ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ:
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Μελέτη της επιθηλιοκύστης στην Ελλάδα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αντωνακάκη Αγγελική

2017

UNIVERSITY OF CRETE – BIOLOGY DEPARTMENT
POST GRADUATE STUDIES PROGRAM
ENVIRONMENTAL BIOLOGY:
MANAGEMENT OF TERRESTRIAL AND MARINE
BIOLOGICAL RESOURCE

Study of epitheliocystis in Greece

MASTER THESIS

Antonakaki Angeliki

2017

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Κεντούρη Μαρουδιώ (Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Καθάριος Παντελής (Ερευνητής Β', Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ)
Vaughan Lloyd (Assistant Professor, Institute of Veterinary Pathology, University of Zurich)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Περιβαλλοντική Βιολογία: Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων» του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το πειραματικό μέρος της εργασίας διεξήχθη στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας στο ΙΘΑΒΒΥΚ του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερα όμως θέλω να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου κα. Κεντούρη Μαρουδιώ που επέβλεψε την μεταπτυχιακή μου διατριβή και που τα τελευταία χρόνια με στηρίζει στην φοιτητική μου πορεία και εξέλιξη και τον Dr. Lloyd Vaughan που με τίμησε με τη συμμετοχή του στην τριμελή μου επιτροπή αλλά και με την άψογη επικοινωνία και συνεργασία που είχαμε. Ωστόσο, τη μέγιστη συμβολή για την εκπόνηση αυτής της εργασίας είχε ο Dr. Παντελής Καθάριος τον οποίο ευχαριστώ θερμά για όλα όσα μου προσέφερε και κυρίως για τη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την κατανόηση του.

Ακόμα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις εταιρίες ιχθυοκαλλιέργειας, Νηρέα, Σελόντα και Ανδρομέδα που συνέβαλαν στη συλλογή των δειγμάτων και συγκεκριμένα θέλω να ευχαριστήσω τους ιχθυοπαθολόγους, κ. Kantham Papanna, κ. Νάνσυ Δουράλα και κ. Ιωάννη Πετρόπουλο.

Οφείλω να ευχαριστήσω επίσης, τους ανθρώπους που δουλεύουν στο τμήμα Υδατοκαλλιεργειών του ΙΘΑΒΒΥΚ καθώς, όλοι, λίγο ή πολύ, συνέβαλαν και βοήθησαν στην διεκπεραίωση αυτής της εργασίας. Όμως θέλω να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους φοιτητές και εργαζόμενους στο εργαστήριο ιχθυοπαθολογίας, τη Ντίντα Κοκκάρη, τη Μαρία Σμυρλή, τη Μαριάννα Τσέρτου και τον Παναγιώτη Καλατζή για τη σημαντική βοήθειά που μου προσέφεραν και για το φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον συνεργασίας που δημιούργησαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένεια και τους φίλους μου που με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια σε όλα μου τα βήματα χαρίζοντας μου ασφάλεια, δύναμη και αισιοδοξία ώστε να πραγματοποιώ τα όνειρα και τους στόχους μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΕΣ 3
ΕΙΚΟΝΕΣ 5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ 8
ABSTRACT 9
1 Εισαγωγή 10
1.1 Υδατοκαλλιέργειες 10
1.2 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα 10
1.3 Ασθένειες 12
1.3.1 Ασθένειες στη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια 13
1.3.2 Επιθηλιοκύστη 14
1.3.3 Ιστορικό της μελέτης της ασθένειας στην Ελλάδα 19
1.4 Στόχοι εργασίας 20
2 Υλικά και Μέθοδοι 21
2.1 Συλλογή δειγμάτων 21
2.2 Μοριακή ανάλυση 23
2.2.1 Εξαγωγή DNA 23
2.2.2 Πολλαπλασιασμός DNA βακτηρίων 23
2.2.3 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης 24
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση 24
2.2.5 Παρατήρηση γέλης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας 25
2.2.6 Καθαρισμός DNA 26
2.2.7 Αλληλούχιση 26
2.2.8 Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών 26
2.3 Ιστολογία 28
2.3.1 Παρασκευή μονιμοποιητικού διαλύματος 28
2.3.2 Αφυδάτωση δειγμάτων 28
2.3.3 Έγκλειση (πολυμερισμός ρητίνης) 28
2.3.4 Χρώση δειγμάτων 29
2.3.5 Τομές και παρατήρηση 29
2.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης 29
2.4.1 Χρώση 30
2.4.2 Αφυδάτωση 30
2.4.3 Έγκλειση 30
2.4.4 Τομές και παρατήρηση 30
2.5 Στατιστική ανάλυση 30
3 Αποτελέσματα 32

3.1 Χαρακτηριστικά των ψαριών ... 32
3.2 Μοριακή ανάλυση ... 33
3.2.1 Τσιπούρα ... 33
3.2.2 Λαβράκι ... 35
3.2.3 Μαγιάτικο ... 35
3.3 Μοριακός χαρακτηρισμός ... 36
3.3.1 *Ca*. Ichthyocystis spp. ... 36
3.3.2 Chlamydiales ... 37
3.3.3 Endozoicomonas spp. ... 39
3.4 Μικροσκοπική παρατήρηση ... 40
3.5 Ιστολογία ... 40
3.6 Μορφομετρια κυστεων ... 44
3.7 Μορφομετρια κυστεων ανά είδος ψαριού ... 45
3.7.1 Τύπος a ... 47
3.7.2 Τύπος b ... 47
3.7.3 Τύπος c ... 48
3.7.4 Τύπος d ... 49
3.7.5 Μορφομετρία των κύστεων ανά τύπο ... 49
3.7.6 Τσιπούρα ... 51
3.7.7 Λαβράκι ... 53
3.7.8 Μαγιάτικο ... 55
3.7.9 Μορφομετρία κύστεων με την παράμετρο του δακτυλιδιού ... 57
3.7.10 Μορφομετρία των κύστεων σε σχέση με την υφή του περιεχομένου ... 59
3.8 Ηλεκτρονικη μικροσκόπια ... 62
4 Συζήτηση ... 64
4.1 Μοριακός χαρακτηρισμός και φυλογενετικές σχέσεις των βακτηρίων ... 64
4.2 Ιστολογική ανάλυση ... 67
4.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία ... 70
4.4 Συμπεράσματα ... 70
4.5 Μελλοντικές μελέτες ... 73
5 Βιβλιογραφία ... 74

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Απεικόνιση του συνόλου των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και αντιστοίχιση του κωδικού των ψαριών με το μέσο συντήρησης που χρησιμοποιήθηκε και το είδος του ψαριού. 22
Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε κατηγορία παθογόνου μικροβίου. 24
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό σχεδόν όλου του γονιδίου 16S των χλαμυδίων. 26
Πίνακας 4: Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις για τις 3 κατηγορίες βακτηρίων. Χαρακτηρισμός του βακτηρίου σε επίπεδο γένους ή είδους, κωδικός του στελέχους, οργανισμός από τον οποίο ταυτοποιήθηκε και κωδικός της βάσης δεδομένων GenBank. 27
Πίνακας 5: Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις, ελάχιστες και μέγιστες τιμές της ηλικίας, του χρόνου παραμονής στα κλουβιά, του βάρους και της θερμοκρασίας του νερού για το σύνολο των ψαριών που εξετάστηκαν. 32
Πίνακας 6: Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις, ελάχιστες και μέγιστες τιμές της ηλικίας, του χρόνου παραμονής στα κλουβιά, του βάρους και της θερμοκρασίας του νερού για τις τσιπούρες. 32
Πίνακας 7: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή του Αστακού. 33
Πίνακας 8: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Νότιας Εύβοιας. 34
Πίνακας 9: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας. 34
Πίνακας 10: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Χίου. 34
Πίνακας 11: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Αργολίδας. 35
Πίνακας 12: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων του δείγματος από την περιοχή της Βόνιτσας. 35
Πίνακας 13: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Λάρυμνας. 35
Πίνακας 14: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Σούδας. 35
Πίνακας 15: Αριθμός κύστεων, αριθμός δειγμάτων και μέσος όρος κύστεων ανά δείγμα για τα 3 είδη ψαριών και συνολικά. 43
Πίνακας 16: Μέσος όρος, τυπική απόκλιση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους του συνόλου των 645 κύστεων. 45
Πίνακας 17: Μέσοι όροι, αριθμός μετρήσεων, τυπικό σφάλμα, τυπική απόκλιση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή της επιφάνεια, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για τα τρία διαφορετικά είδη, τσιπούρα, λαβράκι και μαγιάτικο. 45
Πίνακας 18: Καταγεγραμμένος αριθμός κύστεων ανά τύπο και συνολικός αριθμός 46
Πίνακας 19: Κατηγοριοποίηση των τεσσάρων τύπων κύστεων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα την υφή του περιεχομένου τους και το αν σχηματίζεται δακτυλίδι στην περιφέρειά τους. 49
Πίνακας 20: Μετρικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων κύστεων 50
Πίνακας 21: Μετρικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων κύστεων που απομονώθηκαν από δείγματα βραγχίων τσιπούρας. 52

Πίνακας 22: Μετρικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων κύστεων που απομονώθηκαν από δείγματα βραγχίων λαβρακιού. 54
Πίνακας 23: Μετρικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων κύστεων που απομονώθηκαν από δείγματα βραγχίων μαγιάτικου. 56
Πίνακας 24: Μετρικά χαρακτηριστικά κύστεων χωρίς και με δακτυλίδι. 58
Πίνακας 25: Μετρικά χαρακτηριστικά των κύστεων με λεπτόκοκκο (fine) και των κύστεων με χοντρόκοκκο (coarse) περιεχόμενο. 60
Πίνακας 26: Μετρικά χαρακτηριστικά του δακτυλιδιού των κύστεων. 61

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Ευρωπαϊκή παραγωγή ανά είδος σε χιλιάδες τόνους για το έτος 2014 από τη FEAP (http://www.nireus.com). 11
Εικόνα 2: Ετήσιο διάγραμμα της παγκόσμιας παραγωγής σε τσιπούρα και λαβράκι όπου με διαφορετικό χρώμα απεικονίζεται η συμμετοχή κάθε χώρας-παραγωγού (http://www.nireus.com). 11
Εικόνα 3: Ποσοστιαία απεικόνιση των εξαγωγών τσιπούρας και λαβρακιού στις χώρες-αποδέκτες (http://www.nireus.com). 12
Εικόνα 4: Επιθηλιοκύστη σε βράγχια Red Snapper (http://chlamydiae.com/) 14
Εικόνα 5: Γεωγραφική κατανομή των περιοχών δειγματοληψίας. Το χρώμα του περιγράμματος αντιστοιχεί στο είδος ψαριού από το οποίο συλλέχθηκαν τα δείγματα. Το κόκκινο περίγραμμα αντιστοιχεί σε τσιπούρες, το πράσινο σε λαβράκια και το κίτρινο σε μαγιάτικα. 21
Εικόνα 6: Φωτογραφία από γέλη αγαρόζης στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Ca.* Ichthyocystis. Η θέση 1 αντιστοιχεί στο αρνητικό control, οι θέσεις 2-7 αντιστοιχούν σε DNA δειγμάτων, η θέση 8 αντιστοιχεί στο θετικό control και η θέση 9 στον μάρτυρα (Ladder 100-1000bp). Όπως φαίνεται από τις μπάντες που σχηματίζονται, στα δείγματα ταυτοποιούνται βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis. 25
Εικόνα 7: Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών που μελετήθηκαν με στελέχη που ανήκουν στο γένος Ichthyocystis και δύο άλλα βακτήρια που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια (Εξωομάδα: *Aeromonas veronii*), σύμφωνα με την ανάλυση Neighbor-Joining για τμήμα (755 νουκλεοτιδικές βάσεις) του γονιδίου του 16S rRNA. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ανάλυσης. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από τσιπούρες, σε γκρι αυτές που αντιστοιχούν σε δείγμα από λαβράκι (Λάρυμνα) και σε μπλε οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από μαγιάτικα (Σούδα). Σε λευκό πλαίσιο βρίσκονται τα σύμβολα που αντιστοιχούν στις περιοχές δειγματοληψίας για τα δείγματα από τσιπούρες. 37
Εικόνα 8: Φυλογενετικές σχέσεις των αλληλουχιών που μελετήθηκαν με στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικά γένη του φύλου Chlamydiales (Εξωομάδα: *Aeromonas veronii*), σύμφωνα με την ανάλυση Neighbor-Joining για τμήμα (1005 νουκλεοτιδικές βάσεις) του γονιδίου του 16S rRNA. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ανάλυσης. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από τσιπούρες και σε γκρι αυτές που αντιστοιχούν σε δείγμα από λαβράκι (Λάρυμνα). Σε λευκό πλαίσιο βρίσκονται τα σύμβολα που αντιστοιχούν στις περιοχές δειγματοληψίας για τα δείγματα από τσιπούρες. 38
Εικόνα 9: Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών που μελετήθηκαν με στελέχη που ανήκουν στο γένος Endozoicomonas (Εξωομάδα: *Aeromonas veronii*) σύμφωνα με την ανάλυση Neighbor-Joining για τμήμα (397 νουκλεοτιδικές βάσεις) του γονιδίου του 16S rRNA. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ανάλυσης. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από τσιπούρες. Σε λευκό πλαίσιο βρίσκεται το σύμβολο που αντιστοιχεί στην περιοχή δειγματοληψίας. 39
Εικόνα 10: Εικόνες βραγχίων νωπών παρασκευασμάτων που προέρχονται από βράγχια συντηρημένα σε φωσφορικό διάλυμα φορμόλης (PBF 10%). Οι κύστεις είναι ευδιάκριτες, πολυάριθμες, ανισομεγέθεις και διάσπαρτες κατά μήκος των δευτερογενών ελασμάτων των βραγχίων. 40

Εικόνα 11: Φωτογραφία τομής βραγχίων τσιπούρας με επιθηλιοκύστη σε οπτικό μικροσκόπιο. Παρατηρείται παθολογική εικόνα των δευτερογενών βραγχιακών ελασμάτων που οφείλεται στις κύστεις με έντονη την υπερπλασία του επιθηλιακού ιστού (κλίμακα στα 100μm) 41
Εικόνα 12: Ιστολογικές τομές βραγχίων με επιθηλιοκύστη. α) Δευτερογενή ελάσματα βραγχίου τσιπούρας με έντονο πρόβλημα. Υπάρχουν πολλές κύστεις διαφορετικών μεγεθών και σχημάτων. Οι σκούρες διαγώνιες γραμμές είναι artifacts (κλίμακα: 100μm). β) Μεγάλη κύστη με πυκνό λεπτόκοκκο περιεχόμενο. Περιφερειακά της κύστης παρατηρείται υπερπλασία του επιθηλιακού ιστού με στιβάδες πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων (squamus metaplasia) (κλίμακα: 50μm). γ) Μεγάλη, διερρηγμένη, κύστη που έχει αποκοπεί από τα βράγχια. Τα βακτήρια έχουν αρχίσει να απελευθερώνονται στο περιβάλλον (κλίμακα: 50μm). δ) τμήμα δευτερογενούς βραγχιακού ελάσματος με κύστεις. Παρατηρούνται αλλοιώσεις του ιστού που πιθανά να οφείλονται σε κακή συντήρηση ωστόσο στις περιοχές που υποδεικνύονται με μαύρα βέλη είναι πιθανό η αλλοίωση να έχει προκληθεί από κύστεις που προϋπήρχαν στα σημεία και έχουν «εξουδετερωθεί» από τον οργανισμό (κλίμακα: 100μm) 42
Εικόνα 13: Φωτογραφίες των παρασίτων και των βακτηριών που παρατηρήθηκαν στους ιστούς που εξετάστηκαν. α) Φωτογραφία από αυγό του διγενούς *Cardicola aurata* σε δείγμα από τσιπούρα. Η έντονη μπλε γραμμή κάτω αριστερά στη φωτογραφία είναι artifact (κλίμακα: 50μm). β) Φωτογραφία του μονογενούς παρασίτου *Furnestinia echeneis* σε δείγμα από τσιπούρα (κλίμακα: 100μm). γ) Φωτογραφία του μονογενούς παρασίτου *Diplectanum aequans* σε δείγμα από λαβράκι (κλίμακα: 50μm). δ) Φωτογραφία από Μυξοβακτήρια σε δείγμα από τσιπούρα που υποδεικνύονται με ελλειψοειδές πλαίσιο (κλίμακα: 50μm). 44
Εικόνα 14: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε είδος ψαριού. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). 46
Εικόνα 15: Κύστη τύπου a. Χαρακτηρίζεται από πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο ενώ εξωτερικά, στο κάτω μέρος της κύστης, παρατηρείται υπερπλασία του ιστού (κλίμακα: 50μm). 47
Εικόνα 16: Κύστη τύπου b. Χαρακτηρίζεται από χοντρόκοκκο περιεχόμενο. Δεν παρατηρείται υπερπλασία του ιστού ή φλεγμονή. Οι κάθετες γραμμές στο αριστερό τμήμα της φωτογραφίας είναι artifact (κλίμακα: 50μm). 47
Εικόνα 17: Κύστη τύπου c. Χαρακτηρίζεται από χοντρόκοκκο περιεχόμενο και η διάταξη των βακτηρίων είναι αραιότερη σε σχέση με τις κύστεις τύπου a. Ούτε εδώ παρατηρείται υπερπλασία του ιστού ή φλεγμονή, αντίθετα περιφερειακά της κύστης σχηματίζεται μια ροζ δομή από τον ιστό (δακτυλίδι). Η κλίμακα ορίζεται στα 50μm. .. 48
Εικόνα 18: Κύστη τύπου d. Χαρακτηρίζεται από πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο όπως αυτό των κύστεων τύπου a. Περιφερειακά της κύστης σχηματίζεται δακτυλίδι και περιφερειακά του δακτυλιδιού παρατηρείται στιβάδα πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων (squamus metaplasia). Η κάθετη γραμμή δεξιά της κύστης είναι artifact (κλίμακα στα 50μm). 49
Εικόνα 19: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). 51
Εικόνα 20: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης για τα δείγματα από τσιπούρες. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). 53
Εικόνα 21: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης για τα δείγματα από

λαβράκια. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). 55
Εικόνα 22: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης για τα δείγματα από μαγιάτικα. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). 56
Εικόνα 23: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για τις κύστεις χωρίς δακτυλίδι και για τις κύστεις με δακτυλίδι. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05). 58
Εικόνα 24: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για τις κύστεις με λεπτόκοκκο (fine) και τις κύστεις με χοντρόκοκκο (coarse) περιεχόμενο. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0,05). 61
Εικόνα 25: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Φαίνεται η πυκνή και συμπαγής διαμόρφωση των βακτηριακών κυττάρων στο εσωτερικό των κύστεων. Παρατηρούνται κυρίως στρογγυλά ή ελλειψοειδή βακτήρια καθώς και επιμήκη σε διαδικασία διαίρεσης. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 2μm. 62
Εικόνα 26: Φωτογραφίες από TEM των βακτηρίων της κύστης σε μεγάλη μεγέθυνση. Είναι εμφανής η διπλή μεμβράνη των βακτηρίων (μαύρο βέλος), τα σφαιρικά σωματίδια στο περιβάλλον και στο εσωτερικό των κυττάρων (λευκό βέλος), ενώ τα πυρηνοειδή των κυττάρων είναι οι πυκνές μαύρες δομές (υψηλή πυκνότητα ηλεκτρονίων) στο εσωτερικό τους. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 0.2μm. 63
Εικόνα 27: Φωτογραφίες από TEM της άκρης των κύστεων. Στις 2 φωτογραφίες φαίνεται η μεμβράνη που δημιουργείται περιφερειακά από τα επιθηλιακά πλακώδη κύτταρα του ιστού που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμοσώματα και εσωκλείουν τα βακτήρια. Στην κάτω φωτογραφία φαίνονται και κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος του ψαριού να βρίσκονται περιφερειακά της μεμβράνης. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 2μm και 5μm στην αριστερή και δεξιά φωτογραφία αντίστοιχα. 63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιθηλιοκύστη είναι μια ασθένεια των ψαριών. Χαρακτηρίζεται από κύστεις που εντοπίζονται στο επιθήλιο των βραγχίων και του δέρματος και περιέχουν ενδοκυτταρικά βακτήρια. Η μελέτη της επιθηλιοκύστης αποτελεί πρόκληση και αυτό οφείλεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της. Η ασθένεια έχει παγκόσμια εξάπλωση και έχει καταγραφεί σε πάνω από 90 είδη ψαριών γλυκού ή θαλασσινού νερού, καλλιεργούμενα ή μη. Τα βακτήρια που την προκαλούν εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα καθώς, μέχρι τώρα, έχουν ταυτοποιηθεί ως υπεύθυνα παθογόνα, βακτήρια που ανήκουν στα χλαμύδια, στα β- και γ-πρωτεοβακτήρια. Επιπλέον, τα παθογόνα βακτήρια είναι ενδοκυτταρικά με αποτέλεσμα να μην έχει επιτευχθεί η απομόνωσή τους *in vitro*.

Στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια, η επιθηλιοκύστη παρουσιάζει μια τάση εδραίωσης και εξάπλωσης που έχει αρνητικές επιπτώσεις για τις ιχθυοκαλλιέργειες γενικότερα, ενώ φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα την τσιπούρα. Ως, υπεύθυνα παθογόνα που προκαλούν την ασθένεια έχουν ταυτοποιηθεί τα είδη *Ca.* Ichthyocystis sparus και *Ca.* Ichthyocystis hellenicum (β-πρωτεοβακτήρια) και βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Ca.* Similichlamydia και *Ca.* Piscichlamydia, στην τσιπούρα, ενώ το *Ca.* Endozoicomonas cretensis (γ-πρωτεοβακτήρια) έχει ταυτοποιηθεί στο μυτάκι.

Ο γενικός στόχος της εργασίας είναι η μελέτη της επιθηλιοκύστης σε μεγάλο εύρος περιοχών της Ελλάδας και η συλλογή δεδομένων σχετικά με τους αιτιολογικούς παράγοντες και τα χαρακτηριστικά τους. Για το σκοπό αυτό, συλλέχθηκαν δείγματα βραγχίων με επιθηλιοκύστη από 21 τσιπούρες, 3 λαβράκια και 9 μαγιάτικα ιχθυοκαλλιέργειας από 9 διαφορετικές περιοχές. Πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων και φυλογένεση, ανάλυση της παθολογίας που προκαλείται στον ιστό και των μορφομετρικών χαρακτηριστικών των κύστεων και παρατήρηση των βακτηρίων.

Βάση των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι βακτήρια του γένους *Ca.* Ichthyocystis spp. είναι τα κυρίαρχα παθογόνα καθώς ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα. Εκτός από τα ήδη γνωστά, *Ca.* Ichthyocystis sparus και *Ca.* Ichthyocystis hellenicum, που ταυτοποιήθηκαν σε τσιπούρες, φαίνεται να υπάρχει και άλλο είδος που ταυτοποιήθηκε σε λαβράκι και μαγιάτικα. Παθογόνα που ανήκουν στα χλαμύδια κυρίως, ή στο γένος *Ca.* Endozoicomonas spp., συχνά συνυπάρχουν με τα βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis spp., προκαλώντας δευτερογενείς μολύνσεις σε τσιπούρες-λαβράκια ή μόνο σε τσιπούρες αντίστοιχα. Η τυπική παθολογία που παρατηρήθηκε στους ιστούς είναι υπερπλασία του επιθηλίου και φλεγμονώδης απόκριση. Οι κύστεις κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη μορφολογία τους σε 4 τύπους: a, b, c, και d. Όμως, δεν εντοπίστηκε σαφής διαχωρισμός των 4 τύπων και στα μετρικά τους χαρακτηριστικά. Τέλος, τα βακτήρια που παρατηρήθηκαν στο εσωτερικό των κύστεων είναι στρογγυλά ή ελλειψοειδή, με διπλή μεμβράνη και πυκνή διάταξη.

Η παρούσα εργασία είναι μια εκτενής μελέτη της επιθηλιοκύστης στην Ελλάδα και μπορεί να αποτελέσει βάση για περεταίρω έρευνα της ασθένειας και των παραγόντων της καθώς και τρόπων πρόληψης και αντιμετώπισής της ώστε να μειωθούν οι επιπτώσεις της στην ιχθυοκαλλιέργεια.

ABSTRACT

Epitheliocystis is a fish disease characterized by cysts formed in the gills and skin epithelium containing intracellular bacteria. The study of the disease is challenging due to its particular characteristics. The distribution of the disease is global and has been recorded in more than 90 marine and fresh water fish species, wild or cultured. There is great diversity among the bacteria causing the disease since chlamydia, β- and γ-proteobacteria have been identified so far as pathogens. In addition, these pathogens are intracellular bacteria and as a result their isolation has not been accomplished yet.

In Greece, there is an increasing trend of epitheliocystis the past few years affecting fish-farming industry in general while, particularly gilthead sea bream appears to be the most susceptible species. As causative agents of the disease have been identified *Ca.* Ichthyocystis sparus and *Ca.* Ichthyocystis hellenicum (β-proteobacteria) and bacteria of the genus *Ca.* Similichlamydia and *Ca.* Piscichlamydia as well, in gilthead sea bream, whereas, *Ca.* Endozoicomonas cretensis (γ-proteobacteria) has been identified in sharpsnout seabream.

The purpose of this thesis is to perform a global research on epitheliocystis in a wide range of regions in Greece in order to collect data related to the causative agents of the disease and their characteristics. Therefore, infected fish gills were collected from farmed fish and specifically, 21 gilthead sea bream, 3 European sea bass and 9 greater amberjack from 9 different regions. Molecular identification of the causative agents, phylogenetic analysis, analysis of the pathology caused and the morphometry of the cysts and observation of the bacteria were performed.

According to the results, bacteria of the genus *Ca.* Ichthyocystis spp. are the dominant pathogens since they were identified in all samples. Apart from the already known *Ca.* Ichthyocystis sparus and *Ca.* Ichthyocystis hellenicum that were identified in gilthead sea bream, it seems that there is a novel species that was identified in European sea bass and greater amberjack. Mainly chlamydia, or even *Ca.* Endozoicomonas spp. are often, also present as secondary coinfections of the gills in gilthead sea bream and European sea bass or only in gilthead sea bream, respectively. The typical pathology observed on the gill tissue is hyperplasia of the epithelium and inflammation. The cysts were categorized in 4 types according to their morphological characteristics: a, b, c, and d. However, the distinction of the types according to their morphometrics was not quite adequate. Finally, the bacteria observed in the cysts were circular or ellipsoid with double membrane, presenting a compact and dense distribution.

The present thesis is an extensive study of epitheliocystis in Greece and could be the base for further research on the disease and its causative agents but also on the prevention and treatment in order to eliminate its impact on fish-farming.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

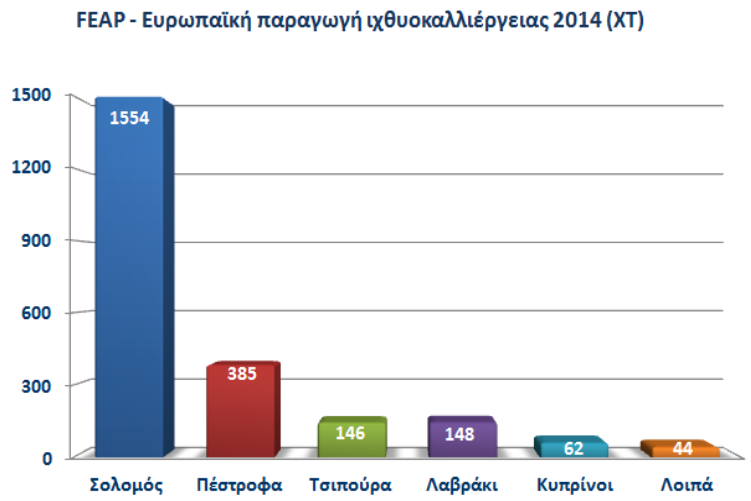
1.1 ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Υδατοκαλλιέργεια είναι η καλλιέργεια υδρόβιων ζωικών και φυτικών οργανισμών (© FAO, 2009-2016). Θεωρείται γεωργική ή/και κτηνοτροφική δραστηριότητα και τις τελευταίες δεκαετίες προσελκύει το ενδιαφέρον παγκοσμίως και ποικιλοτρόπως τόσο από οικονομικής άποψης όσο και από επιστημονικής, τεχνολογικής, οικολογικής, διατροφικής κ.α.

Σχεδόν τα μισά ψάρια που καταναλώνονται πλέον από τον άνθρωπο είναι προϊόντα υδατοκαλλιεργειών και η σημαντική αυτή συνεισφορά του τομέα αναμένεται και πρέπει να αυξηθεί (FAO, 2013). Η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού συνεπάγεται την αναγκαία αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής προϊόντων διατροφής, ιδιαίτερα αυτών με υψηλή διατροφική αξία όπως είναι οι υδρόβιοι οργανισμοί. Η παραγωγή υδρόβιων οργανισμών βασίζεται στην αλιεία και στις υδατοκαλλιέργειες. Ωστόσο, σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO για το 2016 η ετήσια παραγωγή αλιευμάτων έχει παραμείνει σταθερή από τη δεκαετία του ’80 γεγονός που αποδίδεται στην υπεραλίευση των ωκεανών και την κλιματική αλλαγή. Αντίθετα, η ετήσια παραγωγή υδρόβιων οργανισμών από δραστηριότητα υδατοκαλλιέργειας αυξάνεται ραγδαία από τη δεκαετία του ‘90 μέχρι και σήμερα (FAO, 2016). Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στην εκμηχάνιση των διαδικασιών παραγωγής, τη συνεχή εισαγωγή νέων ειδών για καλλιέργεια καθώς και τη βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας (διατροφή, χειρισμοί, ασθένειες) με στόχο την ευζωία των εκτρεφόμενων οργανισμών. Κατά κανόνα, τα καλλιεργούμενα είδη είναι υψηλής εμπορικής αξίας με ταχεία ή σχετικά ταχεία ανάπτυξη και σημαντικής διατροφικής αξίας για τον καταναλωτή. Επιπλέον, η υδατοκαλλιέργεια είναι δραστηριότητα που συμβάλει στην ενίσχυση των τοπικών περιοχών και μικρών κοινωνιών καθώς επίσης και της παγκόσμιας βιομηχανίας και του εμπορίου. Τα κοινωνικο-οικονομικά οφέλη που σχετίζονται με τον κλάδο περιλαμβάνουν εκτός από την προσφορά εργασίας σε τοπικό επίπεδο και ευκαιρίες για εξειδικευμένη εκπαίδευση, έρευνα και ανάπτυξη που σε δεύτερο χρόνο λειτουργούν αμφίδρομα προς όφελος της ίδιας της δραστηριότητας των υδατοκαλλιεργειών.

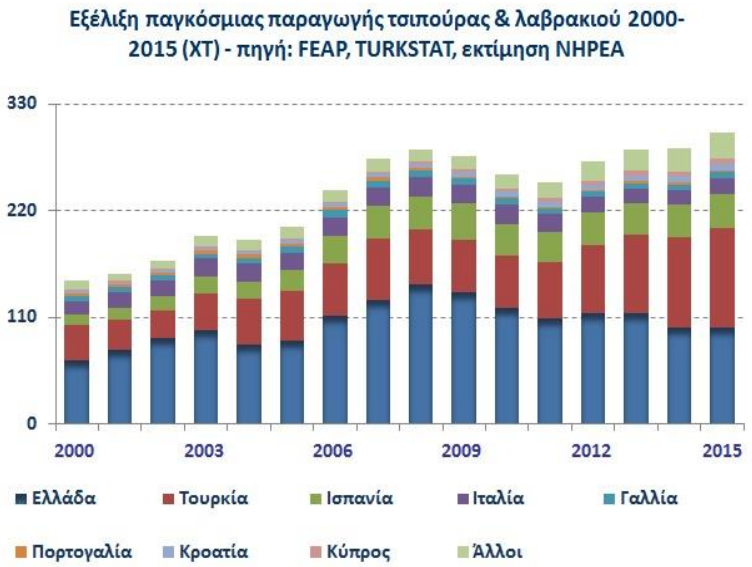
1.2 ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Η Ελλάδα είναι μεσογειακή χώρα και κατά συνέπεια το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής που προκύπτει από δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών είναι μεσογειακά είδη ψαριών και δίθυρων. Η τσιπούρα και το λαβράκι είναι τα δύο βασικά είδη ψαριών που παράγονται στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια και είναι είδη υψηλής διατροφικής αξίας. Η Ελλάδα τα τελευταία χρόνια είναι πρώτη παγκοσμίως στην παραγωγή των συγκεκριμένων ειδών που φτάνει μέχρι και πάνω από 100.000 τόνους ετησίως (**Εικόνα 1**). Ωστόσο, έχει ξεκινήσει προσπάθεια για εκτροφή νέων ειδών, υψηλής ζήτησης και αξίας, όπως το μαγιάτικο, η συναγρίδα, το μυτάκι, το φαγκρί, το λυθρίνι, το μυλοκόπι και ο κρανιός.



Εικόνα 1: Ευρωπαϊκή παραγωγή ανά είδος σε χιλιάδες τόνους για το έτος 2014 από τη FEAP (http://www.nireus.com).

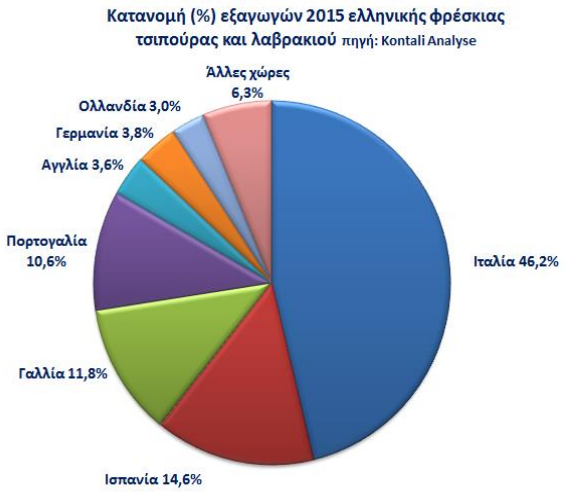
Στην Ευρώπη, η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού είναι τρίτη μετά του σολομού και της πέστροφας όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2**. Το 80% της παγκόσμιας παραγωγής των ειδών αυτών προέρχεται από την Ελλάδα, την Τουρκία και την Ισπανία ενώ το υπόλοιπο 20% από την Ιταλία, Γαλλία, Πορτογαλία, Κροατία, Κύπρο αλλά και χώρες της Β. Αφρικής και Μέσης Ανατολής (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 2: Ετήσιο διάγραμμα της παγκόσμιας παραγωγής σε τσιπούρα και λαβράκι όπου με διαφορετικό χρώμα απεικονίζεται η συμμετοχή κάθε χώρας-παραγωγού (http://www.nireus.com).

Η συμβολή των ιχθυοκαλλιεργειών στο μεσογειακό χώρο και κατ' επέκταση στην Ελλάδα, είναι μείζονος σημασίας. Πέρα από το γεγονός ότι είναι μια διαδικασία παραγωγής τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας, συμβάλει και στην ανάπτυξη του πρωτογενούς τομέα ενισχύοντας την εγχώρια παραγωγική διαδικασία. Στηρίζει

ενεργά την κοινωνικο-οικονομική δομή δημιουργώντας θέσεις εργασίας σε περιοχές που εξαρτώνται κυρίως από την αλιεία. Ταυτόχρονα, αποτελεί δραστηριότητα που συχνά λαμβάνει χώρα σε ακατοίκητα νησιά και βραχονησίδες, γεγονός εθνικής σημασίας ειδικά για μια χώρα σαν την Ελλάδα (http://www.nireus.com). Συγκεκριμένα, από τα δεδομένα έρευνας της Ελληνικής Στατιστικής Αρχής για τις υδατοκαλλιέργειες, το 2015 παράχθηκαν 87.761 τόνοι ψαριών συνολικής αξίας άνω των 450 εκατ. € (ΕΛΣΤΑΤ 2016) ενώ στον κλάδο δραστηριοποιούνται πάνω από 50 εταιρίες που απασχολούν μέχρι και 15.000 εργαζόμενους (http://www.nireus.com). Το 60% του τζίρου πραγματοποιείται από τις 3 μεγαλύτερες εταιρίες, το Νηρέα, τη Σελόντα και την Ανδρομέδα. Παράλληλα, ο κλάδος συμβάλει δυναμικά στον τομέα των εξαγωγών καθώς το 80% του συνόλου της παραγωγής εξάγεται με κύριο αποδέκτη ευρωπαϊκές χώρες.



Εικόνα 3: Ποσοστιαία απεικόνιση των εξαγωγών τσιπούρας και λαβρακιού στις χώρες-αποδέκτες (http://www.nireus.com).

Με βάση αυτά τα στοιχεία πρέπει να τονιστεί πόσο σημαντικός είναι ο τομέας αυτός και η ανάπτυξή του για τη χώρα σε οικονομικό, εργασιακό καθώς και σε ερευνητικό επίπεδο.

1.3 ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Με μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης μεγαλύτερο από 8% από το 1980 (FishStat), οι υδατοκαλλιέργειες θεωρούνται πλέον μια από τις ταχύτερα αναπτυσσόμενες βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων στον κόσμο (FAO, 2014), εντούτοις ο τομέας μαστίζεται από τις ασθένειες. Οι ασθένειες μπορεί να οφείλονται σε ιούς, βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα ή παράσιτα και αποτελούν έναν από τους βασικούς παράγοντες κόστους για τις υδατοκαλλιέργειες (Lafferty et al., 2015). Για παράδειγμα, η μολυσματική αναιμία του σολομού (ISA) μείωσε δραματικά την παραγωγή στη Χιλή. Συγκεκριμένα, η παραγωγή σολομού το 2010 έφτασε μόλις τους 130.000 τόνους από 385.000 το 2005 (Hansen & Onozaka, 2011). Απώλειες τέτοιου μεγέθους έχουν σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις όχι μόνο για τους παραγωγούς και τους εργαζόμενους αλλά γενικότερα στην οικονομία μιας χώρας.

Η εκτροφή πολλών υδρόβιων οργανισμών συχνά περιορίζεται από τις ασθένειες, παρεμποδίζοντας την οικονομική και κοινωνική ανάπτυξη σε αρκετές χώρες. Σύμφωνα με τους Dr Melba G Bondad-Reantaso και Dr Rohana P Subasinghe από τον FAO, η κατάσταση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε ποικιλία πολύπλευρων και ισχυρά διασυνδεδεμένων παραγόντων όπως: η αυξανόμενη παγκοσμιοποίηση του εμπορίου ζωντανών υδρόβιων ζώων και των προϊόντων τους, η εντατικοποίηση των υδατοκαλλιεργειών με τη μετατόπιση των διαφορετικών σταδίων της παραγωγής (γεννητόρων, νυμφικών σταδίων, γόνου και ιχθυδίων), η εισαγωγή νέων ειδών, η ανάπτυξη και εξάπλωση του εμπορίου των διακοσμητικών ειδών, η αξιοποίηση και χρήση θαλάσσιων και παράκτιων περιοχών για την πάχυνση ζώων που προέρχονται από εκκολαπτήρια, οι απρόβλεπτες, βλαβερές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των άγριων και των καλλιεργούμενων ιχθυοπληθυσμών, τα ανεπαρκή ή αναποτελεσματικά μέτρα βιοασφάλειας, η καθυστερημένη διάγνωση αναδυόμενων ασθενειών, η έλλειψη ελέγχου ώστε να χρησιμοποιούνται αποκλειστικά υγιείς πληθυσμοί, η κλιματική αλλαγή καθώς και όλοι οι χειρισμοί που απαιτούν την ανθρώπινη παρουσία. (FAO, 2008).

Παρά το γεγονός ότι αποτελούν γκρίζα ζώνη στην επιστημονική βιβλιογραφία, οι συνέπειες των ασθενειών έχουν εκτιμηθεί με κοινωνικοοικονομικούς όρους. Για παράδειγμα, έχουν γίνει εκτιμήσεις για τις απώλειες στην παραγωγή, το εισόδημα, την αγορά εργασίας, τις επενδύσεις, την εμπιστοσύνη των καταναλωτών, τη δημιουργία ελλείμματος στις βιομηχανίες ή το κλείσιμο των επιχειρήσεων. Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι οι οικονομικές απώλειες που οφείλονται στις ασθένειες ανέρχονται σε δισεκατομμύρια δολάρια παγκοσμίως το χρόνο (FAO, 2008).

Στο επίπεδο της παραγωγής το κόστος που αφορά στις ασθένειες οφείλεται στη θνησιμότητα ή στη μείωση του φυσιολογικού ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ειδών, στη χρήση ακριβών αντιμικροβιακών και αντιπαρασιτικών χημικών ουσιών και εμβολίων για την πρόληψη ή και την αντιμετώπιση εξάρσεων, στην απώλεια τροφών εξαιτίας της μείωσης του ρυθμού πρόσληψης τροφής, στους χειρισμούς, στην αποδιοργάνωση του προκαθορισμένου προγράμματος της συνεχούς γραμμής παραγωγής και τέλος στην παραγωγή και συντήρηση προϊόντων ακατάλληλων για κατανάλωση.

1.3.1 Ασθένειες στη μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια

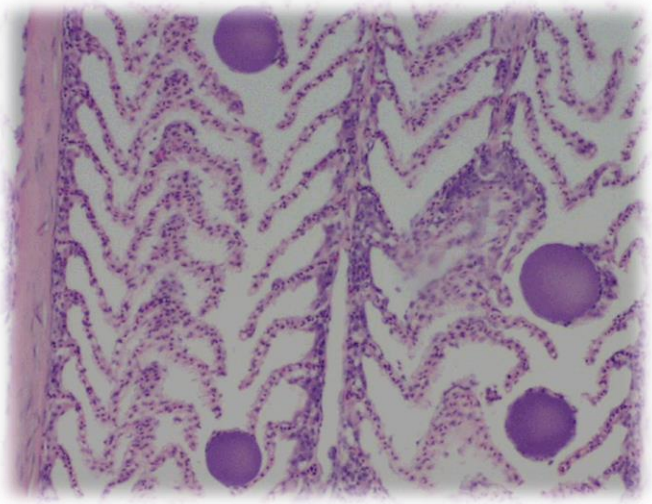
Όπως έχει προαναφερθεί, η εντατικοποίηση της βιομηχανίας θαλασσοκαλλιέργειας και η εισαγωγή νέων ειδών σε αυτή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, όπως περιβαλλοντικούς (κλιματική αλλαγή, εμφάνιση λεσεψιανών εισβολέων στην περιοχή της Μεσογείου κ.α.), οικονομικούς και εμπορικούς, έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση, την εξάπλωση και την εδραίωση ασθενειών. Το μοτίβο αυτό, παρατηρείται παγκοσμίως στις περιοχές με έντονη τη δραστηριότητα των υδατοκαλλιεργειών και εξαίρεση δε θα μπορούσε να αποτελεί η Μεσόγειος.

Σύμφωνα με τους Rigos & Katharios (2010), στη Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια έχουν ενταχθεί είδη που ανήκουν στις οικογένειες *Sparidae, Polyprionidae, Serranidae, Sciaenidae, Soleidae, Carangidae* και *Scombridae* έτσι ώστε να υπάρχουν εναλλακτικές επιλογές προϊόντων εκτροφής σε αντίθεση με το καθεστώς μονοπωλίου της αγοράς σε τσιπούρα – λαβράκι που υπήρχε αρχικά. Η

καλλιέργεια των ειδών αυτών συνοδεύτηκε από την εμφάνιση σημαντικών παθολογικών προβλημάτων μειώνοντας το ποσοστό επιτυχούς παραγωγής τους. Εξάρσεις βακτηρίων που δημιούργησαν μεγάλα προβλήματα αποδόθηκαν στα βακτήρια *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*, *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *Tenacibaculum maritimum* και *Flavobacterium* sp. Ασθένειες που οφείλονται σε βλαβερά, παθογόνα παράσιτα προκλήθηκαν από το μυξοσπορίδιο *Enteromyxum leei*, τα βλεφαριδοτά *Cryptocaryon irritans* και *Uronema* spp., το μαστιγωτό *Amyloodinium occelatum*, το μονογενές *Zeuxapta seriolae* και το διγενές *Paradeontacylix* spp. Ιδιαίτερης σοβαρότητας ασθένειες είναι επίσης, η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια, που προκαλείται από τον ιο Betanodavirus, καθώς και η επιθηλιοκύστη, που προκαλείται από υποχρεωτικά ενδοκυττάρια βακτήρια στο επιθήλιο των βραγχίων και του δέρματος. Πέραν των προαναφερθέντων παθογόνων έχουν καταγραφεί και άλλα τα οποία προκαλούν λιγότερα προβλήματα ή εμφανίζουν μικρή συχνότητα (Rigos & Katharios, 2010).

Η επιθηλιοκύστη, στην οποία εστιάζεται η παρούσα εργασία, δεν αποτελεί προς το παρόν βασικό πρόβλημα για τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η παρουσία της φαίνεται να είναι πιο συχνή στις ελληνικές μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας με αξιοσημείωτες επιπτώσεις για την παραγωγή. Επιπλέον, μέχρι πρόσφατα, ήταν ίσως και η λιγότερο μελετημένη από τις προαναφερθείσες ασθένειες.

1.3.2 Επιθηλιοκύστη



Εικόνα 4: Επιθηλιοκύστη σε βράγχια Red Snapper (http://chlamydiae.com/)

Ο όρος επιθηλιοκύστη χρησιμοποιείται για την περιγραφή κυτταρικών εγκλείστων, που περιέχουν αρνητικά κατά Gram βακτήρια, τα οποία εντοπίζονται στο επιθήλιο των βραγχίων (**Εικόνα 4**) και πιο σπάνια σε κύτταρα του επιθηλίου του δέρματος των ψαριών (Nowak & LaPatra, 2006; Katharios et al., 2008; Toenshoff et al., 2012). Αναφέρθηκε πρώτη φορά ως «Μυκοφίλωση» στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) (Plehn, 1920). Ο όρος επιθηλιοκύστη επινοήθηκε από τον Hoffman (1969) μετά την παρατήρηση εγκλείστων που έμοιαζαν με κύστεις στα επιθηλιακά κύτταρα των βραγχίων του bluegill (*Lepomis macrochirus*) το οποίο είναι ψάρι γλυκών υδάτων (Hoffman et al., 1969). Από την πρώτη εκείνη διάγνωση η επιθηλιοκύστη

έχει διαγνωστεί σε περισσότερα από 90 είδη ψαριών, γλυκού ή θαλασσινού νερού, καλλιέργειας και άγρια, παγκοσμίως (Nowak & LaPatra, 2006; Stride et al., 2014). Ταξινομικά, υπάρχει μεγάλο εύρος στην ποικιλότητα των ξενιστών της ασθένειας. Στους ξενιστές που έχουν αναφερθεί περιλαμβάνονται: Acipenseridae: white sturgeon (*Acipenser trasmonanus*) (Groff et al., 1996), Cyprinidae: κυπρίνος (*C. carpio*) (Plehn, 1920), Salmonidae: coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Carvajal et al., 1990), σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) (Carvajal et al., 1990), Arctic charr (*Salvelinus aplinus*) (Draghi II et al., 2007) and brown trout (*Salmo trutta*) (Karlsen et al., 2008), Carangidae: μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) (Crespo et al., 1990), yellow- tail kingfish (*S. lalandi*) (Venizelos & Benetti, 1996) και yellowtail (*S. mazatlana*) (Venizelos & Benetti, 1996), Latidae: barramundi (*Lates calcarifer*) (Meijer et al., 2006), Muglidae: golden grey mullet (*Liza aurata*) (Paperna & Sabnai, 1980), thinlip grey mullet (*L. ramada*) (Paperna, 1977), greenback mullet (*L. subviridis*) (Paperna & Sabnai, 1980) και κέφαλος (*Mugil cephalus*) (Paperna & Sabnai, 1980), Terapontidae: silver perch (*Bidyanus bidyanus*) (Meijer et al., 2006), και Centrachidae: bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Hoffman et al., 1969) και largemouth bass (*Micropterus salmoides*) (Goodwin et al., 2005).

Σύμφωνα με τον Kirkbright (2016) δεν υπάρχει απόδειξη για το ενδεχόμενο η επιθηλιοκύστη να είναι ασθένεια (Katharios et al., 2008), σύνδρομο (Kirkbright, 2016) ή φυσιολογική κατάσταση των ψαριών (Grau & Crespo, 1991; Stride, 2014) καθώς το ποσοστό επιπολασμού στις περιοχές που επηρεάζονται, δηλαδή ο αριθμός των ψαριών που εμφανίζουν επιθηλιοκύστη προς το συνολικό αριθμό ατόμων του πληθυσμού, και η θνησιμότητα κυμαίνεται από 20-100 % και από 0-100 %, αντίστοιχα (Katharios et al., 2008). Τα καλλιεργούμενα είδη ψαριών έχουν μελετηθεί εκτενέστερα και φαίνεται να είναι και αυτά που επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό (Nowak & LaPatra, 2006).

Κατά πλειοψηφία, η επιθηλιοκύστη θεωρείται μόλυνση των ψαριών που εντοπίζεται στο επιθήλιο των βραγχίων και του δέρματος. Τα βακτήρια-παράγοντες της επιθηλιοκύστης σχηματίζουν ενδοκυτταρικές εγκυστώσεις οι οποίες σταδιακά διογκώνονται και προκαλείται υπερτροφία και πλήρωση του κυττάρου με βακτήρια. Ανάλογα με το είδος του υπεύθυνου βακτηρίου μπορεί να παρατηρηθεί και πολλαπλασιασμός του επιθηλίου με μεταπλασία των πλακωδών κυττάρων (squamous metaplasia) τοπικά (Seth-Smith et al., 2016). Η παθολογία που αποδίδεται στην ασθένεια είναι η υπερπλασία του επιθηλίου, η φλεγμονώδης αντίδραση του ιστού περιμετρικά των κύστεων και η νέκρωση του ιστού (Katharios et al., 2008). Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που δεν παρατηρείται κάποια κυτταρική απόκριση (Paperna, 1977; Grau & Crespo, 1991; Crespo et al., 1999; Crespo et al., 2001; Nowak & Clark, 1999). Παρά το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η εμφάνιση της ασθένειας δεν έχει άμεσες επιπτώσεις στα ψάρια, έχουν αναφερθεί και μη φυσιολογικές καταστάσεις, στις οποίες τα ψάρια είναι ληθαργικά, έχουν αυξημένη παραγωγή βλέννας ή αυξάνουν τον ρυθμό αναπνοής τους λόγω αναπνευστικής δυσλειτουργίας, (Corsaro & Greub, 2006; Meijer et al., 2006; Draghi II et al., 2007). Ωστόσο, σε έξαρση επιθηλιοκύστης αποδίδονται και μαζικές θνησιμότητες ψαριών οι οποίες είναι πιο έντονες σε νυμφικές καλλιέργειες όπου μπορεί να φτάσουν μέχρι και το 100% (Katharios et al., 2008; Katharios et al., 2015; Venizelos & Benetti, 1996). Οι υψηλές ιχθυοφορτίσεις, η παρουσία θρεπτικών, η εποχή, η θερμοκρασία και η

ηλικία των ψαριών έχουν αναγνωριστεί ως πιθανοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της ασθένειας (Nowak & LaPatra, 2006).

Η επιθηλιοκύστη φαίνεται να προκαλείται από τρεις κλάσεις βακτηρίων, τα χλαμύδια, τα β- και γ-πρωτεοβακτήρια. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί ως παράγοντες πρόκλησης της επιθηλιοκύστης 51-52 είδη διαφορετικών χλαμυδίων, 4 είδη β-πρωτεοβακτηρίων, τα *Candidatus* (ο όρος *Candidatus* αναφέρεται σε μη-καλλιεργήσιμα βακτήρια, γράφεται με italics και ακολουθεί η λατινική ονομασία χωρίς italics) Ichthyocystis hellenicum και *Ca*. I. sparus (Seth-Smith et al., 2016), το *Ca*. Branchiomonas. cysticola (Toenshoff et al., 2012) και το Blue Jay Creek Burkholderia (BK-BJC) (Contador et al., 2016), και 2 είδη γ-πρωτεοβακτηρίων, τα *Endozoicimonas elysicola* (Mendoza et al., 2013) και *Ca*. Endozoicomonas cretensis (Katharios et al., 2015). Τα βακτήρια αυτά έχουν αναγνωριστεί και ταυτοποιηθεί με συνδυασμό τεχνικών άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), ανοσο-ιστοχημείας (IHC) και *in situ* υβριδισμός (ISH) (Draghi et al., 2004; Nowak & LaPatra, 2006; Toenshoff et al., 2012; Katharios et al., 2015; Seth-Smith et al., 2016). Παρά τις πολλές προσπάθειες, κανένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες της επιθηλιοκύστης δεν έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα. Ως εκ τούτου, δεν έχει εκπληρωθεί το αξίωμα του Koch για να αποδειχθεί η αιτιώδης σχέση των μικροβίων με την ασθένεια.

Η καλλιέργεια των βακτηρίων *in vitro* και η απομόνωσή τους δεν έχει επιτευχθεί διότι, ανεξάρτητα από την εξελικτική τους προέλευση, τα βακτήρια-παράγοντες της επιθηλιοκύστης είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παθογόνα βακτήρια.

Όμως τι σημαίνει για ένα παθογόνο βακτήριο να είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό; Σύμφωνα με τον Casadevall, δεν υπάρχει καλός ορισμός για ένα ενδοκυτταρικό παθογόνο γιατί ο όρος «ενδοκυτταρικό» ενέχει μια ασάφεια όταν εξετάζεται στο πλαίσιο της ζωής των μικροβίων. Συγκεκριμένα, θεωρεί ότι ενώ η ενδοκυττάρια στρατηγική των παθογόνων αντιμετωπίζεται ως μια ιδιαίτερη ιδιότητα, στην ουσία είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό παθογόνων και μη-παθογόνων βακτηρίων (Casadevall, 2008).

Πηγαίνοντας πίσω στο χρόνο και λαμβάνοντας ως δεδομένο ότι τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια των ευκαρυωτών είναι προϊόντα ενδοσυμβίωσης προκύπτει ότι η ικανότητα για ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής των μικροβίων είναι «αρχαία» και προϋπήρξε των ευκαρυωτικών οργανισμών όπως τους γνωρίζουμε σήμερα (Margulis, 1971).

Η εμφάνιση του ενδοκυτταρικού τρόπου ζωής των αρχαίων μικροβίων φαίνεται να είχε τουλάχιστον τρεις μεγάλες απαιτήσεις: α) διαφορές μεγεθών μεταξύ των μικροβίων έτσι ώστε το ένα να μπορεί να προσληφθεί από το άλλο, β) μηχανισμό πρόσληψης σωματιδίων από την πλευρά του ξενιστή ή/και μηχανισμό εισόδου από την πλευρά του μικρότερου βακτηρίου καθώς και γ) την ικανότητα να επιβιώσει το ένα μέσα στο άλλο. Οι πιθανές εκβάσεις τέτοιων αλληλεπιδράσεων θα ήταν η επιβίωση και των δύο μικροβίων (συμβίωση και αμοιβαιότητα), η επιβίωση του ξενιστή (θήρευση), η βλάβη του ξενιστή (ενδοκυτταρικό παθογόνο), ή η βλάβη και των δύο μικροβίων (ασυμβατότητα και ανταγωνισμός). Το αποτέλεσμα της κάθε έκβασης υπέστη πιέσεις επιλογής που οδήγησαν στην εμφάνιση των διαφόρων τύπων σχέσεων ξενιστή-μικροβίου.

Τα ενδοκυτταρικά παθογόνα εντάσσονται σε δύο ομάδες με διαφορετική στρατηγική διαβίωσης: τα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παθογόνα τα οποία έχουν χάσει την ικανότητά τους να διαβιούν εκτός του ξενιστή τους και τα προαιρετικά ενδοκυτταρικά παθογόνα που έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται και εκτός του ξενιστή τους. Αυτό συνεπάγεται υποχρεωτικά την ύπαρξη ενδιάμεσου ξενιστή για τα πρώτα χωρίς αυτό να ισχύει για τα δεύτερα. Παρά την ποικιλότητα που εμφανίζουν οι στρατηγικές ενδοκυτταρικής παθογένειας, στοιχεία από τις αλληλουχίες των διαθέσιμων γονιδιωμάτων υποδεικνύουν αυτό που ίσως να είναι γενικός κανόνας, ότι δηλαδή τα υποχρεωτικά και προαιρετικά ενδοκυτταρικά παθογόνα τα οποία μεταφέρονται με ενδιάμεσο ξενιστή συχνά παρουσιάζουν μείωση του γονιδιώματος τους. Συνεπώς, η μετάβαση από την κατάσταση της ελεύθερης διαβίωσης στον ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής σχετίζεται με την απώλεια μεγάλων τμημάτων του DNA. Αυτή η διαγραφή γονιδίων συχνά περιλαμβάνει τμήματα του DNA που κωδικοποιούν ολόκληρα μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής θρεπτικών, που όμως τώρα τους παρέχονται από τον ξενιστή. Για παράδειγμα, η ανάλυση του γονιδιώματος και των μεταβολικών μονοπατιών στα δύο είδη του γένους *Ca*. Ichthyocystis έδειξε ότι τα βακτήρια αυτά δεν έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν αμινοξέα γεγονός που αποτελεί ισχυρή απόδειξη του υποχρεωτικά ενδοκυττατρικού τρόπου ζωής τους (Seth-Smith et al., 2016; Qi et al., 2016).

Ωστόσο, αναπάντητο ακόμα παραμένει το ερώτημα, πώς πραγματοποιείται από τα βακτήρια η μόλυνση του ξενιστή. Για τα βακτήρια που ανήκουν στα χλαμύδια γνωρίζουμε ότι υπάρχει εξωκυττάριο, μολυσματικό στάδιο στον κύκλο ζωής τους (elementary body), δεν έχει όμως αποδειχθεί αν το εξωκυττάριο στάδιο είναι αρκετό ή η μόλυνση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια κάποιου ενδιάμεσου ξενιστή μέσω του οποίου τα βακτήρια «έρχονται σε επαφή» με τα ψάρια.

1.3.2.1 Χλαμύδια

Τα χλαμύδια είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των σπονδυλωτών, κάποιων ειδών αρθροπόδων και διαφόρων αμοιβάδων (Corsaro & Venditti, 2004; Friedman et al., 2003; Longbottom & Coulter, 2003). Εμφανίζουν ένα ιδιόμορφο αναπτυξιακό κύκλο δύο σταδίων που περιλαμβάνει ένα εξωκυττάριο μολυσματικό στάδιο (elementary body) και ένα ενδοκυτταρικό στάδιο πολλαπλασιασμού (reticulate body). Ένα επιπλέον μολυσματικό στάδιο «*the crescent body*» περιγράφηκε πρόσφατα για τα Parachlamydiaceae, μια νέα οικογένεια της τάξης Chlamydiales. Οι πιο γνωστοί εκπρόσωποι των χλαμυδίων είναι τα ανθρώπινα παθογόνα *Chlamydia trachomatis* και *Chlamydia pneumonia* που προκαλούν τράχωμα και σεξουαλικώς μεταδιδόμενες ασθένειες, και πνευμονία αντίστοιχα (Bébéar & De Barbeyrac, 2009; Burillo & Bouza, 2010; Hu et al., 2010).

Παρά το γεγονός ότι αυτά τα σημαντικά για την ιατρική χλαμύδια περιγράφηκαν το 1907 από τους Halberstadter και Prowazek, , το φύλο στο σύνολό του αντιπροσωπευόταν μόνο από το γένος Chlamydia μέχρι και το 1995. Η περιορισμένη αντίληψη της ποικιλότητας των χλαμυδίων άλλαξε σταδιακά με την αναγνώριση περιβαλλοντικών χλαμυδίων όπως τα *Simkania negevensis* (Kahane et al., 1995), *Waddlia chondrophila* (Rurangirwa et al., 1999) και χλαμύδια που σχετίζονται με αμοιβάδες όπως τα *Parachlamydia acanthamoebae, Protochlamydia*

amoebophila (Fritsche et., al. 1993; Amann et al., 1997; Collingro et al., 2005) και *Criblamydia sequanensis* (Thomas et al., 2006).

Η ανάλυση των χλαμυδίων αυτών βοήθησε στην καλύτερη κατανόηση της εξέλιξής της τάξης των Χλαμυδίων στο σύνολό τους (Horn, 2008). Έγινε, λοιπόν, γνωστό ότι ο ενδοκυτταρικός τρόπος ζωής τους σχετίζεται χρονολογικά με μονοκύτταρους ευκαρυώτες στο Προκάμβριο, εκατοντάδες χιλιάδες χρόνια πριν (Greub & Raoult, 2004; Horn, 2008; Kamneva et al., 2012). Αυτή η εξειδίκευση σε ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής μπορεί να συνέβαλε στην εξέλιξη των φυτών διευκολύνοντας την καθιέρωση των πρωταρχικών πλαστιδίων. Επίσης, αρκετοί μηχανισμοί επίδρασης με τον ξενιστή αναπτύχθηκαν από εκείνες τις αρχαίες σχέσεις και χρησιμοποιούνται ακόμα από τα υπάρχοντα παθογόνα και συμβιωτικά χλαμύδια (Hueck, 1998).

Μοριακές μελέτες που βασίστηκαν στην ανάλυση του 16S γονιδίου του ριβοσωμικού ριβονουκλεϊκού οξέος (rRNA) έδειξαν ότι τα χλαμύδια όχι μόνο έχουν μεγαλύτερη ποικιλότητα από ότι θεωρήθηκε αρχικά αλλά είναι παρόντα και σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα (Horn, 2008; Corsaro & Venditti, 2009). Μέχρι σήμερα, έχουν περιγραφεί εννέα οικογένειες, που ανήκουν στο φύλο των Χλαμυδίων και ποικίλουν σε μέγεθος. Οι οικογένειες Chlamydiaceae και Parachlamydiaceae έχουν τους περισσότερους αντιπροσώπους και ακολουθούν οι Rhabdochlamydiaceae (Corsaro & Venditti, 2009), Criblamydiaceae (Corsaro et al., 2009), Simkaniaceae (Everett et al., 1999) και Waddliaceae (Rurangirwa et al., 1999). Ενώ οικογένειες με πολύ μικρό αριθμό ειδών είναι οι Clavochlamydiaceae (Karlsen et al., 2008), Piscichlamydiaceae (Draghi et al., 2004) και η Parilichlamydiaceae (Stride et al., 2013b) η οποία ανακαλύφθηκε πρόσφατα.

Από τα αποτελέσματα των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί για τα χλαμυδια-παράγοντες της επιθηλιοκύστης επιβεβαιώνεται η μεγάλη ποικιλότητα και η ειδο-ειδικότητα στον ξενιστή των βακτηρίων αυτών. Γεγονός που υποδεικνύει ότι η μεταβίβασή τους μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών είναι περιορισμένη (Nowak & LaPatra, 2006).

1.3.2.2 Β-πρωτεοβακτήρια

Τα β-πρωτεοβακτήρια είναι μια από τις πέντε κλάσεις βακτηρίων που ανήκουν στην ομάδα των πρωτεοβακτηρίων. Αυτό που διαφοροποιεί τις κλάσεις μεταξύ τους είναι οι διαφορές που έχουν στις αλληλουχίες του rRNA. Τα β-πρωτεοβακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια που μπορούν να διαβιούν σε περιβάλλοντα με χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών. Στα ανθρώπινα παθογόνα β-πρωτεοβακτήρια ανήκουν τα γένη *Neisseria, Bordetella* και *Spirillum*. Για παράδειγμα το είδος *N. meningitidis* είναι παράγοντας μηνιγγίτιδας, το *B. pertussis* ευθύνεται για την εμφάνιση κοκίτη και το *S. minus* είναι ένας από τους παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν «rat-bite fever» ή αλλιώς στρεπτοβακίλωση.

Β-πρωτεοβακτήρια με παρόμοιους κύκλους ζωής έχουν αναφερθεί σε διαφορετικά συστήματα ξενιστών (Hahn et al., 2009; Heinz et al., 2007; Matsuo et al., 2010; Nakabachi et al., 2013) αλλά τα διαθέσιμα γονιδιώματα είναι πολύ λίγα (Fujimura et al., 2014; Lackner et al., 2011). Τα γονιδιώματα βακτηρίων που σχετίζονται με ξενιστές τείνουν να εμφανίζουν μείωση της μεταβολικής ικανότητας (Moran, 2003), καθώς χρησιμοποιούν πολλούς πόρους από το κύτταρο-ξενιστή.

Επιπλέον, αποκτούν ικανότητα να αλληλεπιδρούν, να προσκολλούνται και να επηρεάζουν το κύτταρο-ξενιστή, συνήθως χρησιμοποιώντας το εκκριτικό σύστημα (Toft & Andersson, 2010). Η ανάπτυξη ενός ενδοκυτταρικού τρόπου ζωής, συχνά, συνεπάγεται την απώλεια γονιδίων (Toft & Andersson, 2010). Η διαδικασία ξεκινά με τη δημιουργία ψευδογονιδίων και συνεχίζεται με τη σταδιακή εξάλειψη των μη λειτουργικών γονιδίων. Για παράδειγμα, το γονιδίωμα των βακτηρίων του γένους *Ca*. Ichthyocystis φαίνεται να είναι σταθερό στο μεταβολικό του πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι η διαδικασία απώλειας λειτουργικών γονιδίων συνέβη ιστορικά νωρίς στην εξέλιξη του γένους, πριν το διαχωρισμό των ειδών, και ότι η περαιτέρω μείωση έχει πλέον σταματήσει. Αυτή η σταθερότητα του γονιδιωματικού πυρήνα μπορεί να υποδεικνύει τον περιορισμό σε ξενιστές των παθογόνων αυτών (Qi et al., 2016).

1.3.2.3 Γ-πρωτεοβακτήρια

Αυτή είναι η πιο μεγάλη και η πιο διαφοροποιημένη κλάση των πρωτεοβακτηρίων. Σε αυτήν ανήκουν: τα μωβ βακτήρια που οξειδώνουν το H_2S σε θείο το οποίο αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικά έγκλειστα, τα ενδοκυτταρικά παθογόνα όπως η *Legionella pneumophila* και η *Coxiella burnetii* τα οποία προσβάλουν τα λευκά αιμοσφαίρια καθώς δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν από τα φαγοκύτταρα προκαλώντας τη νόσο των Λεγεωνάριων και τον πυρετό Q αντίστοιχα, τους οξειδωτές μεθανίου, οι οποίοι χρησιμοποιούν το μεθάνιο ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, τα γλυκολυτικά προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση για το μεταβολισμό των υδατανθράκων και τις ψευδομονάδες με πιο γνωστό εκπρόσωπο την *P. aeruginosa*, ένα ευκαιριακό παθογόνο που ευθύνεται για μολύνσεις σε εγκαύματα, κοψίματα, γρατζουνιές και για δευτερογενείς μολύνσεις σε ανοσοκατασταλμένα άτομα.

Τα γ-πρωτεοβακτήρια που έχουν αναφερθεί ως παράγοντες επιθηλιοκύστης είναι το *Endozoicomonas elysicola* (Mendoza et al., 2013), σε νυμφική εκτροφή κόμπια (*Rachycentrum canadum*), και το *Ca*. Endozoicomonas cretensis το οποίο αναγνωρίστηκε ως αιτιολογικός παράγοντας επιθηλιοκύστης σε εκτροφή μυτακιού στην Κρήτη (Katharios et al., 2015).

1.3.3 Ιστορικό της μελέτης της ασθένειας στην Ελλάδα

Όπως έχει προαναφερθεί, οι επιπτώσεις της επιθηλιοκύστης στις ελληνικές μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στο παρελθόν ήταν ελάχιστες και όταν ταυτοποιούνταν θεωρούνταν ασήμαντες συγκριτικά με τις επιπτώσεις άλλων ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια όμως, η ασθένεια φαίνεται να παρουσιάζει μια τάση εδραίωσης και εξάπλωσης στον ελληνικό χώρο. Κρούσματα στις μονάδες αναφέρονται πλέον σε ετήσια βάση και σε πολύ μεγάλο εύρος περιοχών με κύριες εποχές εμφάνισης τους φθινοπωρινούς μήνες και την αρχή της άνοιξης. Τα ψάρια που νοσούν εμφανίζουν μείωση της φυσιολογικής τους λειτουργίας ενώ καταγράφονται και υψηλές θνησιμότητες, της τάξης του 20-30% του εκτρεφόμενου ιχθυοπληθυσμού, που αποδίδονται στην ασθένεια. Οι επιπτώσεις είναι ακόμα μεγαλύτερες όταν η έξαρση επιθηλιοκύστης συνδυάζεται με προσβολή των ψαριών κι από άλλα παθογόνα (Καθάριος, Προσωπική επικοινωνία)

Σε ερευνητικό επίπεδο, η μελέτη της ασθένειας ξεκίνησε ουσιαστικά περίπου την τελευταία δεκαετία από τον Katharios et al. (2008) ο οποίος περιέγραψε έξαρση

της ασθένειας σε νυμφική εκτροφή μυτακιού (*Diplodus puntazzo*). Ήταν η πρώτη φορά που καταγράφηκε η ασθένεια στο μυτάκι καθώς και σε τόσο πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο (Katharios et al., 2008). Πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική ανάλυση και ιστολογία και η ασθένεια αποδόθηκε στα χλαμύδια που μέχρι τότε θεωρούνταν ο μοναδικός αιτιολογικός παράγοντας της επιθηλιοκύστης χωρίς όμως να πραγματοποιηθούν μοριακές αναλύσεις. Μετά από προσπάθειες χρόνων για την επανεμφάνιση της επιθηλιοκύστης, σε πειραματικές δεξαμενές, παρατηρήθηκε εκ νέου έξαρση επιθηλιοκύστης σε νυμφική εκτροφή μυτακιού το 2015. Αυτή τη φορά, με χρήση μοριακών τεχνικών (PCR) αναγνωρίστηκε ένα νέο βακτήριο-παράγοντας της επιθηλιοκύστης, το *Ca*. Endozoicomonas cretensis, το οποίο ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια. Με την τεχνική του *in-situ* υβριδισμού και τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης αποδείχτηκε ότι το *Ca*. Endozoicomonas cretensis ήταν υπεύθυνο για τη δημιουργία κύστεων στο δέρμα και στα βράγχια των νυμφών και όχι βακτήρια που ανήκουν στα χλαμύδια όπως ήταν η αρχική υπόθεση (Katharios et al., 2015). Παράλληλα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε βράγχια ενήλικων ψαριών (τσιπούρα) με επιθηλιοκύστη, που συλλέχθηκαν από ελληνικές μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, αναγνωρίστηκε ένα νέο γένος βακτηρίων ως αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας, το *Candidatus* Ichthyocystis. Στο γένος αυτό ταυτοποιήθηκαν δύο είδη, το *Ca*. Ichthyocystis sparus και το *Ca*. Ichthyocystis hellenicum (Seth-Smith et al., 2016) που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια.

1.4 ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Για τη συγκεκριμένη εργασία συλλέχθηκαν δείγματα βραγχίων ενήλικων ψαριών με επιθηλιοκύστη, από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας σε μεγάλο εύρος περιοχών της Ελλάδας. Το μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων ήταν από τσιπούρες, ωστόσο συλλέχθηκαν και δείγματα από λαβράκια και μαγιάτικα, είδη σημαντικής αξίας για την ελληνική βιομηχανία ιχθυοκαλλιεργειών.

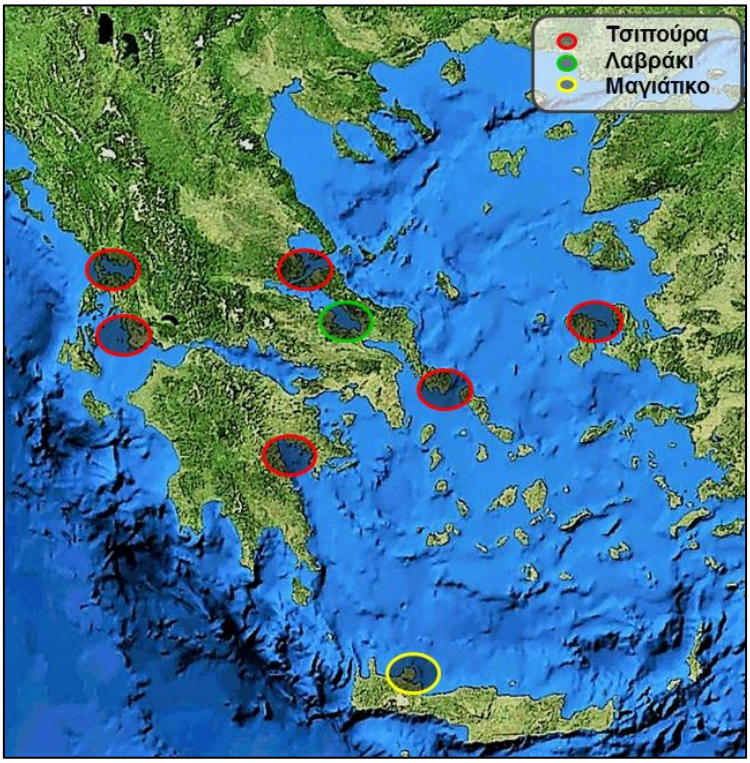
Ο γενικός στόχος της εργασίας αυτής είναι η σφαιρική μελέτη της επιθηλιοκύστης και η συλλογή δεδομένων με σκοπό την περεταίρω κατανόηση των αιτιολογικών της παραγόντων και των χαρακτηριστικών τους στην περιοχή της Ελλάδας. Πιο συγκεκριμένα οι βασικοί στόχοι της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η:

- Ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων που προκαλούν την ασθένεια,
- Εκτίμηση της κατανομής τους,
- Αποτύπωση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των διαφορετικών στελεχών παθογόνων που ταυτοποιήθηκαν,
- Μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κύστεων και της ιστοπαθολογίας,
- Εκτίμηση των μορφομετρικών χαρακτηριστικών των κύστεων,
- Αντιστοίχιση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κύστεων με το παθογόνο βακτήριο που τις προκαλεί και η
- Παρατήρηση και μελέτη της μορφολογίας των βακτηρίων

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για τη μελέτη της ασθένειας συλλέχθηκαν δείγματα από βράγχια ψαριών με επιθηλιοκύστη σε συνεργασία με τις τρεις μεγαλύτερες εταιρίες ιχθυοκαλλιεργειών της Ελλάδας: το Νηρέα, τη Σελόντα και την Ανδρομέδα. Όλα τα δείγματα προέρχονταν από ψάρια στη διαδικασία της πάχυνσης. Το χρονικό διάστημα λήψης των δειγμάτων ήταν από το Μάρτιο του 2015 έως το Σεπτέμβριο του 2016 σε ένα μεγάλο εύρος περιοχών της Ελλάδας που περιλαμβάνουν περιοχές της Δυτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου, της Ανατολικής Στερεάς, της Εύβοιας, του Βορείου Αιγαίου και της Κρήτης όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5**.



Εικόνα 5: Γεωγραφική κατανομή των περιοχών δειγματοληψίας. Το χρώμα του περιγράμματος αντιστοιχεί στο είδος ψαριού από το οποίο συλλέχθηκαν τα δείγματα. Το κόκκινο περίγραμμα αντιστοιχεί σε τσιπούρες, το πράσινο σε λαβράκια και το κίτρινο σε μαγιάτικα.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων ήταν από τσιπούρες, ωστόσο συλλέχθηκαν δείγματα και από λαβράκια και μαγιάτικα. Συνολικά, συγκεντρώθηκαν δείγματα από 33 ψάρια. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή και ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων μέσω μοριακών τεχνικών, για την ανάλυση της μορφολογίας και των δομικών χαρακτηριστικών των κύστεων καθώς και της ιστοπαθολογίας που προκαλούν με χρήση ιστολογικών μεθόδων. Παράλληλα, έγινε παρατήρηση των βακτηρίων και των δομών τους σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Για την πραγματοποίηση των αναλύσεων αυτών, από καθένα από τα 33 ψάρια πάρθηκε δείγμα βραγχίων που τοποθετήθηκε σε διάλυμα φορμόλης και

αιθανόλης 96% ή/και RNAlater. Από κάποια από τα ψάρια πάρθηκε και δείγμα που τοποθετήθηκε σε διάλυμα γλουταραλδεΰδης. Ο **Πίνακας 1** περιλαμβάνει πληροφορίες για το συνόλου των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

Πίνακας 1: Απεικόνιση του συνόλου των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και αντιστοίχιση του κωδικού των ψαριών με το μέσο συντήρησης που χρησιμοποιήθηκε και το είδος του ψαριού.

Κωδικός ψαριού	Μέσο συντήρησης				Είδος ψαριού
	Διάλυμα φορμόλης	RNAlater	Αιθανόλη	Γλουταραλδεΰδη	
100	+	+			Λαβράκι
101	+	+			Λαβράκι
102	+	+			Λαβράκι
1	+	+	+		Τσιπούρα
2	+		+	+	Τσιπούρα
3	+		+	+	Τσιπούρα
4	+		+	+	Τσιπούρα
5	+		+	+	Τσιπούρα
6	+		+	+	Τσιπούρα
7	+		+	+	Τσιπούρα
8	+		+	+	Τσιπούρα
9	+		+	+	Τσιπούρα
11	+		+		Τσιπούρα
12	+		+	+	Τσιπούρα
13	+		+		Τσιπούρα
14	+		+	+	Τσιπούρα
15	+		+	+	Τσιπούρα
16	+		+	+	Τσιπούρα
17	+		+		Τσιπούρα
18	+		+	+	Τσιπούρα
19	+		+		Τσιπούρα
19*	+		+		Τσιπούρα
*****	+		+		Τσιπούρα
******	+		+		Τσιπούρα
Souda 1	+		+		Μαγιάτικο
Souda 2	+		+		Μαγιάτικο
Souda 3	+		+		Μαγιάτικο
Souda 4	+		+		Μαγιάτικο
Souda 5	+		+		Μαγιάτικο
Souda 6	+		+		Μαγιάτικο
Souda 7	+		+		Μαγιάτικο
Souda 8	+		+		Μαγιάτικο
Souda 9	+		+		Μαγιάτικο

2.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε διάλυμα αιθανόλης ή RNAlater χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει ταυτοποίηση των βακτηρίων με PCR. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλάμβανε:

2.2.1 Εξαγωγή DNA

Τα δείγματα συντηρημένα σε αιθανόλη τοποθετήθηκαν αρχικά σε φούρνο στους 36˚C για ένα βράδυ ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη πλήρως. Στη συνέχεια έγινε η εξαγωγή DNA με το DNeasy Blood & Tissue Kit της Qiagen. Στα δείγματα συντηρημένα σε RNAlater έγινε απλά εξαγωγή DNA χωρίς να προηγηθεί κάποια άλλη διαδικασία. Η κατακρήμνιση του DNA γινόταν με αποστειρωμένο, διπλά αποσταγμένο νερό 25μl.

2.2.2 Πολλαπλασιασμός DNA βακτηρίων

Για να γίνει η ανίχνευση των βακτηρίων που ήταν υπεύθυνα για την επιθηλιοκύστη σε κάθε δείγμα έγινε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Για την ανίχνευση χλαμυδίων χρησιμοποιήθηκαν αρχικά γενικοί εκκινητές του γονιδίου 16S του ριβοσωμικού RNA, ενώ για την ανίχνευση βακτηρίων που ανήκουν στο γένος Ichthyocystis spp. και Endozoicomonas spp. χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εκκινητές πάλι για το γονίδιο 16S του ριβοσωμικού RNA. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των εκκινητών και οι συνθήκες της αντίδρασης για καθένα από αυτούς.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε κατηγορία παθογόνου μικροβίου.

Παθογόνο	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία επιμήκυνσης	Διάρκεια επιμήκυνσης	Μέγεθος προϊόντος
Endozoicomonas spp.	Endo sp F	AGTAGGGAGGAAAGGTTGAAGG	60°C	30 sec	400 bp
	Endo sp R	CCCAGAATACAAGACTCCGGAC			
Ichthyocystis spp.	Ichthyo sp F	AACTARGATGGTGGCGAGTG	60-62°C	1 min	900 bp
	Ichthyo sp R	CGCACATGTCAAGGGTAGG			
Chlamydiaceae	IGF IGR	GACTAGGTTGGGCAAG AGCTCTTA(T/G/A)(C/T)AACTTGGT CTGTA	55°C	30 sec	300 bp

2.2.3 Πρωτόκολλο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

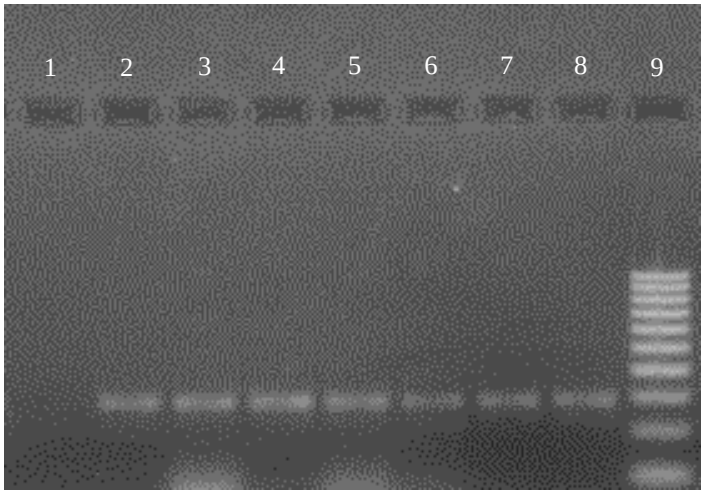
Κάθε αντίδραση είχε συνολικό όγκο 25μl. Τα 12.5μl ήταν το διάλυμα της πολυμεράσης (Master Mix), 0.5μl συγκέντρωσης 10μM ήταν ο όγκος κάθε εκκινητή (F και R), 1μl DNA δείγματος και 10.5μl αποστειρωμένο νερό (H_2O). Ως θετικό control για κάθε μια από τις κατηγορίες βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε DNA βραγχίων για τα οποία είχε γίνει ήδη η ταυτοποίηση των εν λόγω βακτηρίων σε προηγούμενες μελέτες (Seth-Smith et al., 2016; Katharios et al., 2015). Για αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε DNA υγιούς ψαριού, ενώ ως blank χαρακτηρίστηκε η αντίδραση χωρίς DNA κάποιου δείγματος.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Για να γίνει η ταυτοποίηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε γέλη Αγαρόζης (1%) με βρωμιούχο αιθίδιο (0.5%) στα 90V για 40 λεπτά.

2.2.5 Παρατήρηση γέλης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας

Μετά την ηλεκτροφόρηση η γέλη τοποθετούνταν σε ειδικό μηχάνημα εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας από όπου γινόταν άμεση λήψη φωτογραφιών. Ταυτοποίηση ενός δείγματος σε κάποια από της κατηγορίες των βακτηρίων στόχων γινόταν μόνο όταν υπήρχε μπάντα για το δείγμα ίδιου μεγέθους με αυτή του θετικού control αλλά όχι μπάντες για το αρνητικό control και το blank.



Εικόνα 6: Φωτογραφία από γέλη αγαρόζης στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν δείγματα για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Ca.* Ichthyocystis. Η θέση 1 αντιστοιχεί στο αρνητικό control, οι θέσεις 2-7 αντιστοιχούν σε DNA δειγμάτων, η θέση 8 αντιστοιχεί στο θετικό control και η θέση 9 στον μάρτυρα (Ladder 100-1000bp). Όπως φαίνεται από τις μπάντες που σχηματίζονται, στα δείγματα ταυτοποιούνται βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis.

Στην περίπτωση των χλαμυδίων, όταν κάποιο δείγμα έδινε θετικό σήμα γινόταν εκ νέου PCR με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο 16S του ριβοσωμικού RNA ώστε να ενισχυθεί σχεδόν ολόκληρο το μήκος του γονιδίου (Near-full-length of 16S) (Draghi et al. 2004) και ακολουθούσαν οι διαδικασίες που αναφέρονται παραπάνω.

Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών και του προϊόντος φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό σχεδόν όλου του γονιδίου 16S των χλαμυδίων.

Τμήμα γονιδίου	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία επιμήκυνσης	Διάρκεια επιμήκυνσης	Μέγεθος προϊόντος	Θέση εκκινητή
Near-full-length 16S	16SIGF	GACTAGGTTGGGCAAG	58°C	40 sec	1487	40–57
	16SB1	TACGGYTACCTTGTTACGACTT				1505–1527

2.2.6 Καθαρισμός DNA

Ο καθαρισμός των προϊόντων έγινε με το ειδικό kit καθαρισμού της Qiagen, QIAquick PCR Purification Kit.

2.2.7 Αλληλούχιση

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε με τη μέθοδο Sanger από την εταιρία CEMIA.

2.2.8 Φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών

Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Clustal W στο Genious. Οι γενετικές αποστάσεις εκτιμήθηκαν με τη χρήση του μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης Tamura-Nei ενώ για την προσέγγιση των φυλογενετικών σχέσεων χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση σύνδεσης γειτόνων (Neighbor joining). Η στατιστική υποστήριξη των κλάδων ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap στις 1000 επαναλήψεις.
Εκτός από τις αλληλουχίες που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν και άλλες αλληλουχίες από τη βάση δεδομένων GenBank της NCBI (**Πίνακας 4**). Για τη σύγκριση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος σύγκρισης αλληλουχιών BLAST.

Πίνακας 4: Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις για τις 3 κατηγορίες βακτηρίων. Χαρακτηρισμός του βακτηρίου σε επίπεδο γένους ή είδους, κωδικός του στελέχους, οργανισμός από τον οποίο ταυτοποιήθηκε και κωδικός της βάσης δεδομένων GenBank.

Χαρακτηρισμός	Στέλεχος	Προέλευση/ Ξενιστής	GenBank No
Ca. Ichthyocystis hellenicum	2012Sar4i	*Sparus aurata*	LN612730.1
Ca. Ichthyocystis hellenicum	2013Arg42i	*Sparus aurata*	LN612726.1
Ca. Ichthyocystis sparus	2013Arg22i	*Sparus aurata*	LN612728.1
Ca. Ichthyocystis sparus	2013Arg32i	*Sparus aurata*	LN612729.1
Ca. Ichthyocystis sparus	2013Ark19i	*Sparus aurata*	LN612727.1
Ca. Branchiomonas cysticola	A1-483-L1	*Salmo salar*	JN968376.1
Ca. Glomeribacter gigasporarum	S. persica E09	Arbuscular mycorrhizal fungi	AJ251635.1
Ca. Clavochlamydia salmonicola	-	*Salmo trutta*	EF577392.1
Ca. Parilichlamydia carangidicola	25YTK11	*Seriola lalandi*	JQ673516.1
Ca. Parilichlamydia sp.	RB230513-5	*Labrus mixtus*	KT030896.1
Ca. Piscichlamydia salmonis	clone C093-1	*Salmo salar*	AY462244.1
Ca. Protochlamydia sp.	cvE14	Fresh water	FJ976093.1
Ca. Rhabdochlamydia sp.	cvE88	isolated in mixed eukaryotic cocultures	JF513056.1
Ca. Similichlamydia labri	SM160513-33	*Symphodus melops*	KT030899.1
Ca. Similichlamydia latridicola	123ST10	*Latris lineata*	KC686679.1
Ca. Similichlamydia labri	CE230512-20	*Centrolabrus exoletus*	KC469549.1
Neochlamydia hartmannellae	A1Hsp	*Hartmannella vermiformis* (amoeba)	NR_025037.1
Ca. Similichlamydia sp.	2012Sar3_5c	*Sparus aurata*	LN612731.1
Ca. Similichlamydia sp.	2013Arg23_1c	*Sparus aurata*	LN612732.1
Ca. Piscichlamydia salmonis	BR281005-25	*Salmo trutta*	EF153480.1
Waddliaceae bacterium	cvE65	isolated in mixed eukaryotic cocultures	JF706723.1

Endozoicomonas elysicola	MKT110	*Elysia ornata* (sea slug)	AB196667.1
Endozoicomonas atrinae	WP70	*Atrina pectinate* (shell)	NR_134024.1
Endozoicomonas montiporae	Ab229	*Arenosclera brasiliensis* (marine sponge)	KJ372476.1
Endozoicomonas sp.	TSASRA102	*Theonella swinhoei* (sponge)	KJ573540.1
Endozoicomonas elysicola	CL-113	*Rachycentron canadum*	KC312958.1
Ca. Endozoicomonas cretensis	Dpd21_3_44	*Diplodus puntazzo*	LN626318.1
Uncultured γ- proteobacterium	HOC27	environmental_sample	AB054161.1
Endozoicomonas elysicola	MKT110	*Elysia ornata* (sea slug)	NR_041264.1
Endozoicomonas elysicola	urch12	urchin	KF057013.1

2.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Ιστολογική μελέτη πραγματοποιήθηκε για καθένα από τα 33 δείγματα που συλλέχθηκαν. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη συντήρηση και την επεξεργασία των δειγμάτων περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

2.3.1 Παρασκευή μονιμοποιητικού διαλύματος

Τα δείγματα που συλλέγονταν για ιστολογία τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια των 2ml με το κατάλληλο μονιμοποιητικό διάλυμα φορμαλδεΰδης – γλουταραλδεΰδης (4:1). Η παρασκευή του μονιμοποιητικού διαλύματος γινόταν ως εξής: 23.2 g $NaH_2PO_4H_20$, 5.4 g NaOH, 200 ml φορμαλδεΰδης 40%, 80 ml γλουταραλδεΰδης 25%, απιονισμένο νερό μέχρι τα 2 λίτρα. Μετά την παρασκευή γινόταν έλεγχος του pH του διαλύματος ώστε να είναι 7.2.

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολούθησε η απαραίτητη χημική επεξεργασία βάση πρωτοκόλλου ώστε να γίνουν οι ιστολογικές τομές.

2.3.2 Αφυδάτωση δειγμάτων

Απιονισμένο νερό (45 λεπτά)
70% αιθανόλη (1 ώρα και 15 λεπτά)
80% αιθανόλη (1 ώρα και 15 λεπτά)
96% αιθανόλη (1 ώρα και 15 λεπτά)
96% αιθανόλη και ρητίνη (1:1) (1 ώρα)
Ρητίνη (overnight)
Χρησιμοποιήθηκε υδροξυεθυλμεθακρυλική πολυμεριζόμενη ρητίνη Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Γερμανία)

2.3.3 Έγκλειση (πολυμερισμός ρητίνης)

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές θήκες και στη συνέχεια προστέθηκε ρητίνη σε συνδυασμό με το σκληρυντικό που παρέχεται από το πρωτόκολλο ώστε να

πολυμεριστεί και να σκληρύνει. Τα δείγματα αφέθηκαν για 24 ώρες στις θήκες και στη συνέχεια πάνω από τα δείγματα τοποθετήθηκαν ειδικά πλαστικά με σκοπό την αποκόλληση τους από τις θήκες της ιστολογίας. Η προσθήκη των πλαστικών αυτών έγινε με τη χρήση ειδικής κόλλας (Technovit 3040, Heraeus Kulzer, Γερμανία). Οι τομές των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μικροτόμο και το πάχος τους ήταν 4μm.

2.3.4 Χρώση δειγμάτων

Η χρώση των τομών έγινε με τις χρωστικές Polychrome I και Polychrome II (Bennett et al., 1976) και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το ακόλουθο:

Χρώση στο Polychrome I για 2 λεπτά και 20 δεύτερα.
Ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με απιονισμένο νερό 3 φορές επί 1 λεπτό τη φορά.
Χρώση στο Polychrome II για 1 λεπτό.
Εκ νέου ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με απιονισμένο νερό 3 φορές επί 1 λεπτό τη φορά.

Για την παρασκευή των διαλυμάτων των χρωστικών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά: Polychrome I: 0.325g Methylene blue, 0.05g Azure II, 25 ml Glycerol, 25 ml Methanol, 200 ml DDW. Polychrome II: 0.5g Basic Fuchsin, 250 ml δις-απεσταγμένο νερό. Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα των χρωστικών φιλτραρίστηκαν και το διάλυμα Polychrome II αραιώθηκε πριν από τη χρήση του με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:3.5.

2.3.5 Τομές και παρατήρηση

Για καθένα από τα 33 δείγματα πάρθηκαν συνολικά 8 τομές οι οποίες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Nikon. Με φωτογραφική μηχανή Nikon και με το πρόγραμμα NIS elements της Nikon έγινε λήψη φωτογραφιών των κύστεων σε μεγέθυνση x10, x20, x40 και x100. Οι φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της έκτασης, της περιμέτρου, του ύψους και του πλάτους των κύστεων μέσω του προγράμματος επεξεργασίας και ανάλυσης εικόνων Image J με σκοπό την κατηγοριοποίηση των κύστεων βάση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών.

2.4 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΛΕΥΣΗΣ

Η παρατήρηση των κύστεων και των βακτηρίων που περιέχουν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έγινε σε δύο δείγματα βραγχίων από τσιπούρες, το ένα ήταν από την περιοχή του Αστακού ενώ το άλλο από τη Χίο. Τα δείγματα αυτά ήταν συντηρημένα σε γλουταραλδεϋδη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία τους, ώστε να μπορεί να γίνει η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας στο Τμήμα Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Αρχικά, η παρατήρηση του ιστού έγινε σε στερεοσκόπιο όπου αναγνωρίστηκαν οι κύστεις. Στη συνέχεια, κόπηκαν 2 τμήματα βραγχίου από κάθε δείγμα, μήκους περίπου 0.5mm, που περιείχαν από μια κύστη για τα οποία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο προετοιμασίας.

Η πρωτογενής μονιμοποίηση τον δειγμάτων έγινε σε διάλυμα φωσφορικού άλατος 100 mM, γλουταραλδεϋδης 2.5% με pH 7 για 2 ώρες στους 4°C. Ακολούθησε ξέπλυμα με διάλυμα φωσφορικού άλατος συγκέντρωσης 200 mM. Η δευτερογενής μονιμοποίηση έγινε σε διάλυμα φωσφορικού άλατος 100 mM με τετροξείδιο του οσμίου 1% για 2 ώρες στους 4°C. Μετά τις 2 ώρες τα δείγματα ξεπλύθηκαν πέντε φορές με απιονισμένο νερό.

2.4.1 Χρώση

Για τη χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 'En bloc' σε 2% υδατικό οξικό ουρανύλιο για περίπου 2 ώρες στους 4°C στο σκοτάδι.

2.4.2 Αφυδάτωση

Για την αφυδάτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε άνυδρη αιθανόλη και ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:
30% αιθανόλη για 15 λεπτά
50% αιθανόλη για 15 λεπτά
70% αιθανόλη για 15 λεπτά
90% αιθανόλη για 15 λεπτά
και τρεις αλλαγές σε αιθανόλη 100% για 30 λεπτά η καθεμία.

2.4.3 Έγκλειση

Αρχικά έγιναν δύο αλλαγές των 15 λεπτών σε προπυλενοξείδιο. Στη συνέχεια για να πραγματοποιηθεί σταδιακά ο εμποτισμός των δειγμάτων με ρητίνη τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μίγμα προπυλενοξιδίου-ρητίνης:
2:1 για 1 ώρα
1:1 για 1 ώρα
1:2 για 1 ώρα
και σε 100% ρητίνη για όλο το βράδυ

Την επόμενη μέρα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φρέσκια ρητίνη για 1 ώρα και τοποθετήθηκαν σε ειδικά καλούπια. Ο πολυμερισμός της ρητίνης έγινε στους 60°C για 24 ώρες.

2.4.4 Τομές και παρατήρηση

Έγιναν μικρές τομές σε ειδική μικροτόμο με διαμάντι και, αφού χρωματίστηκαν με χρήση Toluidine Blue, τοποθετήθηκαν σε ειδικό αδρό χαρτί για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης και λήψη φωτογραφιών.

2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν από την ιστολογία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Excel 2010.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS statistics 23. Αρχικά, έγινε κανονικοποίηση των δεδομένων με λογαριθμικό μετασχηματισμό ($\ln(x)= x'$) ώστε να έχουν κανονική κατανομή. Η ομοιογένεια των διασπορών των δειγμάτων ελέγχθηκε με Levene's test. Για τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ και ανάμεσα στα δείγματα

πραγματοποιήθηκε σύγκριση ανεξάρτητων δειγμάτων με το στατιστικό t-test (σύνολο δειγμάτων = 2) ή ανάλυση διασποράς μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA) (σύνολο δειγμάτων > 2). Η ισότητα των μέσων τιμών ελέγχθηκε με Robust test of equality of means (Welch). Τέλος, έγινε έλεγχος πολλαπλών συγκρίσεων (Post Hoc tests) και ομαδοποίηση των ομογενών δειγμάτων (Homogenous subsets) με το στατιστικό Tuckey HSD. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε ως p=0.05.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη ήταν βράγχια από τσιπούρες, λαβράκια και μαγιάτικα με επιβεβαιωμένη την ασθένεια. Τα ψάρια δεν ήταν πάνω από 10.5 μηνών και ο χρόνος που είχαν παραμείνει στη θάλασσα έως ότου διαγνωσθεί η ασθένεια δεν ξεπερνούσε τους 6 μήνες. Επιπλέον, τα κρούσματα παρατηρήθηκαν σε θερμοκρασίες νερού που κυμαίνονταν από 12 έως 26˚C. Το ψάρι με το μεγαλύτερο βάρος που καταγράφηκε ήταν μαγιάτικο στα 139.2g ενώ αυτό με το μικρότερο ήταν τσιπούρα 10g. Τέλος, η συλλογή των δειγμάτων κάλυψε περιοχές της Δυτικής Ελλάδας (Αστακό και Βόνιτσα), της Ανατολικής Στερεάς (Λάρυμνα), της Ανατολικής Πελοποννήσου (Αργολίδα), της Εύβοιας (Βόρεια και Νότια), του Βορείου Αιγαίου (Χίο) και της Κρήτης (Σούδα).

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Τα ζωοτεχνικά και περιβαλλοντικά στοιχεία που αφορούν στα περιστατικά που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις, ελάχιστες και μέγιστες τιμές της ηλικίας, του χρόνου παραμονής στα κλουβιά, του βάρους και της θερμοκρασίας του νερού για το σύνολο των ψαριών που εξετάστηκαν.

	Ηλικία (μήνες)	Χρόνος στα κλουβιά (μήνες)	Βάρος (g)	Θερμοκρασία (˚C)
Μέσος όρος	6.6	3.8	28.3	17.3
Τυπική απόκλιση	1.9	1.4	20	3.2
Ελάχιστο	4	1.5	10	12
Μέγιστο	10.5	6	139.2	26

Στον Πίνακα 6 παρατίθενται τα αντίστοιχα δεδομένα για τις τσιπούρες.

Πίνακας 6: Μέσοι όροι, τυπικές αποκλίσεις, ελάχιστες και μέγιστες τιμές της ηλικίας, του χρόνου παραμονής στα κλουβιά, του βάρους και της θερμοκρασίας του νερού για τις τσιπούρες.

	Ηλικία (μήνες)	Χρόνος στα κλουβιά (μήνες)	Βάρος (g)	Θερμοκρασία (˚C)
Μέσος όρος	6.2	3.7	28.2	17.6
Τυπική απόκλιση	1.5	1.3	18.3	2.5
Ελάχιστο	4	1.5	10	13.8
Μέγιστο	9	6	70	23

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τα δύο άλλα είδη, λαβράκια και μαγιάτικα, αφορούν σε ψάρια μιας δειγματοληψίας από την ίδια περιοχή και χρονική στιγμή, με

τα ίδια χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, τα λαβράκια, από την περιοχή της Λάρυμνας, ήταν 10.5 μηνών, είχαν μείνει στα κλουβιά για 6 μήνες, ζύγιζαν 15g περίπου και η θερμοκρασία του νερού ήταν 12˚C. Αντίστοιχα, τα μαγιάτικα, από την περιοχή της Σούδας, ήταν 4 μηνών, είχαν μείνει στα κλουβιά για 2 μήνες περίπου, το βάρος τους ήταν από 59g έως 139g και η θερμοκρασία ήταν 26˚C .

3.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Μέσω μοριακής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε μια πρώτη ανίχνευση των τριών κατηγοριών παθογόνων βακτηρίων, που επιβεβαιωμένα προκάλεσαν επιθηλιοκύστη, στα δείγματα που μελετήθηκαν.

Ο αρχικός έλεγχος των δειγμάτων για τον προσδιορισμό των παθογόνων βακτηρίων μέσω PCR για συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA έδειξε ότι:

- Όλα τα δείγματα (33) ήταν θετικά για Ichthyocystis
- 15 δείγματα ήταν θετικά για Chlamydia
- 2 δείγματα ήταν θετικά για Endozoicomonas

Επεξηγηματικά, όταν για ένα δείγμα αναφέρεται η φράση «θετικό για Ichthyocystis», «θετικό για Chlamydia», «θετικό για Endozoicomonas» αυτό σημαίνει ότι στο συγκεκριμένο δείγμα ανιχνεύθηκαν βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca.* Ichthyocystis, στην τάξη Chlamydiales ή στο γένος *Ca.* Endozoicomonas αντίστοιχα δηλαδή η φράση αυτή χρησιμοποιείται αποκλειστικά χάριν ευκολίας.

Τα αποτελέσματα της PCR για τα 3 είδη ψαριών που εξετάστηκαν ανά περιοχή δειγματοληψίας, ημερομηνία δειγματοληψίας και δείγμα παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω .

3.2.1 Τσιπούρα

3.2.1.1 Αστακός

Όλα τα δείγματα από την περιοχή του Αστακού ήταν θετικά για Ichthyocystis (n=8) ενώ σε 6 από αυτά ανιχνεύθηκαν και Chlamydia. Κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό για Endozoicomonas (**Πίνακας 7**).

Πίνακας 7: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή του Αστακού.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
1.2	11/11/2015	+	+	-
5.2	18/11/2015	+	+	-
6.2	10/11/2015	+	+	-
7.2	10/11/2015	+	+	-
8.2	18/11/2015	+	+	-
14.2	28/1/2016	+	-	-
15.2	28/1/2016	+	-	-
16.2	28/1/2016	+	+	-

3.2.1.2 Νότια Εύβοια

Τα 3 δείγματα από την περιοχή της Νότιας Εύβοιας ήταν θετικά για Ichthyocystis και Chlamydia ενώ κανένα δεν ήταν θετικό για Endozoicomonas (**Πίνακας 8**).

Πίνακας 8: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Νότιας Εύβοιας.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
2.2	30/11/2015	+	+	-
3.2	30/11/2015	+	+	-
4.2	30/11/2015	+	+	-

3.2.1.3 Βόρεια Εύβοια

Τα 4 δείγματα από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας ήταν θετικά για Ichthyocystis, ένα ήταν θετικό για Chlamydia ενώ κανένα δεν ήταν θετικό για Endozoicomonas (**Πίνακας 9**).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Βόρειας Εύβοιας.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
17.2	2/2/2016	+	-	-
18.2	2/2/2016	+	-	-
19.2	2/2/2016	+	-	-
19.2*	2/2/2016	+	+	-

3.2.1.4 Χίος

Τα 3 δείγματα από την περιοχή της Χίου ήταν θετικά για Ichthyocystis , κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό για Chlamydia όμως 2 δείγματα ήταν θετικά για Endozoicomonas που ήταν και τα μοναδικά από το σύνολο των δειγμάτων (**Πίνακας 10**).

Πίνακας 10: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Χίου.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
11.2	16/2/2016	+	-	+
12.2	16/2/2016	+	-	-
13.2	16/2/2016	+	-	+

3.2.1.5 Αργολίδα

Τα 2 δείγματα από την περιοχή της Αργολίδας ήταν θετικά για Ichthyocystis και Chlamydia αλλά δεν ήταν θετικά για Endozoicomonas (**Πίνακας 11**).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Αργολίδας.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
*	22/12/2015	+	+	-
**	22/12/2015	+	+	-

3.2.1.6 Βόνιτσα

Το δείγμα από την περιοχή της Βόνιτσας ήταν θετικό για Ichthyocystis και Chlamydia αλλά όχι για Endozoicomonas (**Πίνακας 12**).

Πίνακας 12: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων του δείγματος από την περιοχή της Βόνιτσας.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
9.2	12/11/2015	+	+	-

3.2.2 Λαβράκι

3.2.2.1 Λάρυμνα

Τα δείγματα από λαβράκια προέρχονταν όλα από την περιοχή της Λάρυμνας και ήταν θετικά για Ichthyocystis και Chlamydia αλλά όχι για Endozoicomonas (**Πίνακας 13**)

Πίνακας 13: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Λάρυμνας.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
100.2	23/3/2015	+	+	-
101.2	23/3/2015	+	+	-
102.2	23/3/2015	+	+	-

3.2.3 Μαγιάτικο

3.2.3.1 Σούδα

Τα 9 δείγματα από μαγιάτικα προέρχονταν όλα από την περιοχή της Σούδας Χανίων και ήταν και τα 9 θετικά για Ichthyocystis ενώ δεν ήταν θετικά για Chlamydia και Endozoicomonas (**Πίνακας 14**)

Πίνακας 14: Αποτελέσματα PCR για τις τρεις κατηγορίες βακτηρίων των δειγμάτων από την περιοχή της Σούδας.

Κωδικός	Ημερομηνία	Κατηγορίες βακτηρίων		
		Ichthyocystis	Chlamydia	Endozoicomonas
Souda 1	15/9/2016	+	-	-
Souda 2	15/9/2016	+	-	-

Souda 3	15/9/2016	+	-	-
Souda 4	15/9/2016	+	-	-
Souda 5	15/9/2016	+	-	-
Souda 6	15/9/2016	+	-	-
Souda 7	15/9/2016	+	-	-
Souda 8	15/9/2016	+	-	-
Souda 9	15/9/2016	+	-	-

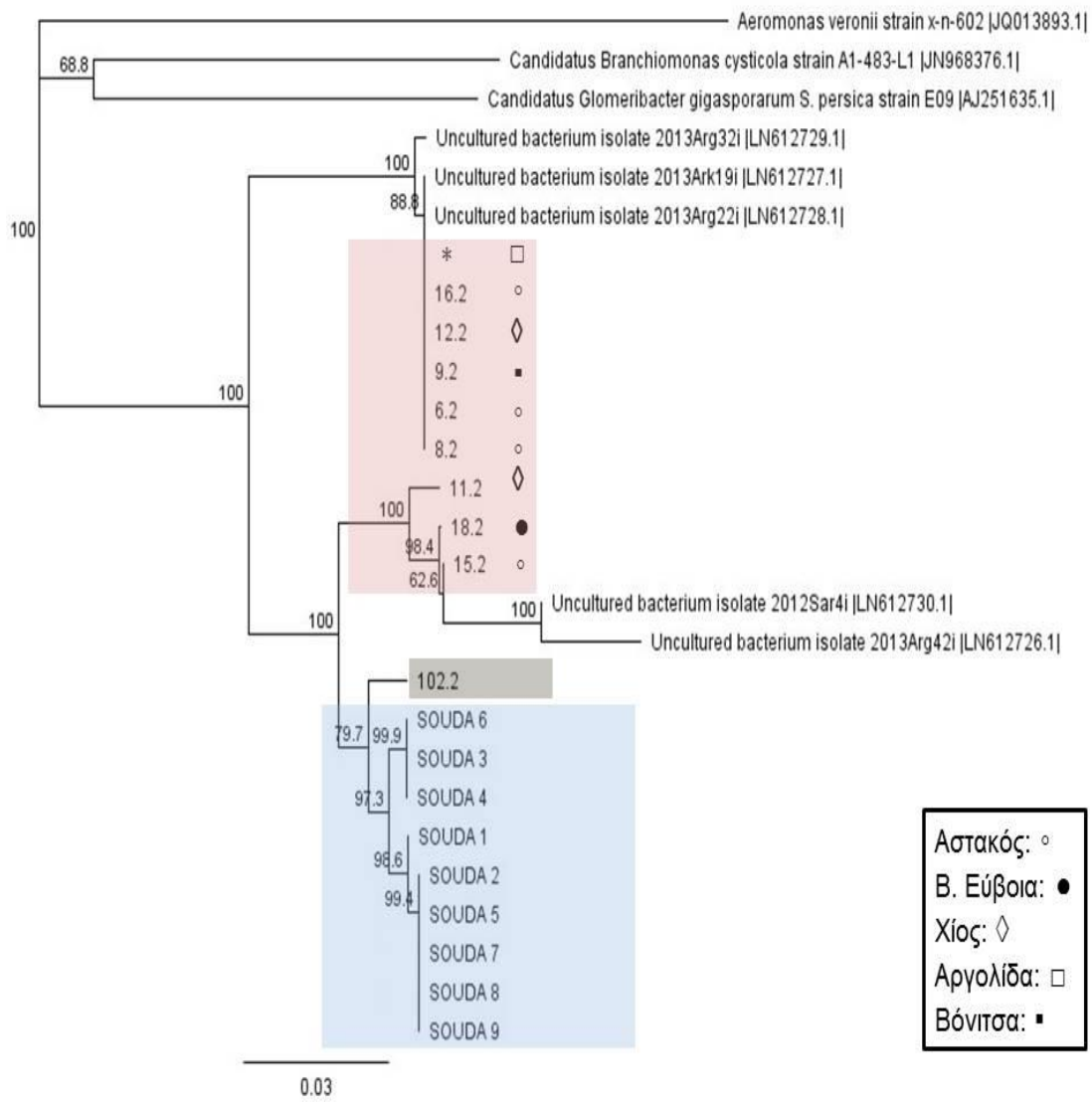
3.3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Αλληλουχίσεις πραγματοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα που έδωσαν θετικό σήμα για κάποια από τις 3 κατηγορίες των υπό διερεύνηση βακτηρίων. Από το σύνολο των 50 δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν μόνο 30 αλληλουχίες για την μοριακή ταυτοποίηση των βακτηρίων. Η επιλογή των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις έγινε με γνώμονα την ποιότητα τους και στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίζονται ως «καθαρές αλληλουχίες». Αλληλουχίες που είχαν μόλυνση (χρωματογράφημα με συνεχείς διπλές κορυφές) αποκλείστηκαν από τις αναλύσεις.

3.3.1 *Ca.* Ichthyocystis spp.

Από τη σύγκριση των 19 καθαρών αλληλουχιών που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου 16S rRNA με ειδικούς εκκινητές για το γένος Ichthyocystis (*Ca.* Ichthyocystis που χάριν ευκολίας θα αναφέρεται ως Ichthyocystis), με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, NCBI μέσω του αλγορίθμου σύγκρισης αλληλουχιών BLAST προέκυψε ότι:

- οι αλληλουχίες 6 δειγμάτων (12.2, 9.2, 16.2, 6.2, 8.2 και *) ταυτοποιούνται ως *Ca.* Ichthyocysts sparus έχοντας 99% ομοιότητα με τα βακτηριακά στελέχη 2013Arg22i, 2013Ark19i και 2013Arg32i που απομονώθηκαν από περιστατικά επιθηλιοκύστης σε τσιπούρες.
- οι αλληλουχίες 3 δειγμάτων (11.2, 15.2, 18.2) ταυτοποιούνται ως *Ca.* Ichthyocystis hellenicum έχοντας 99-100% ομοιότητα με το βακτηριακό στέλεχος 2013Arg42i που απομονώθηκε από περιστατικό τσιπούρας με επιθηλιοκύστη
- οι αλληλουχίες 10 δειγμάτων (102.2 και SOUDA1 – SOUDA9) έχουν ομοιότητα 96-97% με το συγγενικότερο σε αυτές, βακτηριακό στέλεχος 2013Arg42i (*Ca.* Ichthyocysts hellenicum). Η διάκριση ειδών ορίζεται σε ποσοστό ομοιότητας 94.5–98.7% του γονιδίου 16S rRNA (Yarza et al., 2014) επομένως είναι πιθανό τα βακτήρια που προκαλούν επιθηλιοκύστη στα εν λόγω δείγματα να ανήκουν σε ένα νέο είδος του γένους *Ca.* Ichthyocysts.

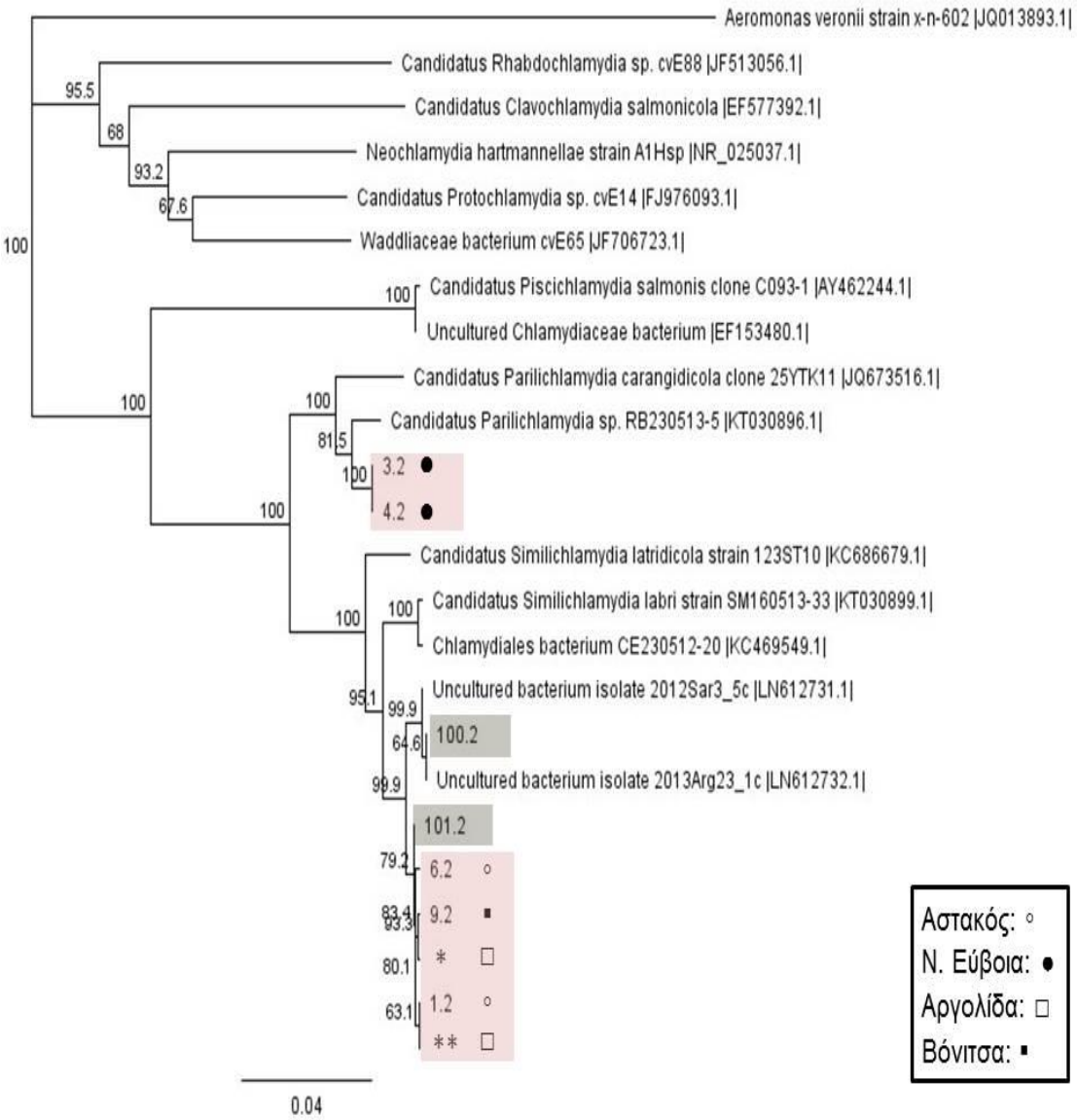


Εικόνα 7: Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών που μελετήθηκαν με στελέχη που ανήκουν στο γένος Ichthyocystis και δύο άλλα βακτήρια που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια (Εξωομάδα: *Aeromonas veronii*), σύμφωνα με την ανάλυση Neighbor-Joining για τμήμα (755 νουκλεοτιδικές βάσεις) του γονιδίου του 16S rRNA. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ανάλυσης. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από τσιπούρες, σε γκρι αυτές που αντιστοιχούν σε δείγμα από λαβράκι (Λάρυμνα) και σε μπλε οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από μαγιάτικα (Σούδα). Σε λευκό πλαίσιο βρίσκονται τα σύμβολα που αντιστοιχούν στις περιοχές δειγματοληψίας για τα δείγματα από τσιπούρες.

3.3.2 Chlamydiales

Από τη σύγκριση των καθαρών αλληλουχιών που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό σχεδόν όλου του γονιδίου 16S rRNA με ειδικούς εκκινητές για το φύλο Chlamydiales, με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, NCBI μέσω του αλγορίθμου σύγκρισης αλληλουχιών BLAST προέκυψε ότι:

- οι αλληλουχίες 7 δειγμάτων (1.2, 6.2, 9.2, 100.2, 101.2, * και **) έχουν 98% ομοιότητα με στελέχη που ανήκουν στο είδος *Candidatus* Similichlamidia labri με κάλυψη αλληλουχιών 99-100% ενώ έχουν ομοιότητα 99-100% με τα στελέχη 2013Arg33_2c και 2013Arg23_1c με κάλυψη 75-76% που απομονώθηκαν από περκόμορφο (*Centrolabrus exoletus*) και από τσιπούρα με επιθηλιοκύστη αντίστοιχα.
- οι αλληλουχίες 2 δειγμάτων (3.2 και 4.2) έχουν ομοιότητα 98% με το στέλεχος RB230513-5 που ανήκει στο γένος *Candidatus* Parilichlamydia sp. και απομονώθηκε από περκόμορφο (*Labrus mixtus*) με επιθηλιοκύστη.



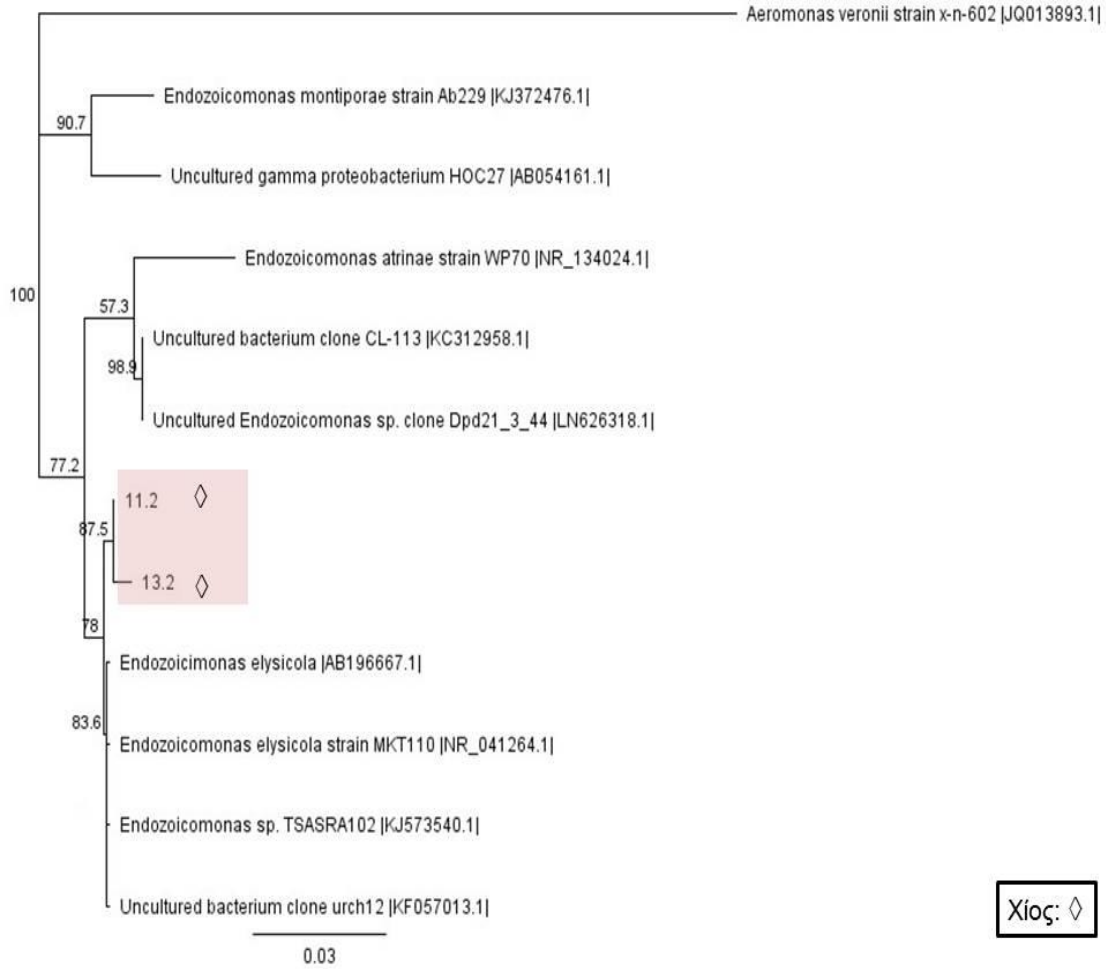
Εικόνα 8: Φυλογενετικές σχέσεις των αλληλουχιών που μελετήθηκαν με στελέχη που ανήκουν σε διαφορετικά γένη του φύλου Chlamydiales (Εξωομάδα: *Aeromonas veronii*), σύμφωνα με την ανάλυση Neighbor-Joining για τμήμα (1005 νουκλεοτιδικές βάσεις) του γονιδίου του 16S rRNA. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ανάλυσης. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από τσιπούρες και σε

γκρι αυτές που αντιστοιχούν σε δείγμα από λαβράκι (Λάρυμνα). Σε λευκό πλαίσιο βρίσκονται τα σύμβολα που αντιστοιχούν στις περιοχές δειγματοληψίας για τα δείγματα από τσιπούρες.

3.3.3 Endozoicomonas spp.

Από τη σύγκριση των αλληλουχιών που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό τμήματος του γονιδίου 16S rRNA με ειδικούς εκκινητές για το γένος Endozoicomonas, με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, NCBI μέσω του αλγορίθμου σύγκρισης αλληλουχιών BLAST προέκυψε ότι:

- η αλληλουχία του δείγματος 13.2 έχει ομοιότητα 99% και αυτή του δείγματος 11.2 98% με το στέλεχος Dpd21_3_44 το οποίο ανήκει στο *Ca.* Endozoicomonas cretensis και βρέθηκε σε μυτάκι με επιθηλιοκύστη καθώς και με το στέλεχος CL-113 που βρέθηκε από κόμπια με επιθηλιοκύστη και ανήκει στο *Endozoicomonas elysicola*. Τα ίδια ποσοστά ομοιότητας φαίνεται να έχει και με στελέχη που έχουν απομονωθεί από σπόγγο, αχινό και θαλάσσιο σαλιγκάρι και ανήκουν κι αυτά στο γένος Endozoicomonas.

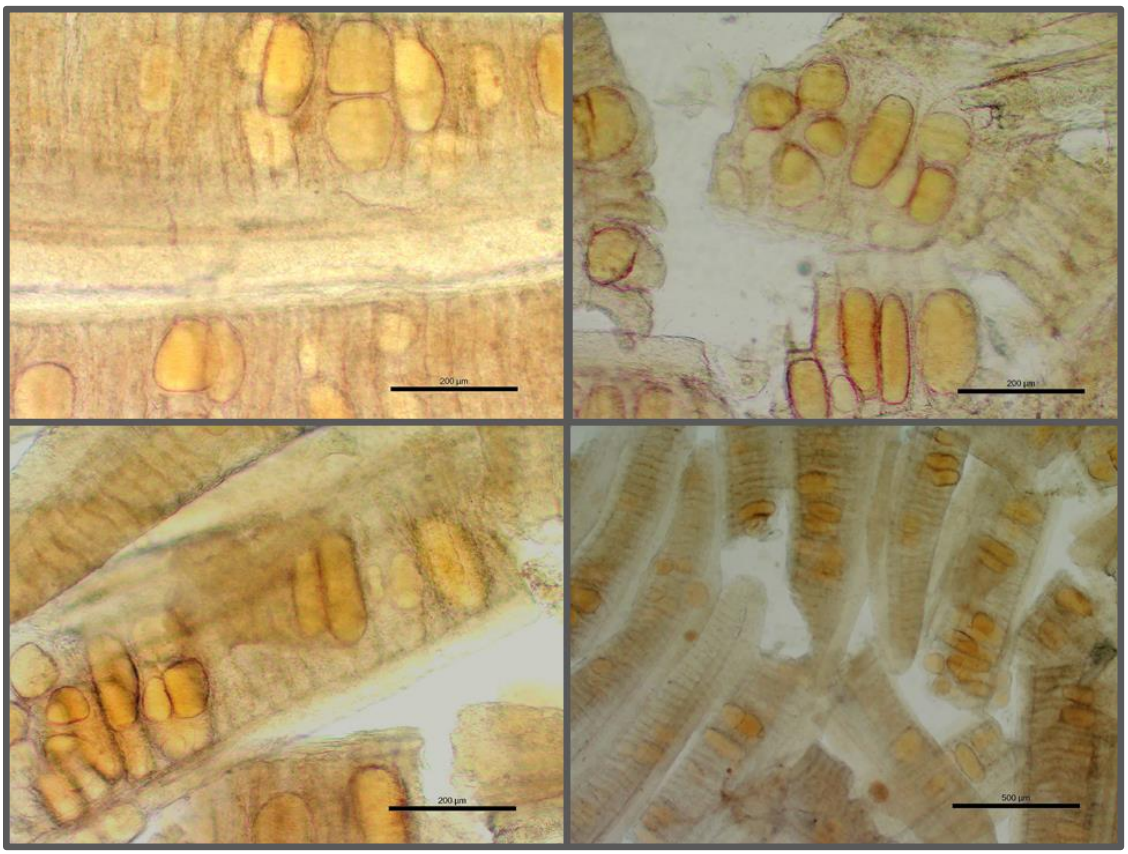


Εικόνα 9: Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των αλληλουχιών που μελετήθηκαν με στελέχη που ανήκουν στο γένος Endozoicomonas (Εξωομάδα: *Aeromonas veronii*) σύμφωνα με την ανάλυση Neighbor-Joining για τμήμα (397 νουκλεοτιδικές βάσεις) του γονιδίου του 16S rRNA. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap της ανάλυσης. Σε κόκκινο πλαίσιο βρίσκονται

οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε δείγματα από τσιπούρες. Σε λευκό πλαίσιο βρίσκεται το σύμβολο που αντιστοιχεί στην περιοχή δειγματοληψίας.

3.4 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

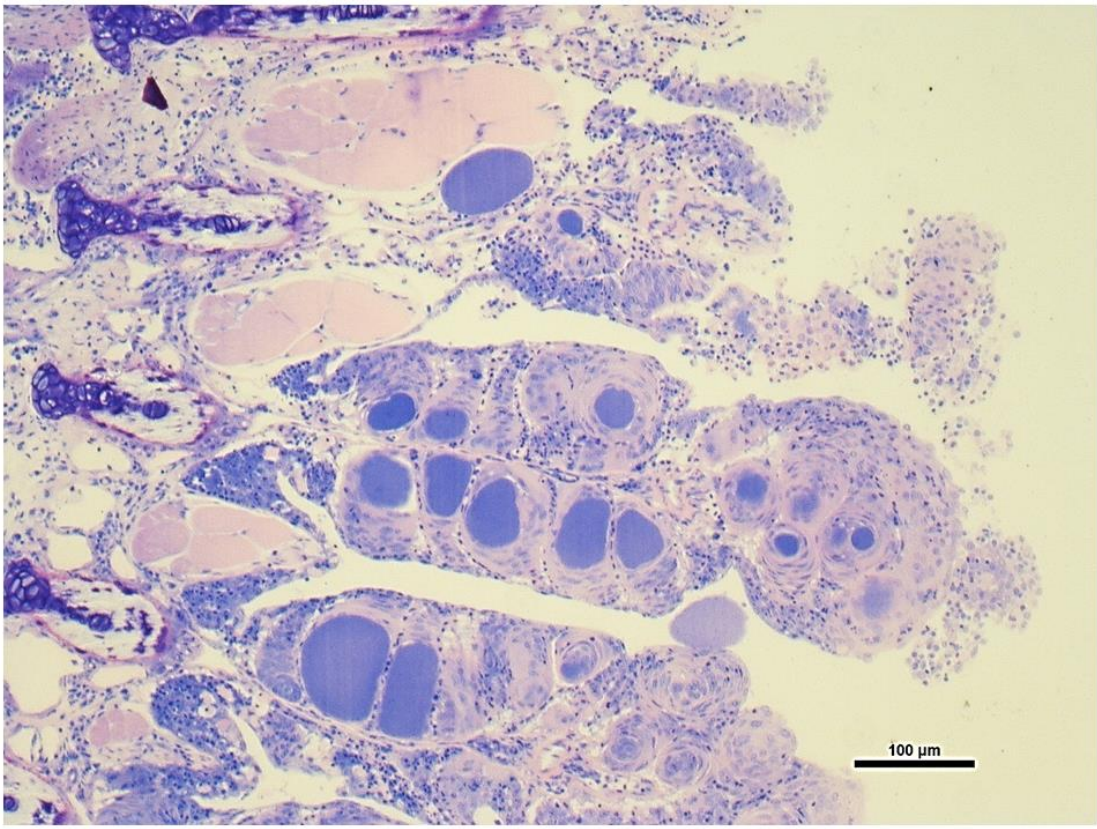
Αρχικά, έγινε παρατήρηση των νωπών βραγχίων και των κύστεων σε οπτικό μικροσκόπιο και στερεοσκόπιο για την επιβεβαίωση της ασθένειας (**Εικόνα 10**). Κύστεις παρατηρήθηκαν σε όλα τα βράγχια εκτός των δειγμάτων που προέρχονταν από μαγιάτικα. Στα δείγματα αυτά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση κύστεων κατά αυτόν τον τρόπο.



Εικόνα 10: Εικόνες βραγχίων νωπών παρασκευασμάτων που προέρχονται από βράγχια συντηρημένα σε φωσφορικό διάλυμα φορμόλης (PBF 10%). Οι κύστεις είναι ευδιάκριτες, πολυάριθμες, ανισομεγέθεις και διάσπαρτες κατά μήκος των δευτερογενών ελασμάτων των βραγχίων.

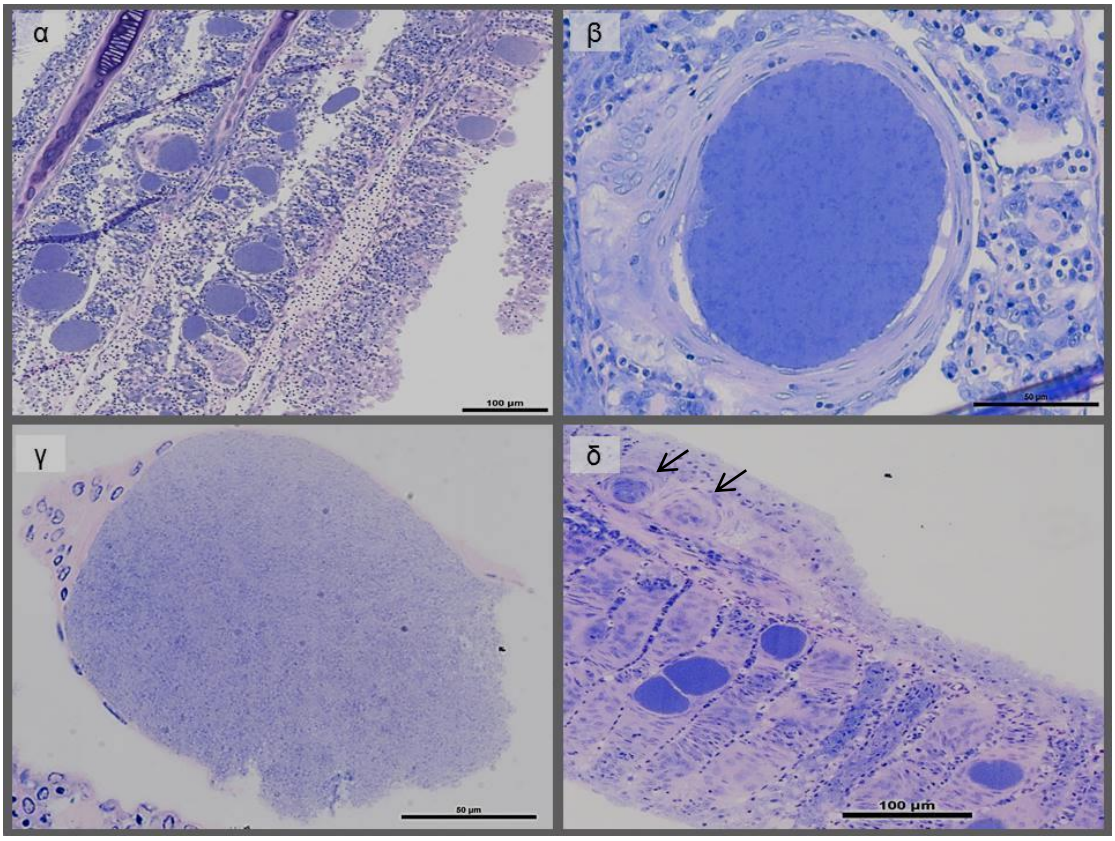
3.5 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ

Η τυπική μορφολογία μια κύστης είναι μια διογκωμένη μεμβράνη με κοκκώδες περιεχόμενο (βακτήρια) που βρίσκεται προσκολλημένη στα κύτταρα του επιθηλίου των δευτερογενών βραγχιακών ελασμάτων. Ουσιαστικά, πρόκειται για ένα υπερτροφικό επιθηλιακό κύτταρο του οποίου ο πυρήνας έχει μετατοπιστεί στην περιφέρεια ενώ το κυτταρόπλασμα περιέχει τα βακτήρια (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11: Φωτογραφία τομής βραγχίων τσιπούρας με επιθηλιοκύστη σε οπτικό μικροσκόπιο. Παρατηρείται παθολογική εικόνα των δευτερογενών βραγχιακών ελασμάτων που οφείλεται στις κύστεις με έντονη την υπερπλασία του επιθηλιακού ιστού (κλίμακα στα 100μm)

Η ιστολογία επιβεβαίωσε την ύπαρξη κύστεων στα δείγματα των βραγχίων που οφείλονται στην επιθηλιοκύστη. Οι κύστεις εντοπίζονται σε όλο το μήκος των δευτερογενών βραγχιακών ελασμάτων ενώ σπανιότερα παρατηρούνται και στον επιθηλιακό ιστό πίσω από το πρωτογενές βραγχιακό έλασμα. Σύμφωνα με τη Seth-Smith et. al. (2016), οι μεγάλες κύστεις πιθανά να επηρεάζουν την ανταλλαγή των αερίων λόγω της υπερπλασίας του επιθηλίου, και, κατά συνέπεια την αναπνοή. Ιδιαίτερα, όταν είναι υπεράριθμες στον ιστό μπορεί να επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ξενιστή (Seth-Smith et al., 2016). Συχνά, σχηματίζονται στιβάδες πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων (squamus metaplasia) περιφερειακά των κύστεων ακόμα και φλεγμονώδης απόκριση με συσσώρευση μακροφάγων, λεμφοκυττάρων ή/και ουδετερόφιλων. Επίσης, παρατηρήθηκαν διερρηγμένες κύστεις όπου τα βακτήρια στο εσωτερικό τους απελευθερώνονταν στο περιβάλλον. Αυτό πιθανά οφειλόταν είτε σε μηχανική ρήξη της μεμβράνης των κύστεων, είτε στη δράση κυττάρων του ανοσοποιητικού με σκοπό την αντιμετώπιση των εισβολέων παθογόνων, ή ακόμα στην ωρίμανση της κύστης με την απελευθέρωση των μολυσματικών βακτηρίων στο περιβάλλον. Τέλος, συχνά παρατηρούνταν περιοχές του ιστού με φλεγμονή στις οποίες πιθανά να προϋπήρχαν κύστεις (**Εικόνα 12**).



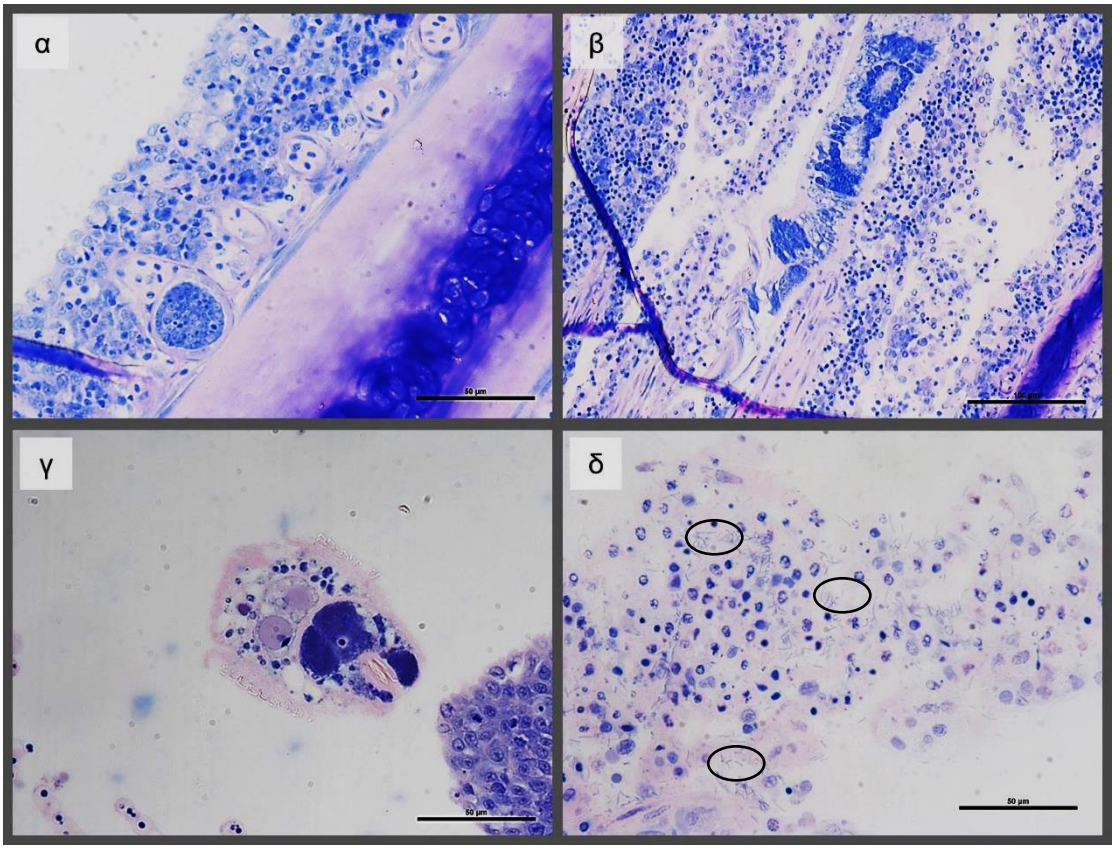
Εικόνα 12: Ιστολογικές τομές βραγχίων με επιθηλιοκύστη. α) Δευτερογενή ελάσματα βραγχίου τσιπούρας με έντονο πρόβλημα. Υπάρχουν πολλές κύστεις διαφορετικών μεγεθών και σχημάτων. Οι σκούρες διαγώνιες γραμμές είναι artifacts (κλίμακα: 100μm). β) Μεγάλη κύστη με πυκνό λεπτόκοκκο περιεχόμενο. Περιφερειακά της κύστης παρατηρείται υπερπλασία του επιθηλιακού ιστού με στιβάδες πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων (squamus metaplasia) (κλίμακα: 50μm). γ) Μεγάλη, διερρηγμένη, κύστη που έχει αποκοπεί από τα βράγχια. Τα βακτήρια έχουν αρχίσει να απελευθερώνονται στο περιβάλλον (κλίμακα: 50μm). δ) τμήμα δευτερογενούς βραγχιακού ελάσματος με κύστεις. Παρατηρούνται αλλοιώσεις του ιστού που πιθανά να οφείλονται σε κακή συντήρηση ωστόσο στις περιοχές που υποδεικνύονται με μαύρα βέλη είναι πιθανό η αλλοίωση να έχει προκληθεί από κύστεις που προϋπήρχαν στα σημεία και έχουν «εξουδετερωθεί» από τον οργανισμό (κλίμακα: 100μm) .

Η ένταση του προβλήματος διέφερε από δείγμα σε δείγμα και μεταξύ των 3 διαφορετικών ειδών. Στα δείγματα από τσιπούρες καταγράφηκε ο μεγαλύτερος αριθμός κύστεων και στα δείγματα από μαγιάτικα ο μικρότερος (**Πίνακας 15**)

Πίνακας 15: Αριθμός κύστεων, αριθμός δειγμάτων και μέσος όρος κύστεων ανά δείγμα για τα 3 είδη ψαριών και συνολικά.

	Τσιπούρα	Λαβράκι	Μαγιάτικο	Σύνολο
Αριθμός κύστεων	568	59	18	645
Αριθμός δειγμάτων	20	3	9	32
Μέσος όρος κύστεις/δείγμα	28.4	19.7	2	20.2

Στους ιστούς που εξετάστηκαν, εκτός από την επιθηλιοκύστη αναγνωρίστηκαν και άλλες παρασιτικές και βακτηριακές μολύνσεις. Συγκεκριμένα, στα δείγματα από τσιπούρα αναγνωρίστηκαν: το παράσιτο *Furnestinia echeneis* που ανήκει στα Μονογενή και είναι ειδοειδικό παράσιτο στην τσιπούρα, αυγά από το Διγενές *Cardicola aurata* και βακτηριακές μολύνσεις κυρίως από μυξοβακτήρια. Στα δείγματα από λαβράκια αναγνωρίστηκαν: το παράσιτο *Diplectanum aequans* που ανήκει στα Μονογενή και είναι ειδοειδικό παράσιτο στο λαβράκι, το κωπήποδο *Lernanthropus kroyeri* που επίσης είναι ειδοειδικό παράσιτο καθώς και βακτηριακές μολύνσεις από Μυξοβακτήρια. Τέλος, στα δείγματα από μαγιάτικα αναγνωρίστηκε το Μονογενές *Zeuxapta seriolae* που είναι ειδοειδικό παράσιτο των βραγχίων στο μαγιάτικο (**Εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Φωτογραφίες των παρασίτων και των βακτηριών που παρατηρήθηκαν στους ιστούς που εξετάστηκαν. α) Φωτογραφία από αυγό του διγενούς *Cardicola aurata* σε δείγμα από τσιπούρα. Η έντονη μπλε γραμμή κάτω αριστερά στη φωτογραφία είναι artifact (κλίμακα: 50μm). β) Φωτογραφία του μονογενούς παρασίτου *Furnestinia echeneis* σε δείγμα από τσιπούρα (κλίμακα: 100μm). γ) Φωτογραφία του μονογενούς παρασίτου *Diplectanum aequans* σε δείγμα από λαβράκι (κλίμακα: 50μm). δ) Φωτογραφία από Μυξοβακτήρια σε δείγμα από τσιπούρα που υποδεικνύονται με ελλειψοειδές πλαίσιο (κλίμακα: 50μm).

3.6 Μορφομετρια κυστεων

Από τα μονιμοποιημένα παρασκευάσματα των ιστολογικών τομών ελήφθησαν συνολικά 392 φωτογραφίες κύστεων και βραγχίων εκτός από τις τομές των δειγμάτων SOUDA 2, SOUDA 6 και SOUDA8 όπου δε βρέθηκε καμία κύστη. Στο σύνολο των 32 δειγμάτων μετρήθηκαν 645 κύστεις. Στο δείγμα με κωδικό *, που αντιστοιχεί σε τσιπούρα από την περιοχή της Αργολίδας, μετρήθηκαν οι περισσότερες κύστεις και συγκεκριμένα 124, ενώ στο δείγμα SOUDA 4, που αντιστοιχεί σε μαγιάτικο από την περιοχή της Σούδας, μετρήθηκε μόλις 1 κύστη.

Για το σύνολο των κύστεων έγιναν μετρήσεις της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του μήκους που περιγράφονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16: Μέσος όρος, τυπική απόκλιση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους του συνόλου των 645 κύστεων.

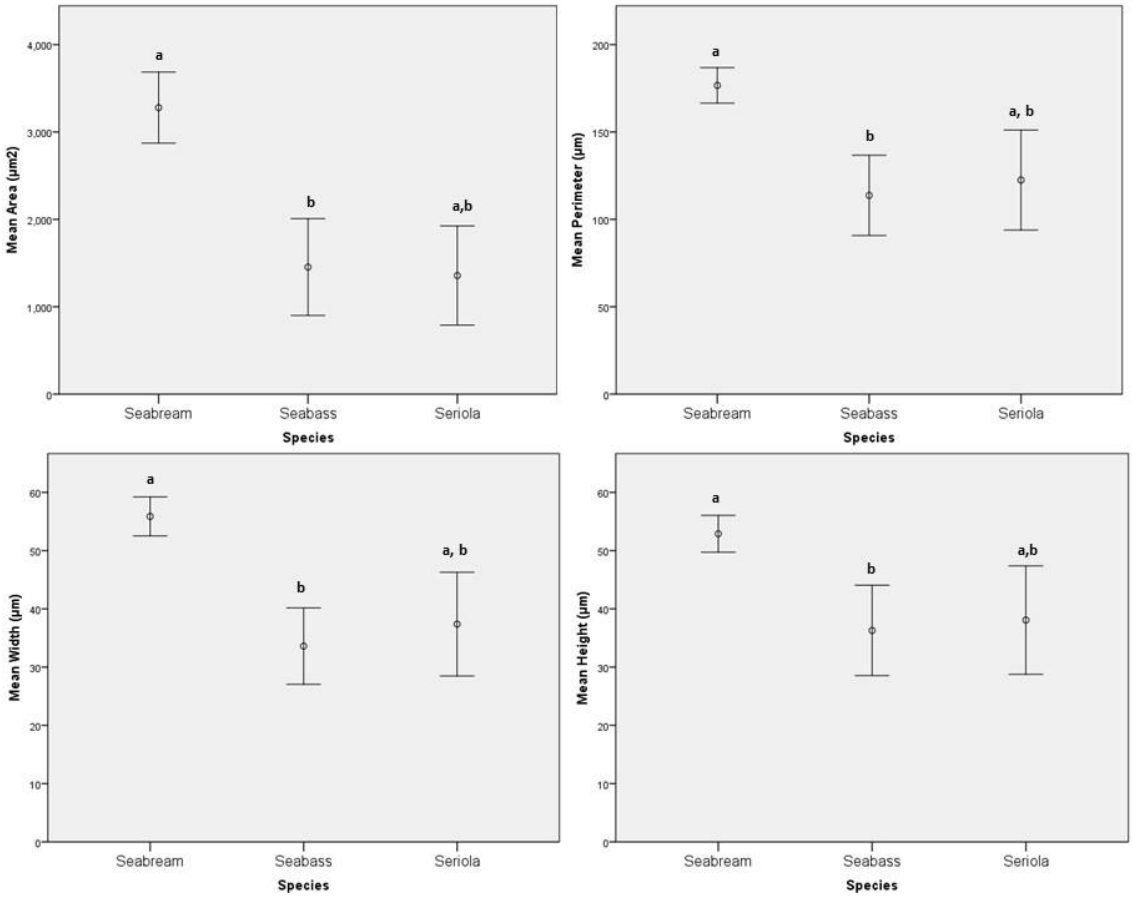
	Επιφάνεια (μm^2)	Περίμετρος (μm)	Πλάτος (μm)	Ύψος (μm)
Μέσος όρος	3058.3	169.4	53.3	51
Τυπική απόκλιση	4635.1	119	38.8	37
Ελάχιστο	46.1	25.7	7	7.6
Μέγιστο	41379	735.3	232.6	241.3

3.7 Μορφομετρια κυστεων ανα ειδος ψαριου

Στον Πίνακα 17 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους των κύστεων για τα τρία είδη ψαριών. Από την ανάλυση των διασπορών (ANOVA) προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) των μέσων τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους και στα 3 είδη.

Πίνακας 17: Μέσοι όροι, αριθμός μετρήσεων, τυπικό σφάλμα, τυπική απόκλιση, ελάχιστη και μέγιστη τιμή της επιφάνεια, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για τα τρία διαφορετικά είδη, τσιπούρα, λαβράκι και μαγιάτικο.

Species		Area	Perimeter	Width	Height
Seabream	Mean	3278.8571	176.6683	55.8705	52.8936
	N	568	568	568	568
	Std. Error of Mean	203.34646	5.09303	1.66961	1.58138
	Std. Deviation	4846.30546	121.38089	39.79133	37.68867
	Minimum	55.55	27.62	6.96	8.15
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26
Seabass	Mean	1453.8086	113.7347	33.6120	36.2971
	N	59	59	59	59
	Std. Error of Mean	277.06416	11.48914	3.28254	3.87992
	Std. Deviation	2128.17020	88.24977	25.21370	29.80227
	Minimum	46.09	25.70	6.98	7.61
	Maximum	8698.55	386.93	107.30	141.08
Seriola	Mean	1356.7172	122.5100	37.3811	38.0800
	N	18	18	18	18
	Std. Error of Mean	283.78615	14.29427	4.45514	4.64952
	Std. Deviation	1204.00268	60.64544	18.90154	19.72624
	Minimum	99.31	37.19	10.60	11.41
	Maximum	4076.80	234.46	71.62	74.60



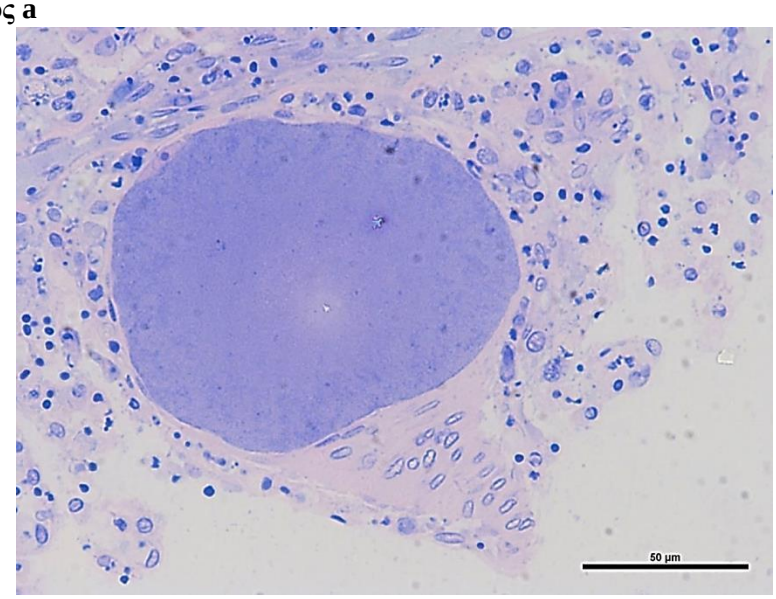
Εικόνα 14: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε είδος ψαριού. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

Από το σύνολο των κύστεων που παρατηρήθηκαν φαίνεται να προκύπτουν 4 βασικοί τύποι που ονομάστηκαν a, b, c και d. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 18, οι περισσότερες κύστεις χαρακτηρίστηκαν ως τύπου a και ακολουθεί ο τύπος c, ενώ στον τύπο d εντάχθηκαν μόλις 2 κύστεις.

Πίνακας 18: Καταγεγραμμένος αριθμός κύστεων ανά τύπο και συνολικός αριθμός

	Τύπος a	Τύπος b	Τύπος c	Τύπος d	Σύνολο
Αριθμός κύστεων	455	36	152	2	645

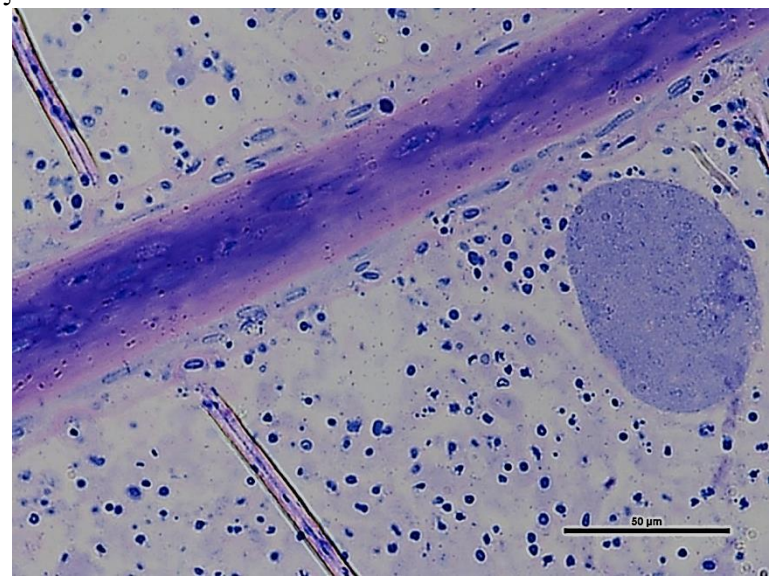
3.7.1 Τύπος a



Εικόνα 15: Κύστη τύπου a. Χαρακτηρίζεται από πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο ενώ εξωτερικά, στο κάτω μέρος της κύστης, παρατηρείται υπερπλασία του ιστού (κλίμακα: 50μm).

Ως τύπος a χαρακτηρίστηκαν οι κύστεις με βασοφιλικό, λεπτά κοκκώδες και πολύ πυκνό περιεχόμενο που περιβάλλονται από μια πολύ λεπτή μεμβράνη. Κύστεις τέτοιου τύπου, στις περισσότερες περιπτώσεις, δημιουργούν φλεγμονώδη αντίδραση με υπερπλασία των γύρω κυττάρων του επιθηλίου και συσσώρευση κυττάρων του ανοσοποιητικού όπως μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα.

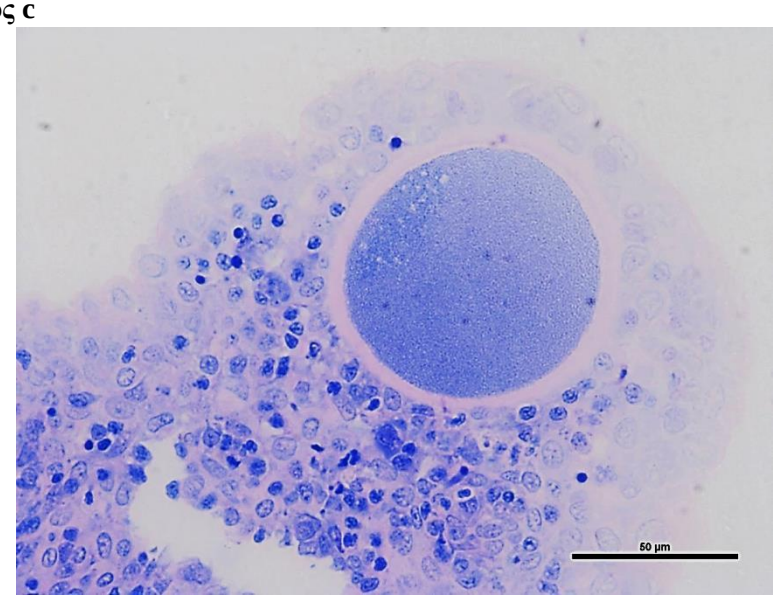
3.7.2 Τύπος b



Εικόνα 16: Κύστη τύπου b. Χαρακτηρίζεται από χοντρόκοκκο περιεχόμενο. Δεν παρατηρείται υπερπλασία του ιστού ή φλεγμονή. Οι κάθετες γραμμές στο αριστερό τμήμα της φωτογραφίας είναι artifact (κλίμακα: 50μm).

Ως τύπος b χαρακτηρίστηκαν οι κύστεις με έντονα βασεόφιλο περιεχόμενο. Το εσωτερικό τους ήταν έντονα χοντρό κοκκώδες με τα βακτήρια να είναι σχεδόν διακριτά αφού είναι και μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά στις κύστεις τύπου a και όχι τόσο πυκνά. Οι κύστεις τύπου b συνήθως περιβάλλονται από μια πολύ λεπτή μεμβράνη, ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις που η μεμβράνη δεν είναι καθόλου εμφανής. Τέτοιου τύπου κύστεις δε δημιουργούν σχεδόν ποτέ έντονη φλεγμονώδη αντίδραση, ωστόσο, συχνά φαίνονται στην περιφέρεια τους κύτταρα του ανοσοποιητικού.

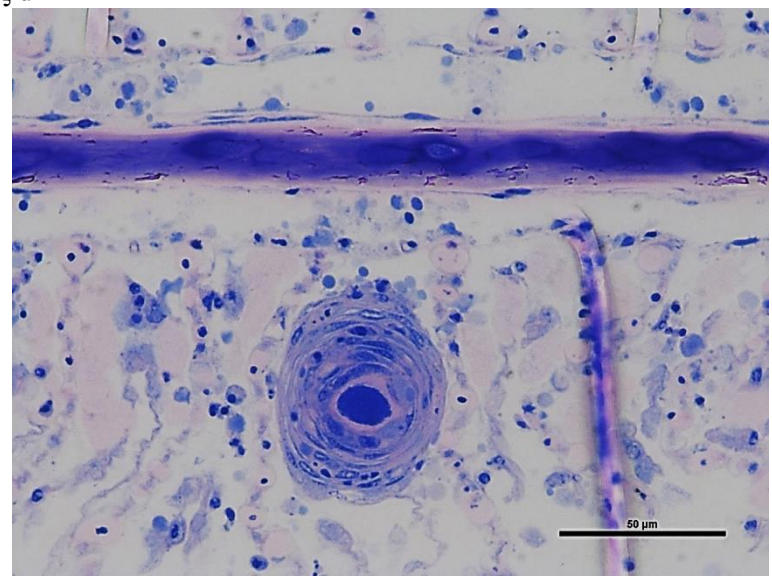
3.7.3 Τύπος c



Εικόνα 17: Κύστη τύπου c. Χαρακτηρίζεται από χοντρόκοκκο περιεχόμενο και η διάταξη των βακτηρίων είναι αραιότερη σε σχέση με τις κύστεις τύπου a. Ούτε εδώ παρατηρείται υπερπλασία του ιστού ή φλεγμονή, αντίθετα περιφερειακά της κύστης σχηματίζεται μια ροζ δομή από τον ιστό (δακτυλίδι). Η κλίμακα ορίζεται στα 50μm.

Ως τύπος c χαρακτηρίστηκαν οι κύστεις που έχουν ίδια χαρακτηριστικά με τις τύπου b εκτός από ένα. Γύρω από τη μεμβράνη που περιβάλει το εσωτερικό τους δημιουργείται από τον ιστό μια δομή περιφερειακά που μοιάζει με δακτυλίδι και πιθανότατα δημιουργείται από σταγονίδια βλέννας (Molnar & Boros ,1981).

3.7.4 Τύπος d



Εικόνα 18: Κύστη τύπου d. Χαρακτηρίζεται από πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο όπως αυτό των κύστεων τύπου a. Περιφερειακά της κύστης σχηματίζεται δακτυλίδι και περιφερειακά του δακτυλιδιού παρατηρείται στιβάδα πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων (squamus metaplasia). Η κάθετη γραμμή δεξιά της κύστης είναι artifact (κλίμακα στα 50μm).

Αντίστοιχα, ως τύπος d χαρακτηρίστηκαν οι κύστεις που τα χαρακτηριστικά τους είναι ίδια με τις τύπου a και εμφανίζουν το δακτυλίδι.

Πίνακας 19: Κατηγοριοποίηση των τεσσάρων τύπων κύστεων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα την υφή του περιεχομένου τους και το αν σχηματίζεται δακτυλίδι στην περιφέρειά τους.

Περιεχόμενο κύστης / Δακτυλίδι	Λεπτόκοκκο	Χοντρόκοκκο
Όχι	a	b
Ναι	d	c

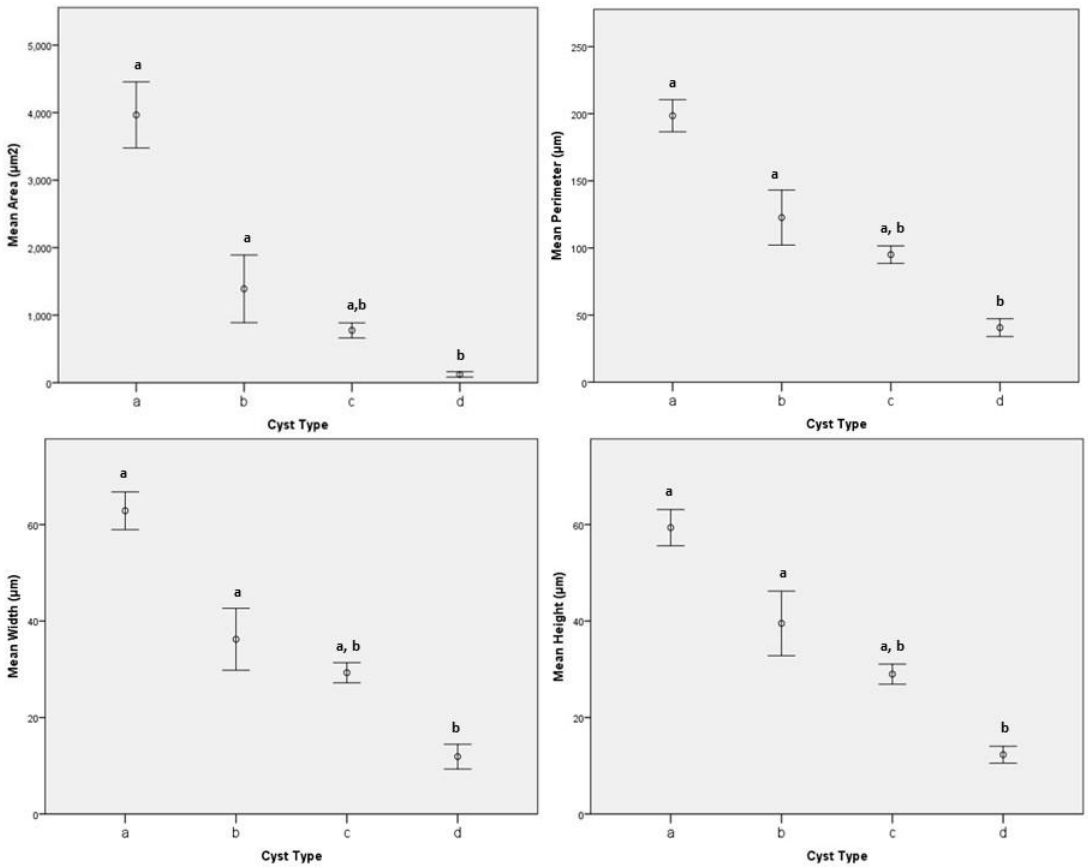
3.7.5 Μορφομετρία των κύστεων ανά τύπο

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους των κύστεων για τους 4 διαφορετικούς τύπους. Ο τύπος a έχει τις μεγαλύτερες τιμές για όλες τις μετρήσεις ενώ ο d έχει τις χαμηλότερες. Ωστόσο, από το σύνολο των κύστεων που μετρήθηκαν μόλις 2 κύστεις αναγνωρίστηκαν ως d. Από την ανάλυση διασποράς (ANOVA) προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) των μέσων

τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους μεταξύ των 4 τύπων κύστεων .

Πίνακας 20: Μετρικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων κύστεων

Type		Area	Perimeter	Width	Height
a	Mean	3966.0090	198.5056	62.8785	59.3743
	N	455	455	455	455
	Std. Error of Mean	245.01241	5.98787	1.95624	1.87868
	Std. Deviation	5226.29323	127.72553	41.72809	40.07365
	Minimum	46.09	25.70	6.98	7.61
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26
b	Mean	1389.9508	122.6019	36.2244	39.5089
	N	36	36	36	36
	Std. Error of Mean	250.35044	10.23450	3.20876	3.34801
	Std. Deviation	1502.10266	61.40702	19.25258	20.08805
	Minimum	49.35	25.70	7.32	8.62
	Maximum	8051.17	321.49	98.91	103.37
c	Mean	774.8004	95.0536	29.2953	29.0023
	N	152	152	152	152
	Std. Error of Mean	55.77663	3.26270	1.04646	1.04153
	Std. Deviation	687.66051	40.22522	12.90164	12.84085
	Minimum	55.55	27.62	6.96	8.15
	Maximum	4576.20	250.00	78.88	75.94
d	Mean	122.2300	40.6150	11.8850	12.2900
	N	2	2	2	2
	Std. Error of Mean	19.94000	3.30500	1.28500	.88000
	Std. Deviation	28.19942	4.67398	1.81726	1.24451
	Minimum	102.29	37.31	10.60	11.41
	Maximum	142.17	43.92	13.17	13.17



Εικόνα 19: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

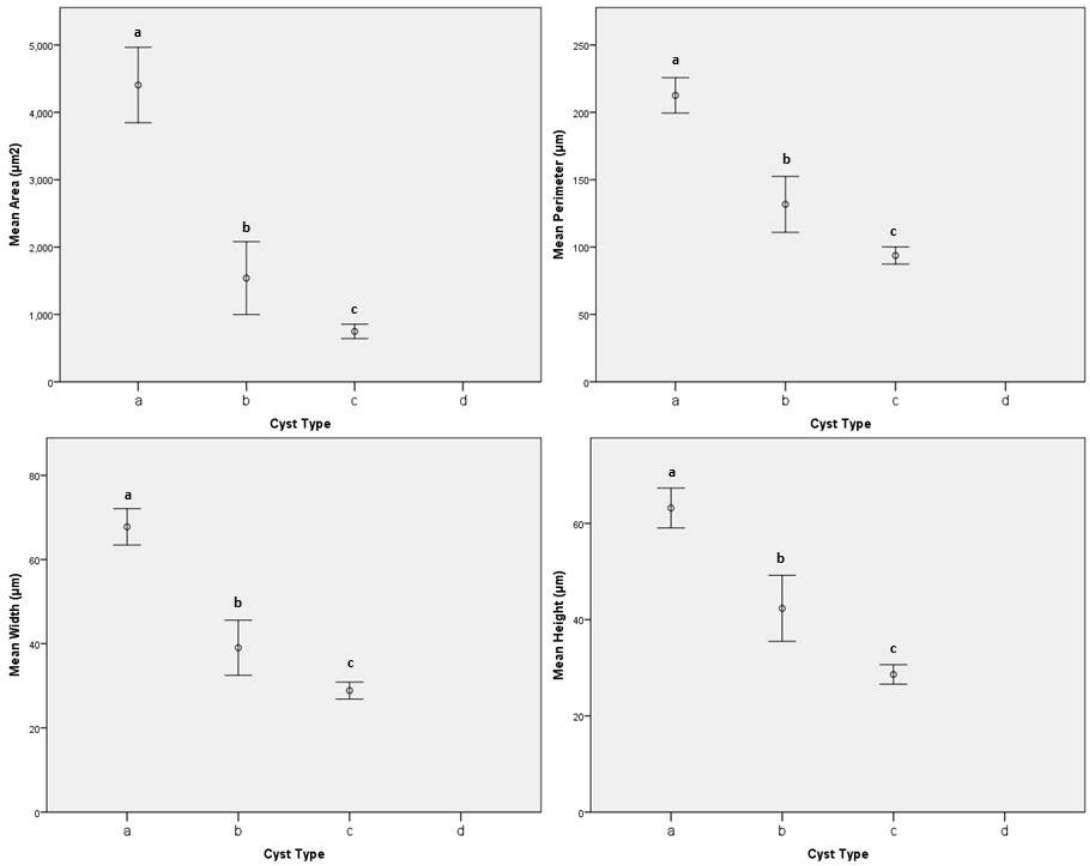
Θέλοντας να εξετάσουμε εάν το είδος του ψαριού επηρεάζει τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά των 4 τύπων κύστεων πραγματοποιήθηκε ανάλυση για κάθε είδος χωριστά.

3.7.6 Τσιπούρα

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους των κύστεων. Σε δείγματα που προήλθαν από τσιπούρες αναγνωρίστηκαν 3 από τους 4 τύπους, οι a, b και c. Σε τσιπούρες, οι κύστεις τύπου a έχουν τις μεγαλύτερες τιμές για όλες τις μετρήσεις ενώ οι κύστεις τύπου b και c ακολουθούν . Από την ανάλυση των διασπορών (ANOVA) προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) των μέσων τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους μεταξύ των 3 τύπων κύστεων .

Πίνακας 21: Μετρικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τύπων κύστεων που απομονώθηκαν από δείγματα βραγχίων τσιπούρας.

Type		Area	Perimeter	Width	Height
a	Mean	4406.5158	212.6064	67.7615	63.2027
	N	386	386	386	386
	Std. Error of Mean	279.78234	6.57646	2.15655	2.07127
	Std. Deviation	5496.85081	129.20701	42.36943	40.69397
	Minimum	90.16	35.19	9.52	8.33
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26
b	Mean	1538.8781	131.7281	39.0466	42.3522
	N	32	32	32	32
	Std. Error of Mean	270.42934	10.39091	3.27277	3.42980
	Std. Deviation	1529.77937	58.77985	18.51356	19.40190
	Minimum	87.63	34.47	11.50	9.15
	Maximum	8051.17	321.49	98.91	103.37
c	Mean	748.2107	93.7748	28.8601	28.6137
	N	150	150	150	150
	Std. Error of Mean	53.14791	3.17610	1.01276	1.01777
	Std. Deviation	650.92625	38.89915	12.40368	12.46513
	Minimum	55.55	27.62	6.96	8.15
	Maximum	4576.20	250.00	78.88	75.94
Total	Mean	3278.8571	176.6683	55.8705	52.8936
	N	568	568	568	568
	Std. Error of Mean	203.34646	5.09303	1.66961	1.58138
	Std. Deviation	4846.30546	121.38089	39.79133	37.68867
	Minimum	55.55	27.62	6.96	8.15
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26



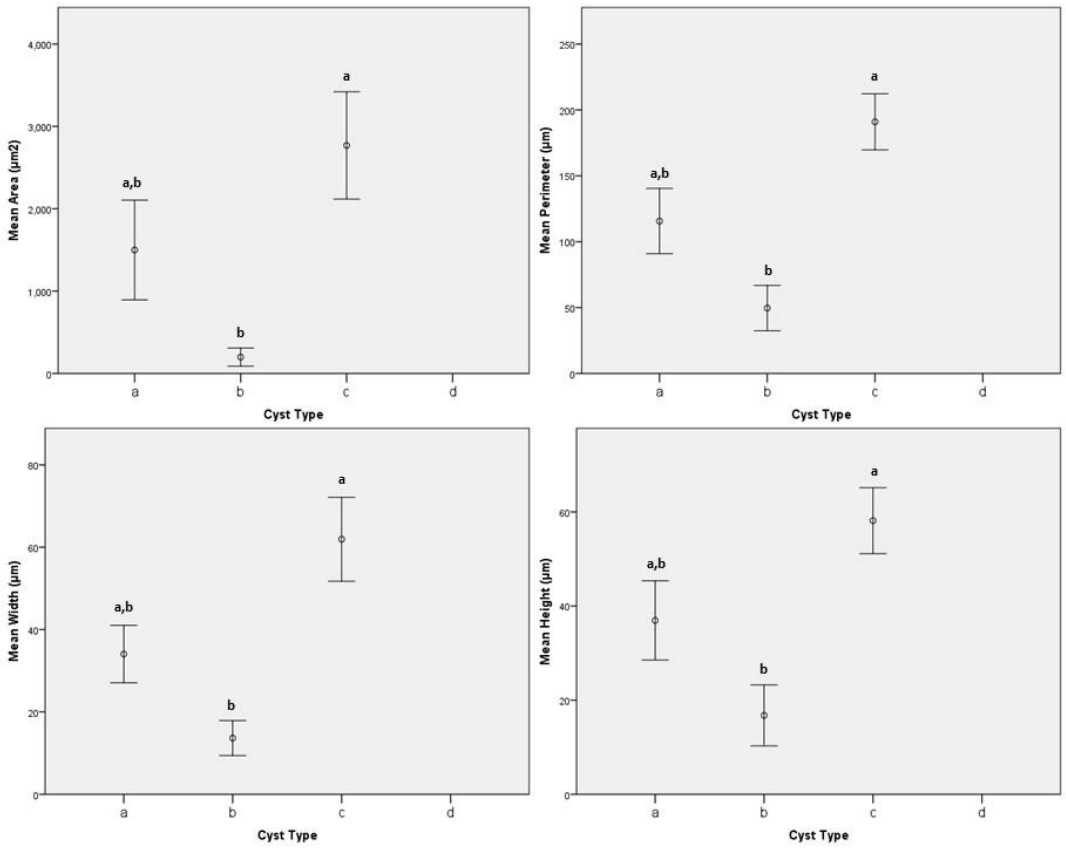
Εικόνα 20: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης για τα δείγματα από τσιπούρες. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

3.7.7 Λαβράκι

Στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους των κύστεων. Σε δείγματα που προέρχονται από λαβράκια αναγνωρίστηκαν 3 από τους 4 τύπους, οι a, b και c. Στα λαβράκια, οι κύστεις τύπου c έχουν τις μεγαλύτερες τιμές για όλες τις μετρήσεις ενώ οι κύστεις τύπου b έχουν τις μικρότερες. Ωστόσο ο αριθμός των κύστεων που αναγνωρίστηκαν ως τύπος b και c στο συγκεκριμένο είδος ψαριού είναι πολύ μικρός, με 4 και 2 κύστεις αντίστοιχα. Από την ανάλυση των διασπορών (ANOVA) προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) των μέσων τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους μεταξύ των 3 τύπων κύστεων .

Πίνακας 22: Μετρικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων κύστεων που απομονώθηκαν από δείγματα βραγχίων λαβρακιού.

Type		Area	Perimeter	Width	Height
a	Mean	1498.9157	115.6613	34.0502	36.9468
	N	53	53	53	53
	Std. Error of Mean	302.72661	12.37435	3.48946	4.21053
	Std. Deviation	2203.88298	90.08661	25.40364	30.65310
	Minimum	46.09	25.70	6.98	7.61
	Maximum	8698.55	386.93	107.30	141.08
b	Mean	198.5325	49.5925	13.6475	16.7625
	N	4	4	4	4
	Std. Error of Mean	55.00943	8.58714	2.12376	3.23781
	Std. Deviation	110.01886	17.17429	4.24751	6.47563
	Minimum	49.35	25.70	7.32	8.62
	Maximum	314.76	66.63	16.45	24.47
c	Mean	2769.0250	190.9650	61.9300	58.1500
	N	2	2	2	2
	Std. Error of Mean	325.93500	10.64500	5.10000	3.51000
	Std. Deviation	460.94170	15.05430	7.21249	4.96389
	Minimum	2443.09	180.32	56.83	54.64
	Maximum	3094.96	201.61	67.03	61.66
Total	Mean	1453.8086	113.7347	33.6120	36.2971
	N	59	59	59	59
	Std. Error of Mean	277.06416	11.48914	3.28254	3.87992
	Std. Deviation	2128.17020	88.24977	25.21370	29.80227
	Minimum	46.09	25.70	6.98	7.61
	Maximum	8698.55	386.93	107.30	141.08



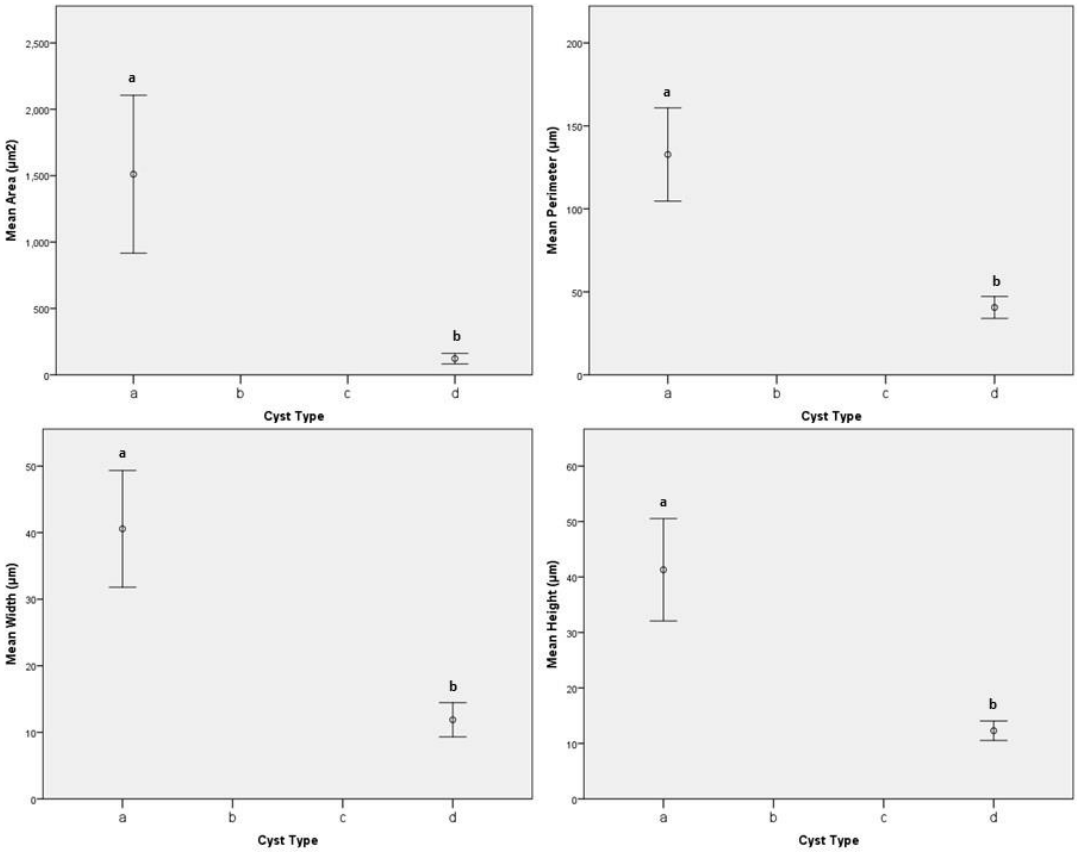
Εικόνα 21: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης για τα δείγματα από λαβράκια. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05).

3.7.8 Μαγιάτικο

Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους των κύστεων. Σε δείγματα που προέρχονται από μαγιάτικα αναγνωρίστηκαν 2 από τους 4 τύπους, οι a και d. Στα μαγιάτικα, οι κύστεις τύπου a έχουν τις μεγαλύτερες τιμές για όλες τις μετρήσεις ενώ οι τύπου d έχουν μικρότερες. Ο συνολικός αριθμός των κύστεων που μετρήθηκαν σε βράγχια μαγιάτικων ήταν 18 ενώ ως d αναγνωρίστηκαν μόλις 2 κύστεις. Από την ανάλυση ανεξάρτητων δειγμάτων (t-test) με ομοιογένεια διασπορών προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0.05) των μέσων τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους μεταξύ των 2 τύπων.

Πίνακας 23: Μετρικά χαρακτηριστικά διαφόρων τύπων κύστεων που απομονώθηκαν από δείγματα βραγχίων μαγιάτικου.

Type		Area	Perimeter	Width	Height
a	Mean	1511.0281	132.7469	40.5681	41.3038
	N	16	16	16	16
	Std. Error of Mean	297.30652	14.05520	4.38161	4.61747
	Std. Deviation	1189.22606	56.22079	17.52644	18.46986
	Minimum	99.31	37.19	11.17	11.80
	Maximum	4076.80	234.46	71.62	74.60
d	Mean	122.2300	40.6150	11.8850	12.2900
	N	2	2	2	2
	Std. Error of Mean	19.94000	3.30500	1.28500	.88000
	Std. Deviation	28.19942	4.67398	1.81726	1.24451
	Minimum	102.29	37.31	10.60	11.41
	Maximum	142.17	43.92	13.17	13.17
Total	Mean	1356.7172	122.5100	37.3811	38.0800
	N	18	18	18	18
	Std. Error of Mean	283.78615	14.29427	4.45514	4.64952
	Std. Deviation	1204.00268	60.64544	18.90154	19.72624
	Minimum	99.31	37.19	10.60	11.41
	Maximum	4076.80	234.46	71.62	74.60



Εικόνα 22: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για κάθε τύπο κύστης για τα δείγματα

από μαγιάτικα. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

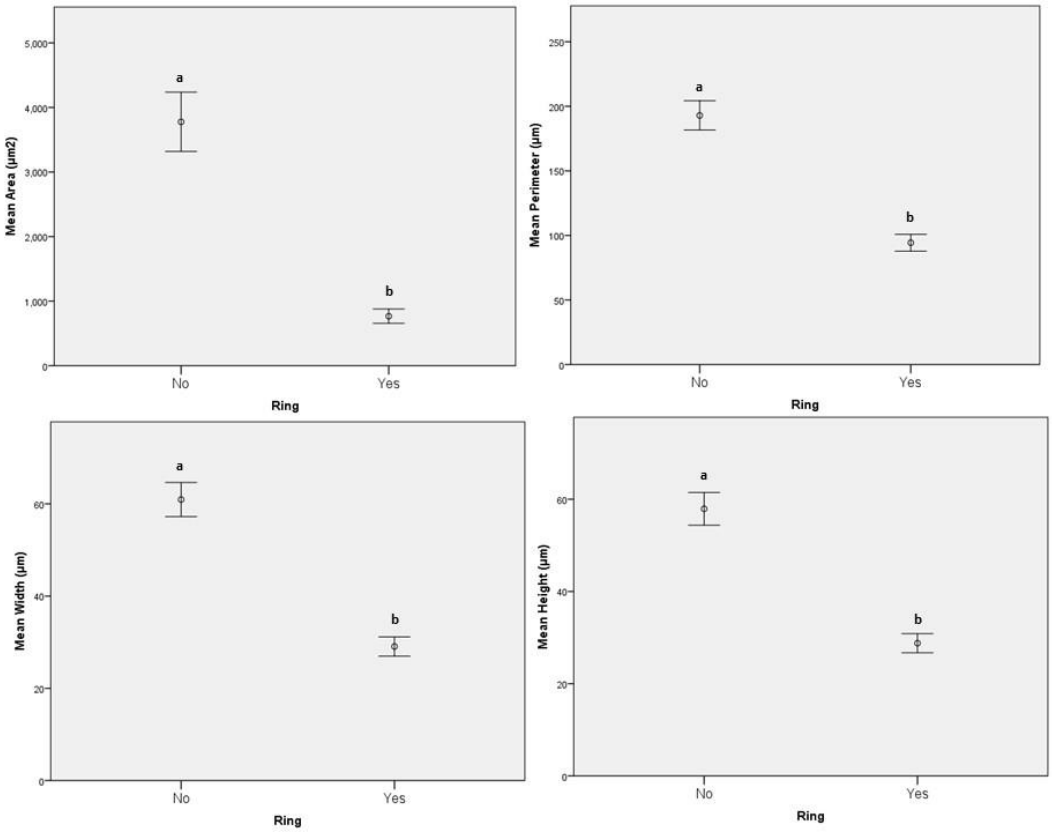
Ο προσδιορισμός των 4 τύπων έγινε βάσει δύο παραμέτρων, την ύπαρξη ή μη δακτυλιδιού περιφερειακά της κύστης και αν το περιεχόμενό τους ήταν λεπτόκοκκο ή χοντρόκοκκο. Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, επιμέρους ανάλυση των δεδομένων λαμβάνοντας υπόψη την κάθε παράμετρο χωριστά. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι μετρήσεις των κύστεων με ή χωρίς δακτυλίδι ανεξάρτητα από το περιεχόμενό τους και στη συνέχεια αναλύθηκαν οι μετρήσεις των λεπτόκοκκων κύστεων και χοντρόκοκκων ανεξάρτητα με το αν είχαν δακτυλίδι.

3.7.9 Μορφομετρία κύστεων με την παράμετρο του δακτυλιδιού

Στον Πίνακα 24 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους των κύστεων με δακτυλίδι και χωρίς. Οι κύστεις χωρίς δακτυλίδι είχαν τις μεγαλύτερες τιμές για όλες τις μετρήσεις ενώ οι κύστεις με δακτυλίδι είχαν τις χαμηλότερες. Από την ανάλυση ανεξάρτητων δειγμάτων (t-test) χωρίς ομοιογένεια διασπορών προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) των μέσων τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους.

Πίνακας 24: Μετρικά χαρακτηριστικά κύστεων χωρίς και με δακτυλίδι.

Ring		Area	Perimeter	Width	Height
No	Mean	3777.1330	192.9404	60.9242	57.9177
	N	491	491	491	491
	Std. Error of Mean	229.76280	5.66851	1.85424	1.77308
	Std. Deviation	5091.20362	125.60589	41.08711	39.28873
	Minimum	46.09	25.70	6.98	7.61
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26
Yes	Mean	766.3255	94.3466	29.0692	28.7853
	N	154	154	154	154
	Std. Error of Mean	55.37330	3.25865	1.04512	1.03931
	Std. Deviation	687.16456	40.43880	12.96954	12.89751
	Minimum	55.55	27.62	6.96	8.15
	Maximum	4576.20	250.00	78.88	75.94
Total	Mean	3058.2736	169.4002	53.3185	50.9621
	N	645	645	645	645
	Std. Error of Mean	182.50768	4.68581	1.52963	1.45661
	Std. Deviation	4635.12014	119.00482	38.84771	36.99318
	Minimum	46.09	25.70	6.96	7.61
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26



Εικόνα 23: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για τις κύστεις χωρίς δακτυλίδι και για

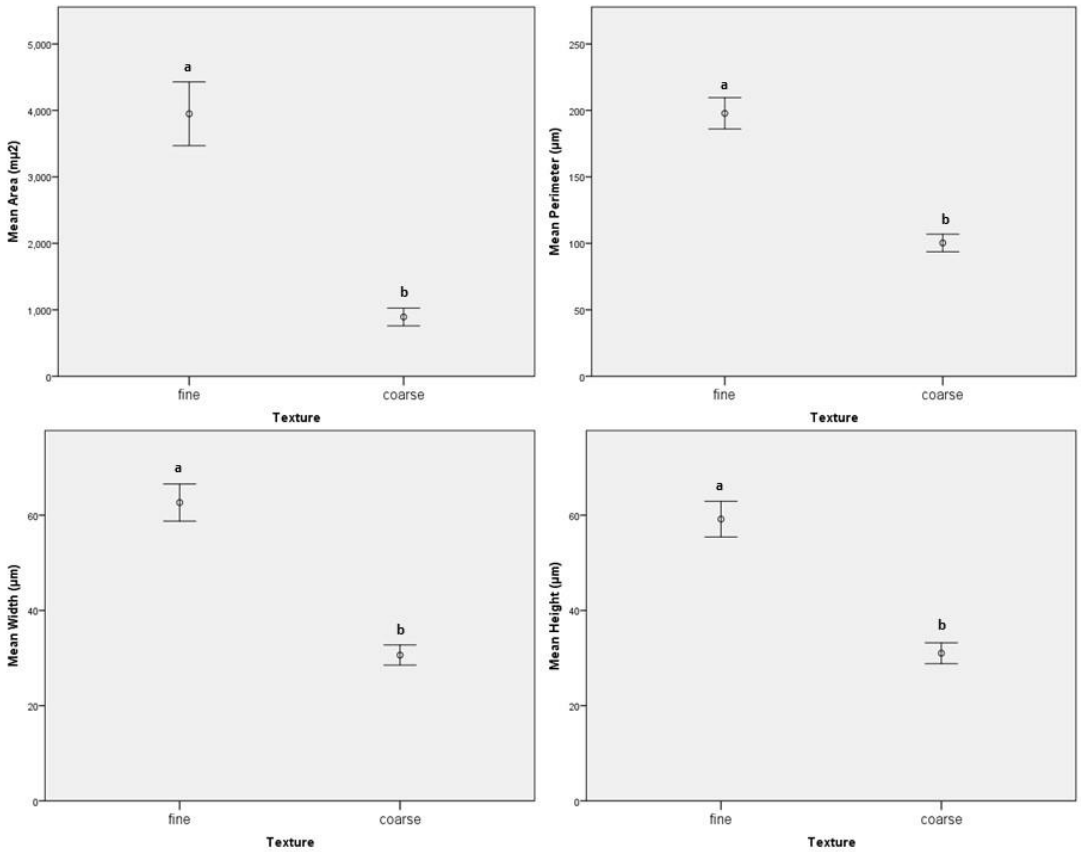
τις κύστεις με δακτυλίδι. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$).

3.7.10 Μορφομετρία των κύστεων σε σχέση με την υφή του περιεχομένου

Στον Πίνακα 25 παρουσιάζονται τα μετρικά αποτελέσματα των κύστεων με λεπτόκοκκο και με χοντρόκοκκο περιεχόμενο. Οι κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο είχαν τις μεγαλύτερες τιμές για όλες τις μετρήσεις ενώ οι κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο είχαν τις μικρότερες. Από την ανάλυση ανεξάρτητων δειγμάτων (t-test) χωρίς ομοιογένεια διασπορών προκύπτει ότι εντοπίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p<0.05$) των μέσων τιμών της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και τους ύψους.

Πίνακας 25: Μετρικά χαρακτηριστικά των κύστεων με λεπτόκοκκο (fine) και των κύστεων με χοντρόκοκκο (coarse) περιεχόμενο.

Texture		Area	Perimeter	Width	Height
fine	Mean	3949.1872	197.8146	62.6553	59.1682
	N	457	457	457	457
	Std. Error of Mean	244.22817	5.98159	1.95404	1.87611
	Std. Deviation	5221.00194	127.87169	41.77271	40.10659
	Minimum	46.09	25.70	6.98	7.61
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26
coarse	Mean	892.5952	100.3288	30.6221	31.0142
	N	188	188	188	188
	Std. Error of Mean	67.75446	3.36634	1.06005	1.09606
	Std. Deviation	929.00242	46.15692	14.53467	15.02841
	Minimum	49.35	25.70	6.96	8.15
	Maximum	8051.17	321.49	98.91	103.37
Total	Mean	3058.2736	169.4002	53.3185	50.9621
	N	645	645	645	645
	Std. Error of Mean	182.50768	4.68581	1.52963	1.45661
	Std. Deviation	4635.12014	119.00482	38.84771	36.99318
	Minimum	46.09	25.70	6.96	7.61
	Maximum	41378.97	735.30	232.61	241.26



Εικόνα 24: Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους των κύστεων για τις κύστεις με λεπτόκοκκο (fine) και τις κύστεις με χοντρόκοκκο (coarse) περιεχόμενο. Τα διαφορετικά γράμματα προσδιορίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p<0,05).

Στον Πίνακα 26 αναφέρονται οι μέσες τιμές της επιφάνειας, της περιμέτρου, του πλάτους και του ύψους του δακτυλιδιού των κύστεων όπου αυτό υπήρχε.

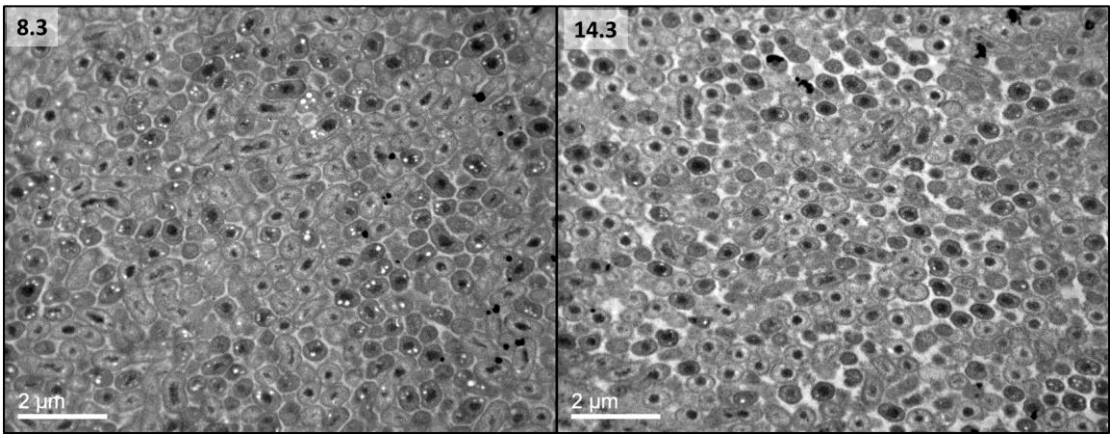
Πίνακας 26: Μετρικά χαρακτηριστικά του δακτυλιδιού των κύστεων.

	Επιφάνεια δακτυλιδιού (μm2)	Περίμετρος δακτυλιδιού (μm)	Πλάτος δακτυλιδιού (μm)	Ύψος δακτυλιδιού (μm)
Μέσος όρος	606.4	131.2	5.7	5.7
Τυπική απόκλιση	578.1	41.7	3.2	3.2
Ελάχιστο	60.2	44.8	0.4	1
Μέγιστο	6907.1	335.7	30	26.8

3.8 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

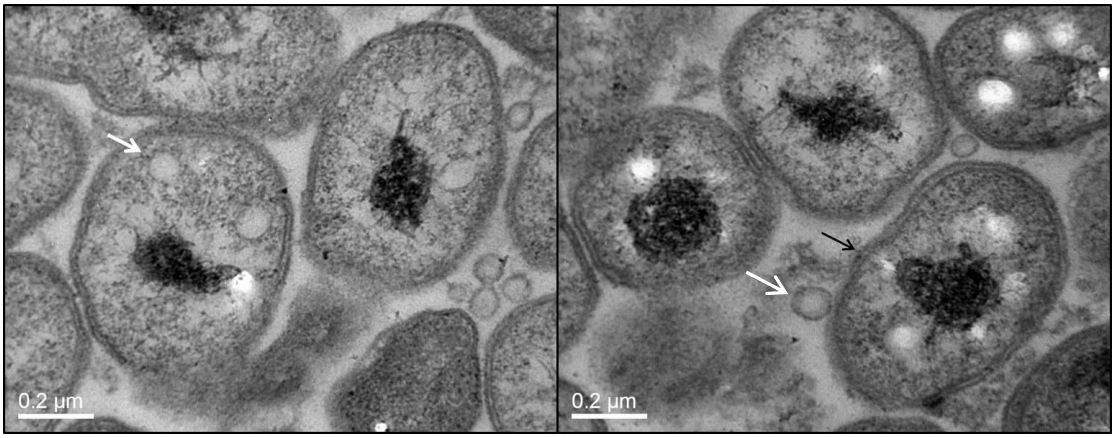
Ηλεκτρονική μικροσκοπία πραγματοποιήθηκε σε δύο δείγματα από τσιπούρα, το ένα από την περιοχή του Αστακού (Κωδικός δείγματος: 8.3) και το άλλο από την περιοχή της Χίου (Κωδικός δείγματος: 14.3). Τα δείγματα παρατηρήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Στις φωτογραφίες που πάρθηκαν απεικονίζεται η δομή και η μορφολογία των βακτηρίων στο εσωτερικό των κύστεων καθώς και η μορφή του περιβάλλοντα ιστού.

Η μορφολογία των βακτηριακών κυττάρων είναι παρόμοια και στα δύο δείγματα. Τα βακτηριακά κύτταρα είναι μικρά και στρογγυλά ή ελλειψοειδή ενώ υπάρχουν και επιμηκυμένα βακτήρια που βρίσκονται σε διαδικασία διχοτόμησης με αυξημένο μέγεθός και διπλασιασμένο (ή στη φάση του διπλασιασμού) πυρηνοειδές. Διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο, έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα συνεχές μωσαϊκό, καλύπτοντας με τον πλέον στοιχισμένο τρόπο το διαθέσιμο χώρο (**Εικόνα 25**).



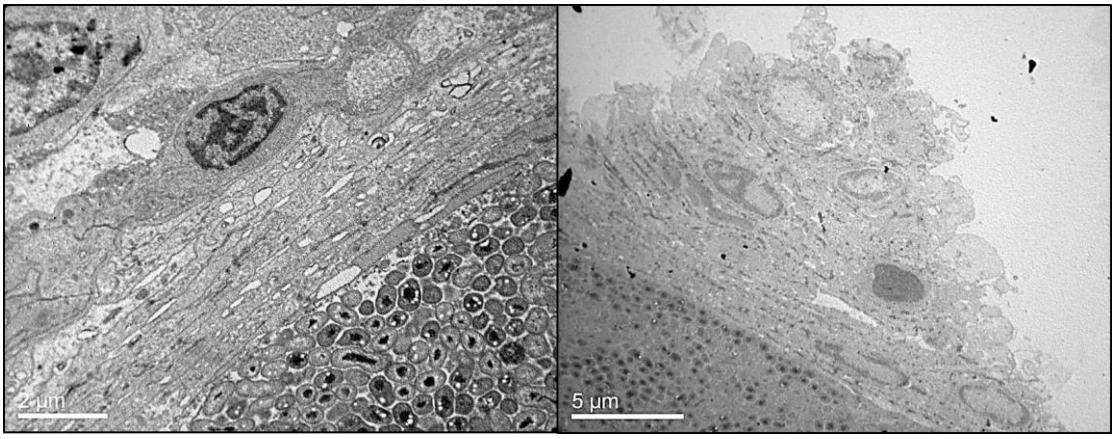
Εικόνα 25: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Φαίνεται η πυκνή και συμπαγής διαμόρφωση των βακτηριακών κυττάρων στο εσωτερικό των κύστεων. Παρατηρούνται κυρίως στρογγυλά ή ελλειψοειδή βακτήρια καθώς και επιμήκη σε διαδικασία διαίρεσης. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 2μm.

Το μήκος τους κυμαίνεται στα 500 nm εκτός από τις περιπτώσεις διαίρεσης του βακτηρίου που το μέγεθος τους μπορεί να ξεπεράσει το 1 μm. Τα βακτήρια περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και στις περισσότερες περιπτώσεις το πυρηνοειδές είναι εμφανές. Συχνά, φέρουν στο εσωτερικό τους έντονα φωτεινές κηλίδες που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε κενοτόπια ή/και σε (artifact). Επίσης, παρατηρούνται ανάμεσα στα βακτήρια και σπανιότερα στο εσωτερικό τους μικρά, σφαιρικά σωματίδια.



Εικόνα 26: Φωτογραφίες από TEM των βακτηρίων της κύστης σε μεγάλη μεγέθυνση. Είναι εμφανής η διπλή μεμβράνη των βακτηρίων (μαύρο βέλος), τα σφαιρικά σωματίδια στο περιβάλλον και στο εσωτερικό των κυττάρων (λευκό βέλος), ενώ τα πυρηνοειδή των κυττάρων είναι οι πυκνές μαύρες δομές (υψηλή πυκνότητα ηλεκτρονίων) στο εσωτερικό τους. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 0.2μm.

Δεν φαίνεται ενιαία μεμβράνη που να περιβάλει το σύνολο των βακτηρίων της κύστης. Αντίθετα, τα βακτήρια φαίνεται να εσωκλείονται από μια στοιβάδα αλληλοσυνδεόμενων επιθηλιακών κυττάρων το πάχος της οποίας μεταβάλλεται περιμετρικά της κύστης (**Εικόνα 27**).



Εικόνα 27: Φωτογραφίες από TEM της άκρης των κύστεων. Στις 2 φωτογραφίες φαίνεται η μεμβράνη που δημιουργείται περιφερειακά από τα επιθηλιακά πλακώδη κύτταρα του ιστού που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμοσώματα και εσωκλείουν τα βακτήρια. Στην κάτω φωτογραφία φαίνονται και κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος του ψαριού να βρίσκονται περιφερειακά της μεμβράνης. Η κλίμακα έχει οριστεί στα 2μm και 5μm στην αριστερή και δεξιά φωτογραφία αντίστοιχα.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιθηλιοκύστη είναι ασθένεια των ψαριών που οφείλεται σε ενδοκυτταρικά, παθογόνα βακτήρια τα οποία δημιουργούν κύστεις στα βράγχια και το δέρμα. Το εντυπωσιακό από βιολογικής, οικολογικής και εξελικτικής σκοπιάς είναι ότι υπάρχουν πολλά διαφορετικά βακτήρια-αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας. Στην Ελλάδα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 4 διαφορετικά βακτήρια που προκαλούν επιθηλιοκύστη τα οποία ανήκουν σε διαφορετικά φύλα και ομοταξίες. Τα *Ca.* Similichlamydia sp. και *Ca.* Parilichlamydia sp. (Φύλο: Chlamydiae, Ομοταξία: Parachlamydiales), το *Ca.* Ichthyocystis sp. (Φύλο: Πρωτεοβακτήρια, Ομοταξία: β-πρωτεοβακτήρια) και το *Ca.* Endozoicomonas cretensis (Φύλο: Πρωτεοβακτήρια, Ομοταξία: γ-πρωτεοβακτήρια). Βάσει όσων προαναφέρθηκαν και σε συνδυασμό με την αύξηση των εξάρσεων της ασθένειας στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια σε ετήσια κλίμακα δημιουργήθηκε η ανάγκη μελέτης της ώστε να γίνει εκτενής περιγραφή της.

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο να εξετάσει την επιθηλιοκύστη στον ελληνικό χώρο χρησιμοποιώντας δείγματα ψαριών με επιβεβαιωμένη την ασθένεια από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας σε διαφορετικές περιοχές για να γίνει εκτίμηση της σοβαρότητας της ασθένειας και πώς αυτή διαμορφώνεται στις διαφορετικές περιοχές. Συγκεκριμένα, στα δείγματα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε:

- μοριακός χαρακτηρισμός των παθογόνων μικροβίων που είναι αιτιολογικοί παράγοντες της ασθένειας και ανάλυση των φυλογενετικών τους σχέσεων με άλλα βακτηριακά είδη
- περιγραφή της παθολογίας των βραγχίων
- περιγραφή της δομής των κύστεων και εκτίμηση των μορφομετρικών τους χαρακτηριστικών
- παρατήρηση και περιγραφή της μορφολογίας των βακτηρίων και της διάταξης τους στο εσωτερικό των κύστεων (TEM).

Τα είδη που εξετάστηκαν ήταν τσιπούρα, λαβράκι και μαγιάτικο.

4.1 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η επιθηλιοκύστη στην Ελλάδα έχει μελετηθεί σε βάθος στην τσιπούρα (Seth-Smith et al., 2016; Vaughan et al., 2017), και στο μυτάκι (Katharios et al., 2015) όπου έχουν ταυτοποιηθεί και τα υπεύθυνα παθογόνα μικρόβια, ενώ έχει γίνει μόνο μία αναφορά στη συναγρίδα (Rigos et al., 1998). Για την τσιπούρα τα παθογόνα μικρόβια είναι είδη του γένους *Ca.* Ichthycystis καθώς και χλαμύδια τα οποία συνυπάρχουν στους μολυσμένους ιστούς ενώ για το μυτάκι είναι το είδος *Ca.* Endozoicomonas cretensis. Για τα υπόλοιπα είδη ψαριών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν αναφερθεί περιστατικά επιθηλιοκύστης χωρίς πάντοτε η διάγνωση να συνοδεύεται με ταυτοποίηση των παθογόνων. Συγκεκριμένα, στο λαβράκι η επιθηλιοκύστη έχει αναφερθεί στην Ισπανία και μάλιστα σε περιστατικό με έντονη μόλυνση. Στην περίπτωση αυτή δεν υπήρξε ταυτοποίηση του παθογόνου (Crespo et al., 2001). Σε ότι αφορά το μαγιάτικο, η επιθηλιοκύστη έχει αναφερθεί στην Ισπανία, το Εκουαδόρ και στην Αυστραλία. Στην Αυστραλία τα περιστατικά αφορούν το είδος *Seriola lalandi* όπου η ασθένεια οφειλόταν στο είδος *Ca.* Parililichlamydia sp. που ανήκει στα χλαμύδια (Stride et al., 2013b), ενώ στην Ισπανία και στο Εκουαδόρ, η ασθένεια

παρατηρήθηκε στα είδη *Seriola dumerili* (Grau & Crespo 1991) και *Seriola lalandi* (Venizelos & Benetti, 1996) αντίστοιχα, χωρίς να γίνει ταυτοποίηση του παθογόνου.

Βακτήρια υπεύθυνα για την εμφάνιση επιθηλιοκύστης σε ψάρια έχουν ταυτοποιηθεί ως είδη που ανήκουν σε διάφορες οικογένειες της τάξης Chlamydiales καθώς δεν περιλαμβάνονται όλα σε ένα κοινό γένος (Stride et al., 2014; Stride, et al. 2013b), στην κλάση των β-πρωτεοβακτηρίων (Toenshoff et al., 2012; Contador et al., 2016; Seth-Smith et al., 2016) και στην κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων, στο γένος *Endozoicomonas* (Katharios et al., 2015; Mendoza et al., 2013).

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των βακτηρίων των δειγμάτων έγινε με γνώμονα τις προϋπάρχουσες μελέτες. Βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca.* Ichthyocystis ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν, από όλες τις περιοχές δειγματοληψίας (Αστακό, Β. Εύβοια, Ν. Εύβοια, Χίο, Αργολίδα, Βόνιτσα, Λάρυμνα και Σούδα) και για τα 3 είδη ψαριών υποδεικνύοντας την ευρεία εξάπλωση του γένους στην Ελλάδα. Από τη φυλογενετική ανάλυση 19 δειγμάτων τμήματος του γονιδίου του 16S rRNA, προέκυψε ότι σε δείγματα από τσιπούρες ταυτοποιούνται βακτήρια του είδους *Ca.* Ichthyocystis sparus και του είδους *Ca.* Ichthyocystis hellenicum με ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών 99-100 % με τις αντίστοιχες αλληλουχίες στελεχών των δύο ειδών, ενώ στα δείγματα από λαβράκι και μαγιάτικα ταυτοποιούνται βακτήρια που παρουσιάζουν τη μέγιστη συγγένεια με στελέχη του *Ca.* Ichthyocystis hellenicum με ποσοστό ομοιότητας αλληλουχιών 96-97%. Το ποσοστό διαφοράς μεταξύ των αλληλουχιών των δειγμάτων από τα μαγιάτικα και το λαβράκι με τις αλληλουχίες των στελεχών του *Ca.* Ichthyocystis hellenicum αποτελεί ένδειξη ύπαρξης διαφορετικού είδους (Yarza et al., 2014) στο γένος *Ca.* Ichthyocystis, ωστόσο για να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να γίνει πλήρης αλληλούχιση του 16S. Αν το αποτέλεσμα επιβεβαιωθεί, τότε επιβεβαιώνεται και η εικασία των Seth-Smith et al. (2016) για την ύπαρξη επιπλέον στελεχών που πιθανά να υπάρχουν και δεν έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα. Επιπλέον, αξιοσημείωτη είναι η ταυτοποίηση βακτηρίων που ανήκουν στο *Ca.* Ichthyocystis σε άλλα είδη, πλην της τσιπούρας. Σύμφωνα με τους Qi et al. (2016) το γένος αυτό είναι ειδοειδικό καθώς από την γονιδιωματική ανάλυση φάνηκε να υπάρχει ένας συμπαγής, σταθερός πυρήνας του γονιδιώματος ο οποίος δεν μεταβάλλεται, προϊόν της απώλειας μεγάλου αριθμού γονιδίων πριν τη διαφοροποίηση του γένους, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη περιορισμένου αριθμού πιθανών ξενιστών σε επίπεδο είδους (Qi et al., 2016). Αυτό δεν επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς το γένος βρέθηκε σε 2 ακόμα μη-συγγενικά με τη τσιπούρα είδη, στο λαβράκι και το μαγιάτικο.

Αναλυτικά, για τα δείγματα από τσιπούρες, ταυτοποιήθηκαν ως *Ca.* Ichthyocystis sparus βακτήρια 4 δειγμάτων από τη Δυτική Ελλάδα (3 από τον Αστακό και ένα από τη Βόνιτσα), ενός δείγματος από την Πελοπόννησο (Αργολίδα) και ενός δείγματος από το Βόρειο Αιγαίο (Χίο) ενώ ως *Ca.* Ichthyocystis hellenicum ταυτοποιήθηκαν βακτήρια ενός δείγματος από τη Δυτική Ελλάδα (Αστακό), ενός δείγματος από την Κεντρική Ελλάδα (Β. Εύβοια) και ενός δείγματος από το Βόρειο Αιγαίο (Χίο). Τα βακτήρια του δείγματος από λαβράκι της Κεντρικής Ελλάδας (Λάρυμνα) και των 9 δειγμάτων από μαγιάτικα της Κρήτης (Σούδα) ταυτοποιήθηκαν ως βακτήρια του γένους *Ca.* Ichthyocystis εμφανίζοντας τη μέγιστη συγγένεια με το *Ca.* Ichthyocystis hellenicum.

Η μοριακή ταυτοποίηση βακτηρίων για την τάξη Chlamydiales έδειξε την παρουσία των βακτηρίων σε 6 από τα 8 δείγματα από την περιοχή του Αστακού, σε όλα τα δείγματα από την περιοχή της Ν. Εύβοιας, σε ένα από τα 4 δείγματα από την περιοχή της Β. Εύβοιας, σε όλα τα δείγματα από την περιοχή της Αργολίδας και της Βόνιτσας και σε κανένα από τα 3 δείγματα της Χίου για τις τσιπούρες. Παρουσία των βακτηρίων ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα από λαβράκια της Λάρυμνας ενώ στα δείγματα από μαγιάτικα της Σούδας δεν ανιχνεύτηκε. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται η κατανομή των εν λόγω παθογόνων να καλύπτει τις περιοχές της Δυτικής και της Κεντρικής Ελλάδας, και περιοχή της Πελοποννήσου ενώ πιθανά να απουσιάζουν από τις περιοχές του Βορείου Αιγαίου και της Κρήτης.

Από τη φυλογενετική ανάλυση 9 δειγμάτων μεγάλου τμήματος του γονιδίου του 16S rRNA προέκυψε ότι σε 5 δείγματα από τσιπούρες και σε 2 δείγματα από λαβράκια ταυτοποιούνται βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca*. Similichlamydia έχοντας ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών με αλληλουχίες στελεχών του γένους 98-100% (Vaughan et al. 2017) ενώ σε 2 δείγματα από τσιπούρες ταυτοποιήθηκαν βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca*. Parilichlamydia έχοντας ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών με αλληλουχίες στελεχών του γένους 98% (Stride, et al. 2013b). Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που ταυτοποιούνται παθογόνα που σχετίζονται με επιθηλιοκύστη σε ψάρια και ανήκουν στο γένος *Ca*. Parilichlamydia στην Ελλάδα καθώς στα δείγματα από τσιπούρες στη μελέτη των Vaughan et al. 2017 ταυτοποιήθηκαν στελέχη που ανήκουν στα γένη *Ca*. Similichlamydia και *Ca*. Piscichlamydia.

Αναλυτικά, τα δείγματα από τσιπούρες στα οποία ταυτοποιήθηκαν βακτήρια που ανήκουν στα *Ca*. Similichlamydia ήταν 2 δείγματα από την περιοχή του Αστακού, 2 δείγματα από την Αργολίδα και 1 δείγμα από τη Βόνιτσα ενώ στο γένος *Ca*. Similichlamydia ανήκουν και τα βακτήρια από τα 2 δείγματα λαβρακιών της Λάρυμνας. Τα 2 δείγματα τσιπούρας στα οποία ταυτοποιήθηκαν βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca*. Parilichlamydia ήταν από την Ν. Εύβοια.

Τα *Ca*. Similichlamydia και τα *Ca*. Parilichlamydia είναι γένη χλαμυδίων που σχετίζονται με την επιθηλιοκύστη στα ψάρια. Για το γένος *Ca*. Similichlamydia έχουν αναφερθεί 2 περιστατικά επιθηλιοκύστης στα είδη *Latris lineata* (Stride et al., 2013c) και *Lates calcarifer* (Stride et al., 2013a) στην Αυστραλία με υπεύθυνο παθογόνο το είδος *Ca*. Similichlamydia laticola και ένα περιστατικό επιθηλιοκύστης στο είδος *Labrus bergylta* στη Νορβηγία με παθογόνο το είδος *Ca*. Similichlamydia labri. Στην Ελλάδα έχουν ταυτοποιηθεί και τα δύο αυτά είδη σε τσιπούρα με επιθηλιοκύστη στην υπό δημοσίευση μελέτη των Vaughan et al. 2017. Για το γένος *Ca*. Parilichlamydia έχει αναφερθεί ένα περιστατικό επιθηλιοκύστης στο *Seriola lalandi* στην Αυστραλία όπου ταυτοποιήθηκε το είδος *Ca*. Parilichlamydia carangidicola.

Βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca*. Endozoicomonas βρέθηκαν μόνο σε 2 από τα 3 δείγματα τσιπούρας στην περιοχή του Βορείου Αιγαίου (Χίος). Ωστόσο, είναι πρώτη φορά που το γένος *Ca*. Endozoicomonas αναγνωρίζεται ως αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας σε τσιπούρα. Οι μέχρι τώρα αναφορές για το συγκεκριμένο γένος γ-πρωτεοβακτηριών έχουν γίνει σε μυτάκι στην Ελλάδα και σε κόμπια, *Rachycentrum canadum* στην Κολομβία (Katharios et al., 2015; Mendoza et al., 2013).

Από τη φυλογενετική ανάλυση μικρού τμήματος του γονιδίου του 16S rRNA των 2 δειγμάτων προέκυψε ότι οι αλληλουχίες των δειγμάτων έχουν 98% και 99% ομοιότητα με το είδος *Ca*. Endozoicomonas cretensis που ταυτοποιήθηκε σε μυτάκι με επιθηλιοκύστη. Ωστόσο την ίδια ομοιότητα έχουν και με στελέχη του *Endozoicomonas elysicola* που ταυτοποιήθηκαν σε θαλάσσιο σαλιγκάρι, αχινό και σπόγγο. Αυτό πιθανά να οφείλεται στο μικρό μέγεθος της αλληλουχίας (400 βάσεις) που χρησιμοποιήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση. Πιθανόν, με ανάλυση μεγαλύτερου τμήματος του γονιδίου του 16S rRNA να αποτυπωθούν καλύτερα οι διαφορές μεταξύ των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

Το γένος Endozoicomonas ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια και τα είδη που έχουν ταυτοποιηθεί ως παράγοντες επιθηλιοκύστης είναι το *Endozoicomonas elysicola* σε κόμπια *Rachycentrum canadum* (Mendoza et al., 2013) και το *Ca*. Endozoicomonas cretensis σε μυτάκι (Katharios et al., 2015). Βέβαια, βακτήρια του γένους *Endozoicomonas* είναι και κοινά ενδοσυμβιωτικά βακτήρια των σπόγγων, των κοραλλιών αλλά και ασπονδύλων (Kurahashi & Yokota, 2007) τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο βιολογικό και οικολογικό ενδιαφέρον. Φαίνεται λοιπόν ότι τα βακτήρια του γένους δεν παρουσιάζουν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής αλλά υπάρχει και στάδιο/στάδια του κύκλου ζωής τους που να έχει ελεύθερο τρόπο διαβίωσης.

Γενικά, τα ενδοκυτταρικά παθογόνα διαχωρίζονται σε υποχρεωτικά και προαιρετικά ενδοκυτταρικά παθογόνα. Τα μεν πρώτα έχουν χάσει την ικανότητά τους να διαβιούν εκτός του ξενιστή τους που συνεπάγεται απαραιτήτως την ύπαρξη ενδιάμεσου ξενιστή, ενώ τα δεύτερα έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται και εκτός του ξενιστή, επομένως η ύπαρξη ενδιάμεσου ξενιστή δεν είναι απαραίτητη. Επιπλέον, γενικός κανόνας που σχετίζεται με τη βιολογία των ενδοκυτταρικών βακτηρίων που μεταφέρονται με ενδιάμεσο ξενιστή φαίνεται να είναι η μείωση του γονιδιώματος τους σε τέτοιο βαθμό ώστε να διαγράφονται γονίδια που κωδικοποιούν ολόκληρα μεταβολικά μονοπάτια. Προφανώς, οι ανάγκες των βακτηρίων ελλείψει των προϊόντων των μεταβολικών μονοπατιών, καλύπτονται από το κύτταρο-ξενιστή (Casadevall, 2008). Τέτοιο παράδειγμα υποχρεωτικών ενδοκυτταρικών βακτηρίων αποτελούν τα βακτήρια του *Ca*. Ichthyocystis καθώς η γονιδιωματική μελέτη του γένους των Qi et al. (2016) έδειξε ότι τα βακτήρια αυτά έχουν χάσει την ικανότητά να μεταβολίσουν αμινοξέα (Qi et al., 2016). Αντίθετα, από τη γονιδιωματική ανάλυση του *Ca*. Endozoicomonas cretensis φαίνεται να βρίσκεται εξελικτικά στη φάση μετάβασης από ελεύθερο εξωκυττάριο σε ενδοκυτταρικό βακτήριο που υποδεικνύεται από το μεγάλο μέγεθος του γονιδιώματός του (Katharios et al., 2015).

4.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα αποτελέσματα της ιστολογικής ανάλυσης προέκυψαν από την παρατήρηση ιστολογικών τομών με πολυχρωματική χρώση σε οπτικό μικροσκόπιο από το σύνολο το δειγμάτων που συλλέχθηκαν.

Ο αριθμός των κύστεων στα βράγχια διέφερε μεταξύ των δειγμάτων καθώς υπήρξαν δείγματα όπου μετρήθηκαν πάνω από 100 κύστεις ενώ σε άλλα δε βρέθηκε καμία. Ταυτόχρονα φαίνεται να υπάρχει διαφορά στο πλήθος των κύστεων που παρατηρήθηκαν στα δείγματα μεταξύ των 3 ειδών. Στα δείγματα από τσιπούρες καταγράφηκε ο μεγαλύτερος αριθμός κύστεων, ακολουθούν τα δείγματα από

λαβράκια ενώ τα μαγιάτικα είχαν τις λιγότερες. Λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων στο λαβράκι και το μαγιάτικο, δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα σε ότι αφορά στην ένταση της παθολογίας ανά είδος. Όσον αφορά στο μέγεθος των κύστεων, παρατηρήθηκε έντονη διαφοροποίηση μεγεθών ακόμα και μεταξύ κύστεων του ίδιου δείγματος. Η μεγαλύτερη κύστη που παρατηρήθηκε έχει περίμετρο 735 μm και βρέθηκε σε δείγμα από τσιπούρα ενώ η μικρότερη έχει περίμετρο 26 μm και βρέθηκε σε δείγμα από λαβράκι. Επομένως, φαίνεται να εμφανίζεται διαφοροποίηση στην ένταση του προβλήματος μεταξύ των δειγμάτων και πιθανά μεταξύ των διαφορετικών ειδών καθώς φαίνεται η ασθένεια να επιδρά πιο έντονα στην τσιπούρα.

Η παθολογία που οφείλεται στην επιθηλιοκύστη και παρατηρήθηκε στον ιστό των βραγχίων ήταν η δημιουργία στοιβάδας διαφοροποιημένων, υπερπλαστικών επιθηλιακών κυττάρων περιμετρικά των κύστεων που δημιουργήθηκαν με μεταπλασία του τυπικού επιθηλιακού ιστού (squamus metaplasia) ως αντίδραση στο ερέθισμα. Η αντίδραση αυτή παρατηρήθηκε τόσο σε μεγάλες όσο και σε μικρές κύστεις που είχαν πυκνό και λεπτόκοκκο περιεχόμενο ενώ σε κύστεις με αραιότερο και χοντρόκοκκο περιεχόμενο παρατηρήθηκε σπάνια και σε μικρότερο βαθμό. Παρά το γεγονός ότι η ίδια κλινική εικόνα περιγράφεται και από τους Seth-Smith *et al.* (2016) η παθολογία αποδίδεται μόνο σε κύστεις μεγάλου μεγέθους. Επίσης, σε κύστεις διαφορετικών μεγεθών παρατηρήθηκε φλεγμονώδης αντίδραση του ιστού με συσσώρευση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε μεγάλο αριθμό κύστεων υπήρχε περιφερειακά μια παχιά δομή που πιθανά να αποτελείται από σταγονίδια βλέννας και έχει περιγραφεί σε περιστατικό επιθηλιοκύστης σε κυπρίνο (Molnar & Boros, 1981). Η δομή αυτή στην παρούσα εργασία αναφέρεται ως δακτυλίδι. Τέλος, υπήρξαν και περιπτώσεις κύστεων, με χοντρόκοκκο περιεχόμενο, στις οποίες δεν υπήρχε κανενός είδους αντίδρασης του ιστού. Τέτοιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί και σε περιστατικό επιθηλιοκύστης που οφείλεται σε *Ca.* Similichlamydia στο περκόμορφο *Latris lineata*.

Στη μελέτη των Vaughan *et al.* (2017) που αφορά σε περιστάτικα τσιπούρας με επιθηλιοκύστη στην Ελλάδα στα οποία ταυτοποιήθηκαν βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis και του *Ca.* Similichlamydia, γίνεται διαχωρισμός στη μορφολογία των κύστεων που οφείλονται στα 2 αυτά διαφορετικά γένη βακτηρίων. Η διαφοροποίηση των κύστεων εντοπίζεται κυρίως στη διαμόρφωσή (υφή) των βακτηρίων στο εσωτερικό των κύστεων (προσωπική παρατήρηση που δεν αναφέρεται στο άρθρο). Σε άλλη μελέτη περιστατικού επιθηλιοκύστης σε κυπρίνο αναφέρεται η ύπαρξη δύο διακριτών τύπων κύστεων, κύστεις στις οποίες σχηματίζεται περιφερειακά μια δομή που τις περιβάλει (δακτυλίδι) και κύστεις χωρίς τη δομή αυτή. Η διάκριση των δύο τύπων αποδόθηκε σε ανώριμες (κύστεις με δακτυλίδι) και σε ώριμες (κύστεις χωρίς δακτυλίδι) (Molnar & Boros, 1981).

Με βάση τις παραπάνω αναφορές πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση των κύστεων στα δείγματα που παρατηρήθηκαν σε 4 τύπους, a, b, c και d, ανάλογα με τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά. Η διάκριση των κύστεων έγινε με βάση την υφή του περιεχομένου τους και με το αν είχαν ή όχι δακτυλίδι. Οι κύστεις τύπου a και d έχουν πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο ενώ οι κύστεις τύπου b και c έχουν πιο αραιό και χοντρόκοκκο περιεχόμενο. Αντίστοιχα για το δακτυλίδι, οι κύστεις τύπου a και b δεν έχουν δακτυλίδι ενώ οι κύστεις τύπου c και d έχουν. Σε δείγματα από τσιπούρες

και λαβράκια βρέθηκαν κύστεις τύπου a, b και c, ενώ σε δείγματα από μαγιάτικα βρέθηκαν μόνο κύστεις τύπου a και d.
Από τη μορφομετρία των κύστεων στο σύνολο των δειγμάτων φαίνεται ότι οι κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο, χωρίς δακτυλίδι, είναι μεγαλύτερες. Ακολουθούν οι κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι και οι κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο και δακτυλίδι ενώ οι κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο και δακτυλίδι είναι μικρότερες. Ωστόσο, στην τσιπούρα και το λαβράκι που εμφανίζονται κοινοί τύποι κύστεων (με λεπτόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι, με χοντρόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι και με χοντρόκοκκο περιεχόμενο και δακτυλίδι) η σχέση των μεγεθών μεταξύ των τύπων διαφέρει. Στην τσιπούρα φαίνεται οι κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι να είναι μεγαλύτερες, να ακολουθούν οι κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι και οι κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο και δακτυλίδι να είναι οι μικρότερες. Όμως, στο λαβράκι μεγαλύτερες είναι οι κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο και δακτυλίδι, ακολουθούν οι κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι και οι κύστεις τύπου με χοντρόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι να είναι οι μικρότερες. Αυτό πιθανά να οφείλεται σε διαφορές μεταξύ των 2 ειδών που σχετίζονται με τη φυσιολογία, τη δομή και τη μορφολογία των ιστών στα βράγχια καθώς και με την ανοσολογική απόκριση σε ερεθίσματα (π.χ. παθογόνα). Στο μαγιάτικο, οι κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο χωρίς δακτυλίδι είναι μεγαλύτερες από τις κύστεις με λεπτόκοκκο περιεχόμενο και δακτυλίδι.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια αντιστοίχισης της μορφολογίας των κύστεων με βάση το περιεχόμενό τους στις 3 κατηγορίες βακτηρίων που μελετήθηκαν αναφορικά με τα αποτελέσματα των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί για την ασθένεια στην Ελλάδα (Vaughan et al., 2017; Katharios et al., 2015; Seth-Smith et al., 2016). Θεωρήθηκε, λοιπόν ότι κύστεις που περιέχουν βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis θα έχουν πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο, κύστεις που θα περιέχουν βακτήρια των Chlamydiales θα έχουν αραιώτερο και χοντρόκοκκο περιεχόμενο ενώ κύστεις που θα περιέχουν βακτήρια του *Ca.* Endozoicomonas θα έχουν περιεχόμενο μεγάλων κυττάρων ινώδους μορφής. Η υπόθεση όμως δεν επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης των βακτηρίων των δειγμάτων και της ιστολογίας. Συγκεκριμένα, σε δείγματα τσιπούρας που ταυτοποιήθηκαν μόνο βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis από τη μοριακή ανάλυση βρέθηκαν κύστεις με χοντρόκοκκο περιεχόμενο και σε δείγματα που δεν ταυτοποιήθηκαν μοριακά βακτήρια του γένους *Ca.* Endozoicomonas παρατηρήθηκαν κύστεις όμοιες με αυτές που παρουσιάζονται από τους Katharios *et al.* (2015) από τις οποίες ταυτοποιήθηκε το είδος *Ca.* Endozoicomonas cretensis. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι:

- Είτε υπάρχουν στάδια στον κύκλο ζωής των διαφορετικών βακτηρίων κατά τα οποία μοιάζουν μορφολογικά μεταξύ ή έστω οι διαφορές τους δεν είναι διακριτές με το οπτικό μικροσκόπιο.
- Είτε υπάρχουν και άλλα βακτήρια που δημιουργούν κύστεις παρόμοιας μορφολογίας με αυτή των γνωστών βακτηρίων που δεν έχουν ταυτοποιηθεί ακόμα.

Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί ότι στα δείγματα από μαγιάτικα που βρέθηκαν μόνο βακτήρια του *Ca.* Ichthyocystis παρατηρήθηκαν αποκλειστικά κύστεις με πυκνό, λεπτόκοκκο περιεχόμενο.

Στα βράγχια που παρατηρήθηκαν, εκτός από επιθηλιοκύστη βρέθηκαν και άλλα παθογόνα και παράσιτα με κυρίαρχα τα Μονογενή παράσιτα. Από τα Μονογενή, σε δείγματα από τσιπούρα βρέθηκε το *Furnestinia echeneis,* σε δείγματα από λαβράκι βρέθηκε το *Diplectanum aequans* και σε δείγματα από μαγιάτικο βρέθηκε το *Zeuxapta seriolae.* Επιπλέον σε τσιπούρα βρέθηκαν αυγά του *Cardicola aurata* και σε λαβράκι βρέθηκε το κωπήποδο *Lernanthropus kroyeri* καθώς και Μυξοβακτήρια. Η ταυτόχρονη παρουσία στα βράγχια των ψαριών επιθηλιοκύστης και διαφόρων παρασίτων ίσως και να μην είναι τελείως τυχαία και πιθανά να έχουν κάποια αλληλοεξαρτώμενη σχέση. Θα μπορούσε ενδεχομένως κάποια παράσιτα να είναι φορείς των βακτηρίων που προκαλούν επιθηλιοκύστη. Αυτό βέβαια αποτελεί απλά μια υπόθεση καθώς δεν έχει γίνει σχετική έρευνα. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές αναφορές περιστατικών επιθηλιοκύστης που συνοδεύονται από την παρουσία άλλων παρασίτων και παθογόνων μικροβίων στα βράγχια (Nowak & LaPatra, 2006; Stride, 2014; Seth-Smith et al., 2016; Padrós & Crespo, 1995).

4.3 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα παθογόνα μικρόβια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση της επιθηλιοκύστης είναι ενδοκυτταρικά παθογόνα και δεν έχει επιτευχθεί ως τώρα η απομόνωση τους *in vitro*. Επομένως, για τη συλλογή δεδομένων και πληροφοριών που σχετίζονται με τη δομή, τη βιολογία, τον κύκλο ζωής, την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον και τον ξενιστή τους χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον η ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Στην παρούσα εργασία έγινε περιγραφή της δομής και μορφολογίας των παθογόνων βακτηρίων και της διάταξής τους στο εσωτερικό της κύστης από φωτογραφίες που συλλέχθηκαν μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM). Συνολικά παρατηρήθηκαν 2 δείγματα από τσιπούρες, ένα από την περιοχή του Αστακού και ένα από την περιοχή της Χίου.

Δεν υπήρχε διαφορά στη μορφολογία και τη χωρική διάταξη των βακτηριών που παρατηρήθηκαν μεταξύ των 2 δειγμάτων. Επιπλέον, παρατηρείται ομοιότητα της εικόνας των βακτηρίων με την εικόνα των βακτηρίων *Ca.* Ichthyocystis που παρουσιάζεται από τις φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης των Seth-Smith *et al.*, (2016) στη μελέτη τους για την επιθηλιοκύστη σε τσιπούρες ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας. Αντίθετα, δεν υπάρχεια ομοιότητα στην εικόνα των βακτηρίων της παρούσας μελέτης με αυτή των *Ca.* Similichlamydia και *Ca.* Parilichlamydia από τις μελέτες των Vaughan *et al.* (2017) σε τσιπούρα και Stride *et al.* (2013) σε μαγιάτικο αντίστοιχα, όπου παρατηρήθηκαν intermediate bodies (IBs) και elementary bodies (EBs) στην πρώτη περίπτωση και intermediate bodies και reticulate bodies (RB) στη δεύτερη. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τα βακτήρια στις κύστεις που παρατηρήθηκαν ήταν βακτήρια του γένους *Ca.* Ichthyocystis και όχι χλαμύδια.

4.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα μέχρι τώρα γενικά δεδομένα για την επιθηλιοκύστη προκύπτει ότι:

- Είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από κύστεις έγκλειστων, ενδοκυτταρικών βακτηρίων σε κύτταρα του επιθηλίου των βραγχίων και του δέρματος των ψαριών.
- Έχει παγκόσμια εξάπλωση και έχει καταγραφεί σε πάνω από 90 είδη καλλιεργούμενων και άγριων ψαριών, θαλάσσιων ή γλυκών υδάτων.
- Στα καλλιεργούμενα είδη έχουν καταγραφεί σοβαρές θνησιμότητες που αποδίδονται στην ασθένεια. Ιδιαίτερα τα στάδια των νεαρών ιχθυδίων φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία καθώς σε περιστατικά εξάρσεων της ασθένειας έχουν καταγραφεί μαζικές και απότομες θνησιμότητες.
- Τα παθογόνα βακτήρια που έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες επιθηλιοκύστης εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα. Έχουν ταυτοποιηθεί είδη που ανήκουν σε διαφορετικά γένη και οικογένειες του φύλου των χλαμυδίων (Chlamydiales) στα οποία οφείλεται και το μεγαλύτερο ποσοστό των περιστατικών της ασθένειας, ενώ τα τελευταία 4 χρόνια έχουν ταυτοποιηθεί και είδη που ανήκουν στις ομοταξίες των β- και γ-πρωτεοβακτηρίων.
- Ο ενδοκυτταρικός τρόπος ζωής των παθογόνων βακτηρίων (υποχρεωτικός ή προαιρετικός) δεν έχει επιτρέψει ως τώρα την απομόνωσή τους *in vitro*.
- Δεν έχει ανακαλυφθεί ο τρόπος με τον οποίο τα παθογόνα βακτήρια προσβάλουν και μολύνουν το ψάρι. Αν δηλαδή, υπάρχει ενδιάμεσος ξενιστής μέσω του οποίου τα ενδοκυτταρικά παθογόνα έρχονται σε επαφή με τα ψάρια ή αν έχουν κάποιο ελεύθερο στάδιο στον κύκλο ζωής τους.

Συνοψίζοντας, τα μέχρι σήμερα δεδομένα για την ασθένεια στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια είναι τα ακόλουθα:

- Η επιθηλιοκύστη στην Ελλάδα έχει καταγραφεί μόνο σε θαλάσσια καλλιεργούμενα είδη ψαριών
- Τα τελευταία χρόνια εμφανίζεται όλο και πιο έντονα σε ετήσια βάση επηρεάζοντας κυρίως τις καλλιέργειες τσιπούρας παρόλο που και άλλα είδη όπως το μυτάκι, και η συναγρίδα φαίνεται να προσβάλλονται από την ασθένεια.
- Οι επιστημονικές μελέτες της ασθένειας που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα αφορούν στα είδη τσιπούρα και μυτάκι.
- Τα παθογόνα βακτήρια που έχουν αναγνωριστεί ως υπεύθυνα για την εμφάνιση της ασθένειας στην τσιπούρα είναι βακτήρια του γένους *Ca.* Ichthyocystis (κύρια παθογόνα) που ανήκουν στα β-πρωτεοβακτήρια αλλά έχουν ταυτοποιηθεί και βακτήρια που ανήκουν στα *Ca.* Similichlamydia και *Ca.* Piscichlamydia, ενώ στο μυτάκι ως υπεύθυνο βακτήριο για την εμφάνιση της ασθένειας αναγνωρίστηκε το *Ca.* Endozoicomonas cretensis που ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια.

Ο γενικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επιθηλιοκύστης στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια με σκοπό την εκτίμηση των χαρακτηριστικών της και πώς αυτά διαμορφώνονται στο μεγαλύτερο δυνατό εύρος περιοχών και μεταξύ όσο περισσότερων διαφορετικών ειδών που προσβάλλονται από την ασθένεια..

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με άλλες ερευνητικές εργασίες πάνω στην επιθηλιοκύστη και κυρίως με αυτές που πραγματοποιήθηκαν στην Ελλάδα προκύπτει ότι:

- Η εξάπλωση της ασθένειας στον ελληνικό χώρο φαίνεται να είναι αρκετά μεγάλη καλύπτοντας ένα μεγάλο εύρος περιοχών ενώ στα είδη των ψαριών έχουν καταγραφεί με την ασθένεια ως τώρα, προστίθεται το λαβράκι και το μαγιάτικο.
- Το *Ca.* Ichthyocystis είναι το κυρίαρχο παθογόνο καθώς βακτήρια του γένους ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα αλλά και χλαμύδια ταυτοποιήθηκαν σε δείγματα από μεγάλο εύρος περιοχών ενώ βακτήρια του *Ca.* Endozoicomonas ταυτοποιήθηκαν μόνο σε δείγματα από την περιοχή του Βορείου Αιγαίου.
- Τα μέχρι τώρα γνωστά είδη του *Ca.* Ichthyocystis είναι τα *Ca.* Ichthyocystis sparus και *Ca.* Ichthyocystis hellenicum, ωστόσο βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης φαίνεται ότι πιθανά να υπάρχει ακόμα ένα είδος.
- Τα γένη των χλαμυδίων που έχουν αναγνωριστεί ως τώρα είναι *Ca.* Similichlamydia και *Ca.* Piscichlamydia. Στην παρούσα εργασία δεν ταυτοποιήθηκαν βακτήρια του γένους *Ca.* Piscichlamydia ως παράγοντες της ασθένειας αλλά *Ca.* Parilichlamydia και *Ca.* Similichlamydia.
- Ταυτοποήθηκαν βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Ca.* Endozoicomonas όμως το μικρό μήκος των αλληλουχιών από τις οποίες έγινε η ταυτοποίηση των βακτηρίων δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος για το είδος των βακτηρίων.
- Οι παρατηρήσεις από την παθολογία των ιστών, τη μορφολογία των κύστεων και των βακτηριακών κυττάρων συμφωνούν σε πολύ μεγάλο βαθμό με τις παρατηρήσεις των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στην Ελλάδα.

Η επιθηλιοκύστη, παρά τις αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχει στα ψάρια που προσβάλει αλλά και στην παραγωγή των ιχθυοκαλλιεργειών στις περιπτώσεις των καλλιεργούμενων ψαριών, είναι μια ασθένεια που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον από επιστημονικής άποψης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην μεγάλη ποικιλότητα που εμφανίζουν τα παθογόνα βακτήρια που την προκαλούν. Από οικολογικής σκοπιάς, υπάρχει μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών αλλά και ειδών-ξενιστών που εμφανίζεται η ασθένεια. Από βιολογικής σκοπιάς, υπάρχει έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών των παθογόνων βακτηρίων που την προκαλούν. Από πλευράς παθολογίας, υπάρχει μεγάλο εύρος απόκλισης της συμπτωματολογίας, της ευαισθησίας των ξενιστών και της φυσιοπαθολογίας του μολυσμένου ιστού που έχει καταγραφεί σε περιστατικά εμφάνισης της ασθένειας. Ίσως όμως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον προκαλείται μελετώντας την ασθένεια από εξελικτικής σκοπιάς αφού, βακτήρια τελείως διαφορετικά γενετικά μεταξύ τους φαίνεται να υιοθετούν ένα κοινό, ενδοκυτταρικό τρόπο ζωής που από κοινού τον «χρησιμοποιούν» ως μηχανισμό παθογένειάς, επιφέροντας το ίδιο αποτέλεσμα, το σχηματισμό κύστεων.

4.5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η επιθηλιοκύστη αν και αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Plehn το 1920 ως μυκοφίλωση στον κυπρίνο, είναι μια ασθένεια που μελετάται τα τελευταία 50 χρόνια περίπου. Η μελέτη και η ταυτοποίηση των παθογόνων βακτηρίων που την προκαλούν όμως έχει ξεκινήσει από το 2004 με την ταυτοποίηση του *Ca.* Piscichlamydia salmonis σε σολομό Ατλαντικού, ενώ, εμπεριστατωμένες μελέτες γονιδιωματικής ανάλυσης των παθογόνων πραγματοποιούνται τα τελευταία 2 χρόνια μόνο.

Επομένως, βάσει όλων όσων έχουν αναφερθεί στην παρούσα εργασία για την ασθένεια γενικότερα οι μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να στοχεύουν:

- Στην εκτίμηση της ποικιλότητας των παθογόνων βακτηρίων δημιουργώντας χάρτες της εξάπλωσης των διαφορετικών ειδών και των ξενιστών τους με σκοπό την εκτίμηση της κατάστασης της ασθένειας σε μεγάλη κλίμακα.
- Στη γρήγορη διάγνωση της ασθένειας ή ακόμα την ανάπτυξη μεθόδων για προληπτική επέμβαση ώστε να μειωθούν οι επιπτώσεις της στην ιχθυοκαλλιέργεια.
- Στην ανεύρεση του τρόπου μετάδοσης των ενδοκυτταρικών παθογόνων στο ψάρι και συγκεκριμένα αν υπάρχει ενδιάμεσος ξενιστής και ποιος είναι αυτός
- Στην αποκρυπτογράφηση της εξελικτικής ιστορίας του μηχανισμού παθογένειας των ενδοκυτταρικών βακτηρίων μέσω της συγκριτικής γονιδιωματικής.
- Στην αναγνώριση των παθογόνων βακτηρίων βάσει της μορφολογίας τους
- Στην απομόνωση των παθογόνων βακτηρίων *in vitro.*

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΣΤΑΤ, 2016. *ΕΡΕΥΝΑ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ, 2015*,

Amann, R. et al., 1997. Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to Chlamydia spp. *Applied and environmental microbiology*, 63(1), pp.115–121.

Bébéar, C. & De Barbeyrac, B., 2009. Genital Chlamydia trachomatis infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(1), pp.4–10.

Bennett, H.S. et al., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technology*, 51(2), pp.71–97.

Burillo, A. & Bouza, E., 2010. Chlamydophila pneumoniae. *Infectious disease clinics of North America*, 24(1), pp.61–71.

Carvajal, J., Ruiz, G. & Gonzalez, L., 1990. Gill histopathologies in coho salmon (Oncorhynchus kisutch) and Atlantic salmon (Salmo salar) raised under net cages in southern Chile. *Medio-Ambiente*, 11, pp.53–58.

Casadevall, A., 2008. Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol*, 62, pp.19–33.

Collingro, A. et al., 2005. “Candidatus Protochlamydia amoebophila”, an endosymbiont of Acanthamoeba spp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(5), pp.1863–1866.

Contador, E. et al., 2016. Epitheliocystis in lake trout Salvelinus namaycush (Walbaum) is associated with a b -proteobacteria. *Journal of Fish Diseases*, 39, pp.353–366.

Corsaro, D. et al., 2009. Novel Chlamydiales strains isolated from a water treatment plant. *Environmental Microbiology*, 11(1), pp.188–200.

Corsaro, D. & Greub, G., 2006. Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), pp.283–297.

Corsaro, D. & Venditti, D., 2009. Detection of Chlamydiae from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. *Research in microbiology*, 160(8), pp.547–552.

Corsaro, D. & Venditti, D., 2004. Emerging chlamydial infections. *Critical reviews in microbiology*, 30(2), pp.75–106.

Crespo, S. et al., 1999. Epitheliocystis agents in sea bream Sparus aurata: morphological evidence for two distinct chlamydia-like developmental cycles. *Diseases of aquatic organisms*, 37(1), pp.61–72.

Crespo, S., Grau, A. & Padrós, F., 1990. Epitheliocystis disease in the cultured amberjack, Seriola dumerili Risso (Carangidae). *Aquaculture*, 90(3–4), pp.197–207.

Crespo, S., Zarza, C. & Padrós, F., 2001. Epitheliocystis hyperinfection in sea bass , Dicentrarchus labrax (L .): light and electron microscope observations. *Journal of Fish Diseases*, 24, pp.557–560.

Draghi, A. et al., 2004. Characterization of "Candidatus Piscichlamydia salmonis"(order Chlamydiales), a Chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (Salmo salar). *Journal of clinical microbiology*, 42(11), pp.5286–5297.

Draghi II, A. et al., 2007. Characterization of a Neochlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in cultured Arctic charr Salvelinus alpinus. *Diseases of aquatic organisms*, 76(1), pp.27–38.

Everett, K.D.E., Bush, R.M. & Andersen, A.A., 1999. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), pp.415–440.

FAO, 2013. *Fishery and Aquaculture Statistics*, Rome.

FAO, 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014*, Rome.

FAO, 2016. *TThe State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.*, Rome.

FAO, 2008. *Understanding and applying risk analysis in aquaculture*, Rome.

Friedman, M.G., Dvoskin, B. & Kahane, S., 2003. Infections with the chlamydia-like microorganism Simkania negevensis, a possible emerging pathogen. *Microbes and Infection*, 5(11), pp.1013–1021.

Fritsche, T.R. et al., 1993. Occurrence of bacterial endosymbionts in Acanthamoeba spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *Journal of clinical microbiology*, 31(5), pp.1122–1126.

Fujimura, R. et al., 2014. Draft genome sequence of the betaproteobacterial endosymbiont associated with the fungus Mortierella elongata FMR23-6. *Genome announcements*, 2(6), pp.e01272-14.

Goodwin, A.E., Park, E. & Nowak, B.F., 2005. Successful treatment of largemouth bass, Micropterus salmoides (L.), with epitheliocystis hyperinfection. *Journal of fish diseases*, 28(10), pp.623–625.

Grau, A. & Crespo, S., 1991. Epitheliocystis in the wild and cultured amberjack, Seriola dumerili Risso: ultrastructural observations. *Aquaculture*, 95(1–2), pp.1–6.

Greub, G. & Raoult, D., 2004. History of the ADP/ATP-Translocase-Encoding Gene, a Parasitism Gene Transferred from a Chlamydiales Ancestor to Plants 1 Billion Years Ago. *Applied and environmental microbiology*, 70(11), p.6949.

Groff, J.M. et al., 1996. Epitheliocystis infection in cultured white sturgeon (Acipenser transmontanus): antigenic and ultrastructural similarities of the causative agent to the chlamydiae. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(2), pp.172–180.

Hahn, M.W. et al., 2009. Emended description of the genus Polynucleobacter and the species Polynucleobacter necessarius and proposal of two subspecies, P. necessarius subsp. necessarius subsp. nov. and P. necessarius subsp. asymbioticus subsp. nov. *International journal of systematic and evolutionary*

microbiology, 59(8), pp.2002–2009.

Halberstadter, L. & Prowazek, S. von, 1907. Untersuchungen (iber die Malariaparasiten der Affen. *Arb. GesundhAmt. Berl*, pp.37–43.

Hansen, H. & Onozaka, Y., 2011. When diseases hit aquaculture: An experimental study of spillover effects from negative publicity. *Marine Resource Economics*, 26(4), pp.281–291.

Heinz, E. et al., 2007. An Acanthamoeba sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. *Environmental microbiology*, 9(6), pp.1604–1609.

Hoffman, G.L. et al., 1969. Epitheliocystis, a new infectious disease of the bluegill (Lepomis macrochirus). *Antonie van leeuwenhoek*, 35(1), pp.146–158.

Horn, M., 2008. Chlamydiae as symbionts in eukaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 62, pp.113–131.

Hu, V.H. et al., 2010. Epidemiology and control of trachoma: systematic review. *Tropical medicine & international health*, 15(6), pp.673–691.

Hueck, C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), pp.379–433.

Kahane, S., Metzer, E. & Friedman, M.G., 1995. Evidence that the novel microorganism "Z"may belong to a new genus in the family Chlamydiaceae. *FEMS microbiology letters*, 126(2), pp.203–207.

Kamneva, O.K. et al., 2012. Analysis of genome content evolution in PVC bacterial super-phylum: assessment of candidate genes associated with cellular organization and lifestyle. *Genome biology and evolution*, 4(12), pp.1375–1390.

Karlsen, M. et al., 2008. Characterization of "Candidatus Clavochlamydia salmonicola": an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environmental microbiology*, 10(1), pp.208–218.

Katharios, P. et al., 2015. Environmental marine pathogen isolation using mesocosm culture of sharpsnout seabream : striking genomic and morphological features of novel. *Scientific Reports*, 5(17609), pp.1–13. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/srep17609.

Katharios, P. et al., 2008. Severe mortality in mesocosm-reared sharpsnout sea bream Diplodus puntazzo larvae due to epitheliocystis infection. *Diseases of aquatic organisms*, 82(1), pp.55–60.

Kirkbright, D.W., 2016. *Development of a Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Assay for the Beta- Proteobacterium BK-BJC , and Its Application in Lake Trout (Salvelinus namaycush) During an Epitheliocystis-Associated Mortality Event.*

Kurahashi, M. & Yokota, A., 2007. Endozoicomonas elysicola gen. nov., sp. nov., a γ-proteobacterium isolated from the sea slug Elysia ornata. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(3), pp.202–206.

Lackner, G. et al., 2011. Complete genome sequence of Burkholderia rhizoxinica, an endosymbiont of Rhizopus microsporus. *Journal of bacteriology*, 193(3), pp.783–784.

Lafferty, K.D. et al., 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture

economics. *Annual review of marine science*, 7, pp.471–496.

Longbottom, D. & Coulter, L.J., 2003. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of comparative pathology*, 128(4), pp.217–244.

Margulis, L., 1971. The Origin of Plant and Animal Cells: The serial symbiosis view of the origin of higher cells suggests that the customary division of living things into two kingdoms should be reconsidered. *American Scientists*, 59(2), pp.230–235.

Matsuo, J. et al., 2010. Survival and transfer ability of phylogenetically diverse bacterial endosymbionts in environmental Acanthamoeba isolates. *Environmental microbiology reports*, 2(4), pp.524–533.

Meijer, A. et al., 2006. Molecular evidence for association of Chlamydiales bacteria with epitheliocystis in leafy seadragon (Phycodurus eques), silver perch (Bidyanus bidyanus), and barramundi (Lates calcarifer). *Applied and environmental microbiology*, 72(1), pp.284–290.

Mendoza, M. et al., 2013. A novel agent (Endozoicomonas elysicola) responsible for epitheliocystis in cobia Rachycentrum canadum larvae. *Diseases of aquatic organisms*, 106(1), pp.31–37.

Molnar, K. & Boros, G., 1981. A light and electron microscopic study of the agent of carp mucophilosis. *Journal of Fish Diseases*, 4, pp.325–334.

Moran, N.A., 2003. Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts. *Current opinion in microbiology*, 6(5), pp.512–518.

Nakabachi, A. et al., 2013. Defensive bacteriome symbiont with a drastically reduced genome. *Current biology*, 23(15), pp.1478–1484.

Nowak, B.F. & Clark, A., 1999. Prevalence of epitheliocystis in Atlantic salmon, Salmo salar L., farmed in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), pp.73–78.

Nowak, B.F. & LaPatra, S.E., 2006. Epitheliocystis in fish. *Journal of fish diseases*, 29(10), pp.573–588.

Padrós, F. & Crespo, S., 1995. Proliferative epitheliocystis associated with monogenean infection in juvenile seabream Sparus aurata in the North East of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*.

Paperna, I., 1977. Epitheliocystis infection in wild and cultured sea bream (Sparus aurata, Sparidae) and grey mullets (Liza ramada, Mugilidae). *Aquaculture*, 10(2), pp.169–176.

Paperna, I. & Sabnai, I., 1980. Epitheliocystis disease in fishes. In *Fish Diseases*. Springer, pp. 228–234.

Plehn, M., 1920. Neue Parasiten in Haut and Kiemen von Fischen. *Ichthyochytrium und Mucophilus Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde Abteilung*, 1(85), pp.275–281.

Qi, W. et al., 2016. Host-associated genomic features of the novel uncultured intracellular pathogen Ca. Ichthyocystis revealed by direct sequencing of epitheliocysts. *Genome biology and evolution*, 8(6), pp.1672–1689.

Rigos, G. et al., 1998. Stress-related pathology seems a significant obstacle for the intensive farming of common dentex, Dentex dentex (Linnaeus 1758). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom).*

Rigos, G. & Katharios, P., 2010. Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 20(1), pp.47–70.

Rurangirwa, F.R. et al., 1999. Analysis of the 16S rRNA gene of microorganism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam. nov., Waddlia chondrophila gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), pp.577–581.

Seth-Smith, H.M.B. et al., 2016. Emerging pathogens of gilthead seabream: characterisation and genomic analysis of novel intracellular β-proteobacteria. *The ISME journal*.

Stride, M.C., Polkinghorne, A., Powell, M.D. & Nowak, B.F., 2013. "Candidatus Similichlamydia laticola", a Novel Chlamydia-like Agent of epitheliocystis in Seven Consecutive Cohorts of Farmed Australian Barramundi, Lates calcarifer (Bloch). *PloS one*, 8(12), p.e82889.

Stride, M.C., Polkinghorne, A., Miller, T.L., Groff, J.M., et al., 2013. Molecular characterization of "Candidatus Parilichlamydia carangidicola," a novel Chlamydia-like epitheliocystis agent in yellowtail kingfish, Seriola lalandi (Valenciennes), and the proposal of a new family,"Candidatus Parilichlamydiaceae" fam. nov.(order Chlamydiales). *Applied and environmental microbiology*, 79(5), pp.1590–1597.

Stride, M.C., Polkinghorne, A., Miller, T.L. & Nowak, B.F., 2013. Molecular characterization of "Candidatus Similichlamydia latridicola" gen. nov., sp. nov.(Chlamydiales:"Candidatus Parilichlamydiaceae"), a novel Chlamydia-like epitheliocystis agent in the striped trumpeter, Latris lineata (Forster). *Applied and environmental microbiology*, 79(16), pp.4914–4920.

Stride, M.C., 2014. Novel chlamydia-like agents of epitheliocystis in wild and cultures Australian finfish.

Stride, M.C., Polkinghorne, A. & Nowak, B.F., 2014. Chlamydial infections of fish: diverse pathogens and emerging causes of disease in aquaculture species. *Veterinary microbiology*, 170(1), pp.19–27.

Thomas, V., Casson, N. & Greub, G., 2006. Criblamydia sequanensis, a new intracellular Chlamydiales isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environmental Microbiology*, 8(12), pp.2125–2135.

Toenshoff, E.R. et al., 2012. A novel betaproteobacterial agent of gill epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon (Salmo salar). *PLoS One*, 7(3), p.e32696.

Toft, C. & Andersson, S.G.E., 2010. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 11(7), pp.465–475.

Vaughan, L. et al., 2017. Ca. Similichlamydia in epitheliocystis co-infection of gilthead seabream gills: unique morphological features of a deep branching chlamydial family. *In review*.

Venizelos, A. & Benetti, D.D., 1996. Epitheliocystis disease in cultured yellowtail Seriola mazatlana in Ecuador. *Journal of the world Aquaculture Society*, 27(2), pp.223–227.

Yarza, P. et al., 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), pp.635–645.