

Universidad de Murcia
Departamento de Patología Animal

Estudio de la respuesta inmune de la lubina
***Dicentrarchus labrax* L. frente a mixosporidios**
parásitos

Pilar Muñoz Ruiz
Murcia, Octubre 1999

La Tesis Doctoral Titulada “Estudio de la respuesta inmune de la lubina *Dicentrarchus labrax* L. frente a mixosporidios parásitos” es un compendio de trabajos publicados.

Los artículos que constituyen el cuerpo de la tesis son los siguientes

Artículo I: P. Muñoz, A. Sitjà-Bobadilla & P. Álvarez-Pellitero. Antigenic characterization of *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea:Bivalvulida) a parasite from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Diseases of Aquatic Organisms* 40: 117-124. (2000). <http://www.int-res.com/articles/dao/40/d040p117.pdf>

Artículo II: P. Muñoz, A. Sitjà-Bobadilla & P. Álvarez-Pellitero. Immunohistochemical characterization of a polyclonal antibody against *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae). *Parasitology Research*, **84**,733-740. (1998). <http://www.springerlink.com/content/0932-0113/84/9/> DOI: 10.1007/s004360050478

Artículo III: P. Muñoz, O. Palenzuela, A. Sitjà-Bobadilla & P. Álvarez-Pellitero. Immunohistochemical reactivity of polyclonal antibodies against *Sphaerospora testicularis* and *Ceratomyxa labracis* (Myxosporea: Bivalvulida), with other myxosporean parasites. *International Journal for Parasitology*, **29**, 521-525. (1999). [doi:10.1016/S0020-7519\(98\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00214-8)

Artículo IV: P. Muñoz, O. Palenzuela, P. Álvarez-Pellitero & A. Sitjà-Bobadilla. Comparative study on several Myxosporean parasites using lectin histochemical methods. *Folia Parasitologica* **46**, 241-247. (1999). <http://www.paru.cas.cz/folia/detail.php?id=20613>.

Artículo V: P. Muñoz, A. Sitjà-Bobadilla & P. Álvarez-Pellitero. Ultrastructural localisation of carbohydrates in several myxosporean parasites. *Parasite* 7:185-191. (2000).

Artículo VI: P. Muñoz, J.A. Calduch-Giner, A. Sitjà-Bobadilla, P. Álvarez-Pellitero & J. Pérez-Sanchez. Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish and Shellfish Immunology*, **8**, 25-36. (1998). [doi:10.1006/fsim.1997.0117](https://doi.org/10.1006/fsim.1997.0117)

Artículo VII: P. Muñoz, P. Álvarez-Pellitero & A. Sitjà-Bobadilla. Modulation of the in vitro activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) leucocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi*. *Fish and Shellfish Immunology* 10:567-581. (2000). [doi:10.1006/fsim.2000.0272](https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0272)

Artículo VIII: P. Muñoz, A. Sitjà-Bobadilla & P. Álvarez-Pellitero. Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunised with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology* 120: 465-477. (2000). doi: 10.1017/S0031182099005855.

I. INTRODUCCIÓN	9
LA LUBINA	11
LOS MIXOSPORIDIOS. <i>SPHAEROSPORA DICENTRARCHI</i>	14
1. Generalidades.....	14
2. Aspectos morfo-fisiológicos.....	15
2.1. La espora	15
2.2. Estadios de desarrollo.....	16
3. Localización.....	16
Ciclo de vida y transmisión	17
5. Epidemiología.....	20
6. Efectos patógenos	21
7. Tratamiento y control	21
SISTEMA INMUNITARIO DE LOS TELEÓSTEOS: RESPUESTA INMUNE FRENTE A PARÁSITOS	23
1. Generalidades.....	23
2. La respuesta inmune innata o inespecífica	24
2.1. La respuesta celular	24
2.1.1. Fagocitosis.....	24
2.1.2. Citotoxicidad	26
2.1.3. Formación de quistes	26
2.2. La respuesta humoral.....	27
2.2.1. Inhibidores del crecimiento bacteriano o vírico.....	27
2.2.2. Inhibidores enzimáticos	27
2.2.3. Sustancias causantes de lisis celular	28
3. Respuesta inmune adquirida o específica.....	29
II. OBJETIVOS DEL TRABAJO	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Aislamiento y purificación de <i>Sphaerospora dicentrarchi</i>	40
2. Técnicas histoquímicas.....	41
2.1. Microscopía óptica.	41
2.2. Microscopía electrónica de transmisión.	42
3. Obtención de leucocitos de riñón anterior	43
4. Estallido respiratorio.....	44
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
1. Composición antigénica de <i>Sphaerospora dicentrarchi</i>	49
2. Estudios <i>in vitro</i>	53
3. Estudios <i>in vivo</i> : experiencia de inmunización.....	55
V. BIBLIOGRAFÍA	57
CONCLUSIONES	69

Las nuevas técnicas de pesca y el aumento de la población humana han llevado a la sobreexplotación de los recursos pesqueros naturales, lo que ha causado que gran número de especies piscícolas hayan desaparecido o estén a punto de desaparecer. Ya hace miles de años, el hombre se dio cuenta que, si seguía cazando sin reponer, acabaría con todas las especies, y para evitar esto se hizo ganadero y se generalizó la crianza de todo tipo de animales, incluidos los peces. De hecho, la acuicultura ya existía en el año 2000 a.c. en China, donde era común el cultivo de la carpa (*Cyprinus carpio*). Las granjas acuáticas son en realidad parcelas de agua dulce o salada destinadas al cultivo de la fauna acuática como si de ganadería terrestre se tratara.

Como en cualquier otro tipo de ganadería, las epizootias resultan potenciadas por la agrupación de muchos ejemplares en un espacio más reducido del habitual en el medio natural. No olvidemos que los peces son animales poiquiloterms y sumamente dependientes de las condiciones ambientales. Cualquier alteración de su entorno afecta de forma directa o indirecta a su estado fisiológico, y por lo tanto a sus mecanismos de defensa ante los agentes patógenos. Si a las condiciones de elevada densidad en que se cultivan los peces, se añade un desconocimiento de la zootecnia básica para la cría de muchas especies, la posibilidad de introducir alteraciones ambientales que repercutan en el estado fisiológico del animal y, consecuentemente, en la aparición de brotes infecciosos, es muy elevada.

Tradicionalmente, los parásitos han sido considerados como un mal menor entre los distintos agentes infecciosos causantes de enfermedades. No obstante, su incidencia en los cultivos piscícolas no es desdeñable y las referencias a epizootias y efectos adversos sobre los hospedadores son cada vez más abundantes. El impacto económico de las infecciones parasitarias es difícil de evaluar, y depende en gran medida de las condiciones concretas de cada cultivo. Muchas parasitosis se producen concomitantemente o como secuelas de enfermedades bacterianas, víricas, fúngicas o debidas a factores ambientales. Los parásitos son responsables de al menos un 20% de las pérdidas piscícolas de la producción mundial (Bauer et al., 1981). A las pérdidas por

mortalidades se han de sumar las debidas a efectos indirectos, como son disminución del crecimiento y de la eficacia reproductora, y alteración del aspecto externo del producto final, con la consiguiente pérdida de valor en el mercado. Por otra parte, algunas parasitosis producen inmunodepresión en sus hospedadores (Woo, 1992). Este aspecto es de gran importancia, ya que la disminución de la respuesta inmune de los peces supone, por un lado, una mayor vulnerabilidad frente a agentes infecciosos y, por otro, disminuye la eficacia de los programas de vacunación frente a otros patógenos.

El objetivo fundamental de esta tesis es profundizar en el conocimiento de una de las parasitosis más frecuentes de la lubina, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758), causada por *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida), centrándonos en aspectos inmunológicos. *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero, 1992 es un mixosporidio con una elevada prevalencia en lubinas cultivadas y silvestres, tanto en el Mediterráneo (Sitjà-Bobadilla & Álvarez-Pellitero, 1993a) como en el Atlántico (Santos, 1996). A continuación revisaremos algunos aspectos básicos de la lubina, de los mixosporidios (Myxozoa: Myxosporea) y del sistema inmunitario de los teleósteos.

I. Introducción

La lubina

La lubina es un pez teleósteo, perciforme, depredador, perteneciente a la familia Moronidae. Su distribución abarca el Atlántico oriental, con el límite meridional en aguas noruegas y el septentrional en las Islas Canarias, o en ocasiones hasta el Senegal. Habita también en todo el litoral mediterráneo, donde es una especie común y muy apreciada por el consumidor. Se trata de una especie euriterma y eurihalina, que en su medio natural efectúa ciertos desplazamientos en función de sus necesidades nutricionales y reproductoras, pudiendo penetrar en las lagunas costeras y en las desembocaduras de los ríos, remontándolos varios kilómetros. La lubina es un depredador durante toda su vida; en el medio natural los crustáceos y los peces constituyen su alimento básico. Es un pez gonocorista (los sexos son separados), a pesar de pertenecer a una familia donde el hermafroditismo es muy frecuente, y no presenta un dimorfismo sexual evidente. Alcanza la primera maduración sexual entre los dos y los cuatro años de vida. Su fecundación es externa; las puestas se producen una vez al año y la época de puesta depende de la latitud. Los huevos son pelágicos y las larvas planctónicas. Su crecimiento es rápido (200 g y 30 cm a los dos años) pudiendo alcanzar 12 Kg de peso y 1 m de longitud.

Su elevado coste en el mercado y la reducción de las capturas, entre otros factores, han

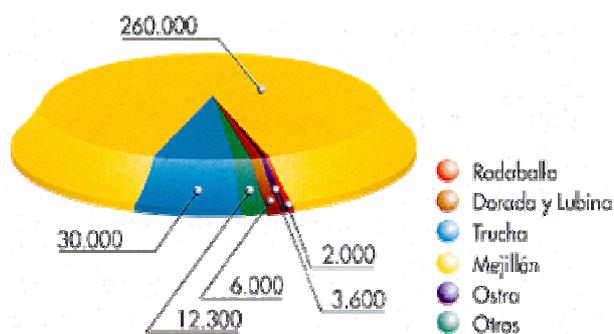


Fig. 1. Producción acuícola en toneladas, en España en el año 1998. Fuente: Estadística de la Secretaría General de Pesca Marítima.

hecho que su cultivo se haya ido extendiendo. Junto con la dorada es la especie más cultivada en el Mediterráneo (6000 toneladas en España en 1998, Fig. 1). Según datos de la FAO, la producción de lubina en Europa ascendió a 23.742 toneladas en 1997. (Circular de

Pesca nº 815, Revisión 11. Dependencia de Información, Datos y Estadísticas de Pesca. Departamento de Pesca de la FAO, 1999).

La generalización de estos cultivos ha puesto de manifiesto que la lubina es una especie susceptible de padecer diversas patologías, causadas por todo tipo de agentes etiológicos. En las tablas 1 y 2 se resumen las principales infecciones parasitarias descritas en los cultivos de lubina en el Mediterráneo.

Tabla 1. Principales parasitosis producidas por metazoos en lubinas cultivadas.

Parásito	Organo(s)	Observaciones	Referencia
Monogéneos			
<i>Diplectanum</i> spp.	Branquias, piel	Asociado a mortalidades en infecciones masivas	González-Lanza y cols. 1991; Silan y Maillard 1986; Caillot y cols. 1999
<i>Serranicotyle labracis</i>	Piel, branquias	Daños histopatológicos	Silan y Maillard 1989
Crustáceos			
<i>Anylocra physodes</i>	Branquias, piel	Asociados a mortalidad o morbilidad	Álvarez-Pellitero y cols. 1995
<i>Caligus minimus</i>	Branquias, piel		Paperna 1980a, 1984; Caillot y cols. 1999
<i>Ceratothoa oestroides</i>	Branquias, piel		Šarušić, 1999
<i>Colobomatus labracis</i>	Branquias		Raibaut y cols. 1980
<i>Lernanthropus</i> sp.	Branquias		Cabral y cols. 1984
<i>Lernanthropus kroyeri</i>	Branquias		Caillot y cols. 1999
<i>Nerocyla orbignyi</i>	Piel, branquias		Bragoni y cols. 1984
Mixosporidios*			
<i>Ceratomyxa diplodae</i>	Ves. biliar	Daños histopatológicos	Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla 1993
<i>Ceratomyxa labracis</i>	Ves. biliar		
<i>Sphaerospora dicentrarchi</i>	Sistémica	Daños histopatológicos, asociado a mortalidad	Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero 1993a
<i>Sphaerospora testicularis</i>	Testículo	Castración parasitaria	Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero 1990a; Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero 1993b

*Los mixosporidios se incluyen en el grupo de los metazoos de acuerdo con recientes revisiones de varios autores, tal como se explica en el apartado 1.

Tabla 2. Principales parasitosis producidas por protozoos en lubinas cultivadas.

Parásito	Organo(s)	Observaciones	Referencias
Flagelados			
<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Branquias, piel	Epizootias	Álvarez-Pellitero y cols. 1995; Paperna 1980b
<i>Colponema</i> sp.	Branquias	Hallazgos ocasionales; en ocasiones, asociados a mortalidades por goteo	Paperna y Baudin-Laurencin 1979
<i>Cryptobia</i> sp.	Branquias		Álvarez-Pellitero y cols. 1993
<i>Ichthyobodo</i> sp.	Piel, branquias	Epizootias	Álvarez-Pellitero y cols. 1995
Ciliados			
<i>Cryptocaryon</i> sp.	Branquias	Epizootias o asociado a mortalidades por goteo en infecciones mixtas	Diamant y cols. 1991; Álvarez-Pellitero y cols. 1995
<i>Philasterides dicentrarchi</i>	Branquias	Asociado a mortalidad	Dragesco y cols. 1995
<i>Trichodina</i> spp.	Branquias	Daños branquiales en infecciones masivas	Álvarez-Pellitero y cols. 1993, 1995; Paperna y Baudin-Laurencin 1979
<i>Tripartiella</i> sp.	Branquias		Paperna 1984
Coccidios			
<i>Eimeria dicentrarchi</i>	Intestino	Hallazgos ocasionales; daños histopatológicos	Álvarez-Pellitero y cols. 1995
<i>Hemogregarina</i> sp.	Sangre	Hallazgos ocasionales	Álvarez-Pellitero y cols. 1993
Microsporidios			
Indeterminado	Intestino	Hallazgos ocasionales	Álvarez-Pellitero y cols. 1993

Los mixosporidios. *Sphaerospora dicentrarchi*

1. Generalidades

Los mixosporidios forman un amplio grupo zoológico en el que existen más de 1250 especies descritas (Lom y Dyková, 1995). Constituyen un grupo de organismos mayoritariamente endoparásitos, raramente intracelulares, que afectan sobre todo a peces marinos y dulceacuícolas y, en menor proporción, a otros vertebrados poiquilothermos acuáticos. Además, se han señalado raramente en invertebrados (Kudo, 1920; Weidner y Overstreet, 1979; Desser y cols., 1986; Canning y cols., 1996; Okamura y cols., 1996; Anderson y cols. 1999, Longshaw y cols., 1999).

Algunos mixosporidios son responsables de importantes patologías con grandes pérdidas económicas. Por ejemplo, las infecciones por varias especies del género *Kudoa* son causantes, tanto en la industria de la acuicultura como en la de pesquerías, de que lotes enteros de peces deban ser desechados, debido a la licuefacción *postmortem* del músculo provocada por los enzimas proteolíticos del mixosporidio, así como a la presencia de quistes (Renon y cols., 1996; Moran y cols., 1999). Este fenómeno se ha asociado especialmente a infecciones por *K. cupleidae* en arenques atlánticos, *K. histolytica* en caballas atlánticas, *K. musculoliquefaciens* en peces espada, así como *K. paniformis* o *K. peruvianus* en merluzas (Moran y cols., 1999). Otros mixosporidios pueden provocar la muerte de lotes completos de peces, como *Ceratomyxa shasta* (Bartholomew y cols., 1989a), *Myxobolus cerebralis* (Markiw, 1992) y PKX (Clifton-Hadley y cols., 1986a) en salmónidos cultivados, *Sphaerospora renicola* en ciprínidos (Lom y Dyková, 1995), o un mixosporidio similar a *Myxidium* sp. en rodaballos (Branson y cols., 1999)

En cuanto a su posición taxonómica, los mixosporidios se han clasificado tradicionalmente entre los protozoos. Tras la última revisión de este grupo, realizada por la Sociedad de Protozoólogos se incluyó, junto con la Clase Actinosporea, en el filo Myxozoa (Levine y cols, 1980). En los últimos años, las evidencias de que algunos miembros de la Clase Actinosporea no son sino fases alternantes de parásitos de la Clase Myxosporea (véase apartado 4), ha llevado a reconsiderar la sistemática completa del grupo proponiéndose la supresión de la Clase Actinosporea (Kent y cols., 1994).

Asimismo, estudios realizados mediante comparación de secuencias de ADN, demostraron que diversos mixosporidios no presentaban afinidad con ningún protozoo sino con metazoos (Smother y cols., 1994; Siddall y cols., 1995; Schlegel y cols., 1996). Debido a esto, recientemente, varios autores han incluido a los mixosporidios entre los metazoos (Patterson, 1994; Cavalier-Smith, 1998). Es por ello que a lo largo de esta memoria, trataremos a los mixosporidios como una clase de metazoos.

2. Aspectos morfo-fisiológicos

2.1. La espora

Es el estadio o fase que caracteriza a este grupo, y en el que se basan tanto la taxonomía como la filogenia clásicas. Es en realidad un estadio pluricelular, y constituye la fase de dispersión y resistencia del parásito. Las esporas de *S. dicentrarchi* (Fig. 2) son subesféricas, ligeramente apuntadas anteriormente y aplastadas posteriormente (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1992a). Constan de:

- Las valvas. Envuelven a todo el conjunto y lo cierran por las líneas de sutura. Su función es dar consistencia y proteger a la espora. Según los distintos géneros y especies, el número de valvas oscila entre dos y siete, pueden ser lisas u ornamentadas, y poseer envolturas mucosas. Las de *S. dicentrarchi* son lisas y sin envoltura mucosa, unidas por una sutura fina tipo desmosoma que en los extremos anterior y posterior muestra puntos de superposición. El grosor de las valvas es de unos 45-51 nm, pero se incrementa notablemente en la sutura, especialmente en las zonas de superposición.

- Las cápsulas polares. Son estructuras especializadas típicas de los mixosporidios; su número, tamaño y posición varían según los géneros y especies. En el caso de *S. dicentrarchi* son piriformes, de igual tamaño y se abren en el polo anterior. En su interior contienen un filamento enrollado 4 ó 5 veces en espiral, el filamento polar, que puede descargarse violentamente ante determinados estímulos y que, se supone, constituye el anclaje de la espora en

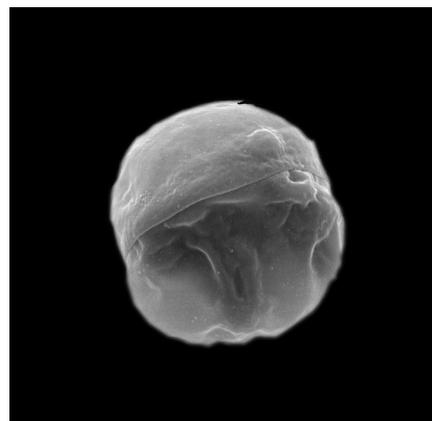


Fig 2. Imagen al microscopio de barrido de una espora de *Sphaerospora dicentrarchi*. Foto modificada de Palenzuela (1996).

los tejidos a infectar. El ápice de cada cápsula esta coronado por una estructura granulosa denominada tapón, que impide la extrusión del filamento.

- Los esporoplasmas. Son las células germinativas de la espora. Se supone que al liberarse del resto de la espora pueden penetrar en los tejidos del hospedador, comenzando un nuevo ciclo. El género *Sphaerospora* posee un único esporoplasma binucleado que ocupa la mayor parte del volumen de la espora.

2.2. *Estadios de desarrollo*

Los estadios vegetativos de los mixosporidios se denominan trofozoitos, pueden ser plasmodiales o pseudoplasmodiales, y presentar diversos tamaños y formas, pudiendo llegar a alcanzar un tamaño de varios cm. Estos estadios adoptan múltiples formas durante su desarrollo en el pez. La presencia de células que contienen a otras células es típica de estas formas de los mixosporidios, y ocurre regularmente durante su ciclo vital (Lom, 1987). El citoplasma de las formas vegetativas contiene la mayoría de los orgánulos típicos de los eucariotas, excepto los centriolos. La membrana plasmática es unitaria y puede formar papilas o microvellosidades que incrementan la superficie de intercambio. En el caso de *S. dicentrarchi*, no se ha descrito completamente el desarrollo y la morfología de sus estadios inmaduros, en parte debido a su pequeño tamaño. No obstante, se ha observado la existencia de estadios bi- y tricelulares, así como la presencia de diesporoblastos con dos esporas en desarrollo.

3. Localización

Según el género y la especie, los mixosporidios presentan diferentes localizaciones. *S. dicentrarchi* es típicamente histozoica, con una amplia distribución en los órganos de la lubina. No obstante, la vesícula biliar y el intestino son los órganos parasitados con más frecuencia e intensidad. Las esporas se encuentran formando agrupaciones a modo de bolsas esféricas o haces fusiformes (Fig. 3), o bien dispersas a modo de infiltración en el tejido

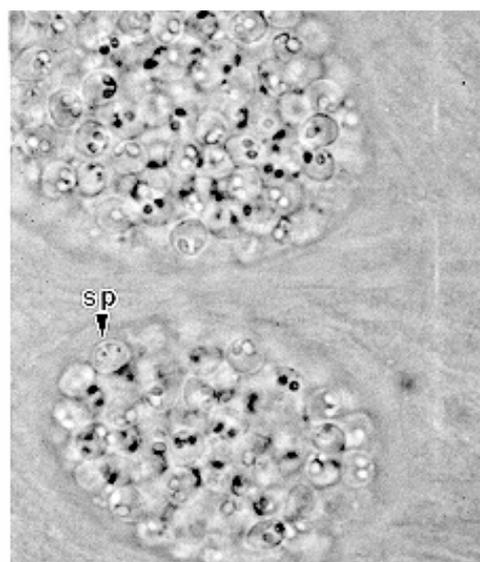


Fig. 3. Bolsas de esporas (sp) de *Sphaerospora dicentrarchi* en vesícula biliar. Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero (1992a).

del hospedador. Las esporas ocupan la capa muscular de la vesícula biliar e intestinos, aunque también pueden detectarse en el tejido conectivo subepitelial y en los epitelios vesicular, intestinal y renal. En otros órganos, el parásito se sitúa preferentemente en el tejido conectivo o en la serosa, como se ha observado en vejiga natatoria, riñón anterior, bazo, hígado, páncreas, gónada, etc.

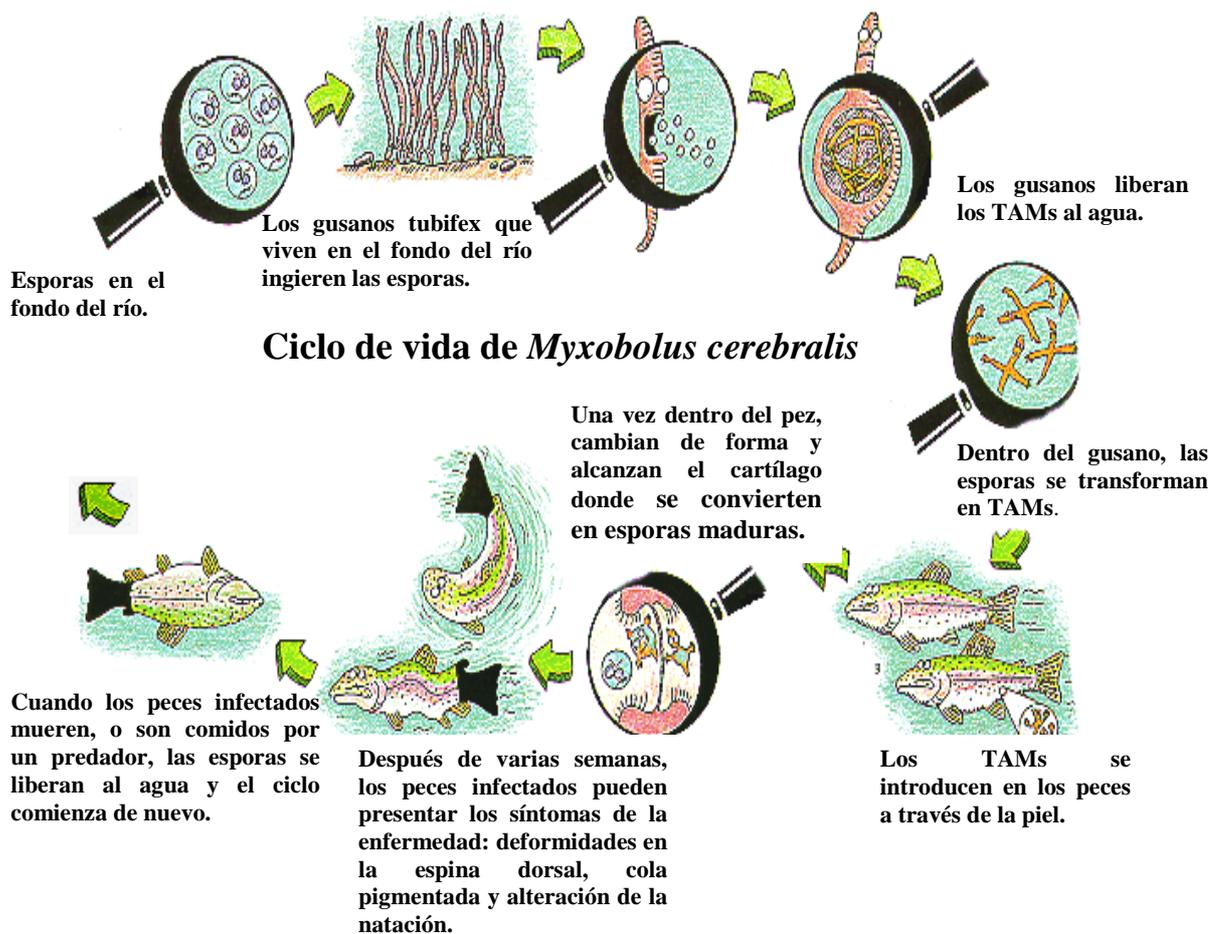


Fig.4. Ilustración modificada de Randy Bright. Montana Fish, Wildlife and Parks. TAM= triactinomixon.

4. Ciclo de vida y transmisión

Desde que Thélohan descubriera el primer mixosporidio en 1895, el ciclo de vida de estos organismos ha permanecido como un enigma. Incluso hoy en día tan sólo se conoce el ciclo del 1% de las especies de mixosporidios descritas. Hasta 1984, se consideraba que las esporas de los mixosporidios resultaban infectivas para nuevos peces; no obstante, todos los intentos de infección con esporas purificadas resultaron infructuosos. Este hecho se achacaba a la necesidad de cierta “maduración” de las esporas en el agua o más probablemente en el fango (Uspenskaya, 1978; Hoffman y

Putz, 1969). Esta situación se aclaró gracias a los trabajos de Markiw y Wolf, 1983 y Wolf y Markiw, 1984 con *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1906.

Estos autores demostraron que cuando el gusano oligoqueto *Tubifex tubifex* ingería las esporas de *M. cerebralis*, éstas se transformaban en un *Triactinomyxon* sp., miembro de la Clase Actinosporea (filo Myxozoa), que era el estadio infectivo para las truchas (Fig. 4). En los últimos años se ha sugerido, y en algunos casos demostrado, la existencia de ciclos heteroxenos en otros mixosporidios dulceacuícolas (Tabla 2). Estos hallazgos han llevado a la propuesta por parte de algunos autores (Kent y cols., 1994, Lom y cols., 1997) de la supresión de la Clase Actinosporea en favor de la Clase Myxosporea. Sin embargo, los escasos actinosporidios detectados hasta el momento en peces marinos (Roubal y cols., 1997) no se han podido asociar a un mixosporidio determinado. De hecho, existe todavía una gran controversia en torno al ciclo de vida de estos organismos. Por una parte, existen datos sobre la posible transmisión directa de *M. cerebralis* (Hoffman y cols., 1962; Uspenskaya, 1984) y de otras especies, como *Sphaerospora renicola* (Odening, 1989) y *Myxidium leei* (Diamant, 1997). En segundo lugar, Kent y cols. (1994) señalaron que algunas especies de *Tetractinomyxon*, presentes en sipuncúlidos, podrían no tener su correspondiente mixosporidio en un vertebrado. En tercer lugar, varios autores han descrito mixosporidios en invertebrados (Kudo, 1920; Overstreet, 1976; Weidner y Overstreet, 1979; Dessler y cols., 1986; Korczynski, 1988; Canning y cols., 1996; Okamura y cols., 1996; Anderson y cols., 1999), lo que sugiere que estos parásitos podrían no necesitar un vertebrado para completar su ciclo de vida. En cuarto lugar, estudios preliminares sugieren que la transmisión de *Kudoa ovivora*, que parasita el ovario de la azuleja (*Thalassoma bifasciatum*), podría ocurrir a través de la ingestión de huevos infectados (Swearer y Robertson, 1999). Por último, puesto que estudios recientes evidencian que la reproducción sexual de *M. cerebralis* tiene lugar en el oligoqueto (El-Matbouli y Hoffman, 1998), algunos autores sugieren que podría existir una transmisión directa de los actinosporidios entre los oligoquetos (Lester y cols., 1998), aunque no se ha demostrado todavía.

En el caso de *Sphaerospora dicentrarchi* resultaron infructuosos los intentos de transmisión directa por medio de la inoculación de tejidos infectados, por contacto con peces infectados o por contacto con agua supuestamente contaminada (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1990b), lo que parece abogar por la existencia de un ciclo heteroxeno.

Tabla 2. Mixosporidios en los que se ha demostrado o sugerido un ciclo de vida heteroxeno.

Mixosporidio	Pez	Oligoqueto/Poliqueto	Actinosporidio	Ref.
Familia Myxobolidae				
<i>Myxobolus arcticus</i> ^a	Salmón	<i>Stylodrilus heringianus</i>	Triactinomixon	12
<i>M. bramae</i> ^d	Gallineta	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomixon	10
<i>M. carassii</i> ^a	Carpín	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomixon	9
<i>M. cerebralis</i> ^{b,c}	Trucha	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomixon	21
<i>M. cotti</i> ^a	Cavilat	Varias especies	Triactinomixon	7
<i>M. cultus</i> ^a	Carpín	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Raabeia	24
<i>M. dispar</i> ^d	Carpa	<i>Tubifex tubifex</i>	Raabeia	14
<i>M. drjagini</i> ^d	Carpa	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomixon	4
<i>M. hungaricus</i> ^d	Brema	<i>Tubifex tubifex</i> <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Triactinomixon	5
<i>M. pavlovskii</i> ^a	Carpa	Varias especies	Hexactinomixon	17
<i>M. portucalensis</i> ^d	Anguila	<i>Tubifex tubifex</i>	Triactinomixon	6
<i>M. pseudodispar</i> ^d	Bermejuela	<i>Tubifex tubifex</i> <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Triactinomixon	19
<i>Myxobolus</i> sp. ^a	Carpín	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Raabeia	22
<i>Thelohanellus hovorkai</i> ^b	Carpa	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Aurantiactinomixon	18, 25
<i>T. nikolskii</i> ^d	Carpa	<i>Tubifex tubifex</i>	Aurantiactinomixon	18
Familia Sphaerosporidae				
<i>Hoferellus carassii</i> ^a	Carpín	Varias especies	Aurantiactinomixon	8
<i>H. carassii</i> ^a	Carpín	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Neoactinomixon	23
<i>H. cyprini</i> ^a	Carpa	<i>Nais</i> sp.	Sin identificar	11
PGD mixosporido ^a	Pez gato	<i>Dero digigata</i>	Aurantiactinomixon	3
<i>Henneguya exilis</i> ^c	Pez gato	<i>Dero digigata</i>	Aurantiactinomixon	13
<i>Sphaerospora renicola</i> ^d	Carpa	<i>Branchiura sowerbyi</i> <i>Tubifex tubifex</i>	Neoactinomixon	15
<i>S. truttae</i> ^a	Salmón	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Echinactinomixon	16
Familia Ceratomyxidae				
<i>Ceratomyxa shasta</i> ^{b,c}	Trucha	<i>Manayunkia speciosa</i>	Tetractinomixon	1
Familia Myxidiidae				
<i>Myxidium giardi</i> ^b	Anguila	<i>Tubifex tubifex</i>	Aurantiactinomixon	2
<i>Zschokkella</i> sp. ^a	Carpín	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Echinactinomixon	22
<i>Z. nova</i> ^d	Carpín	<i>Tubifex tubifex</i>	Sin identificar	20

5. Epidemiología

En la mayoría de las parasitosis descritas en peces marinos, la prevalencia de infección es más elevada entre los peces cultivados que en los silvestres, aunque la diversidad de la parasitofauna es menor (Lom, 1984). En el caso de *Sphaerospora dicentrarchi*, se han descrito niveles de infección más altos en lubinas silvestres que en cultivadas (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993c). Una posible explicación es que los estadios infectivos podrían ser más abundantes en el medio natural, o que el contacto entre el hipotético hospedador intermediario y las lubinas sería mayor en el medio natural que en las instalaciones piscícolas.

Se ha descrito una relación positiva entre la edad del hospedador y la prevalencia de *S. dicentrarchi* (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993c). Este mismo fenómeno se ha señalado para otros parásitos. Según Holloway (1987), esto podría ser simplemente el reflejo de que, cuanto mayor es el pez, mayor es la probabilidad de que entre en contacto con el parásito y resulte infectado. Con respecto al sexo del hospedador, en el caso de infecciones por *S. dicentrarchi*, ambos sexos parecen ser igualmente susceptibles a esta esferosporosis (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993c). Varios autores han descrito variaciones estacionales en la prevalencia de mixosporidios. En general, se considera a la temperatura como un factor que afecta tanto al desarrollo del parásito como al estado inmunitario del hospedador. En el caso de *S. dicentrarchi*, parece existir una tendencia al aumento de la prevalencia cuando aumenta la temperatura (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993). Esta tendencia se ha observado igualmente en carpas parasitadas por *S. renicola* (Grupcheva y cols,



^a Demostrada la transmisión experimental de la infección desde el actinosporidio (o desde el oligoqueto o poliqueto infectado con actinosporidio) al pez. ^b Demostrado el ciclo completo. ^c Identidad molecular confirmada. ^d Demostrada la transmisión experimental de la infección desde las esporas del mixosporidio al oligoqueto o al poliqueto.

1= Bartholomew y cols. (1997), **2=** Benajiba y Marques (1993), **3=** Burtle y cols. (1991), Styer y cols. (1991), **4=** El-Mansy y Molnár (1997a), **5=** El-Mansy y Molnár (1997b), **6=** El-Mansy y cols. (1998), **7=** El-Matbouli y Hoffmann (1989), **8=** El-Matbouli y cols. (1992), **9=** El-Matbouli y Hoffmann (1993), **10=** Eszterbauer y cols. (1999), **11=** Grossheider y Körting (1992), **12=** Kent y cols. (1993), **13=** Lin y cols. (1999), **14=** Molnár y cols. (1999a), **15=** Molnár y cols. (1999b), **16=** Özer y cols. (1999), **17=** Ruidisch y cols. (1991), **18=** Székely y cols. (1998), **19=** Székely y cols. (1999), **20=** Uspenskaya (1995), **21=** Wolf y Markiw (1984), **22=** Yokoyama y cols. (1991), **23=** Yokoyama y cols. (1993), **24=** Yokoyama y cols. (1995), **25=** Yokoyama (1997).

1985) y en peces infectados con *Myxidium rhodei* y *Myxobolus bramae* (Izyumova, 1987). Por el contrario, en el caso de *Ceratomyxa* spp. de la lubina, esta relación entre la temperatura y el grado de parasitación es inversa (Álvarez-Pellitero y Sitjà-Bobadilla, 1993).

6. Efectos patógenos

Aunque en lubinas adultas, que son las que normalmente presentan los mayores grados de infección, *Sphaerospora dicentrarchi* no produce síntomas ni lesiones externas, las observaciones histológicas demuestran la existencia de daño tisular incluso en infecciones ligeras. Cuando la infección es masiva, incluso pueden aparecer lesiones macroscópicas como necrosis de los testículos. Además, puede haber una gran destrucción tisular en los órganos afectados (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993a), especialmente en el hígado, páncreas y en los testículos. A esto hay que sumar la posibilidad de una depresión de la resistencia de la lubina frente a otras infecciones parasitarias o al estrés ambiental, tal como se ha descrito en carpas parasitadas por *Sphaerospora carassi* (Molnár, 1979).

En el caso de lubinas jóvenes, en los últimos años se han observado varios casos de mortalidades elevadas en alevines de piscifactorías griegas e italianas en los que se pudo detectar una infección masiva por *S. dicentrarchi*. En algunos de estos brotes no se detectó la presencia de ninguna infección bacteriana concomitante, por lo que estas mortalidades podrían atribuirse a la presencia del parásito.

7. Tratamiento y control

Las investigaciones encaminadas al tratamiento y control de las enfermedades en la industria de la acuicultura han llevado a un abanico de posibles soluciones, desde las vacunas a la quimioterapia, especialmente en la salmonicultura. No obstante, el avance frente a las enfermedades parasitarias dista mucho del conseguido contra otros agentes infecciosos.

No se conoce tratamiento efectivo contra las mixosporosis. Se ha descrito el empleo, aunque no con mucho éxito, de algunos quimioterápicos contra estos parásitos, como es el caso de Proguanil y Clamoxyquin en la lucha contra la enfermedad del

torneo (Alderman, 1986), el toltrazuril (Mehlhorn y cols., 1988, Yokoyama y cols., 1990, Schmahl y cols., 1997) y la fumagilina. Esta última, administrada oralmente, parece que previene el desarrollo de PKX (Hedrick y cols., 1988; Higgins, 1996, 1998; Le Gouvello y cols., 1998), *Sphaerospora renicola* (Molnar y cols., 1987), *Thelohanellus kitauei* (Rhee y cols., 1993), así como los brotes de enfermedad del torneo (El-Matbouli y Hoffmann, 1991). En el caso de las esferosporosis de las lubinas, se observó que la fumagilina no era eficaz para combatir el desarrollo de infecciones avanzadas de *Sphaerospora testicularis*, aunque parecía ser válido para impedir el avance de infecciones tempranas (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1992b). No obstante, este quimioterápico no está incluido todavía entre la lista de medicamentos aprobada por la Unión Europea, ya que se desconocen las dosis mínimas que evitarían la presencia de residuos, así como los efectos tóxicos secundarios en los peces. De hecho, varios autores han descrito que una medicación prolongada con fumagilina produce pérdida de apetito y peso (Hedrick y cols., 1988; Lauren y cols., 1989, Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1992b) y anemia generalizada (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1992b).

En tanto no se disponga de un tratamiento eficaz o método de vacunación contra las mixosporosis, la prevención y control se basa sobre todo en un buen conocimiento de la enfermedad, de sus posibles vías de transmisión, así como de la respuesta inmune del hospedador y que podría ser potenciada para evitar la extensión de estas parasitosis.

Sistema inmunitario de los teleósteos: respuesta inmune frente a parásitos

En el establecimiento de una enfermedad intervienen factores dependientes del medio ambiente, del patógeno y del hospedador. En el caso de las piscifactorías, el control de los factores medioambientales resulta complicado, especialmente cuando se trata de explotaciones con jaulas en el mar, sistema por otra parte cada vez más extendido en nuestras costas. Los factores dependientes del patógeno son a veces difíciles de controlar, máxime si tenemos en cuenta el desconocimiento existente en torno a la biología y el ciclo de vida de muchos de estos organismos. Por ello, el conocimiento del sistema inmunitario del hospedador, así como de su interacción con los patógenos, nos permitiría potenciar los factores capaces de actuar contra el establecimiento de la enfermedad.

1. Generalidades

Los teleósteos son los peces más avanzados evolutivamente y, a la vez, son los más explotados por el hombre, tanto en pesquerías como en acuicultura. Como vertebrados ectotérmicos, están dotados de un sistema inmunitario bien desarrollado que, como el resto de gnatóstomos, cuenta con un timo, cuya complejidad aumenta con el grado de evolución de la especie, y un sistema vascular y linfático separados, en oposición a la vasculatura mixta de los elasmobranquios. Sin embargo, carecen de ganglios linfáticos. Por otro lado, carecen de médula ósea y el tejido linfohematopoyético del riñón, del bazo y del timo realizan las funciones de ambos (Dalmo y cols., 1997). Estos dos últimos aspectos determinan gran parte de las peculiaridades del sistema inmunitario de los teleósteos y la respuesta inmune (Zapata y Cooper, 1990). En los teleósteos, como en mamíferos, se ha descrito una respuesta inespecífica (innata) y otra específica (adquirida), capaces de actuar frente a los distintos patógenos. No obstante, y puesto que se trata de una división artificial, las interconexiones entre uno y otro tipo de inmunidad son abundantes. En una respuesta inmune primaria, el antígeno es evaluado desde un punto de vista biológico por parte de los componentes de la inmunidad innata. Si es considerado como antígeno, será presentado a los integrantes de la sistema inmune que darán lugar a la expansión clonal

de los linfocitos, que reconocerán al antígeno con un alto grado de especificidad. En el caso de los teleósteos, la importancia relativa de la inmunidad innata y la adquirida en el conjunto de su sistema difiere respecto a los vertebrados homeotermos. La primera es particularmente importante en todos los poiquilotermos, porque su inmunidad adquirida se desarrolla más lentamente. En mamíferos y aves, el tiempo necesario para crear una defensa es de 48 horas, mientras que en los peces puede variar de 7 a 14 días, dependiendo de la temperatura ambiental. Por tanto, el animal necesita algún mecanismo para retrasar el establecimiento y desarrollo de los patógenos hasta que se produzca la respuesta específica. Esto explicaría, en parte, el hecho de que los peces conserven un gran número de mecanismos de defensa humorales no específicos que pueden encontrarse en invertebrados (Alexander e Ingram, 1992).

La primera barrera de defensa que poseen los peces frente a patógenos es de tipo físico y la forman las escamas y las células queratinizadas. Las secreciones mucosas, que incluyen proteasas, lisinas y aglutininas, constituyen la segunda línea de defensa de la respuesta inmune. Una vez el agente infectante ha superado estas primeras barreras, la sangre y la linfa pueden constituir su medio de transporte hasta su destino final. A este nivel entran en acción sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano como las transferrinas, lisinas, proteinasas, lectinas, inhibidores enzimáticos e interferón. La mayoría de los parásitos potenciales serán destruidos por los elementos inespecíficos, mientras que otros tan sólo serán frenados el tiempo suficiente para que se produzca la respuesta específica.

2. La respuesta inmune innata o inespecífica

2.1. *La respuesta celular*

Los principales mecanismos de la inmunidad celular no específica son la fagocitosis, la citotoxicidad y la formación de quistes.

2.1.1. Fagocitosis

En los peces teleósteos, al igual que en mamíferos, hay dos tipos celulares que comúnmente tienen capacidad fagocítica: los granulocitos neutrófilos y los fagocitos mononucleares (monocitos, macrófagos). Sin embargo, existe una gran variación respecto a la importancia de cada tipo celular según la especie considerada (Hightower

y cols., 1984; MacArthur y Fletcher, 1985) e incluso se ha observado actividad fagocítica en los eosinófilos de algunas especies, como *Fundulus heteroclitus* (Roszell y Anderson, 1994), lubina estriada (*Morone saxatilis*) (Bodammer, 1986) y dorada (Calduch-Giner y cols., 1997). Al igual que en los mamíferos, se suceden en la fagocitosis los siguientes pasos: quimiotaxis, adherencia, ingestión, destrucción del patógeno o diana y expulsión del material de desecho por exocitosis. Las células fagocíticas destruyen los organismos englobados mediante dos tipos de defensa, la aerobia y la anaerobia. La defensa aerobia está ligada al estallido respiratorio. Durante este proceso, descrito tanto en monocitos como en neutrófilos, empleando NADPH o NADH como dador de electrones, se reduce un electrón del oxígeno para formarse el radical superóxido (O_2^-), el cual dismuta a peróxido de hidrógeno espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD), produciéndose una nueva molécula de oxígeno.

Se ha demostrado la activación del estallido respiratorio de los fagocitos de los peces mediante partículas de zymosan (Edwards y cols., 1992), varias especies de bacterias como *Mycobacterium* spp. (Chen y cols., 1998) y extractos de parásitos como *Diplostomum spathaceum* (Whyte y cols., 1990). Los anticuerpos y el complemento también pueden activarlo.

La defensa anaerobia comporta la acción de diversas enzimas microbicidas, como la lisozima, y otros enzimas contenidos en los gránulos citoplasmáticos y lisosómicos. En el interior del lisosoma se producen cambios de pH. Un aumento transitorio del pH favorece la unión de proteínas catiónicas a la pared celular de las bacterias y daña la capa externa lipídica de los organismos gram-negativos. El posterior descenso del pH en el lisosoma destruye estos organismos.

Los fagocitos responden a estímulos que aumentan su capacidad para fagocitar y destruir los patógenos. Entre las sustancias que pueden activar a los fagocitos, se incluyen linfoquinas, opsoninas (como los anticuerpos) y otros componentes humorales. Sustancias estimulantes exógenas como el levamisol o los glucanos también pueden estimular a los fagocitos (Sveinbjørson y Seljelid, 1994). Asimismo, se ha demostrado que las inyecciones de preparaciones de bacterias o de parásitos activan los macrófagos peritoneales.

Los macrófagos peritoneales son capaces de fagocitar a *Cryptobia salmositica* (Woo, 1979) y a *C. bullocki* (Sypeck y Burreson, 1983). La fagocitosis también resulta efectiva contra las esporas de los microsporidios *Glugea anomala* (Dyková y Lom,

1978), *G. plecoglossi* (Dyková y cols., 1980) y *Tetramicra brevifilum* (Figueras y cols., 1992). También se ha sugerido su importancia en la mixosporosis testicular de la lubina debida a *Sphaerospora testicularis* (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993b).

Además de la fagocitosis, las células fagocíticas también tienen una función adicional al interactuar con los linfocitos, constituyendo un nexo entre la respuesta celular y la humoral.

2.1.2. Citotoxicidad

Es la capacidad de ciertas subpoblaciones de células linfoides, y a veces de las células mieloides, para lisar células diana, a las que se unen estrechamente. En los peces, las células citotóxicas naturales (NCC) son de gran importancia en la resistencia a infecciones por protozoos. Un ejemplo de esta citotoxicidad lo encontramos en las infecciones producidas por el ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (Evans y Jaso-Friedman, 1992).

2.1.3. Formación de quistes

Cuando el sistema inmunitario no puede eliminar por completo al parásito, el hospedador desarrolla una serie de reacciones conducentes a localizarlo, suprimir su actividad y evitar su difusión, que generalmente desembocan en la formación de quistes que aíslan al parásito. Tanto los ecto- como los endoparásitos son capaces de generarlos, aunque son más comunes contra estos últimos. En cuanto a los mixosporidios, la encapsulación se produce en los órganos en los que existe tejido conectivo. Esta encapsulación se ha descrito con frecuencia, particularmente en la enfermedad del torneo, producida por *Myxobolus cerebralis*. Sin embargo, las esporas contenidas en el interior del quiste pueden permanecer viables durante años y, por tanto, la encapsulación no siempre implica la destrucción del parásito. Tampoco parece tener éxito el enquistamiento contra las infecciones por el género *Kudoa*, ya que algunos estadios del desarrollo producen enzimas histolíticos que destruyen la cápsula y el tejido muscular adyacente, produciendo un reblandecimiento de la masa muscular, causante de elevadas pérdidas, tanto en pesquerías como en acuicultura. En otras ocasiones, aunque se evita la difusión del parásito, y de hecho éste es destruido en el interior del granuloma, los residuos celulares resultantes, no son del todo reabsorbidos, quedando de forma permanente en el tejido a modo de cicatrices. Este es el caso de los

testículos de lubina afectados por *Sphaerospora testicularis*, cuya superficie germinativa, capaz de producir espermatozoides, queda considerablemente reducida tras una infección masiva (Sitjà-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 1993b).

2.2. La respuesta humoral

Dependiendo del tipo de acción que ejercen sobre los patógenos, se pueden distinguir sustancias inhibitoras del crecimiento bacteriano, inhibidores enzimáticos, sustancias causantes de lisis celular, aglutininas y precipitinas.

2.2.1. Inhibidores del crecimiento bacteriano o vírico

Son sustancias que interfieren el desarrollo de los microorganismos mediante la disminución de la disponibilidad de determinados nutrientes o interrumpiendo alguna vía metabólica. En peces se ha demostrado la existencia de apotransferrina, ceruloplasmina y metalotioneína, proteínas con capacidad para unirse a determinados iones, imprescindibles para el crecimiento bacteriano. Parece ser que una de estas proteínas, la metalotioneína, además, puede unirse a la membrana plasmática de los macrófagos induciendo en ellos el estallido respiratorio y la transducción de la señal.

El interferón (IFN) es una proteína capaz de inhibir la replicación vírica. En mamíferos existen dos tipos, el tipo I que incluye IFN- α y IFN- β , y el tipo II o IFN- γ . El tipo I ha sido descrito en varios peces, y parece jugar un importante papel las infecciones víricas (Rogel-Gaillard y cols., 1993), lo que compensaría el hecho de que los peces sean tan lentos en su respuesta inmune específica, especialmente a bajas temperaturas. El IFN tipo II es producido por los linfocitos T tras ser estimulados por un antígeno. Es considerado un potente factor activador de los macrófagos (MAF), capaz de aumentar su metabolismo oxidativo y su actividad antimicrobiana. Aunque se ha negado su existencia en peces durante mucho tiempo, se ha demostrado que los leucocitos de algunos peces, como la trucha arcoiris (Graham y Secombes, 1990), el carpín (Neumann y cols., 1995), y la dorada (Mulero y Meseguer, 1998), producen MAF después de la estimulación antigénica.

2.2.2. Inhibidores enzimáticos

Son sustancias, predominantemente antiproteasas, cuya función es destruir o inactivar los enzimas liberados, bien por las propias células del hospedador una vez han

muerto, o bien por los parásitos u otros patógenos al digerir los tejidos del hospedador. Algunos inhibidores enzimáticos se han descrito ya en peces, como es la α -2-macroglobulina. Se trata de una antiproteasa cuya acción parasiticida se ha demostrado sobradamente en los mamíferos, y muy especialmente en las tripanosomiasis (Araujo y cols., 1992), esquistosomiasis (Truden y Boros, 1988) y amebiasis (Lushbaugh y cols., 1981). Su papel en las parasitosis de los peces se ha demostrado en infecciones por *Cryptobia salmositica* (Zuo y Woo, 1997). Los inhibidores de las proteasas también interactúan con la parte específica del sistema inmunitario mediante la modulación de la presentación antigénica.

2.2.3. Sustancias causantes de lisis celular

Entre ellas se encuentran las hidrolasas (como la lisozima), las proteasas, y las lisinas no específicas. Estas últimas comprenden los factores líticos naturales y el complemento.

La lisozima es un enzima mucolítico, que actúa contra los agentes infecciosos de varias formas, pero principalmente atacando a los mucopolisacáridos presentes en la pared celular de las bacterias gram-negativas (Lie y cols., 1989). En los peces se ha descrito su presencia en la mayor parte de los tejidos y secreciones, especialmente en los expuestos a bacterias y ricos en leucocitos, como el riñón, bazo, mucus, tracto alimentario, suero y branquias (Fänge y cols. 1976). Varios autores han descrito un aumento en los niveles de lisozima en peces infectados o inmunizados, como es el caso de carpas infectadas por *Aeromonas salmonicida* (Siwiki y Studnicka, 1987), o de truchas infectadas (Chen y cols., 1996) o inmunizadas con *Mycobacterium* spp. (Chen y cols., 1998).

El complemento es un sistema compuesto por un grupo de proteínas del suero, que interviene tanto en la defensa humoral inespecífica como en la específica, actuando conjuntamente con células fagocíticas y linfocitos para aumentar sus funciones específicas y efectoras. Sus principales funciones son la activación celular, la citolisis, y el recubrimiento de las células diana (opsonización) para potenciar su fagocitosis. En los peces, se conoce la existencia de un sistema de proteínas similar al complemento de mamíferos, con dos cascadas enzimáticas interrelacionadas, la vía clásica y la vía alternativa. Se ha demostrado la existencia de factores C3 y C4 (Dodds y cols., 1998; Sunyer y cols., 1998). No obstante, todavía no se han podido identificar todos los

componentes de la serie proteica C1 a C9. Varios autores han descrito el papel del complemento en infecciones producidas por *Aeromonas salmonicida* (Marsden y cols., 1996) y por *Gyrodactylus derjavini* (Buchmann, 1998).

3. Respuesta inmune adquirida o específica

Cuando son expuestos a un antígeno, los peces al igual que los vertebrados superiores, producen anticuerpos específicos, con propiedades biológicas como la aglutinación, precipitación, fijación del complemento, opsonización y sensibilización dérmica. De hecho, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales específicos contra inmunoglobulinas (Ig) de peces se ha demostrado la existencia de linfocitos B en muchas especies de teleósteos (Magnadottir y cols., 1996; Scapigliati y cols., 1996). La mayor parte del conocimiento actual acerca de la función de los linfocitos de los peces demuestra que tienen funciones equivalentes a los linfocitos B y T descritos en los mamíferos.

Como comentábamos anteriormente, los fagocitos presentan, además de su función típicamente fagocítica, la capacidad de interactuar con los linfocitos. Por tanto, pese a ser células inespecíficas, median en la respuesta inmune de otras células específicas. Realizan dos funciones, la presentación antigénica y la estimulación de los linfocitos T:

- La presentación antigénica: Se ha demostrado la correlación directa entre la captación antigénica y la degradación por parte de los macrófagos, con la subsiguiente inducción de una respuesta inmune específica contra dicho antígeno. El procesado antigénico comporta una serie de procesos bioquímicos que dan lugar a la exposición de epítomos. Estos antígenos con la conformación alterada son reconocidos por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility complex, MHC). En mamíferos, las moléculas del MHC de clase I y II juegan un papel crucial en la presentación de proteínas antigénicas extrañas, a las células T citotóxicas y las células T colaboradoras, respectivamente. Todos los datos actuales parecen sugerir la existencia de un sistema MHC funcional en los peces. Parecen existir muchos loci y alelos para ambas clases de moléculas del MHC, aunque el desconocimiento de los loci funcionales impide hoy por hoy determinar su número exacto en cada especie.

- La estimulación de los linfocitos T: Se ha demostrado que los monocitos y los macrófagos estimulados con LPS, liberan factores solubles con actividad interleuquinica.

La respuesta humoral específica en los peces difiere de la de los mamíferos en algunas características, mientras que otras todavía se deben dilucidar:

- La producción de anticuerpos es dependiente de la temperatura (Rijkers y col, 1980; Miller y Clem, 1984).
- La respuesta secundaria o memoria inmunológica de los teleósteos comparte con la de los mamíferos el aumento del título de anticuerpos, la aceleración de la respuesta y el aumento de la sensibilidad al antígeno. Pero carece de alguna de las características propias de los mamíferos, como es el hecho de que no se produzca el cambio a otros tipos de Igs, es decir no se pasa a un rápido predominio de Ig de bajo peso molecular (IgG) (Wilson y Warr, 1992), ya que en los teleósteos sólo existe un tipo reconocido de Ig, las IgM.

Son varias las parasitosis en las que se ha descrito una adquisición de resistencia a la reinfección en los peces que sobreviven a una primera infección. Los anticuerpos específicos son los responsables de esta inmunización en las infecciones por los flagelados *Amyloodinium ocellatum* (Smith y cols., 1992), *Ichthyobodo necator* (Robertson, 1979), *Cryptobia salmositica* (Jones y Woo, 1987), *Cryptobia bullocki* (Burreson y Fritzell, 1986) y *Trypanosoma danilewskyi* (Woo, 1981), y el ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (Burkart y cols., 1990). En el caso del mixosporidio PKX, los peces que se recuperan de la enfermedad proliferativa del riñón (PKD), son más resistentes a la reinfección o no muestran signos clínicos de la enfermedad cuando son reinfectados (Clifton-Hadley y cols., 1986b).

Los anticuerpos específicos pueden dañar directamente a los parásitos, como es el caso de los anticuerpos aglutinantes e inmovilizantes de las dinosporas de *Amyloodinium ocellatum* (Smith y cols., 1993), y de los anticuerpos inmovilizantes de *Ichthyophthirius multifiliis* (Dickerson y Clark, 1989). Los anticuerpos también actúan mediante la interacción con el complemento. Experiencias *in vitro*, han demostrado que los anticuerpos fijadores del complemento por la vía clásica son causantes de la lisis de *Cryptobia salmositica* (Feng y Woo, 1997). Burreson y Fritzell (1986) encontraron también anticuerpos fijadores del complemento en platijas infectadas de forma natural por el hemoflagelado *Trypanoplasma bullocki*.

Son muchas las parasitosis en las que se desconoce si hay producción de anticuerpos específicos o si estos son de algún modo efectivos contra el patógeno. Tal es el caso de los mixosporidios. Durante años se consideraba a los mixosporidios incapaces de generar respuesta inmune en sus hospedadores (Lom, 1987). Sin embargo, las observaciones histopatológicas indican que estos organismos ciertamente generan reacciones inmunes, que en ocasiones, se convierten en el principal daño, como es el caso del PKD en los salmómidos (MacConell y cols., 1989). No obstante, los resultados concernientes a la detección de anticuerpos específicos contra mixosporidios son escasos y en ocasiones, contradictorios. Griffin y Davis (1978) detectaron anticuerpos circulantes en trucha contra *Myxosoma cerebralis*, pero ni Pauley (1974), ni Halliday (1974) pudieron detectar respuesta humoral alguna contra ese parásito. En algunos casos, se cree que el parásito elude la respuesta humoral imitando los antígenos del hospedador (McArthur y Sengupta, 1982), aunque otros autores citan la posibilidad de que el parásito se recubra de antígenos del hospedador, que se adsorben a la superficie, haciendo imposible su identificación como material foráneo. Bartholomew y cols. (1989a) no encontraron anticuerpos circulantes en la trucha arco iris contra ningún estadio de *Ceratomyxa shasta*. En cambio, Furuta y cols., (1993), detectaron anticuerpos circulantes en la carpa (*Cyprinus carpio*), infectada naturalmente por *Myxobolus arcticus*.

II. Objetivos del trabajo

El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la respuesta inmune de la lubina frente a *Sphaerospora dicentrarchi*, a través de:

1° Caracterización antigénica de *Sphaerospora dicentrarchi*, y análisis de la presencia de terminales carbohidrato.

2° Estudio de la modulación *in vitro* de la actividad de los leucocitos de la lubina por el parásito.

3° Evaluación de algunos aspectos de la interacción del sistema inmunitario y el sistema endocrino, y de la influencia de la parasitación por *S. dicentrarchi* en esta interacción.

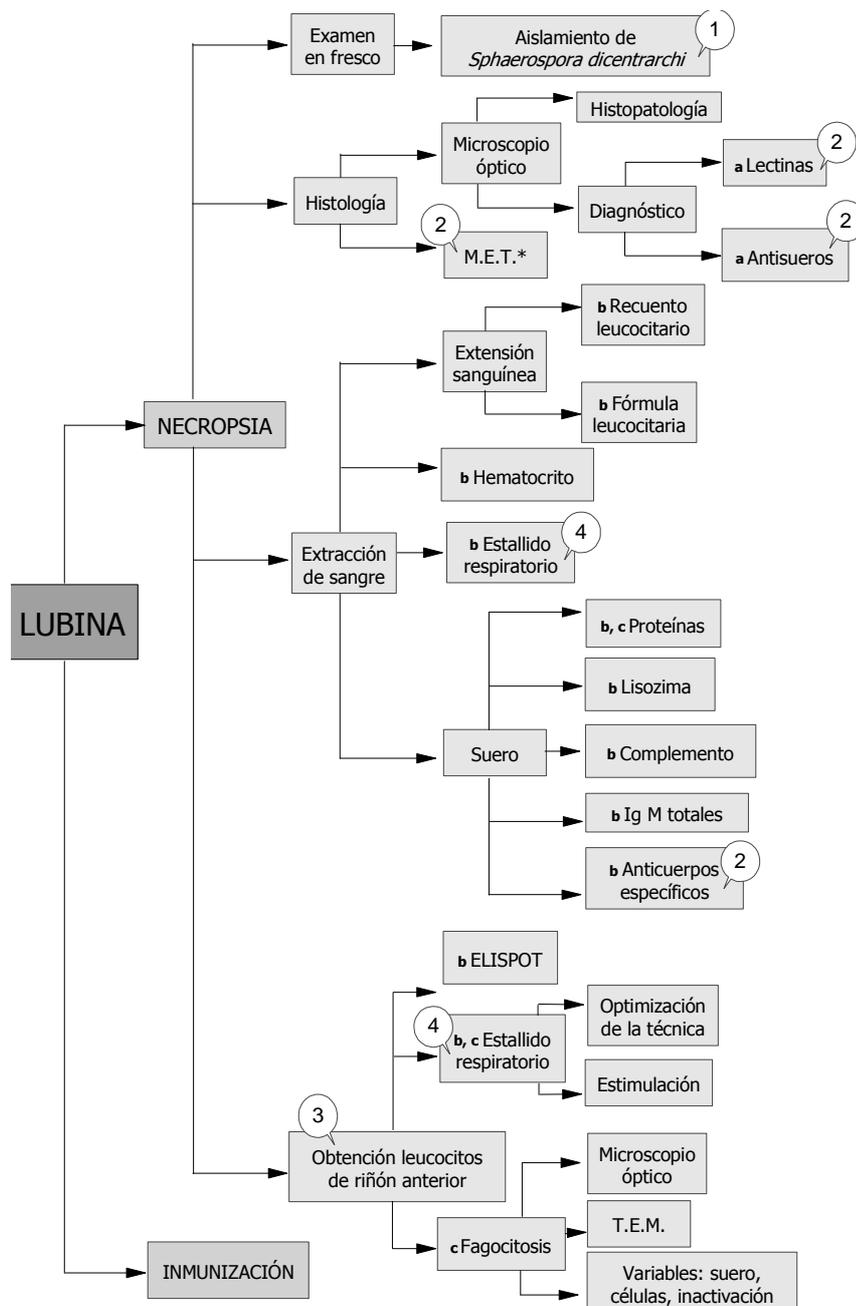
4° Estudio del efecto de la inmunización de lubinas con esporas de *S. dicentrarchi* sobre el sistema inmune específico e inespecífico.

Para lograr estos objetivos se realizaron una serie de experimentos que dieron lugar a ocho artículos publicados, o en consideración, en revistas de reconocido prestigio internacional. Estos artículos aparecen recopilados al final de esta memoria.

III. Materiales y métodos

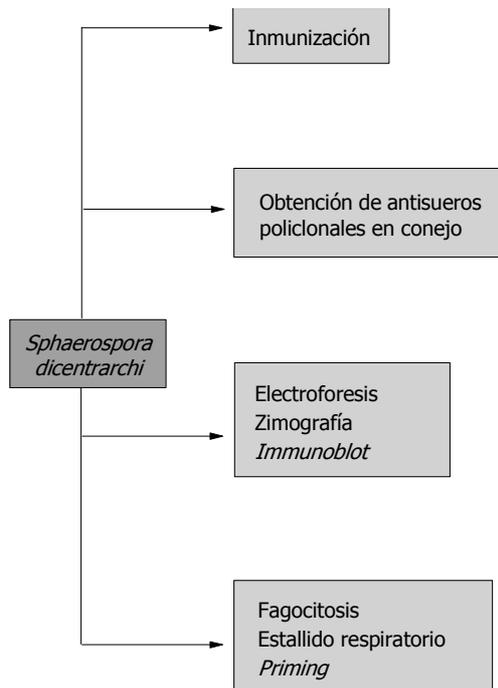
Para llevar a cabo los objetivos de este trabajo fue necesario poner a punto algunas técnicas y seguir una metodología que aparece descrita en cada uno de los artículos incluídos al final de esta memoria. Dicha metodología se muestra esquematizada en las figuras 5 y 6. Aquellas técnicas que se usan con mayor frecuencia en estos trabajos, o incluyen alguna modificación frente a las usadas por otros autores, o bien se pusieron a punto en estos trabajos, se explican con más detalle a continuación.

Fig 5. Diagrama esquemático de la metodología empleada en esta memoria.



* M.E.T. = microscopio electrónico de transmisión.

Fig. 6 Diagrama esquemático de las técnicas en las que se emplearon esporas purificadas de *Sphaerospora dicentrarchi*.



1. Aislamiento y purificación de *Sphaerospora dicentrarchi*

Ante la imposibilidad de infectar peces experimentalmente con *Sphaerospora dicentrarchi*, así como de realizar su cultivo *in vitro*, se muestrearon lubinas de diversas procedencias, para la obtención de cantidades suficientes de este parásito. En dichos muestreos se extrajeron los órganos donde se localiza preferentemente este mixosporidio, intestino y vesícula biliar. La infección se diagnosticó mediante el examen de una porción de estos órganos al microscopio óptico. Los órganos infectados se limpiaron de grasa, tejido conjuntivo y otras adherencias, y se trocearon finamente. En el caso de las vesículas, se digirieron en una solución de colagenasa P (2 mg/ml, Sigma) y elastasa (0,3 mg/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) en PBS a temperatura ambiente, y, en el caso de los intestinos, se realizó la digestión en una solución de tripsina al 0,25% (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) en solución equilibrada



^a Estas técnicas se emplearon en los estudios destinados a determinar la caracterización antigénica de *Sphaerospora dicentrarchi*, mediante la verificación de su capacidad inmunógena frente a los antisueros producidos en conejos, y en los estudios destinados al estudio de su composición glucídica. ^b Estas técnicas se emplearon en los estudios sobre el efecto que tiene la inmunización de lubinas con *S. dicentrarchi* sobre el sistema inmune. ^c Estas técnicas se emplearon en los estudios sobre la modulación *in vitro* de la actividad de los leucocitos de lubina por el parásito y en los estudios sobre la interacción del sistema inmune y el sistema endocrino. Los números se corresponden con las técnicas que se van a explicar detalladamente.

de Hank sin calcio ni magnesio a 37 °C. En ambos casos las muestras se mantuvieron con agitación constante durante todo el proceso. Los tiempos de digestión se ajustaron a 3 horas, pues se observó que con digestiones más prolongadas se producía una alteración en la morfología de las esporas. Tras la digestión, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos, a 400 g y 4 °C. Los parásitos se resuspendieron en PBS fresco, y el proceso de centrifugación y lavado se repitió 3 veces más. Las suspensiones se filtraron a través de mallas de 90 y 20 μ m y por una membrana de 8 μ m cycloporeTM. Tras una última centrifugación, los parásitos se resuspendieron en aproximadamente 1ml de PBS, y se examinó una gota de la suspensión en una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración de parásitos a la adecuada para su uso posterior, y se conservaron en alícuotas a -20 °C.

2. Técnicas histoquímicas.

2.1. Microscopía óptica.

Tras la necropsia de los animales y el examen en fresco, los tejidos parasitados y los controles se fijaron en formol al 10%, se incluyeron en resina acrílica Technovit 7100 (Kulzer, Heraeus, Alemania) mediante métodos estándar y se cortaron mediante microtomo a 1,5 μ m de grosor. Los cortes se recogieron sobre portaobjetos recubiertos de Poly-L-Lisina (Sigma), para evitar su desprendimiento durante las incubaciones posteriores. Este recubrimiento se obtuvo mediante la inmersión de los portaobjetos en una solución caliente (60 °C) de gelatina-alumbre de cromo (Palacín-Forgue, 1984).

Por su superior sensibilidad sobre las técnicas convencionales, se utilizó el sistema de la avidina-biotina-peroxidasa. Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente y en cámara húmeda, para evitar la evaporación de los reactivos. Los cortes se incubaron durante 5 min en un baño de H₂O₂ al 3% en agua bidestilada, para destruir la actividad peroxidasa endógena de los tejidos. Tras lavar con tampón tris-HCL 20 mM, NaCl 0,5 M pH 7,2 (TBS), las secciones se saturaron durante 20 min con suero normal de cabra, diluído 1:50 en TBS. A continuación se siguieron distintos protocolos dependiendo de si se empleaban sueros policlonales obtenidos en conejo, suero de lubinas, o lectinas:

1° Las secciones incubadas con suero policlonal (1 h), se incubaron durante 1 h con suero de cabra anti-conejo biotinado (Fig. 7-A).

2° Las secciones incubadas con suero de lubina se incubaron 1 h con suero de conejo anti-IgM de lubina, obtenida en nuestro laboratorio por Palezuela y cols., (1996), y a continuación con suero de cabra anti-conejo biotinado (Fig. 7-B).

3° Otras secciones se incubaron durante 1 h con lectinas (Fig. 7-C).

En los tres casos el resto del procedimiento de tinción se completó con la avidina-biotina-peroxidasa (30 min), y revelado con diaminobencidina (DAB) (5 min), siguiendo las instrucciones del proveedor de los reactivos (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA). Las preparaciones teñidas se contrastaron con hematoxilina de Gill, durante 20 min en una placa calefactora (35 °C), y se lavaron para la diferenciación del tinte durante 10 min de lavado, bajo agua corriente del grifo. Los cortes se deshidrataron, se montaron en DPX, y se examinaron al microscopio óptico.

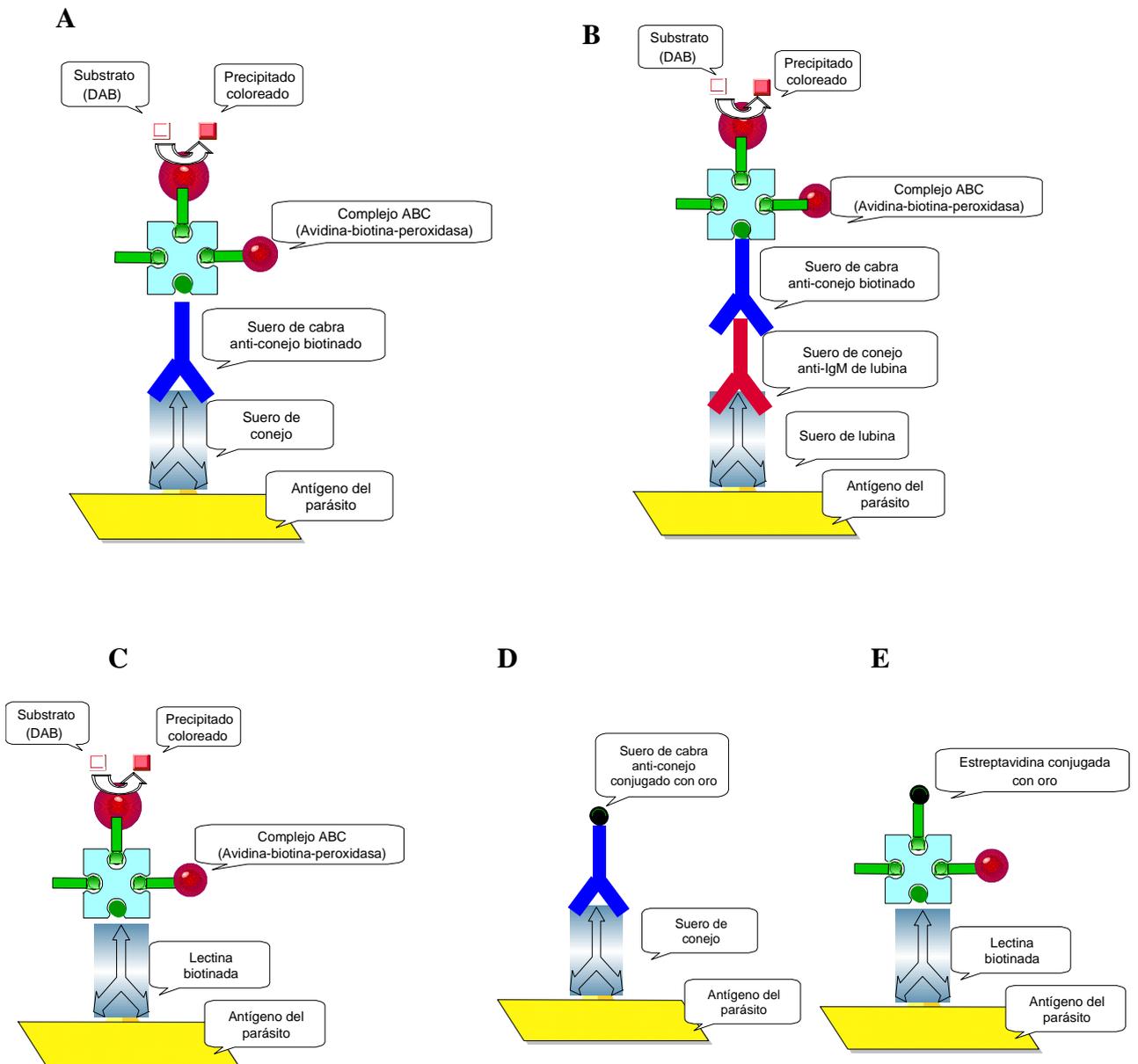
2.2. Microscopía electrónica de transmisión.

Tras el examen en fresco, los órganos parasitados se fijaron en una solución de glutaraldehído al 1% v/v y paraformaldehído al 4% w/v en tampón cacodilato 0,1M (pH 7,2, 4 °C). A continuación se postfijaron en tetraóxido de osmio al 0,1% (w/v), se deshidrataron a través de una serie de alcoholes y se incluyeron en Lowicryl K4M (Polysciences Ltd.). Se cortaron secciones ultrafinas que se recogieron en rejillas recubiertas con Formvar. Tras el bloqueo con albúmina sérica bovina (Sigma) diluída en TBS con Tween 20 al 0,05% (TTBS), las rejillas se incubaron con los antisueros o con lectinas para lo que se siguieron distintos protocolos:

- Tras la incubación durante 2 h a 20 °C con los sueros policlonales de conejo, las rejillas se incubaron 1h a 20 °C con suero de cabra anti-conejo conjugado con partículas de oro coloidal de 15 nm de diámetro. Ambos sueros se diluyeron en albúmina sérica bovina al 1% en TTBS (Fig. 7-D).
- En la técnica de detección de carbohidratos, se aplicaron a las rejillas las lectinas biotinadas y se incubaron durante toda la noche. Tras los lavados se aplicó durante 1 h una solución de estreptavidina conjugada con oro coloidal (Biocell) diluída 1:25 en Hepes 10mM (Fig. 7-E).

En ambos casos y tras los lavados con TBS y agua bidestilada, las muestras se teñieron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi H-800 o Philips CM 100).

Figura 7. Dibujo esquemático de las técnicas inmunohistoquímicas empleadas.



3. Obtención de leucocitos de riñón anterior

Para poner a punto la técnica del aislamiento y cultivo de leucocitos del riñón anterior de la lubina, se siguió un procedimiento similar al descrito en dorada por Calduch-Giner y cols., (1997). El riñón anterior se extrajo en condiciones estériles y se cortó en pequeños trozos en una placa de Petri con un pequeño volumen de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 frío. La suspensión celular resultante se decantó del tejido

no disociado. A continuación se añadió PBS hasta un volumen final de 15 ml y se dejó sedimentar 15 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 200 g durante 15 min, y el pellet se resuspendió en 2 ml de medio Leibovitz (L-15 Sigma) suplementado con 0,1% de suero fetal bovino (BioWhittaker), y se dejó sedimentar en hielo durante 15 min. Se ajustó la concentración de células del sobrenadante a la necesaria para su uso posterior.

4. Estallido respiratorio

La estimulación de la membrana de los fagocitos por diferentes antígenos (como el forbol miristato acetato (PMA, phorbol miristate acetate), desencadena el estallido respiratorio. Tal y como comentábamos en la introducción de esta memoria, empleando NADPH o NADH como dador de electrones, se reduce un electrón del oxígeno para formar O_2^- . El aumento de

los niveles de O_2^- es indicativo de la estimulación celular. Para estudiar el estallido respiratorio de los fagocitos de lubina se siguieron varios métodos, unos descritos previamente por otros autores y otros puestos a punto por

Detección de la producción de anión superóxido

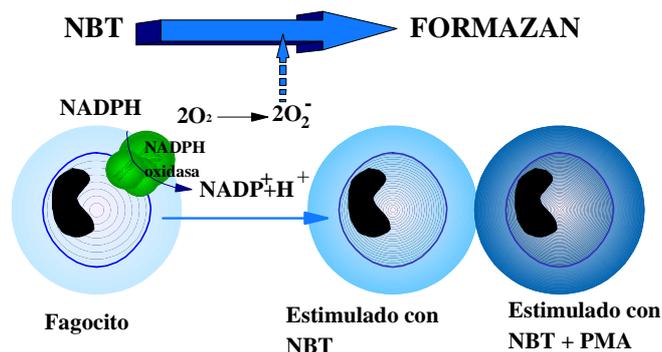


Fig. 8. Dibujo esquemático de la detección de O_2^- .

nosotros, basados todos ellos en el empleo de azul de tetrazolio (NBT; nitro blue tetrazolium). Este compuesto soluble, en presencia de O_2^- se reduce a formazán, compuesto insoluble y de color azul (Fig. 8). Las diferentes técnicas empleadas fueron:

- Por un lado se siguió un método microscópico, que expresa la proporción de células que están reduciendo NBT. Así, se midió el número de células sanguíneas positivas con la técnica del NBT, siguiendo un protocolo modificado del descrito por Anderson y cols., (1992). Para ello, se mezclaron en un portaobjetos 10 μ l de sangre con 10 μ l de NBT en L-15 sin rojo fenol (BioWhittaker) (2 mg/ml NBT, Sigma) y la mezcla se incubó en cámara húmeda durante 1 h a 20 ° C. Los portaobjetos se lavaron con PBS y se montaron con un cubreobjetos con una gota de PBS. Se contó el número de células

positivas en un área circular de 6 mm de diámetro en un microscopio invertido. Una variante de este método consistió en incubar en tubos *eppendorf* 300 μ l de una solución de NBT (1 mg/ml) en L-15 sin rojo fenol con esporas de *Sphaerospora dicentrarchi* fijadas en glutaraldehído, con eritrocitos de oveja o con PMA durante 1 a 22 °C y agitación constante. Posteriormente, se pusieron 20 μ l de esta suspensión en un portaobjetos, y se contó el número de células positivas en un área de 6 mm de diámetro, tal y como se ha descrito anteriormente.

- Por otro lado, se siguió un método cuantitativo (espectofotométrico) que consistía en incubar los leucocitos con NBT, extraer el formazán con un solvente orgánico y leer la absorbancia del extracto libre de las células en un lector de placas. En nuestros trabajos, este estudio cuantitativo del estallido respiratorio de los leucocitos de riñón anterior se realizó de dos formas.
 - 1° Se siguió el protocolo de Chung y Secombes (1988). La suspensión de leucocitos se colocó en placas de 96 pocillos (Flow, VA, USA) (100 μ l/pocillo) y las células se dejaron adherir durante 3 h o durante toda la noche, a 4 °C. Tras el tiempo de adherencia, las células no adheridas se retiraron mediante lavados con PBS. Los leucocitos se recubrieron con 100 μ l de NBT en L-15 sin rojo fenol con 5% de suero fetal bovino, a una concentración final de 1 mg/ml, con o sin PMA (1 μ g/ml), dejándose incubar 15, 30 ó 60 min. La reacción se paró mediante la fijación durante 2 min con metanol al 100%. El NBT presente en el interior de los leucocitos se solubilizó añadiendo a cada pocillo 120 μ l de una solución 2 M de KOH en agua destilada y 140 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). La densidad óptica se determinó en lector de placas a 620 nm de absorbancia.
 - 2° Se realizó esta misma técnica durante 30 min, directamente sobre la suspensión de leucocitos sin previa adherencia.

IV. Resultados y discusión

1. Composición antigénica de *Sphaerospora dicentrarchi*

En varios de los trabajos recopilados en esta memoria (artículos I-V) se trató de estudiar la composición antigénica de *Sphaerospora dicentrarchi* mediante varias técnicas, como electroforesis, *immunoblot*, e inmunohistoquímica. Asimismo, se emplearon lectinas para la detección de carbohidratos, y se produjeron antisueros policlonales contra varios mixosporidios, que permitieron estudiar la existencia de reacciones cruzadas. El objetivo de este grupo de trabajos fue estudiar la caracterización antigénica del parásito y tratar de dilucidar el posible papel de los terminales carbohidratos en el reconocimiento antigénico.

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), teñidos con azul de coomassie o nitrato de plata se observó la existencia de varias bandas antigénicas en los extractos de *S. dicentrarchi* con un peso molecular entre 21 y 130 kDa.

Con el objetivo de estudiar la antigenicidad de esas bandas se emplearon antisueros policlonales producidos en conejos. La producción de antisueros contra especies de parásitos es una herramienta útil para el estudio de muchos aspectos de su biología, así como de las interacciones parásito-hospedador. No obstante, su uso en los estudios de mixosporidios es escaso (Bartholomew y cols., 1989b; Saulnier y Kinkelin, 1996). Los trabajos recopilados en esta memoria describen el empleo de antisueros policlonales producidos en conejo, tres de ellos contra los mixosporidios de la lubina *Sphaerospora dicentrarchi* (RaSdic), *S. testicularis* (RaStest), y *Ceratomyxa labracis* (RaClab), y el cuarto contra *C. sparusaurati* (RaCspr), parásito de la dorada (*Sparus aurata*).

Cuando los extractos parasitarios transferidos a membranas de nitrocelulosa se analizaron con estos antisueros, aparecieron varias bandas. Los resultados obtenidos demostraron la homología existente entre los dos antisueros producidos frente a *Sphaerospora* spp., puesto que ambos detectaron bandas similares con un peso molecular entre 20 y 50 kDa. También se observó gran similitud entre las bandas detectadas por RaClab y RaCspr, pues ambos tiñeron bandas con un peso molecular entre 50 y 140 kDa. La banda de 50 kDa, fue reconocida por los cuatro antisueros policlonales, por lo que podría tratarse de un antígeno conservado en muchos mixosporidios.

La oxidación con periodato provoca la eliminación de los grupos hidroxilo de los terminales glucídicos sin afectar a la estructura de las cadenas polipeptídicas (Woodward y cols, 1985). En nuestro estudio, el tratamiento de las membranas de nitrocelulosa con periodato, no tuvo ningún efecto sobre el marcaje con RaSdic o RaStest, lo que podría explicarse por el hecho de que no todos los carbohidratos son sensibles al tratamiento con periodato (Woodward y cols, 1985), o porque la unión del anticuerpo no depende de un terminal carbohidrato. Por el contrario, se observó una marcada disminución en la intensidad del marcaje con RaClab y RaCspr cuando el periodato se aplicó a una concentración de 10 y 20 mM. Estas diferencias entre los sueros producidos contra *Sphaerospora* spp. y *Ceratomyxa* spp. podrían deberse a diferencias en la afinidad y especificidad de estos antisueros policlonales por los antígenos de *S. dicentrarchi*.

Los tres antisueros policlonales producidos frente a parásitos de la lubina se emplearon en inmunohistoquímica con el objetivo de detectar epítomos en las esporas y en los estadios de desarrollo de sus parásitos homólogos. Además se estudió la reacción cruzada de estos antisueros con otros mixosporidios procedentes de distintos hospedadores y distintos ambientes, así como con parásitos pertenecientes a otros grupos. Se observó que cada antisuero teñía su parásito homólogo. Asimismo, teñieron las esporas de la mayoría de los mixosporidios ensayados, aunque se encontraron diferentes patrones de tinción. Concretamente, las cápsulas polares de casi todos se marcaron con los tres antisueros. Esto revela la existencia de epítomos antigénicos conservados en las cápsulas polares de organismos pertenecientes a la Clase Myxosporidia procedentes de diferentes hospedadores, tanto de aguas continentales como marinas, y podría sugerir una composición conservada acorde con el papel análogo de las cápsulas polares en la biología de estos mixosporidios. En cuanto a los estadios de desarrollo, no se teñieron con ninguno de los antisueros ensayados, excepto los estadios inmaduros de *Zschokkella mugilis* que mostraron un punteado con RaClab y los de *S. testicularis* que se teñieron débilmente con RaStest y con RaSdic. Este diferente patrón de tinción podría deberse a un cambio en la composición antigénica durante el ciclo de vida de estos parásitos, que tendría como objetivo evadir la respuesta inmune del hospedador, como se ha demostrado para otros parásitos (Jacobson y Schnur, 1990; Horák, 1995) y sugerido para otros mixosporidios (Bartholomew y cols., 1989a). No obstante, cuando se emplearon técnicas inmunohistoquímicas al

microscopio electrónico, RaSdic tiñó intensamente los estadios de desarrollo de *S. dicentrarchi*. La mayor sensibilidad de esta técnica podría explicar estos resultados.

Para estudiar la composición glucídica de *S. dicentrarchi*, que podría ser compartida por otros parásitos de este grupo, se emplearon lectinas, tanto en técnicas histoquímicas (al microscopio óptico y al electrónico), como en *immunoblots*. Las lectinas son proteínas o glicoproteínas, derivadas tanto de plantas como de animales, que reconocen y se unen reversiblemente a azúcares específicos o a ciertos terminales glucosídicos de los polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos (Sharon y Lis, 1989). Puesto que todos los parásitos tienen carbohidratos en su superficie, como parte de su citoesqueleto o formando parte de sus estructuras internas, y estas moléculas son responsables de muchas de las funciones biológicas celulares (Reuter y cols., 1998), las lectinas se han usado ampliamente en parasitología.

Los estudios realizados mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica, demostraron que todos los mixosporidios ensayados contenían manosa y/o glucosa en las cápsulas polares, lo que indicaba nuevamente la existencia de estructuras glucídicas conservadas en las cápsulas polares de estos organismos. Podría suceder que estos carbohidratos fueran las estructuras reconocidas por los antisueros RaSdic, RaStest y RaClab en las cápsulas polares de la mayoría de los mixosporidios ensayados. De hecho, los patrones de tinción observados con estas lectinas fueron similares a los detectados empleando los antisueros policlonales. Por tanto, la parte glucídica podría estar involucrada en el reconocimiento antigénico, como se ha descrito previamente para otros parásitos (Roth y cols., 1997).

La lectina WGA tiñó las cápsulas polares y las valvas de la mayoría de los parásitos ensayados. Esta lectina se ha empleado para detectar quitina, un polímero de N-acetil-glucosamina, en diversos organismos (Jacobson y Doyle, 1996; Muzzarelli y Peter, 1997). Otros autores (Lukes y cols., 1993) han descrito la presencia de quitina en las cápsulas polares de algunos mixosporidios. Esta sustancia podría tener varias funciones en las esporas de estos organismos, como la protección contra el estrés mecánico o químico procedente del medio ambiente, o el mantenimiento de su forma.

Las lectinas empleadas tiñeron mayoritariamente los estadios maduros, ya que tan sólo los estadios de desarrollo de *Leptotheca* sp. se marcaron con WGA al microscopio óptico y los de *Leptotheca* sp. y *Zschokkella mugilis* con BS-I mediante microscopía electrónica. Podría suceder que los estadios inmaduros de estos mixosporidios no tuvieran carbohidratos en su superficie, como se ha observado en los

estadios larvarios de microfilarias (Ham y cols., 1988). Otra posible explicación podría ser que estos estadios de desarrollo presentaran cantidades muy pequeñas de carbohidratos, no detectadas mediante la técnica empleada, o bien que estuvieran enmascarados, o que tuvieran otros carbohidratos no reconocidos por las lectinas empleadas en este estudio. Por otra parte, tal y como comentábamos en el apartado anterior, el cambio en la composición glucídica de estos mixosporidios a lo largo de su ciclo vital podría ser un mecanismo desarrollado para evadir la respuesta inmune del hospedador.

Cuando las lectinas se emplearon en *immunoblots*, sólo Con-A detectó dos bandas de 78 y 96 kDa. La alteración de los antígenos durante el proceso de desnaturalización que se aplica en esta técnica, podría explicar la falta de reconocimiento por parte del resto de las lectinas ensayadas.

Las proteasas son sustancias capaces de hidrolizar enlaces peptídicos, con una gran importancia en las relaciones parásito hospedador, en la patogénesis, así como en procesos tales como la nutrición o la invasión de tejidos del hospedador (McKerrow, 1989; North y Lockwood, 1995). Como comentábamos en la introducción de esta memoria, se han detectado proteasas en varios mixosporidios. En nuestro estudio, y mediante técnicas de zimografía, detectamos la existencia, en los extractos de esporas de *S. dicentrarchi*, de tres proteasas con pesos moleculares de 50, 84 y 126 kDa, así como un área difusa entre los 34 y 40 kDa. Aunque se desconoce el posible papel de estas proteasas en el caso de *S. dicentrarchi*, podrían contribuir a facilitar la invasión de los tejidos del hospedador, a la digestión de sus proteínas, así como a ayudar al parásito a evadir la respuesta inmune, tal y como se ha descrito para otros parásitos (McKerrow, 1989).

2. Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* constituyen una herramienta muy útil para el estudio de algunos aspectos de la respuesta inmune. En los trabajos recopilados en esta memoria (artículos VI y VII), se aborda el aislamiento y cultivo *in vitro* de leucocitos de lubina, con el objetivo de estudiar la modulación de su actividad en relación con el grado de parasitación por *Sphaerospora dicentrarchi*. También se intentó estudiar un aspecto de la interacción entre el sistema inmunitario y el endocrino valorando la posible activación *in vitro* mediada por la hormona del crecimiento.

Los resultados obtenidos demuestran que los leucocitos de lubina pueden ser estimulados por PMA, y son capaces de producir O_2^- de la misma forma que los neutrófilos y macrófagos de los mamíferos. La cinética de esta reacción fue similar a la descrita por otros autores en otros fagocitos de peces, mientras que la producción de O_2^- fue proporcional a la cantidad de células existentes por pocillo.

Parece evidente que las diferencias en el grado de activación de los fagocitos pueden producirse como una respuesta a factores endocrinos, o a factores relacionados con el estado sanitario del animal. En nuestro estudio se demostró que la hormona del crecimiento recombinante de trucha estimula el estallido respiratorio de los fagocitos de lubina, siendo mayor esta estimulación cuando los peces estaban parasitados por *S. dicentrarchi*. En células de lubinas no parasitadas la mayor estimulación se produjo a una concentración mucho menor que en los peces parasitados. Este efecto estimulatorio desaparece a dosis altas de GH, tal y como ocurre en trabajos previos con fagocitos de trucha (Sakai y cols., 1996) y con macrófagos humanos (Warwick-Davies y cols., 1995).

Los conocimientos sobre los efectos de los parásitos sobre la fisiología del sistema inmunitario de los peces, así como sobre el coste bioenergético necesario para combatir dichos parásitos, son escasos. Hay algunos estudios sobre la estimulación *in vitro*, de leucocitos de peces mediante parásitos o extractos parasitarios (Taylor y Hoole, 1995), pero existe muy poca información sobre la relación existente entre el estado parasitario del pez *in vivo* y su capacidad fagocítica. En nuestro estudio, las células procedentes de peces parasitados naturalmente, con intensidad media, respondían a la estimulación con PMA con una mayor producción de O_2^- pero cuando el grado de parasitación aumentaba, la reducción del NBT alcanzaba valores similares a los encontrados en peces no parasitados. Los primeros estadios de la invasión

parasitaria son los que suelen provocar una mayor activación de los macrófagos. Por tanto, en nuestro caso, la baja respuesta de los peces con mayores niveles de parasitación podría ser debida al hecho de que se trataba de estadios crónicos de la parasitosis, con una fuerte reacción granulomatosa y grandes zonas de necrosis y pigmentación (debido a la acumulación de centros melanomacrofágicos).

El estado parasitario del animal parece influir también en las características del suero. Así, la adición de suero de lubinas no parasitadas produjo unos niveles de estallido respiratorio significativamente superiores a la adición de suero de lubinas parasitadas, e incluso superiores a la adición de suero fetal bovino. Estos factores séricos relacionados con la activación del estallido respiratorio parecen ser lábiles, pues la inactivación con calor produjo una clara disminución del efecto del suero de lubinas no parasitadas sobre dicho estallido respiratorio, por lo que podría tratarse del complemento. No obstante, no se descarta el papel de otros componentes del suero, incluidas las inmunoglobulinas. Sin embargo, estos posibles componentes no lábiles no compensan el descenso de la actividad del complemento en los peces parasitados.

Los fagocitos de la lubina tienen una gran afinidad por los eritrocitos de oveja, superior a la que se ha demostrado para otras especies de peces marinos (Santarém y Figueras, 1994). El índice de fagocitosis de los fagocitos de lubina por *Sphaerospora dicentrarchi* fue similar al encontrado utilizando eritrocitos de oveja como dianas. No obstante, debe de ser mayor la afinidad por *S. dicentrarchi*, pues la proporción células:diana utilizada en nuestros estudios era inferior cuando las dianas empleadas eran *S. dicentrarchi*. Nuestros resultados indican la posible existencia de una opsonización mediada por el complemento, pues la inactivación por calor produjo una disminución significativa del índice de fagocitosis de *S. dicentrarchi* cuando se usó suero de lubinas no parasitadas. No obstante, cuando se empleó suero de lubinas parasitadas, la inactivación por calor no disminuyó el índice de fagocitosis, lo que indica nuevamente que los niveles de complemento podrían ser inferiores en los peces parasitados.

Mediante estos trabajos realizados *in vitro* con leucocitos de lubina se demostró que existe una relación entre el grado de parasitación por *Sphaerospora dicentrarchi* y la actividad del sistema inmunitario de dichas lubinas. También se comprobó que este grado de parasitación influye en relación entre el sistema inmunitario y endocrino.

3. Estudios *in vivo*: experiencia de inmunización

El conocimiento acerca de los efectos de los parásitos sobre la respuesta inmune de los peces es escaso, especialmente en lo referente a estudios *in vivo*. En este trabajo (artículo VIII) se abordó el estudio de la respuesta inmune (inespecífica y específica), de la lubina frente a las esporas de *Sphaerosproa dicentrarchi*, mediante una experiencia de inmunización con esporas de dicho parásito. Se siguió un protocolo de inmunización en el que se establecieron 4 grupos de 7 peces a los que se inyectaron esporas (grupo DIC), esporas y adyuvante completo de Freund (grupo DIC+FCA), sólo adyuvante (grupo FCA) ó PBS (grupo PBS). A los 30 días se volvieron a inyectar los grupos DIC y DIC+FCA con la misma cantidad de esporas y los grupos control con PBS. Se realizaron cuatro muestreos a lo largo de los 60 días que duró la experiencia. Para estudiar la respuesta inespecífica se midió la producción de O_2^- por parte de los leucocitos circulantes y de los leucocitos extraídos del riñón anterior, así como los niveles de lisozima y de complemento en el suero. En relación con la respuesta inmune específica, se estudió la existencia de células formadoras de anticuerpos (ASC, antibody secreting cells) mediante ELISPOT, así como la presencia de anticuerpos en el suero, mediante inmunohistoquímica e *immunoblotting*.

Los resultados obtenidos demostraron que la inmunización con *S. dicentrarchi* produjo cambios en el estallido respiratorio y en los niveles de lisozima y complemento, especialmente a los siete días del inicio de la experiencia. Así, el número de células positivas en la sangre con la técnica del NBT aumentó significativamente en los peces del grupo DIC+FCA en todos los muestreos, aunque el mayor aumento se observó a los siete días. Los leucocitos del riñón anterior de los peces de los grupos DIC y DIC+FCA, obtenidos a los 60 días del inicio de la experiencia, mostraron mayores niveles de O_2^- que los de los grupos control. Asimismo, se observó un aumento en los niveles de lisozima a los siete y 60 días del inicio de la experiencia en el grupo DIC y a los 30 en el grupo DIC+FCA. Puesto que el porcentaje de neutrófilos en estos grupos fue menor cuando se detectaron los mayores niveles de lisozima, y puesto que no se produjo un aumento significativo en el número de leucocitos, el aumento en los niveles de lisozima en el suero de estos peces pudo ser debido a un incremento en la síntesis y liberación de lisozima. Los niveles de complemento disminuyeron en todos los grupos a los siete días, indicando un cierto efecto del propio muestreo. A los 30

días, sólo el grupo PBS recuperó los valores normales, sugiriendo que en los restantes grupos se consumía más complemento del que se producía. A los 60 días los grupos DIC y DIC+FCA habían recuperado los valores normales, pero no el grupo FCA. Estos resultados sugieren que las esporas de *S. dicentrarchi* producen un consumo inmediato del complemento, pero a largo plazo también estimulan su producción. Por otra parte, el FCA disminuye los niveles de complemento incluso a largo plazo. Trabajos previos, tanto en peces (Thomas y Woo, 1989) como en mamíferos (Baeza y cols., 1994), han demostrado la disminución del complemento en animales parasitados.

En este estudio, se demostró la capacidad de las lubinas inmunizadas con esporas de *S. dicentrarchi*, de producir anticuerpos específicos contra este parásito. No obstante, tanto el número de células formadoras de anticuerpos específicos como el título de anticuerpos detectado en el suero mediante inmunohistoquímica fue bajo. Se pueden dar varias explicaciones al bajo título de anticuerpos. Por un lado, el propio proceso de inmunización, ya que algunos autores han demostrado que la inyección del parásito vivo origina una mayor respuesta que el sonicado (Smith y cols., 1993). Por otro lado, quizás *S. dicentrarchi* sea poco inmunogénica para la lubina, aunque no podemos descartar la posibilidad de una mayor respuesta contra otros estadios de este parásito o contra el posible actinosporidio, que inicialmente entraría en el pez.

En resumen, este estudio demostró la capacidad del sistema inmune de las lubinas, especialmente del sistema inespecífico, de ser estimulado tras una inmunización con esporas del mixosporidio *Sphaerospora dicentrarchi*.

V. Bibliografía

- A**LDERMAN, D.J. (1986) Whirling disease chemotherapy. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, **6**, 38-40.
- ALEXANDER J.B. & INGRAM G.A. (1992) Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 249-279.
- ÁLVAREZ-PELLITERO, P. & SITJÀ-BOBADILLA, A. (1993) *Ceratomyxa* spp. (Protozoa: Myxosporea) infections in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Spanish Mediterranean area. *Journal of Fish Biology*, **42**, 889-901.
- ÁLVAREZ-PELLITERO, P., SITJÀ-BOBADILLA, A. & FRANCO-SIERRA, A. (1993) Protozoan parasites of wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Mediterranean area. *Aquaculture and Fisheries Management*, **24**, 101-108.
- ÁLVAREZ-PELLITERO, P. JOFRE, J., BAUDIN-LAURENCIN, F., TRILLES, J.P. BREUIL, G. & GIORGETTI, G. (1995). Study of the parasitic and infectious (bacterial and viral) diseases in sea bream (*Sparus aurata*) and Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in the Mediterranean environment. En: *Synopsis of R & D. projects. Fisheries and aquaculture Research, 1988-1992. Vol. 1: Aquaculture, Upgrading of fisheries Products*. European Commission, Directorate Generale XIV, Fisheries, Brussels, pp. 21-26. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- ANDERSON, D. P., MORITOMO, T. & GROOTH, R. (1992) Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **30**, 419-429.
- ANDERSON, C.L., CANNING, E.U. & OKAMURA, B. (1999) 18S rDNA sequences indicate that PKX organism parasitizes Bryozoa. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, **19**, 94-97.
- ARAUJO-JORGE, T.C., LAGE, M.J., RIVERA, M.T., CARLIER, Y. & VAN LEUVEN, F. (1992) *Trypanosoma cruzi*: enhanced alpha-2-macroglobulin levels correlate with the resistance of mice to acute infection. *Parasitology Research*, **78**, 215-221.
- B**AEZA E., POITOU I, V. C. & BOULARD C. (1994). Complement depletion in rats infected with *Fasciola hepatica*- *In vivo* and *in vitro* studies. *Veterinary Parasitology*, **51**, 219-230.
- BARTHOLOMEW, J.L., SMITH, C.E., ROHOVEC, J.S. & FRYER, J.L. (1989a) Characterization of a host response to the myxosporean parasite, *Ceratomyxa shasta* (Noble), by histology, scanning electron microscopy and immunological techniques. *Journal of Fish Diseases*, **12**, 509-522.
- BARTHOLOMEW, J.L., ROHOVEC, J.S. & FRYER, J.L. (1989b) Development, characterization, and use of monoclonal and polyclonal antibodies against the Myxosporean, *Ceratomyxa shasta*. *Journal of Protozoology*, **36**, 397-401.
- BARTHOLOMEW, J.L., WHIPPLE, M.J., STEVENS, D.G. & FRYER, J.L. (1997) The life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, requires a freshwater polychaete as an alternate host. *Journal of Parasitology*, **83**, 859-868.
- BAUER, O.N., EGUSA, S. & HOFFMAN, G.L. (1981) Parasitic infections of economic importance in fishes. En "Review of Advances in Parasitology". W. Slusarski (Ed.). P.W.N. Polish Sc. Pub., Warszawa, pp: 425-443.
- BENAJIBA, M.H. & MARQUÉS, A. (1993) The alternation of actinomyxidian and myxosporidian sporadic forms in the development of *Myxidium giardi* (parasite of *Anguilla anguilla*) through oligochaetes. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, **13**, 100-103.
- BODDAMER, J.E. (1986) Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **12**, 127-140.
- BRAGONI, G. ROMESTAND, B. & TRILLES, J.P. (1984) Parasitoses a cymothoadien chez le loup, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) en élevage. I. Ecologie parasitaire dans les cas de l'étang de Dian (Haute-Corse) (Isopoda, Cymothoidae). *Crustaceana*, **47**, 44-51.
- BRANSON, E., RIAZA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO (1999) Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) (L.) (Teleostei: Scophthalmidae). *Journal of Fish Diseases* (in press).
- BUCHMANN, K. (1998) Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Diseases of Aquatic Organisms*, **32**, 195-200.

- BURCKART, M.A., CLARK, T.G. & DICKERSON, H.W. (1990) Immunization of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque against *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet): Killed versus live vaccine. *Journal of fish diseases*, **13**, 401-410.
- BURRESON, E.M. & FRITZELL, L.T. (1986) The seasonal antibody response in juvenile summer flounder (*Paralichthys dentatus*) to the haemoflagellate trypanoplasma bullocki. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, **12**, 395-402.
- BURTLE, G.J., HARRISON, L.R. & STYER, E.L. (1991) Detection of a triactinomyxid myxozoan in an oligochaete from ponds with proliferative gill disease in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, **3**, 281-287.

- C**ABRAL, P., COSTE, F., & RAIBAUT, A. (1984) Cycle évolutif de *Lernanthropus kroyeri*. Van Beneden, 1851, copépode branchial du loup *Dicentrarchus labrax* (linné, 1758) dans les populations naturelles et en élevage. *Annals de Parasitologie Humaine et Comparée*, **59**, 189-207.
- CAILLOT, C., MORAND, S., MÜLLER-GRAF, C.M., FALIEUX, E. & MARCHAND, B. (1999) Parasites of *Dicentrarchus labrax*, *Anguilla anguilla*, and *Mugil cephalus* from a pond in Corsica, France. *Journal of the Helminthology Society of Washington*, **66**, 95-98.
- CALDUCH-GINER, J.A., SITJA-BOBADILLA, A., ÁLVAREZ-PELLITERO, P. & PÉREZ-SÁNCHEZ, J. (1997) Growth hormone as an *in vitro* phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell and Tissue Research*, **287**, 535-540.
- CANNING, E.U., OKAMURA, B. & CURRY, A. (1996) Development of a myxozoa parasite *Tetracapsula bryozoides* gen. n. et sp. n. in *Cristatella mucedo* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Folia Parasitologica*, **43**, 249-261.
- CAVALIER-SMITH, T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biology Review*, **73**, 203-266.
- CHEN, S.C., YOSHIDA, T., ADAMS, A., THOMPSON, K.D. & RICHARDS, R.H. (1996) Immune response of rainbow trout to extracellular products of *Mycobacterium* spp. *Journal of Aquatic Animal Health*, **8**, 216-222.
- CHEN, S.C., YOSHIDA, T., ADAMS, A., THOMPSON, K.D. & RICHARDS, R.H. (1998) Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium* spp. and to various adjuvants. *Journal of Fish Diseases*, **21**, 39-45.
- CHUNG, S. & SECOMBES, C.J. (1988) Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **89**, 539-544.
- CLIFTON-HADLEY, R.S., BUCKE, D. & RICHARDS, R.H. (1986a) Economic importance of proliferative kidney disease of salmonid fish in England and Wales. *The Veterinary Record*, **20**, 305-306.
- CLIFTON-HADLEY, R.S., RICHARDS, R.H. & BUCKE, D. (1986b) Proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Further observations on the effects of water temperature. *Aquaculture*, **55**, 165-171.

- D**ALMO, R.A., INGEBRIGTSEN, K. & BØGWALD, J. (1997) Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, **20**, 241-273.
- DESSER, S.S., LOM, J. & DYKOVÁ, I. (1986) Developmental stages of *Sphaerospora ohlmacheri* (Whinery, 1893) n. comb. (Myxozoa: Myxosporea) in the renal tubules of bullfrog tadpoles, *Rana catesbeiana*, from Lake of Two Rivers, Algonquin Park, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, **64**, 2213-2217.
- DIAMANT, A., ISSAR, G., COLORNI, A. & PAPERNA, I. (1991) A pathogenic *Cryptocaryon*-like ciliate from the Mediterranean sea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **11**, 122-124.
- DIAMANT, A. & WAJSBROT, N. (1997) Experimental transmission of *Myxidium leei* in gilt head sea bream *Sparus aurata*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, **17**, 99-103.
- DICKERSON, H.W., CLARK, T.G. & FINDLY, R.C. (1989) *Ichthyophthirius multifiliis* has membrane associated immobilization antigens. *Journal of Protozoology*, **29**, 502-503.
- DODDS, A.W., SMITH, S.L., LEVINE R.P. & WILLIS, A.C. (1998) Isolation and initial characterisation of complement components C3 and C4 of the nurse shark and the channel catfish. *Developmental and Comparative Immunology*, **22**, 207-216.

- DRAGESCO, A., DRAGESCO, J., COSTE, F., GASC, C., ROMESTAND, B., RAYMOND, J.C. & BOUIX, G. (1995) *Philasterides dicentrarchi*, n. sp. (Ciliophora, Scuticociliatida) a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *European Journal of Protistology*, **31**, 327-340.
- DYKOVÁ, I. & LOM, J. (1978) Tissue reaction of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. to infection with *Glugea anomala* (Moniez, 1887). *Journal of Fish Diseases*, **1**, 83-90.
- DYKOVÁ, I., LOM, J. & EGUSA, S. (1980) Tissue reaction to *Glugea plecoglossi* infection in its natural host *Plecoglossus altivelis*. *Folia Parasitologica*, **27**, 213-216.

- E**DWARDS, C.K.I., ARKINS, S., YUNGER, L.M., BLUM, A., DANTZER, R. & KELLEY, K.W. (1992) The macrophage-activating properties of growth hormone. *Cellular & Molecular Neurobiology*, **12**, 499-510.
- EL-MANSY, A. & MOLNÁR, K. (1997a) Extrapiscine development of *Myxobolus drjagini* Akmerov, 1954 (Myxosporidia: Myxobolidae) in oligochaete alternative hosts. *Acta Veterinaria Hungarica*, **45**, 427-438.
- EL-MANSY, A. & MOLNÁR, K. (1997b) Development of *Myxobolus hungaricus* (Myxosporidia: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts. *Diseases of Aquatic Organisms*, **31**, 227-232.
- EL-MANSY, A., MOLNÁR, K. & SZÉKELY, C. (1998) Development of *Myxobolus portucalensis* Saraiva & Molnár, 1990 (Myxosporidia: Myxobolidae) in the oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller). *Systematic Parasitology*, **41**, 95-103.
- EL-MATBOULI, M. & HOFFMANN, R.W. (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogony via tubificid worms. *Parasitology Research*, **75**, 461-464.
- EL-MATBOULI, M. & HOFFMANN, R.W. (1991) Prevention of experimentally induced whirling disease in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* by fumagilin. *Diseases of Aquatic Organisms*, **10**: 109-113.
- EL-MATBOULI, M., FISCHER-SCHERL, T. & HOFFMANN, R.W. (1992) Transmission of *Hoferellus carassi* Achmerov, 1960 to goldfish *Carassius auratus* via an aquatic oligochaete. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **12**(2), 54-56.
- EL-MATBOULI, M. & HOFFMANN, R.W. (1993) *Myxobolus carassii* Klokaceva, 1914 also requires an aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex* as an intermediate hosts in its life cycle. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **13**, 189-192.
- EL-MATBOULI, M. & HOFFMANN, R.W. (1998) Light and electron microscopy studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporidian stage in *Tubifex tubifex*. *International Journal for Parasitology*, **28**, 195-217.
- ESZTERBAUER, E., SZÉKELY, CS., MOLNÁR, M., & BASKA, F. (1999) Development of *Myxobolus bramae* in oligochaete alternate hosts. 5th International Symposium on Fish Parasites. Ceské, Budejovice, Czech Republic, pp 47.
- EVANS, D.L. & JASO-FRIEDMANN, L. (1992) Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, pp:109-121.

- F**ÄNGE, R., LUNDBLAD, G. & LIND, J. (1976) Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Marine Biology*, **36**, 277-282.
- FENG, S. & WOO, P.T.K. (1997) Complement fixing antibody production in thymectomized *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated against or infected with the pathogenic haemoflagellate *Cryptobia salmositica*. *Folia Parasitologica*, **44**, 188-194.
- FIGUERAS, A., NOVOA, B., SANTARÉM, M., MARTÍNEZ, E., ÁLVAREZ, J.M., TORANZO, A.E. & DYKOVÁ, I. (1992) *Tetramica brevifilum*, a potential threat to farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **14**, 127-135.
- FURUTA, T., OGAWA, K. & WAKABAYASHI, H. (1993) Humoral immune response of carp *Cyprinus carpio* to *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxobolidae) infection. *Journal of Fish Biology*, **43**, 441-450.

- G**ONZÁLEZ-LANZA, C., ÁLVAREZ-PELLITERO, P. & SITJÀ-BOBADILLA, A. (1991) Diplectanidae (Monogenea) infestations of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish Mediterranean area. *Parasitology Research*, **77**, 307-314.

- GRAHAM, S. & SECOMBES, C.J. (1990) Do fish lymphocytes secrete interferon? *Journal of Fish Biology*, **36**, 563-573.
- GRIFFIN, B.R. & DAVIES, E.M. (1978) *Myxosoma cerebralis*: detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **35**, 186-1190.
- GROSSHEIDER, G. & KÖRTING, W. (1992) First evidence that *Hoferellus cyprini* (Doflein, 1898) is transmitted by *Nais* sp. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **12**, 17-20.
- GRUPCHEVA, G.I., DYKOVÁ, I. & LOM, J. (1985) Seasonal fluctuation in the prevalence of *Sphaerospora renicola* and myxosporean bloodstream stages in carp fingerlins in Bulgaria. *Folia Parasitologica*, **32**, 193-203.

- H**ALLIDAY, M. (1974) Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonids. A preliminary immunofluorescent investigation of the spores of *Myxosoma cerebralis*. *Nordic Veterinarian Medicine*, **26**, 173-179.
- HAM P.J., SMAIL A.J. & GROEGER B.K. (1988) Surface carbohydrate changes on *Onchocerca lienalis* larvae as they develop from microfilariae to the infective third-stage in *Simulium ornatum*. *Journal of Helminthology*, **62**, 195-205.
- HEDRICK, R.P., GROFF, J.M., FOLEY, P. & MCDOWELL, T.S. (1988) Oral administration of fumagillin DCH protects chinook salmon *Onchorhynchus tshawytscha* from experimentally - induced proliferative kidney disease. *Diseases of Aquatic Organisms*, **4**, 165-168.
- HIGGINS, M.J. & KENT, M.L. (1996) Field trials with fumagillin for the control of proliferative kidney disease in coho salmon. *The Progressive Fish Culturist*, **58**, 268-272.
- HIGGINS, M.J. & KENT, M.L. (1998) TNP-470, the analogue of fumagillin-DCH, controls PKX in naturally infected sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), underyearlings. *Journal of Fish Diseases*, **21**, 455-457.
- HIGHTOWER, J.A., MCCUMBER, L.J., WELSH, M.G., WHATLEY, D.S., HARTVIGSEN, R.E. & SIGEL, M. (1984) Blood cells of *Fundulus heteroclitus* (L.). *Journal of Fish Biology*, **24**, 587-598.
- HOFFMAN, G.L., DUNBAR, C.E. & BRADFORD, A. (1962). Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. *United States Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report-Fisheries*, **427**, 1-14.
- HOFFMAN, G.L. & PUTZ, R.E. (1969) Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. *The Progressive Fish Culturist*, **31**, 35-37.
- HOLLOWAY, H. L. (1987) Parasitosis in relation to age of fish host. *Proceedings of the North Dakota Academy of Sciences*, **41**, 58.
- HORÁK P. (1995) Developmentally regulated expression of surface carbohydrate residues on larval stages of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati*. *Folia Parasitologica*, **42**, 225-265.

- L**ZYUMOVA, N.A. (1987) *Parasitic fauna of reservoir fishes of the USSR and its evolution* pp. 1-325. Oxonian Press, New Delhi, India.

- J**ACOBSON R.L. & SCHNUR L.F. (1990) Changing surface carbohydrate configurations during the growth of *Leishmania major*. *Journal of Parasitology*, **76**, 218-224.
- JACOBSON, R.L. & DOYLE, R.J. (1996) Lectin-Parasite interactions. *Parasitology Today*, **12**, 55-61.
- JONES, S.R.M. & WOO, P.T.K. (1987) The immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *Journal of Fish Diseases*, **10**, 395-402.

- K**ENT, M.L., WHITAKER, D.J. & MARGOLIS, L. (1993) Transmission of *Myxobolus arcticus* Pugachev and Khokhlov, 1979, a myxosporean parasite of Pacific salmon, via a triactinomyxon from the aquatic oligochaete *Stylodrilus heringianus* (Lumbriculidae). *Canadian Journal of Zoology*, **71**, 1207-1211.

- KENT, M.L., MARGOLIS, L. & CORLISS, J.O. (1994) The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum *Myxozoa* Grassé, 1970. *Canadian Journal of Zoology*, **72**, 932-937.
- KORCZYNSKI, R.E. (1988) Myxosporean parasite in the isopod *Mesidotea entomon*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **5**, 107-110
- KUDO, R.R. (1920) Studies on Myxosporidia. A synopsis of genera and species of Myxosporidia. *Illinois Biological Monographs*, **5**, 1-265.

- L**AUREN, D.J., WISHKOVSKY, A., GROFF, J.M., HEDRICK, R.P. & HINTON, D.E. (1989) Toxicity and pharmacokinetics of the antibiotic fumagillin, in yearling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, **98**, 444-453.
- LE GOUVELLO, R., POBEL, T., RICHARDS, R.H. & GOULD, C. (1998) Field efficacy of a 10-day treatment of fumagillin against proliferative kidney disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, **171**, 27-40.
- LESTER, R.J.G., HALLIDAY, M.M., EL-MATBOULI, M. & CANNING, E.U. (1998) The case of naming actinosporeans using the zoological code. *Parasitology Today*, **14**, 476-477.
- LEVINE, N.D., CORLISS, J.O., COX, F.E.G., DEROUX, G., GRAIN, J., HONIGBERG, B.M., LEEDALE, G.F., LOEBLICH, A.R., LOM, J., LYNN, D., MERINFELD, E.G., PAGE, E.G., POLJANSKY, G., SPRAGUE, V., VAVRA, J. & WALLACE, F.G. (1980) A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, **2**, 37-58.
- LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A. & FROYSADAL, E. (1989) Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, **6**, 1-5.
- LIN, D., HANSON, L.A. & POTE, L.M. (1999) Small subunit ribosomal RNA sequence of *Henneguya exilis* (Class Myxosporidia) identifies the actinosporean stage from an oligochaete host. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**, 66-68.
- LOM, J. (1984) Diseases caused by protistans. En: O. Kinne (Ed.), *Diseases of Marine Animals, Biologische Anstalt Helgoland. Vol IV, Parte I*, pp: 114-168.
- LOM, J. (1987) Myxosporidia: a new look at long-known parasites of fish. *Parasitology Today*, **3**, 327-332.
- LOM, J. & DYKOVA, I. (1995) Myxosporidia (Phylum Myxozoa). En: P.T.K. Woo (Ed.), *Fish diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and metazoan Infections*. Cambridge: University Press, pp: 97-148.
- LOM, J., MCGEORGE, J., FEIST, S.W., MORRIS, D. & ADAMS, A. (1997) Guidelines for the uniform characterisation of the actinosporean stages of parasites of the phylum Myxozoa. *Diseases of Aquatic Organisms*, **30**, 1-9.
- LONGSHAW, M., FEIST, S.W., CANNING, E.U. & OKAMURA, B. (1999) First identification of PKX in Bryozoans from the United-Kingdom- molecular evidence. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **19**, 146-148.
- LUKES, J., VOLF, P. & LOM, J. (1993) Detection of chitin in spores of *Myxobolus muelleri* and *M. subepithelialis* (Myxosporidia, Myxozoa). *Parasitology Research*, **79**, 439-440.
- LUSHBAUGH, W.B., KAIRALLA, A.B., HOFBAUER, A.F., ARNAUD, P., CANTEY, J.R. & PITTMAN, F.E. (1981) Inhibition of *Entamoeba histolytica* cytotoxin by alpha 1 antiprotease and alpha 2 macroglobulin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 575-585.

- M**CARTHUR C.P. & SENGUPTA S. (1982) Antigenic mimicry of eel tissues by a myxosporidian parasite. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **66**, 249-255.
- MACARTHUR, J.I. & FLETCHER, T.C. (1985) Phagocytosis in fish. En: M.J. Manning y M.F. Tatner (Eds.) *Fish Immunology*. Londres: Academic Press, pp: 29-46.
- MACCONNELL, E., SMITH, C.E., HEDRICK, R.P. & SPEER, C.A. (1989) Cellular inflammatory response of rainbow trout to the protozoan parasite that causes proliferative kidney disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, **1**, 108-118.
- MAGNADOTTIR, B., KRISTJANSDOTTIR, H. & GUDMUNDSDOTTIR, S. (1996) Characterisation of monoclonal antibodies to separate epitopes on salmon IgM heavy chain. *Fish & Shellfish Immunology*, **6**, 185-198.
- MARKIWI, M.E. (1992) Experimentally induced whirling disease II. Determination of longevity of the infective triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* in vital satining. *Journal of Aquatic Animal Health*, **4**, 44-47.

- MARKIW, M.E. & WOLF, K. (1983) *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa: Myxosporidia) etiologic agent of salmonid whirling disease requires tubificid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *Journal of Protozoology*, **30** (3), 561-564.
- MARSDEN, M.J., FREEMAN, L.C., COX, D. & SECOMBES, C.J. (1996) Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance to furunculosis. *Aquaculture*, **146**, 1-16.
- MCKERROW, J.H. (1989) Minireview: parasite proteases. *Experimental Parasitology*, **68**, 11-115.
- MEHLHORN, H., SCHMAHL, G. & HABERKORN, A. (1988) Toltrazuril effective against a broad spectrum of protozoan parasites. *Parasitology Research*, **75**, 64-66.
- MILLER, N.W. & CLEM, L.W. (1984) Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-independent antigens. *Journal of Immunology*, **133**, 2356-2359.
- MOLNÁR, K. (1979) Gill sphaerosporosis in the common carp and grasscarp. *Acta Veterinaria Hungarica*, **27**, 99-113.
- MOLNÁR, K., BASKA, K. & SZÉKELY, C. (1987) Fumagillin, an efficacious drug against renal sphaerosporosis of the common carp *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **2**, 187-190.
- MOLNÁR, K., EL-MANSI, A., SZEKELY, C. & BASKA, F. (1999a) Development of *Myxobolus dispar* (Myxosporidia: Myxobolidae) in an oligochaete alternate host, *Tubifex tubifex*. *Folia Parasitologica*, **46**, 15-21.
- MOLNÁR, K., EL-MANSI, A., SZEKELY, C. & BASKA, F. (1999b) Experimental identification of the actinosporean stage of *Sphaerospora renicola* Dyková & Lom 1982 (Myxosporidia: Sphaerosporidae) in oligochaete alternate hosts. *Journal of Fish Diseases*, **22**, 143-153.
- MORAN, J.D.W., WHITAKER, D.J. & KENT, M.L. (1999) A review of the myxosporidian genus *Kudoa* meglitsch, 1947, and its impact on the interantional aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture*, **172**, 163-196.
- MULERO, V. & MESEGUER, J. (1998) Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, **8**, 143-156.
- MUZZARELLI A.A. & PETER M.G. 1997: Chitin Handbook. Atec Edizioni, Italy, pp: 528.

- N** NEUMANN, N.F., FAGAN, D. & BELOSEVIC, M. (1995) Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, **19**, 473-482.
- NORTH, M.J. & LOCKWOOD, B.C. (1995) Aminoacid and protein metabolism. In: Müller M, Marr JJ (eds) Biochemistry and molecular biology of parasitic organisms. Academic Press, New York pp 67-88.

- O** DENING, K., WALTER, G. & BOCKHARDT, I. (1989) Zum Infektionsgeschehen bei *Sphaerospora renicola* (Myxosporidia). *Angewandte Parasitologie*, **30**, 131-140.
- OKAMURA, B. (1996) Occurrence, prevalence, and effects of the myxozoan *Tetracapsula bryozoides* parasitic in the freshwater bryozoan *Cristatella mucedo* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Folia Parasitologica*, **43**, 262-266.
- OVERSTREET, R.M. (1976) *Fabespora vermicola* sp.n., the first myxosporidian from a Platyhelminth. *Journal of Parasitology*, **62**, 680-684.
- ÖZER, A. & WOOTEN, R. (1999) The life cycle of *Sphaerospora truttae* and the epidemiology of its actinosporean and myxosporidian stages. 5th International Symposium on Fish Parasites. Ceské, Budejovice, Czech Republic, pp 103.

- P** ALACÍN-FORGUE, A. (1984) Técnicas inmunohistoquímicas: aspectos teórico prácticos. Barcelona: ATOM, S.A.
- PALENZUELA, O. (1996) Mixosporidiosis de la lubina y la dorada. Aspectos de la relación parásito-hospedador y desarrollo de métodos diagnósticos. Tesis doctoral.

- PAPERNA, I. & BAUDIN-LAURENCIN, F. (1979) Parasitic infections in sea bass, *Dicentrarchus labrax* and gilthead sea bream *Sparus aurata* in mariculture facilities in France. *Aquaculture*, **16**, 173-175.
- PAPERNA, I. (1980a). Study of *Caligus minimus* (Otto, 1821) (Caligidae, Copepoda) infections of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in Bardawill Lagoon. *Annals de Parasitologie Humaine et Comparée*, **55**, 687-306.
- PAPERNA, I. (1980b) *Amyloodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellida) infestations in cultured marine fish at Eilat, Red Sea: epizootiology and pathology. *Journal of Fish Diseases*, **3**, 363-372.
- PAPERNA, I. (1984). Review of diseases affecting culture *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. En: G. Barnabe y R. Billard (Eds.) L'Aquaculture du Bar et des Sparidés. INRA Publ. Paris, pp: 465-482.
- PATTERSON, D.J. (1994) Protozoa: Evolution and systematics. En: K. Hausmann y N. Hülsmann (Eds.), *Progress in Protozoology. Proceedings of the IX International Congress of Protozoology* (pp. 1-14), Berlin.
- PAULEY, G.B. (1974) Fish sporozoa: Extraction of antigens from *Myxosoma cerebralis* spores which mimic tissue antigens of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **31**, 1481-1484.

- R**ENON, P., CAMISASCA, S., ZANA, C. & FOSCHINI, S. (1996) Rilevamento de mixosporidi in filetti di merluzzo congelati importati. *Industria Alimentari*, **35**, 510-514.
- REUTER, G., KELM, S. & SCHAUER, R. (1988) Chemistry and biology of cell surface glycoconjugates. *Acta of Histochemistry*, **36**, 51-79.
- RHEE, J.K., KIM H.C. & PARK, B.K. (1993) Efficacy of fumagillin against *Thelohanellus kitauei* of Israel carp, *Cyprinus carpio* nudus. *Korean Journal of Parasitology*, **31**, 57-65.
- RIBAUT, A., DIVANACH, P., COSTA, P. & MAILLARD, C. (1980) Copépode larvaire en éclosion de poissons marins. En: *La pisciculture française 16 è année, 3è et 4è tr.*
- RIJKERS, G.T., FREDERIX - WOLTERS, L.M.H. & VAN MUISWINKEL, W.B. (1980) The immune response system in cyprinid fish. The effect of antigen dose and route of administration on the development of immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*). In *Phylogeny of Immunological Memory* pp: 93-102.
- ROBERTSON, D.A. (1979) Host-parasite interactions between *Ichthyobodo* (Henneguy, 1833) and farmed salmonids. *Journal of Fish Diseases*, **2**, 481-491.
- ROGEL-GAILLARD, C., CHILMONCZYK, S. & DE KINKELIN, P. (1993) *In vitro* induction of interferon-like activity from rainbow trout leucocytes stimulated by egtved virus. *Fish & Shellfish Immunology*, **3**, 383-394.
- ROSZELL, L.E. & ANDERSON, R.S. (1994) Inhibition of phagocytosis and superoxide production by pentachlorophenol in two leukocyte subpopulations from *Fundulus heteroclitus*. *Marine Environmental Research*, **38**, 195-206.
- ROTH, A., WEEKE, J., KARSTEN, V. & JANISTSCHKE, K. (1997) Light and electron microscopy study of carbohydrate antigens found in electron-lucent layer of *Pneumocystis carinii* cysts. *Parasitology Research*, **83**, 177-184.
- ROTHWELL, J.T., VIRGONA, J.L., CALLINAN, R.B., NICHOLS, P.J. & LANGDON, J.S. (1997) Occurrence of cutaneous infections of *Myxobolus episquamalis* (Myxozoa: Myxobolidae) in sea mullet, *Mugil cephalus* L., in Australia. *Australian Veterinary Journal*, **75**, 349-352.
- ROUBAL, F.R., HALLET, S.L. & LESTER, R.J.G. (1997) First record of Triactinomyxon Actinosporean in a marine oligochaete. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **17**, 83-85.
- RUIDISCH, S., EL-MATBOULI, M. & HOFFMANN, R.W. (1991) The role of tubified worms as an intermediate host in the life cycle of *Myxobolus pavlovskii* (Akhmerov, 1954). *Parasitology Research*, **77**, 663-667.

- S**AKAI, M., KOBAYASHI, M. & KAWAUCHI, H. (1996) Mitogenic effect of growth hormone and prolactin on chum salmon *Oncorhynchus keta* leukocytes in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **53**, 185-189.
- SANTARÉM, M.M. & FIGUERAS, A.J. (1994) Kinetics of phagocytic activity, plaque forming cells and specific agglutinins of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) immunised with O antigen of *Vibrio damsela* and *Pasteurella piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, **4**, 527-537.

- SANTOS, M.J. (1996) Observations on the parasitofauna of wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from Portugal. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **16**, 77-79.
- ŠARUŠIĆ, G. (1999) Preliminary report of infestation by isopod *Ceratothoa oestroides* (Risso, 1826), in marine cultured fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **19**, 110-112.
- SAULNIER, D. & KINKENLIN, P. (1996) Antigenic and biochemical study of PKX, the myxosporean causative agent of proliferative kidney disease of salmonid fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, **27**, 103-114.
- SCAPIGLIATI, G., ROMANO, N., PICCHIETTI, S., MAZZINI, M., MASTROLIA, L., SCALIA, D. & ABELLI, L. (1996) Monoclonal antibodies against sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish & shellfish Immunology*, **6**, 383-401.
- SCHLEGEL, M., LOM, J., STECHMANN, A., BERNHARD, D., LEIPE, D., DYKOVÁ, I. & SOGUIN, M. (1996) Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde*, **147**, 1-9.
- SCHMAHL, G.M.H. & TARASCHEWSKI, H. (1997) Treatment of fish parasites. 7. Effects of triazinone (toltrazuril) on developmental stages of *Myxobolus* sp. Bütschli, 1882 (Myxosporea, Myxozoa): a light and electron microscopic study. *European Journal of Protistology*, **25**, 6-32.
- SHARON N. & LIS H. (1989) The lectins. Chapman and Hall, London, pp: 127.
- SIDDALL, M.E., MARTIN, D.S., BRIDGE, D., DESSER, S.S. & CONE, D.K. (1995) The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *Journal of Parasitology*, **81**, 961-967.
- SILAN, P. & MAILLARD, C. (1986) Modalités de l'infestation par *Diplectanum aequans* monogène ectoparasite de *Dicentrarchus labrax* en aquaculture. Elements d'épidémiologie et de prophylaxie. In *Pathology in marine aquaculture* (eds C.P. Vivarès, J.R. Bonami & E. Jaspers), European Aquaculture Society Special Publication, N° 9, Bredene, Belgium, pp: 139-152.
- SILAN, P. & MAILLARD, C. (1989) Biology of *Serranicotyle labracis*, ectoparasite of *Dicentrarchus labrax* (Teleostei): contribution of the study of its populations. *Marine Biology*, **103**, 481-487.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO, P. (1990a) *Sphaerospora testicularis* sp.nov. (Myxosporea: Sphaerosporidae) in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), from the Spanish Mediterranean area. *Journal of Fish Diseases*, **13**, 193-203.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO, P. (1990b) Datos preliminares sobre la transmisión experimental de *Sphaerospora* sp. (Protozoa: Myxosporidia) en juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*). Actas III Congreso Nacional de Acuicultura 739-744.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO, P. (1992a) Light and electron microscopic description of *Sphaerospora dicentrarchi* n. sp. (Myxosporea: Sphaerosporidae) from wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Journal of Protozoology*, **39**, 273-281.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO, P. (1992b) Effect of Fumagilin treatment on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) parasitised by *Sphaerospora testicularis* (Myxosporea: Bivalvulida). *Diseases of Aquatic Organisms*, **14**, 171-178.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO, P. (1993a) Pathologic effects of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà-Bobadilla and Álvarez -Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitjà-bobadilla and Álvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: a light and electron microscopy study. *Parasitology Research*, **79**, 119-129.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ÁLVAREZ-PELLITERO, P. (1993b) Ultrastructural and cytochemical observations on the sporogenesis of *Sphaerospora testicularis* (Protozoa: Myxosporea) from Mediterranean sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *European Journal of Protistology*, **29**, 219-229.
- SITJÀ-BOBADILLA, A. & ALVAREZ-PELLITERO, P. (1993c) Population dynamics of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà-Bobadilla et Alvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitjà-Bobadilla et Alvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) infections in wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Parasitology*, **106**: 39-45
- SIWICKI, A. & STUDNIKA, M. (1987) The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, **31**, 57-60.
- SMITH, S.A., LEVY, M.G. & NOGA, E.J. (1992) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in *Oreochromis aureus*. *Veterinary Parasitology*, **42**, 145-155.
- SMITH, S.A., NOGA, E.J., LEVY, M.G. & GERIG T.M. (1993) Effect of serum from tilapia *Oreochromis aureus* immunized with the dinospore *Amyloodinium ocellatum* on the motility, infectivity and growth of the parasite in cell culture. *Diseases of Aquatic Organisms*, **15**, 73-80.

- SMOTHERS, J.F., VON DOHLEN, C.D., SMITH JR., L.H. & SPALL, R.D. (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, **265**, 1719-1721.
- STYER, E.L., HARRISON, L.R. & BURTLE, G.J. (1991) Experimental production of proliferative gill disease in channel catfish exposed to a myxozoan-infected oligochaete, *Dero digitata*. *Journal of Aquatic Animal Health*, **3**, 288-291.
- SUNYER, O.J., ZARKADIS, L.K. & LAMBRI, J.D. (1998) Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity. *Immunology Today*, **19**, 519-523.
- SVEINBJORNSSON, B. & SELJELID, R. (1994) Aminated β -1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros *in vitro*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**, 113-123.
- SWEARER, S.E. & ROBERTSON, D.R. (1999) Life history, pathology, and description of *Kudoa ovivora* n. sp. (Myxozoa, Myxosporidia): an ovarian parasite of caribbean labroid fishes. *Journal of Parasitology*, **85**, 337-353.
- SYPECK, J.P. & BURRESON, E.M. (1983) Influence of temperature on the immune response of juvenile summer flounder, *Paralichthys dentatus* and its role to the elimination of *Trypanoplasma bullocki* infections. *Developmental and Comparative Immunology*, **7**, 277-286.
- SZÉKELY, C., EL-MANSY, A., MOLNÁR, K. & BASKA, F. (1998) Development of *Thelohanellus hovorkai* and *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporidia: Myxozoa) in Oligochaete alternate hosts. *Fish Pathology*, **33**, 107-114.
- SZÉKELY, CS., MOLNÁR, K. & ESZTERBAUER, E. (1999) Experimentally induced development of *Myxobolus pseudodispar* in *Tubifex tubifex* and *Limnodrilus* alternate hosts. 5th International Symposium on Fish Parasites. Ceské, Budejovice, Czech republic, pp 142.

- T**AYLOR, M.J. & HOOLE, D. (1995) The chemiluminescence of cyprinid leucocytes in response to zymosan and extracts of *Ligula intestinalis* (Cestoda). *Fish & Shellfish Immunology*, **5**, 191-198.
- THOMAS, P. T. & WOO, P. T. K. (1989). Complement activity in *Salmo gairdneri* Richardson infected with *Cryptobia salmositica* (Sarcocystidophora, Kinetoplastida) and its relationship to the anaemia in cryptobiosis. *Journal of Fish Diseases*, **12**, 395-397.
- TRUDEN, J.L. & BOROS, D.L. (1988). Detection of alpha-2-macroglobulin, alpha-1-protease inhibitor, and neutral protease-antiprotease complexes within liver granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *American Journal of Pathology*, **130**, 281-288.

- U**SPENSKAYA, A.V. (1978) Biological features of the invasive stage of *Myxosoma cerebralis* (Myxosporidia; Myxosomatidae). *Parazitologiya*, **12**, 15-19.
- USPENSKAYA, A.V. (1984) *Cytology of myxosporidia*. Nauka, Leningrad, pp: 1-122
- USPENSKAYA, A.V. (1995) Alternation of actinosporidian and myxosporidian phases in the life cycle of *Zschokkella nova* (Myxozoa). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **46**, 665-668.

- W**ARWIGK-DAVIES, J. LOWRIE, D.B. & COLE, P.J. (1995) Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H₂O₂. *Journal of Immunology*, **154**, 1909-1918.
- WEIDNER, E. & OVERSTREET, R.M. (1979) Sporogenesis of a Myxosporidian with motile spores. *Cell & Tissue Research*, **201**, 331-342.
- WHYTE, S.K., CHAPPELL, L.H. & SECOMBES, C.J. (1990) Protection of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Richardson), against *Diplostomum spathaceum* (Digenea): the role of specific antibody and activated macrophages. *Journal of Fish Diseases*, **13**, 281-291.
- WILSON M.R. & WARR, G.W. (1992) Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**, 201-221.
- WOLF, K. & MARKIW, M.E. (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, **225**, 1449-1452.
- WOO, P.T.K. (1979) *Trypanoplasma salmositica*: Experimental infections in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Experimental Parasitology*, **47**, 36-48.
- WOO, P.T.K. (1981) Acquired immunity against *Trypanosoma danilewskyi* in goldfish. *Parasitology* **83**, 343-346.

- WOO, P.T.K. (1992) Immunological responses of fishes to parasitic organisms. *Annual Review of Fish Diseases*, **2**, 339-366.
- WOODWARD, M.P., YOUNG, W.W., JR & BLOODGOOD, R.A. (1985) Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. *Journal of Immunological Methods*, **78**, 143-153.
- Y**OKOYAMA, H., OGAWA, K. & WAYABAYASHI, H. (1990) Chemotherapy with fumagillin and toltrazuril against kidney enlargement disease of goldfish caused by the myxosporean *Hoferellus carassii*. *Fish Pathology*, **25**, 157-163.
- YOKOYAMA, H., OGAWA, K. & WAKABAYASHI, H. (1991) A new collection method of actinosporeans- a probable infective stage of myxosporeans to fishes- from tubificids and experimental infection of goldfish with the actinosporean, *Raabeia* sp. *Fish Pathology*, **26**, 133-138.
- YOKOYAMA, H., OGAWA, K. & WAKABAYASHI, H. (1993) Involvement of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Annelida) in the transmission of *Hoferellus carassii* (Myxosporea: Myxozoa), the causative agent of kidney enlargement disease (KED) of goldfish *Carassius auratus*. *Fish Pathology*, **28**, 135-139.
- YOKOYAMA, H., OGAWA, K. & WAKABAYASHI, H. (1995) *Myxobolus cultus* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) in the goldfish *Carassius auratus* transformed from the actinosporean stage in the oligochaete *Branchiura sowerbyi*. *Journal of Parasitology*, **81**, 446-451.
- YOKOYAMA, H. (1997) Transmission of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960 (Myxosporea: Myxozoa) to common carp *Cyprinus carpio* through the alternate oligochaete host. *Systematic Parasitology*, **36**, 79-84.

- Z**APATA, A.G. & COOPER E.L. (1990) The immune system: Comparative histophysiology. *John Wiley & Sons, New York*, pp: 335
- ZUO, X. & WOO, P.T.K. (1997) *In vivo* neutralization of *Cryptobia salmositica* metallo-protease by α 2-macroglobulin in the blood of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and in brook charr *Salvelinus fontinalis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **29**, 67-72.

Conclusiones

PRIMERA: En el estudio antigénico de *Sphaerospora dicentrarchi*, mixosporidio parásito de la lubina, el análisis electroforético de extractos antigénicos, demostró la existencia de bandas con pesos moleculares entre 32 y 130 kDa.

SEGUNDA: En los extractos parasitarios de *S. dicentrarchi* se detectó la existencia de tres proteasas con pesos moleculares de 50, 84 y 126 kDa, así como un área difusa de proteólisis entre los 34 y 40 kDa.

TERCERA: Los estudios realizados demostraron la homología existente entre los dos antisueros producidos frente a *Sphaerospora* spp., que detectaron bandas similares con pesos moleculares entre 20 y 50 kDa, así como una homología entre los dos antisueros producidos frente a *Ceratomyxa* spp. que detectaron bandas entre 50 y 140 kDa. La banda de 50 kDa fue reconocida por los cuatro antisueros, por lo que podría tratarse de un antígeno conservado en distintos mixosporidios.

CUARTA: Las cápsulas polares de las esporas de casi todos los mixosporidios ensayados se tiñeron con los tres antisueros obtenidos frente a parásitos de la lubina probados mediante inmunohistoquímica, lo que revela la existencia de epítomos antigénicos conservados en las cápsulas polares de organismos pertenecientes a la Clase Myxosporea.

QUINTA: Los estudios realizados empleando lectinas mediante técnicas de microscopía óptica y electrónica demostraron que la mayoría de los mixosporidios ensayados contenían manosa y/o glucosa en sus cápsulas polares, y N-acetil-glucosamina o sus polímeros en las valvas.

SEXTA: Los patrones de tinción observados con algunas lectinas fueron similares a los detectados empleando los antisueros policlonales.

SÉPTIMA: La mayoría de los estadios inmaduros de los mixosporidios ensayados no se tiñeron ni con los antisueros policlonales ni con las lectinas,

lo que podría deberse a un cambio en la composición antigénica de estos mixosporidios durante el ciclo de vida, para evadir la respuesta inmune del hospedador.

OCTAVA: Los estudios realizados *in vitro* con leucocitos de lubina demostraron la relación entre el grado de parasitación por *S. dicentrarchi* y la actividad de dichas células.

- Las células de los peces parasitados con una intensidad media de infección, presentaron unos niveles de estallido respiratorio significativamente superiores que los de las células de peces no parasitados.
- El estallido respiratorio de los leucocitos de lubina aumenta significativamente con la adición de suero de lubinas no parasitadas, produciéndose una mayor cantidad de O_2^- intracelular que con la adición de suero de lubinas parasitadas e incluso que con suero fetal bovino.
- Los fagocitos de lubinas no parasitadas mostraron un índice de fagocitosis de esporas de *S. dicentrarchi* significativamente superior cuando se añade suero de lubinas no parasitadas que cuando se utiliza suero de lubinas parasitadas.
- La inactivación por calor del suero de lubinas no parasitadas produce una disminución significativa tanto del estallido respiratorio como del índice de fagocitosis de *S. dicentrarchi*, lo que indica la posible existencia de una opsonización mediada por el complemento.
- *S. dicentrarchi* estimula el estallido respiratorio de los fagocitos de lubina tanto utilizando sus esporas fijadas en glutaraldehído como sus extractos solubles.

NOVENA: El estudio de la interacción entre el sistema inmunitario³³ y el endocrino en relación con el grado de parasitación por *S. dicentrarchi*, demostró que la hormona del crecimiento recombinante de trucha estimula el estallido respiratorio de los fagocitos de lubina, en mayor medida cuando están parasitadas. En células de lubinas no parasitadas la mayor

estimulación se produjo a una concentración mucho menor que en los peces parasitados.

DÉCIMA: La inmunización de lubinas con esporas de *S. dicentrarchi* produjo cambios en la respuesta inmune que se reflejaron sobre todo en un aumento de la respuesta inespecífica.

- El número de células circulantes positivas con la técnica del NBT, y el estallido respiratorio de los leucocitos de riñón anterior fue superior en los peces inmunizados que en los peces control.
- Los niveles de lisozima plasmática fueron mayores en los peces inmunizados que en el grupo control.
- La actividad de la vía alternativa del complemento disminuyó en los peces inmunizados, pero se recuperaron los niveles al final de la experiencia.

También se observó una respuesta específica demostrada por la presencia de anticuerpos contra el parásito. No obstante, tanto el número de células formadoras de anticuerpos como el título de anticuerpos detectado en el suero mediante inmunohistoquímica fue bajo.