the stem and gill the filaments. No parasites were visible in haemolymph of gills and other organs and the septum of the gill filament was still intact in hepatopancreas and heart. No more RIC were seen, although haemocytes and haemolymph were still present. No change in the connective tissue of any of the organs was observed at this stage.

At week 9 post-infection, the most typical lesions occurred in the gills and the connective tissue, mainly of the epipodite nearest to the gills. In the gills, there was a massive invasion of the stem and afferent and efferent vessels of the filaments by the ciliates (Figure 2). These were showing normal staining properties with distinct and well stained



Εικόνα 4. Συσσωρεύματα παρασίτων σε συνδετικό ιστό ηπατοπαγκρέατος πειραματικά μολυσμένων αστακού (9η εβδομάδα μετά τη μόλυνση-τόξα) με *A. haemophila*. H&E, 150X.

Figure 4. Aggregations of ciliates (arrows) in the hepatopancreas of an American lobster experimentally infected with *A. haemophila* per animal, causing localised damage, week 12 post-infection. H&E, 235X.

κές συγκεντρώσεις παρασίτων στην περιοχή όπου υπήρχε απώλεια συνδετικού ιστού, στο κεντρικό άκρο των ηπατοπαγκρεατικών σωλήνων, με αποτέλεσμα την απώλεια των σταθερών φαγοκυττάρων. Λίγα εκφυλισμένα παράσιτα παρατηρήθηκαν στην αιμόλεμφο γύρω από το ηπατοπάγκρεας μαζί με συγκέντρωση αιμοκυττάρων (Εικόνα 4). Συγκεντρώσεις παρασίτων βρέθηκαν επίσης στο συνδετικό ιστό του εντέρου, των όρχεων, του πρόσθιου αδένου, χωρίς ωστόσο να προκαλέσουν σημαντικές αλλοιώσεις.

Στη 10η εβδομάδα μετά τη μόλυνση τα βραγχιακά νημάτια είχαν γεμίσει με μεγάλο αριθμό παρασίτων και μόνο σε λίγα παρέμεινε ανέπαφο το βραγχιακό στέλεχος. Δεν παρατηρήθηκαν περιοχές αλλοίωσης με εγκάψωση. Στο συνδετικό ιστό του ηπατοπαγκρέατος υπήρχε μεγάλος αριθμός παρασίτων και λέμφου. Μερικά παράσιτα εισέβαλαν τοπικά διαμέσου της συνδετικής κάψας στο παρεγγύμια, χωρίς όμως να προκληθούν σοβαρές αλλοιώσεις. Αρκετά παράσιτα βρέθηκαν στο συνδετικό ιστό και στη μυϊκή στιβάδα του επιποδίτη και του εντέρου, όπου τα RIC ήταν επίσης παρόντα. Μερικά παράσιτα βρέθηκαν και στο μυοκάρδιο και στα νευρικά γάγγλια προκαλώντας πολύ εντοπισμένες αλλοιώσεις. Επιπλέον στους ιστούς αυτών βρέθηκαν και RIC.

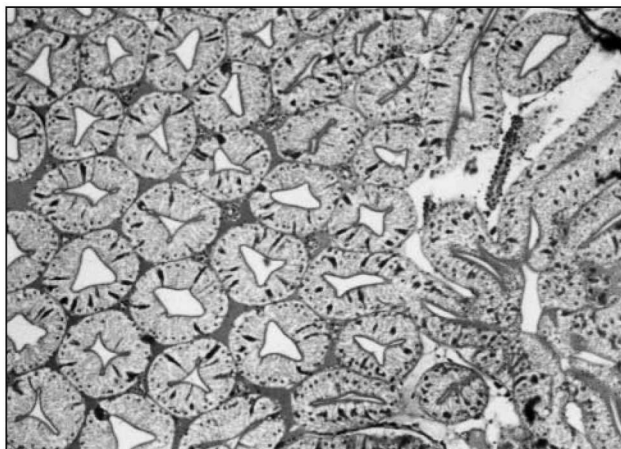
Μολυσμένοι και μη μολυσμένοι αστακοί στους οποίους χορηγήθηκε lasalocid

Οι μολυσμένοι αστακοί εμφάνισαν τις ίδιες αλλοιώσεις με τους θετικούς μάρτυρες.

Επιπλέον, και οι μολυσμένοι και μη μολυσμένοι αστακοί εμφάνισαν αιμόλυση στην καρδιά.

Μολυσμένοι αστακοί στους οποίους χορηγήθηκε pyrimethamine

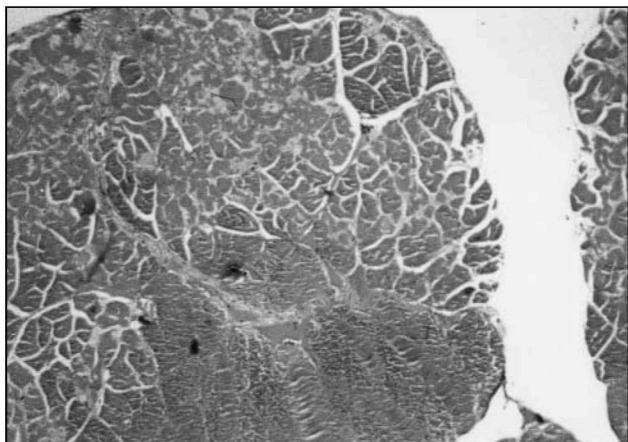
Οι μολυσμένοι αστακοί, στους οποίους χορηγήθηκε



Εικόνα 5. Φυσιολογική υφή ηπατοπαγκρέατος αστακού πειραματικά μολυσμένου με *A. haemophila*. Θεραπεία με pyrimethamine. H&E, 95X.

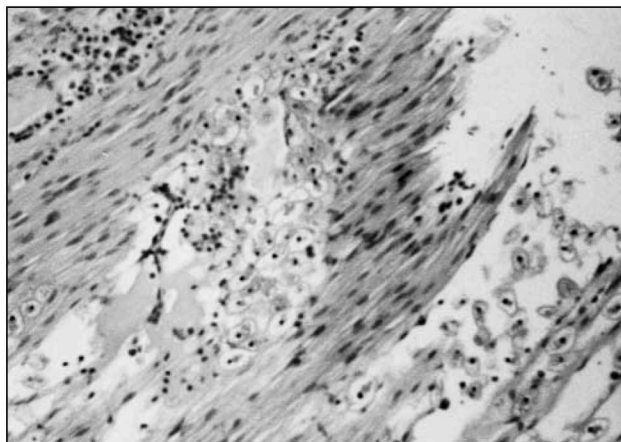
Figure 5. Normal structure of hepatopancreas of a pyrimethamine treated lobster. Destruction of connective tissue of epipodite of an American lobster experimentally infected with *A. haemophila*. H&E, 95X.

basophilic macronucleus, multiple eosinophilic granules in their cytoplasm and were easily recognized in both haematoxylin & eosin treated tissues. Some parasites were seen feeding on the gill epithelium. In the filaments, both the flattened and columnar epithelial cells (pillar cells) were destroyed and septum was lost, resulting in the formation of granulomatous appearance. In the gill stem, there was typically a total loss of reserve inclusion cells, podocytes and nephrocytes. However, some of the lobster showed increased cellularity in this area, involving haemocytes and podocytes with minimal pathology accompanying the gill filaments, suggesting that at this stage, all host defenses were directed primarily at this area. Also, a few lobsters at week 9 and most lobsters that died at week 10 showed a marked nodular appearance at the gill stem, as well as a total loss of dispersed cellularity and connective tissue structure. These were accompanied by the severe lesions in all of the filaments, thus, suggesting that the host defenses had been overtaken by the ciliates. In the connective tissue, a marked progressive reduction of the RIC and fibrocytes was observed in most internal organs (Figure 3). This was evident, at the beginning of the 9th week post-infection, nearest to the gills' epipodite, where the most serious pathology of the connective tissue was observed. Numerous well stained parasites were present in minimal amounts of remaining fibrocytes; some were seen feeding of this tissue and as a result, a large area of this organ was totally destroyed. In some cases, there was also an increase of granulocytes and haemocytes locally. Later in infection, in the loose connective tissue of the proximal end of the hepatopancreatic tubules, multifocal aggregations of ciliates were common, resulting in loss of fixed, mostly active phagocytes. A few degenerating ciliates were seen in the haemolymph surrounding the hepatopancreas, together



Εικόνα 6. Νεκρωτικές αλλοιώσεις σε μυς αστακού πειραματικά μολυσμένου με *A. haemophila*. Έγχυση διαλυτών. H&E, 95X.

Figure 6. Necrotic lesions in the muscles of a non-infected lobster treated with solvents. H&E, 95X.



Εικόνα 7. Νεκρωτικές αλλοιώσεις σε καρδιά αστακού πειραματικά μολυσμένου με *A. haemophila*. Έγχυση διαλυτών. H&E, 235X.

Figure 7. Necrotic lesions in the heart of a non-infected lobster treated with solvents. H&E, 235X.

μονή δόση της ουσίας, εμφάνισαν τις ίδιες αλλοιώσεις με τους θετικούς μάρτυρες, αλλά η εμφάνιση των παρασίτων στην αιμολέμφο καθυστέρησε μία εβδομάδα. Έτσι, η αλληλουχία των ιστολογικών αλλοιώσεων ήταν η ίδια, με διαφορά χρονική μίας εβδομάδας. Επίσης, δε βρέθηκαν παράσιτα στο ηπατοπάγκρεας και τον επιποδίτη (Εικόνα 5).

Μη μολυσμένοι αστακοί στους οποίους χορηγήθηκε pyrimethamine

Δεν βρέθηκαν ιστολογικές αλλοιώσεις.

Μολυσμένοι αστακοί στους οποίους χορηγήθηκαν διαλύτες

Βρέθηκαν αλλοιώσεις σε 3 από τους 8 αστακούς (37,5%) και αυτές ήταν παρόμοιες με αυτές των αστακών -θετικών μαρτύρων. Η εμφάνιση των παρασίτων στην αιμολέμφο παρατηρήθηκε την 5η εβδομάδα μετά τη μόλυνση και οι αλλοιώσεις στον επιποδίτη και τα βράγχια ήταν πολύ σοβαρότερες, ακόμη και από αυτή την εβδομάδα.

Αστακοί που παρέμειναν μη μολυσμένοι εμφάνισαν νεκρωτικές εστίες στην καρδιά.

Μη μολυσμένοι αστακοί στους οποίους χορηγήθηκαν διαλύτες

Οι μη μολυσμένοι αστακοί επίσης εμφάνισαν νεκρωτικές εστίες στους μυς (Εικόνα 6) και στην καρδιά (Εικόνα 7).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα βλεφαριδοφόρα παράσιτα θεωρούνται ως αιτιολογικοί παράγοντες σημαντικών ασθενειών σε Καρρινοειδή που βρίσκονται σε αιχμαλωσία (Morado & Small 1995) και μπορούν να προκαλέσουν απώλειες στον αμερικανικό αστακό (*Homarus americanus*) μέχρι 15% ετησίως (Cawthorn 1997). Η ασθένεια που προκαλείται από το παράσιτο *Anophryoides haemophila* έχει πρόσφατα περιγραφεί από τους Cawthorn et al. (1996) ως "bumper car disease".

with an aggregation of haemocytes (Figure 4). Aggregations of ciliates were also found in the connective tissue of the intestine, testis and antennal gland without, however, causing serious pathology. At week 10 post-infection, the gill filaments were packed with increased numbers of parasites, from which only few remained with intact septum. No encapsulation lesions were present. Numerous parasites and lymph were present in the connective tissue of hepatopancreas. Few of them locally invaded the connective capsule and parenchyma, but did not cause serious lesions. Numerous parasites were found in the connective tissue and muscular layer of the epipodite and the gut, where RIC were also abundant. Some parasites were also present in the myocardium (Figure 5) and nerve ganglion produced very localized pathology; RIC were also present in these tissues.

Infected and uninfected lobsters treated with lasalocid

Infected lobsters showed the same lesions as the infected control. In addition, both uninfected and infected lobsters, injected with lasalocid, showed a distinct haemolysis in the heart.

Infected lobsters treated with pyrimethamine

In infected animals, treated with single dose of the drug, lesions were similar to the infected controls, but the appearance of the ciliates in the haemolymph was delayed by one week. Thus, the histological lesions appeared with the same sequence, but with 7 days difference. However, no parasites were found in the hepatopancreas and the epipodite of the infected lobsters.

Uninfected lobsters treated with pyrimethamine

No lesions were observed in these animals.

Infected lobsters treated with Solvents

Lesions were present at 3 out of 8 (37.5%) of the animals treated with the solvent; these were similar to the

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 Καρκινοειδών άγριων και σε αιχμαλωσία.

Για το λόγο αυτό, σε μία προηγούμενη εργασία (Athanassopoulou et al., υπό δημοσίευση) καθιερώσαμε ένα πειραματικό μοντέλο για την ανάπτυξη και μελέτη των αλλοιώσεων της νόσου αυτής σε αστακούς. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής έδειξαν ότι, υπό πειραματικές συνθήκες, η ασθένεια αναπτύσσεται σε δυο φάσεις. Μια πρώτη φάση (1-4 εβδομάδα μετά τη μόλυνση), όπου κανένα παράσιτο δεν ανιχνεύεται στη λέμφο, και μια δεύτερη φάση (5η εβδομάδα και πέρα), οπότε και τα παράσιτα εμφανίζονται στη λέμφο και αυξάνονται 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, αδημοσίευτα στοιχεία). Αυτή η διπλή φάση ανάπτυξης της μόλυνσης καταγράφηκε από τις ιστοπαθολογικές αλλαγές και τις παρατηρήσεις με ανοσοφθορισμό και ανοσοϋπεροξειδάση σε προηγούμενη εργασία μας και επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα εργασία με την ανάπτυξη της νόσου στους μάρτυρες. Με βάση αυτά τα προηγούμενα στοιχεία χορηγήσαμε τις θεραπευτικές ουσίες μία εβδομάδα μετά την πειραματική μόλυνση και αρχίσαμε να εξετάζουμε την αιμολέμφο για παράσιτα 3 εβδομάδες μετά τη μόλυνση.

Η μη ικανότητα εντόπισης των βλεφαριδοφόρων στις πρώτες εβδομάδες της πειραματικής μόλυνσης, ακόμα και στη μεγαλύτερη έγχυση, μπορεί να οφείλεται σε ποικίλους λόγους. Πρώτον, η περιοχή των ιστών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, με συνήθη ιστολογία, μπορεί να ήταν περιορισμένη και σε διαδοχικά τμήματα, είτε ακόμα μπορεί να απαιτούνται πιο εξειδικευμένες μοριακές μέθοδοι, προκειμένου να ανιχνεύσουν την παρουσία των παρασίτων. Αυτό αποτελεί πεδίο για μελλοντική έρευνα. Ίσως τα βλεφαριδοφόρα μεταφέρονται μέσω της αιμολέμφου σε διαφορετικά όργανα, όπου, αφού εσωκλειστούν με τη συγκόλληση αιμοκυττάρων, μειώνονται προσωρινά από τις λυσίνες και τις οψονίνες του ξενιστή. Όταν οι αμυντικές λειτουργίες του ξενιστή αποτύχουν να αποτρέψουν την εξάπλωση των παρασίτων, αυτά τα βλεφαριδοφόρα μεταφέρονται ή κινούνται σε πιο ευνοϊκές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των βραγχίων και του συνδετικού ιστού (5η εβδομάδα και πέρα). Οι παρατηρήσεις μας υποστηρίζουν ότι οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή (όπως εκδηλώνονται με εγγάφωση και σχηματισμό κοκκιωμάτων) στόχο είχαν τα ίδια τα παράσιτα, αντίθετα με τους ισχυρισμούς των Morado (1993) και Messick και Small 1996.

infected controls. The appearance of the ciliates in the haemolymph was also present at 5th week and the histological lesions in the gills and the epipodite were very serious even at this week. There were also necrotic foci in the heart. Animals remaining uninfected from this group had only necrotic lesions in the heart.

Uninfected lobsters treated with Solvents

Large, necrotic lesions at the site of the injection were present in the musculature (Figure 6).

In most lobsters, similar necrotic lesions were seen also in the heart (Figure 7).

DISCUSSION

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). Previous studies of experimentally induced disease in lobsters are rare (Sherbourn & Bean, 1991). Overall, there is a significant requirement for the 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 assess the impact of infectious diseases on both wild and captive crustacean populations. In a previous study (Athanassopoulou et al, under publication) we established 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. This model provided useful information related to the disease's development. The results of a further experiment (Athanassopoulou et al, under publication) 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 in 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 was also documented by the present study in the infected control group. On the basis of these previous observations, we treated lobsters after a week post-infection and we started looking for parasites from week 3 post-infection onwards.

The inability to locate the ciliates in the earlier weeks of the experimental infection, even at the highest inoculum, may be due to various reasons. Firstly, the area of tissues, examined in the present study by routine histology, could well be limited and serial sections or more sophisticated

Γενικά, οι παρασιτώσεις από τα βλεφαριδωτά είναι γρήγορες και καταλήγουν σε θάνατο (Messick & Small 1996). Τα αιμοκύτταρα του ξενιστή προφανώς είναι ανίκανα να αναγνωρίσουν τα πολλαπλασιαζόμενα παράσιτα και εξαντλούνται γρήγορα, φαινόμενο γνωστό σε πολλές ασθένειες των Καρκινοειδών (Morado et al., 1995).

Το lasalocid βρέθηκε να είναι πολύ τοξικό και μεγάλη θνησιμότητα παρατηρήθηκε όταν δοθηκε *in vivo* τόσο σε υγιείς όσο και μολυσμένους αστακούς. Ο αριθμός των αιμοκυττάρων των αστακών που επέζησαν βρέθηκε πολύ χαμηλός –πολύ μικρότερος των θετικών μαρτύρων- προφανώς λόγω αιμόλυσης, όπως αποδείχθηκε στην ιστοπαθολογική εξέταση.

Η pyrimethamine αποδείχθηκε αποτελεσματική και θεραπεύει τελείως τα παράσιτα ειδικά στο επαναλαμβανόμενο σχήμα. Η θνησιμότητα ήταν πολύ χαμηλή και ο μέσος αριθμός των αιμοκυττάρων παρέμεινε υψηλός, ακόμη και υψηλότερος από τους αρνητικούς μάρτυρες.

Το φάρμακο φαίνεται να επιβραδύνει την εμφάνιση των παρασίτων στην αιμοδέφο και να μειώνει τη διασπορά των παρασίτων και στα όργανα (επιποδίτης, ηπατοπάγκρεας). Τα μη μολυσμένα άτομα που χορηγήθηκε το φάρμακο αυτό, ο αριθμός των αιμοκυττάρων ήταν παρόμοιος με τους αρνητικούς μάρτυρες. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν παθολογικές αλλοιώσεις, όταν το φάρμακο δόθηκε σε μη μολυσμένα άτομα. Εξάλλου, το φάρμακο έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό και σε *in vitro* δοκιμές (Novotny et al., 1996, Cribb et al., 1999).

Καθώς δεν υπάρχει θεραπεία για την νόσο, με βάση τα θετικά αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, προτείνουμε ότι η pyrimethamine είναι ένα καλό φάρμακο για τη θεραπεία της νόσου που οφείλεται στο παράσιτο *A. haemophilum*.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αποδείχθηκε ότι προκαλούν τοπικές νεκρώσεις σε μυϊκό ιστό και καρδιά (χωρίς όμως να προκαλούνται θάνατοι) και επομένως, θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί η χρήση άλλων εναλλακτικών ουσιών για τη διάλυση του φαρμάκου. Αν και αυτό το σημείο προσεχθεί και βελτιωθεί, το φάρμακο μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια σε αστακούς.

Ευχαριστίες: Η Dr. F. Athanassopoulou -Irvine συμμετείχε στην έρευνα με υποτροφία (Postdoctoral Fellowship from the Organization for Economic Development and Cooperation (Europe). Το πρόγραμμα χρηματοδοτήθηκε στο Lobster Health Research Centre από το Ίδρυμα Mux Bell Foundation. □

molecular methods may be required to detect the presence of the parasites; this is an area for future research, especially as the PCR method has been recently developed for detecting these parasites in lobsters (Ragan et al, 1996). Perhaps the ciliates are transferred by the haemolymph to different organs, where, after being enclosed by haemocyte agglutination, they are either temporarily decreased in numbers by the host's lysins and opsonins or they undergo a phase of a localized binary fusion and multiplication. When host defenses fail to prevent spreading of the parasites, these ciliates are then transferred or moved to more favorable locations, including gills and connective tissue (week 5 onwards). Our observations suggested that the host's defense mechanisms (as manifested by encapsulation and granulomata formation) were indeed targeting the parasites, unlike the suggestions of Morado (1993) and Messick & Small (1996).

In general, ciliate infections appear to be fatal and rapid (Messick & Small, 1996). The host haemocytes are apparently unable to recognize the proliferating parasites and they are also rapidly depleted, a common phenomenon of many protistan diseases of crustaceans (Morado et al, 1995).

Lasalocid was found to be toxic and acute mortality was observed, when administered *in vivo* in both infected and uninfected lobsters. The haemocyte counts of the remaining lobster were very low (much lower than the control fish, most probably due to the haemolysis, as this was shown in histology). Monensin was also very toxic to lobsters at the doses tested.

Pyrimethamine was found very efficient to treat these ciliates at repeated doses. The mortality was very low and the mean haemocyte counts remained higher than the uninfected control group. The drug seems to delay the appearance of the ciliates in the haemolymph and to lower the spread of these parasites in the epipodite and the hepatopancreas. In uninfected animals treated with this drug, haemocyte counts were similar to the uninfected control group. Furthermore, no pathology was observed, when the drug was administered to uninfected lobsters. The drug has been also shown effective during *in vitro* trials (Novotny et al, 1996, Cribb et al, 1999). As there is no effective treatment for the control of bumper car disease, on the basis of the results of the present study, we suggest that pyrimethamine is a good drug for the treatment of *A. haemophilum* infection in lobsters. The solvents, used to dissolve the drugs in this study, were shown to produce necrotic lesions in musculature; therefore, it would be interesting to investigate alternative solvents. If this aspect is improved, the drug could be then administered safely to American lobsters.

Acknowledgments: Current work was supported by a Postdoctoral Fellowship from the Organization for Economic Development and Cooperation (Europe). Program funding to the Lobster Health Research Centre was provided by Mux Bell Foundation. □

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Bower, SM, McGladdery SE & Price IM (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Ann. Rev. Fish Dis. 4: 1-199.
- 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 defense mechanisms of *Homarus americanus*. J.Fish. Res.Brd.Can. 25: 695-709.
- Cribb AE, Despres B & Cawthorn RJ (1999). Tetrazolium- based cytotoxicity assay to determine anti-protozoal activity against the scuticociliate *A. haemophila*. Dis. Aquat. Org. 35:213-219.
- 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). *Mesanoophrys chesapeakeensis* sp., an histophagous ciliate in the blue crab, *Callinectes sapidus*, and associated histopathology. Invertebrate Biology 115: 1-12.
- Morado JF & Small EB (1995). Ciliate parasites and related diseases of Crustacea: A review. Rev. Fisheries Sci. 3: 275-354.
- Nothorny MJ, Cawthorn RJ & Despres B (1996). In vitro effects of chemotherapeutants on the lobster parasite *A. haemophila*. Dis. Aquat. Org. 24:233-237.
- Ragan MA, Cawthorn RJ., Despres B, Murphy CA, Singh R, Loughlin B, Bayer RB (1996). The lobster parasite *Anophryoides haemophila* (Scuticociliata: Orchitophthyidae): nuclear 18S rDNA sequence, phylogeny and detection using oligonucleotide primers. J. Euk. Microbiol 43(4), 341-346.
- Speare DJ, Daley J, Markham RJF, Sheppard J, Beaman HJ, Sanchez GJ (1998). *Loma salmonae*- associated growth rate suppression in rainbow trout (*Onchorynchus truttae*) occurs during early- onset xenoma dissolution as determined by in situ hybridization and immunohistochemistry. J. Fish Dis. 21: 345-354.
- Speare DJ, Cawthorn RJ, Horney BS, Mac Millan R & MacKenzie AL (1996). Effects of formalin, chloramine T and low salinity dip on the behaviour and haemolymph biochemistry of the American lobster. Can. Vet. J. 37:729-734.