



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia

**Enteromixosi produïda per *Enteromyxum leei*
(Diamant, Lom i Dyková, 1994) en espàrids d'interès
comercial del Mediterrani**

Memòria presentada per

Montserrat Cuadrado Lafoz

Per optar al grau de Doctora en Ciències Biològiques

Tesi doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Sílvia Crespo i
el Dr. Francesc Padrós de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesi doctoral adscrita al Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i
d'Ecologia. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona 2009

“The only place where success comes before work is in the dictionary”

Atribuït a Vidal Sassoon i Donald Kendall

A les meves “J”:
al Jordi i a la Jània

Amb el suport del Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació
i del Fons Social Europeu.

AGRAÏMENTS

El camí es fa caminant....pots caminar de baixada, de pujada, pots córrer... però mai fas el camí sol. A tots aquells que m'heu acompanyat en alguna etapa o durant tota aquesta travessa: gràcies.

Als meus directors de tesi, la Sílvia i en Sito, voldria agrair-los la oportunitat de deixar-me fer els primers passos en el món de la ciència, per deixar-me experimentar, per deixar-me equivocar...En fi, gràcies per deixar-me aprendre dels meus errors.

En les llargues travesses sovint és necessari una mica de suport tècnic. Per aquest motiu voldria agrair a tot el personal dels Serveis de Microscòpia de la UAB, de la UB i de la UM-II, al Servei d'Estadística de la UAB i al Servei Veterinari de Genètica Molecular la seva atenció i la seva dedicació sense els quals no hauria arribat al final d'aquest camí.

El millor de tot, sense cap mena de dubte ha estat la companyia... En primer lloc, he d'agrair als meus companys de laboratori les rialles, les confidències, el suport... En general, us he d'agrair el bon ambient que ha fet que, durant tots aquests anys, llevar-se al matí no fos una càrrega feixuga. Primer va ser la Laia i els viatges matiners cap a Sant Carles de la Ràpita. Després la Glòria, inseparable companya MyxFish i sense la qual una bona part d'aquesta tesi no hagués estat possible. En Lluís, el nostre "casçaràbies" particular i en Lluís Dopazo el "sensei" de la ganiveta de diamant... De ben segur els primers anys haguessin estat molt més durs sense vosaltres. Després d'algun temps van aparèixer les "súper-nenas" (la Gemma, la Marta, l'Anna Soler, la Mar Marcos, la Mar Costa, la Queta, la Maria) i els Alberts (Fernàndez i el Girons). A tots vosaltres, gràcies per omplir de "bon rotllo" i rialles els laboratoris i els despatxos...heu estat unes bones fregues en aquests darrers temps en què ja acusava una mica el cansament. Alguns companys m'heu "patit" durant tot el camí, com el Roger, el meu "compi" de raid anual i d'algunes aventurilles més; el Paco sempre al meu costat disposat a donar un cop de mà i els que faci falta; i l'Encarna sempre a punt per salvar-me d'algun imprevist. A la Roser i a la Maite els hi voldria agrair la seva proximitat, les ensenyances i els consells rebuts durant tot aquest temps.

Quan vaig començar, la Facultat de Veterinària era un món nou ple de possibilitats, però on no coneixia res ni ningú. Han anat passant uns quants anys i estic molt contenta de dir que me n'aniré amb grans amics (fins i tot, familiars com la tieta Nuri) i grans records. Potser ara estaria a un sanatori sinó fos per l'Alba (Albeixons) i és que quantes bones estones vam passar rient de tot plegat mentre comptaven paràsits i fibres...I les noies d'etologia? A l'Èlia he d'agrair el que me les presentés: la Núria, la

Ceci i l'Eva i amb les que he compartit els extramurs de la Facultat en unes fabuloses barbacoes (sempre quedem per menjar o m'ho sembla a mi?).

Ja fora de la Facultat, hi ha un petit indret a l'altre banda del campus que es diu Unitat de Zoologia amb els companys de la qual he compartit, a més d'alguna estoneta de laboratori, dies espectaculars de sol i platja. A tots vosaltres: Anna Morton, Anna Soler, Francesc, Emili, Manolo, Pilar us vull agrair el vostre companyonia i l'ajuda que m'heu prestat durant tots aquests anys.

De ben segur no hagués acabat aquest camí sense l'ajuda de moltíssima altra gent de la UM-II, de l'IATS, de l'NCM i de la UV. De la UM-II he d'agrair-li al Dr. Marques haver-me ensenyat com estudiar els mixozous i a la Idalia, la Cinzia i la Devika haver fet que la meva estada a França fos inoblidable. A la Dra. Alvarez-Pellitero i a la Dra. Sitjà-Bobadilla del IATS els hi voldria agrair tot el que m'han ensenyat i la paciència que han demostrat durant l'elaboració de les publicacions. Al Dr. Diamant i al Dr. Yokoyama per la seva positivitat, pels seus comentaris sempre constructius i, com no, per la cessió de mostres. Gràcies a tots els companys de la UV: Toni, Javi, Merche, Carmen, Angeles, Celia, Aigües, Isa, Anna Ahuir, Anna Pérez, Diana, Patricia, Neus, Gema, Vicent,...(segur que em deixo a algú...) per acollir-me al vostre laboratori i haver-me fet sentir part del vostre equip. Un agraïment especial per l'Astrid per ajudar-me a carregar les piles en un moment que estava molt baixa de bateria.

A tota la "colla pessigolla" de Bio: a l'Èlia, l'Ester S., el Jordi, l'Ester C., el Marc, l'Arnau, la Mari,...pels soparets, les calçotades, les excursions, etc. En fi, gràcies per compartir amb mi tots aquests meravellosos moments de descans que m'han donat energia per continuar el camí (sobretot les calçotades...).

Al Joel, a la Núria i al Carlos per les excursions, les "eternals" enfangades, els barrancs, les ferrades, els caps d'any,... M'heu estalviat la risoteràpia, el yoga, el tai-chi....quina millor manera de desconnectar que amb vosaltres.

I què hagués fet jo sense el suport logístic i emocional de la meva família... Gràcies per donar-me l'oportunitat d'estudiar sense haver-me de preocupar de res més. Gràcies pels ordinadors, els "tuppers", la paciència (ai! santa paciència...). Gràcies pel miler de coses que haureu fet per mi sense que jo me n'hagi adonat i que m'han permès finalitzar aquesta etapa.

Molt especialment, gràcies al Jordi sense el qual avui no escriuria aquestes línies. En tota bona travessa, els quilometres pesen i, a vegades, creus que no pots donar una passa més... Gràcies per recordar-me que encara que no ens ho sembli, sempre podem una miqueta més, gràcies per carregar-te la meva motxilla, gràcies per acompanyar-me fins al final del camí... Només gràcies a tu ara veiem el paisatge des del cim.

Encara no saps llegir....però no em vull oblidar de tu, petita Jània. Gràcies per donar-me un embaràs plàcid i per les petites becainetes que m'han deixat acabar la tesi.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Els espàrids: Aspectes biològics i ecològics	3
1.2. L'aqüicultura a nivell mundial. Situació de la producció d'espàrids al Mediterrani.	4
1.3. El cultiu de l'orada i la morruda. Aspectes tècnics.	7
1.4. Importància de les parasitosis en la piscicultura marina al Mediterrani. Principals parasitosis dels espàrids.	8
1.5. Els mixozous	11
1.5.1. Aspectes generals	11
1.5.2. Relacions filogenètiques i classificació	11
1.5.3. Aspectes morfològics. Cicle de vida i desenvolupament.	12
1.5.3.1. Classe Malacosporea.	12
1.5.3.2. Classe Myxosporea.	13
1.6. El gènere <i>Enteromyxum</i> i les enteromixosis en peixos cultivats.	15
1.6.1 <i>Enteromyxum leei</i> : agent causant de l'enteromixosi en l'orada i altres espàrids d'interés comercial.	16
2. OBJECTIUS	19
3. MATERIALS I MÈTODES	23
3.1. Material biològic	25
3.1.1. Infeccions experimentals	25
3.1.2. Infeccions en medi natural de morrudes (N1)	28
3.2. Tècniques <i>Post Mortem</i>	28
3.2.1. Tècniques histològiques	28
3.2.1.1. Microscopi òptic	28
3.2.1.2. Microscopi electrònic de rastreig	30
3.2.1.3. Microscopi electrònic de transmissió	30

4. DESCRIPCIÓ DELS ESTADIS DE DESENVOLUPAMENT D'<i>Enteromyxum leei</i> A L'ORADA (<i>Sparus aurata</i>) I A LA MORRUDA (<i>Diplodus puntazzo</i>)	33
4.1. INTRODUCCIÓ	35
4.2. MATERIALS I MÈTODES	36
4.2.1. Material biològic	36
4.2.2. Tècniques <i>Post Mortem</i>	36
4.2.3. Estudis al microscopi òptic	36
4.2.4. Estudis al microscopi electrònic de transmissió	37
4.3. RESULTATS	37
4.3.1. Estadis inicials i de proliferació del paràsit	38
4.3.1.1. Estadi 1	38
4.3.1.2. Estadi 2	38
4.3.1.3. Estadi 3	41
4.3.2. Estadis d'esperogènesi	46
4.3.2.1. Estadi 4	46
4.3.2.2. Estadi 5	54
4.4. DISCUSSIÓ	55
4.4.1. Localització dels estadis de desenvolupament d' <i>Enteromyxum leei</i>	56
4.4.2. Estadis de proliferació	56
4.4.3. Estadis esporogènics	58
5. ESTUDI COMPARATIU DE L'ESTABLIMENT, PROGRESSIÓ DE LA INFECCIÓ I PATOGÈNIA D'<i>Enteromyxum leei</i> A L'ORADA (<i>Sparus aurata</i>) I LA MORRUDA (<i>Diplodus puntazzo</i>) EN DIFERENTS CONDICIONS D'EXPERIMENTACIÓ	61
5.1. INTRODUCCIÓ	63
5.2. MATERIALS I MÈTODES	64
5.2.1. Material biològic i tècniques <i>post mortem</i>	64
5.2.2. Estudi histològic	64
5.2.3. Estudi estadístic	65
5.3. RESULTATS	66
5.3.1. Infecció per cohabitació en orades adultes (C1)	66
5.3.1.1. Progressió de la infecció	66
5.3.1.2. Lesions i reacció inflamatòria	70

5.3.2. Infecció per ingestió en orades adultes (O1)	75
5.3.2.1. Progressió de la infecció	75
5.3.2.2. Lesions i reacció inflamatòria	78
5.3.3. Infecció per cohabitació en morrudes juvenils (C2)	79
5.3.3.1. Dades biomètriques	79
5.3.3.2. Progressió de la infecció	79
5.3.3.3. Lesions i reacció inflamatòria	83
5.3.4. Infecció per cohabitació en orades juvenils (C3)	85
5.3.4.1. Dades biomètriques	85
5.3.4.2. Progressió de la infecció	85
5.3.4.3. Lesions i reacció inflamatòria	88
5.3.5. Infeccions en medi natural de morrudes (N1)	89
5.3.5.1. Dades biomètriques	89
5.3.5.2. Estudi histològic de la infecció	90
5.3.5.3. Lesions i reacció inflamatòria	91
5.3.6. Estudi comparatiu de la infecció per <i>Enteromyxum leei</i> en diferents situacions experimentals	93
5.3.6.1. Estudi comparatiu de dues metodologies d'infecció experimentals (cohabitació i infecció oral) en orades adultes: infeccions C1 i O1	93
5.3.6.2. Estudi comparatiu de la infecció en la morruda i l'orada emprant el mateix mètode d'infecció (cohabitació): infeccions C2 i C3	94
5.3.6.3. Estudi comparatiu de la infecció entre orades juvenils i orades adultes emprant el mateix mètode d'infecció (cohabitació): infeccions C1 i C3	96
5.3.6.4. Estudi comparatiu de les infeccions experimentals i la infecció natural	98
5.4. DISCUSSIÓ	99
5.4.1. Invasió d' <i>Enteromyxum leei</i> dins l'hoste	99
5.4.2. Dispersió d' <i>Enteromyxum leei</i> dins l'hoste	100
5.4.3. Evolució de la infecció per <i>Enteromyxum leei</i> en diferents condicions experimentals	101
5.4.3.1. Efecte de l'espècie d'hoste	101
5.4.3.2. Efecte de l'edat	102
5.4.3.3. Efecte del mètode d'infecció	102
5.4.3.4. Efecte del tram intestinal	103

5.4.6. Lesions i recció inflamatòria	104
6. ESTUDI D'UNA NOVA FORMA DE MIXOSPORIDI EPI-EPITELIAL EN EL TRANCURS D'INFECCIONS EXPERIMENTALS AMB <i>Enteromyxum leei</i> EN ORADA (<i>Sparus aurata</i>)	105
6.1. INTRODUCCIÓ	107
6.2. MATERIALS I MÈTODES	107
6.2.1. Material biològic	107
6.2.2. Tècniques <i>post mortem</i>	108
6.2.2.1. Tècniques de microscòpia òptica i electrònica	108
6.2.2.2. Tècniques moleculars	108
6.2.3. Estudis al microscopi òptic	111
6.2.4. Estudis al microscopi electrònic	111
6.3. RESULTATS	112
6.3.1. Localització i patogènia del mixosporidi epi-epitelial	112
6.3.2. Morfologia del estadis del mixosporidi epi-epitelial	112
6.3.3. Prevalença i intensitat del paràsit en diferents situacions experimentals	120
6.3.4. Estudis moleculars	121
6.4. DISCUSSIÓ	124
6.4.1. Estudi morfològic	124
6.4.2. Prevalença i intensitat del paràsit en diferents situacions experimentals	125
6.4.3. Identificació del paràsit	126
6.4.4. Transmissió del paràsit	127
7. CONCLUSIONS	129
8. APÈNDIX	135
8.1. Tècniques histològiques	137
8.1.1. Microscopi òptic	137
8.1.2. Microscopi electrònic de rastreig	140
8.1.3. Microscopi electrònic de transmissió	141

8.2. Tècniques moleculars	144
8.2.1. Extracció d'ADN	144
9. BIBLIOGRAFIA	145

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Els espàrids: Aspectes biològics i ecològics

Els espàrids (Sparidae) constitueixen una família de peixos àmpliament representada en els mars tropicals i temperats de tot el món. En la majoria de casos es tracta d'espècies litorals de costums bentònics. Prefereixen els fons rocosos, tot i que algunes espècies es troben als fons de la plataforma continental i fins i tot, n'hi ha de pelàgiques. Les espècies de distribució més profunda acostumen a presentar colors vermellosos o rosats, mentre que les espècies que es troben a menor profunditat són argentades amb el dors fosc i algunes bandes transversals de color negre o marró. Els individus joves són gregaris, mentre que els adults són solitaris o nedan en petits grups. Moltes espècies són hermafrodites proteràndriques (inicien el seu desenvolupament com a mascles i després inverteixen el seu sexe per ser femelles) com l'orada (*Sparus aurata*). Altres espècies són proterogíniques (inicien el seu desenvolupament com a femelles i després inverteixen el seu sexe per ser mascles) com el pagell (*Pagellus erythrinus*). La majoria són carnívores com l'orada, tot i que hi ha espècies de règim omnívor com la morruda (*Diplodus puntazzo*) i herbívor com la salpa (*Sarpa salpa*).

Aquesta família té una gran importància econòmica ja que inclou espècies d'elevat valor comercial i molt apreciades gastronòmicament al Mediterrani com l'orada i la morruda.

Sparus aurata L'orada o dorada (Fig.1.1) és una espècie litoral, normalment solitària o que viu en grups reduïts, que viu sobre fons rocosos i sorrencs o en praderies de fanerògames marines. Rarament es troba per sota dels 30 m, encara que ocasionalment pot superar els 100 m de profunditat. Carnívora, s'alimenta sobretot de mol·luscs, però també de crustacis i peixos petits. És una espècie hermafrodita proteràndrica i la majoria d'individus es converteixen en femelles al cap d'uns tres anys (o quan pesen de 0,5 a 1 Kg). La reproducció abasta el període d'octubre a desembre, malgrat que pot perllongar-se fins al febrer o l'abril. És una espècie comuna al Mediterrani i a l'Adriàtic i rara al Mar Negre. Colonitza l'Atlàntic oriental, des de les illes britàniques, on es considera ocasional, fins al Senegal, incloses les illes Açores i les Canàries. Pot arribar als 70 cm de llargada, però no sol sobrepassar els 35 cm.

Diplodus puntazzo La morruda (Fig.1.1) és una espècie litoral i gregària que viu sobre fons rocosos i sorrencs o en praderies de fanerògames marines. Rarament supera els 50 m de profunditat, però es pot trobar a la plataforma continental a profunditats superiors als 100 m. Omnívora, menja tant algues com invertebrats (anèl·lids, mol·luscs i crustacis). És una espècie hermafrodita, tot i que en alguns

casos pot ser hermafrodita proteràndrica (els individus són mascles fins la primera maduració sexual i després són femelles). Els individus adults es reproduïxen entre els mesos de setembre i novembre. Viuen al Mediterrani i a l'Atlàntic ibèric i nord-africà. La seva talla mitjana és de 25 a 30 cm, però poden arribar als 60 cm.

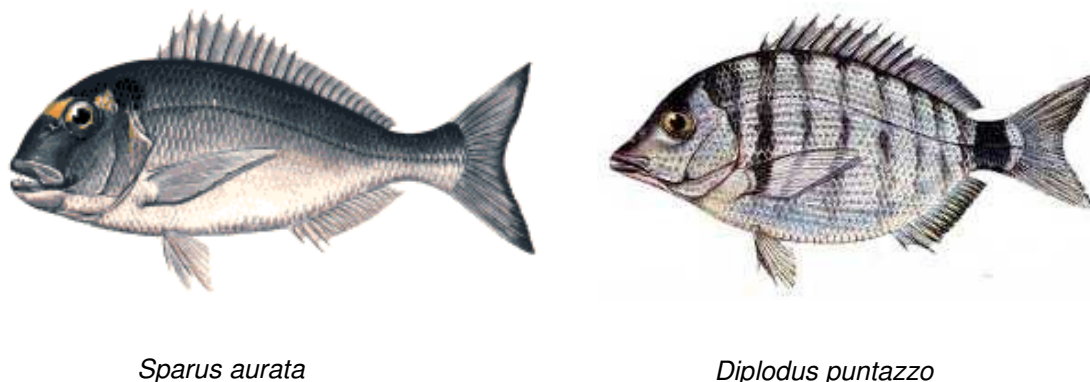


Fig. 1.1. Exemples d'orada (*S. aurata*) i morruda (*D. puntazzo*).

1.2. L'aqüicultura a nivell mundial. Situació de la producció d'espàrids al Mediterrani

Durant l'últim quart del segle XX, el cultiu de peixos ha estat el sector productiu alimentari que ha crescut més ràpidament (un 8,8% anual des de 1950 (FAO 2006)). Segons l'Organització Mundial de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació (FAO), al 1980 només un 9% del peix que es consumia provenia de l'aqüicultura, mentre que un 45% del peix que es consumeix actualment (uns 48 milions de tones) prové del cultiu en granges. Tot i que existeix una creixent demanda, sobretot en països en vies de desenvolupament, les captures de peix en el medi natural es mantenen gairebé estables des del 1980 (de 90 a 93 milions de tones anuals). A més, segons l'últim informe de la FAO sobre l'estat de les pesqueries marines al món, més de la meitat dels estocs estudiats estan explotats al límit del màxim rendiment sostenible, sobreexplotats o esquilmatos (FAO 2009). Aquest mateix organisme preveu que l'any 2030 seran necessaris uns 40 milions de tones addicionals per poder satisfer els nivells de consum de peix de la creixent població mundial (FAO 2006). En aquest escenari, sembla que l'única opció per satisfer la futura demanda de peix és l'aqüicultura.

Al Mediterrani i al Mar Negre la situació de la pesca extractiva és similar a la situació a nivell mundial. Així, mentre que la pesca extractiva de peixos marins ha anat

decreixent lentament en els darrers 15 anys, el seu cultiu ha experimentat un gran creixement en el mateix període (Fig.1.2).

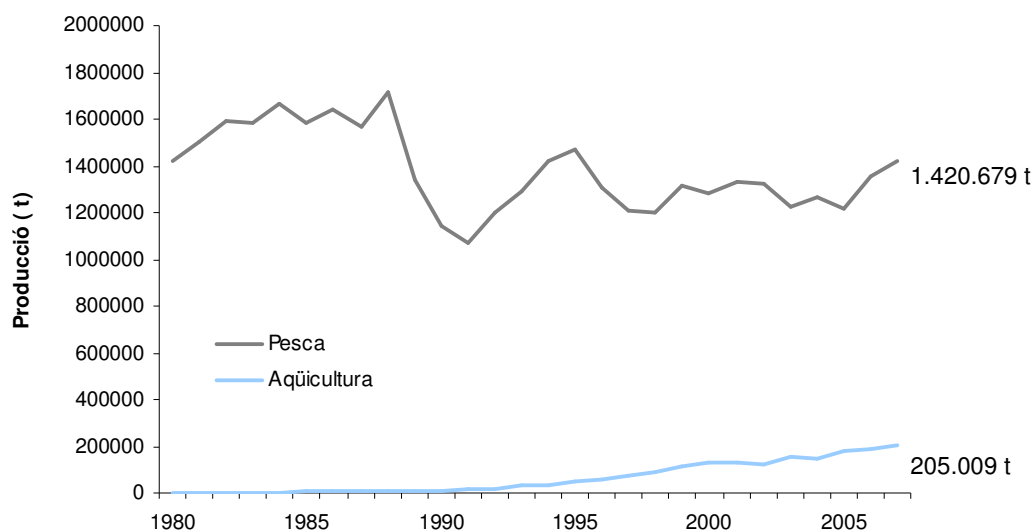


Fig.1.2. Evolució de la producció de peixos marins al Mediterrani i al Mar Negre (1980-2007) (Fishery Statistical Collections 2009).

Actualment, als països de la conca mediterrània la producció de peixos cultivats representa un 24% de la producció a nivell europeu i bàsicament consisteix en el cultiu de l'orada (*S. aurata*) i el llobarro (*Dicentrarchus labrax*). Els principals països productors en aquesta zona són en ordre decreixent: Grècia, Turquia, Espanya, Itàlia i França, als quals se li afegeixen les petites produccions de Croàcia, Malta i Xipre (Taula 1.1).

Taula 1.1. Evolució de la producció del cultiu de peixos als principals països de la conca mediterrània en t (Aquamedia 2009).

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Croàcia	9.840	9.605	8.456	9.350	9.950	9.950	10.430	10.930
Xipre	1.790	1.861	2.090	3.515	3,598	3.235	3.425	4.000
França	59.155	55.300	49.470	51.010	48.767	50.655	49.194	49.137
Grècia	66.550	73.500	78.500	79.500	83.600	100.000	72.000	95.000
Itàlia	62.500	59.700	56.500	58.700	58.620	60.705	59.700	60.975
Malta	1.235	1.116	1.000	913	931	931	931	931
Espanya	54.620	57.200	57.514	62.668	65.205	66.154	61.959	68.325
Turquia	66.972	62.510	67.250	71.250	78.850	92.750	100.250	105.250
Total	322.662	320.792	320.780	336.906	349.521	384.380	357.889	394.548

A Espanya, la producció total de peixos marins l'any 2007 va ser de 39.737,77 t (JACUMAR 2009). Tot i que les produccions de llobarro i turbot (*Psetta maxima*) van ser importants, la meitat de la producció va ser deguda al cultiu d'espàrids, especialment d'orada amb 19.855,41 t, però també de besuc (*Pagellus bogaraveo*) i de morruda (Fig.1.3). Durant l'any 2008 es va produir un increment del 7,2% en la producció d'orada a Espanya, però durant l'any 2009 se'n preveu un descens d'un 1,5% (APROMAR 2009).

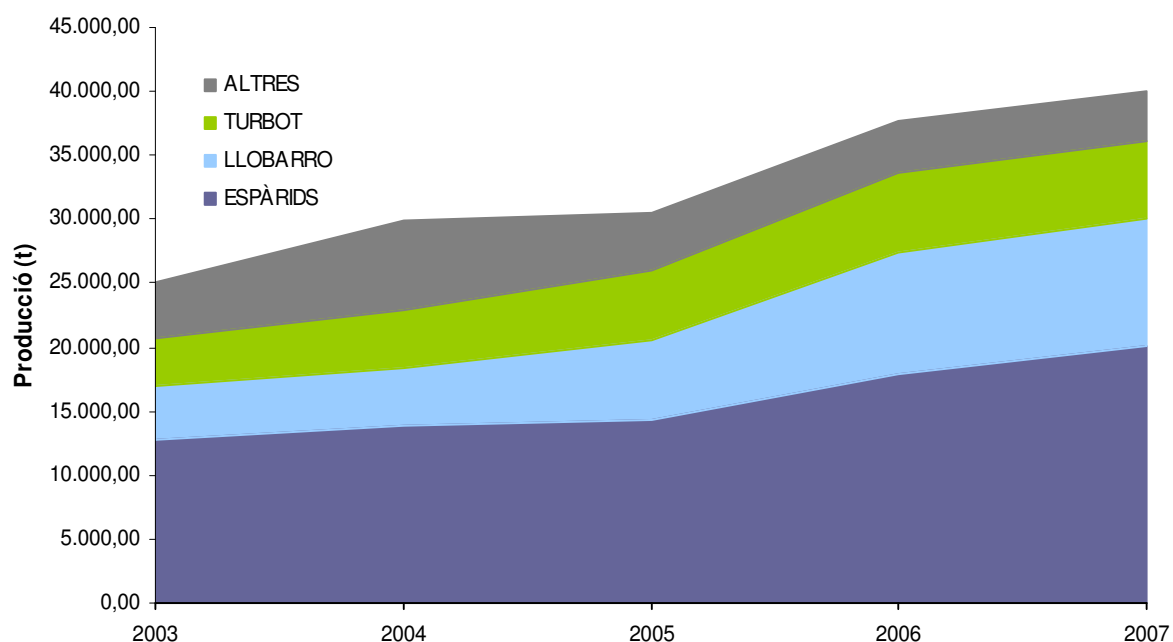


Fig.1.3. Evolució de les produccions de peixos marins a Espanya (2003-2007) (JACUMAR 2009).

Pel que fa a la producció d'orada per comunitats autònomes, la Comunitat Valenciana va encapçalar la producció a l'any 2008, seguida de Múrcia, les Canàries, Andalusia i Catalunya (Fig.1.4).

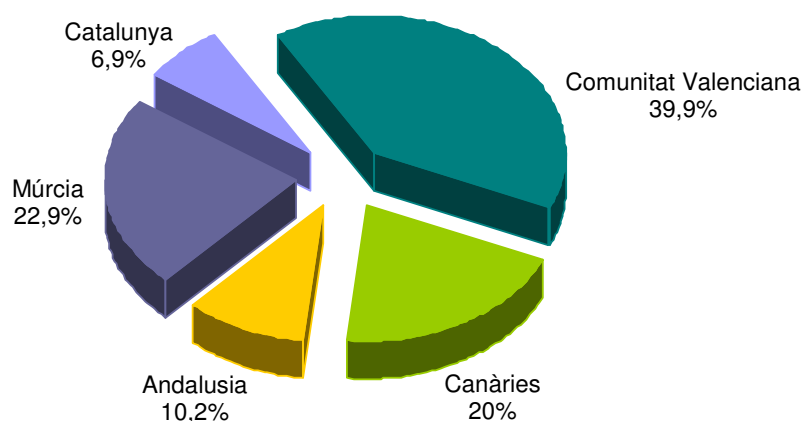


Fig.1.4. Distribució percentual de la producció d'orada per CCAA (APROMAR 2009).

1.3. El cultiu de l'orada i la morruda. Aspectes tècnics

El cultiu d'espàrids i, en concret, el cultiu de l'orada, es realitza de forma intensiva des de la dècada dels 80. Les primeres postes artificials es van aconseguir a Itàlia entre el 1981 i el 1982 i la producció de juvenils es va aconseguir 6 anys després a Itàlia, Espanya i Grècia. El cultiu de l'orada consta de 4 fases: la d'obtenció d'ous i larves, la *nursery*, la fase de preengreix i la d'engreix. Les larves esgoten el sac vitel·lí en 3 o 4 dies, de manera que comencen a ser alimentades amb presa viva (rotífers *Brachionus plicatilis* i artèmia *Artemia salina*) fins que completen la metamorfosi i són traslladades a tancs on es produeix una fase de transició en que es va substituint progressivament la presa viva pel pinso. Quan assoleixen els 5-10 g, els alevins són traslladats a sistemes d'engreix intensiu on arribaran a la seva talla comercial d'aproximadament 300-400 g en un any o un any i mig en funció del sistema de cultiu (tancs o gàbies), la temperatura del sistema i el pes inicial dels juvenils. Existeixen altres sistemes de cultiu extensiu o semiextensiu que no estan tan àmpliament utilitzats i que consisteixen en l'engreix d'orades en llacunes artificials amb major o menor aportació d'aliment artificial (pinso).

El cultiu de la morruda és metodològicament similar al cultiu de l'orada i també presenta un bon rendiment productiu ja que pot arribar a una talla comercial de 300 g en 11 o 13 mesos (Mena i García García 2002).

1.4. Importància de les parasitosis en la piscicultura marina al Mediterrani. Principals parasitosis dels espàrids

El cultiu en gàbies és una de les tècniques d'engreix de l'orada més utilitzada. Aquest sistema d'engreix permet intensificar la producció amb un menor cost, però implica una disminució en la capacitat de control de la qualitat de l'aigua o de la presència d'altres organismes a prop o dins del sistema. Aquestes característiques (elevades densitats i menor control) creen unes condicions propícies per al desenvolupament de brots infecciosos (vírics, bacterians o parasitaris). A això, s'ha d'afegir l'elevat cost dels tractaments i la dificultat d'aplicar-los. Probablement, aquest sigui un dels motius pels quals en els darrers anys les malalties, especialment les parasitàries han adquirit una importància creixent al Mediterrani (Alvarez-Pellitero 2004).

L'impacte sanitari i econòmic de les parasitosis en els peixos cultivats és variable. En alguns casos, causen alteracions funcionals dels òrgans parasitats que poden produir efectes negatius en els índexs productius i/o reproductius. En altres casos poden afectar la resistència a altres factors estressants (biòtics o abiòtics) o el comportament dels peixos afectats. Finalment, hi ha parasitosis que produeixen grans mortalitats i poden provocar l'abandonament de determinats cultius. Aquest seria el cas de l'abandonament del cultiu de la morruda en diverses zones geogràfiques del Mediterrani provocada per les infeccions recurrents del mixozou *Enteromyxum leei* (Fioravanti i col. 2006).

Els espàrids han demostrat ser susceptibles a una gran varietat de paràsits (Taula 1.2) entre els quals destaquen, per la seva patogeneïtat, els protozous ectoparàsits com *Ichthyobodo necator* i *Amyloodinium ocellatum*, els mixozous i els monogenis microcotílids (Alvarez-Pellitero 2004).

Taula 1.2. Principals parasitosis que afecten al cultiu d'espàrids al Mediterrani. S'han assenyalat els més patogènics amb un asterisc (*).

Paràsit	Localització	Hoste/s	Referències
PROTOZOUS ECTOPARÀSITS			
CILIATS			
<i>Trichodina</i>	Pell i brànquies	<i>Sparus aurata</i>	Alvarez-Pellitero i col. 1995
<i>Cryptocaryon</i>	Pell i brànquia	<i>Sparus aurata</i>	Alvarez-Pellitero i col. 1995

Taula 1.2. (continuació) Principals parasitosis que afecten al cultiu d'espàrids al Mediterrani. S'han assenyalat els més patogènics amb un asterisc (*).

Paràsit	Localització	Hoste/s	Referències
PROTOZOUS ECTOPARÀSITS			
DINOFLAGELATS			
* <i>Amyloodinium</i>	Pell i brànquies	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i> <i>Pagellus bogaraveo</i>	Alvarez-Pellitero i col. 1995 Mladineo 2005 Mladineo 2005
FLAGELATS			
* <i>Ichthyobodo</i>	Pell i brànquia	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i>	Alvarez-Pellitero i col. 1995 Alvarez-Pellitero 2004
<i>Cryptobia</i>	Brànquia	<i>Sparus aurata</i>	Diamant 1990
PROTOZOUS ENDOPARÀSITS			
COCCIDIS			
<i>Eimeria</i>	Intestí	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i>	Alvarez-Pellitero i col. 1995 Athanasopoulou i col. 1999
<i>Goussia sparis</i>	Intestí	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i>	Sitjà-Bobadilla i col. 1996 Alvarez-Pellitero 2004
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Estómac	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i>	Alvarez-Pellitero i Sitjà-Bobadilla 2002 Alvarez-Pellitero 2004
MICROSPORIDIS			
<i>Glugea</i>	Múscul	<i>Sparus aurata</i>	Mathieu-Daude i col. 1992
<i>Pleistophora sp.</i>	Múscul	<i>Sparus aurata</i>	Athanasopoulou 1998
MIXOZOUS			
* <i>Enteromyxum leei</i>	Intestí	<i>Diplodus puntazzo</i> <i>Sparus aurata</i> <i>Pagrus pagrus</i> <i>Pagrus major</i> <i>Pagellus bogaraveo</i>	Le Breton i Marques 1995 Diamant 1992 Diamant 1995 Le Breton i Marques 1995 Marino i col. 2004
<i>Polysporoplasma sparis</i>	Ronyó	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i>	Palenzuela i col. 1999 Rigos i col. 1999
<i>Leptotheca sparidarum</i>	Ronyó	<i>Sparus aurata</i> <i>Dentex dentex</i>	Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 2001 Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 2001
<i>Ceratomyxa diplodae</i>	Vesícula biliar	<i>Diplodus puntazzo</i> <i>Dentex dentex</i> <i>Pagellus bogaraveo</i>	Merella i col. 2005 Rigos i col. 1999 Mladineo 2005
<i>C. sparusaurati</i>	Vesícula biliar	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus puntazzo</i>	Sitjà-Bobadilla i col. 1995 Rigos i col. 1999
<i>Kudoa sp</i>	Ronyó Múscul	<i>Sparus aurata</i> <i>Diplodus sargus</i>	Alvarez-Pellitero i Sitjà-Bobadilla 1993 Golomazou i col. 2006a

Taula 1.2. (continuació) Principals parasitosis que afecten al cultiu d'espàrids al Mediterrani. S'han assenyalat els més patogènics amb un asterisc (*).

Paràsit	Localització	Hoste/s	Referències
MIXOZOUS			
<i>Myxobolus sp.</i>	Ronyó	<i>Diplodus puntazzo</i>	Athanassopoulou i col. 2004
	Ronyó	<i>Diplodus sargus</i>	Golomazou i col. 2006a
<i>Henneguya spp.</i>	Cor	<i>Sparus aurata</i>	Caffara i col. 2003
MONOGENEA			
* <i>Sparycotyle chrisophrii</i>	Brànquia	<i>Sparus aurata</i>	Fioravanti i col. 2006
		<i>Diplodus puntazzo</i>	Athanassopoulou i col. 1999
		<i>Diplodus sargus</i>	Golomazou i col. 2006a
<i>Lamellodiscus</i>	Brànquia	<i>Diplodus puntazzo</i>	Athanassopoulou i col. 1999
<i>Furnestinia</i>	Brànquia	<i>Sparus aurata</i>	Fioravanti i col. 2006
		<i>Diplodus puntazzo</i>	Fioravanti i col. 2006
		<i>Diplodus sargus</i>	Golomazou i col. 2006a
DIGENEA			
Sanguinicolidae	Sistema circulatori	<i>Sparus aurata</i>	Padrós i col. 2001 Fioravanti i col. 2006
Cardicola aurata	Sistema circulatori	<i>Sparus aurata</i>	Holzer i col. 2008
COPEPODA			
<i>Caligus minimus</i>	Pell	<i>Diplodus puntazzo</i>	Mladineo 2005
ISOPODA			
<i>Ceratothoa parallela</i>	Cavitat bucal Cavitat branquial	<i>Sparus aurata</i>	Papapanagiotou i Trilles 2001
<i>Ceratothoa oestroides</i>	Cavitat bucal	<i>Sparus aurata</i>	Mladineo 2003
		<i>Diplodus annularis</i>	Mladineo 2003

Tal i com es pot observar a la taula anterior (Taula 1.2), els mixozous és un dels grups de paràsits més importants que afecten als espàrids del Mediterrani. La importància d'aquest grup no només és deguda al nombre d'espècies, sinó també a l'ampli ventall d'espècies que poden afectar i a la diversitat d'òrgans i teixits que poden parasitar. En ocasions, les infeccions per mixozous es produeixen de manera ocasional o bé no provoquen cap problema greu en les produccions d'espàrids; altres vegades són els agents causants de brots aguts o de mixosporidiosis cròniques que causen abundants pèrdues econòmiques als productors d'aquestes espècies.

1.5. Els mixozous

1.5.1. Aspectes generals

Els mixozous són un grup de metazous paràsits de vertebrats i d'invertebrats coneguts per les malalties que produeixen en peixos d'interès comercial. Aquests mixozous (els que provoquen malalties en peixos d'interès comercial), només representen una petita fracció de les de 2.182 espècies descrites fins al moment (Lom i Dyková 2006). Aquest grup de metazous es caracteritza per la formació d'espores multicel·lulars que estan formades per 1 a 7 valves, un o més elements infectius o esporoplasmes i una o més càpsules polars (Fig.1.5). Les càpsules polars són l'òrganul més característic d'aquest grup. Es tracta d'estructures que contenen un filament polar enrotllat en espiral que, en entrar en contacte amb l'hoste, s'evagina i fixa l'espore, permetent la penetració de l'esporoplasma dins seu.

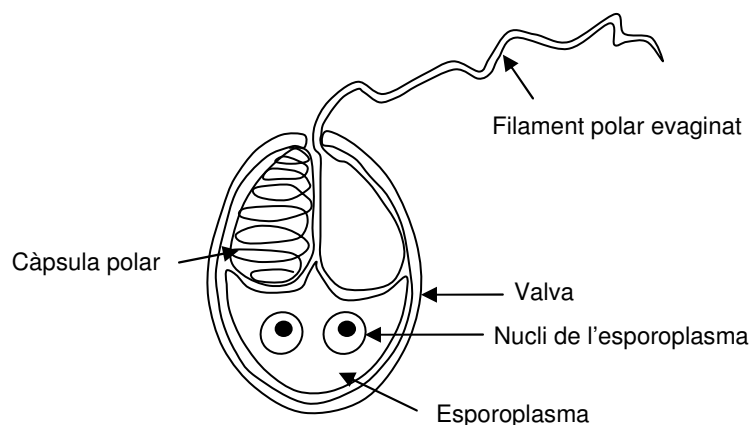


Fig.1.5. Dibuix esquemàtic d'una mixospora d'un mixozou.

1.5.2. Relacions filogenètiques i classificació

Els mixozous no només han despertat l'interès científic per les malalties que provoquen, sinó que durant molts anys la seva posició filogenètica ha estat motiu d'una gran controvèrsia. Així, els mixozous van ser considerats protozous fins que l'any 1994 els estudis de Smothers i col. amb la subunitat petita de l'ADN ribosòmic (18S rDNA) van permetre afirmar que els mixozous eren en realitat metazous. La seva afiliació als cnidaris o als animals bilaterals també ha estat motiu de debat. D'una banda, el descobriment de *Buddenbrockia plumatellae* (un mixozou amb simetria bilateral) i els estudis amb els gens *Hox* dels mixozous apuntaven a que els mixozous eren metazous bilaterals altament modificats (Monteiro i col. 2002). Recentment, un altre estudi realitzat amb *B. plumatellae* torna a posar en dubte aquesta hipòtesi i sosté que els mixozous són cnidaris (Jiménez-Guri i col. 2007).

Fins fa relativament pocs anys, la classificació dels mixozous es basava principalment en la morfologia de l'espore, tot i que, ocasionalment, també en l'hoste i el teixit afectat. Actualment, nombrosos estudis que empren la subunitat 18S rDNA han demostrat que aquesta classificació basada en la morfologia de l'espore no és consistent amb les relacions filogenètiques del grup, ja que poden produir-se fenòmens de convergència evolutiva que provoquin similituds entre espècies (Fiala 2006). La darrera classificació del grup divideix els mixozous en 2 classes que es diferencien pel tipus d'hoste definitiu (Taula 1.3).

Taula 1.3. Classificació dels mixosporidis (Canning i Okamura 2004).

Phylum Myxozoa (Grassé 1970)
Classe Myxosporea (Bütschli 1881)
Ordre Bivalvulida (Schulman 1959)
Subordre Sphaeromyxina (Lom i Noble 1984)
Subordre Variisporina (Lom i Noble 1984)
Subordre Platysporina (Kudo 1919)
Ordre Multivalvulida (Schulman 1959)
Classe Malacosporea (Canning, Curry, Feist, Longshaw i Okamura 2000)
Ordre Malacovalvulida (Canning, Curry, Feist, Longshaw i Okamura 2000)
Família Saccosporidae (Canning, Okamura i Curry 1996)

1.5.3. Aspectes morfològics. Cicle de vida i desenvolupament

1.5.3.1. Classe Malacosporea

Dins la classe Malacosporea trobem dues espècies paràsites de briozous d'aigua dolça: *Buddenbrockia plumatellae* i *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Les fases vegetatives o tròfiques d'aquestes espècies es desenvolupen en la cavitat del cos del seu hoste i presenten una gran complexitat estructural. *B. plumatellae* presenta un cos vermiforme format per una capa externa cel·lular, una capa intermitja de musculatura longitudinal i una capa interna cel·lular a partir de la qual es diferencien les espores o malacospores. Les formes vegetatives de *T. bryosalmonae* tenen forma de sac i estan formades per dues capes, la més interna conté les cèl·lules que formaran les malacospores. En ambdues espècies les cèl·lules precursoras de les espores pateixen

una meiosi i donen lloc a grups de 10 cèl·lules que es diferencien en 4 valves que envolten 4 cèl·lules capsulogèniques i dos esporoplasmes. Tot i que el coneixement del cicle de vida d'aquest grup és encara força desconegut, *T. bryosalmonae* s'ha trobat també parasitant el lluci (*Esox lucius*) i diverses espècies de salmònids. En els seus hosts vertebrats *T. bryosalmonae* provoca una malaltia coneguda com a PKD (o malaltia proliferativa del ronyó) que consisteix en una reacció inflamatòria greu provocada per la presència dels trofozoïts del paràsit al ronyó.

1.5.3.2. Classe Myxosporea

Dins la classe Myxosporea trobem la gran majoria de mixozous descrits fins al moment. Es tracta de paràsits amb dues fases de vida, la primera d'elles o fase mixospora és una fase proliferativa que acaba amb la formació de mixospores en un hoste vertebrat (o intermediari). Típicament, aquest hoste intermediari és un peix, tot i que a vegades s'han trobat en amfibis, rèptils, aus i mamífers (Jacobson 2007, Prunescu i col. 2007, Bartholomew i col. 2008). La segona fase o fase actinospora és la fase en què es produeixen processos sexuals i acaba amb la formació d'actinospores en un hoste invertebrat (o definitiu), generalment un anèl·lid i rarament un sipuncúlid (Ikeda 1912). Aquest cicle de vida en dues fases va ser descrit per primera vegada per Wolf i Markiw (1984) en l'espècie *Myxobolus cerebralis*, l'agent causant del "whirling disease" als salmònids. Els seus estudis van demostrar que les mixospores de *M. cerebralis* no eren infectives pels salmònids, sinó que només ho eren per un anèl·lid oligoquet (*Tubifex tubifex*) en el tub digestiu del qual es desenvolupaven les actinospores que, un cop alliberades al medi, eren infectives pels salmònids. S'han descrit cicles de vida similars en més de 25 espècies de mixosporidis d'aigua dolça (Kent i col. 2001) i, més recentment, en tres mixosporidis marins (Køie 2004, Køie i col. 2007, Køie i col. 2008). A més d'aquest cicle de vida en que hi participen dos hosts, s'ha demostrat que les espècies del gènere *Enteromyxum* són capaces de transmetre's horitzontalment d'un peix a un altre sense necessitat de desenvolupar-se en un hoste invertebrat (Diamant 1997).

Les formes vegetatives o tròfiques dels mixosporidis dins del seu hoste intermediari presenten una estructura típica de cèl·lula dins de cèl·lula que consisteix en la formació endògena de cèl·lules (cèl·lules secundàries) que persisteixen dins de les cèl·lules mare (cèl·lules primàries). Aquesta estructura pot produir-se fins a nivell quaternari generant cèl·lules terciàries (a l'interior de cèl·lules secundàries) i cèl·lules quaternàries (a l'interior de cèl·lules terciàries). Aquests estadis vegetatius són celozoics quan es troben flotant o fixats al lumen d'òrgans (com la vesícula biliar) i conductes (com els túbuls renals) o histozoics quan es troben intratissularment. Aquestes formes

vegetatives es poden trobar o no en el mateix teixit on es produeix l'esperogènesi. En el moment de l'esperogènesi, els trofozoïts de les espècies polispòriques (que formen diverses espores) formen plasmodis i el de les espècies monospòriques o dispòriques (que formen una o dos espores) formen pseudoplasmodis.

Els plasmodis estan constituïts per diversos nuclis vegetatius i diverses cèl·lules secundàries. La unió de dues d'aquestes cèl·lules secundàries forma una estructura anomenada pansporoblast en què una de les cèl·lules (perícit) envolta l'altra (cèl·lula esporogènica). A través de successives divisions, la cèl·lula esporogènica dona lloc a un esporoblast format per les cèl·lules valvogèniques, les cèl·lules capsulogèniques i els esporoplasmes que posteriorment donaran lloc a l'espore (Fig.1.6).

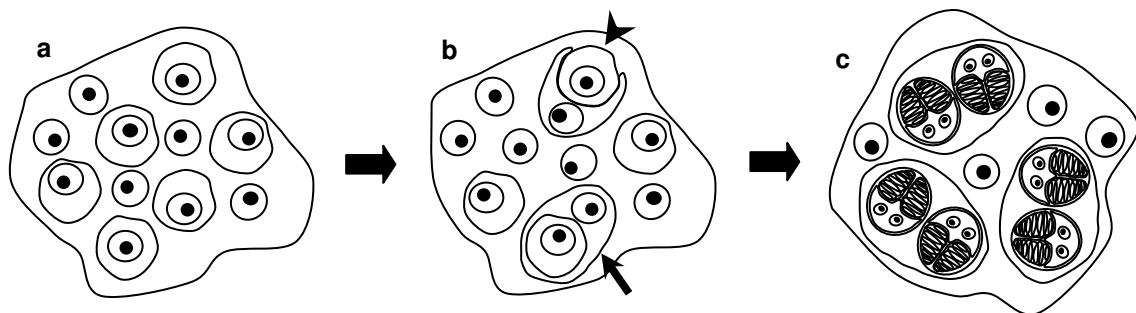


Fig.1.6. Dibuix esquemàtic de la seqüència de desenvolupament d'un plasmodi. **a.** Plasmodi amb diverses cèl·lules secundàries i nuclis vegetatius. **b.** Plasmodi amb diversos nuclis vegetatius, un pansporoblast en formació (punta de fletxa) i un pansporoblast format (fletxa). **c.** Plasmodi amb diversos nuclis vegetatius i espores madures.

Els pseudoplasmodis són més petits i estan constituïts per un nucli vegetatiu i diverses cèl·lules secundàries. En aquest cas no es forma pansporoblast i l'esporoblast es forma per reunió o per divisió endògena de cèl·lules secundàries (en aquest cas, les cèl·lules secundàries també poden anomenar-se esporogèniques) (Fig.1.7).

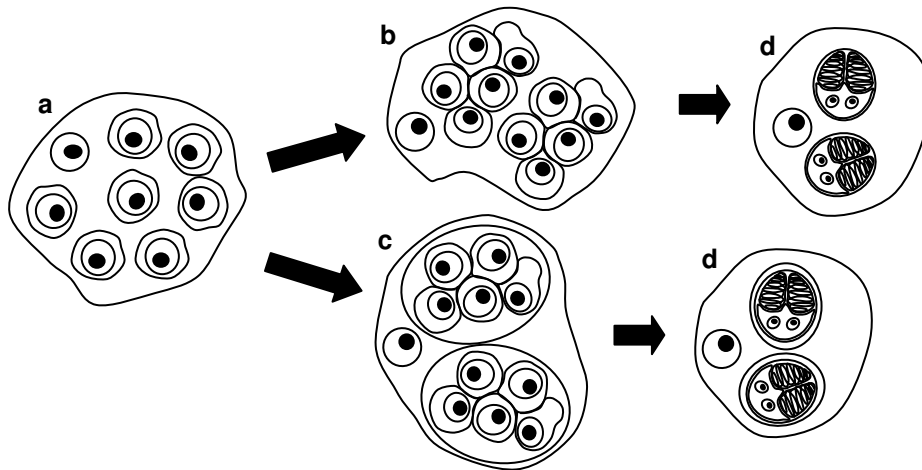


Fig.1.7. Dibuix esquemàtic de la seqüència de desenvolupament d'un pseudoplasmodi. **a.** Pseudoplasmodi amb un nucli i varies cèl·lules secundàries. **b.** Pseudoplasmodi amb un nucli i dos esporoblasts formats per la reunió de cèl·lules esporogèniques. **c.** Pseudoplasmodi format per un nucli i dos esporoblasts formats per la divisió endògena de dues cèl·lules esporogèniques. **d.** Pseudoplasmodi format per un nucli i dues espores.

Al final del procés, cada pansporoblast i pseudoplasmodi haurà format una o dues mixospores que són alliberades al medi després de la mort de l'hoste intermediari o a través dels seus fluids corporals.

Quan aquestes mixospores són ingerides per l'hoste definitiu, l'esporoplasma entra en una fase esquizogònica que consisteix en una sèrie de divisions nuclears i cel·lulars que acaba amb la formació d'estadis binucleats. Durant la gametogònia, aquests estadis es divideixen per formar un pansporocist jove format per 8 cèl·lules somàtiques que envolten 8 parells de cèl·lules generatives α i β o gametòcits diploids. Aquests últims pateixen una divisió meiòtica que formarà 8 parells de gametòcits haploids i 16 cossos polars. Els gametòcits α s'uneixen amb els β per formar 8 zigots. Aquests zigots experimentaran una sèrie de divisions i diferenciacions (esporogènesi) que acabarà amb la formació de 8 actinospores que es caracteritzen per presentar tres càpsules polars, tres valves amb projeccions caudals i un esporoplasma amb molts nuclis i molts estadis infectius (Kent i col. 2001).

1.6. El gènere *Enteromyxum* i les enteromixosis en peixos cultivats

Les espècies del gènere *Enteromyxum* (Palenzuela, Redondo i Alvarez-Pellitero 2002) formen un grup monofilètic de mixozous marins entèrics (Palenzuela i col. 2002, Yanagida i col. 2004). Les espècies d'aquest gènere es caracteritzen per presentar espores en forma de mitja lluna i dues càpsules polars grans que es van estrenyent

cap a l'extrem distal i s'obren al final de l'espora. Les espores es desenvolupen en pseudoplasmodis dispòrics i posseeixen un esporoplasma binucleat (Palenzuela i col. 2002).

Aquest gènere inclou 3 espècies: *E. fugu*, *E. leei* i *E. scopthalmi*, totes elles paràsites de l'epiteli del tracte digestiu de peixos marins. En totes les espècies del gènere s'ha demostrat experimentalment la capacitat de transmissió horitzontal d'un peix a un altre sense necessitat de completar el seu cicle en un hoste invertebrat o definitiu (Diamant 1997, Redondo i col. 2002, Yasuda i col. 2002).

Enteromyxum fugu és l'única de les tres espècies celozoica i no ocasiona canvis patològics importants al seu hoste, el peix globus *Takifugu rubripes* (Tun i col. 2002). Tot i això, sol trobar-se en infeccions mixtes amb *E. leei* en una malaltia anomenada "emanciation disease" que afecta al peix globus cultivat al Japó. Aquesta malaltia provoca l'anorèxia, l'aprimament extrem (emanciació) i a la llarga, la mort dels peixos afectats (Tun i col. 2000).

A diferència d'*E. fugu*, *E. scopthalmi* al turbot *P. maxima* (Branson i col. 1999) i *E. leei* als espàrids són considerades les espècies de mixozous més patogèniques (Midtlyng i col. 2006) d'aquest gènere. Es tracta de dues espècies histozoiques que, normalment, causen una enteritis aguda, caquèxia i mort dels peixos susceptibles.

1.6.1 *Enteromyxum leei*: agent causant de l'enteromixosi en l'orada i altres espàrids d'interès comercial

Com la resta d'espècies del gènere *Enteromyxum*, les espores d'*E. leei* presenten forma de mitja lluna amb les càpsules polars piriformes i grans (Fig.1.8). Aquestes càpsules es troben formant un angle aproximat de 90° i descarreguen el filament polar a un sol costat de l'espora en relació a un pla longitudinal que la divideix en una part superior i una altra inferior. A l'interior de les càpsules polars hi ha unes 7 voltes (entre 6 i 8) del filament polar. Presenten un esporoplasma binucleat en forma de rellotge de sorra i un gran vacúol al seu interior (Diamant i col. 1994).

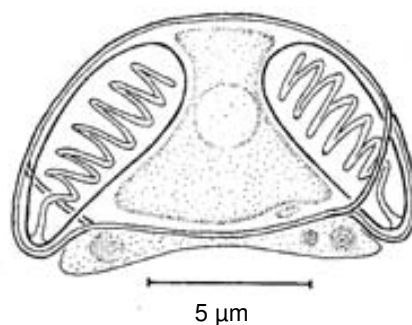


Fig.1.8. Espora d'*Enteromyxum leei* (Diamant i col. 1994).

Aquest paràsit va trobar-se per primer cop associat a mortalitats en tancs de cultiu d'orada al sud de Xipre (Diamant 1995). Posteriorment, s'ha anat trobant associat a morbiditats i mortalitats d'orada i altres espèrids com la morruda o el besuc a Grècia (Le Breton i Marques 1995, Athanassopoulou i col. 1999, Rigos i col. 1999), França (Sakiti i col. 1996), Itàlia (Pattono i col. 1997, Marino i col. 2004), Espanya (Alvarez-Pellitero i Sitjà-Bobadilla 1993) i Turquia. Actualment, els principals països afectats són Israel, Grècia, França, Itàlia i Espanya (Midtlyng i col. 2006). La baixa especificitat que caracteritza aquesta espècie fa que, fins al moment, s'hagi descrit en més de 45 espècies del Mediterrani, el Mar Roig i el Pacífic (Diamant 1998, Paperna 1998, Padrós i col. 2001, Renaud i col. 2004, Yanagida i col. 2004, Yasuda i col. 2005, Diamant i col. 2006). Dins d'aquest ampli ventall d'hostes, n'hi ha que presenten una major susceptibilitat com els blènids i els làbrids (Padrós i col. 2001), i fins i tot, dins de la mateixa espècie, hi ha estocs més susceptibles a la malaltia que altres (Sitjà-Bobadilla i col. 2007).

Els peixos afectats per aquest paràsit, presenten un aprimament extrem i l'abdomen inflat. En ser necropsiats, l'intestí apareix amb les parets engruixides, inflat i ocasionalment, hemorràgic. Aquesta simptomatologia és deguda a una enteritis crònica produïda per la presència d'un gran nombre de paràsits entre les cèl·lules de la mucosa intestinal. Els estadis de desenvolupament del paràsit alteren l'arquitectura de la mucosa i, fins i tot, poden produir la descamació de les cèl·lules epitelials. Tot i que a vegades no es produeix cap reacció per part de l'hoste (Diamant 1992, Diamant 1998), la submucosa pot aparèixer inflamada, congestionada i hemorràgica (Padrós i col. 2001). A més de l'intestí i en parasitacions massives, el paràsit s'ha observat a la bufeta urinària (Diamant i col. 1994) i a la vesícula biliar (Cuadrado i col. 2008). El diagnòstic de la malaltia es pot realitzar mitjançant l'observació d'estadis del paràsit en mostres en fresc d'intestí i de vesícula biliar, mitjançant un estudi histopatològic o bé mitjançant mètodes de diagnòstic molecular que permeten la detecció del paràsit en mostres no letals (Palenzuela i col. 2004).

2. OBJECTIUS

Enteromyxum leei és un dels patògens més importants per l'aqüicultura al Mediterrani tant a nivell sanitari com econòmic. Això és degut, en primer lloc, a la susceptibilitat que presenten algunes espècies d'interès per l'aqüicultura al Mediterrani i al Mar Roig (com els espàrids, els mugílids i els esciaènids). En segon lloc, el seu control és difícil degut a la seva capacitat de transmissió horitzontal, degut a la susceptibilitat per part de famílies força comunes en els sistemes sublitorals mediterranis (Padrós i col. 2001) que podrien actuar com a reservori de la malaltia, i degut al desconeixement del seu cicle de vida i a la falta d'estudis sobre el seu tractament i prevenció (Yokoyama i Shirakashi 2007).

En aquest context es va plantejar el projecte europeu d'investigació *MyxFishControl: Diagnosis, epidemiology and control of an enteric myxosporosis of commercial Mediterranean fish* (QLRT-2001-00722) coordinat pel grup de patologia de peixos de l'Institut de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS, CSIC) i en el qual participaven diversos grups d'investigació a Espanya, Grècia, França i Israel i entre els quals s'hi trobava el grup de patologia de peixos de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). L'objectiu d'aquest projecte era avaluar la situació de la malaltia en els cultius d'espàrids al Mediterrani per tal de desenvolupar mesures de prevenció i control. Els objectius específics d'aquest projecte europeu eren, entre altres:

- La validació d'un test de PCR pel diagnòstic específic del paràsit, incloent tècniques d'obtenció de mostres no letals pel peix.
- L'aplicació d'aquest test de PCR en estudis epidemiològics en els que s'inclouïen diversos sistemes de cultiu d'espàrids en diferents països del Mediterrani.
- L'ús d'aquesta tècnica de PCR per avaluar el paper dels peixos salvatges i els invertebrats com a reservoris de la malaltia.
- L'estudi dels mecanismes involucrats en la transmissió, patogènia i desenvolupament del paràsit en el transcurs d'infeccions experimentals.
- L'estudi dels aspectes més importants de la resposta immunitària innata i adaptativa i l'ús d'aquesta informació en el desenvolupament de mesures d'immunoprofilaxi.

La present tesi doctoral s'emmarca dins d'un dels objectius del projecte europeu *MyxFishControl*, en concret, en l'estudi de la transmissió, patogènia i desenvolupament d'*E. leei* dins del seu hoste.

Els objectius de la present tesi doctoral són els següents:

- Estudi descriptiu al microscopi òptic i electrònic de transmissió de les diferents etapes del desenvolupament d'*E. leei* en l'orada (*Sparus aurata*) i la morruda (*Diplodus puntazzo*).
- Establiment d'un model de cicle de vida del paràsit en el peix basat en observacions del creixement i maduració dels seus estadis de desenvolupament.
- Estudi de l'establiment i progressió de la infecció per *E. leei* en diferents situacions experimentals que inclouen diferents mètodes d'infecció de l'hoste i diferents espècies i edats d'hoste.
- Estudi de les principals lesions produïdes per *E. leei* i de la resposta inflamatòria de l'hoste.
- Estudi de les rutes d'invasió i dels processos de dispersió del paràsit dins de l'hoste.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Material biològic

El material biològic amb el que s'ha realitzat la present tesi doctoral prové tant d'infeccions experimentals com de brots de la malaltia en medi natural.

3.1.1. Infeccions experimentals

Les infeccions experimentals que es descriuen a continuació es van realitzar a les instal·lacions i per personal de l'Institut de Acuicultura Torre de la Sal (IATS, CSIC) i del National Centre for Mariculture (NCM) en el marc del projecte europeu *MyxFishControl* (QLRT-2001-00722).

Les condicions experimentals de les infeccions realitzades a l'IATS van ser:

Infecció per cohabitació en orades (*Sparus aurata*) adultes (C1). Aquesta infecció es va dur a terme durant el període de gener a març de l'any 2003. El protocol per a la realització d'aquesta infecció fou dissenyat seguint el model de transmissió directe per cohabitació proposat per Diamant (1997). En un tanc amb peixos infectats per *Enteromyxum leei* (peixos donants) s'hi submergeix una gàbia amb peixos sans (peixos receptors). Aquest sistema permet la cohabitació entre els dos estocs sense que s'hi puguin produir fenòmens de depredació entre ells. En aquest cas, 98 orades receptores (orades R) (d'uns 125 g aproximadament) van cohabitar amb orades donants en una proporció receptor:donant de 3:1. Aquestes orades es van mantenir en un tanc de 500 L amb un flux continu d'aigua de mar natural filtrada amb filtres de sorra i escalfada a 19-20°C. Paral·lelament, es va mantenir un tanc amb 30 orades control (orades C).

Durant l'experiment es van realitzar 4 mostrejos en que es van sacrificar, mitjançant una sobredosi d'anestèsic (MS222), grups de 24 o 25 orades els dies 21, 42, 56 i 72 de cohabitació.

Infecció per ingestió en orades adultes (O1). Aquesta infecció es va dur a terme durant el mes d'abril de l'any 2003. El protocol per a la realització d'aquesta infecció fou dissenyat seguint el model d'infecció oral proposat per Diamant (1997). Segons aquest model, els peixos receptors són alimentats durant un període inicial de temps amb porcions d'intestí o del seu contingut que provenen de peixos infectats per *E. leei* (peixos donants). Passat aquest període, els peixos receptors se'ls alimenta amb pinso comercial. En aquest cas, es van sacrificar 10 orades donants de les que es van obtenir raspats de la mucosa intestinal. Aquests raspats es van homogeneïtzar i es van administrar per intubació mitjançant una cànula intraesofàgica a 29 orades

receptores (orades R) (d'aproximadament 125 g) durant 2 dies consecutius. Posteriorment, aquestes orades es van introduir en un tanc de 500 L amb un flux continu d'aigua de mar natural filtrada amb filtres de sorra i escalfada a 19-20°C. Durant la resta de l'experiment les orades receptores van ser alimentades amb pinso comercial. Paral·lelament, es va mantenir un tanc amb 8 orades control (orades C). Durant l'experiment es van realitzar dos mostrejors en que es van sacrificar, mitjançant una sobredosi d'anestèsic (MS222), 14 i 15 orades els dies 16 i 29 després de la ingestió (d.i) del paràsit, respectivament.

Tant en la infecció C1 com en la O1, les orades donants provenien d'una granja de cultiu espanyola que presentava infeccions naturals per *E. leei*.

El disseny experimental de les infeccions C1 i O1 va ser elaborat amb l'objectiu de validar un assaig de PCR que permetés el diagnòstic específic d'*E. leei*. Per aconseguir aquest objectiu es van avaluar els resultats obtinguts amb aquesta nova tècnica als obtinguts amb el diagnòstic histopatològic tradicional (*Gold Standard*). Com que els objectius de la present tesi doctoral eren diferents als objectius amb els que es van dissenyar aquestes infeccions experimentals, només es van estudiar el material biològic destinat al diagnòstic histopatològic.

Infecció per cohabitació en morrudes (*Diplodus puntazzo*) (C2) i orades juvenils (C3). Aquestes infeccions es va realitzar durant el període de maig a juliol de l'any 2005. El protocol per a la realització d'aquestes infeccions fou dissenyat seguint el model de transmissió directe per cohabitació proposat per Diamant (1997). L'experiment es va realitzar en un únic tanc de 500 L amb un flux continu d'aigua de mar natural filtrada amb filtres de sorra i escalfada a 19-20°C. Al tanc es van introduir 21 orades donants (500-1000 g), 15 de les quals havien donat positiu per *E. leei* (mitjançant una PCR no letal (Palenzuela i col. 2004)) dos mesos abans de començar l'experiència. Els peixos receptors van ser 84 juvenils de morruda (morrudes R) i 104 juvenils d'orada (orades R) d'uns 5 g (proporció receptor:donant, 4:1 i 5:1, respectivament) que van ser col·locats en gàbies independents i es van submergir al tanc d'experimentació.

Paral·lelament, es va mantenir un tanc control de 200 L en les mateixes condicions que el tanc de cohabitació (flux continu d'aigua de mar natural filtrada amb filtres de sorra i escalfada a 19-20°C) amb 14 morrudes (morrudes C) i 18 orades (orades C). Durant l'experiment es van realitzar 9 mostrejors en que es van sacrificar, mitjançant una sobredosi d'anestèsic (MS222), grups de 4 a 6 individus. En el cas de la morruda

(infecció C2), la presa de dades biomètriques i l'obtenció de mostres es va realitzar els dies 2, 4, 7, 10, 14, 24, 26, 31, 38 i 45 de cohabitació i, en el cas de l'orada (infecció C3), els dies 2, 4, 7, 14, 31, 45, 60, 77 i 89 de cohabitació. Pel que fa als controls, per a la morruda es van mostrejar grups de 6 individus els dies 0, 14 i 38 de cohabitació i 2 individus el dia 26 de cohabitació i per a l'orada es van mostrejar grups de 6 individus els dies 0, 45 i 89 de cohabitació.

Infecció per cohabitació i efluent d'orades adultes (C4). Aquesta infecció es va dur a terme durant el període d'agost de l'any 2003 a març de l'any 2004. Les mostres que es van obtenir d'aquesta infecció provenien d'un lot heterogeni d'orades que havia estat infectat per cohabitació i efluent. El protocol per a la realització d'aquests tipus d'infeccions fou dissenyat seguint el model de transmissió directe per cohabitació i efluent proposat per Diamant (1997). La infecció per efluent es produeix quan un tanc de peixos sans (o receptors) rep una canonada des d'un tanc amb peixos infectats (o donadors) de manera que els peixos receptors es veuen exposats contínuament a l'aigua contaminada dels peixos donadors. En aquest cas, les orades (177-522 g) es van mantenir en tancs de 200 i 500 L a una temperatura de 18-26°C. Es va realitzar un únic mostreig de 10 individus que ja havien donat positiu per *E. ictaluri* mitjançant PCR no letal (Palenzuela i col. 2004).

Les condicions experimentals de les infeccions realitzades al NCM van ser:

Infecció per cohabitació en orades adultes (C5). Aquesta infecció es va dur a terme durant el període de maig a juny de l'any 2003. El protocol per a la realització d'aquesta infecció fou dissenyat seguint el model de transmissió directe per cohabitació proposat per Diamant (1997). En aquest cas, 40 orades receptores (d'uns 10-20 g aproximadament) van cohabitar amb 6 orades donants (150-300 g) i 3 llobarros (de 50 g aproximadament). Aquestes orades es van mantenir en un tanc de 100 L amb un flux continu d'aigua de mar natural filtrada amb filtres de sorra a 21-24°C. Paral·lelament, es va mantenir un tanc amb un grup de 10 orades control que provenien del mateix estoc que les orades receptores.

Durant l'experiment es van realitzar 5 mostrejos en que es van sacrificar mitjançant una sobredosi d'anestèsic (oli de clau) grups de 5 orades receptores i 2 del grup control els dies 4, 8, 12, 20 i 28 de cohabitació.

Infecció per ingestió en orades adultes (O2). Aquesta infecció es va dur a terme durant el període de desembre a febrer de l'any 2003 i 2004. El protocol per a la

realització d'aquesta infecció fou dissenyat seguint el model d'infecció oral proposat per Diamant (1997). En aquest cas, un homogeneïtzat de raspat de la mucosa intestinal provinent d'orades infectades (250-450 g) va ser administrat per intubació mitjançant una cànula intraesofàgica a 105 orades (5-11 g) durant la primera setmana d'infecció. Després, les orades van ser alimentades amb pinso comercial. Aquestes orades es van mantenir en un tanc de 100 L amb un flux continu d'aigua de mar natural filtrada amb filtres de sorra a 21-24 °C. Paral·lelament, es va mantenir un tanc amb un grup de 20 orades control que provenien del mateix estoc que les orades receptores.

Durant l'experiment es van realitzar 10 mostres en que es van sacrificar mitjançant una sobredosi d'anestèsic (oli de clau) grups de 5 (només el dia 4 d.i) o 8 (resta de dies) orades, els dies 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 35, 42, 53 d.i.

3.1.2. Infecció en medi natural de morrudes (N1)

Durant el mes d'octubre de l'any 2005 es va detectar un brot d'enteromixosi en gàbies de morruda situades davant de les costes de Gandia (València) (38°53'N-39°05'N, 0°15'W-0°01'W). Aquestes morrudes provenien d'un lot de juvenils que havien estat importades d'un viver d'Itàlia lliure del paràsit. Un grup de 43 morrudes provinents de les gàbies de Gandia (pes mitjà 31,02 g; longitud mitjana 10,32 cm) van ser transportades fins a la Planta d'Aquaris de l'Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva (ICBiBE) a València. Les morrudes es van mantenir en aquestes instal·lacions fins que van ser sacrificades mitjançant una sobredosi d'anestèsic (Eugenol) per després prendre'n les dades biomètriques i les mostres necessàries pel seu posterior estudi.

3.2. Tècniques *post mortem*

3.2.1. Tècniques histològiques

3.2.1.1. Microscopi òptic

Es van processar pel seu estudi al microscopi òptic (MO) tots els individus sacrificats en les infeccions descrites a l'apartat 3.1.1 (p. 25). Els protocols de deshidratació, inclusió en parafina i tinció amb Hematoxilina i Eosina (HiE), Giemsa i d'Àcid Periòdic-reactiu de Schiff (PAS) són els mateixos en totes les mostres i es descriuen a l'Apèndix (p. 137-139). La composició i preparació dels diferents fixadors i colorants també es descriu a l'Apèndix (p. 137-139). La metodologia emprada en l'obtenció i fixació de les mostres de cada infecció es descriu a continuació.

Infeccions C1 i O1. Durant la necròpsia de les orades es van obtenir mostres del tracte digestiu i de la vesícula biliar. Aquestes mostres van ser fixades en formol tamponat al 10% durant 48 hores. Després de la fixació, es van obtenir vàries porcions d'uns 5 mm de gruix del tracte digestiu i de la vesícula biliar que van ser processades fins a la seva inclusió en parafina. Al final del procés, es van obtenir 2 blocs de parafina. Un dels blocs contenia seccions de la vesícula biliar, l'estómac, els cecs pilòrics i de 3 a 6 porcions de la meitat anterior de l'intestí. L'altre contenia unes 4 porcions d'intestí posterior i una porció de la interfase entre l'intestí posterior i el recte. Posteriorment, es van fer seccions de 4 µm de cadascun dels blocs que es van tenyir amb HiE i Giemsa.

Infeccions C2 i C3. En aquest cas, es van processar totes les morrudes de la infecció C2 exceptuant les sacrificades el dia 26 de cohabitació i totes les orades de la infecció C3. El paquet visceral d'aquests individus es va fixar en formol tamponat al 10% durant 48 hores. La reduïda mida del paquet visceral va permetre processar-lo tot junt i fer-ne un únic bloc de parafina. La resta del cos, incloent el ronyó, el cor i les brànquies es va fixar en líquid de Davidson. Després de 48 hores en líquid de Davidson, les mostres es van submergir en aigua destil·lada durant aproximadament una hora i mitja i finalment, es van transferir en alcohol al 70%. Posteriorment, el cor, el ronyó i les brànquies es van processar també fins a la seva inclusió en parafina. Un cop en parafina, les mostres es van tallar a 4 µm i després es van tenyir amb HiE i PAS. En el cas de les mostres de paquet visceral es van obtenir diversos talls a diferents profunditats (10 o 12 talls per bloc separats uns 40 µm).

Infeccions C5 i O2. Durant la necròpsia de les orades es van obtenir mostres del ronyó anterior, la melsa, el tracte digestiu i la vesícula biliar. Aquestes mostres van ser fixades en formol tamponat al 10%. Després de la fixació, es van obtenir vàries porcions del tracte digestiu: cecs pilòrics, intestí anterior, posterior i recte que es van processar per separat fins a la seva inclusió en parafina. Igualment, es van processar una o més seccions de la vesícula biliar, el ronyó anterior i la melsa. Posteriorment, es van fer seccions de 4 µm de cadascuna de les mostres que es van tenyir amb HiE i Giemsa.

Infecció N1. La necròpsia de les morrudes va permetre obtenir mostres del tracte intestinal, fetge, melsa i brànquia que van ser fixades en formol tamponat al 10%. El tracte digestiu va ser subdividit en 4 parts: la primera part incloïa l'estómac, els cecs pilòrics i 2 o 3 seccions de l'intestí anterior; la segona unes 3 o 4 seccions

d'intestí mig, la tercera unes 3 o 4 seccions de l'intestí posterior i la quarta una secció del recte. Totes les seccions tenien un gruix aproximat de 5 mm. Posteriorment, les mostres van ser processades fins a la seva inclusió en parafina (les mostres de brànquia van ser sotmeses a un procés de descalcificació previ en àcid fòrmic al 8%). De cada mostra se'n va obtenir talls de 4 µm que van ser tenyits amb HiE.

En tots els casos, les mostres en parafina es van tallar amb un micròtom (Microm HM330).

3.2.1.2. Microscopi electrònic de rastreig

Les mostres biològiques processades per a la seva observació al microscopi electrònic (ME) de rastreig provenen de la infecció C5. Durant la necròpsia de les orades es van obtenir mostres del tracte digestiu que va ser fixades en formol tamponat al 10%. Després del seu estudi al MO, el tracte digestiu d'alguns individus va ser seleccionat pel seu estudi al ME de rastreig. Les mostres de tracte digestiu dels individus escollits van ser processades fins a obtenir-ne diverses porcions d'uns 7-8 mm² de superfície. Aquestes porcions es van processar seguint el protocol descrit a l'Apèndix (p. 140).

3.2.1.3. Microscopi electrònic de transmissió

Les mostres biològiques processades pel seu estudi al ME de transmissió provenen de les infeccions C2, C4, C5 i O2. Tot i que es van fixar mostres de tots els individus, només es van acabar de processar aquelles que provenien d'individus en què s'havia observat *Enteromyxum leei*.

Infecció C2. Durant la necròpsia de les morrudes sacrificades el dia 26 de cohabitació es van obtenir petites porcions (d'aproximadament 1 mm³) del tracte digestiu (estómac, intestí anterior i intestí posterior), la vesícula biliar, el fetge, les brànquies, el cor, la melsa i el ronyó anterior. Aquestes mostres van ser fixades en glutaraldehid tamponat al 2,5% en tampó cacodilat sòdic (0,1M, pH=7,4) i es van processar fins a la seva inclusió en resina EPON (Apèndix, p. 141-142). Després del seu processament, es van obtenir talls semifins d'aproximadament 1 µm que es van tenyir amb blau de toluïdina a l'1% (Apèndix, p. 143). Posteriorment i quan es va considerar convenient, es van realitzar talls ultrafins (600-900 nm de gruix) que es van recollir en reixetes de coure. Els talls ultrafins van ser tenyits, primer, amb acetat d'uranil a l'1% en aigua destil·lada i després, amb citrat de plom (Apèndix, p. 143).

Infecció C4. Durant la necròpsia de les orades es van obtenir petites porcions (1 mm^3) de ronyó anterior, melsa i intestí (anterior, mig i posterior) que es van fixar en glutaraldehyd tamponat al 2,5% en tampó cacodilat sòdic (0,1M, pH=7,4). Un cop fixades, aquestes mostres es van processar fins a la seva inclusió en resina EPON. De cada mostra es van obtenir talls semifins d'aproximadament $1 \mu\text{m}$ que es van tenyir amb blau de toluïdina l'1%. Quan es va considerar convenient, es van realitzar talls ultrafins (600-900 nm de gruix) que es van recollir en reixetes de coure. Els talls ultrafins es van tenyir, primer amb acetat d'uranil a l'1% en aigua destil·lada i, després amb citrat de plom.

Infecció C5 i O2. Durant la necròpsia de les orades es van obtenir petites porcions (d'aproximadament 1 mm^3) de ronyó anterior, melsa, tracte digestiu (cecs pilòrics, intestí anterior, intestí posterior i recte) i vesícula biliar. Aquestes mostres es van fixar en glutaraldehyd tamponat al 3% en tampó cacodilat sòdic (0,1M, pH=7,4). Només es van processar fins a la seva inclusió en resina EPON les mostres de tracte digestiu. En aquest cas, es va realitzar una tinció "en bloc" amb acetat d'uranil a l'1% en alcohol de 70^º. Després del seu processament, es van obtenir talls semifins d'aproximadament $1 \mu\text{m}$ que es van tenyir amb blau de toluïdina a l'1%. Posteriorment i quan es va considerar convenient, es van realitzar talls ultrafins (600-900 nm de gruix) que es van recollir en reixetes de coure. Posteriorment, els talls ultrafins es van tenyir amb citrat de plom.

En tots els casos, les mostres en resina es van tallar amb un ultramicròtom (LKB 2188) mitjançant una ganiveta de diamant (Diatome).

**4. DESCRIPCIÓ DELS ESTADIS DE DESENVOLUPAMENT
D'*Enteromyxum leei* A L'ORADA (*Sparus aurata*) I A LA
MORRUDA (*Diplodus puntazzo*)**

4.1. INTRODUCCIÓ

Abans de l'ús generalitzat de les tècniques de biologia molecular en l'estudi dels mixozous, tota la informació de la que es disposava d'aquest grup de metazous es basava en observacions realitzades amb el microscopi òptic (MO) i electrònic (ME). Així, aspectes com la identificació a nivell específic o la classificació d'aquests paràsits es basaven en l'estudi de l'estructura i la morfologia de les seves espores. En els darrers anys, però, les tècniques de biologia molecular han adquirit una importància creixent ja que han esdevingut un gran complement a l'estudi morfològic tradicional, sobretot a nivell diagnòstic i taxonòmic (Fiala 2006, Holzer i col. 2006, Funk i col. 2007, True i col. 2009, entre altres).

Les tècniques de biologia molecular han demostrat tenir aplicacions molt importants en la identificació i filogènia d'aquests paràsits, tot i això, encara no són suficients per aclarir alguns aspectes estructurals i funcionals dels mixozous pels quals sí que són necessàries les tècniques de descripció morfològiques (MO i ME). En aquest sentit, destaquen els treballs d'El-Matbouli i col. (1995) i El-Matbouli i Hoffmann (1998), en què es descriuen tots els estadis de desenvolupament de *Myxobolus cerebraлис*, els treballs de Marques (1986), en què es descriu la sexualitat de la forma d'actinosporidi de *Neoactinomyxon eiseniellae* i els treballs sobre el desenvolupament de les estructures vermiformes i en sac en *Buddenbrockia plumatellae* i *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Canning i col. 2007, Morris i Adams 2007a, 2007b).

Tanmateix, els treballs en què es descriuen el creixement, la maduració o la relació amb l'hoste d'altres formes de desenvolupament diferents a l'espóra són escassos (Matos i col. 2005, Tadjari i col. 2005, Casal i col. 2007, Abdel-Ghaffar i col. 2008a, Abdel-Ghaffar i col. 2008b, Cuadrado i col. 2008, Redondo i col. 2008, entre altres).

Actualment, la informació morfològica i estructural del gènere *Enteromyxum* es limita a l'estudi descriptiu al MO i ME de transmissió (MET) dels estadis de desenvolupament d'*E. scophthalmi* al turbot (*Psetta maxima*) (Redondo 2005), a un estudi al MO d'*E. leei* a *Takifugu rubripes* (Tun i col. 2000) i a una descripció detallada de les espores d'*E. leei* (Diamant i col. 1994). Com que aquesta informació resulta insuficient, sobretot pel què fa a *E. leei*, en el present treball es pretén realitzar una descripció, mitjançant el MO i MET, dels principals estadis de desenvolupament d'*Enteromyxum leei* observats en orades (*Sparus aurata*) i en morrudes (*Diplodus puntazzo*). A més d'emprar les tècniques tradicionals d'estudi al MO i MET, s'han utilitzat tècniques citoquímiques complementàries com la detecció d'hidrats de carboni mitjançant la tinció de PAS i de Thiéry (Thiéry 1967) i la detecció de lípids mitjançant la tinció d'OTO (Seligman i col. 1966). A més, i en paral·lel a aquesta descripció, es proposa una

seqüència temporal del desenvolupament d'*E. ictaluri* basada en les observacions del creixement i la maduració dels seus estadis.

4.2. MATERIALS I MÈTODES

4.2.1. Material biològic

El material biològic amb què s'ha realitzat el present estudi prové de totes les infeccions experimentals i de la infecció en medi natural que s'expliquen amb detall a l'apartat 3.1. "Materials i mètodes. Material biològic" (p. 25-28). A més d'aquestes mostres, també es van poder estudiar mostres d'intestí mig, cedides per la Dra. Alvarez-Pellitero que provenien d'una orada moribunda. Aquesta orada havia estat infectada per l'efluent provinent d'un tanc amb peixos infectats a les instal·lacions de l'Institut de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS, CSIC) durant un període aproximat de 12 setmanes entre els mesos de desembre de 2002 a març de 2003. També es van poder estudiar mostres de la vesícula biliar provinents d'una morruda infectada cedides pel Dr. Diamant del National Center for Mariculture (NCM).

4.2.2. Tècniques *post mortem*

La metodologia emprada en el processament dels individus des del seu sacrifici fins a l'obtenció de preparacions per ser observades al MO i MET es detallen a l'apartat 3.2.1. "Materials i mètodes. Tècniques *post mortem*. Tècniques histològiques" (p. 28-31). Com es descriu en aquest apartat, les tincions emprades en l'observació dels talls histològics al MO van variar en funció de la infecció experimental considerada. Tots els talls es van tenyir amb Hematoxilina i Eosina (HiE). A més, els talls que provenien de les infeccions C1 i O1 es van tenyir amb Giemsa i els que provenien de les infeccions C2 i C3 es van tenyir amb Àcid Periòdic-reactiu de Schiff (PAS).

4.2.3. Estudis al microscopi òptic

Tal i com s'ha esmentat a l'apartat 2. "Objectius" (p. 19), el projecte europeu en què s'emmarcava la present tesi doctoral presentava uns objectius generals diferents als objectius concrets de la present tesi doctoral. Aquest és el motiu pel qual el disseny experimental emprat en cada infecció és lleugerament diferent i existeixen variacions en la selecció dels òrgans analitzats entre infeccions. En totes les infeccions es van estudiar mostres del tracte gastrointestinal (estómac, cecs pilòrics, intestí i recte), també es van poder observar talls histològics de vesícula biliar (en totes les infeccions excepte la infecció natural N1), de fetge (C2, C3 i N1), de ronyó anterior i melsa (C2–C5, O2 i N1), i també de brànquies (N1). Aquestes preparacions histològiques es van

observar en els microscopis *Leica DM 5000B* i *Olympus BSH2*. A més, es van captar imatges digitals mitjançant les càmeres *ProgRes C3* i *Leica DC 300* i els programes *ProgRes® CapturePro 2.1* (Jenoptik, Alemanya) i *IM50 v1.2*, respectivament.

Les preparacions en fresc de la infecció N1 es van observar en un microscopi *Leica DMR* de contrast de fases o Nomarski amb l'objectiu de 100 augments. Les imatges es van prendre mitjançant una càmera *Leica DC300*.

4.2.4. Estudis al microscopi electrònic de transmissió

Només es van processar pel seu estudi al MET les mostres de tracte intestinal (cecs pilòrics, intestí i recte) dels individus de les infeccions C4, C5 i O2 en què s'havia observat prèviament el paràsit en secció histològica. Com s'ha comentat anteriorment, aquestes mostres van ser processades seguint els protocols que es detallen a l'Apèndix (p. 141-142). En canvi, les mostres d'intestí mig cedides per la Dra. Pellitero i les de vesícula biliar cedides pel Dr. Diamant van ser processades fins a la seva inclusió en resina SPURR (mostres d'intestí mig) i resina EPON (mostres de vesícula biliar) en els laboratoris d'origen. Per tant, d'aquestes mostres només es van obtenir talls semifins d'aproximadament 1 µm que es van tenyir amb blau de toluïdina l'1%. Quan es va considerar convenient, es van realitzar talls ultrafins (600-900 nm de gruix) que es van recollir en reixetes de coure. Els talls ultrafins van ser tenyits, primer, amb acetat d'uranil a l'1% en aigua destil·lada i després, amb citrat de plom. Les mostres d'intestí mig, a més, es van estudiar des d'un punt de vista histoquímic. Per aquest motiu es van realitzar talls ultrafins que es van recollir en reixetes d'or. Posteriorment, es van tenyir mitjançant les tècniques d'OTO de tinció de lípids (Seligman i col. 1966) i de Thiéry de tinció de carbohidrats (Thiéry 1967).

Les seccions obtingudes es van observar en els microscopis *Hitachi H-7000*, *JEOL-EX II* i *JEOL 1010* a 75kV.

Les imatges digitals obtingudes al MO i al MET es van estudiar mitjançant el programari *UTHSCSA Image Tool 3.0*. Mitjançant aquest programari, es van poder prendre mides (llargada x amplada) dels estadis de desenvolupament d'*E. leei*.

4.3. RESULTATS

A continuació es descriuen, en ordre seqüencial, els estadis de desenvolupament d'*E. leei* al MO i MET. Els primers tres primers estadis formen part del que s'anomenen estadis inicials i de proliferació del paràsit, mentre que els dos darrers formen part dels estadis esporogènics o de formació de l'espóra.

4.3.1. Estadis inicials i de proliferació del paràsit

Es denominen estadis inicials i de proliferació cadascun dels estadis infectius inicials i trofozoïts. Aquests estadis es caracteritzen per representar els primers esglaons en la sèrie de divisions endògenes i/o divisions binàries que poden experimentar els mixozous i que els duen a la formació de la típica estructura de “cèl·lula dins d’una altra cèl·lula”. Seguint el criteri que l’aparició d’una nova cèl·lula interna representa un estadi més en la seqüència de creixement del paràsit, s’ha pogut establir una seqüència de tres estadis: un inicial (estadi 1) i dos de proliferació (estadi 2 i estadi 3). Durant la fase de proliferació del paràsit, les cèl·lules internes que van apareixent reben el nom de cèl·lules secundàries (o S) quan provenen de la divisió endògena d’una cèl·lula primària (o P) i cèl·lules terciàries (o T) quan provenen de la divisió endògena d’una cèl·lula S.

4.3.1.1. Estadi 1

Es denominen estadis inicials o ST1 les formes de desenvolupament que estan formades per una única cèl·lula (cèl·lula P) que pot contenir un o més nuclis (Fig.4.1). Es tracta d’estadis de mida petita (7,2 µm x 4,9 µm) que es situen entre les cèl·lules de la mucosa de l’intestí i dels cecs pilòrics i estan pròxims a la membrana basal. Al MO són difícils de diferenciar de la resta d’estadis de proliferació i de les pròpies cèl·lules que formen la mucosa intestinal ja que, sovint, ni els augments ni la resolució d’aquest microscopi permeten diferenciar clarament aquest estadi d’un estadi 2. Els estadis ST1 solen observar-se com a petits estadis ameboids amb un nucli basòfil en HiE i blau fosc en Giemsa. Al MET, aquests estadis es presenten com a petites cèl·lules de contorn irregular que contenen un o més nuclis amb un gran nuclèol i heterocromatina marginal (Fig.4.5a). Al seu citoplasma, s’hi troben algunes cisternes de reticle endoplasmàtic (RE), petits mitocondris, alguns vacúols i algunes gotes lipídiques.



Fig.4.1. Dibuix esquemàtic d’un estadi ST1 amb dos nuclis a l’interior d’una cèl·lula P.

4.3.1.2. Estadi 2

Es denominen estadis 2 o ST2 les formes vegetatives constituïdes per una cèl·lula P que conté, com a mínim, una cèl·lula S (Fig.4.2). Aquests estadis són, per tant, el resultat de la primera divisió interna que experimenten els estadis ST1 d’*E. leei*. En

general, es tracta d'estadis de mida variable en funció número de cèl·lules S que continguin (aproximadament mesuren 12,84 µm x 7,96 µm de mitjana) que també se situen entre les cèl·lules de l'intestí i dels cecs pilòrics. Al MO, apareixen formats per una cèl·lula P PAS positiva que engloba un conjunt variable de cèl·lules S PAS negatives (Fig.4.3a). El nucli de les cèl·lules S sol ocupar gran part del citoplasma i apareix tenyit de blau clar en tincions Giemsa (Fig.4.3b). Tot i que les cèl·lules S solen presentar-se en petits grups de 2 o més cèl·lules esfèriques, ocasionalment, s'han pogut observar cèl·lules S emetent projeccions citoplasmàtiques en direcció a una altra cèl·lula S (Fig.4.3b).

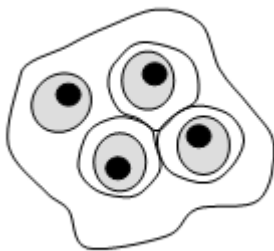


Fig.4.2. Dibuix esquemàtic d'un estadi ST2 amb un nucli i tres cèl·lules S a l'interior d'una cèl·lula P.

Al MET, aquests estadis apareixen formats per una cèl·lula P de contorn irregular, a l'interior de la qual es poden observar cèl·lules S, un o dos nuclis i pocs orgànuls. Els nuclis presenten les mateixes característiques que en els estadis ST1, és a dir, un gran nuclèol i heterocromatina marginal (Fig.4.5b i Fig.4.5d). Pel què fa als orgànuls, el citoplasma es troba majoritàriament ocupat per petits mitocondris, gotes lipídiques, petits vacúols i estructures semblants a vacúols però amb una única membrana que contenen una substància amorfa o multilaminar (Fig.4.5b)

Les cèl·lules S d'aquests estadis poden aparèixer envoltades d'una membrana vacuolar. En ocasions, s'han observat cèl·lules S o els seus nuclis en divisió (Fig.4.5c). El nucli de les cèl·lules S ocupa bona part del citoplasma i presenta un nuclèol prominent i heterocromatina marginal. Al seu citoplasma trobem petits mitocondris, algunes cisternes de RE rugós (REr), ribosomes i petits agregats de grànuls de β-glicogen dispersos pel citoplasma (Fig.4.5d). A més, en la membrana d'aquestes cèl·lules S també s'han pogut observar estructures d'unió o comunicació intercel·lular semblants a hemidesmosomes (Fig.4.5e) i semblants a desmosomes (Fig.4.5f)

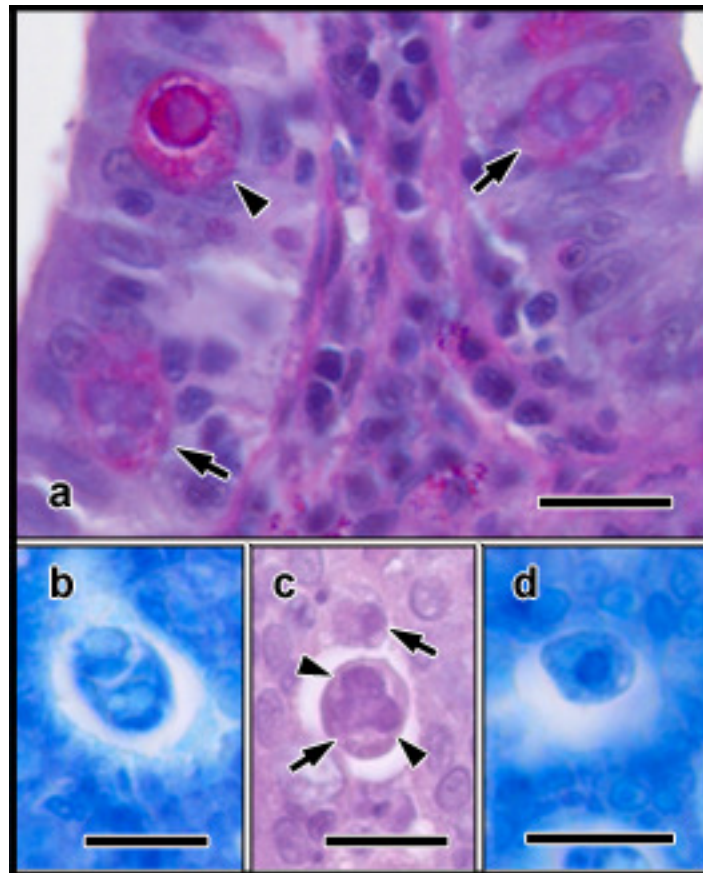


Fig.4.3. Imatges al MO d'estadis inicials i proliferatius d'*E. leei* a l'intestí de l'orada. **a.** Estadis ST2 (fletxes) i ST3 (punta de fletxa). Els estadis ST2 estan formats per una cèl·lula P amb un citoplasma PAS positiu i varies cèl·lules S PAS negatives. L'estadi ST3 està format per una cèl·lula P que conté una cèl·lula S amb una cèl·lula T i un citoplasma fortament PAS positiu. Tinció PAS. **b.** Estadi ST2 format per una cèl·lula P i dues cèl·lules S una de les quals emet projeccions citoplasmàtiques cap a l'altra. El nucli de les cèl·lules S apareix tenyit de color blau clar. Tinció Giemsa. **c.** Estadi ST3 format per una cèl·lula P, dues cèl·lules S (fletxes) a l'interior de les quals s'hi poden observar fins a 2 cèl·lules T (puntes de fletxa) i un nucli. Tinció HiE. **d.** Estadi ST3 format per una cèl·lula P que conté una cèl·lula S amb un nucli blau clar i una cèl·lula T blau fosc. Tinció Giemsa. *Barres* 10 μ m.

4.3.1.3. Estadi 3

Es denominen estadis 3 o ST3 els trofozoïts formats per una cèl·lula P que conté una o més cèl·lules S que, a la vegada, contenen una o més cèl·lules T (Fig.4.4). Aquests estadis, per tant, representen el segon i darrer esglaió en la sèrie de divisions internes que poden experimentar les formes vegetatives d'*E. leei*. Aquests estadis solen presentar una mida variable (de mitjana, 14,66 µm x 11,05 µm). Poden trobar-se entre les cèl·lules de la mucosa de l'intestí, dels cecs pilòrics i/o de la vesícula biliar i de manera ocasional, lliures al lumen d'aquests òrgans acompanyats de mucus i altres restes cel·lulars.

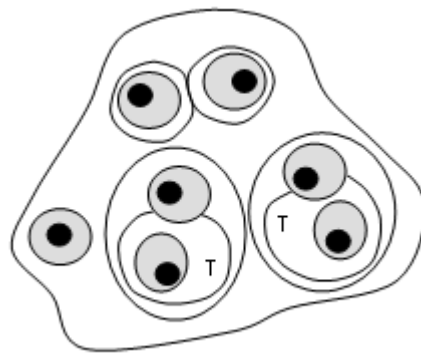
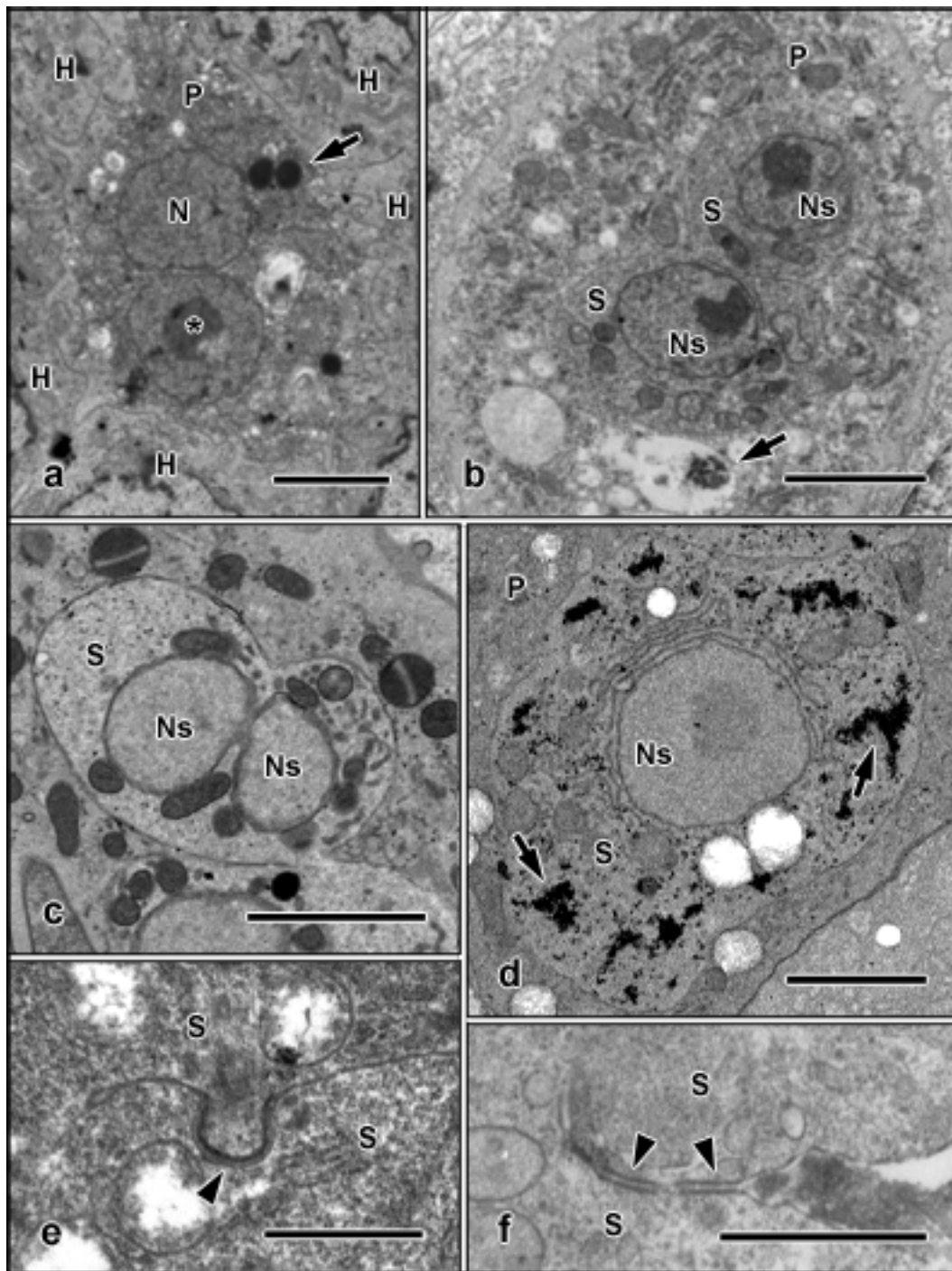


Fig.4.4. Dibuix esquemàtic d'un estadi ST3 amb un nucli i quatre cèl·lules S a l'interior d'una cèl·lula P. Dues de les cèl·lules S contenen una cèl·lula T.

Al MO, la cèl·lula P d'aquests estadis queda reduïda a una fina regió de citoplasma eosinòfila i PAS positiva que envolta un número variable de cèl·lules S (Fig.4.3a i Fig.4.3c). Es poden distingir dos tipus de cèl·lules S: el primer tipus és molt similar a les cèl·lules S dels estadis ST2 (d'uns 5 µm de diàmetre, una relació nucli:citoplasma gran i un citoplasma PAS negatiu). El segon tipus de cèl·lules S presenten una mida més gran (uns 7,6 µm de diàmetre), una relació nucli:citoplasma menor i un citoplasma fortament PAS positiu (Fig.4.3a, Fig.4.3c). Aquest últim tipus de cèl·lula S pot presentar un o dos nuclis que es tenyeixen de blau clar amb Giemsa (Fig.4.3d). Al seu interior trobem una o dos cèl·lules T que acostumen a trobar-se pròximes al nucli de la cèl·lula S i que es caracteritzen pel seu caràcter basòfil (Fig.4.3c) i per tenyir-se de blau fort amb Giemsa (Fig.4.3d).



Fig.4.5. Imatges al MET d'estadis inicials i proliferatius d'*E. leei* a l'intestí de morrudes (*Diplodus puntazzo*) (a) i d'orades (b-f). **a.** Estadi ST1 format per una cèl·lula P (P) que conté un parell de nuclis (N), alguns mitocondris i gotes lipídiques (fletxes). Un dels nuclis presenta un nuclèol marcat (*). H: enteròcits de l'hoste. **b.** Estadi ST2 format per una cèl·lula P que conté un parell de cèl·lules secundàries (S). El citoplasma de la cèl·lula P conté petits mitocondris, algunes cisternes de RE rugós i vacúols amb un contingut amorf (fletxa). Ns: nucli de la cèl·lula S. **c.** Detall de la divisió nuclear a l'interior d'una cèl·lula S d'un estadi ST2. **d.** Cèl·lula S d'un estadi ST2 on s'observen agrupacions de grànuls de β -glicogen al citoplasma (fletxes). Tinció de Thiéry. **e.** Detall d'una unió intercel·lular semblant a un hemidesmosoma (punta de fletxa) que s'estableix entre cèl·lules S en els estadis ST2. **f.** Detall d'una unió intercel·lular semblant a un desmosoma (puntes de fletxa) que s'estableix entre les cèl·lules S dels estadis ST2. *Barres:* 2 μ m (a-d), 1 μ m (e) i 500nm (f).



Al MET, tant l'estructura del nucli com la composició d'òrgànuls de la cèl·lula P quasi no varien en relació als estadis ST2. Tot i això, sí que es sol apreciar una disminució en les irregularitats de la membrana de la cèl·lula P i un augment del nombre d'estructures que contenen una substància amorfa o multilaminar al seu interior (Fig.4.6a). Al MET, també s'observen dos tipus de cèl·lules S. El primer tipus presenta les mateixes característiques que les cèl·lules S dels estadis ST2. El segon tipus de cèl·lules S contenen un o dos nuclis amb un nuclèol prominent i heterocromatina marginal. Al citoplasma trobem gran quantitat de grànuls Thiéry positius, algunes cisternes de REr i petits mitocondris (Fig.4.6b). A l'interior de les cèl·lules S, es poden observar una o dues cèl·lules T que poden aparèixer envoltades per una membrana vacuolar.

Les cèl·lules T solen situar-se pròximes al nucli de la cèl·lula S establint-s'hi un cert contacte però sense que mai s'hi hagi observat cap tipus d'unió entre la membrana de la cèl·lula T i la membrana nuclear del nucli de la cèl·lula S (Fig.4.6c). Les cèl·lules T es caracteritzen per presentar un citoplasma dens amb alguns mitocondris i gran quantitat de ribosomes. El seu nucli ocupa gran part de la cèl·lula i es caracteritza per presentar un nuclèol prominent i, a vegades, gran quantitat de cromatina condensada (Fig.4.6d).

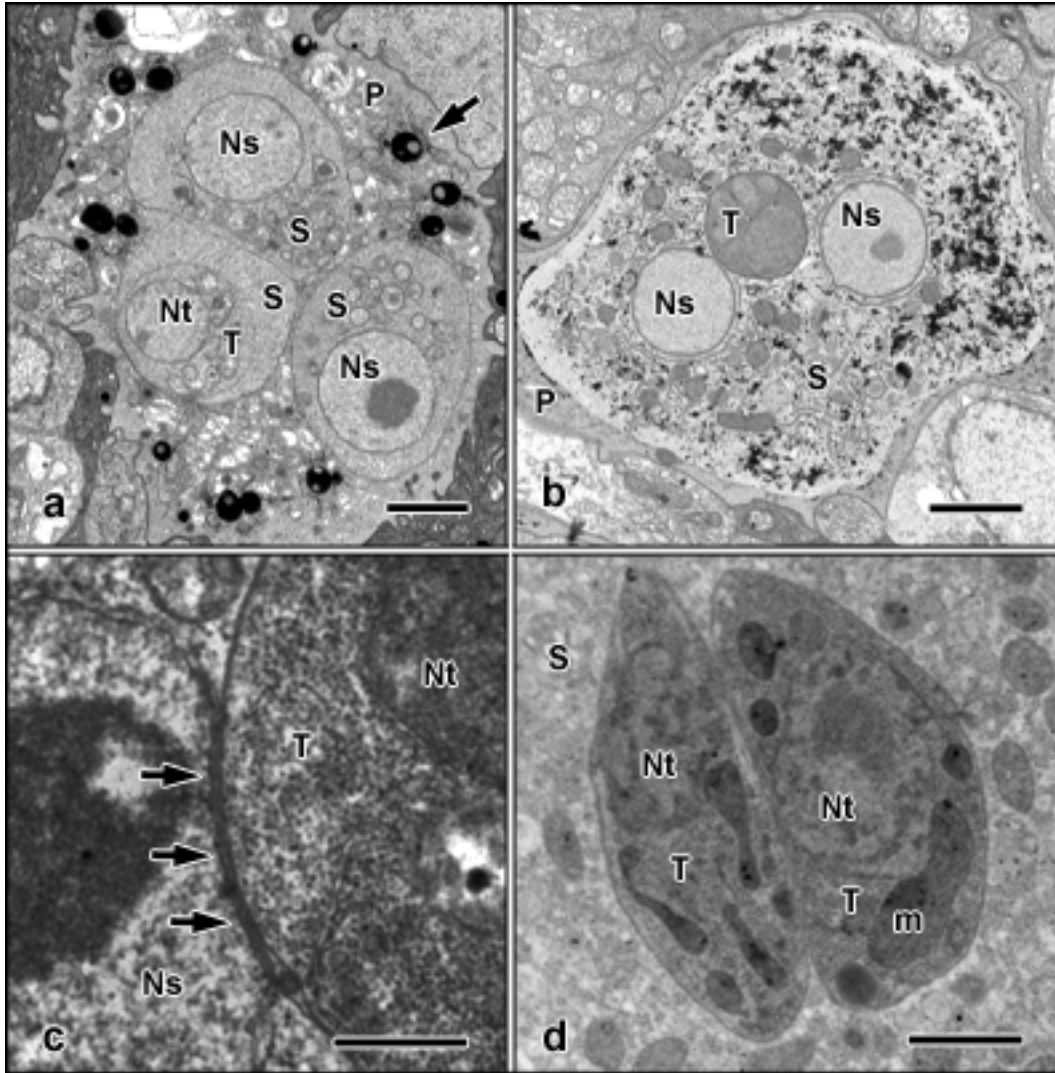


Fig.4.6. Imatges al MET d'alguns estadis de proliferació ST3 d'*E. leei* a l'intestí d'orades (a, b i d) i a la vesícula biliar de morrudes (c). **a.** Estadi format per una cèl·lula P (P) amb 3 cèl·lules S (S) una de les quals conté una cèl·lula T (T). El citoplasma de la cèl·lula P conté una gran quantitat de gotes lipídiques (fletxa) i de cossos multilaminars o amorfs. Ns: nuclis de la cèl·lula S i Nt: nuclis de la cèl·lula T. **b.** Detall d'una cèl·lula S on es poden observar un parell de nuclis i una cèl·lula T més densa. A més, s'hi poden distingir gran quantitat de petits mitocondris i grànuls de β -glicogen dispersos pel citoplasma. **c.** Detall de la zona de contacte (fletxes) entre el nucli d'una cèl·lula S i la membrana d'una cèl·lula T. **d.** Cèl·lules T a l'interior d'una cèl·lula S. Les cèl·lules T presenten una elevada densitat del citoplasma deguda a la gran quantitat de ribosomes. m: mitocondri. Barres: 2 μm (a i b), 1 μm (d) i 500 nm (c).

4.3.2. Estadis d'espogènesi

En el procés de formació de les espores o espogènesi s'han identificat dos tipus d'estadis: estadi 4 (ST4) i estadi 5 (ST5), que es diferencien en el grau de maduració i diferenciació dels components de l'esporeta.

4.3.2.1. Estadi 4

Es denominen estadis ST4 totes aquelles formes de desenvolupament caracteritzades per la presència de, com a mínim, un esporoblast i una o més cèl·lules acompanyants (Fig.4.7). L'esporoblast pot trobar-se en qualsevol estat de maduració, des d'un conjunt inicial de cèl·lules indiferenciades fins a la quasi formació de l'esporeta madura. En general, els estadis ST4 es troben entre les cèl·lules de la mucosa intestinal i dels cecs pilòrics i/o entre les cèl·lules de la mucosa de la vesícula biliar. En ocasions, poden trobar-se lliures al lumen d'aquests òrgans acompanyats de mucus i altres restes cel·lulars. Tenen una mida mitjana de 18,75 µm x 12,45 µm.

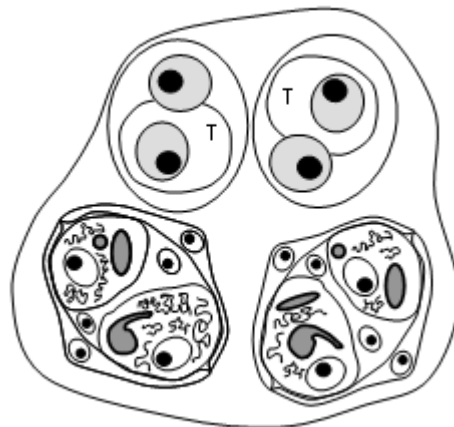


Fig.4.7. Dibuix esquemàtic d'un estadi ST4 amb dues cèl·lules S i dos esporoblasts en formació. Les cèl·lules S contenen una cèl·lula T al seu interior. Cada esporoblast està format per dues cèl·lules valvogèniques, dues capsulogèniques i un esporoplasma binucleat.

A l'inici de l'espogènesi els estadis ST4 estan formats per una cèl·lula P que conté dos tipus de cèl·lules S: les cèl·lules acompanyants i les cèl·lules espogèniques o de l'esporoblast (Fig.4.8a, Fig.4.8b, Fig.4.9a).

Dins dels estadis ST4 es solen trobar dues cèl·lules acompanyants que presenten una mida superior a les cèl·lules que formen els esporoblasts i unes característiques similars a les cèl·lules S dels estadis proliferatius ST3. Per tant, el seu tret més característic, tant si s'observen al MO com al MET, és la presència de, com a mínim,

una cèl·lula terciària (T) que, en la majoria de casos, es situa pròxima al nucli o nuclis de la cèl·lula S (Fig.4.8a). Al MO, les cèl·lules acompanyants solen presentar una gran quantitat de grànuls PAS positius i, en ocasions, presenten regions perifèriques acromàtiques pròximes a la membrana plasmàtica (Fig.4.8a). Al MET, el nucli d'aquestes cèl·lules presenta un nuclèol prominent i poca heterocromatina que es situa marginalment a prop de la membrana nuclear. El citoplasma està ocupat per ribosomes, algunes cisternes de RER, grànuls de glicogen, algunes gotes de lípids i mitocondris.

Al MO, les cèl·lules T de les cèl·lules acompanyants apareixen com una estructura fortament basòfila (HiE) que es tenyeix de blau fosc en tincions Giemsa (Fig.4.8b). Al MET, aquestes cèl·lules es caracteritzen per presentar un gran nucli heterocromatínic i un citoplasma ocupat per gran quantitat de ribosomes i alguns mitocondris.

La morfologia de les cèl·lules acompanyants es manté fins al final de l'esperogènesi. En canvi, les cèl·lules de l'esperoblast experimenten un procés de maduració que implica un canvi en la morfologia de les seves cèl·lules.

Al principi de l'esperogènesi, les cèl·lules de l'esperoblast es presenten formant 1 o 2 grups de cèl·lules inicialment indiferenciades (Fig.4.8a i Fig.4.8b). Al MO s'han pogut observar agrupacions de fins a 10 cèl·lules que es caracteritzen per la presència d'un gran nucli (amb un color blau clar en tincions Giemsa) (Fig.4.8b), per presentar un citoplasma més fosc (tincions Giemsa) que les cèl·lules acompanyants (Fig.4.8b) i per l'absència de reserves glucídiques en forma de grànuls PAS positius.

Al MET, només s'han pogut observar agrupacions de fins a 6 cèl·lules (Fig.4.9b). Ocasionalment, aquestes cèl·lules s'han observat envoltades d'una membrana vacuolar (Fig.4.9c). Aquestes cèl·lules es caracteritzen per la presència d'un gran nucli en el que freqüentment es pot observar un nuclèol ben diferenciat i excèntric. A més, al seu citoplasma es poden observar grans mitocondris i algunes cisternes de RER (Fig.4.9b).

Aquest conjunt inicial de cèl·lules es diferencien ben aviat en un parell de cèl·lules valvogèniques (CV), un parell de cèl·lules capsulogèniques (CC) i un esporoplasma (ES).

Al MO, només es distingeixen dos estadis de diferenciació de l'esperoblast i, per tant, dos tipus d'estadis ST4. Un primer estadi és aquell en què l'esperoblast està format per grups de 6 a 10 cèl·lules totalment indiferenciades. El segon estadi ST4 és aquell en què apareixen un o dos esperoblasts formats per 5 cèl·lules. Entre aquestes cèl·lules, hi podem observar o bé les càpsules polars en formació (molt eosinòfiles) o bé la disposició de les cèl·lules CC i CV (Fig.4.8c, Fig.4.8d).

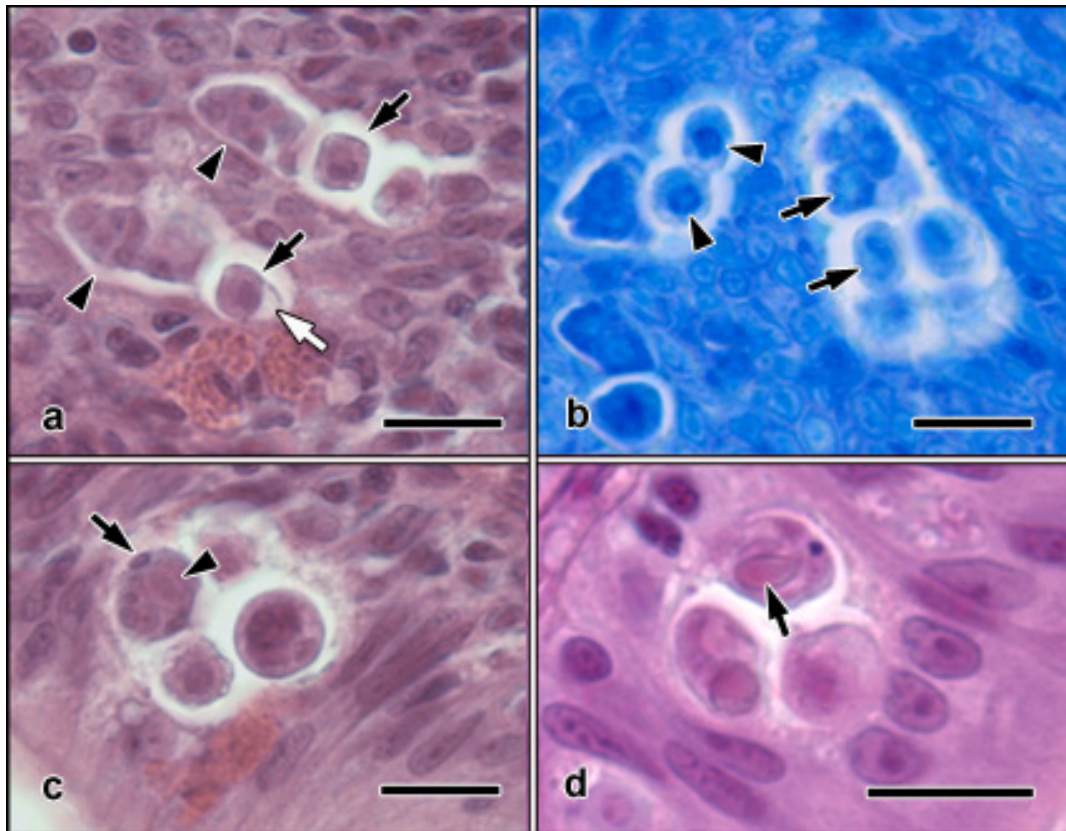


Fig.4.8. Imatges al MO d'estadis ST4 d'*E. leei* a l'intestí de morrudes (a, c i d) i orades (b). **a.** Estadis formats per una cèl·lula P que engloba una o dues cèl·lules acompanyants (fletxes) i un grup de cèl·lules esporogèniques indiferenciades (puntes de fletxa). En una d'aquestes cèl·lules acompanyants es pot observar una zona del citoplasma que ha quedat sense tenyir (fletxa blanca). Tinció HiE. **b.** Estadis formats per dues cèl·lules acompanyants i un grup de cèl·lules esporogèniques indiferenciades. Els nuclis de les cèl·lules acompanyants i esporogèniques es tenyeixen de blau clar (fletxes), el citoplasma de les cèl·lules esporogèniques és tenyeix més intensament de blau que el citoplasma de les cèl·lules acompanyants i les cèl·lules T presenten una coloració blava intensa (puntes de fletxa). Tinció Giemsa. **c.** Estadi format per un esporoblast i dues cèl·lules acompanyants. Dins de l'esporoblast es pot observar la posició perifèrica de les cèl·lules CV (fletxa) i la càpsula polar (punta de fletxa). Tinció HiE. **d.** Estadi amb dos esporoblasts i una cèl·lula acompanyant. La càpsula polar és l'única estructura que es diferencia a l'interior de l'esporoblast (fletxa). Tinció HiE. *Barres:* 10 μ m.

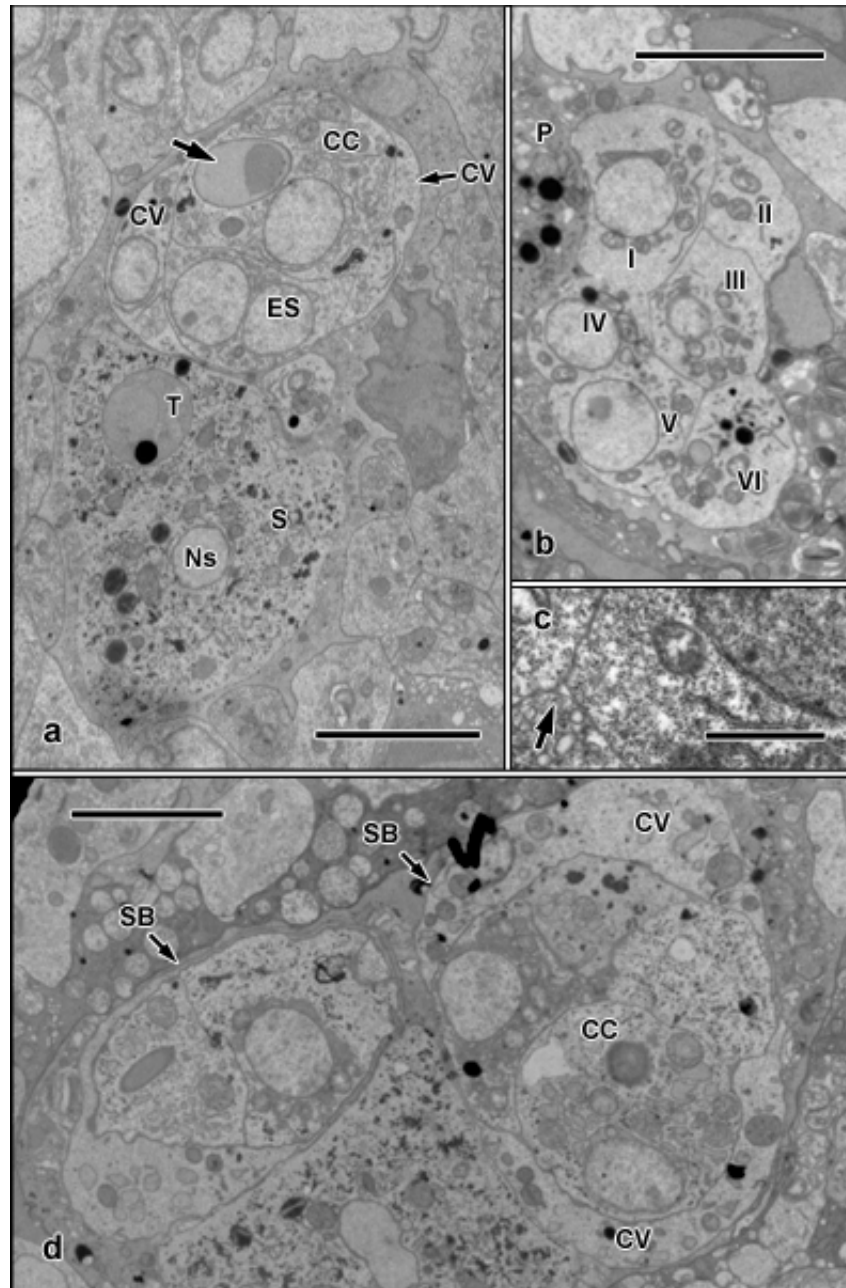


Fig.4.9. Imatges al MET d'estadis ST4 d'*E. leei* a l'intestí d'orades (a, b i d) i a la vesícula biliar de morrudes (c). **a.** Estadi format per una cèl·lula acompanyant (S) i un esporoblast en fase inicial de desenvolupament. A l'interior de la cèl·lula acompanyant s'observa un nucli (Ns) i una cèl·lula T (T) més densa. A l'esporoblast s'observen un parell de cèl·lules valvogèniques (CV) externes, un esporoplasma (ES) binucleat i una cèl·lula capsulogènica (CC) que conté un primordi de càpsula polar (fletxa). **b.** Agrupació de 6 cèl·lules esporogèniques (I-VI) a l'interior d'una cèl·lula P. **c.** Detall de la membrana vacuolar (fletxa) que es pot observar envoltant grups de cèl·lules esporogèniques. **d.** Esporoblasts (SB) a l'interior d'un estadi ST4. En un dels esporoblast, s'hi distingeixen un parell de cèl·lules CV que envolten un grup de 4 cèl·lules, una de les quals podria ser una cèl·lula CC per la gran quantitat de REr que conté. *Barres:* 5 μ m (a, b i d) i 1 μ m (c).

Al MET es poden distingir amb més detall les etapes del desenvolupament de l'esperoblast. La maduració de cadascuna de les cèl·lules que formen l'esperoblast es descriu a continuació:

Les cèl·lules capsulogèniques i la capsulogènesi. Al MET, les cèl·lules CC es diferencien ben aviat de la resta de cèl·lules de l'esperoblast perquè presenten una major quantitat de cisternes de RER i un primordi de la càpsula polar. Al seu citoplasma també es diferencien grànuls de glicogen, mitocondris i algunes gotes lipídiques (Fig.4.10a). Normalment, el nucli es localitza lateralment i presenta heterocromatina marginal i un nuclèol excèntric molt prominent. A mesura que l'esperogènesi progressa, l'estructura i òrgans de la cèl·lula no experimenten grans variacions. El primordi polar, en canvi, experimenta un procés de transformació o capsulogènesi que acaba en la formació d'una càpsula polar madura. Al principi de la capsulogènesi, el primordi polar apareix com una estructura semiesfèrica o esfèrica formada per dues, tres o quatre capes de diferent densitat: una capa externa molt fina i fosca a la que segueix una capa més gruixuda i clara. Internament, s'observa una zona on es poden distingir dues zones fosques: una més interna i fosca i una altra més externa i clara (Fig.4.10a, Fig.4.10b). Posteriorment, el primordi polar forma un tub extern en què es diferencien les mateixes capes que en el primordi (Fig.4.10b). Aquest tub extern es disposa al voltant del nucli i forma circumvolucions dins de la cèl·lula, de manera que en un tall transversal es poden observar diverses seccions del tub. Dins d'aquest tub es diferencia el filament polar que, posteriorment, apareix enrotllat dins la càpsula polar (Fig.4.10c, Fig.4.10d). L'aparició del filament polar dins de la càpsula polar coincideix amb la desaparició del tub extern. En estadis avançats de la capsulogènesi, la càpsula polar apareix com una estructura ovalada que presenta tres capes de diferent densitat: una capa externa fina i fosca, una capa intermitja més gruixuda i clara i finalment, una capa densa on s'observa el filament polar enrotllat en espiral (Fig.4.10d, Fig.4.10e).

A mesura que l'esperogènesi continua, la càpsula polar esdevé apuntada per un dels seus extrems i es dirigeix cap a una regió concreta de la membrana plasmàtica de la cèl·lula CC. En aquesta regió apareix una densificació de la membrana que indica el punt de descàrrega del filament polar en l'espóra madura (Fig.4.10e, Fig.4.10f).

Les cèl·lules valvogèniques i la valvogènesi. En els primers estadis de l'esperogènesi les cèl·lules CV són fàcils de distingir al MET ja que sempre ocupen una posició externa i a més, emeten unes projeccions citoplasmàtiques semblants a pseudopodis que envolten la resta de cèl·lules de l'esperoblast (Fig.4.10a). Com les

cèl·lules CC, les cèl·lules CV presenten un nucli amb heterocromatina marginal i un nuclèol prominent i excèntric. A més, al seu citoplasma es distingeixen algunes cisternes de RER, mitocondris i alguns grànuls de glicogen. A l'inici de la valvogènesi (o procés de maduració de les cèl·lules CV fins a la formació de les valves de l'espóra) les projeccions citoplasmàtiques d'una cèl·lula CV i les d'una altra s'uneixen en una línia de sutura (Fig.4.11a). Després, aquestes projeccions es situen una sobre l'altra i en la regió de solapament apareix un tipus d'unió intercel·lular que pren una forma semblant a una escala i que s'anomena unió septada (Fig.4.11b). Finalment, en l'espóra madura o quasi madura aquestes projeccions es mantenen solapades en els seus extrems delimitant el contorn de l'espóra (Fig.4.11c). A mesura que avança la valvogènesi, el citoplasma i el nucli de la cèl·lula CV també experimenten canvis en la seva morfologia: per una banda, el nucli, que cada vegada és més heterocromàtic, queda relegat a una regió de la cèl·lula on apareix una petita protuberància que es mantindrà a l'espóra madura (Fig.4.11d). Per altra banda, en el citoplasma es perden la majoria d'òrgànuls i apareix una massa amorfa amb nombrosos microfilaments d'uns 12 nm (Fig.4.11d).

L'espóroplasma. L'espóroplasma o element infectiu comença a distingir-se de la resta de cèl·lules de l'espóroblast quan aquestes -cèl·lules CC i CV- ja han començat a diferenciar-se (Fig.4.10a). Apareix situat en l'espai que queda entre les dues cèl·lules CC. Es tracta d'una cèl·lula binucleada que conté mitocondris, RER i un espai vacuolar que està ocupat per grans quantitats de grànuls Thiéry positius.

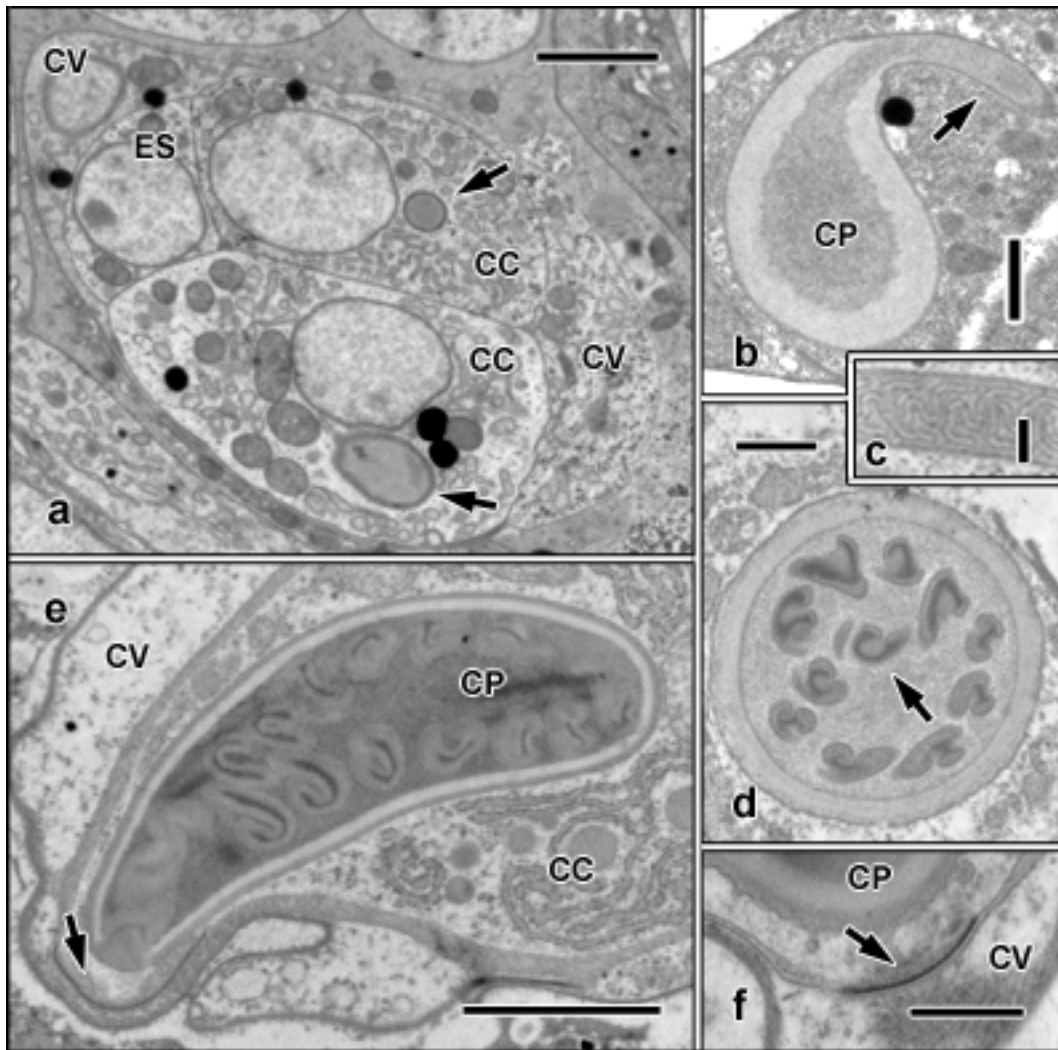


Fig.4.10. Imatges al MET d'estadis ST4 d'*E. leei* a l'intestí d'orades (a, c, e i f) i a la vesícula biliar de morrudes (b i d). **a.** Esporoblast en fase inicial de desenvolupament on s'observen un parell de cèl·lules capsulogèniques (CC), dues cèl·lules valvogèniques (CV) externes i un esporoplasma (ES). Les cèl·lules CC es caracteritzen per presentar una major quantitat de RER i un primordi de càpsula polar (fletxa). **b.** Càpsula polar (CP) jove emetent el tub extern (fletxa) on posteriorment es desenvoluparà el filament polar. **c.** Detall del tub extern emès per la càpsula polar que conté el filament polar enrotllat en espiral. **d.** Càpsula polar amb el filament polar (fletxa) enrotllat al seu interior. **e.** Càpsula polar piriforme dirigint l'extrem de sortida del filament polar a una zona concreta de la cèl·lula CC. En aquesta regió apareix una densificació de la membrana (fletxa). **f.** Detall de la densificació (fletxa) que apareix a la membrana de la cèl·lula CC en el punt de sortida del filament polar. *Barres:* 2 µm (a i e), 1 µm (b i d), 500 nm (f) i 200 nm (b).

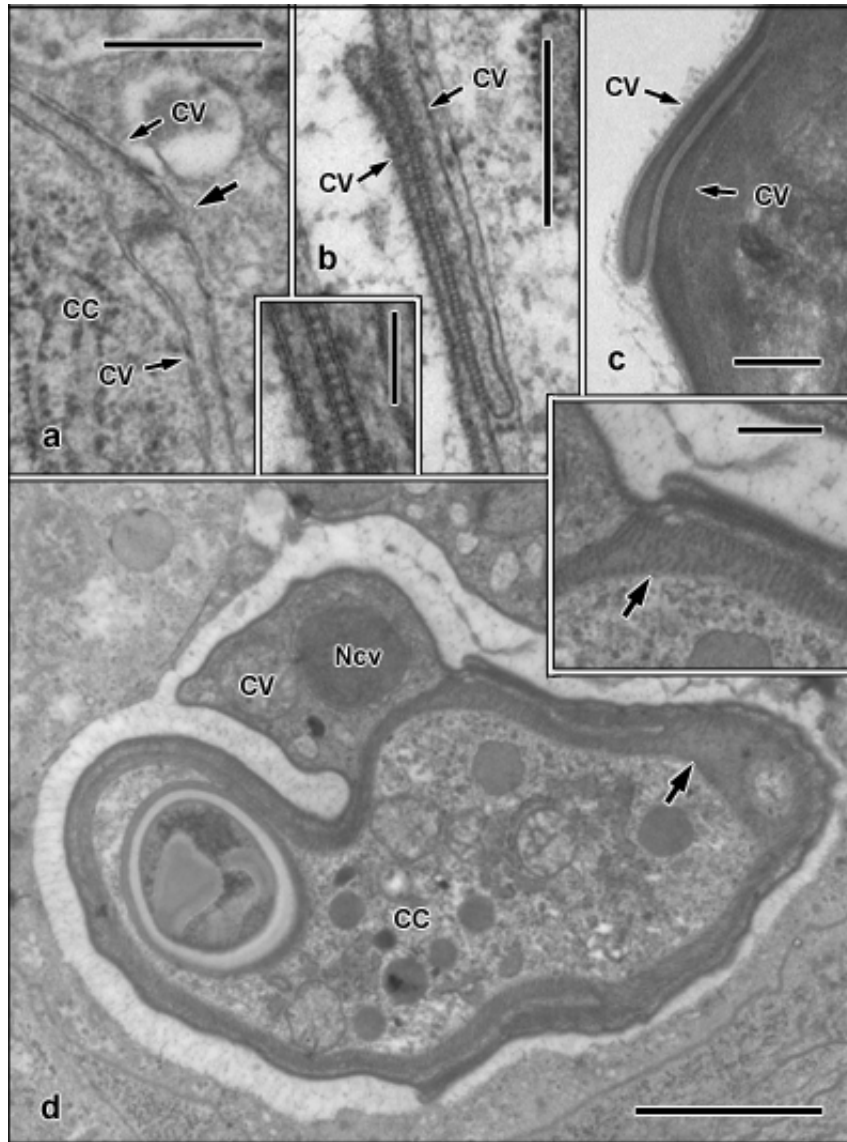


Fig.4.11. Imatges al MET d'estadis ST4 d'*E. leei* a l'intestí d'orades (C) i morrudes (a, b i d). **a.** Detall de la unió (fletxa) entre les projeccions de dues cèl·lules CV (CV). Les projeccions estan envoltades d'una membrana vacuolar (fletxa). CC: Cèl·lula capsulogènica. **b.** Unió septada entre els extrems sobreposats de les projeccions citoplasmàtiques de les cèl·lules CV. A l'extrem esquerre inferior es mostra un detall d'aquest tipus d'unions (Barra: 100 nm). **c.** Regió de solapament entre els extrems de dues cèl·lules CV en una espora madura. **d.** Esporoblast on s'observa una cèl·lula CC i una cèl·lula CV. El nucli de la cèl·lula CV (Ncv) queda relegat a una regió del citoplasma de la cèl·lula CV on comencen a aparèixer microfilaments que queden immersos en una matriu densa (fletxa). Al detall superior dret s'observen aquests microfilaments (fletxa) (Barra: 500 nm). Barres: 2 μ m (d) i 500 nm (a-c).

4.3.2.2. Estadi 5

Dins d'aquest estadi s'inclouen les formes de desenvolupament que contenen espores madures ($5,09 \mu\text{m} \times 13,13 \mu\text{m}$) (Fig.4.12).

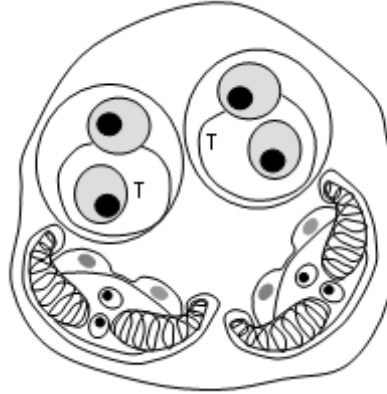


Fig.4.12. Dibuix esquemàtic d'un estadi ST5 amb un parell de cèl·lules S i un parell d'espores a l'interior d'una cèl·lula P. Les cèl·lules S contenen una cèl·lula T interna.

Aquestes espores poden trobar-se en parelles amb una o dues cèl·lules acompanyants a l'interior d'una cèl·lula P o lliures. En el primer cas, els estadis ST5 es situen entre les cèl·lules de la mucosa de l'intestí i/o de la vesícula biliar o bé lliures al lumen d'aquests òrgans acompanyats d'altres restes cel·lulars. En el segon cas, les espores solen trobar-se quasi exclusivament al lumen del tracte digestiu i/o a la vesícula biliar. En qualsevol dels dos casos, les espores sempre presenten la mateixa morfologia.

Les espores es caracteritzen per la presència d'un parell de càpsules polars allargades que s'estenen en direcció inferior i en sentits oposats formant una espècie de mitja lluna (Fig.4.13a). En fresc, aquestes càpsules polars apareixen com dues estructures refringents en les que es poden observar 7 o 8 voltes del filament polar. En secció histològica, la càpsula polar apareix formada per un filament polar molt eosinòfil envoltat d'una coberta basòfila (Fig.4.13b) que presenta un color blau fosc en tinció Giemsa (Fig.4.13c). Al MET, les càpsules polars apareixen ocupant gran part del citoplasma de la cèl·lula CC que ha quedat relegat a una estructura densa on són inapreciables tant el nucli com els orgànuls de l'antiga cèl·lula CC.

L'esoroplasma queda delimitat entre les càpsules polars i sol prendre forma de rellotge sorra. L'estructura de l'esoroplasma és difícil d'observar al MO i al MET, de manera que s'assumeix que presenta les mateixes característiques que presentava en l'esoroplast.

Finalment, tota aquesta estructura (càpsules polars i esporoplasma) queda delimitada per les valves. Al MO, les valves apareixen com un una fina capa refringent en preparacions en fresc (Fig.4.13a), basòfila (Fig.4.13b) o blava fosca en Giemsa (Fig.4.13c). En la part inferior es formen dues petites protuberàncies just al costat de l'obertura de les càpsules polars. En ocasions, en aquestes protuberàncies es pot observar el nucli de les cèl·lules CV. Al MET, les valves apareixen com una capa molt densa que envolta els altres elements de l'espóra i on ja no s'observa cap resta de l'antic citoplasma de la cèl·lula CV. En l'espóra madura es manté la regió de solapament entre les valves, tot i que no s'observen les unions septades que apareixien a l'esporeblast (Fig.4.11c).

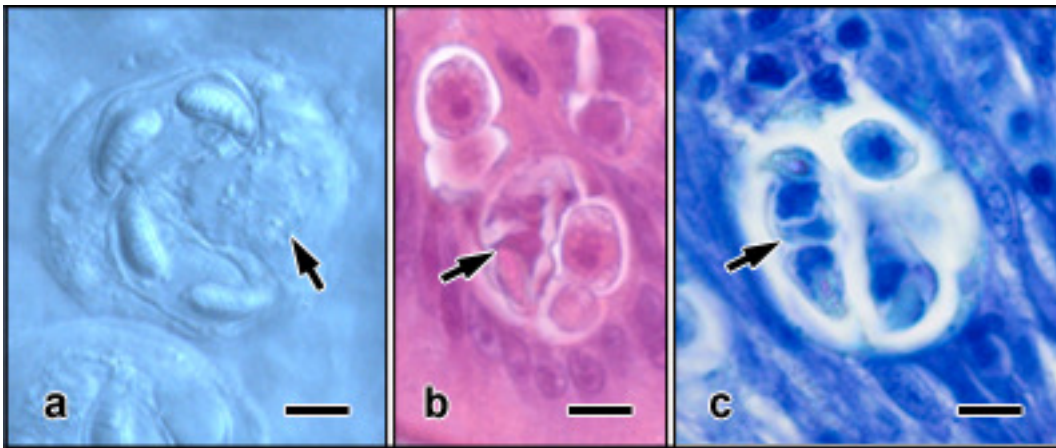


Fig.4.13. Imatges al MO d'estadis ST5 d'*E. leei* en orades. **a.** Imatge en fresc d'un estadi amb dues espores i una cèl·lula acompanyant (fletxa). **b.** Estadi format per una espóra i una cèl·lula acompanyant. Dins de l'espóra s'observa un filament polar eosinòfil envoltat de les restes basòfiles de la cèl·lula CC (fletxa). Tinció HiE. **c.** Estadi format per dues espores i una cèl·lula acompanyant. L'esporoplasma (fletxa) està situat entre les restes de les cèl·lules CV. Tinció Giemsa. Barres: 5 µm

4.4. DISCUSSIÓ

L'estudi al MO i al MET que s'ha realitzat en el present treball ha demostrat que tant els estadis de proliferació com els d'esporegènesi presenten les característiques típiques prèviament descrites per altres mixosporidis (Lom i Dyková 1992, Canning i Okamura 2004).

4.4.1. Localització dels estadis de desenvolupament d'*Enteromyxum leei*

Els estadis de desenvolupament descrits en el present treball sempre s'han trobat o lliures al lumen de l'intestí o de la vesícula biliar o bé entre les cèl·lules de la mucosa d'aquests òrgans. Els estadis descrits en posició intraepitelial sempre s'han localitzat intercel·lularment tot i que en altres espècies del gènere, en concret a *E. scopthalmi*, s'han detectat estadis inicials en posició intracel·lular (Redondo i col. 2003, Redondo i col. 2004). Tot i que la posició habitual dels estadis de desenvolupament dels mixozous sol ser la intercel·lular (Lom i Dyková 1992), la presència d'estadis inicials intracel·lulars a *E. leei* no es descarta donada la naturalesa críptica d'aquests estadis que fa molt difícil distingir-los tant al MO com al MET.

4.4.2. Estadis de proliferació

L'estructura de cèl·lula dintre de cèl·lula ha permès establir un ordre cronològic dels estadis de proliferació del paràsit. Seguint el criteri que l'aparició i multiplicació de cèl·lules internes dóna lloc al creixement i maduració dels estadis de proliferació, s'han pogut establir 3 estadis de desenvolupament (ST1, ST2 i ST3).

La presència d'una membrana vacuolar envoltant les cèl·lules internes (cèl·lules S i T) dels estadis ST2 i ST3 indica que l'aparició d'aquestes cèl·lules a *E. leei* es produiria a través de la divisió endògena de la cèl·lula mare. Aquest tipus de divisió es produeix quan, després de la divisió del nucli de la cèl·lula mare (cèl·lula P o S), el nucli i una porció del seu citoplasma queden envoltats per una porció de RE. La membrana interna del RE dóna lloc a la membrana de la cèl·lula interna, mentre que la membrana externa forma una membrana vacuolar (Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 1993a, Canning i col. 1999). L'observació de parells de cèl·lules S o T envoltades d'una única membrana vacuolar, a més, indica que el creixement dels estadis proliferatius també es pot produir a través de la divisió binària de les cèl·lules S i T dins de la mateixa membrana vacuolar. L'observació ocasional de cèl·lules S emetent projeccions citoplasmàtiques cap a una altra cèl·lula S fa que no es pugui descartar que a *E. leei* es formin cèl·lules internes a través de l'englobament d'una cèl·lula per una altra.

A mesura que apareixen i es multipliquen les cèl·lules internes, la cèl·lula P queda confinada a una petita porció del citoplasma. En aquesta petita regió, es produeix un augment del nombre de vacúols formats per una sola membrana i que contenen un contingut amorf o multilaminar. Aquests tipus de vacúols també apareixen als trofozoïts de *Myxidium trachinorum* (Canning i col. 1999) i *E. scopthalmi* (Redondo i col. 2003) i s'interpreten com a vesícules fagocítiques. De fet, la pinocitosi i la fagocitosi són processos que han estat descrits tant en mixosporidis celozoics (Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 1993b) com histozoics (Upenskaya 1982). Per tant, la

presència d'aquests vacúols i de vesícules pinocítiques al citoplasma de la cèl·lula P, l'augment del nombre d'aquestes estructures a mesura que creixen els estadis de proliferació i la seva absència en les cèl·lules S i T, poden indicar que les cèl·lules P són les encarregades de nodrir la resta d'elements interns en els estadis de proliferació.

L'aliment obtingut per la cèl·lula P en els processos de pinocitosi i fagocitosi és emmagatzemat al citoplasma en forma de gotes lipídiques o bé en forma d'acúmuls de β -glicogen. Així, durant el present estudi s'ha observat que les cèl·lules P, tot i que acumulen carbohidrats, presenten una major quantitat de reserves lipídiques que les cèl·lules S i que, en canvi, en les cèl·lules S (que també poden contenir algunes gotes lipídiques) hi ha una major quantitat de reserves de β -glicogen. La majoria de mixosporidis presenten aquestes reserves, però existeix una gran variació en la seva abundància i la distribució a les cèl·lules en els diferents estadis de desenvolupament. Per exemple, *E. scopthalmi*, tot i ser del mateix gènere que *E. leei*, presenta més quantitat de reserves glucídiques i lipídiques a les cèl·lules P que a les cèl·lules internes (Redondo i col. 2003).

Independentment de les variacions observades entre espècies, la distribució de les reserves energètiques a les cèl·lules que formen els estadis de proliferació d'*E. leei* podrien ser degudes a diferents motius. Per una banda, la demanda energètica de les cèl·lules P podria ser diferent a la de les cèl·lules S. En els animals, el glicogen constitueix la principal font d'energia a curt termini que satisfà les necessitats immediates dels teixits, mentre que els lípids constitueixen una font d'energia a llarg termini que s'emmagatzema. Per tant, l'acumulació de gotes de lípids al citoplasma de la cèl·lula P podria indicar que aquestes cèl·lules, a més de ser les responsables de l'obtenció d'aliment a través de la fagocitosi i la pinocitosi, tindrien la capacitat d'actuar com a magatzems d'energia. L'acumulació de β -glicogen al citoplasma de les cèl·lules S podria ser degut a l'elevada necessitat energètica d'aquestes cèl·lules que, en els estadis de proliferació, estan en ple període de creixement i multiplicació. De fet, la presència de petits mitocondris, cisternes de REr i ribosomes (aquests últims sobretot a les cèl·lules T) indiquen una gran activitat de síntesi i, per tant, uns grans requeriments d'energia. D'altra banda, les cèl·lules S podrien no ser capaces de realitzar parcial o totalment el metabolisme dels lípids. Això faria que les cèl·lules S no poguessin acumular energia en forma de lípids i, per tant, depenguessin de les reserves de la cèl·lula P.

Durant el període de proliferació d'*E. leei* en el seu hoste, s'han pogut distingir dos tipus de cèl·lules S que no només es diferencien per la seva mida sinó també per les seves propietats histoquímiques. Aquests dos tipus cel·lulars podrien representar dues

etapes en el creixement de les cèl·lules S. Així, les cèl·lules S de mida petita (que freqüentment s'observen als estadis ST2) donarien lloc a les cèl·lules S que contenen cèl·lules T (presents únicament als estadis ST3). Tot i això, aquests dos tipus de cèl·lules també es poden trobar simultàniament en el mateix estadi de desenvolupament (ST3) i, per tant, podrien correspondre a dues línies cel·lulars diferenciades: per una banda, les agrupacions de cèl·lules S de mida petita i sense cèl·lules T donarien lloc a les cèl·lules de l'esperoblast. D'altra banda, el segon tipus de cèl·lula S (de mida gran i amb cèl·lules T internes) donaria lloc a les cèl·lules acompanyants dels estadis esporogènics. Per tant, aquest últim tipus de cèl·lula S podria tenir una funció similar a la de les cèl·lules acompanyants dels estadis esporogènics a les que se'ls hi atribueix la capacitat de reinfectar altres zones de teixit i iniciar un nou cicle proliferatiu o esporogènic en el mateix o en altres hostes (Sitjà-Bobadilla i col. 1995, Tarer i col. 1996). Així, en el període de proliferació, el paràsit podria tenir la capacitat de reinfectar altres zones del teixit i donar lloc a les grans infestacions que tradicionalment ocasionen els individus d'aquest grup (Tarer i col. 1996, Canning i col. 1999, Redondo i col. 2003).

En els estadis de proliferació d'*E. leei* s'han pogut observar dos tipus d'unions intercel·lulars entre les membranes de les cèl·lules S: les unions semblants a desmosomes similars a les descrites per Morrison i col. (1996) a *Ceratomyxa drepanopsettae* i les unions semblants a hemidesmosomes. La presència d'unions intercel·lulars dins dels trofozoïts o entre trofozoïts és freqüent entre els mixosporidis (Lom i Dyková 1992). En aquest cas, aquestes unions podrien funcionar de manera anàloga als desmosomes i hemidesmosomes dels mamífers i donar estabilitat a l'estructura del trofozoït.

Una altra característica dels estadis de proliferació d'*E. leei* és la posició que prenen el nucli de les cèl·lules S i la cèl·lula T. Aquesta configuració en què la membrana nuclear d'una cèl·lula està gairebé en contacte amb la membrana plasmàtica d'una cèl·lula interna no és exclusiva d' *E. leei*, sinó que també ha estat observada per altres autors com Lom i Dyková a *Ortholinea fluviatilis* (1996) i a *Kudoa lunata* (1988), sense que aquests autors indiquin el significat funcional d'aquests aparellaments.

4.4.3. Estadis esporogènics

L'observació dels estadis esporogènics d'*E. leei* ha permès constatar que existeix una certa versatilitat en els mecanismes de formació de l'esperoblast. D'una banda, la presència d'una membrana vacuolar envoltant les cèl·lules de l'esperoblast indica que l'esperoblast es forma a partir de la divisió d'una única cèl·lula esporogènica que prové de la divisió endògena d'una cèl·lula mare. D'altra banda, la presència d'agrupacions

de cèl·lules esporogèniques indiferenciades no envoltades per una membrana comú indicaria que l'esperoblast es forma per simple agrupació de cèl·lules. Per tant, i tal i com han suggerit altres autors com Redondo i col. (2003) o Lom i Dyková (1996), existeix una gran versatilitat en el desenvolupament d'aquests organismes.

A més d'un parell d'esperoblasts o espores, que sovint es desenvolupen asincrònicament (com a *E. scophthalmi* (Redondo i col. 2003)), en els estadis d'esporogènesi d'*E. leei*, apareixen com a mínim un parell de cèl·lules acompanyants. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquestes cèl·lules podrien actuar com a formes d'amplificació parasitària amb capacitat de reinfectar el teixit i iniciar un nou cicle proliferatiu o esporogènic (Sitjà-Bobadilla i col. 1995, Tarer i col. 1996). D'altra banda, aquestes cèl·lules també participarien en la transmissió horitzontal del paràsit infectant altres teixits i/o hostes.

Càpsules polars i capsulogènesi. La presència de gran quantitat de REr a les cèl·lules CC és comuna entre els mixosporidis i permet distingir-les ben aviat de la resta de cèl·lules de l'esperoblast. La gran quantitat de REr podria estar relacionada amb la formació de la càpsula polar, de manera que els seus components haurien de ser, majoritàriament, de naturalesa proteica.

El desenvolupament de les càpsules polars segueix el mateix patró descrit en altres mixosporidis. Per una banda, la capsulogènesi es produeix seguint les descripcions de Lom i Puytorac (1965). En aquestes descripcions el filament polar es forma a l'interior del tub extern que surt del primordi de la càpsula polar. Posteriorment, el filament s'aniria introduint a l'interior de la càpsula polar adoptant una estructura helicoidal. Al final del procés, el nombre de voltes del filament polar dins de la càpsula polar madura es trobaria entre 7 i 8 coincidint amb les descripcions de Diamant i col. (1994).

Cèl·lules valvogèniques i valvogènesi. La degradació citoplasmàtica i l'atròfia que experimenten les cèl·lules CV al llarg de la valvogènesi és un fenomen estès entre els mixosporidis. A *E. leei*, però, els nuclis de les cèl·lules CV es mantenen fins al final del desenvolupament i romanen en l'espore madura formant dos petites protuberàncies a la part inferior de l'espore (Diamant i col. 1994).

Durant la valvogènesi d'*E. leei* apareixen un conjunt de microfibrilles immerses en una matriu densa al citoplasma de la cèl·lula CV. Aquest tipus d'estructures no s'han observat en altres espècies del gènere *Enteromyxum*, però són semblants a les estructures descrites a les cèl·lules CC de *Polysporoplasma mugilis* (Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 1995) o a les cèl·lules CV de *Zschokkella helmii* (Abdel-Ghaffar i col. 2008a).

Les unions septades o desmosomes septats observats entre els extrems sobreposats de les cèl·lules CV han estat descrits en altres mixosporidis (Azevedo i col. 1989, Casal i col. 2007, Desportes-Livage i Nicolas 1990), però mai no s'havien observat al gènere *Enteromyxum* (Palenzuela i col. 2002, Redondo i col. 2003). Aquestes unions solen trobar-se als teixits epitelials d'invertebrats on a part de proporcionar resistència mecànica als epitelis, actuen com a barrera a la difusió de soluts (Locke 1965). Per tant, la presència d'aquestes unions en les cèl·lules CV podria actuar donant estabilitat i protegint la resta de cèl·lules de l'espóra.

Esporoplasma. La formació de l'espোরoplasma binucleat a *E. leei* podria ser deguda a la unió de dues cèl·lules esporoplàsmiques indiferenciades o bé a la cariocinesi d'una cèl·lula esporogènica. Tot i que mai s'ha observat la fusió de cèl·lules esporogèniques, sembla que aquesta seria la via de formació més probable ja que en els esporoblasts indiferenciats s'han arribat a observar fins a 6 cèl·lules. Tot i que *E. leei* presenta un esporoplasma binucleat, *E. fugu* presenten dos esporoplasmes uninucleats. La variabilitat en l'estructura de l'espোরoplasma sembla que no tindria cap tipus d'importància taxonòmica ja que també ha estat descrita en altres mixosporidis com *Leptotheca* (Tun i col. 2000, Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 2001) o *Kudoa* (Cho i Kim 2003, Lom i Dyková 1988).

**5. ESTUDI COMPARATIU DE L'ESTABLIMENT,
PROGRESSIÓ DE LA INFECCIÓ I PATOGÈNIA
D'*Enteromyxum leei* A L'ORADA (*Sparus aurata*) I LA
MORRUDA (*Diplodus puntazzo*) EN DIFERENTS
CONDICIONS D'EXPERIMENTACIÓ**

5.1. INTRODUCCIÓ

En els darrers anys, el coneixement dels mixozous (Fílum Myxozoa) ha crescut exponencialment gràcies, sobretot, a la creixent necessitat de solucionar els problemes sanitaris que aquests paràsits ocasionen en cultius de peixos d'interès comercial. En aquest context s'emmarca el descobriment d'*Enteromyxum leei* (Diamant 1992) com l'agent causant d'una enteritis crònica en cultius d'orada (*Sparus aurata*) al Mediterrani. Les característiques d'aquest mixozou (poca especificitat i transmissió horitzontal) han fet que aquest paràsit hagi estat considerat com un perill pel desenvolupament i la diversificació de l'aqüicultura al Mediterrani. *E. leei* no només afecta les produccions d'orada del Mediterrani sinó que entre el seu ventall d'hostes es troben altres espècies amb un elevat potencial per a la diversificació de l'aqüicultura al Mediterrani com la morruda (*Diplodus puntazzo*) (Diamant 1995, Montero i col. 2007), el besuc (*Pagellus bogaraveo*) (Marino i col. 2004), el sarg (*Diplodus sargus*) (Golomazou i col. 2006a), el pagre ver (*Pagrus pagrus*) (Diamant 1995) i el pagre japonès (*Pagrus major*) (Le Breton i Marques 1995). Dins del rang d'hostes d'*E. leei*, s'ha observat que n'hi ha que presenten una major susceptibilitat pel paràsit tant a nivell de famílies (els blènids i làbrids són parasitats amb més facilitat que altres famílies de peixos) com a nivell d'espècies dins d'una mateixa família. Així, si només es prenen en consideració els espècies, s'ha vist que la morruda mostra una elevada susceptibilitat tant en condicions d'experimentació com en gàbies a mar obert (Zrnëić i col. 1998, Athanassopoulou i col. 1999, Montero i col. 2007), tant, que en alguns casos, ha conduït al progressiu abandonament del seu cultiu en algunes àrees del Mediterrani (Fioravanti i col. 2004). Aquesta susceptibilitat de la morruda, que pot cursar amb elevades mortalitats, destaca front a la resistència d'alguns estocs d'orada en què la infecció, sovint, esdevé crònica durant molt de temps.

El descobriment de la transmissió horitzontal d'aquest paràsit, que ha facilitat el manteniment d'infeccions en condicions de laboratori, ha permès obtenir gran quantitat d'informació referent a la morfologia i patogènia d'*E. leei* en espècies d'interès comercial com la morruda o l'orada (Cuadrado i col. 2008, Alvarez-Pellitero i col. 2008, Fleurance i col. 2008). Tot i això, no existeixen prou estudis comparatius que permetin entendre l'aparent susceptibilitat que mostren algunes espècies de peixos quan es comparen amb altres. Recentment, però, s'ha demostrat que tant les característiques de l'hoste (mida o estoc) com les característiques de la infecció (temperatura, dies d'exposició, ràtio donador:receptor) poden afectar a la progressió de la infecció o a la mortalitat que produeix aquesta enteromixosi (Sitjà-Bobadilla i col. 2007).

L'objectiu del present treball és, per tant, realitzar un estudi comparatiu de l'establiment, la progressió de la infecció i la patogènia d'*E. leei* en diferents situacions

experimentals que inclouen diferents mètodes d'infecció (cohabitació amb peixos donants, la ingestió forçada del paràsit i la infecció natural, diferents espècies (orada i morruda) i diferents edats (juvenils i adults). Amb aquest estudi es pretenen identificar les semblances i les diferències en els patrons d'infecció que segueix *E. leei* en cada situació experimental.

5.2. MATERIALS I MÈTODES

5.2.1. Material biològic i tècniques *post mortem*

El material biològic amb què s'ha realitzat el present estudi prové de les infeccions experimentals O1, C1, C2 i C3 i de la infecció N1 que s'expliquen amb detall a l'apartat 3.1 "Materials i mètodes. Material biològic" (p. 25-28). La metodologia emprada en el processament dels individus després del seu sacrifici es detallen a l'apartat 3.2.1. "Materials i mètodes. Tècniques *post mortem*. Tècniques histològiques" (p. 28-31). Tal i com es descriu en aquest apartat, tots els talls van ser tenyits amb Hematoxilina i Eosina (HiE). A més, els talls que provenien de les infeccions C1 i O1 van ser tenyits amb Giemsa i els que provenien de les infeccions C2 i C3 es van tenyir amb Àcid Periòdic-reactiu de Schiff (PAS).

5.2.2. Estudi histològic

Tal i com s'ha esmentat a l'apartat 2. "Objectius" (p. 19), els objectius del projecte europeu en què s'emmarcava la present tesi doctoral eren diferents als objectius concrets d'aquest estudi. Aquest és el motiu pel qual la metodologia emprada en el processament de les mostres ha estat lleugerament diferent en cada infecció. Així, en les infeccions C1 i O1 s'han estudiat talls histològics de la vesícula biliar, l'estómac, els cecs pilòrics, l'intestí anterior, el posterior i el recte. En les infeccions C2 i C3 s'han estudiat talls de la melsa, el fetge, la vesícula biliar, l'estómac, els cecs pilòrics i l'intestí anterior, mig i posterior (aquest últim amb el recte). Per últim, en la infecció N1 s'han estudiat talls de les brànquies, la melsa, el fetge, l'estómac, l'intestí posterior, el mig, l'anterior (amb els cecs pilòrics) i el recte.

Els aspectes de la infecció que es descriuen a continuació van avaluar-se mitjançant l'observació d'aquests talls histològics en un microscopi *Leica DM 5000B*. A més, es van prendre imatges digitals mitjançant una càmera *ProgRes C3* i el software *ProgRes® CapturePro 2.1* (Jenoptik, Alemanya).

En primer lloc, es va estudiar la presència o l'absència del paràsit anotant-ne tant l'estadi de desenvolupament (des de ST1 fins a ST5) com la localització (dins o fora del teixit). En aquest sentit, es va considerar que un individu o un teixit estava infectat

quan es trobava algun estadi del paràsit dins del teixit estudiat. Això va permetre obtenir un valor de prevalença (P) de la infecció que es va definir com el percentatge entre el nombre d'individus infectats (n) respecte el nombre total d'individus examinats (n_T).

$$P = \frac{n}{n_T} \times 100$$

Per tal d'avaluar la intensitat de la infecció, es van realitzar tres comptatges a l'atzar del nombre de paràsits per unitat de superfície (mm^2) en cada secció de teixit i després es va calcular la mitjana aritmètica. A més de mesures d'intensitat, també es va anotar si la infecció era total o parcial, en el sentit de si afectava la totalitat del teixit o només afectava petites regions.

Per altra banda, es van anotar alguns aspectes de la resposta cel·lular de l'hoste com l'abundància relativa de leucòcits i de cèl·lules granulars eosinòfiles (CGE) a la submucosa, la infiltració d'aquests tipus cel·lulars a la mucosa o l'abundància de cèl·lules *rodlet* també a la mucosa. L'abundància relativa de leucòcits i CGE a la submucosa va permetre establir 4 nivells per la resposta inflamatòria: nul·la, lleu, moderada i greu.

Per acabar, es va realitzar un estudi histopatològic en què es van realitzar anotacions dels canvis en l'estructura normal i de les lesions del teixit afectat pel paràsit.

5.2.3. Estudi estadístic

Per estudiar les dades biomètriques es va emprar el factor de condició (FC), que es va definir com el quocient entre el pes (P) i la longitud (L) al cub dels individus:

$$FC = \frac{P}{L^3}$$

Per testar diferències en els valors mitjans del FC entre els peixos control (C) i els receptors (R) i entre els peixos sans i els parasitats en cada mostreig es va emprar un anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA). Quan les dades incomplien els requisits de normalitat o homogeneïtat de variàncies, aquestes comparacions es van realitzar mitjançant la prova U de Mann Whitney. Totes aquestes anàlisis es van realitzar amb el programa *SPSS 15.0*, en què es va fixar un nivell de significació mínim de $p < 0,05$. D'altra banda, i només en el cas de la infecció N1, es va estudiar la relació existent entre el FC i la intensitat mitjana de la infecció en cada un dels trams mitjançant el coeficient de correlació de Pearson.

Per analitzar els valors d'intensitat mitjana del paràsit entre trams intestinals en cada dia de mostreig es va emprar una anàlisi de la variància d'un factor amb mesures repetides (ANOVA MR). Quan les dades incomplien els requisits de normalitat o igualtat de variàncies, aquestes comparacions es van realitzar mitjançant el Test de Friedman. Quan el Test de Friedman va donar valors significatius es va emprar el Test de Wilcoxon per detectar entre quins parells de trams es produïen les diferències significatives (es va aplicar la correcció de Bonferroni en el nivell de significació mínim).

Es va emprar una ANOVA per comparar els valors d'intensitat mitjana del paràsit de cada tram en els diferents dies de mostreig (només en infeccions O1, C1, C2 i C3). Quan les dades incomplien els requisits de normalitat o igualtat de variàncies, aquestes comparacions es van realitzar amb el Test de Kruskal-Wallis. Aquests tests també es van emprar per comparar els valors d'intensitat mitjana màxima assolida pel paràsit en cada tram intestinal entre infeccions experimentals.

Per validar la normalitat de les dades es va emprar el Test de Shapiro-Wilk ja que la mida mostral era reduïda ($n < 30$) i per validar la igualtat de variàncies es va emprar el Test de Levene.

D'altra banda es va modelitzar la intensitat del paràsit en funció de la espècie, del tram intestinal i del temps en les infeccions C2 i C3 i en funció del mètode d'infecció, del tram intestinal i del temps en les infeccions O1 i C1. Aquesta modelització es va realitzar utilitzant el programari SAS 9.0 ®. Es va emprar un model de regressió logística, de manera que es va transformar la variable *intensitat* en una variable binomial que prenia el valor 0 quan la intensitat era igual a 0 paràsits/mm² i 1 quan la intensitat era superior a 0 paràsits/mm². D'aquesta manera, el model de regressió logística va permetre explicar la presència o absència del paràsit en funció de les variables: *tipus d'infecció*, *espècie*, *tram* i *temps*.

Per últim, i per tal d'avaluar el grau de relació entre la presència del paràsit i l'existència d'una reacció inflamatòria es va emprar el coeficient de correlació de Pearson i el coeficient Tau-b de Kendall (τ).

5.3. RESULTATS

5.3.1. Infecció per cohabitació en orades adultes (C1)

5.3.1.1. Progressió de la infecció

Els primers estadis del paràsit, fonamentalment estadis ST2 i ST3, es van detectar el dia 21 de cohabitació formant petites agrupacions a la mucosa del recte. Només en un

cas es van poder observar aquests estadis formant agrupacions -de menor intensitat que al recte- a la mucosa de l'intestí posterior i dels cecs pilòrics (Fig.5.1, Fig.5.2).

El dia 42 de cohabitació ja es van poder observar estadis ST4 i ST5 formant agrupacions amb estadis ST2 i ST3 a la mucosa de qualsevol zona de l'intestí (Fig.5.3a). A més, també es van observar estadis del paràsit lliures al lumen (Fig.5.3b) i en contacte amb les microvellositats dels enteròcits (Fig.5.3c). A partir d'aquest moment i en endavant, es van observar agrupacions del paràsit en qualsevol zona de la mucosa intestinal. En aquestes agrupacions es podia distingir qualsevol estadi del paràsit: els estadis proliferatius (ST2 i ST3) es solien situar al voltant dels estadis esporogènics (ST4 i ST5), que es situaven al nucli de l'agrupació. A partir del dia 42 de cohabitació també va ser freqüent l'observació d'estadis lliures al lumen o d'estadis sobre les microvellositats dels enteròcits (ST3, ST4 i ST5) dels individus parasitats.

Tot i que a partir del dia 42 de cohabitació el paràsit podia localitzar-se en qualsevol tram intestinal, només un petit percentatge dels individus parasitats (d'un 12,5 a un 25% dels individus en funció del dia de mostreig) va presentar el paràsit simultàniament en els quatre trams estudiats. En aquests casos, el paràsit no va colonitzar de manera contínua la totalitat de la mucosa intestinal.

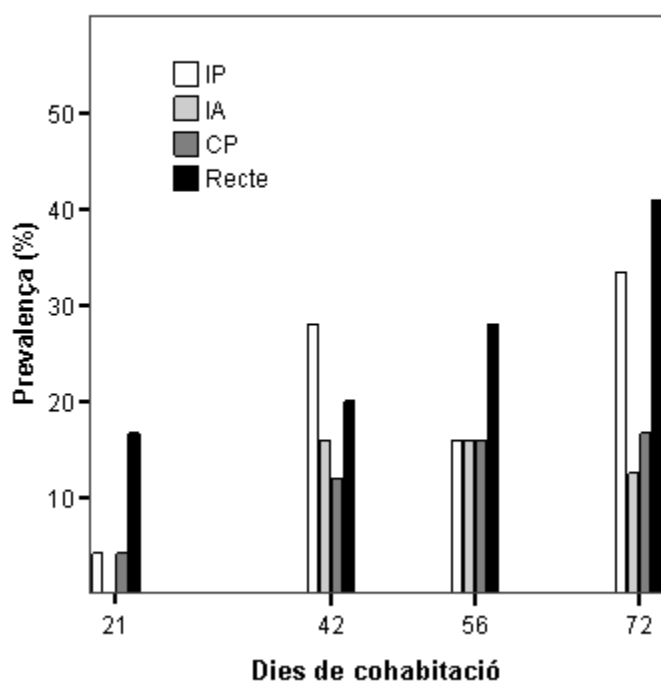


Fig.5.1. Prevalença de la infecció C1 en cada tram intestinal al llarg de l'experiment. IA: Intestí anterior, IP: Intestí posterior, CP: Cecs pilòrics.

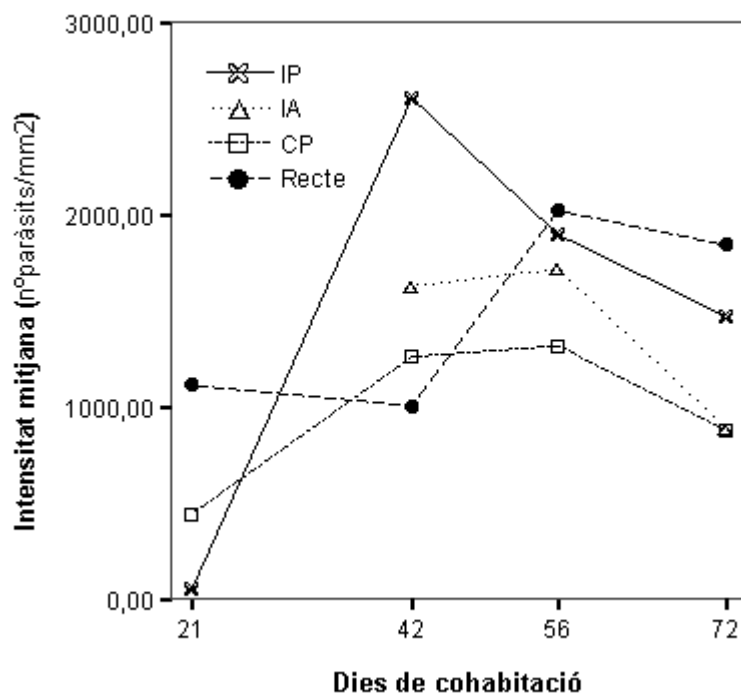


Fig.5.2. Evolució de la intensitat mitjana en cada tram intestinal durant la infecció C1. Cada punt representa la intensitat mitjana del paràsit en cada dia de mostreig. IP: Intestí posterior, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

El percentatge total d'individus infectats va anar creixent progressivament des del dia 21 de cohabitació fins al final de l'experiment (Taula 5.1).

Taula 5.1. Prevalença (P) i prevalença acumulada (P_A) de la infecció C1 en cada dia de mostreig.

	<i>Dies de cohabitació</i>			
	21	42	56	72
P (%)	16,67	36	36	58,33
P_A (%)	16,67	26,53	29,72	36,73

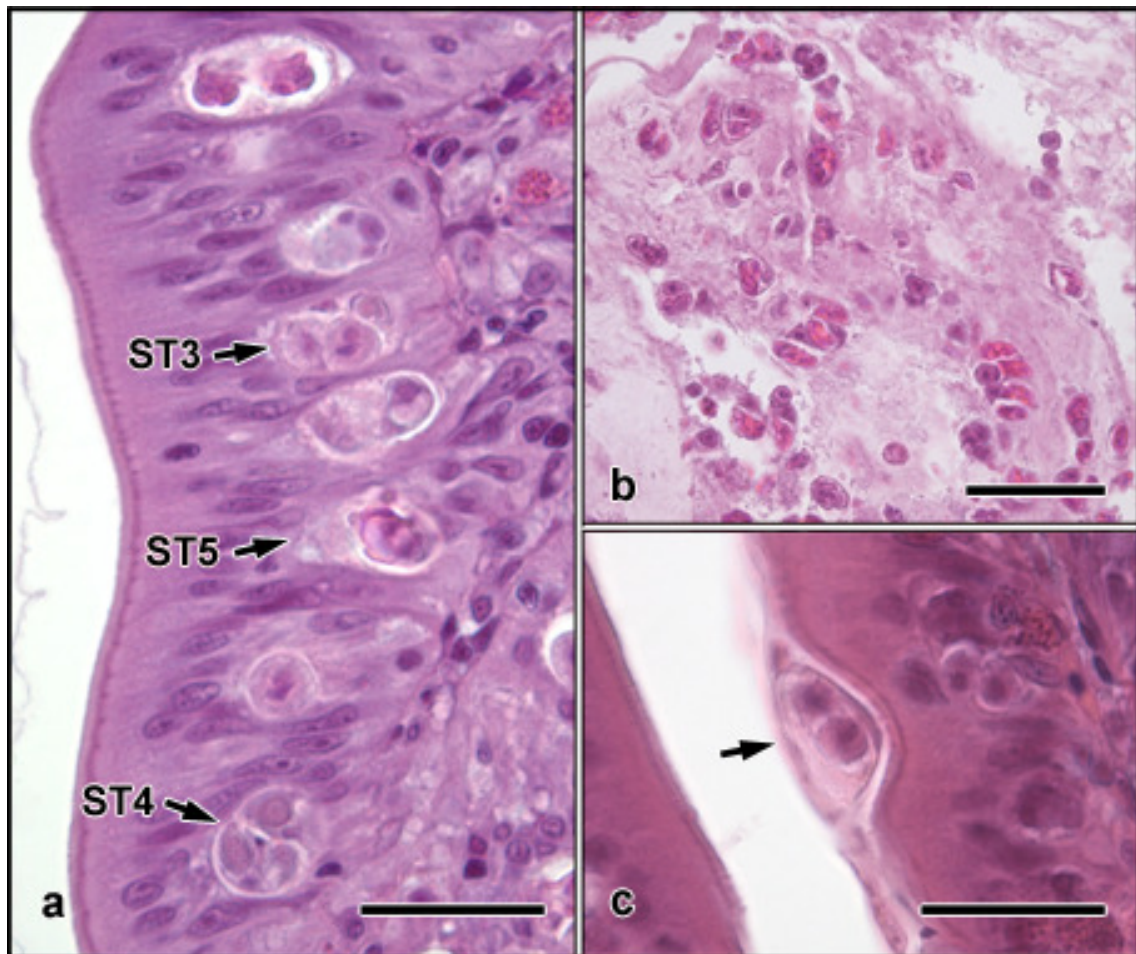


Fig.5.3. Imatges al MO d'estadis d'*E. leei* a l'intestí de peixos parasitats. Tinció HiE. **a.** Agrupació d'estadis del paràsit a la mucosa intestinal. **b.** Estadis ST5 del paràsit al lumen de l'intestí. **c.** Estadi ST3 en contacte amb les microvellositats dels enteròcits de la mucosa intestinal. Barres: 20 µm (a i c), 50 µm (b).

Quan es va estudiar la prevalença de la infecció en cada tram intestinal (Fig.5.1) es va observar que el percentatge d'individus amb l'intestí posterior i el recte infectats experimentava un creixement progressiu a mesura que avançava la infecció (sobretot al recte). En canvi, a l'intestí anterior i als cecs pilòrics només es va produir un creixement de la prevalença fins al dia 42 de cohabitació, moment a partir del qual la proporció d'individus infectats es va mantenir més o menys constant. Al final de l'experiment, el percentatge d'individus que presentaven el recte o l'intestí posterior afectat representaven una mica més del doble que els que presentaven els trams anteriors afectats (Fig. 5.1). Tot i que els trams posteriors semblaven mostrar una major predisposició a ésser parasitats, no es van trobar diferències significatives en el risc de cadascun dels trams a ésser parasitats.

Pel que fa a la intensitat mitjana del paràsit, gairebé en tots els trams (amb excepció de l'intestí posterior) es va produir un creixement fins al dia 56 de cohabitació, moment a partir del qual la intensitat mitjana va començar a disminuir. Tot i aquest creixement general, només el recte va presentar valors d'intensitat mitjana del paràsit significativament diferents al llarg de l'experiment ($F = 3,274$; $g.l. = 3$; $p = 0,041$). La intensitat mitjana del paràsit va mantenir-se més elevada en els trams posteriors de l'intestí que en els trams anteriors en gairebé tots els dies mostrejats. Tanmateix, només els dies 21 i 72 de cohabitació les diferències entre trams intestinals van ser significatives ($n = 12$; $g.l. = 3$; $\chi^2 = 14,633$; $p = 0,002$ i $n = 4$; $g.l. = 3$; $\chi^2 = 10,714$; $p = 0,013$) i només el dia 72 de cohabitació es va poder detectar que aquestes diferències eren significatives entre el recte i els cecs pilòrics ($Z = -2,703$, $p = 0,007$). En les orades receptores (R) infectades no es van detectar estadis del paràsit en cap altre teixit que no fos l'intestí o els cecs pilòrics. No es van detectar estadis del paràsit en cap de les orades control (C).

5.3.1.2. Lesions i reacció inflamatòria

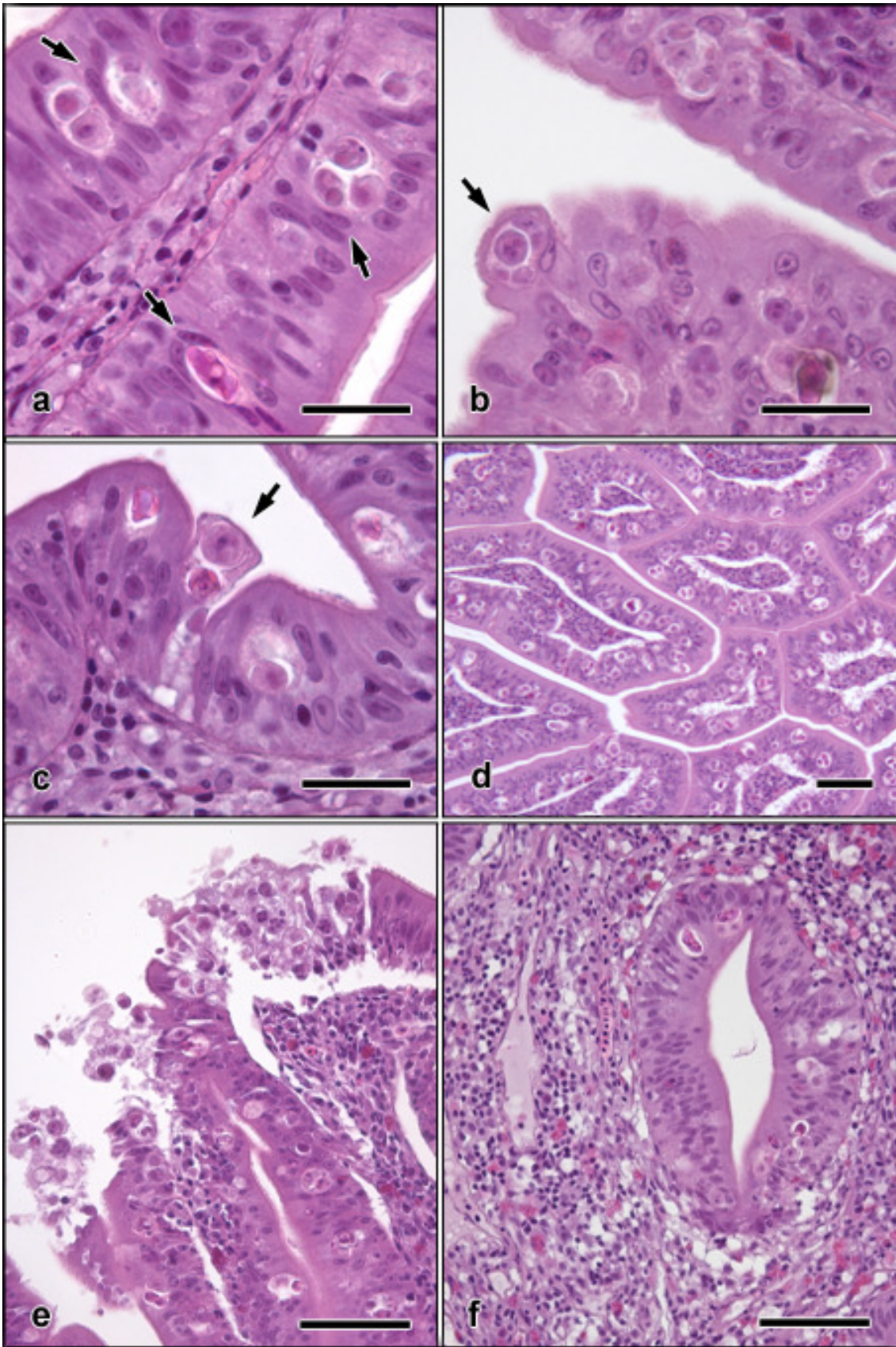
A partir del dia 21 de cohabitació ja es va poder observar l'efecte del paràsit sobre les cèl·lules de la mucosa intestinal, que van començar a presentar graus variables de compressió mecànica (Fig.5.4a). A partir del dia 42 de cohabitació en endavant, el creixent nombre d'estadis del paràsit va provocar l'aparició d'ondulacions de la superfície de l'epiteli intestinal com a conseqüència de la pressió exercida (Fig.5.4b). Altres lesions que es van poder observar van ser la descamació i la mort cel·lular sigui per necrosi, apoptosi o anoikis de les cèl·lules de la mucosa intestinal que, freqüentment, estaven associades a l'alliberació del paràsit al lumen intestinal (Fig.5.4c, Fig.5.4e). També es va poder observar el desprendiment d'algunes regions de la mucosa intestinal (completament infectades) que es separaven de la submucosa adjacent (Fig.5.4d, Fig.5.4e) i l'aparició d'edemes a la submucosa (Fig.5.4f). Només el darrer dia de mostreig (dia 72 de cohabitació) es va poder observar la necrosi de les cèl·lules de la submucosa.

Pel que fa a la resposta inflamatòria per part de l'hoste, es va observar que existia una relació positiva i significativa entre la presència del paràsit i l'aparició de resposta inflamatòria ($\chi^2 = 329,090$, $g.l. = 3$, $p = 0,000$; $\tau = 0,894$, $g.l. = 3$, $p = 0,000$). Així, en la majoria d'orades R infectades es va produir un augment de l'abundància relativa de les cèl·lules inflamatòries (sobretot leucòcits) a la submucosa (Fig.5.5a). Rarament es va observar un augment de l'abundància relativa de CGE a la submucosa o la infiltració d'aquestes cèl·lules a la mucosa de l'intestí.

D'altra banda, es van poder observar diferències quant a la resposta en cada tram (Fig.5.6). Així, en els trams posteriors van dominar les respostes de tipus lleu, a l'intestí anterior van predominar les moderades i, per últim, als cecs pilòrics van dominar les respostes de tipus greu.



Fig.5.4. Imatges al MO de les principals lesions del teixit intestinal que apareixen durant les infeccions per *E. leei*. Tinció HiE. **a.** Compressió mecànica dels enteròcits adjacents als estadis del paràsit. La compressió mecànica es pot observar en la deformació del nucli dels enteròcits (fletxes). **b.** Ondulació de la superfície de la mucosa intestinal. La creixent compressió pot ocasionar el despreniment d'alguns estadis del paràsit (fletxa). **c.** Necrosi de les cèl·lules de la mucosa intestinal associada a la sortida del paràsit (fletxa) cap al lumen intestinal. **d.** Separació de la mucosa de la submucosa adjacent. **e.** Separació de la mucosa de la submucosa i necrosi de la mucosa associada a la sortida del paràsit. **f.** Edema a la submucosa. *Barres:* 20 μm (a-c), 50 μm (d-f).



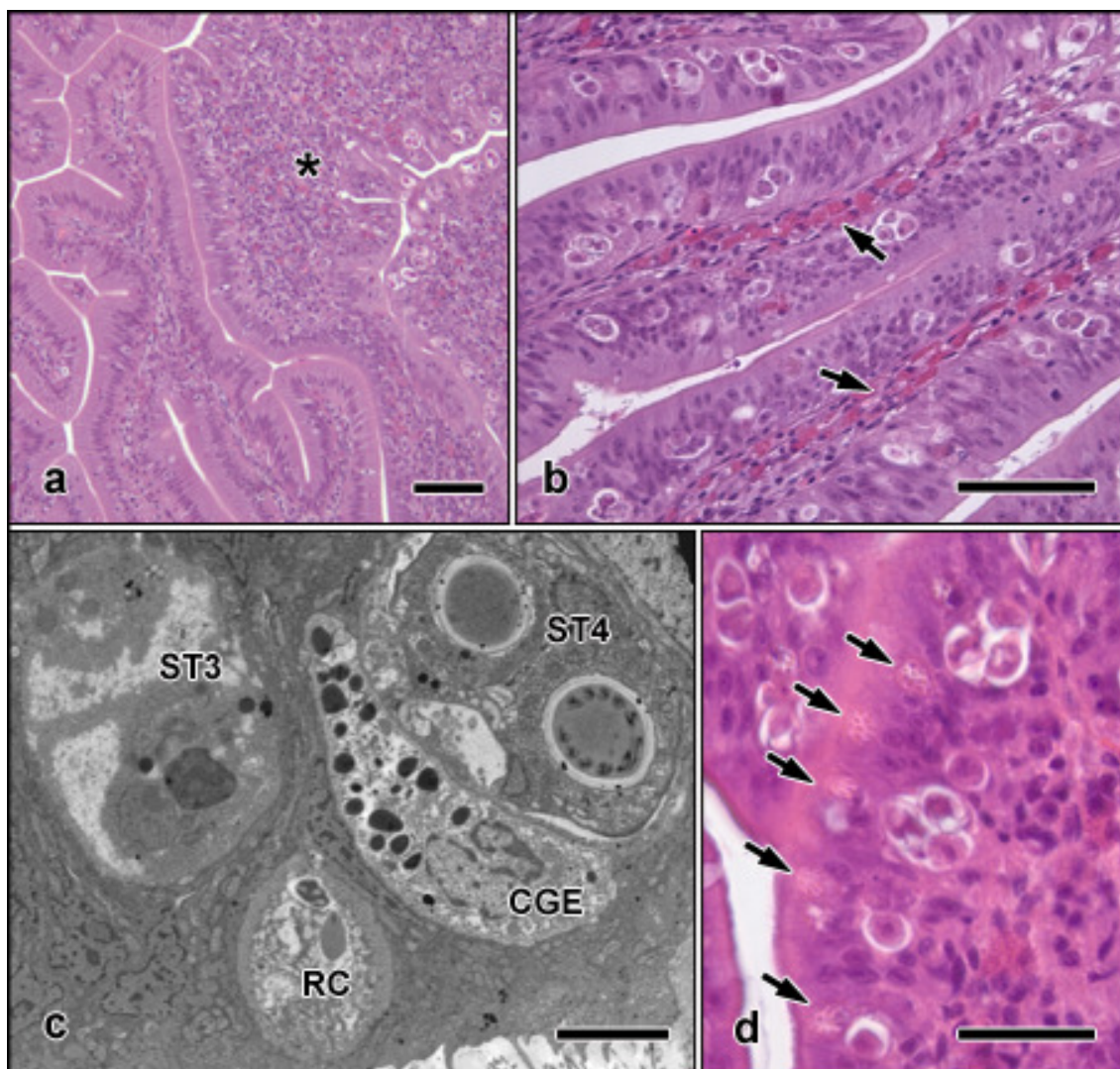


Fig.5.5. Imatges al MO i MET de la resposta de l'hoste front d' *E. leei*. **a.** Engruiximent de la submucosa degut a un increment de cèl·lules inflammatòries. Aquest engruiximent només s'observa en les regions parasitades per *E. leei* (asterisc). **b.** Resposta inflamatòria produïda per un increment de CGE (fletxes) a la submucosa. **c.** Cèl·lula granular eosinòfila (CGE) en contacte amb un estadi ST4 del paràsit i cèl·lula rodlet (RC) a les proximitats d'un estadi ST3. **d.** Increment del nombre de cèl·lules rodlet (fletxes) en una regió de l'epiteli ocupada per estadis d'*E. leei*. Barres: 5 μ m (c), 20 μ m (d), 50 μ m (b i c).

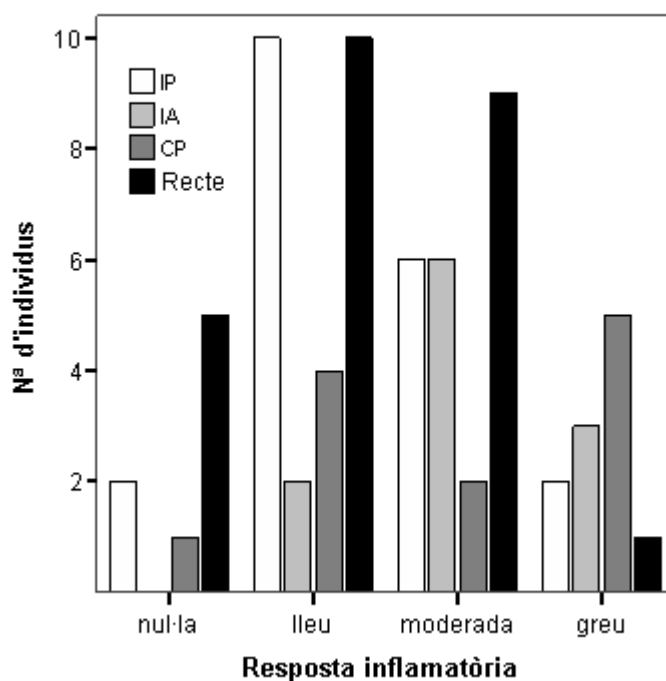


Fig.5.6. Nombre d'orades R parasitades durant la infecció C1 que presentaven algun tipus de reacció inflamatòria. IP: Intestí posterior, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

5.3.2. Infecció per ingestió en orades adultes (O1)

5.3.2.1. Progressió de la infecció

Les primeres orades infectades es van observar el dia 16 després de la ingestió del paràsit (d.i.). En aquestes, el paràsit es va poder observar formant agrupacions d'extensió variable que incloïen diversos estadis de desenvolupament des de ST2 fins a ST5, amb predomini d'estadis ST3 i ST4. En general, els estadis ST4 i ST5 es situaven al nucli de l'agrupació mentre que els estadis ST3 i ST4 es situaven a la perifèria. En tots els casos, els estadis es van localitzar entre els enteròcits de la mucosa intestinal i, ocasionalment, sobre les microvellositats dels enteròcits (només al recte) o bé lliures al lumen intestinal barrejats amb mucus i altres restes cel·lulars. En aquest primer dia de mostreig, més de la meitat de les orades R infectades (62,5%) van presentar un únic tram intestinal infectat, que en la majoria de casos (60%) va resultar ser els cecs pilòrics (Fig.5.7). Tot i que els cecs pilòrics van ser el tram més freqüentment afectat, la intensitat mitjana del paràsit en aquest tram va ser lleugerament inferior a la intensitat a l'intestí posterior i el recte (Fig.5.8).

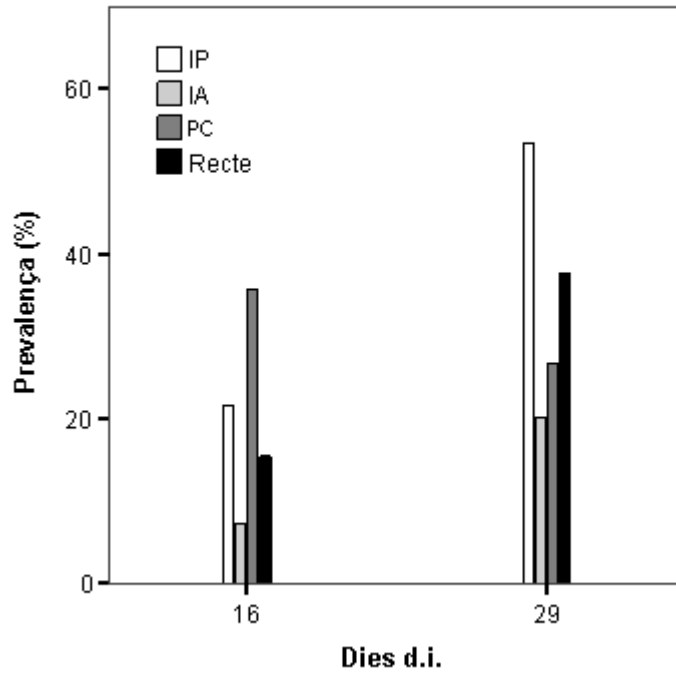


Fig.5.7. Prevalença de la infecció O1 en cada tram intestinal al llarg de l'experiment. IP: Intestí posterior, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

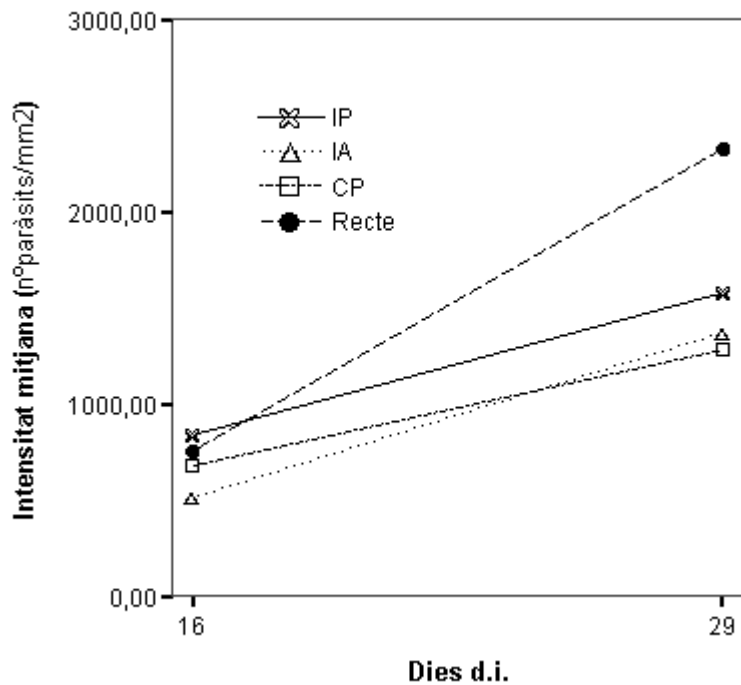


Fig.5.8. Evolució de la intensitat mitjana del paràsit en cada tram intestinal durant la infecció O1. Cada punt representa la intensitat mitjana del paràsit en cada dia de mostreig. IP: Intestí posterior, IA: Intestí anterior, CP: cecs pilòrics.

El dia 29 d.i., el paràsit sempre es va trobar formant agrupacions d'estadis ST2 a ST5 a la mucosa (entre els enteròcits o sobre el microvilli) o al lumen de l'intestí. La prevalença de la infecció també es va mantenir elevada en aquest segon i últim dia de mostreig (Taula 5.2).

Taula 5.2. Prevalença (P) i prevalença acumulada (P_A) de la infecció O1 en cada dia de mostreig.

	<i>Dies de cohabitació</i>	
	<i>16</i>	<i>29</i>
<i>P (%)</i>	78,57	86,66
<i>P_A (%)</i>	57,14	73,33

En aquest cas, però, es va observar que la majoria d'orades infectades (63,36%) presentaven més d'un tram intestinal afectat que sempre incloïa el recte i/o l'intestí posterior. A més, quan les orades presentaven un únic tram afectat (36,64% dels casos), aquest solia ser el recte (75%). Per tant, respecte el mostreig anterior (dia 16 d.i.) no només es va observar un augment del nombre de trams afectats sinó un canvi en la freqüència d'infecció d'algun d'ells. Així, els cecs pilòrics van ser l'únic tram intestinal en què es va produir una disminució de prevalença amb el temps (Fig.5.7). Tot i les diferències observades en les prevalences d'infecció dels diversos trams intestinals, només l'intestí anterior va presentar un risc significativament menor de ser parasitat que l'intestí posterior al llarg de tot l'experiment (Taula 5.3). Així com en la infecció anterior (C1), en la infecció O1 tampoc no es van poder observar orades R infectades que presentessin una infecció total i contínua de la mucosa intestinal al final de l'experiment.

Taula 5.3. Valors significatius de les estimacions *odds ratio* del model de regressió logística amb mesures repetides pel tram intestinal.

		<i>Estimació odds ratio</i>			
		<i>Estimació</i>	<i>g.l.</i>	<i>95% límits confiança</i>	
Intestí anterior	Intestí posterior	0,736	104	0,069	0,995

Pel que fa a la intensitat mitjana del paràsit, es va observar una tendència al creixement al llarg del temps en tots els trams intestinals, que va ser més marcada al recte (Fig.5.8). D'altra banda, aquesta intensitat es va mantenir més elevada al recte i a l'intestí posterior que a l'intestí anterior i als cecs pilòrics (Fig.5.8).

En aquesta infecció tampoc no es van observar estadis del paràsit en cap altre teixit que no fos la mucosa de l'intestí o dels cecs pilòrics de les orades R infectades. Tampoc es van observar estadis del paràsit en les orades C.

5.3.2.2. Lesions i reacció inflamatòria

Les lesions que van aparèixer en el transcurs de la infecció van ser similars que en la infecció C1. Des del començament (dia 16 d.i.), es va poder observar la compressió mecànica de les cèl·lules de la mucosa i l'ondulació de la superfície de l'epiteli intestinal ocasionada per la pressió exercida pel paràsit. A més, i també des del primer dia de mostreig, es van poder observar la separació de trossos parasitats de mucosa de la submucosa adjacent i l'aparició d'edemes a la submucosa a l'intestí anterior i als cecs pilòrics. A partir del dia 29 d.i., aquestes lesions es van poder observar en qualsevol tram i, a més, van començar a aparèixer els primers casos de mort cel·lular de les cèl·lules de l'epiteli intestinal associada a la sortida d'estadis del paràsit.

Es va observar que existia una relació positiva i significativa entre la presència del paràsit i l'aparició d'una resposta inflamatòria ($\chi^2 = 54,962$, *g.l.* = 3, $p = 0,000$; $\tau = 0,696$ *g.l.* = 3, $p = 0,000$). La reacció inflamatòria va consistir en un augment de l'abundància relativa del nombre de cèl·lules inflamatòries a la submucosa. En aquest cas, també es va notar una resposta variable en funció del tram intestinal afectat (Fig.5.9). Així, el recte i l'intestí posterior o bé no van presentar cap resposta o bé aquesta va ser lleu. L'intestí anterior va presentar una resposta inflamatòria de tipus moderat. Els cecs pilòrics van reaccionar d'una manera desigual en funció de l'individu. En la majoria de casos, no van presentar cap tipus de resposta però quan la van presentar va ser catalogada com a lleu o greu.

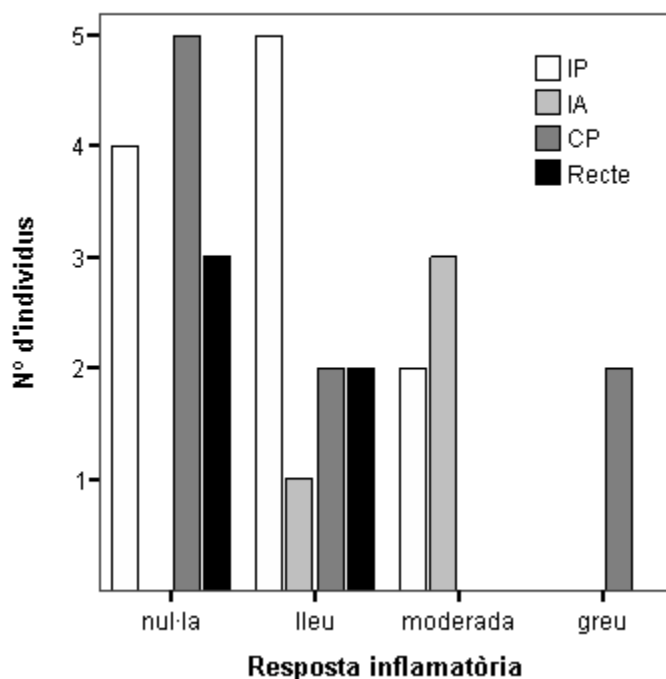


Fig.5.9. Nombre d'orades R parasitades durant la infecció O1 que presentaven algun tipus de reacció inflamatòria. IP: Intestí posterior, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

5.3.3. Infecció per cohabitació en morrudes juvenils (C2)

5.3.3.1. Dades biomètriques

No es van detectar diferències significatives en comparar els valors del FC entre les morrudes R infectades i les morrudes R no infectades en els diferents dies de mostreig. Tampoc no es van detectar diferències significatives quan es va comparar la variació del FC de les morrudes R infectades en els diferents dies de mostreig. D'altra banda, només el dia 38 de cohabitació les morrudes R infectades van presentar un FC significativament més baix que les morrudes C ($Z = -2,00$, $p = 0,046$).

5.3.3.2. Progressió de la infecció

Les primeres espores del paràsit es van poder observar al lumen del tracte digestiu el segon dia de cohabitació. També el segon dia de cohabitació es van detectar trossos d'intestí infectats a l'estómac de 2 morrudes R.

No va ser fins al dia 7 de cohabitació que es van poder detectar les primeres morrudes R infectades. En aquestes es van poder identificar estadis ST1 del paràsit a la mucosa

de les parts mitja i posterior de l'intestí (Fig.5.10). El paràsit en aquest moment ja es trobava afectant el 50% de les morrudes estudiades. En la resta de mostrejos, la prevalença va romandre elevada fins que va assolir el 100% el dia 31 de cohabitació (Taula 5.4).

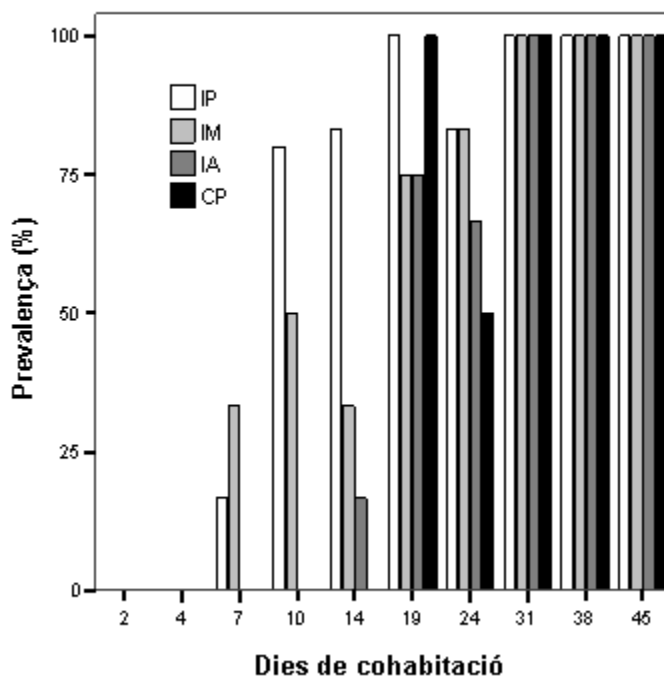


Fig.5.10. Prevalença de la infecció C2 en cada tram intestinal al llarg de l'experiment. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

Taula 5.4. Prevalença (P) i prevalença acumulada (P_A) de la infecció C2 en cada dia de mostreig.

	<i>Dies de cohabitació</i>									
	2	4	7	10	14	19	24	31	38	45
P (%)	0	0	50	66,6	83,3	100	83,3	100	100	100
P_A (%)	0	0	18,75	31,81	42,85	51,5	56,4	62,2	66	68,51

El dia 10 de cohabitació van començar a aparèixer petites àrees de la mucosa de l'intestí posterior i mig ocupades per estadis ST1 a ST3. A partir d'aquest moment i fins al final de l'experiment, es van observar estadis ST2 a ST5 del paràsit al lumen de l'intestí.

El dia 14 de cohabitació el paràsit va començar a ocupar la mucosa de la part més anterior de l'intestí (Fig.5.10). A l'intestí posterior i mig el paràsit seguia ocupant àrees més o menys extenses de l'epiteli, on van començar a aparèixer estadis ST4 i ST5. Per primera vegada, es van observar estadis del paràsit (ST3, ST4 i ST5) molt a prop o en contacte amb les microvellositats dels enteròcits. A partir d'aquest moment va començar a ser freqüent l'observació d'estadis ST3, ST4 o ST5 en contacte amb les microvellositats dels enteròcits.

El dia 19 de cohabitació la infecció ocupava tots els trams de l'intestí i els cecs pilòrics (Fig.5.10). En la meitat dels individus analitzats el paràsit es distribuïa formant una infecció contínua al llarg de l'intestí i els cecs pilòrics, mentre que en l'altra meitat el paràsit es distribuïa formant petites agrupacions. En aquestes agrupacions s'observava que els estadis de proliferació ST2 i ST3 es situaven a la perifèria dels estadis esporogènics (ST4 i ST5). Tant el dia 19 com el 24 de cohabitació, els trams anteriors van presentar un predomini de formes ST3, tot i que ocasionalment es van observar alguns estadis ST4 i ST5. Pel que fa a la intensitat mitjana, es va observar que en els trams posterior i mig de l'intestí era superior que en l'intestí anterior i els cecs pilòrics a l'inici de la infecció. La major intensitat mitjana del paràsit en els trams posteriors respecte els anteriors es va mantenir fins al final de l'experiment, sobretot pel que fa a la intensitat del tram posterior de l'intestí respecte a la resta de trams (Fig.5.11). Les diferències en la intensitat mitjana del paràsit entre trams intestinals van resultar significatives els dies 14, 24, 31 i 45 de cohabitació (Taula 5.5).

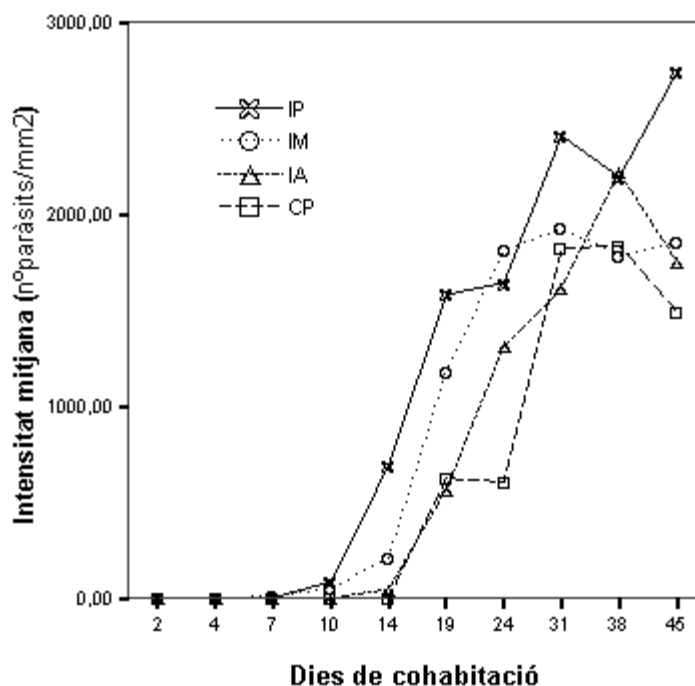


Fig.5.11. Evolució de la intensitat mitjana en cada tram intestinal durant la infecció C2. Cada punt representa la intensitat mitjana del paràsit en cada dia de mostreig. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

Taula 5.5. Valors significatius de les proves de Friedman (χ^2) i ANOVA (F) amb mesures repetides pel tram intestinal.

	χ^2	<i>g.l.</i>	<i>P</i>
Dia 14	13,216	3	0,004
	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>P</i>
Dia 24	20,482	3	0,047
Dia 31	10,303	3	0,043
Dia 45	8,350	3	0,015

A partir del dia 31 de cohabitació en endavant, tots els individus presentaven una infecció contínua, tot i que en la majoria la part més distal dels cecs pilòrics va romandre lliure de la infecció fins al final de l'experiment. Des d'aquest moment i fins al final de l'experiment, es va poder observar qualsevol estadi de desenvolupament (tot i que amb més freqüència estadis ST3 i ST4) coexistent en qualsevol dels trams intestinals. El dia 45 es van observar espores del paràsit al lumen de la vesícula biliar.

En cap altre dels teixits estudiats de les morrudes R es van observar estadis del paràsit. No es van observar estadis del paràsit en les morrudes C. Pel que fa a les mortalitats, només es va registrar una baixa el dia 38 de cohabitació.

Per tant, durant la infecció C2 es va observar que el paràsit anava colonitzant l'intestí de manera progressiva des de la part posterior de l'intestí cap a la part anterior i els cecs pilòrics (Fig.5.10). En aquest sentit, l'intestí anterior i els cecs pilòrics van presentar aproximadament la meitat del risc d'estar infectats que l'intestí posterior al llarg de tot l'experiment (Taula 5.6). A més, es va observar que en arribar a un nou tram intestinal, la intensitat mitjana del paràsit en aquest nou tram creixia de manera significativa a mesura que augmentava el temps de cohabitació (Taula 5.7). Per aquest motiu, la intensitat mitjana va ser sempre més elevada a l'intestí posterior que a la resta de trams estudiats.

Taula 5.6. Valors significatius de les estimacions *odds ratio* del model de regressió logística amb mesures repetides pel tram intestinal.

		Estimació odds ratio			
		<i>Estimació</i>	<i>g.l</i>	<i>95% límits confiança</i>	
Cecs pilòrics	Intestí posterior	0,472	423	0,250	0,892
Intestí anterior	Intestí posterior	0,499	423	0,265	0,939

Taula 5.7. Valors significatius de l'ANOVA amb el temps com a variable.

	<i>F</i>	<i>g.l.</i>	<i>p</i>
Intestí posterior	10,989	6	0,000
Intestí mig	7,994	7	0,000
Intestí anterior	5,279	4	0,006
Cecs pilòrics	0,701	4	0,001

5.3.3.3. Lesions i reacció inflamatòria

L'aparició de lesions a l'epiteli intestinal coincidia amb la presència del paràsit. En aquest cas però, l'augment progressiu de la intensitat del paràsit va permetre observar que la importància estructural i funcional de les lesions es relacionava amb el nombre de paràsits a la mucosa. Així, en infeccions lleus, caracteritzades per una intensitat del paràsit baixa, només es va observar la compressió mecànica de les cèl·lules adjacents al paràsit. En infeccions moderades el creixent nombre de paràsits a la mucosa va

portar a l'aparició d'ondulacions de la superfície de l'epiteli i a la descamació d'alguns enteròcits i dels estadis del paràsit. A més d'aquestes lesions, es van poder observar altres interrupcions de la superfície intestinal com la desaparició de les microvellositats dels enteròcits en aquelles regions en que es produïa la sortida del paràsit (Fig.5.4c). A partir del dia 31 de cohabitació, es va començar a observar el desprendiment de la mucosa intestinal de la submucosa adjacent i la necrosi de l'epiteli intestinal que, sovint, estava associada a l'alliberament del paràsit al lumen. A més, a la submucosa es van observar regions edematoses i hemorràgies. En general, es va observar que les regions intestinals més freqüentment afectades per totes aquestes lesions eren l'intestí anterior i els cecs pilòrics.

Pel que fa a la resposta per part de l'hoste, es va observar que existia una relació positiva i significativa entre la presència del paràsit i l'aparició d'una resposta inflamatòria ($\chi^2 = 138,645$, *g.l.* = 3, $p = 0,000$; $\tau = 0,725$, *g.l.* = 3, $p = 0,000$). Aquesta reacció va ser variable en funció del tram intestinal estudiat: així, mentre que als cecs pilòrics va dominar l'absència de resposta, a l'intestí posterior es va produir una resposta de tipus lleu i a la resta de trams la resposta va ser de tipus moderat (Fig.5.12). En general, la resposta inflamatòria va consistir en un augment de l'abundància relativa del nombre de cèl·lules inflamatòries (sobretot leucòcits) a la submucosa. No obstant, també va ser freqüent l'observació de respostes en que el tipus cel·lular predominant eren les CGE a la submucosa (Fig.5.5b). D'altra banda, també es van observar CGE infiltrades a la mucosa o situades sobre algun estadi aïllat del paràsit sobretot quan les infeccions eren d'intensitat lleu (Fig.5.5c).

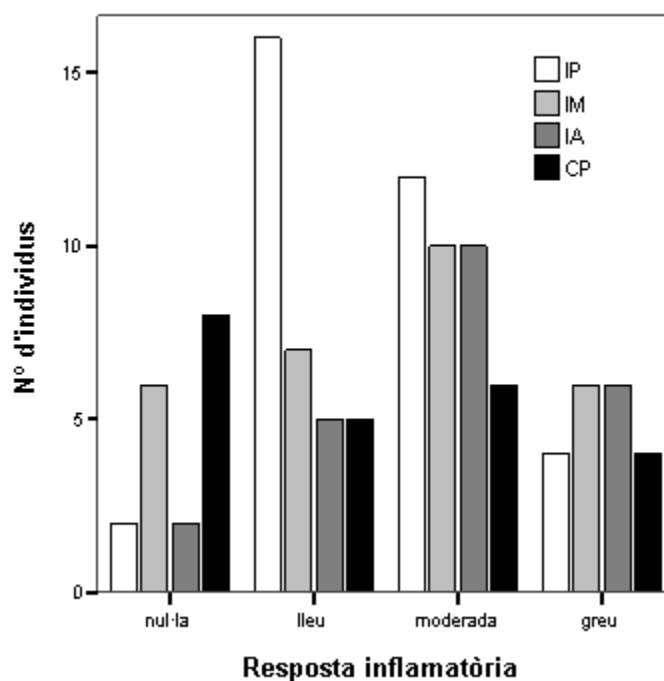


Fig.5.12. Nombre de morrudes R parasitades durant la infecció C2 que presentaven algun tipus de reacció inflammatòria. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior i CP: Cecs pilòrics.

5.3.4. Infecció per cohabitació en orades juvenils (C3)

5.3.4.1. Dades biomètriques

No es van detectar diferències significatives en comparar els valors del FC entre les orades R infectades i les no infectades en els diferents dies de mostreig. Tampoc no es van detectar diferències significatives quan es va comparar la variació del FC entre les orades R infectades en els diferents dies de mostreig. En cap cas es van trobar diferències significatives entre el FC de les orades C i les orades R ni entre les orades C i les orades R infectades.

5.3.4.2. Progressió de la infecció

No va ser fins el dia 31 de cohabitació en què es van poder observar diversos estadis del paràsit (incloent formes ST3 i ST4) afectant una petita regió de l'intestí anterior (Fig.5.13). La prevalença de la infecció va romandre baixa fins al dia 45 de cohabitació. A partir del dia 60 de cohabitació, la prevalença va créixer i va mantenir-se entre el 60 i el 66,6% fins al final de l'experiment (Taula 5.8).

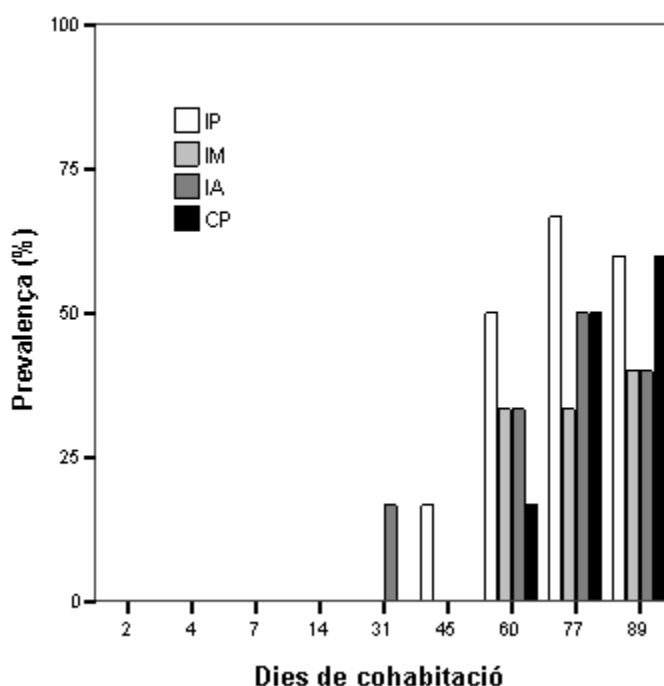


Fig. 5.13. Prevalença de la infecció C3 en cada tram intestinal al llarg de l'experiment. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

Taula 5.8. Prevalença (P) i prevalença acumulada (P_A) de la infecció C3 en cada dia de mostreig.

	<i>Dies de cohabitació</i>								
	2	4	7	14	31	45	60	77	89
P (%)	0	0	0	0	16,66	16,66	66,66	66,66	60
P_A (%)	0	0	0	0	3,33	5,55	14,28	20,83	24,52

El dia 45 de cohabitació es va tornar a observar una petita regió d'intestí posterior infectada. A partir d'aquest moment, es van poder observar estadis ST3, ST4 i ST5 propers a les microvellositats dels enteròcits i també lliures al lumen de l'intestí.

La presència del paràsit en totes les regions de l'intestí va anar creixent gradualment al llarg de l'experiment tot i que va experimentar un lleu descens el dia 89 de cohabitació a les regions anterior i posterior de l'intestí (Fig.5.13).

A partir del dia 60 de cohabitació, coincidint amb l'augment generalitzat de la prevalença, el paràsit ja es podia trobar en petites agrupacions afectant qualsevol part de l'intestí i els cecs pilòrics. En aquestes agrupacions, els estadis més joves (ST2) es situaven preferentment a la perifèria i els estadis més madurs (ST3 i ST4) al centre. A mesura que avançava el temps de cohabitació es va observar que aquests grups augmentaven en nombre però també en mida, de manera que cada vegada més superfície de la mucosa intestinal apareixia afectada. En aquest sentit, al final de l'experiment (89 dies de cohabitació) només es va assolir una infecció contínua del tracte intestinal en un cas. No es van detectar estadis del paràsit en cap altre dels teixits estudiats en les orades R. Tampoc es van observar estadis en les orades C.

El paràsit semblava establir-se indistintament a l'intestí anterior i al posterior formant agrupacions per després anar colonitzant altres regions de l'intestí. A més, es va observar que la intensitat mitjana de la infecció tendia a augmentar amb el temps de cohabitació (Fig.5.14). En cap cas, però, es van detectar diferències significatives en la intensitat mitjana de cada tram al llarg del temps d'infecció. Dins d'aquesta tendència general, l'intestí posterior va presentar una freqüència i una intensitat mitjana de la infecció superior a la resta de trams (Fig.5.13, Fig.5.14). Tot i això, no es van detectar diferències significatives en la intensitat mitjana entre trams intestinals en cada dia de mostreig i tampoc no es van detectar diferències en el risc d'infecció entre trams intestinals.

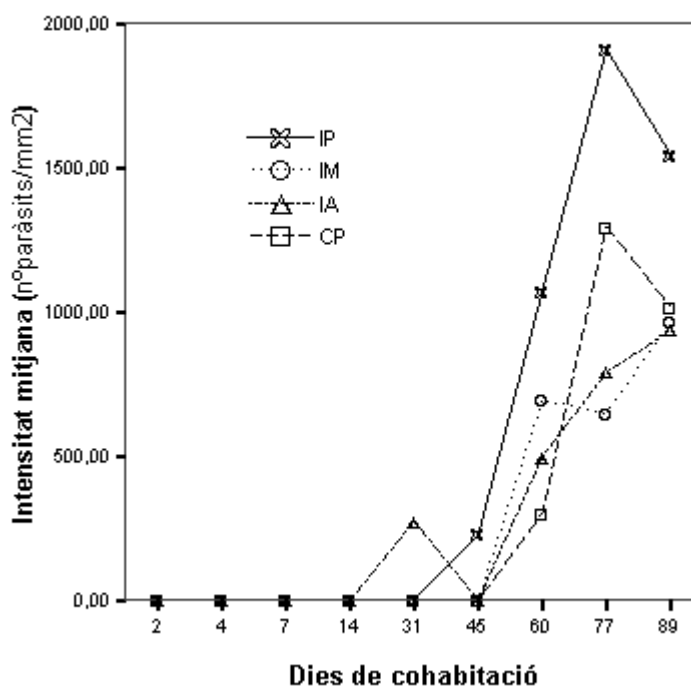


Fig.5.14. Evolució de la intensitat mitjana en cada tram intestinal durant la infecció C3. Cada punt representa la intensitat mitjana del paràsit en cada dia de mostreig. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

5.3.4.3. Lesions i reacció inflamatòria

Exceptuant la compressió mecànica dels enteròcits adjacents al paràsit, les primeres lesions van aparèixer el dia 60 de cohabitació coincidint amb l'augment generalitzat de la prevalença d'infecció i amb l'establiment del paràsit en tots els trams intestinals. Principalment, aquestes lesions van consistir en la separació de porcions infectades de la mucosa intestinal de la submucosa adjacent, en la mort cel·lular més o menys extensa de les cèl·lules de l'epiteli intestinal associada a l'alliberament al lumen d'estadis del paràsit i també en l'aparició de petites regions edematoses a la submucosa de l'intestí. En general, tot i que aquestes lesions podien aparèixer en qualsevol tram intestinal, es va observar que apareixien amb més freqüència a la regió posterior de l'intestí.

Pel que fa a la resposta per part de l'hoste, es va observar que existia una relació positiva i significativa entre la presència del paràsit i l'aparició d'una resposta inflamatòria ($\chi^2 = 89,143$, *g.l.* = 3, *p* = 0,000; $\tau = 0,649$, *g.l.* = 3, *p* = 0,000). En general, tots els trams excepte l'intestí anterior (on van dominar les respostes de tipus lleu) es

va caracteritzar per l'absència de resposta front del paràsit (Fig.5.15). Com en les experiències anteriors (C1, O1 i C2), la resposta inflamatòria va consistir en un augment relatiu de l'abundància relativa de cèl·lules inflamatòries (sobretot leucòcits) a la submucosa. Ocasionalment, i enlloc d'un augment en l'abundància de leucòcits, es va poder observar un augment en l'abundància de CGE a la submucosa. Aquestes cèl·lules també es van trobar properes o en contacte a estadis del paràsit en infeccions d'intensitat lleu. A més, a vegades, es va notar un lleuger augment del nombre de cèl·lules *rodlet* en regions de l'epiteli intestinal ocupades pel paràsit (Fig.5.5d).

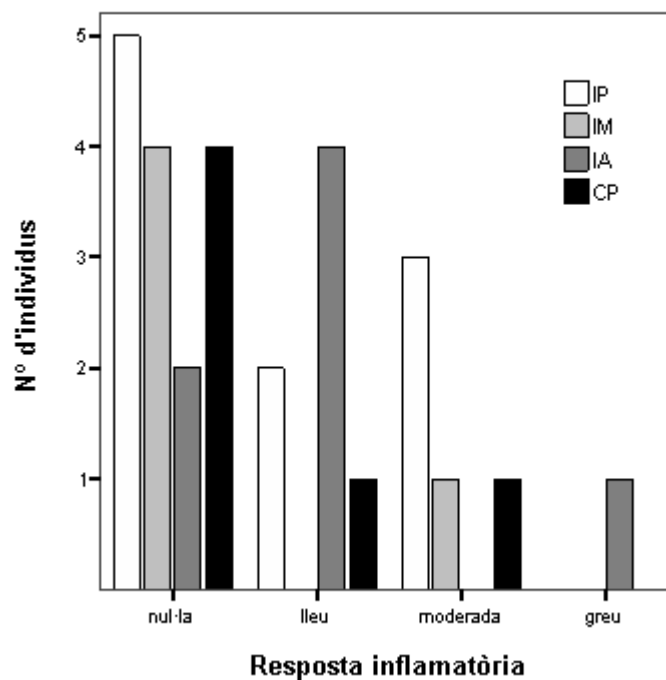


Fig.5.15. Nombre d'orades R parasitades durant la infecció C3 que presentaven algun tipus de reacció inflamatòria. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

5.3.5. Infecció en medi natural de morrudes (N1)

5.3.5.1. Dades biomètriques

No es van detectar diferències significatives en comparar els valors del FC entre les morrudes infectades i les no infectades. Tampoc no es va trobar que existís una relació significativa entre la intensitat mitjana del paràsit en cada tram i el FC de cada individu.

5.3.5.2. Estudi histològic de la infecció

El 53,49% dels individus examinats va presentar algun estadi del paràsit a la mucosa intestinal. En molt pocs casos (un 13%) la infecció es va presentar en forma de petites agrupacions formades exclusivament per estadis proliferatius ST2 i ST3. Al contrari, en la majoria de morrudes parasitades la mucosa intestinal apareixia ocupada per grups d'estadis proliferatius (majoritàriament, ST3) i esporogènics (ST4 i ST5) del paràsit que, rarament (en un 27,27%), van arribar a ser prou extenses com per formar infeccions contínues. En aquests grups, els estadis ST3 eren més abundants al voltant de nuclis d'estadis ST4 i ST5. A més de localitzar-se entre les cèl·lules de la mucosa intestinal, també es van poder observar estadis del paràsit (sobretot ST5) lliures al lumen i freqüentment acompanyats d'altres restes cel·lulars i mucus. Ocasionalment, es van observar estadis ST4 del paràsit propers a les microvellositats dels enteròcits. A part de a l'intestí, no es van detectar estadis del paràsit en cap altre dels teixits estudiats en aquesta infecció.

Pel que fa a la distribució del paràsit, es va observar que aquest es trobava més freqüentment als trams anteriors (intestí anterior i mig) que als trams posteriors (intestí posterior i recte) (Fig. 5.16).

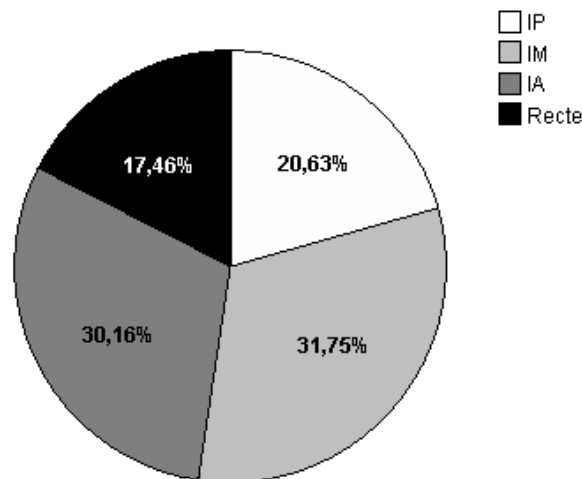


Fig.5.16. Percentatge d'individus parasitats en cada tram intestinal. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

Quan es va comparar la intensitat mitjana en cada tram es va observar que els trams anteriors (intestí anterior i mig), a més, presentaven intensitats del paràsit més elevades que els trams posteriors (intestí posterior i recte) (Fig.5.17). Tot i aquesta tendència general, només es van detectar diferències estadísticament significatives entre la intensitat mitjana de l'intestí mig i el recte ($\chi^2 = 14,136$, *g.l.* = 3, $p = 0,003$; $Z = -2,464$, $p = 0,014$).

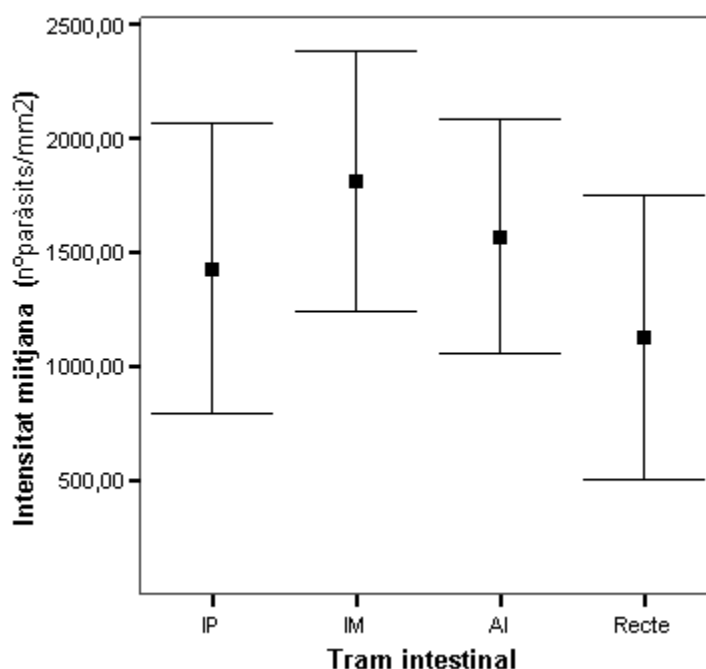


Fig.5.17. Intensitat mitjana expressada com a nº de paràsits /mm² en cada tram en la infecció N1. IP: Intestí posterior; IM: Intestí mig; IA: Intestí anterior.

5.3.5.3. Lesions i reacció inflamatòria

Es va observar que l'aparició de lesions estava relacionada amb la presència del paràsit a l'epiteli intestinal. A més, es va observar que aquestes lesions eren estructuralment i funcionalment més importants com més elevada era la intensitat del paràsit a l'epiteli. Aquestes lesions van consistir en la compressió mecànica de les cèl·lules de l'epiteli intestinal i l'ondulació de la mucosa. També es va observar la descamació i mort cel·lular de les cèl·lules de la mucosa associada a l'alliberament del paràsit al lumen i el desprendiment de seccions de mucosa parasitada de la submucosa adjacent. A més, també es van poder observar petits edemes a la submucosa d'algunes regions de l'intestí.

Pel que fa a la resposta per part de l'hoste, es va observar que existia una relació positiva i significativa entre la presència del paràsit i l'aparició d'una resposta inflamatòria ($\chi^2 = 70,212$, *g.l.* = 3, $p = 0,000$; $\tau = 0,676$, *g.l.* = 3, $p = 0,000$). En la majoria de casos aquesta resposta va ser moderada, exceptuant l'intestí anterior, en què la resposta va ser predominantment lleu (Fig.5.18). Com en la majoria d'infeccions estudiades, la resposta inflamatòria va consistir en un augment de l'abundància relativa de cèl·lules inflamatòries (majoritàriament, leucòcits). Ocasionalment, i coincidint amb intensitats del paràsit lleus, es va observar un augment de l'abundància de CGE a la submucosa o bé infiltrades a la submucosa a prop del paràsit. En aquest darrer cas, també es va poder observar un augment del nombre de cèl·lules *rodlet* al voltant del paràsit.

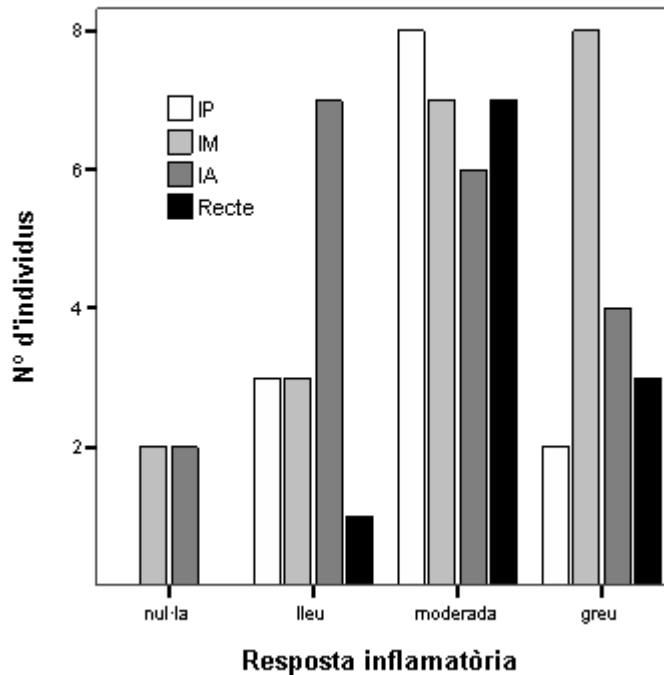


Fig.5.18. Nombre de morrudes parasitades durant la infecció N1 que presentaven algun tipus de reacció inflamatòria. IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior.

5.3.6. Estudi comparatiu de la infecció per *Enteromyxum leei* en diferents situacions experimentals

5.3.6.1. Estudi comparatiu de dues metodologies d'infecció experimentals (cohabitació i infecció oral) en orades adultes: infeccions C1 i O1

L'estudi comparatiu de les infeccions experimentals C1 i O1 va mostrar que la taxa d'infecció de les orades R era sempre més elevada quan el paràsit s'inoculava directament al tracte digestiu (infecció O1). Així, el model de regressió logística va mostrar que el risc d'infecció era aproximadament la meitat (55%) quan el mètode d'infecció utilitzat era la cohabitació (Taula 5.9). També es va observar que els trams posteriors (recte i intestí posterior) mostraven freqüències d'infecció més elevades que els trams anteriors (intestí anterior i cecs pilòrics) al final dels experiments (Fig.5.1, Fig.5.7). En aquest sentit, el model de regressió logística va mostrar que, en general, l'intestí anterior presentava quasi la meitat (0,4 vegades) de la probabilitat de ser infectat que l'intestí posterior (Taula 5.9). D'altra banda, es va observar que en els trams posteriors de l'intestí es produïa un creixement de la prevalença amb el temps independentment del tipus d'infecció (Fig.5.1, Fig.5.7). No obstant, els trams anteriors mostraven un comportament variable en funció del tipus d'infecció i del tram analitzat. En la infecció C1 tant l'intestí anterior com els cecs pilòrics van presentar un comportament homogeni i després d'un lleuger creixement, la freqüència d'infecció romanía més o menys estable al llarg del temps (Fig.5.1). En canvi, en l'experiment O1 es produïa un augment de la prevalença d'infecció amb el temps a l'intestí anterior però una disminució de la prevalença als cecs pilòrics (Fig.5.7).

Taula 5.9. Valors significatius de les estimacions *odds ratio* del model de regressió logística amb mesures repetides pel tram intestinal amb l'espècie com a covariable.

		Estimació odds ratio			
		<i>Estimació</i>	<i>g.l.</i>	<i>95% límits confiança</i>	
Cohabitació	Oral	0,551	493	0,330	0,919
Intestí anterior	Intestí posterior	0,411	493	0,208	0,813

Pel que fa als valors d'intensitat mitjana, en general es va observar que en totes dues infeccions existia una tendència al creixement amb el temps d'infecció en tots els trams intestinals estudiats (Fig.5.2, Fig.5.8). Tot i aquesta tendència general, es va

observar que en la infecció C1, la intensitat tenia tendència a disminuir lleugerament en els últims dies de mostreig (Fig.5.2).

En comparar els valors màxims d'intensitat mitjana assolits al llarg d'ambdós experiments, es va observar que només en el cas de l'intestí posterior la intensitat mitjana màxima era més elevada (tot i que no significativament) en l'experiment C1 que en l'O1 (Taula 5.10).

Taula 5.10. Valors màxims d'intensitat mitjana (\pm desviació estàndard) assolits durant les infeccions per cohabitació (C1) i per ingestió forçada d'estadis del paràsit (O1). Entre parèntesi s'indiquen els dies en què es van assolir aquests valors màxims.

Tram intestinal	Infecció experimental	
	C1	O1
Recte	2020,39 \pm 320,74 (dia 56)	2325,31 \pm 593,70 (dia 29)
Intestí posterior	2606,50 \pm 1441,44 (dia 42)	1576,86 \pm 332,24 (dia 29)
Intestí anterior	1716,24 \pm 157,26 (dia 56)	1371,29 \pm 300,87 (dia 29)
Cecs pilòrics	1317,98 \pm 71,79 (dia 56)	1280,30 \pm 494,41 (dia 29)

Pel que fa a les lesions causades per la presència del paràsit a l'epiteli intestinal, es va observar que, en general, el paràsit causava el mateix tipus de danys en ambdues infeccions experimentals. Tot i això, es va veure que aquestes lesions apareixen abans en la infecció O1 (dia 16 d.i.) que en la infecció C1 (dia 42 de cohabitació).

Pel que fa a la reacció inflamatòria també es van observar diferències (Fig.5.6, Fig.5.9): en la infecció oral es va observar una tendència general de tots els trams intestinals a no reaccionar, mentre que en la infecció per cohabitació es va observar una tendència al desenvolupament de reaccions moderades o lleus. Per tant, en general, la reacció inflamatòria va ser més intensa en la infecció per cohabitació. D'altra banda, també es va observar que, en ambdues infeccions, els trams posteriors tenien tendència a reaccionar més dèbilment que els trams anteriors, que tendien a fer-ho de forma moderada (intestí anterior) i, fins i tot, greu (cecs pilòrics).

5.3.6.2. Estudi comparatiu de la infecció en la morruda i l'orada emprant el mateix mètode d'infecció (cohabitació): infeccions C2 i C3

En realitzar l'estudi comparatiu de la infecció per cohabitació entre ambdues espècies es va veure que la infecció començava abans a les morrudes (dia 7 de cohabitació) que a les orades (dia 31 de cohabitació). En el primer cas, a més, es van assolir

prevalences d'infecció més elevades en menor temps. Així, el dia 19 de cohabitació el 100% de morrudes R ja estaven infectades, mentre que el dia 60 de cohabitació només un 66,6% de les orades R estaven infectades. A més, a partir del dia 31 de cohabitació la majoria de morrudes R analitzades presentaven una infecció contínua i total de l'intestí mentre que una infecció d'aquest tipus només es va poder observar un cop en les orades R i al final de l'experiment. Per tant, totes les observacions experimentals semblen indicar que la progressió del paràsit és més ràpida en el cas de les morrudes. En aquest sentit, quan es va comparar el risc d'infecció que presentaven ambdues espècies es va veure que el risc en la morruda era unes 6 vegades i mitja superior al risc en l'orada (Taula 5.11).

Taula 5.11. Valors significatius de les estimacions *odds ratio* del model de regressió logística amb mesures repetides pel tram intestinal quan l'espècie s'usa com a covariable.

		Estimació odds ratio			
		<i>Estimació</i>	<i>g.l.</i>	<i>95% límits confiança</i>	
Morruda	Orada	6,532	423	4,001	10,664
Cecs pilòrics	Intestí posterior	0,472	423	0,250	0,892
Intestí anterior	Intestí posterior	0,499	423	0,265	0,939

Quan es va analitzar la progressió de la infecció en cada tram intestinal es va veure que en la morruda el paràsit s'establí a l'intestí posterior i, gradualment, progressava cap a zones anteriors de l'intestí fins a afectar-ne la totalitat. A l'orada, en canvi, el paràsit semblava establir-se a l'atzar formant petites agrupacions. Aquestes agrupacions creixien i a la vegada, anaven apareixent-ne de noves al llarg de l'intestí sense seguir cap sentit en concret. Tot i que tant l'establiment com la progressió del paràsit eren diferents en ambdues espècies, es va observar que la taxa d'infecció era sempre superior en l'intestí posterior que en la resta de trams. En aquest sentit, el model de regressió logística va mostrar que, en general, l'intestí anterior i els cecs pilòrics presentaven aproximadament la meitat del risc d'infecció que l'intestí posterior (Taula 5.11).

Quan es van comparar els valors màxims d'intensitat mitjana assolits al llarg d'ambdós experiments, es va observar que només en el cas dels cecs pilòrics la intensitat mitjana màxima era més elevada (tot i que no significativament) en l'experiment C3 que en el C2 (Taula 5.12).

Taula 5.12. Valors màxims d'intensitat mitjana (\pm desviació estàndard) assolits durant les infeccions per cohabitació en morrudes juvenils (C2) i en orades juvenils (C3). Entre parèntesi s'indiquen els dies en què es van assolir aquests valors màxims.

Tram intestinal	Infecció experimental	
	C2	C3
Intestí posterior	2738,82 \pm 261,73 (dia 45)	2866,12 \pm 278,00 (dia 77)
Intestí mig	2171,36 \pm 337,10 (dia 24)	2082,88 \pm 346,79 (dia 60)
Intestí anterior	2219,19 \pm 269,84 (dia 38)	2338,68 \pm 358,48 (dia 80)
Cecs pilòrics	1839,02 \pm 233,94 (dia 38)	2590,87 \pm 193,89 (dia 77)

Tant en la infecció C2 com en la C3, les lesions van aparèixer a la vegada que ho feia el paràsit i la seva importància estructural i funcional creixia a mesura que ho feia la intensitat del paràsit. Així, tot i que no es van poder notar diferències quant a la tipologia de les lesions, sí que es van poder detectar diferències en la seva aparició, que va ser més tardana en el cas de l'orada.

Pel que fa a la reacció inflamatòria, es va observar que en ambdues espècies es produïa un augment de l'abundància relativa del nombre de cèl·lules inflamatòries (leucòcits i/o CGE) a la submucosa o bé en una acció localitzada de les CGE sobre alguns estadis del paràsit a la mucosa. La intensitat d'aquesta resposta, però, va ser major en el cas de la morruda que en el cas de l'orada. Així, en la majoria de casos la morruda va reaccionar de forma lleu o moderada (en funció del tram) vers el paràsit, mentre que en l'orada va dominar l'absència de resposta.

5.3.6.3. Estudi comparatiu de la infecció entre orades juvenils i orades adultes emprant el mateix mètode d'infecció (cohabitació): infeccions C1 i C3

L'estudi comparatiu de les infeccions C1 i C3 va permetre observar que l'establiment de la infecció es produïa abans en les orades adultes que en les orades juvenils en tots els trams excepte l'intestí anterior (Fig.5.1, Fig.5.13). A més, en les orades adultes es va observar que mentre que aquest establiment es produïa sobretot als trams posteriors de l'intestí (intestí posterior i recte), en les orades juvenils ho feia quasi indistintament a l'intestí anterior o posterior. El percentatge d'individus parasitats en cada tram intestinal al llarg del temps també va evolucionar de manera diferent en cada una de les edats. Així, mentre que en les orades adultes es va produir un creixement de la prevalença més marcat a l'intestí posterior i al recte, en les orades

juvenils es va produir un creixement més marcat de l'intestí posterior i els cecs pilòrics (Fig.5.1, Fig.5.13). Tot i que la progressió de la infecció en orades juvenils i adultes va ser diferent, en cap de les dues edats es va aconseguir observar infeccions contínues. A més, els valors de prevalença i prevalença acumulada es van mantenir relativament baixos (Taula 5.8, Taula 5.1).

Pel que fa a la intensitat mitjana, en tots dos casos es va produir un creixement irregular de la intensitat mitjana en cada tram al llarg del temps. Tot i això, quan es van comparar les intensitats mitjanes de cada tram en dies de mostreig relativament propers es va observar que en gairebé tots els trams la intensitat mitjana era més elevada en les orades juvenils que en les adultes. Aquests valors només van ser significativament diferents a l'intestí posterior entre els dies 72 (C1) i 77 (C3) de cohabitació ($Z = -2,141$, $p = 0,032$) (Taula 5.13). A més, es va observar que les intensitats mitjanes màximes assolides al llarg de l'experiment eren superiors en les orades juvenils que en les adultes sent aquestes diferències significatives a l'intestí posterior ($Z = -2,006$, $p = 0,045$) i als cecs pilòrics ($t = 6,951$, $g.l. = 5$, $p = 0,001$) (Taula 5.14).

Taula 5.13 . Valors d'intensitat mitjana (\pm desviació estàndard) assolits en alguns dies de mostreig durant les infeccions per cohabitació en orades adultes (C1) i orades juvenils (C3). Entre parèntesi s'indiquen els dies que es comparen.

Infecció experimental		
Tram intestinal	C1 (<i>dia 56</i>)	C3 (<i>dia 60</i>)
Intestí posterior	1894,75 \pm 180,46	2139,46 \pm 334,57
Intestí anterior	1716,24 \pm 157,26	1490,78 \pm 148,00
C1 (<i>dia 72</i>)		
	C1 (<i>dia 72</i>)	C3 (<i>dia 77</i>)
Intestí posterior	1470,87 \pm 246,13	2866,12 \pm 278
Intestí anterior	889,55 \pm 274,08	1578,06 \pm 396,11
Cecs pilòrics	877,68 \pm 120,95	2590,87 \pm 193,88

Taula 5.14. Valors màxims d'intensitat mitjana (\pm desviació estàndard) assolits durant les infeccions per cohabitació en orades adultes (C1) i orades juvenils (C3). Entre parèntesi s'indiquen els dies en què es van assolir aquests valors màxims.

Tram intestinal	Infecció experimental	
	C1	C3
Intestí posterior	2606,50 \pm 1441,44 (dia 42)	2866,12 \pm 278,00 (dia 77)
Intestí anterior	1716,24 \pm 157,26 (dia 56)	2338,68 \pm 358,48 (dia 80)
Cecs pilòrics	1317,98 \pm 71,78 (dia 56)	2590,87 \pm 193,89 (dia 77)

En les dues infeccions, les lesions van aparèixer en el mateix moment que ho feia el paràsit i van ser fonamentalment les mateixes.

La resposta inflamatòria es va ser més intensa en les orades adultes que en les orades juvenils, en què era pràcticament nul·la (Fig.5.6, Fig.5.15) En les orades juvenils l'intestí anterior va ser el tram que va reaccionar amb més freqüència (de manera lleu) i en les orades adultes gairebé tots els trams reaccionaven de forma moderada o lleu (els trams posteriors ho feien més freqüentment de manera lleu). La reacció inflamatòria es va caracteritzar en ambdues infeccions per un augment de l'abundància relativa del nombre de leucòcits a la submucosa. Tot i això, el número de casos en que es produïa un augment de l'abundància relativa de CGE a la submucosa era superior en les orades juvenils que en les adultes (en aquestes últimes es produïa molt rarament). A més, en les orades juvenils va ser superior el nombre de casos en què aquestes cèl·lules es van trobar properes o en contacte a estadis de desenvolupament del paràsit i també, el nombre de casos en què es va produir un augment del nombre de cèl·lules *rodlet*.

5.3.6.4. Estudi comparatiu de les infeccions experimentals i la infecció natural

En comparar la infecció en morrudes provinents d'un brot d'enteromixosi (N1) amb la resta d'infeccions realitzades en condicions de laboratori, es va observar que les prevalences de la infecció N1 eren relativament moderades (53,49%) i es situaven entre els valors màxims i mínims aconseguits durant les infeccions experimentals.

Quan es va analitzar la prevalença en cada tram intestinal, es va observar que en la infecció natural els trams anteriors de l'intestí (intestí anterior i mig) eren els que presentaven taxes d'infecció i intensitats mitjanes més elevades (Fig.5.16, Fig.5.17). En canvi, a la resta d'infeccions experimentals eren els trams posteriors els que normalment presentaven freqüències d'infecció i intensitats mitjanes més elevades.

No es van trobar diferències significatives quan es comparar els valors de la intensitat mitjana màxima assolida en cada tram entre les diferent infeccions estudiades (Taula 5.15).

Taula 5.15. Valors màxims d'intensitat mitjana (\pm desviació estàndard) assolits durant les infeccions experimentals (C1, C2, C3 i O1) i la infecció natural (N1). IP: Intestí posterior, IM: Intestí mig, IA: Intestí anterior, CP: Cecs pilòrics.

	Infecció				
	C1	C2	C3	O1	N1
Recte	2020,39 (\pm 320,74)			2325,31 (\pm 593,70)	2260,79 (\pm 349,04)
IP	2606,50 (\pm 1441,44)	2738,82 (\pm 261,73)	2866,12 (\pm 278,00)	1576,86 (\pm 332,24)	2527,95 (\pm 269,89)
IM		2171,36 (\pm 337,10)			2085,13 (\pm 265,42)
IA	1716,24 (\pm 157,26)	2219,19 (\pm 269,84)	2338,68 (\pm 358,48)	1371,29 (\pm 300,87)	1898,39 (\pm 234,71)
CP	1317,98 (\pm 71,78)	1839,02 (\pm 233,94)	2590,87 (\pm 193,89)	1280,30 (\pm 494,41)	

Com en la resta d'infeccions, les lesions també van aparèixer en regions de l'intestí infectades pel paràsit i van ser similars a les observades en la resta d'infeccions.

Pel que fa a la resposta inflamatòria, es va observar que la infecció N1 presentava característiques comunes a la infecció en morrudes juvenils C2, ja que en tots dos casos es produïa una reacció predominantment moderada en tots els trams intestinals. D'altra banda i igual que en la infecció C2 (i C3), en la infecció N1 es va poder observar que, ocasionalment i coincidint amb intensitats del paràsit lleus, la resposta inflamatòria també podia estar caracteritzada per un augment en l'abundància relativa de CGE a la submucosa o bé infiltrades a la submucosa a prop del paràsit i acompanyades d'un augment del nombre de cèl·lules *rodlet* al voltant del paràsit.

5.4. DISCUSSIÓ

5.4.1. Invasió d'*Enteromyxum leei* dins l'hoste

En la majoria d'infeccions estudiades, els estadis del paràsit sempre es van trobar al tracte digestiu i, només en el cas de la infecció C2 es van trobar espores al lumen de la vesícula biliar. Els estadis del paràsit que es van trobar al tracte digestiu sempre es

van observar al lumen (a l'estómac, als cecs pilòrics i a l'intestí) o bé entre les cèl·lules de la mucosa intestinal i dels cecs pilòrics. En la majoria d'estudis, *E. leei* es troba ocupant la mucosa o el lumen de l'intestí i rarament s'ha trobat envaint altres teixits (Alvarez Pellitero i col. 2008, Cuadrado i col. 2008). Per aquest motiu i donat que el tracte digestiu manté una comunicació directa amb el medi extern a través de la boca i l'anús, el paràsit podria envair directament la mucosa intestinal des del medi extern a través de dues vies: oral i anal.

Pel que fa a la via oral, la ingestió d'estadis del paràsit es pot produir de manera forçada, com en el cas de la infecció O1, o bé es pot produir de manera no forçada a través de la ingestió d'aigua que es dóna de manera passiva en peixos marins, a través de la necrofàgia de peixos parasitats (Padrós i col. 2001) i/o a través de la coprofàgia (Redondo i col. 2002). L'observació d'espores i porcions d'intestí parasitats a l'estómac de les morrudes de l'experiment C2, la presència d'alguns estadis del paràsit a l'intestí anterior o als cecs pilòrics al començament de les infeccions (C1 i C3) i la major taxa d'infecció i intensitat mitjana dels trams anteriors de l'intestí respecte als posteriors a la infecció N1, podrien indicar que la ingestió de material contaminat podria ser una de les vies naturals d'entrada del paràsit a l'organisme (Diamant i Wajsbrodt 1997).

Pel que fa a l'entrada anal del paràsit, sembla que, tot i que l'anús és un orifici de sortida de material de rebuig, *E. leei* tindria la capacitat de penetrar-hi i envair la regió posterior de l'intestí (Marques, comunicació personal). De fet, si seguim el raonament que la infecció s'estableix i es consolida abans en les zones de l'intestí properes a l'entrada de paràsit (Redondo i col. 2002), l'anús seria la principal via d'entrada del paràsit a l'organisme ja que aquest es detecta i assoleix intensitats mitjanes i prevalences més elevades.

5.4.2. Dispersió d'*Enteromyxum leei* dins l'hoste

Com s'ha comentat en l'apartat anterior, en el present estudi els estadis d'*E. leei* s'han trobat, majoritàriament, al lumen o a la mucosa intestinal i dels cecs pilòrics. Mai no s'han observat estadis del paràsit a la *lamina propria* de l'intestí, ni al teixit connectiu ni els vasos sanguinis de la submucosa intestinal. Aquests resultats fan pensar que l'única via de dispersió del paràsit és l'intestí. En canvi, en altres estudis com el d'Alvarez-Pellitero i col. (2008), sí que s'han observat estadis d'*E. leei* en altres ubicacions que inclouen les anteriorment descrites i la melsa, les brànquies o la sang. Aquests autors suggereixen que, tal i com succeeix en altres espècies del gènere *Enteromyxum* (Redondo i col. 2004), el paràsit es dispersa a través del sistema circulatori i envaeix l'epiteli intestinal des de la làmina basal.

Per tant, a partir dels resultats obtinguts en aquest i altres estudis, en la dispersió d'*E. leei* en el seu hoste podrien coexistir dues estratègies. Una primera estratègia consistiria en la dispersió del paràsit a través del sistema circulatori i la seva entrada a la mucosa intestinal a través de la làmina basal (Alvarez-Pellitero i col. 2008). La segona estratègia consistiria en l'entrada i dispersió a través del lumen intestinal. Així, des d'un focus d'infecció a la mucosa intestinal, els estadis infectius del paràsit serien alliberats al lumen i viatjarien a través d'aquest fins a zones no infectades de l'epiteli intestinal, on penetrarien. Aquesta segona via de dispersió és la que probablement es produeix en els individus analitzats en el present estudi, ja que durant l'anàlisi histopatològica va ser freqüent l'observació d'estadis del paràsit al lumen intestinal i també en contacte (sobretot espores i estadis ST3) amb les microvellositats dels enteròcits que suggeririen una entrada o sortida del paràsit a través de l'epiteli. A més, com que de manera natural els estadis alliberats tendrien a viatjar en sentit antero-posterior, aquesta segona via de dispersió asseguraria taxes d'infecció i intensitats mitjanes del paràsit més elevades en els trams posteriors de l'intestí.

5.4.3. Evolució de la infecció per *Enteromyxum leei* en diferents condicions experimentals

5.4.3.1. Efecte de l'espècie d'hoste

Quan es comparen els resultats de la infecció C2 amb la resta d'infeccions realitzades per cohabitació (C1 i C3) sembla que l'establiment i la progressió de la infecció en les morrudes juvenils és més ràpida que en les orades. Així, en les infeccions C1 i C3, la infecció apareix en una sisena part de les orades entre dues (C1) i tres (C3) setmanes després que en les morrudes juvenils. A més, les prevalences màximes aconseguïdes en aquestes infeccions (un 58% en la infecció C1 i un 67% en la infecció C3) mai no arriben a ser tan elevades com en les morrudes juvenils (100%). Quan les orades s'infecten a través de la ingestió forçada d'estadis del paràsit, l'establiment i la progressió de la infecció semblen ser similars en les dues espècies. Així, quan el mètode d'infecció és la ingestió oral del paràsit (infecció O1), els primers estadis del paràsit es detecten una setmana després que en les morrudes juvenils però afectant a més de tres quartes parts dels individus examinats. Aquests resultats són molt semblants als obtinguts una setmana després de la primera observació d'estadis en la infecció C2, en què la prevalença es situava al voltant del 84%. A més, com que no es disposen de dades anteriors al setzè dia en la infecció O1 no es pot descartar un establiment anterior del paràsit. Per tant, l'establiment i progressió de la infecció en les morrudes juvenils és més ràpida que en les orades (juvenils i adultes) quan el mètode

d'infecció és la cohabitació però sembla similar quan el mètode d'infecció és la ingestió forçada del paràsit. Tot i això, el fet que només en la infecció C2 s'assolissin prevalences del 100% sumat a l'observació d'infeccions totals i contínues de l'intestí, donarien arguments a favor que la infecció progressa més ràpidament en les morrudes.

Quan es comparen els resultats obtinguts en la infecció C2 amb els obtinguts en altres infeccions per cohabitació en què les morrudes han estat sotmeses a diferents condicions experimentals (temperatura, edat, dies d'exposició i ràtio donador:receptor) (Golomazou i col. 2006b, Muñoz i col. 2007, Alvarez-Pellitero i col. 2008) s'observen resultats similars. En canvi, quan es comparen les infeccions C1 i C3 amb altres estudis de cohabitació realitzats amb orada s'observa que l'establiment del paràsit a l'epiteli intestinal es pot produir abans (als 10 dies) (Cuesta i col. 2006a) i, a més, la taxa d'infecció al final de l'experiment pot ser més elevada (92% als 71 dies) (Sitjà-Bobadilla i col. 2007). Per tant, en el cas d'infeccions per cohabitació, la progressió de la infecció en la morruda sembla ser la mateixa en qualsevol condició experimental i, en canvi, en l'orada el paràsit sembla presentar un comportament variable que ha estat atribuït a diferències en la susceptibilitat de cada estoc (Sitjà-Bobadilla i col. 2007).

5.4.3.2. Efecte de l'edat

A més de la susceptibilitat que pugui presentar cada estoc, en el present estudi s'ha comprovat que, en l'orada, un altre factor que afegeix variabilitat als resultats obtinguts és l'edat. Així, el paràsit apareix abans a les orades adultes que a les juvenils però transcorregut aproximadament el mateix temps, les orades juvenils presenten infeccions més intenses que les orades adultes. Aquest fenomen (que existeixi una dependència de les característiques de la infecció amb l'edat dels individus) no és aïllat, sinó que ha estat descrit per altres autors en altres infeccions per mixosporidis (Alvarez-Pellitero i Sitjà-Bobadilla 1993, Yasuda i col. 2002, Gbankoto i col. 2003, Quiroga i col. 2006).

5.4.3.3. Efecte del mètode d'infecció

L'establiment i la progressió d' *E. leei* en l'orada és diferent en funció de la metodologia emprada per infectar els individus. Així, quan es comparen la infecció C1 i O1 es confirmen els resultats obtinguts per altres autors (Sitjà-Bobadilla i col. 2007) que conclouen que les taxes d'infecció són més elevades i l'establiment de la infecció és més curt quan el mètode d'infecció escollit és la ingestió oral forçada de paràsits. Aquest fenomen (que les infeccions orals donen millor rendiment que la resta de mètodes) sembla ser independent de l'espècie d'hoste i de paràsit ja que s'han

obtingut resultats similars amb *E. scophthalmi* parasitant *Psetta maxima* (Redondo i col. 2002) i *E. leei* parasitant *Takifugu rubripes* (Yasuda i col. 2002). Tot i això, en la morruda, s'ha vist que les infeccions per cohabitació també poden donar taxes d'infecció molt elevades en poc temps (present estudi, Golomazou i col. 2006b, Muñoz i col. 2007, Alvarez-Pellitero i col. 2008). Per tant, per tal d'avaluar si realment l'efectivitat de cada un d'aquests mètodes és independent de l'espècie, caldria realitzar un estudi en què es comparessin l'establiment i les taxes d'infecció de cada un d'aquests mètodes d'infecció en la morruda ja que fins ara, no existeix cap estudi que proporcionï aquesta informació.

5.4.3.4. Efecte del tram intestinal

En la majoria d'infeccions experimentals s'ha observat que existeix una clara tendència del paràsit a establir-se primer a l'intestí posterior i al recte. D'altra banda, també s'ha observat que, al final de les infeccions, el paràsit assoleix taxes d'infecció i/o d'intensitat mitjana més elevades a l'intestí posterior i al recte. En canvi, en la infecció natural N1 es produeix el fenomen contrari i són l'intestí anterior i els cecs pilòrics els que assoleixen taxes d'infecció i d'intensitat mitjana del paràsit més elevades. Aquesta variabilitat en els resultats obtinguts és comuna en les infeccions amb *E. leei*. Així, existeixen estudis en què el paràsit es detecta en primer lloc a l'intestí posterior i mig (aquest últim presenta intensitats d'infecció més elevades) (Muñoz i col. 2007) i altres en què les taxes d'infecció i la intensitat són més elevades a l'intestí anterior (Alvarez-Pellitero i col. 2008). Tot i aquesta aparent variabilitat, el fet que en condicions de camp, la metodologia emprada en el diagnòstic histopatològic i molecular es fonamenti en la detecció del paràsit en el recte o l'intestí posterior fa pensar que és en aquestes zones on, normalment, l'establiment i la multiplicació del paràsit es produeix més ràpidament. De fet, en aquest estudi, les majors prevalences i intensitats mitjanes observades a l'intestí posterior i al recte unides a la menor probabilitat que presenten l'intestí anterior i els cecs pilòrics de ser infectats, semblen indicar que la zona posterior de l'intestí presenta unes característiques que afavoreixen l'establiment i la proliferació del paràsit. Per una banda, l'intestí posterior i el recte estan més exposats que la resta de trams ja que estan pròxims a l'entrada anal i, a més, estan exposats al flux continu d'estadis que provenen de la part anterior de l'intestí. D'altra banda, sembla que l'intestí posterior presenta altres característiques que afavoreixen la proliferació del paràsit i que explicarien perquè durant el primer dia de mostreig de la infecció O1, en què es produeix una entrada oral i forçada del paràsit, la intensitat mitjana segueix essent superior a l'intestí posterior i recte.

5.4.6. Lesions i recció inflamatòria

En general, les lesions que provoca *E. leei* en el seu hoste són les mateixes en qualsevol de les infeccions estudiades. Així, i tal i com succeeix en altres infeccions experimentals amb mixozous entèrics (Bermúdez i col. 2006), l'aparició i la gravetat estructural i funcional de les lesions està directament relacionada amb la presència i la intensitat del paràsit, i no a les característiques de l'hoste. Lesions com l'ondulació de l'epiteli intestinal, la descamació d'enteròcits, la separació i el despreniment de la mucosa de la submucosa adjacent i la necrosi de la mucosa són lesions freqüents observades en el present i altres treballs amb mixozous entèrics (Bartholomew i col. 1989, Branson i col. 1999, Padrós i col. 2001, Tun i col. 2002, Marino i col. 2004, Diamant i col. 2006, Golomazou i col. 2006b). Tot i que l'epiteli apareix seriosament afectat quan la càrrega parasitària és força elevada, sembla que les lesions que provoca *E. leei* sobre els enteròcits no afecten la seva funcionalitat ja que en la majoria d'infeccions no s'observa una disminució significativa del FC dels individus R infectats quan es compara amb els R no infectats ni amb els C.

Pel que fa a la resposta de l'hoste vers el paràsit, la infiltració de leucòcits i de CGE a la submucosa intestinal sembla ser una resposta comuna en les infeccions per mixozous entèrics (Bartholomew i col. 1989, Branson i col. 1999, Tun i col. 2002, Muñoz i col. 2007, Alvarez-Pellitero i col. 2008, Sitjà-Bobadilla i col. 2008). A més, la infiltració de CGE a la mucosa intestinal i l'increment del nombre de cèl·lules *rodlet* a les proximitats d'alguns estadis d'*E. leei* també sembla ser una resposta comuna en peixos afectats per altres paràsits (Tun i col. 2002, Dezfuli i col. 2007, Dezfuli i col. 2008, Sitjà-Bobadilla i col. 2008). *E. leei* activa algun tipus de resposta innata en el seu hoste (Cuesta i col. 2006a, Cuesta i col. 2006b, Golomazou i col. 2006b), que pot ser variable i sembla dependre de l'espècie però també del cas en concret que s'estudia. Així, la resposta inflamatòria que es desencadena en la morruda és de tipus moderada o greu (infeccions C2 i N1 del present treball, Muñoz i col. 2007). En canvi, en l'orada hi ha infeccions en que la resposta és pràcticament nul·la (infeccions O1 i C3 del present treball, Diamant 1992) i n'hi d'altres en què apareix una resposta lleu o moderada (infecció C1). Per tant, existeixen factors específics però també intraespecífics que condicionen la resposta de l'hoste vers el paràsit. Aquests factors intraespecífics podrien estar relacionats amb una regulació de la resposta per part de les cèl·lules intestinals i per tant, amb la interacció hoste-paràsit a nivell d'aquestes cèl·lules (Sitjà-Bobadilla i col. 2008). L'existència d'una regulació *on-site* diferent no només en funció de l'espècie, sinó també en funció de l'edat o del tram intestinal, permetria explicar les diferències que s'han observat en la resposta en aquest i altres treballs.

**6. ESTUDI D'UNA NOVA FORMA DE MIXOSPORIDI
EPI-EPITELIAL EN EL TRANSCURS D'INFECCIONS
EXPERIMENTALS AMB *Enteromyxum leei* EN ORADA
(*Sparus aurata*)**

6.1. INTRODUCCIÓ

El cultiu de l'orada (*Sparus aurata*) és, juntament amb el del llobarro (*Dicentrarchus labrax*), un dels principals cultius de peixos en la regió del Mediterrani. Així, si la producció aquícola total a Europa i la resta del món és de 151.096 t, gairebé un 89% es concentra a Grècia (52,9%), Turquia (15,9%), Espanya (14,8%) i Itàlia (5,9%) (APROMAR 2009). Com a conseqüència, en els darrers anys s'ha produït un establiment massiu de gàbies pel cultiu de l'orada al Mediterrani que ha incrementat la incidència de malalties transmissibles d'origen parasitari (Sitjà-Bobadilla 2004). Entre els paràsits causants d'aquestes malalties en l'orada es troben mixosporidis com *Enteromyxum leei*, *Polysporoplasma sparis*, *Ceratomyxa sparusaurati* o *Leptotheca sparidarum*. Tot i que *E. leei* es considera una amenaça per a la producció d'espàrids al Mediterrani (Golomazou i col. 2004, Palenzuela 2006), l'impacte que tenen la resta de mixosporidis esmentats és difícil d'avaluar (Palenzuela i col. 1997, Palenzuela i col. 1999, Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 2001, Athanassopoulou i col. 2004). Des del punt de vista diagnòstic i epidemiològic, resulta molt important la diferenciació d'aquelles espècies de mixosporidis altament patògenes (com *E. leei*) d'aquelles que no ho són, sobretot, quan els seus estadis inicials i proliferatius són morfològicament similars.

Durant el transcurs d'una sèrie d'infeccions experimentals en orada que tenien per objectiu d'estudiar la diagnosi, patogènia i epidemiologia d'*E. leei* es va detectar un organisme desconegut de morfologia semblant a la d'un mixosporidi ancorat a les microvellositats dels entèrocits de l'epiteli intestinal. Per tal de definir la identitat d'aquest nou mixosporidi i estudiar les característiques de la infecció en el seu hoste es van estudiar les mostres d'aquestes infeccions experimentals al microscopi òptic (MO) i electrònic (ME). A més, i ja que aquest nou mixosporidi epi-epitelial (EE) compartia algunes característiques (com la localització o la patogènia) amb *Enteromyxum fugu*, es van realitzar una sèrie proves de PCR per tal de descartar o confirmar la hipòtesi que aquest nou mixosporidi fos en realitat *E. fugu*.

6.2. MATERIALS I MÈTODES

6.2.1. Material biològic

El material biològic amb què s'ha realitzat el present estudi prové de les infeccions experimentals C1, C4, C5, O1, O2 i N1. Les condicions de cadascuna d'aquestes infeccions es detallen a l'apartat 3.1 "Materials i mètodes. Material biològic" (p. 25-28). Per a l'estudi molecular, es van emprar mostres d'intestí de peix globus (*Takifugu rubripes*) infectat amb *Enteromyxum fugu* cedides pel Dr. Hiroshi Yokoyama.

6.2.2. Tècniques *post mortem*

6.2.2.1. Tècniques de microscòpia òptica i electrònica

La metodologia emprada en el processament dels individus des del seu sacrifici fins a l'obtenció de preparacions per ser observades al MO i al ME es detallen a l'apartat 3.2.1. "Materials i mètodes. Tècniques *post mortem*. Tècniques histològiques" (p. 28-31).

Per a l'observació de les preparacions al MO, la tinció emprada en cada cas va variar en funció de la infecció experimental considerada. Breument i a tall de recordatori, tots els talls histològics es van tenyir amb hematoxilina i eosina (HiE) i els talls provinents de les infeccions C1 i O1 es van tenyir amb Giemsa.

D'altra banda, només es van processar pel seu estudi al ME les mostres dels individus de les infeccions C5 i O2 en què s'havia observat el mixosporidi celozoic en secció histològica. Els talls ultrafins obtinguts es observen mitjançant un microscopi *Hitachi H-7000*.

6.2.2.2. Tècniques moleculars

Degut a la impossibilitat d'obtenir material fresc del mixosporidi EE detectat durant les infeccions experimentals amb *E. leei*, la majoria de les mostres emprades durant el present estudi van consistir en extraccions d'ADN obtingudes a partir de talls de parafina. Els protocols d'extracció d'ADN a partir de teixit en parafina i en fresc es detallen a l'Apèndix (p. 144).

En total es va treballar amb 6 mostres: 4 mostres provenien d'extraccions d'ADN de talls en parafina (mostres de la 1 a la 4) i 2 provenien d'extraccions a partir de teixit fresc (mostres 5 i 6) (Taula 6.1).

En total es van dissenyar 2 parells de reaccions en cadena de la polimerasa (PCR), un parell per detectar específicament *E. leei* (PCR1 i PCR2) i l'altre parell per detectar específicament *E. fugu* (PCR3 i PCR4). Els encebadors d'aquestes reaccions es van dissenyar d'acord amb les seqüències de la subunitat petita de l'ARN ribosòmic (SSU RNAr): AY520574.1 (*E. leei*) i AY520573.1 (*E. fugu*) (GenBank). Les condicions de PCR així com les seqüències dels encebadors que es van emprar es detallen a la Taula 6.2 i a la Taula 6.3.

Taula 6.1. Contingut i origen de les mostres emprades en l'estudi a nivell molecular del mixosporidi EE.

Nº mostra	Contingut	Origen
1	Intestí parasitat per <i>E. leei</i>	Mediterrani, infecció C4
2	Intestí infectat pel mixosporidi EE	Mediterrani, infecció C5
3	Intestí no infectat (Control negatiu)	Mediterrani, orades control, infecció C4
4	Intestí parasitat per <i>E. leei</i> i <i>E. fugu</i>	Japó, infecció a <i>Takifugu rubripes</i> *
5	Intestí parasitat per <i>E. fugu</i>	Japó, infecció a <i>Takifugu rubripes</i> *
6	Intestí parasitat per <i>E. leei</i>	Mediterrani, infecció <i>Diplodus puntazzo</i>

* cortesia del Dr. Hiroshi Yokoyama

Taula 6.2. Components i condicions de les reaccions de PCR (PCR1 a PCR4).

Components	Concentració	Volum ($V_{\text{final}} = 25 \mu\text{l}$)
Tampó (x10)	1x	2,5 μl
dNTP (5 mM)	0,2 mM	1 μl
Encebadors (50 μM)	0,3 μM	0,15 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,75 μl
EcoTag (5 U/ μl)	1 U/ μl	0,2 μl

Desnaturalització	94°C	3 minuts	
Desnaturalització	94°C	20 segons	35 a 40 cicles
Hibridació	60°C	30 segons	
Extensió	72°C	30 segons	
Extensió final	72°C	2 minuts	

Taula 6.3. Seqüències dels encebadors de les reaccions PCR1 a PCR4.

	Encebadors	Seq 5'→3'	Localització	Producte(pb)
PCR1	Eleei-F	tgtccaagttcacatcaatttgat	53 – 77	138
	Eleei-R	gtttctagctagtaaataatgcatattagcacg	160 - 189	
PCR2	EL-F	aataccggagttaaccttttaggtaaac	424 – 451	229
	ELU-R	acgataaaaaggaaatgaatgagaata	625 - 652	
PCR3	Efugu-F	tgtgtaagttccatagcgttatacgat	53 - 80	137
	Efugu-R	caatgcaccccgaaggg	172 - 188	
PCR4	EF-F	ggagcagttccaatgggatt	443 - 462	219
	EFU-R	ctctgcaataaaaagagccaatc	638 - 661	

Per tal de comprovar el contingut de les mostres obtingudes a partir de les extraccions en fresc d'ADN, es va emprar un altre parell de reaccions dissenyades per amplificar *E. leei* (PCR5) i *E. fugu* (PCR6) (Yanagida i col. 2005). Les condicions d'aquestes reaccions i la seqüència dels encebadors es detallen a la Taula 6.4 i a la Taula 6.5.

Taula 6.4. Components i condicions de les reaccions de PCR (PCR5 a PCR6).

Components	Concentració	Volum ($V_{\text{final}} = 25 \mu\text{l}$)
Tampó (x10)	1x	2,5 μl
dNTP (5 mM)	0,2 mM	1 μl
Encebadors (50 μM)	0,3 μM	0,15 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,75 μl
EcoTag (5 U/ μl)	1 U/ μl	0,2 μl

Desnaturalització inicial 95°C	10 minuts	
Desnaturalització	95°C 30 segons	35 cicles
Hibridació	55°C 30 segons	
Extensió	74°C 30 segons	
Extensió final	74°C 7 minuts	

Taula 6.5. Seqüències dels primers emprats en les reaccions PCR5 i PCR6.

	Encebadors	Seq 5'→3'	Localització	Producte(pb)
PCR5	EL-F	ggatattgtcagagtatgtt	591-610	433
	EL-R	agaagccaacgtatatgattta	1004-1024	
PCR6	EF-F	ggagcagttccaatgggatt	443-462	873
	EF-R	agaacctacaattgggtctgt	1297-1316	

6.2.3. Estudis al microscopi òptic

En el present treball es van estudiar mostres d'intestí (de totes les infeccions esmentades a l'apartat 6.2.1), ronyó anterior (només de les infeccions C5 i O2) i vesícula biliar (en totes les infeccions excepte N1). Aquestes preparacions histològiques es van observar en un microscopi òptic *Leica DM 5000B* i un *Olympus BSH2*. A més, es van prendre imatges digitals mitjançant les càmeres *ProgRes C3* i *Leica DC 300* i els programes *ProgRes® CapturePro 2.1* (Jenoptik, Alemanya) i *IM50 v1.2*, respectivament. Les imatges digitals obtingudes al MO i al MET es van estudiar mitjançant el programari *UTHSCSA Image Tool 3.0*. Mitjançant aquest programari, es van poder prendre mides (llargada x amplada) dels estadis de desenvolupament d'*E. leei*.

A partir de les observacions realitzades es va determinar la prevalença (P) de la infecció, que es va definir com el percentatge entre el nombre d'individus infectats (n) respecte el nombre total d'individus examinats (n_T).

$$P = \frac{n}{n_T} \times 100$$

La intensitat de la infecció es va classificar en baixa (1), mitjana (2) o alta (3) en funció de l'abundància relativa del paràsit observada en les seccions histològiques.

6.2.4. Estudis al microscopi electrònic

Tal i com s'ha comentat anteriorment (apartat 6.2.2), només es van processar al ME les mostres que havien donat positiu al MO, i per tant, només es van observar al ME seccions del tracte intestinal (cecs pilòrics, intestí i recte). Aquestes seccions es van observar en un ME de transmissió (MET) *Hitachi H-7000* a 75kV i en un ME de rastreig (MER) *Hitachi S-570*.

6.3. RESULTATS

6.3.1. Localització i patogènia del mixosporidi epi-epitelial

Les observacions realitzades al MO i ME van permetre caracteritzar el mixosporidi EE com a un mixosporidi celozoic entèric que podia presentar-se en infeccions simples o mixtes amb *Enteromyxum leei* (Fig.6.1a, Fig.6.1b). El mixosporidi EE es localitzava a la superfície de la mucosa intestinal, des d'on emetia una sèrie de projeccions citoplasmàtiques que l'ancoraven a les microvellositats dels enteròcits dels peixos afectats. En infeccions mixtes es diferenciava d'*E. leei* perquè aquest darrer acostumava a prendre una posició intercel·lular a l'interior de la mucosa intestinal. Ocasionalment, en infeccions mixtes i avançades d'*E. leei*, es podien observar estadis ST3 i ST5 d'*E. leei* pròxims o en contacte a la superfície de la mucosa intestinal que podrien ser confosos per estadis del mixosporidi EE. En aquest cas, els estadis d'*E. leei* sovint apareixien associats a descamacions dels enteròcits o a altres lesions de l'epiteli intestinal; en canvi, el mixosporidi EE semblava no produir alteracions de l'estructura de la mucosa intestinal.

6.3.2. Morfologia del estadis del mixosporidi epi-epitelial

Estudis al microscopi òptic. Al MO, només va ser possible l'observació d'estadis de proliferació o trofozoïts d'entre 4 i 24 μm ($n = 46$, $\bar{x} = 11,48 \mu\text{m}$ i $s = 4,16 \mu\text{m}$) que mostraven la típica estructura de cèl·lula dins de cèl·lula dels mixosporidis (Fig.6.1). Els estadis més joves estaven constituïts per una cèl·lula primària (P) que incloïa una o més cèl·lules secundàries (S). Els estadis més avançats solien presentar una o dues cèl·lules terciàries (T) a l'interior de les cèl·lules S (Fig.6.1a, Fig.6.1b). Les cèl·lules S solien presentar un o dos nuclis amb un nuclèol prominent i excèntric que presentava una coloració blau clar en tincions Giemsa (Fig.6.1c). L'aspecte del citoplasma d'aquestes cèl·lules era variable: podia ser molt basòfil i compacte o bé més eosinòfil i lax (Fig.6.1d). Les cèl·lules T presentaven un o dos nuclis amb un nuclèol excèntric i solien presentar un citoplasma més basòfil que les cèl·lules S que les contenien (Fig.6.1b, Fig.6.1d).

Estudis al microscopi electrònic. Les observacions al MET i al MER van permetre caracteritzar més detalladament els diferents estadis de desenvolupament del mixosporidi EE. En primer lloc, la superfície dels trofozoïts o de la cèl·lula P era llisa exceptuant la zona que es trobava en contacte amb les microvellositats dels enteròcits (Fig.6.2a, Fig.6.2b). En aquesta zona, la superfície de la cèl·lula P presentava projeccions citoplasmàtiques semblants a pseudopodis que a vegades es ramificaven i que s'estenien cap a la superfície apical dels enteròcits de l'hoste formant una espècie de xarxa (Fig.6.2c). Sovint, entre aquestes projeccions s'observaven estructures membranoses semblants a cossos mielínics. Aquestes estructures també es podien observar juntament amb porcions de microvilli dins de vacúols situats a prop dels pseudopodis (Fig.6.2c).

Estadis proliferatius. L'estadi més jove observat al MET va consistir en una cèl·lula P que contenia una cèl·lula S (Fig.6.2d). Altres estadis més avançats contenien un mínim de dues cèl·lules S que podien contenir una cèl·lula T (Fig.6.1e). La cèl·lula P solia presentar pocs orgànuls, sobretot petits mitocondris i alguns vacúols.

Les cèl·lules S presentaven un citoplasma molt dens amb gran quantitat de ribosomes, petits vacúols i petits mitocondris. El seu nucli, que solia trobar-se proper a la cèl·lula T, era eucromatínic i presentava un nuclèol excèntric (Fig.6.1e). Les cèl·lules S podien aparèixer envoltades d'una membrana vacuolar.

Les cèl·lules T presentaven un citoplasma molt dens degut a la gran quantitat de ribosomes empaquetats al seu citoplasma. El citoplasma d'aquestes cèl·lules també contenia mitocondris de matriu densa i un nucli eucromatínic (Fig.6.1f).

Estadis esporogènics. Només es va poder observar un únic estadi esporogènic (d'aproximadament 15 µm de llargada i 10 µm d'amplada) que consistia en una cèl·lula P que incloïa 2 espores que no estaven envoltades per una membrana vacuolar comuna (Fig.6.3a). Cada esporoblast estava format per dues cèl·lules valvogèniques (CV), dues capsulogèniques (CC) i un esporoplasma que estaven envoltades d'una membrana vacuolar (Fig.6.3b).

Les cèl·lules CC es caracteritzaven per presentar un primordi de càpsula polar i gran quantitat de reticle endoplasmàtic rugós (REr) (Fig.6.3a). A més, al seu citoplasma, es podien observar petits mitocondris amb crestes tubulars i matriu densa. El nucli de les cèl·lules CC es situava lateralment a la cèl·lula, era eucromatínic i presentava un nuclèol excèntric i prominent (Fig.6.3a, Fig.6.3c)

L'esporoplasma, que es localitzava entre les cèl·lules CC, presentava un únic nucli eucromatínic i un citoplasma amb petits mitocondris (Fig.6.3c).

Les cèl·lules CV presentaven una posició externa en relació a la resta de cèl·lules de l'esporoblast i les envoltaven gràcies a l'emissió d'unes projeccions citoplasmàtiques

(Fig.6.3a). Aquestes projeccions es solapaven en els seus extrems i en aquestes regions podien aparèixer densificacions (Fig.6.3a, Fig.6.3d). Al citoplasma de les cèl·lules CV, es podien observar alguns mitocondris i un nucli eucromatínic (Fig.6.3b).



Fig.6.1. Imatges al MO d'estadis proliferatius del mixosporidi EE en infeccions simples (a i d) i mixtes amb *E. leei* (b i c) a l'intestí d'orades (*S. aurata*). **a.** Estadi jove format per una cèl·lula P que engloba una cèl·lula S més basòfila (fletxa). Tinció HiE. **b.** Estadi proliferatiu avançat situat sobre les microvellositats dels enteròcits en què s'observen dues cèl·lules S que contenen una o més cèl·lules T (fletxes) molt basòfiles. A l'interior de l'epiteli s'observen alguns estadis d'*E. leei* (puntes de fletxa). Tinció HiE. **c.** Estadi proliferatiu jove format per dues cèl·lules S a l'interior de les quals es poden observar un nucli blau clar (fletxes). Tinció Giemsa. **d.** Estadis proliferatius en diversos graus de desenvolupament. Les cèl·lules P contenen una o més cèl·lules S. A l'interior de les cèl·lules S, s'hi poden observar fins a dos nuclis amb un nuclèol prominent i excèntric (Ns). A l'interior de les cèl·lules T també es poden observar fins a dos nuclis amb un nuclèol prominent i excèntric (Nt). Tinció blau de toluïdina. *Barres:* 10 µm.

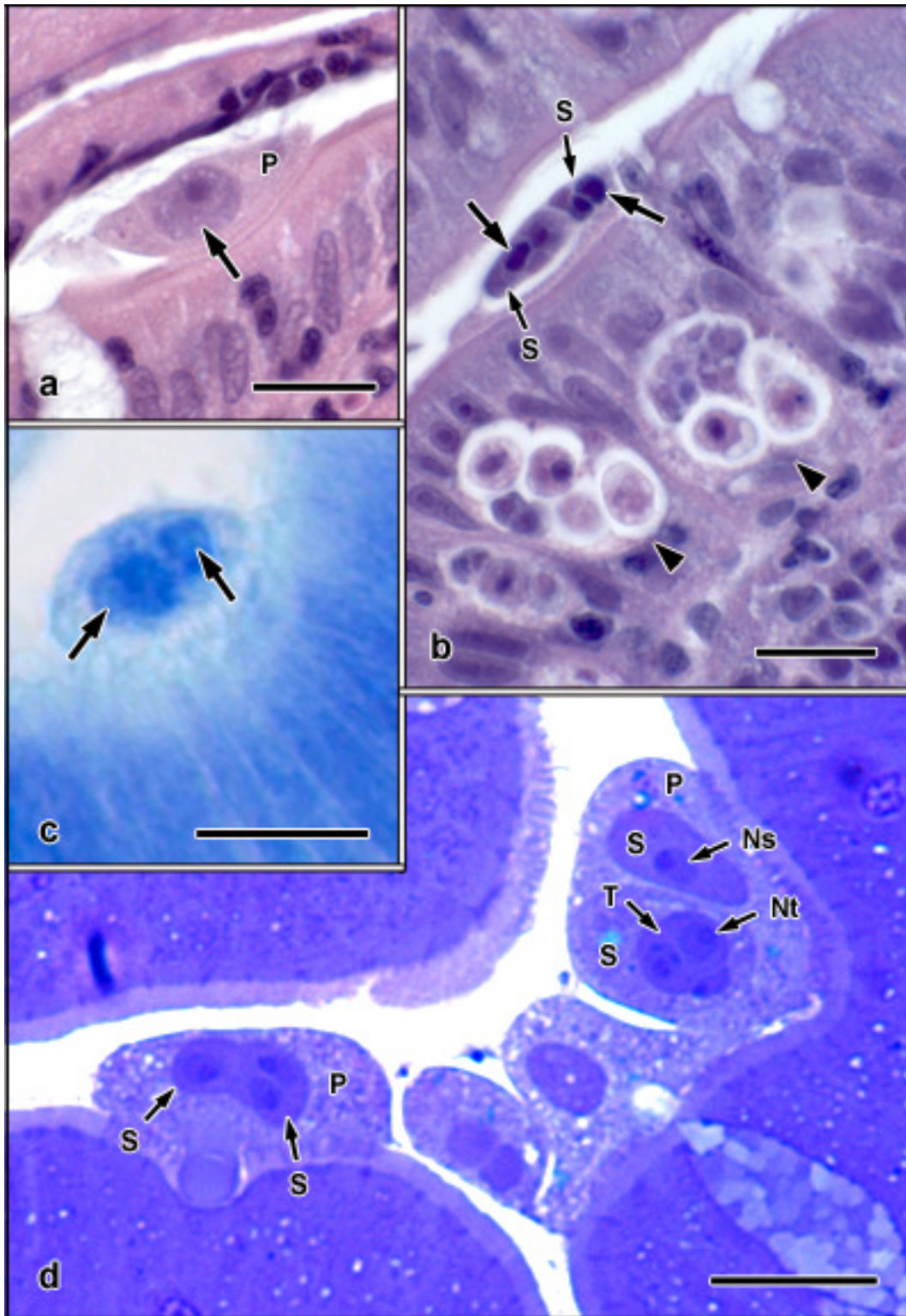




Fig.6.2. Imatges al MER (a) i al MET (b-f) d'estadis de proliferació del mixosporidi EE a l'intestí de l'orada. **a.** Trofozoït sobre la superfície de l'epiteli intestinal. **b.** Trofozoït ancorat sobre la superfície de l'epiteli intestinal a través d'una complicada xarxa formada per projeccions citoplasmàtiques semblants a pseudopodis que s'introdueixen entre les microvellositats de la cèl·lula hoste. **c.** Detall de la xarxa de pseudopodis de la figura anterior (b). Atrapades en aquesta xarxa apareixen tant les microvellositats de la cèl·lula hoste com una sèrie de cossos mielínics (fletxes). **d.** Estadi inicial format per una cèl·lula primària (P) que conté una cèl·lula secundària (S) amb un nucli (Ns). A l'interior del nucli de la cèl·lula S es pot observar un nuclèol excèntric (fletxa). **e.** Detall d'un estadi proliferatiu avançat en què es pot observar la proximitat entre el nucli de la cèl·lula S i una cèl·lula terciària (T). Al citoplasma de la cèl·lula S es poden distingir petits mitocondris. **f.** Cèl·lula T mostrant el seu nucli eucromatínic (Nt) i el seu contingut citoplasmàtic dens format bàsicament per ribosomes i alguns mitocondris. *Barres:* 10 μm (a), 2 μm (b, d i e) i 1 μm (c i f).

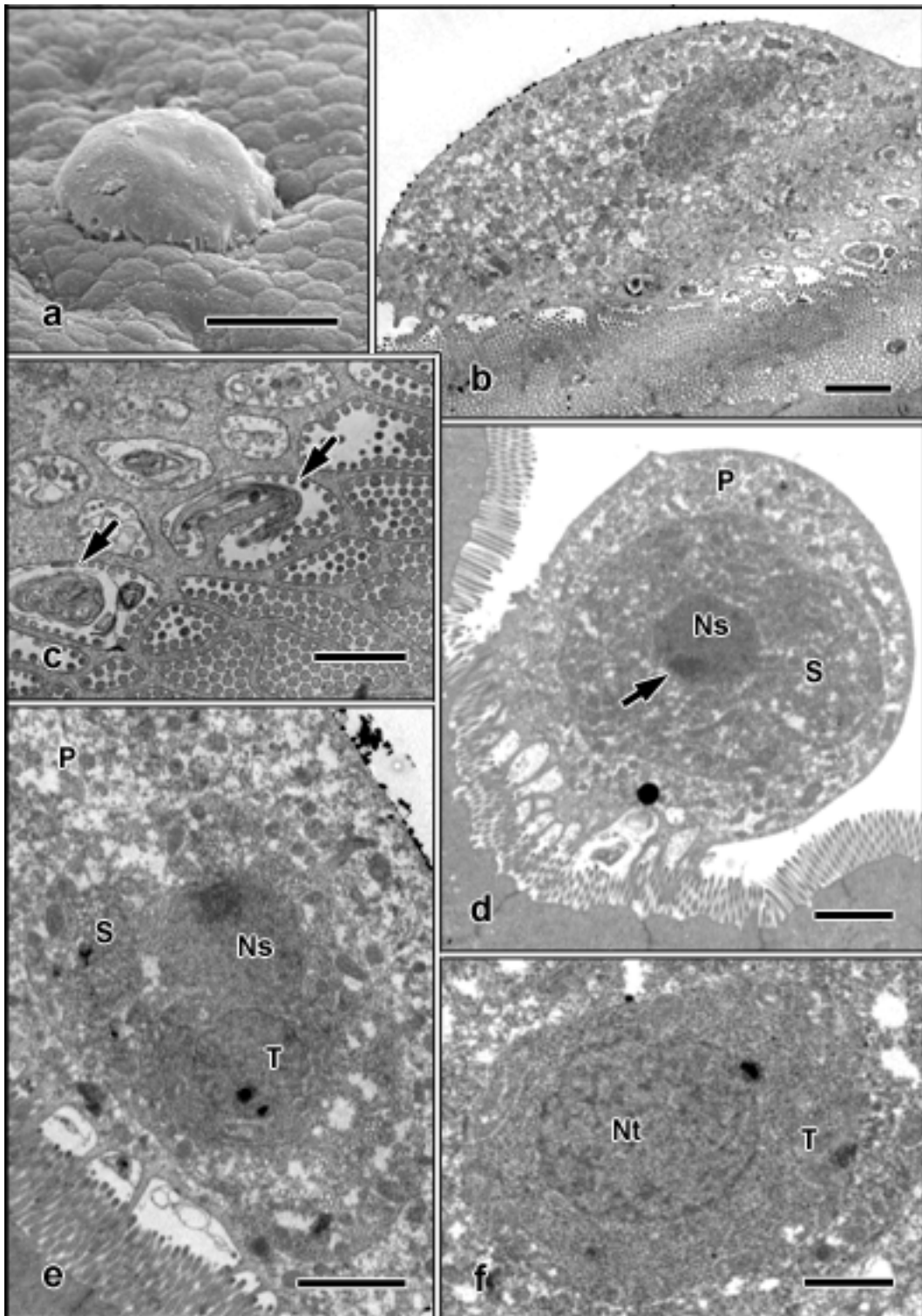
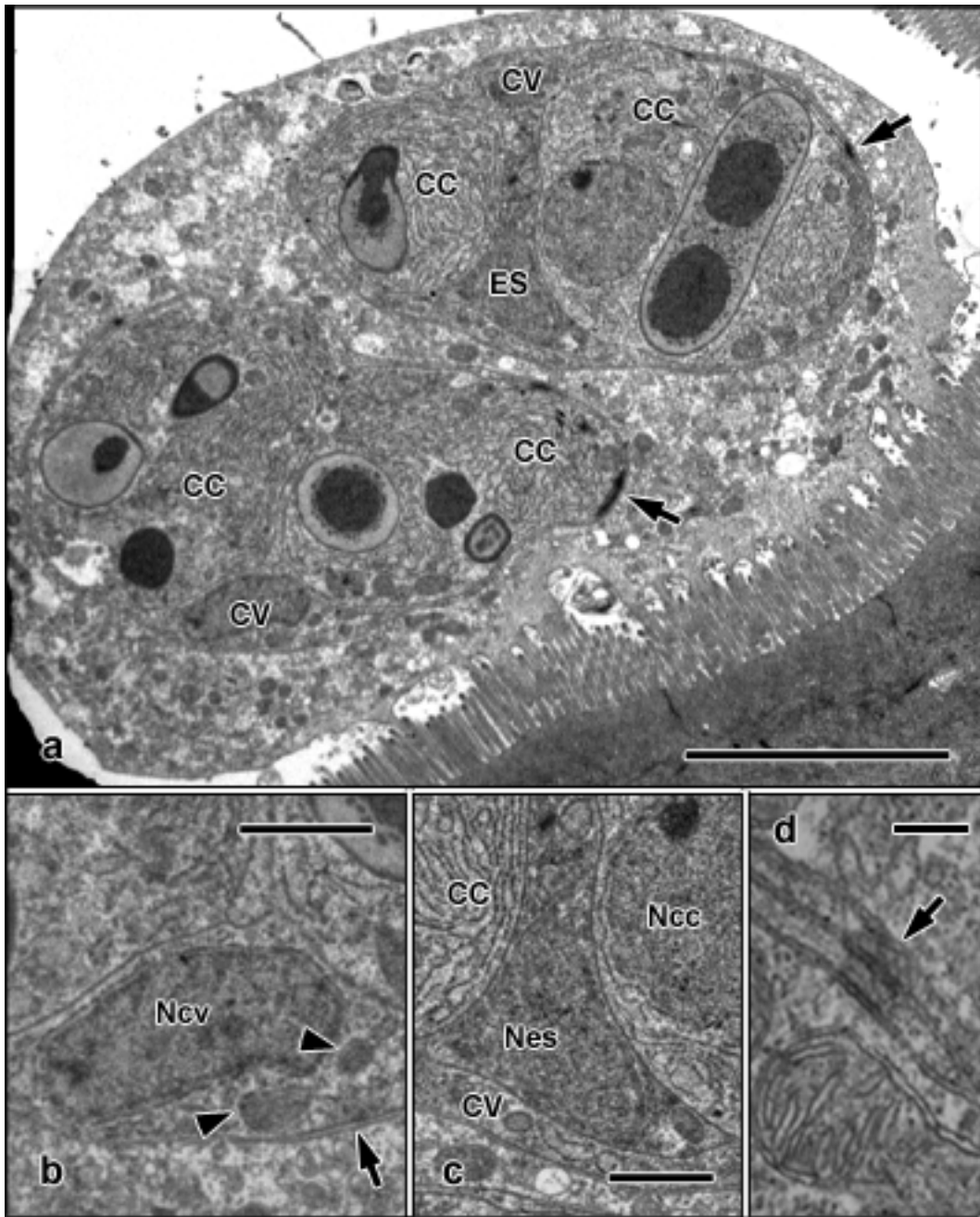




Fig.6.3. Imatges al MET d'estadis d'esperogènesi del mixosporidi EE a l'intestí de l'orada.

a. Estadi ancorat a la superfície de l'epiteli intestinal que conté dos esporoblasts en desenvolupament. Cada esporoblast conté un parell de cèl·lules CC, un parell de cèl·lules CV i un esporoplasma (ES). Als extrems de les projeccions citoplasmàtiques emeses per les cèl·lules CV es produeix un solapament i una densificació de les membranes (fletxes). **b.** Detall d'una cèl·lula CV de l'estadi anterior on s'observa la membrana vacuolar que envolta l'esporoblast (fletxa). A més, es pot observar el nucli eucromatínic (Ncv) i els petits mitocondris de matriu densa (puntes de fletxa) de la cèl·lula CV. **c.** Detall d'un dels esporoblasts de l'estadi esporogènic anterior (a), en què s'observa el citoplasma de la cèl·lula CV, el nucli eucromatínic de l'esporoplasma (Nes) i el de la cèl·lula CC (Ncc) i la gran quantitat de reticle endoplasmàtic rugós de la cèl·lula CC. **d.** Detall de les densificacions de la membrana (fletxa) que es produeixen en la regió de solapament dels extrems de les projeccions citoplasmàtiques de les cèl·lules CV.

Barres: 5 μm (a), 1 μm (b i c) i 200 nm (d).



6.3.3. Prevalença i intensitat del paràsit en diferents situacions experimentals

Els estadis del mixosporidi EE es van observar en el 12,01 % dels peixos examinats (Taula 6.6). En general, la prevalença de les infeccions va romandre baixa (entre un 2,63 i un 4,68%), excepte en la infecció O2, en què el paràsit es va observar en el 32,98% de les orades examinades. En molt pocs casos (12,5%) el mixosporidi EE es va trobar en infeccions mixtes amb *E. leei*.

En les infeccions experimentals es van observar diferències en la prevalença dels peixos control (C) i els peixos receptors (R) en funció de l'experiment (Taula 6.6). Així, en els experiments C5 i O2 (realitzats al National Center for Mariculture (NCM)) no es va trobar cap individu C afectat pel paràsit, mentre que en els experiments C1 i O1 (realitzats a l'Institut de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS, CSIC)) sí que es van observar peixos C parasitats. Pel que fa als peixos R, només en el cas de la infecció O2 es van assolir prevalences d'infecció mitjanes (41,56%), mentre que en la resta d'experiments o no es va observar el paràsit (infecció O1) o bé es va observar de manera esporàdica (Taula 6.6).

En la majoria d'infeccions, el paràsit va aparèixer, a més d'esporàdicament, en una intensitat molt baixa. Només en la infecció O2 va ser possible observar una variació de la prevalença al llarg del temps que va assolir nivells màxims els dies 12 i 53. Tanmateix, la intensitat en aquesta infecció va romandre baixa (Taula 6.7).

Taula 6.6. Prevalença del paràsit en l'orada.

Espècie	Infecció	Prevalença % (peixos parasitats/examinats)		
		Peixos C	Peixos R	Total
<i>Sparus aurata</i>	C1	6,66 (2/30)	4,08 (4/98)	4,68 (6/128)
	O1	12,5 (1/8)	0 (0/30)	2,63 (1/38)
	C5	0 (0/10)	4 (1/25)	2,85 (1/35)
	O2	0 (0/20)	41,56 (32/77)	32,98 (32/97)
Total		3,84 (3/78)	14,51 (37/255)	12,01 (40/333)

C Control, R Receptors.

Taula 6.7. Prevalença i intensitat mitjana del paràsit mixosporidi EE en les orades receptores de l'experiment O2.

Dies d.i	Prevalença % (peixos parasitats/ peixos examinats)	Intensitat mitjana
4	20 (1/5)	1
8	37,5 (3/8)	1
12	62,5 (5/8)	1,5
16	50 (4/8)	1,3
20	25 (2/8)	1,5
24	37,5 (3/8)	1
28	25 (2/8)	1,5
35	37,5 (3/8)	1
42	50 (4/8)	1,4
53	62,5 (5/8)	1,2
Total	41,56 (32 /77)	1,5

d.i. després de la ingestió del paràsit.

La intensitat mitjana representa la mitjana aritmètica de cada grup de peixos. Cada individu ha estat avaluat com a 1 (intensitat baixa), 2 (mitja) o 3 (alta).

6.3.4. Estudis moleculars

Les PCR dissenyades per amplificar *E. leei* (PCR1 i PCR2) no van ser específiques pel paràsit, ja que en ambdós casos, a més d'amplificar les mostres esperades, també van amplificar la mostra d'*E. fugu* que provenia de l'extracció de teixit en fresc (Taula 6.8, Fig.6.4 A, Fig.6.4B, Fig.6.4C).

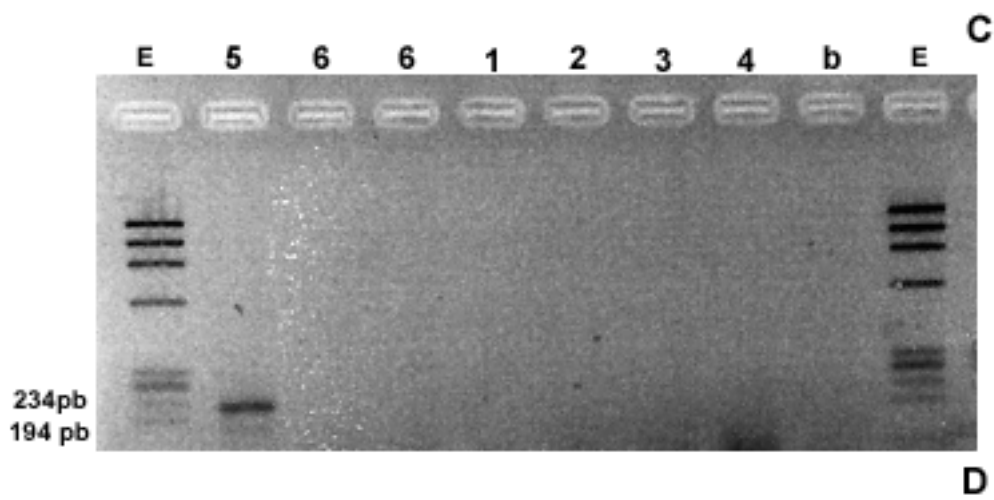
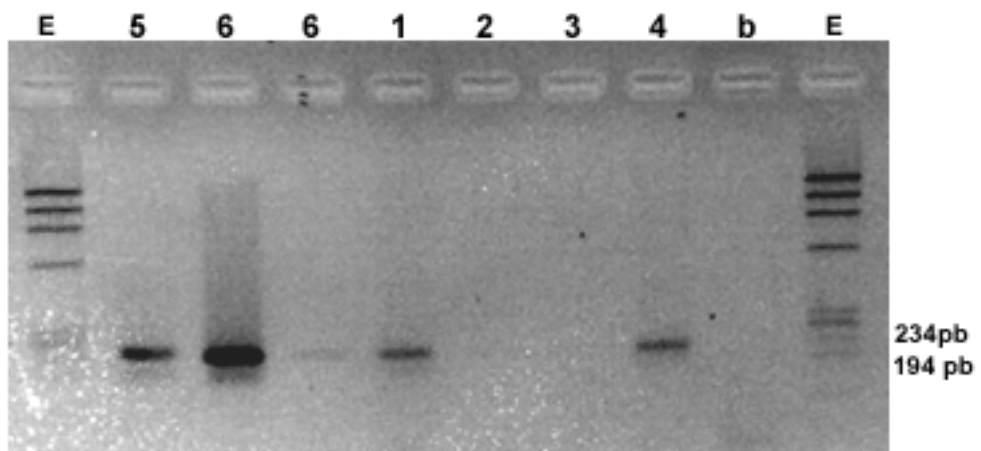
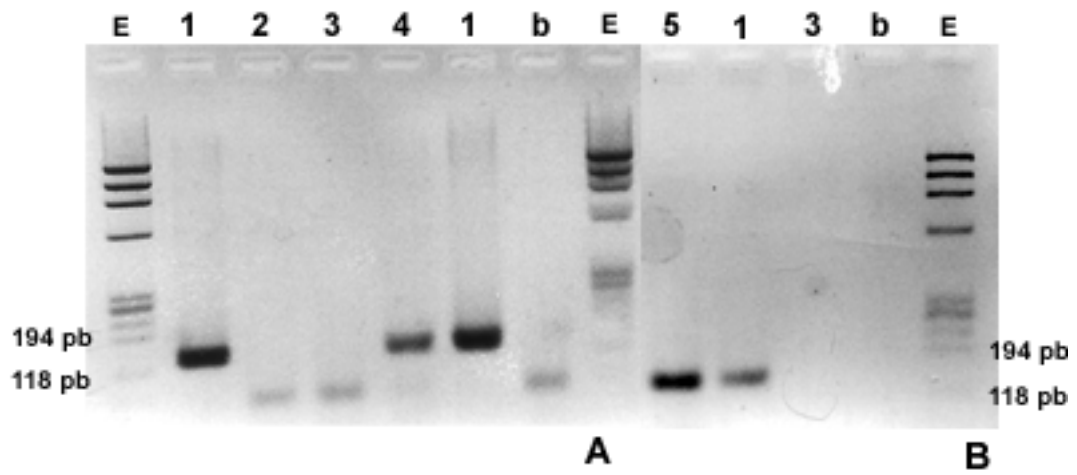
Els resultats obtinguts amb el segon parell de PCR, dissenyades per amplificar específicament *E. fugu*, tampoc van ser els esperats. Per una banda, la PCR3 no va amplificar cap de les mostres. D'altra banda, la PCR4 només va amplificar la mostra provinent de l'extracció en fresc, però no la provinent de l'extracció a partir de talls en parafina (Taula 6.8, Fig. 6.4D).

Taula 6.8. Taula resum dels resultats obtinguts en les diverses proves de PCR realitzades. Les caselles en gris clar corresponen a resultats positius (aparició de bandes) i les caselles en gris fosc a resultats negatius.

Nº de mostra	1 <i>E. leei</i> parafina	2 EMM parafina	3 Control – parafina	4 <i>E. leei</i> i <i>E.fugu</i> parafina	5 <i>E.fugu</i> parafina	6 <i>E.fugu</i> fresc	7 <i>E.leei</i> fresc
PCR1 (<i>leei</i>)	Grís clar	Grís fosc	Grís fosc	Grís clar	Grís fosc	Grís clar	Grís clar
PCR2 (<i>leei</i>)	Grís clar	Grís fosc	Grís fosc	Grís clar	Grís fosc	Grís clar	Grís clar
PCR3 (<i>fugu</i>)	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc
PCR4 (<i>fugu</i>)	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís clar	Grís fosc
PCR5 (<i>leei</i>)	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís clar
PCR6 (<i>fugu</i>)	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís fosc	Grís clar	Grís clar



Fig.6.4. Imatges dels gels d'agarosa resultants de l'amplificació dels gens de la subunitat petita del ARN (SSU RNAr) d'*E. leei* (A-C) i d'*E. fugu* (D). **A i B.** Resultat de l'amplificació amb els encebadors Eleei-F i Eleei-R (PCR1). **C.** Resultat de l'amplificació amb els encebadors EL-F i ELU-R (PCR2). **D.** Resultat de l'amplificació amb els encebadors EF-F i EFU-R (PCR4). E: escala molecular, b: blanc de PCR (aigua Miliq), 1: *E. leei* parafina, 2: Mixosporidi EE parafina, 3: Control negatiu parafina, 4: *E. fugu* i *E. leei* parafina, 5: *E. fugu* fresc i 6: *E. leei* fresc.



6.4. DISCUSSIÓ

L'estructura de cèl·lula dins d'una altra cèl·lula dels estadis proliferatius d'aquest paràsit conjuntament amb la troballa d'un estadi esporogènic donen suport a la hipòtesi inicial que aquest organisme és un mixosporidi.

Al MO, la morfologia i posició dels estadis de proliferació d'aquest mixosporidi fan que, en la majoria de casos, aquest paràsit sigui clarament distingible dels estadis d'*E. leei* intraepitelials. Tanmateix, podria existir una certa confusió quan els estadis d'*E. leei* es presenten pròxims a la superfície de la mucosa intestinal o quan estan envoltats de cèl·lules de la mucosa descamades. En aquest sentit les proves d'hibridació *in situ* permeten distingir clarament les formes epi-epitelials d'*E. leei* amb les d'aquest nou mixosporidi (Cuadrado i col . 2007).

6.4.1. Estudi morfològic

Moltes de les característiques observades en els estadis de desenvolupament del mixosporidi EE són similars a les que s'observen en d'altres mixosporidis. Tot i això, aquest paràsit presenta algunes peculiaritats estructurals.

Ancoratge i nutrició. En primer lloc i com la majoria de mixosporidis celozoics, la superfície de les cèl·lules P presenta una sèrie de projeccions citoplasmàtiques en la regió en contacte amb els enteròcits de l'hoste. Aquestes projeccions semblen jugar un paper important no només en l'ancoratge d'aquests paràsits al seu hoste sinó també en la seva nutrició (Upenskaya 1982, Canning i col. 1999). En referència a la primera funció d'ancoratge, existeixen gran varietat d'estructures i formes d'ancoratge a les cèl·lules de l'hoste entre els mixosporidis celozoics. Alguns presenten una estructura de malla similar a la descrita en la interfase hoste-paràsit com *Ceratomyxa protopsettae* (Cho i col. 2004), *C. drepanopsettae* (Morrison i col. 1996) i *Myxidium zealandicum* (Hulbert i col. 1977). De tota manera, cap d'aquest mixosporidis és entèric ni presenta les complicades trames del mixosporidi EE. A diferència del mixosporidi EE, hi ha mixosporidis celozoics que dirigeixen les seves projeccions cap a l'espai que queda entre les cèl·lules de l'hoste com per exemple *Leptotheca sparidarum* (Sitjà-Bobadilla i Àlvarez-Pellitero 2001), *Myxidium trachinorum* (Canning i col. 1999), *Zschokkella mugilis* (Sitjà-Bobadilla i Alvarez Pellitero 1993a) i *Sinuolinea tetraodoni* (El-Matbouli i Hoffmann 1994). Les projeccions del mixosporidi EE també difereixen de les dels altres mixosporidis celozoics que presenten grans plasmodis, com *Zschokkella leptatherinae* (Su 1996), *Z. icterica* (Diamant i Paperna 1992) o *Sphaeromyxa zaharoni* (Diamant i col. 2004) que normalment no presenten un contacte íntim amb les cèl·lules epitelials de l'hoste.

Pel que fa a la funció de nutrició, l'observació de vacúols de pinocitosi i fagocitosi amb porcions de microvellositats a prop dels enteròcits de l'hoste indiquen que la fagocitosi podria ser una manera de nutrició practicada per aquests paràsits en la que podrien intervenir els pseudopodis. La presència de figures mielíniques entre els pseudopodis o dins dels vacúols de fagocitosi semblen recolzar aquesta hipòtesi. A més, la presència de figures mielíniques entre les projeccions citoplasmàtiques podria indicar una digestió extracel·lular de les membranes de l'hoste prèvia a la fagocitosi o la pinocitosi (Upenskaya 1982). A més d'en aquesta espècie, l'alimentació per fagocitosi ha estat descrita en altres mixosporidis celozoics com *M. trachinorum* (Canning i col. 1999) o *L. sparidarum* (Sitjà Bobadilla i Alvarez Pellitero 2001) i una digestió prèvia a una ingestió per pinocitosi també ha estat descrita a *Z. leptatherinae* (Su 1996).

Estadis proliferatius. L'observació d'una membrana vacuolar envoltant cèl·lules S suggereix que la principal via de formació de cèl·lules internes (S o T) és la divisió endògena de la cèl·lules P o S. D'altra banda, la presència de grans quantitats de ribosomes i d'un nucli eucromatínic suggereix que tant les cèl·lules S com les T tenen una gran activitat en la síntesi de proteïnes.

Esporogènesi. Els mixosporidis monospòrics o dispòrics solen produir espores sense formació de pansporoblast (Lom i Dyková 1992). Aquest sembla ser el cas del mixosporidi EE ja que no s'ha observat una membrana vacuolar envoltant el parell d'esporeblasts observats. Aquesta característica, però, no ajuda a aclarir la identitat d'aquest nou mixosporidi, ja que altres espècies celozoiques presents en espàrids com *Ceratomyxa sparusaurati* o *L. sparidarum* (Palenzuela i col. 1997, Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 2001) presenten un patró de formació d'espores similar. Pel que fa al procés de formació de les espores, a partir de les observacions realitzades, no es pot deduir si es produeix per agrupament de cèl·lules esporogèniques o per divisions endògenes a partir d'una cèl·lula esporogènica. Tanmateix, sembla que la segona d'aquestes possibilitats és la més versemblant ja que s'ha pogut observar una fina membrana vacuolar envoltant les cèl·lules de l'esporeblast.

6.4.2. Prevalença i intensitat del paràsit en diferents situacions experimentals

Els resultats mostren que tant la prevalença com la intensitat varien força entre instal·lacions i experiments. Així, el paràsit és clarament més freqüent a les instal·lacions del NCM (infeccions C5 i O2) que a les de l'IATS (infeccions C1 i O1). Tanmateix, si exclouem els individus de l'experiment O2 la presència del paràsit és força ocasional.

6.4.3. Identificació del paràsit

Identificació basada en la morfologia i localització del paràsit. La morfologia dels estadis del mixosporidi EE en totes les situacions experimentals analitzades va ser idèntica, de manera que probablement tots els estadis observats pertanyin al mateix organisme. En aquest sentit, establir el gènere o l'espècie d'aquest mixosporidi resulta difícil ja que no s'han observat espores madures. A més, la recollida de material genètic en bon estat per a la seva seqüenciació va ser impossible ja que totes les mostres havien estat fixades i processades per MO i ME. De tota manera, els estadis EE observats podrien ser atribuïts a altres espècies de mixosporidis alguns dels quals s'han trobat situats sobre la mucosa intestinal d'espàrids al Mediterrani. Un d'aquests mixosporidis és *Leptotheca sparidarum*, que es troba principalment al ronyó, però que ocasionalment es pot trobar a la superfície de la mucosa intestinal (Sitjà-Bobadilla i Alvarez-Pellitero 2001). *L. sparidarum* comparteix moltes característiques amb el mixosporidi EE com per exemple el fet de presentar una esporogènesi dispòrica o no ocasionar cap lesió a l'epiteli intestinal. Tot i això, no s'han localitzat estadis d'aquest paràsit al ronyó o la vesícula biliar. A més, *L. sparidarum* mai no s'ha trobat en instal·lacions piscícoles a Israel, que és l'indret en què el mixosporidi EE ha resultat ser més abundant.

Un altre mixosporidi que es situa sobre la mucosa intestinal és *Enteromyxum fugu*. Aquest mixosporidi celozoic ha estat descrit en infeccions mixtes amb *E. leei* a l'intestí del peix globus (*Takifugu rubripes*) (Tun i col. 2000, Yanagida i col. 2004). A més de trobar-se en infeccions mixtes amb *E. leei*, comparteix altres característiques amb el mixosporidi EE com són el fet de trobar-se en una intensitat molt baixa i no ser els responsables de les lesions que s'observen a l'epiteli dels peixos afectats. De tota manera i pel que fa a la morfologia, l'estadi esporogènic que s'ha observat en el present estudi sembla tenir una mida menor que els estadis esporogènics observats a *E. fugu* (Tun i col. 2000)

Identificació basada en dades moleculars. L'extracció d'ADN a partir de teixits fixats en parafina és una tècnica que, tot i haver estat emprada fonamentalment en el diagnòstic patològic en humans i mamífers (Levine i col. 2002), s'ha emprat en molt pocs casos en el diagnòstic de patògens que afecten a peixos (Dixon i col. 2004, Crumlish i col. 2002). Els beneficis d'aquesta tècnica són nombrosos, sobretot en el diagnòstic d'organismes que són difícils de detectar en fresc (infeccions subclíniques) o d'identificar a partir d'una secció histològica. Aquest darrer seria el cas de la identificació de les formes de proliferació dels mixosporidis (com el mixosporidi EE i *E.*

fugu) que presenten la mateixa morfologia quan s'estudien al microscopi. En el present treball, aquesta tècnica no ha donat els resultats esperats, sobretot per problemes d'especificitat de les reaccions de PCR. Només en un cas es va aconseguir dissenyar una reacció específica per amplificar *E. fugu* provinent d'extraccions en fresc (PCR4), però va resultar ineficaç en la detecció del paràsit en parafina. Aquests resultats podrien ser deguts a la baixa intensitat que *E. fugu* presentava en les seccions histològiques estudiades i al baix rendiment que solen presentar les extraccions d'ADN a partir de talls en parafina quan es comparen amb les extraccions a partir de material en fresc. Aquests dos factors farien que la quantitat d'ADN total del paràsit a la mostra fos insuficient per poder ser visualitzada en una banda en el gel d'agarosa. En aquest sentit, aquest sembla ser un dels problemes que presenta l'aplicació d'aquesta tècnica ja que, després d'un resultat negatiu, alguns autors solen realitzar una segona reacció de PCR amb el producte de la primera (Crumlish i col. 2002, Levine i col. 2002). Per tant, tot i que no es tracta d'una forma epi-epitelial d'*E. leei* (Cuadrado i col. 2007), a partir dels resultats obtinguts no es pot descartar ni confirmar la hipòtesi que el mixosporidi EE sigui *E. fugu*.

6.4.4. Transmissió del paràsit

La troballa del mixosporidi EE en les orades R de les infeccions C5 i O2 sembla indicar que, a les instal·lacions del NCM, aquest paràsit es va transmetre des dels peixos donants conjuntament amb *E. leei*. Tot i que els estocs de peixos donants van ser rigorosament examinats, el fet que aquests peixos presentessin infeccions molt intenses d'*E. leei* podria haver fet que aquest segon paràsit passés desapercebut degut a la seva baixa intensitat. En aquest sentit, tot i que amb prevalences molt superiors, les infeccions mixtes d'*E. fugu* i *E. leei* també es transmeten a peixos sans per cohabitació amb peixos parasitats i per ingestió del seu contingut intestinal (Yasuda i col. 2002, Yanagida i col. 2006).

En el cas de les infeccions C1 i O1, realitzades a l'IATS, la majoria d'orades infectades eren controls. Per tant, la infecció, probablement, es va produir en les mateixes instal·lacions per efluent des d'un focus d'infecció desconegut.

7. CONCLUSIONS

- El cicle de vida d'*Enteromyxum leei* en el seu hoste intermediari es pot dividir en dues etapes: una etapa inicial i de proliferació que inclou tres estadis denominats ST1, ST2 i ST3 i una segona etapa esporogènica que inclou dos estadis denominats ST4 i ST5.
- Existeix una gran versatilitat en els mecanismes de proliferació i esporogènesi d'*E. leei* en el seu hoste. D'una banda, les cèl·lules internes dels estadis proliferatius podrien formar-se per divisió endògena d'una cèl·lula o bé per l'envoltament d'una cèl·lula (interna) per una altra (externa). D'altra banda, l'esporogènesi podria produir-se per agrupació directa de cèl·lules esporogèniques o per la divisió d'una única cèl·lula interna que podria originar-se a través d'una divisió endògena.
- Durant el període de proliferació d'*E. leei* es poden distingir dos tipus de cèl·lules S que es diferencien per la seva morfologia i propietats histoquímiques.
- En els estadis esporogènics es característica l'aparició d'un parell cèl·lules secundàries que acompanyen als esporoblasts i espores. Aquestes cèl·lules podrien actuar reinfectant el teixit o infectant altres hostes.
- Entre les cèl·lules que formen els estadis desenvolupament d'*E. leei* s'han observat estructures d'unió i/o comunicació intercel·lular. Entre les cèl·lules S dels estadis de proliferació s'estableixen unions semblants a desmosomes i unions semblants a hemidesmosomes i entre les projeccions de les cèl·lules valvogèniques de l'esporoblast s'estableixen unions septades.
- Al citoplasma de les cèl·lules valvogèniques apareix una massa amorfa en que s'hi poden distingir una xarxa de microfilaments d'aproximadament 12 nm de diàmetre.
- Tots els estadis de desenvolupament d'*E. leei* s'han observat a la mucosa o al lumen del tracte digestiu (en concret, cecs pilòrics, intestí i recte). En aquesta ubicació, els estadis del paràsit es poden situar a l'interior del teixit on presenten una posició intercel·lular o bé a l'exterior del teixit situant-se sobre les microvellositats dels enteròcits. Ocasionalment i en parasitacions massives, s'han trobat espores al lumen de la vesícula biliar.
- En infeccions consolidades els estadis d'*E. leei* tendeixen situar-se a la mucosa intestinal formant agrupacions de mida variable. Aquestes agrupacions es caracteritzen per presentar un nucli on s'observen fonamentalment estadis ST3, ST4 i ST5 i una perifèria amb estadis ST2 i ST3. La intensitat dels estadis al nucli és més elevada que a la perifèria.
- En totes les infeccions experimentals, el paràsit assoleix taxes d'infecció i/o d'intensitat mitjana més elevades a l'intestí posterior i al recte al final de

l'experiment. En aquest sentit, el risc d'infecció de l'intestí anterior i/o els cecs pilòrics sol ser menor que el risc d'infecció de l'intestí posterior. Tot i això, en la infecció natural, la prevalença i la intensitat mitjana del paràsit són superiors a l'intestí anterior i mig que a l'intestí posterior i el recte.

- La resposta inflamatòria front del paràsit sembla dependre del tram intestinal considerat. Així, en les orades, els trams intestinals posteriors presenten una reacció inflamatòria més dèbil que l'intestí anterior i els cecs pilòrics.
- Les característiques de la infecció per *E. leei* depenen de la metodologia emprada per infectar els individus. En la orada, l'establiment de la infecció és més curt i les taxes d'infecció són més elevades quan el mètode d'infecció escollit és la ingestió forçada d'estadis del paràsit.
- Les característiques de la resposta inflamatòria per part de l'hoste també depenen del mètode d'infecció utilitzat. En les orades adultes, la reacció inflamatòria és més intensa quan el mètode d'infecció és la cohabitació amb orades donants.
- Les característiques de la infecció per *E. leei* depenen de l'espècie d'hoste. Així, l'establiment i la progressió de la infecció en les morrudes juvenils és més ràpida que en les orades (juvenils i adultes) quan el mètode d'infecció és la cohabitació. En aquest sentit, el risc d'infecció de les morrudes juvenils és unes 6 vegades i mitja superior al risc de les orades juvenils. D'altra banda, en les morrudes juvenils, la colonització de l'epiteli intestinal pels estadis d'*E. leei* es produeix de manera progressiva. El paràsit envaeix l'intestí posterior i avança en direcció proximal fins a ocupar totalment la mucosa de l'intestí i els cecs pilòrics. En canvi, en les orades juvenils, la infecció comença en varis focus al llarg de la mucosa intestinal i avança de manera atzarosa.
- Les característiques de la resposta inflamatòria per part de l'hoste també depenen de l'espècie d'hoste. Així, la resposta inflamatòria és més intensa en les morrudes juvenils que en les orades juvenils.
- En l'orada, les característiques de la infecció per *E. leei* depenen de l'edat dels individus. Tot i que el paràsit s'estableix abans en les orades adultes que en les orades juvenils, la intensitat de la infecció és superior a les orades juvenils. D'altra banda, en les orades adultes el paràsit s'estableix primer a l'intestí posterior i al recte, mentre que en les orades juvenils ho fa quasi indistintament a l'intestí anterior o posterior.

- Les característiques de la resposta inflamatòria per part de l'hoste també depenen de l'edat dels individus. Les orades juvenils solen presentar amb més freqüència respostes inflamatòries caracteritzades per l'augment de cèl·lules granulars eosinòfiles a la submucosa. També, és més freqüent el nombre de casos en què aquestes cèl·lules o cèl·lules *rodlet* es troben properes o en contacte a estadis de desenvolupament del paràsit a la mucosa.
- Les lesions que provoca *E. leei* en el seu hoste, són les mateixes en qualsevol de les infeccions estudiades. La seva aparició i gravetat estructural i funcional està directament relacionada amb la presència i la intensitat del paràsit respectivament, i no a les característiques de l'hoste ni al mètode d'infecció emprat.
- La presència d'una reacció inflamatòria en l'hoste està directament relacionada amb la presència del paràsit a la mucosa intestinal. Aquesta resposta sol consistir en un engruiximent de la submucosa provocat per l'augment de cèl·lules inflamatòries ja siguin cèl·lules limfocitàries o cèl·lules granulars eosinòfiles.
- *E. leei* pot presentar-se en infeccions mixtes amb un altre mixosporidi celozoic entèric (mixosporidi EE).
- El mixosporidi EE es relaciona amb les cèl·lules de l'epiteli intestinal a través d'unes projeccions citoplasmàtiques que conformen una xarxa. Dins l'entramat format per aquestes projeccions citoplasmàtiques figures mielíniques.
- En el desenvolupament proliferatiu d'aquest mixosporidi EE la principal via de formació de cèl·lules internes seria la divisió endògena d'una cèl·lula mare.
- L'esporegènesi del mixosporidi EE és dispòrica i sense formació de pansporoblasts. L'esporegènesi es produiria per divisió directa d'una única cèl·lula esporegènica que provindria de la divisió endògena d'una cèl·lula mare.
- La identificació d'aquest mixosporidi EE en base a la seva morfologia i localització fa descartar la possibilitat de què es tracti de *Leptotheca sparidarum*. Els estudis morfològics i moleculars d'aquest mixosporidi EE no permeten descartar la possibilitat que es tracti d'*Enteromyxum fugu*.
- La transmissió d'aquest paràsit es pot produir a partir de la cohabitació amb altres individus afectats, per la ingestió oral d'estadis del paràsit o bé a través de l'efluent provinent d'altres tancs d'experimentació infectats.

8. APÈNDIX

8.1. Tècniques histològiques

8.1.1. Microscopi òptic

A continuació es descriuen els protocols seguits durant el processament de les mostres per a l'observació al microscopi òptic.

Taula 8.1. Protocol de fixació, deshidratació i inclusió en parafina.

Preparació dels fixadors	
<u>Formol tamponat al 10% (5 L)</u>	
500 ml de formol concentrat (37-40%)	
4,5 L d'aigua destil·lada	
100 g de sal tampó pH=7,2 (fosfat) (ANALEMA)	
<u>Líquid de Davidson</u>	
600 ml alcohol 96%	
200 ml d'àcid acètic	
400 ml de formol concentrat (37-40%)	
600 ml d'aigua destil·lada	

	Reactiu	Nº banys	Temps (hores)
Fixació	Formol 10%	1	2
Transició fixació-deshidratació	Formol 10%: Etanol 50%	1	2
Deshidratació	Etanol 50%	1	1
	Etanol 70%	1	1
	Etanol 96º	1	1
Transició deshidratació-inclusió	Etanol 100º	1	1
	Etanol 100º: Xilol	1	1
	Xilol	2	1
Inclusió	Parafina (58-60º)	2	2

Taula 8.2. Protocol de tinció en hematoxilina i eosina (HiE).

	Reactiu	Nº Banys	Temps (minuts)
Desparafinació	Xilol	2	5
Hidratació	Etanol 100º	2	5
	Etanol 96º	1	5
	Etanol 70%	1	5
	Etanol 50%	1	5
	Aigua corrent	1	10
	Tinció	Hematoxilina de Mayer	1
	Aigua corrent	1	25
	Eosina	1	5
Deshidratació	Etanol 96º	2	15 segons
	Etanol 100º	2	15 segons
Rentat	Xilol	2	5

Taula 8.3. Protocol de tinció amb Giemsa.

Preparació dels reactius
<u>Aigua acètica 0,1%</u>
100 ml d'aigua destil·lada
2 gotes d'aigua acètica

	Reactiu	Nº Banys	Temps (minuts)
Desparafinació	Xilol	2	5
Hidratació	Etanol 100º	2	5
	Etanol 96º	1	5
	Etanol 70%	1	5
	Etanol 50%	1	5
	Aigua corrent	1	10
	Tinció	Giemsa 50%	1
	Aigua corrent	1	25
	Aigua acètica 0,1%	1	15 segons
Deshidratació	Etanol 96º	2	10 segons
	Etanol 100º	2	10 segons
Rentat	Xilol	2	5

Taula 8.4. Protocol de tinció amb Àcid Periòdic-Reactiu de Schiff (PAS).

Preparació dels reactius	
<u>Àcid Periòdic 5%</u>	
	5g d'àcid periòdic (HIO ₄)
	100ml d'aigua destil·lada

	Reactiu	Nº Banys	Temps (minuts)
Desparafinació	Xilol	2	5
Hidratació	Etanol 100º	2	5
	Etanol 96º	1	5
	Etanol 70%	1	5
	Etanol 50%	1	5
	Aigua corrent	1	10
Tinció	Àcid Periòdic 5%	1	10
	Aigua corrent	1	25
	Aigua destil·lada	1	5
	Reactiu de Schiff	1	30
	Aigua corrent	1	10
	Hematoxilina de Mayer	1	1
	Aigua corrent	1	10
Deshidratació	Etanol 96º	2	3
	Etanol 100º	2	3
	Xilol	2	'

8.1.2. Microscopi electrònic de rastreig

El protocol emprat en el processament de les mostres per a la seva observació al microscopi electrònic de rastreig (MER) es detalla a continuació.

Taula 8.5. Protocol de fixació, deshidratació i muntatge de mostres al MER.

Preparació dels reactius	
<u>Tampó cacodilat sòdic 0,1M (100 ml)</u>	
	100 ml d'aigua destil·lada
	3,4 g de cacodilat sòdic
<u>Tampó fosfat 0,1M (100 ml)</u>	
	1,63 g de sodi fosfat bisòdic $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
	0,4 g sodi fosfat dibàsic $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	100 ml d'aigua destil·lada
<u>Glutaraldehyd 2,5% en tampó cacodilat sòdic 0,1M (20ml)</u>	
	18 ml de tampó cacodilat
	2 ml de glutaraldehyd 25%

	Reactiu	Nº banys	Temps (minuts)
Fixació	Formol 10% ^{*1}	1	2 hores
Rentats	Tampó fosfat ^{*2}	2	15
	Tampó cacodilat sòdic ^{*2}		
Fixació	Glutaraldehyd 2,5%	1	2 hores
Rentats	Tampó cacodilat sòdic ^{*2}	2 - 3	5
Deshidratació	Etanol 30%	1	15
	Etanol 50%	1	15
	Etanol 70% ^{*3}	1	15
	Etanol 90 ^º	1	15
	Etanol 100 ^º	2	15
	Punt crític		
Muntatge i recobriment en or			

^{*1} Si es parteix de mostres fixades en formol al 10%, sinó començar el protocol en el quart pas.

^{*2} 0,1M i pH=7,4.

^{*3} Es pot aturar el procés en aquest pas.

8.1.3. Microscopi electrònic de transmissió

A continuació es descriuen els protocols emprats en la preparació de mostres per a la seva observació al microscopi electrònic de transmissió (MET).

Taula 8.6. Protocol de fixació i deshidratació de mostres per MET.

Preparació dels reactius	
<u>Tetraòxid d'osmi 1%</u> (10 ml)	
	10 ml de tampó cacodilat sòdic 0,1 M
	0,1 g de tetraòxid d'osmi
<u>Acetat d'uranil 1%</u> (10 ml)	
	10 ml d'etanol al 70%
	0,1 g d'acetat d'uranil

	Reactiu	Nº banys	Temps (minuts)
Fixació	Glutaraldehyd 2,5 - 3% (a 4°C)	1	2 hores
Rentats	Tampó cacodilat sòdic* ¹ , * ²	2 - 3	15
Post-fixació	Tetraòxid d'osmi 1% en tampó cacodilat sòdic. (4°C)	1	2 hores
Rentats	Tampó cacodilat sòdic* ¹	2 - 3	15
Deshidratació	Etanol 30%	1 - 2	15
	Etanol 50%	1 - 2	15
	Etanol 70%	1 - 2	15
Tinció en bloc * ³	Acetat d'uranil 1% en etanol al 70% (4°C)	1	12-24 hores
Rentats	Etanol 70%	4 - 5	15
Deshidratació	Etanol 90%	2	15
	Etanol 100°	3	15

*¹ 0,1M i pH=7,4.

*² Es pot aturar el procés en aquest pas.

*³ Opcional, és preferible tenyir el tall en reixeta.

Taula 8.7. Protocol d'inclusió de mostres en resina EPON.

Preparació dels reactius	
<u>Resina EPON</u>	
	24 ml TAAB 812 RESIN
	19 ml TAAB DDSA EM grade
	33 ml TAAB MNA EM grade
	2 ml TAAB BDMA

	Reactiu	Temperatura	Temps (hores)
Inclusió	Alcohol 100° : Òxid de propilè (1 : 1)	ambient	15 minuts
	Òxid de propilè	ambient	1
	Òxid de propilè: resina EPON (1 : 1)	ambient	1
	Resina EPON	ambient	1
	Resina EPON	4°C	12 - 24
Polimerització		60°C	48

Taula 8.8. Protocol d'inclusió de mostres en resina SPURR.

Preparació dels reactius	
<u>Resina SPURR</u>	
	5 ml component ERL 4206
	3 ml component DER 736
	13 ml component NSA
	0,2 ml component DMAE
	1 ml component D d'araldita

	Reactiu	Temperatura	Temps (hores)
Inclusió	Alcohol 100° : resina SPURR (3 : 1)	ambient	15 minuts
	Alcohol 100° : resina SPURR (2 : 2)	ambient	1
	Alcohol 100° : resina SPURR (1 : 3)	ambient	1
	Resina SPURR	ambient	1
	Resina SPURR	4°C	12 - 24
Polimerització		80°C	48

Taula 8.9. Protocol de tinció de talls semifins en blau de toluïdina.**Preparació dels reactius**Blau de toluïdina 1%

- 1 g de blau de toluïdina
- 1g de tetraborat sòdic anhidre ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)
- 100 ml d'aigua destil·lada

	Reactiu	Temps
Tinció	Blau de toluïdina 1%.	10 minuts
Rentats*	Aigua destil·lada	

*rentar a raig.

Taula 8.10. Protocol de tinció de talls ultrafins amb acetat d'uranil.**Preparació dels reactius**Acetat d'uranil 1%

- 10 ml d'aigua destil·lada
- 0,1 g d'acetat d'uranil

	Reactiu	Temps
Tinció	Acetat d'uranil 1%	10 minuts
Rentats*	Aigua destil·lada	5 segons

*4 - 5 banys

Taula 8.11. Protocol de tinció de talls ultrafins amb citrat de plom.**Preparació dels reactius**Citrat de plom

- Preparar 0,32 g d'hidròxid sòdic ($\text{Na}(\text{OH})$) en 8 ml d'aigua bidestil·lada.
- Preparar 1,33 g de nitrat de plom ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) i 2,4 g de citrat de sodi ($\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$) en 30 ml d'aigua destil·lada bullida.
- Barrejar les dues solucions i enrasar a 50ml amb aigua bidestil·lada i bullida.

	Reactiu	Temps
Tinció	Citrat de plom* ¹	18 minuts
Rentats * ²	Aigua destil·lada	5 segons

*¹ Es col·loquen unes gotes de citrat de plom en una àrea tancada juntament amb unes lleties d'hidròxid sòdic. *² 4 – 5 banys.

8.2. Tècniques moleculars

8.2.1. Extracció d'ADN

A partir de mostres en parafina. En primer lloc s'elimina mitjançant un bisturí tota la parafina possible del bloc. A continuació i mitjançant un micròtom, es realitzen uns 7 o 8 talls de 5 µm que s'introdueixen en un eppendorf. El material per la manipulació de cada mostra i dels talls que se'n facin ha d'estar desinfectat. Després afegim a cada mostra 200 µl de tampó de digestió (50 mM Tris-HCl a pH = 8,5 i 1 mM EDTA). Les mostres es mantenen 10 minuts a 95°C. Passats els 10 minuts, les mostres es centrifuguen durant 20 minuts a 12.000 g. Després de la centrifugació, apareix un anell de parafina a l'eppendorf que s'ha d'eliminar. Posteriorment, s'afegeixen 2 µl de proteïnasa K (10 mg/ml) i les mostres es deixen tota la nit a 56°C. Per desactivar la proteïnasa K es deixen les mostres durant 10 minuts a 95°C. A continuació, es pot aturar el protocol i congelar les mostres o bé centrifugar-les a durant 10 minuts a 12.000 g. Per fer la PCR, s'agafa 1 µl del sobrenedant que apareix després de la centrifugació.

A partir de teixit fresc. S'introdueix el teixit en un eppendorf amb 300 µl de tampó de TNES urea (10 mM Tris-HCl (pH 8), 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% SDS, 4 M urea). A continuació, s'hi afegeixen 100 µg/ml de proteïnasa K i es manté a 55°C durant tota la nit. S'afegeixen 300 µl (tants com de tampó d'extracció) de fenol i s'agita. A continuació, s'hi afegeixen 300 µl de cloroform (tants µl com de fenol) i també s'agita. Després es centrifuga la mostra a 15.000 g durant 5 minuts. S'agafa el sobrenedant que apareix després de la centrifugació (aproximadament uns 270 µl) i s'hi afegeix el triple de volum (uns 810 µl) d'etanol 92% molt fred. Quan s'agita la mescla apareix un núvol blanc d'ADN (l'aparició d'aquest núvol i la seva mida depèn de la quantitat d'ADN de la mostra). A continuació, es centrifuga la mostra a 15.000 g durant 15 minuts de manera que apareixi un botó blanc d'ADN al fons de l'eppendorf. S'eliminen l'etanol 92% de la mostra per decantació i s'hi afegeix 1 ml d'etanol 70% també fred. S'agita la mescla i es torna a centrifugar la mostra a 15.000 g durant 15 minuts. Es torna a eliminar l'etanol de la mostra per decantació i es deixa assecar. Finalment s'afegeix aigua de PCR a la mostra i es passa pel vòrtex per resuspendre-la.

9. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Ghaffar F., Ali M.A., Al Quraishy S., Entzeroth R., Abdel-Baki A.S., Al Farraj S., Bashar A.R. 2008a. *Zschokkella helmii* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), a new parasite of marbled spinefoot *Siganus rivulanus* (Forsskal 1775), Red Sea, Egypt: light and electron transmission microscopy. *Parasitology Research* 102: 183-192.

Abdel-Ghaffar E., Abdel-Baki A.A.S., Bayouni E.M., Bashtar A.R., Al Qurieshy S., Morsey K.S., Alghamdy A., Mehlhorn H. 2008b. Light and electron microscopic study on *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxozoa: Myxosporea) infecting *Oreochromis niloticus*, a new host record. *Parasitology Research* 103: 609-617.

Alvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. 1993. Pathology of Myxosporea in marine fish culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 17: 229-238.

Alvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A., Francosierra A., Palenzuela O. 1995. Protozoan parasites of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. from different culture systems in Spain. *Journal of Fish Diseases* 18: 105-115.

Alvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. 2002. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology* 32: 1007-1021.

Alvarez-Pellitero P. 2004. Report about parasitic diseases. *Options Méditerranéennes. Serie B, Etudes et Recherches* 49: 103-130.

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

Azevedo C., Lom J., Corral L. 1989. Ultrastructural aspects of *Myxidium giardi* (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the European eel *Anguilla anguilla*. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 55-61.

APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos). 2009. La Acuicultura Marina de Peces en España. Informe 2009. <http://www.apromar.es/Informes/informe%202009/Informe-APROMAR-2009.pdf> (16 de setembre de 2009).

Aquamedia. 2009. European production per country.

http://www.aquamedia.org/production/euproduction/percountry_en.asp (7 de desembre de 2009).

Athanassopoulou F. 1998. A case report of *Pleistophora* sp. infection in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) in Greece. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 18: 19-21.

Athanassopoulou F., Prapas Th., Rodger H. 1999. Diseases of *Puntazzo puntazzo* C. in marine aquaculture systems in Greece. Journal of Fish Diseases 22: 215–218.

Athanassopoulou F., Karagouni E., Dotsika E., Ragias V., Tavla J., Christofilloyanis P. 2004. Efficacy and toxicity of orally administered anticoccidial drugs for innovative treatments of *Polysporoplasma sparis* (Sitjà-Bobadilla and Álvarez-Pellitero 1985) infection in *Sparus aurata* L. Journal of Applied Ichthyology 20: 345–354.

Bartholomew J.L., Rohovec J.S., Fryer J. L. 1989. *Ceratomyxa shasta* a myxosporean parasite of salmonids. U S Fish and Wildlife Service Fish Disease Leaflet 80: 1-8.

Bartholomew J.L., Atkinson S.D., Hallett S.L., Lowenstine L.J., Garner M.M., Gardiner C.H., Rideout B.A., Keel M.K., Brown J.D. 2008. Myxozoan parasitism in waterfowl. International Journal for Parasitology 38: 1199-1207.

Bermúdez R., Vigliano F., Marcaccini A., Sitjà-Bobadilla A., Quiroga M. I., Nieto J. M. 2006. Response of Ig-positive cells to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) experimental infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): A histopathological and immunohistochemical study. Fish & Shellfish Immunology 21: 501-512.

Branson E., Rianza A., Alvarez-Pellitero P. 1999. Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). Journal of Fish Diseases 22: 395-399.

Caffara M., Marcer F., Florio D., Quaglio F., Fioravanti M.L. 2003. Heart infection due to *Henneguya* sp (Myxozoa, Myxosporea) in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured in Italy. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 23: 108-112.

Canning E.U., Curry A., Anderson C.L., Okamura B. 1999. Ultrastructure of *Myxidium trachinorum* sp. nov. from the gallbladder of the lesser weever fish *Echiichtys vipera*. Parasitology Research 85: 910-919.

Canning E.U., Okamura B. 2004. Biodiversity and evolution of Myxozoa. Advances in Parasitology 56: 43-131.

Canning E.U., Curry A., Hill S.L.L., Okamura B. 2007. Ultrastructure of *Buddenbrockia allmani* n sp (Myxozoa, Malacosporea), a parasite of *Lophopus crystallinus* (Bryozoa, Phylactolaemata). Journal of Eukaryotic Microbiology 54: 247-262.

Casal G., Costa G., Azevedo C. 2007. Ultrastructural description of *Ceratomyxa tenuispora* (Myxozoa), a parasite of the marine fish *Aphanopus carbo* (Trichiuridae), from the Atlantic coast of Madeira Island (Portugal). Folia Parasitologica 54: 165-171.

Cho J.B., Kim H.K. 2003. Light and electron-microscope description of *Kudoa paralichthys* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea) from the brain of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Diseases of Aquatic Organisms 55: 59-63.

Cho J.B., Kwon S.R., Kim S.K., Nam Y.K., Kim K.H. 2004. Ultrastructure and development of *Ceratomyxa protopsettae* Fujita, 1923 (Myxosporea) in the gallbladder of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Acta Protozoologica 43: 241-250.

Corbera J., Sabatés A., García-Rubies A. 2000. Peces del mar de la Península Ibérica. Editorial Planeta. 3ª Edición. España. p. 171-191.

Crumlish M., Diab A.M., George S., Ferguson H.W. 2007. Detection of the bacterium *Flavobacterium psychrophilum* from a natural infection in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum), using formalin-fixed, wax-embedded fish tissues. Journal of Fish Diseases 30: 37-41.

Cuadrado M., Albinyana G., Padrós F., Redondo M.J., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P., Palenzuela O., Diamant A., Crespo S. 2007. An unidentified epi-epithelial myxosporean in the intestine of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. Parasitology Research 101: 403-411.

- Cuadrado M., Marques A., Diamant A., Sitjà-Bobadilla A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P., Padrós F., Crespo S. 2008. Ultrastructure of *Enteromyxum leei* (Diamant, Lom, and Dykova, 1994), an enteric parasite infecting gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55: 363-364.
- Cuesta A., Muñoz A., Rodríguez A., Salinas I., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P., Esteban M. A., Meseguer J. 2006a. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate defense against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasitology* 132: 95–104.
- Cuesta A., Salinas I., Rodríguez A., Muñoz P., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P., Meseguer J., Esteban M.A. 2006b. Cell mediated cytotoxicity is the main innate immune mechanism involved in the cellular defence of gilthead seabream (Teleostei: Sparidae) against *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Parasite Immunology* 28: 657–665.
- Desportes-Livage I., Nicolas G. 1990. The plasma membrane of mixosporidian valve cells: freeze fracture data. *Journal of Protozoology* 37: 243-249.
- Dezfuli B.S., Giari L., Shinn A.P. 2007. The role of rodlet cells in the inflammatory response in *Phoxinus phoxinus* brains infected with *Diplostomum*. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 300-304.
- Dezfuli B.S., Giari L. 2008. Mast cells in the gills and intestines of naturally infected fish: evidence of migration and degranulation. *Journal of Fish Diseases* 31: 845-852.
- Diamant A. 1990. Morphology and ultrastructure of *Cryptobia eilatica* n. sp. (Bodonidae, Kinetoplastida), an ectoparasite from the gills of marine fish. *Journal of Protozoology* 37: 482-489.
- Diamant A. 1992. A new pathogenic histozoic *Myxidium* (Myxosporea) in cultured gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 64-66.
- Diamant A, Paperna I. 1992. *Zschokkella icterica* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), a pathogen of wild rabbit fish *Siganus luridus* (Ruppell, 1829) from the Red Sea. *European Journal of Protistology* 28:71–78.

Diamant A., Lom J., Dykova I. 1994. *Myxidium leei* n. sp. a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. Diseases of Aquatic Organisms 20: 137-141

Diamant A. 1995 *Myxidium leei* (Myxosporea) infections in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti) and common sea bream *Pagrus pagrus* (L.) (Sparidae). IV International Symposium of Fish Parasitology, Munich, Germany, Oct.1995, Program and Book of Abstracts, Abs.8.

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

Diamant A., Wajsbrodt N. 1997. Experimental transmission of *Myxidium leei* in gilt head sea bream *Sparus aurata*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 17: 99-103.

Diamant A. 1998. Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporea). Aquaculture 162: 33-39.

Diamant A., Whipps C.M., Kent M.L. 2004. *Sphaeromyxa zaharoni* n. sp. (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae), a parasite of devil firefish *Pterois miles* (Scorpaenidae) from the northern Red Sea: morphology, ultrastructure and phylogeny. Journal of Parasitology 90: 1434–1442.

Diamant A., Ram S., Paperna I. 2006. Experimental transmission of *Enteromyxum leei* to freshwater fish. Diseases of Aquatic Organisms 72: 171-178.

Dixon P.F., Joiner C.L., Le Deuff R.M., Longshaw C.B., Steedman L.C., Stone D.M., Way K. 2004. Development of a polymerase chain reaction-based assay for the detection of koi herpesvirus DNA in formalin fixed, wax embedded archive tissues. A: Aquaculture Europe 04. Book of Abstracts. October 20-23, 2004 (ed. S. Adams i J. Olafsen), p. 300-301. European Aquaculture Society, Barcelona.

El-Matbouli M., Hoffmann R.W. 1994. *Sinuolinea tetraodoni* n. sp., a myxosporean parasite of freshwater pufferfish *Tetraodon palembangensis* from Southeast Asia- light and electron microscope observations. Diseases of Aquatic Organisms 19:47–54.

El-Matbouli M., Hoffmann R.W., Mandok C. 1995. Light and electron microscopic observation on the route of the triactinomyxon-sporoplasms of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *Journal of Fish Biology* 46: 919-935.

El-Matbouli M., Hoffmann R.W. 1998. Light and electron microscopy studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. *International Journal for Parasitology* 28: 195-217.

Colloca F., Cerasi S. 2005-2009. Programa de información de especies acuáticas. *Sparus aurata*. A: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es (11 de diciembre de 2009)

FAO. 2006. State of world aquaculture. FAO Fisheries Department. N° 500. Roma. <http://www.fao.org/docrep/009/a0874e/a0874e00.htm> (11 de noviembre de 2009).

FAO. 2009. El estado mundial de la pesca i la acuicultura (SOFIA). FAO Departamento de Pesca i Acuicultura. Roma. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250s/i0250s.pdf> (11 de noviembre de 2009)

Fiala I. 2006. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology* 36: 1521-1534.

Fishery Statistical Collections. 2009. FAO. Fisheries and Aquaculture Department. <http://www.fao.org/fishery/statistics/collections/en> (7 de diciembre de 2009)

Fioravanti M.L., Caffara M., Florio D., Gustinelli A., Marcer F. 2004. Nuove osservazioni sulle mixosporidiosi marine. Book of Abstracts XI Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica., p.33.

Fioravanti M.L., Caffara M., Florio D., Gustinelli A., Marcer F., Quaglio F. 2006. Parasitic diseases of marine fish: epidemiological and sanitary considerations. *Parassitologica* 48: 15-18.

Fleurance R., Sauvegrain C., Marques A., Le Breton A., Guereaud C., Cherel Y., Wyers M. 2008. Histopathological changes caused by *Enteromyxum leei* infection in farmed sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 79: 219-228.

- Funk V.A., Raap M., Sojonky K., Jones S., Robinson J., Falkenberg C., Miller K.M. 2007. Development and validation of an RNA- and DNA-based quantitative PCR assay for determination of *Kudoa thyrsites* infection levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. 2007. Diseases of Aquatic Organisms 75: 239-249.
- Gbankoto A., Pampoulie C., Marques A., Sakiti G.N., Dramane K.L. 2003. Infection patterns of *Myxobolus heterospora* in two tilapia species (Teleostei: Cichlidae) and its potential effects. Diseases of Aquatic Organisms 55: 125-131.
- Golomazou E., Karagouni E., Athanassopoulou F. 2004. The most important myxosporean parasite species affecting cultured Mediterranean fish. Journal of Hellenic Veterinary Medical Society 55: 342–352.
- Golomazou E., Athanassopoulou F., Vagianou S., Sabatakou O., Tsantilas H., Rigos G., Kokkokiris L. 2006a. Diseases of white sea bream (*Diplodus sargus* L.) reared in experimental and commercial conditions in Greece. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences 30: 389-396.
- Golomazou E., Athanassopoulou F., Karagouni E., Tsagoris E., Tsantilas H., Vaganou S. 2006b. Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dyková, 1994 in sharpnose seabream *Diplodus puntazzo* C. and effect on some innate immune response parameters. Aquaculture 260: 44–53.
- Holzer A.S., Blasco-Costa I., Sarabeev V.L., Ovcharenko M.O., Balbuena J.A. 2006. *Kudoa trifolia* sp n. – molecular phylogeny suggests a new spore morphology and unusual tissue location for a well-known genus. Journal of Fish Diseases 29: 743-755.
- Holzer A.S., Montero F.E., Repullés A., Nolan M.J., Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P., Zarza C., Raga J.A. 2008. *Cardicola aurata* sp. N. (Digenea: Sanguinicolidae) from Mediterranean *Sparus aurata* L. (Teleostei: Sparidae) and its unexpected phylogenetic relationship with *Paradeontacylix* McIntosh, 1934. Parasitology International 57: 472-482.
- Hulbert W.C., Komourdijan M.P., Moon T.W., Fenwick J.C. 1977. The fine structure of sporogony in *Myxidium zealandicum* (Protozoa: Myxosporidia). Canadian Journal of Zoology 55: 438–447.

Ikeda J. 1912. Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. I. The life history of an Actinomyxidian, *Tetractinomyxon intermedium* g. et. sp. nov. Archiv für Protistenkunde 25: 240-242.

Jacobson E.R. 2007. Parasites and Parasitic Diseases of Reptiles. A: Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: color atlas and text. CRC Press. Taylor and Francis Group. p. 581.

JACUMAR (Junta Asesora de Cultivos Marinos). 2009. Datos de producción. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

http://www.mapa.es/app/jacumar/datos_produccion/lista_datos_produccion.aspx?Id=es (consulta 16 de setembre de 2009).

Jiménez-Guri E., Philippe H., Okamura B., Holland P.W.H. 2007. *Buddenbrockia* is a Cnidarian worm. Science 5834: 116-118.

Kent M. L., Andree K.B., Bartholomew J. L., El-Matbouli M., Desser S.S, Devlin R.H., Feist S. W., Hedrick R.P., Hoffmann R.W., Khattra J., Hallett S.L., Lester R.J.G., Longshaw M., Palenzuela O., Siddall M.E., Xiao C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. Journal of Eukaryotic Microbiology 48: 395-413.

Køie M., Karlsbakk E., Nylund A. 2008. The marine herring myxozoan *Ceratomyxa auberbachii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) uses *Chone infundibuliformis* (Annelida: Polychaeta: Sabellidae) as invertebrate host. Folia Parasitologica 55: 100-104.

Køie M., Karlsbakk E., Nylund A. 2007. A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *Gadimyxa atlantica* N. sp. Journal of Parasitology 93: 1459-1467.

Køie M., Whipps C.M., Kent M.L. 2004. *Ellipsomyxa gobii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Annelida: Polychaeta) as invertebrate hosts. Folia Parasitologica 51: 14-18.

Le Breton A., Marques A. 1995. Occurrence of a histozoic *Myxidium* in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 15: 210–212.

- Levine S.M., Pérez-Pérez G., Olivares A., Yee H., Hanna B.A., Blaser M.J. 2002. PCR-based detection of *Bacillus anthracis* in formalin-fixed tissue from a patient receiving ciprofloxacin. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 4360-4362.
- Locke M. 1965. The structure of septate desmosomes. *Journal of Cell Biology* 25: 166-165.
- Lom J., Puytorac P. 1965. Studies on the myxosporidian ultrastructure and polar capsule development. *Protistologica* 18: 489-502.
- Lom J., Dyková I. 1988. Sporogenesis and spore structure in *Kudoa lunata* (Myxosporidia, Multivalvulida). *Parasitology Research* 74: 521-530.
- Lom J., Dyková I. 1992. Myxosporidia (Phylum Myxozoa). A: Protozoan Parasites of Fishes. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. 26. Elsevier, Amsterdam, 167. p. 159-235.
- Lom J., Dyková I. 1996. Notes on the ultrastructure of two myxosporidian (Myxozoa) species, *Zschokkella pleomorpha* and *Ortholinea fluviatilis*. *Folia Parasitologica* 43: 189-202.
- Lom J., Dyková I. 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53: 1-36.
- Marino F., Macri D., Paruta S., Busalacchi B., Genovese L., De Vigo G. 2004. Blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) a new susceptible host for *Myxidium leei*. *Aquaculture Europe. Extended abstracts and short communications, European Aquaculture Society, Special Publication 34*: 524-525.
- Marques A. 1986. Sexuality among Actinomyxidia. A study of *Neoactinomyxon eiseniellae* (Ormieres et Frezil, 1969. Actinosporea Noble 1980. Myxozoa Grassé 1970). *Annales des Sciences Naturelles Zoologie et Biologie Animale* 8: 81-102.
- Mathieu-Daude F., Faye N., Coste F., Manier J.F., Marques A., Bouix G. 1992. Occurrence of a microsporidiosis in marine cultured gilt-head sea bream from the Languedoc coast: a problem of specificity in the genus *Glugea* (Protozoa, Microspora). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 67-70.

Mena Sellís C., García García B. 2002. Importancia de la proteína vegetal en la dieta natural de poblaciones salvajes de Sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777): sus implicaciones en el cultivo intensivo. Revista AquaTIC 17. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=152> (7 de diciembre de 2009)

Matos E., Tadjari J., Azevedo C. 2005. Ultrastructural studies of *Henneguya rhamdia* n. sp (Myxozoa) a parasite from the Amazon teleost fish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). Journal of Eukaryotic Microbiology 52: 532-537.

Merella P., Cherchi S., Salati F., Garippa G. 2005. Parasitological survey of sharpnose seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777) reared in sea cages in Sardinia (western Mediterranean). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 25: 140-147.

Midtlyng P.J., Raynard R., Wahli T., Vatsos I., Mortensen S., Blas I., Thrush M., Miossec L. 2006. Revisión europea sobre interacciones en enfermedades y transferencia de patógenos entre animales acuáticos cultivados y silvestres. Resumen general. Veterinaermedisinsk Oppdragssekte AS.

Mladineo N. 2003. Life cycle of *Ceratomyxa oestroides*, a cymothoid isopod parasite from sea bass *Dicentrarchus labrax* and sea bream *Sparus aurata*. Diseases of Aquatic Organisms 57: 97-101.

Mladineo I. 2005. Parasite communities of Adriatic cage-reared fish. Diseases of Aquatic Organisms 64: 77-83.

Monteiro A.S., Okamura B., Holland P.W.H. 2002. Orphan worm find a home: *Buddenbrockia* is a Myxozoan. Molecular Biology & Evolution 19: 968-971.

Montero F. E., Cuadrado M., Crespo S., Padrós F., Raga J. A. 2007. *Cryptocaryon irritans* and *Enteromyxum leei*, two threats for the culture of *Diplodus puntazzo* in the Mediterranean. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 27: 242-249.

Morrison C.M., Martell D.J., Leggiadro C., O'Neill D. 1996. *Ceratomyxa drepanopsettae* in the gallbladder of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, from the northwest Atlantic Ocean. Folia Parasitologica 43: 20-36.

Morris D.J., Adams A. 2007a. Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) within the bryozoan hosts *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Parasitology Research* 100: 983-992.

Morris D.J., Adams A. 2007b. Sacculogenesis of *Buddenbrockia plumatellae* (Myxozoa) within the invertebrate hosts *Plumatella repens* (Bryozoa) with comments on the evolutionary relationships of the Myxozoa. *International Journal for Parasitology* 37: 1163-1171.

Muñoz P., Cuesta A., Athanassopoulou F., Golomazou H., Crespo S., Padrós F., Sitjà-Bobadilla A., Albiñana G., Esteban M. A., Alvarez-Pellitero P., Meseguer J. 2007. Sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) humoral immune response against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa). *Fish & Shellfish Immunology* 23: 636–645.

Padrós F., Palenzuela O., Hispano C., Tosas O., Zarza C., Crespo S., Alvarez-Pellitero P. 2001. *Myxidium leei* (Myxozoa) infections in aquarium-reared Mediterranean fish species. *Diseases of Aquatic Organisms* 47: 57-62.

Palenzuela O., Sitjà-Bobadilla A., Álvarez-Pellitero P. 1997. *Ceratomyxa sparusaurati* (Protozoa: Myxosporea) infections in cultured gilthead seabream *Sparus aurata* (Pisces:Teleostei) from Spain: aspects of the host-parasite relationship. *Parasitology Research* 83: 539–548.

Palenzuela O., Álvarez-Pellitero P., Sitjà-Bobadilla A. 1999. Glomerular disease associated to *Polysporoplasma sparis* (Myxosporea: Bivalvulida) infections in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, (Pisces; Teleostei): aspects of the host–parasite relationship. *Parasitology* 118:245–256.

Palenzuela O., Redondo M.J., Alvarez-Pellitero P. 2002. Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence. *Parasitology* 124: 369-379.

Palenzuela O., Agnetti F., Albiñana G., Alvarez-Pellitero P., Athanassopoulou F., Crespo S., Diamant A., Ghittino C., Golomazou H., Le Breton A., Lipshitz A., Marques A., Padrós F., Ram S., Raymond J.C. 2004. Applicability of PCR screening for the monitoring of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infection in Mediterranean Aquaculture: an epidemiological survey in sparid facilities. European Aquaculture Society Special Publication, 34: 639-640.

Palenzuela O. 2006. Myxozoan infections in Mediterranean mariculture. Parassitologia 48: 27–29.

Papapanagiotou, E.P., Trilles, J.P. 2001. Cymothoid parasite *Ceratothoa parallela* inflicts great losses on cultured gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece. Diseases of Aquatic Organisms 45: 237-239.

Paperna I. 1998. Mariculture versus environment: risks and impacts. Biol. Mar. Mediterr. 5: 381-389.

Pattono D., Bozzetta E., Prearo M., Rogato F., Gilmozzi M., Ghittino C. 1997. Case of parasitic enteritis in gilthead seabream intensively cultured in Italy. Bolletino Societa Italiana di Patologia Ittica 21: 13-19.

Prunescu C.C., Prunescu P., Puzek Z., Lom J. 2007. The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). Folia Parasitologica 54: 159-164.

Quiroga M., Redondo M.J., Sitjà-Bobadilla A., Palenzuela O., Riaza A., Macias A., Vazquez S., Perez A., Nieto J.M., Alvarez-Pellitero P. 2006. Risk factors associated with *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa) infection in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Parasitology 133: 433-442.

Redondo M.J., Palenzuela O., Riaza A., Macias A., Alvarez-Pellitero P. 2002. Experimental transmission of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. Journal of Parasitology 88: 482-488.

Redondo M.J., Quiroga M.I., Palenzuela O., Nieto J.M., Alvarez-Pellitero P. 2003. Ultrastructural studies on the development of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Parasitology Research 90: 192-202.

Redondo M. J., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. 2004. Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. Folia Parasitologica 51: 188–198.

Redondo M.J. 2005. Estudios sobre el ciclo vital y transmisión de *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), parásito entérico del rodaballo. Tesis doctoral.

Redondo M.J., Cortadellas N., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. 2008. Detection of carbohydrate terminals in the enteric *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) and possible interactions with its fish hosts (*Psetta maxima*). Parasitology Research 102: 1257-1267.

Renaud F., Manet D., Toubiana M., Siau Y., Le Breton A., Sauvegrain C., Wyers M., Marques A. 2004. *Enteromyxum leei* (Myxosporean) Infection of Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*, reared with infested sea bream, *Sparus aurata*. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 41st Annual Meeting.

Rigos G., Christophiligiannis P., Yiagnisi M., Andriopoulou A., Koutsodimou M., Nengas I., Alexis M. 1999. Myxosporean infections in Greek mariculture. Aquaculture International 7: 361-364.

Sakiti N., Tarer V., Jacquemin D., Marques A. 1996. Présence en Méditerranée occidentale d'une Myxosporidie hitozoïque pathogène dans les élevages de la Daurade *Sparus aurata* L. Annales des Sciences Naturelles- Zoologie et Biologie Animale 17: 123-127.

Seligman A.M., Wasserhug H.L., Hanker J.S. 1996. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid droplets in osmium tetroxid-fixed tissue osmiophilic thiocarbonylhydrazide (TCH). Journal of Cell Biology 30: 424-432.

Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. 1993a. *Zschokkella mugilis* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida) from mullets (Teleostei: Mugilidae) of Mediterranean waters: Light and electron microscopic description. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 755-764.

Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. 1993b. Ultrastructural and cytochemical observations on the sporogenesis of *Sphaerospora testicularis* (Protozoa: Myxosporea) from Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *European Journal of Protistology* 29: 219-229.

Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. 1995. Light and electronic description of *Polysporoplasma* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), *Polysporoplasma sparis* n. sp. from *Sparus aurata* (L.) and *Polysporoplasma mugilis* n. sp. from *Liza aurata* L. *European Journal of Protistology* 31: 77-89.

Sitjà- Bobadilla A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. 1995. *Ceratomyxa sparusaurati* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a new parasite of cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Teleostei: Sparidae). Light and electron microscopic description. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 529-539.

Sitjà-Bobadilla A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. 1996. Light microscopic description of *Eimeria sparis* sp. nov. and *Goussia sparis* sp. nov. (Protozoa: Apicomplexa) from *Sparus aurata* L. (Pisces: Teleostei). *Parasitology Research* 82: 323-332.

Sitjà-Bobadilla A., Alvarez-Pellitero P. 2001. *Leptotheca sparidarum* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from cultured common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (Teleostei: Sparidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 627-369.

Sitjà-Bobadilla A. 2004. Parasites in Mediterranean aquacultured fish: current impact and future research directions. A: Mas-Coma S (ed) *Multidisciplinary for parasites, vectors and parasitic diseases*. Medimond, Bologna, Italy, p. 301–311.

Sitjà-Bobadilla A., Diamant A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P. 2007. Host factors and experimental conditions on the horizontal transmission of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Fish Diseases* 29:1–8.

- Sitjà-Bobadilla A., Calduch-Giner J., Saera-Vila A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero P., Pérez-Sánchez J. 2008. Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Fish & Shellfish Immunology* 24: 610-619.
- Smothers J.F., Vondohlen C.D., Smith L.H., Spall R.D. 1994. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science* 265: 1719-1721.
- Sostoa A., Allué R., Camarasa J.M., Casepona J., Castillo M., Doadrio I., Fernández i Colomé J., Franquesa R., Lloris D., Lobón-Cervià J., Matallanas J., Muñoz Chapuli R., Sostoa F.J., Vinyoles D. 1990. Història Natural dels Països Catalans. Peixos. Volum 11. Enciclopèdia Catalana. 1^a Edició. Barcelona. p. 270-281.
- Su X.Q. 1996. An ultrastructural study of *Zschokkella leptatherinae* (Myxozoa: Myxosporea) from atherinid fish, *Leptatherina presbyteroides*. *Acta Protozoologica* 35: 41-48.
- Tadjari J., Matos E., Mendoca I., Azevedo C. 2005. Ultrastructural morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n., parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. *Acta Protozoologica* 44: 377-384.
- Tarer V., Sakiti N., Le Breton A., Marques A. 1996. *Myxidium leei*, myxosporidie pathogène chez les sparidés en aquaculture méditerranée. *Ichthyophysiological Acta* 19: 127-139.
- Thiéry J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *Journal of Microscopy* 6: 987-1018.
- Tun T., Yokoyama H., Ogawa K., Wakabayashi H. 2000. Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emancipated Tiger Puffer. *Fish Pathology* 35: 145-156.
- Tun T., Ogawa K., Wakabayashi H. 2002. Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 25: 63-72.

True K., Purcell M.K., Foott J.S. 2009. Development and validation of a quantitative PCR to detect *Parvicapsula minibicornis* and comparison to histologically ranked infection of juvenile Chinook salmon, *Onchorhynchus tshawytscha* (Walbaum), from the Klamath River, USA. *Journal of Fish Diseases* 32: 183-192.

Upenskaya A.V. 1982. New data on the life cycle and biology of Myxosporidia. *Archiv für Protistenkunde* 126: 309-338.

Yanagida T., Nomura Y., Kimura T., Fukuda Y., Yokoyama H., Ogawa K. 2004. Molecular and morphological redescrptions of enteric the Myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. N. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathology* 39:137–143.

Yanagida T., Freeman M.A., Nomura Y., Takami I., Sugihara Y., Yokoyama H., Ogawa K. 2005. Development of a PCR-based method for the detection of enteric myxozoans causing the emaniation disease of cultured tigger puffer. *Fish Pathology* 40: 23-28.

Yanagida T., Sameshima M., Nasu H., Yokoyama H., Ogawa K. 2006. Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 29: 561–567.

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

Yasuda H., Ooyama, Y., Nakamura A., Iwata, K., Palenzuela, O. & Yokoyama, H. 2005. Occurrence of the myxosporean emaniation disease caused by *Enteromyxum* in cultured japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish pathology* 30: 175-180.

Yokoyama H., Shirakashi S. 2007. Evaluation of hyposalinity treatment on infection with *Enteromyxum leei* (Myxozoa) using anemone fish *Amphiprion* spp. as experimental host. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 27: 74-78.

Wolf K., Markiw M.E. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa- New discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225: 1449-1452.

Zrnčić S., Oraić D., Šoštarić, B. & Filić, I. 1998. First occurrence of *Myxidium leei* in cultivated sharp snouted *Sparus* (*Puntazzo puntazzo*) in Croatia. 3rd Int'l Symp. Aquatic Animal Health. p. 248.

