

644

Αρ. 644

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΗΣ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστές	1
Πρόλογος	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1. Το λαβράκι.....	4
1.1.1. Ταξινόμια.....	4
1.1.2. Γενική μορφολογία.....	5
1.1.3. Ανατομία.....	7
1.1.4. Υδατοκαλλιέργεια λαβρακιού.....	8
1.1.5. Εξάπλωση.....	9
1.1.6. Συνήθειες και βióτοπος.....	9
1.1.7. Διατροφή.....	10
1.1.8. Αναπαραγωγή.....	10
1.2. <i>Vibriosis</i>	11
1.2.1. Αντιπρόσωποι της οικογένειας <i>Vibrionaceae</i>	11
1.2.2. <i>Vibrio anguillarum</i>	11
1.2.3. Χαρακτηριστικά της ασθένειας.....	12
1.2.4. Απομόνωση του παθογόνου.....	13
1.2.5. Χαρακτηριστικό του παθογόνου.....	13
1.2.6. Διάγνωση	16
1.2.7. Χαρακτηριστικά του <i>Vibrio anguillarum</i> ορότυπος 1.....	18
1.2.8. Έλεγχος.....	20
1.2.8.1. Εμβόλια	20
1.2.9. Χημειοθεραπεία.....	24
1.2.10. Διαχείριση.....	25
1.2.11. Μικροβιακός ανταγωνισμός.....	25
1.3. Εμβολιασμός και ανοσοποιητικό σύστημα.....	26
1.3.1. Τι είναι ένα εμβόλιο.....	26
1.3.2. Το ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα.....	27
1.3.2.1. Humoral immunity.....	28
1.3.2.2. Ανοσία μεσαζόντων κυττάρων (CMI).....	29

1.3.3. Τι κάνει ένα εμβόλιο.....	31
1.3.4. Τα μέρη της προστατευτικής ανοσίας.....	32
1.3.5. Τι κάνει ένα εμβόλιο αποτελεσματικό.....	32
1.3.5.1.Ασφάλεια.....	33
1.3.5.2.Ανοσοποίηση.....	33
1.3.5.3.Διέγερση της προστατευτικής ανοσίας.....	34
1.3.6. Η φύση των εμβολίων <i>Vibrio</i>	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	37
2.1. Ενυδρεία.....	37
2.2. Stress.....	40
2.3. Τροφοδοσία νερού και αποστείρωση.....	40
2.3.1.Τροφοδοσία νερού.....	40
2.3.2.Αποστείρωση.....	41
2.4. Ρύθμιση των ενυδρείων (Conditioning).....	43
2.5. Μεταφορά ιχθυδίων και εγκλιματισμός.....	44
2.6. Διατροφή.....	49
2.6.1.Προβλήματα και αντιμετώπιση.....	52
2.7. Εμβολιασμός ιχθυδίων.....	53
2.7.1.Διάρκεια ανοσίας μετά από εμβάπτιση-λουτρό σε εμβόλιο Vibrogen 2.....	57
2.8. Αναζήτηση βακτηρίου <i>Listonella anguillarum</i> ορότυπος 1.....	57
2.8.1.Ιστορικό αναζήτησης.....	57
2.8.2.Εύρεση βακτηρίου.....	59
2.9. Ενδοπαιριτοναϊκές εκχύσεις.....	60
2.9.1.Υλικά και μέθοδοι.....	61
2.9.2.Διαδικασία ενδοπαιριτοναϊκών εκχύσεων.....	63
2.10. Ταυτοποίηση θνησογόνου παράγοντα.....	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
3.1. 1ος πειραματικός έλεγχος.....	73
3.2. 2ος πειραματικός έλεγχος.....	103
3.2.1.Εγκλιματισμός.....	103
3.2.2.Εμβολιασμός ιχθυδίων.....	103

3.2.3.Ταυτοποίηση βακτηρίου.....	103
3.2.4.Υλικά και μέθοδοι.....	104
3.2.5.Αποτελέσματα.....	104
3.2.6.Συμπεριφορά ιχθυδίων.....	110
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	111
4.1. Εγκλιματισμός.....	111
4.2. Διατροφή.....	112
4.3. Το <i>Vibrio anguillarum</i> ορότυπος1 ως πρόβλημα στις υδατοκαλλιέργειες.....	113
4.4. Διατήρηση βακτηρίου.....	113
4.5. Ρυθμός ανάπτυξης.....	114
4.6. Συμπεράσματα επί των αποτελεσμάτων	115
4.6.1.1ος πειραματικός έλεγχος.....	115
4.6.2.2ος πειραματικός έλεγχος.....	117

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά την εκπόνηση αυτής της πτυχιακής εργασίας πολλοί ήταν εκείνοι που μας βοήθησαν να ξεπεράσουμε πολλά από τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν :

Πρώτον από όλους ευχαριστούμε τον κ . Βορεινάκη Θεοφάνη ο οποίος εκτός του ότι είναι ο εισηγητής αυτής της πτυχιακής εργασίας , μας πρόσφερε τα μέγιστα για να κατορθώσουμε να φέρουμε εις πέρας αυτή την εργασία .

Επίσης ευχαριστούμε τον κ . Βαρβαρίγγο Παναγιώτη και την εταιρία **VET-CARE** για την υλική αλλά και ουσιαστική βοήθειά του κατά την διάρκεια του πειράματος .

Τρίτο αριθμητικά και όχι σημασιολογικά , όσον αφορά την προσφορά και βοήθεια , θέλουμε να ευχαριστήσουμε τον κ. Χώτο Γιώργο που στάθηκε δίπλα μας σε όλες τις δυσκολίες καθώς και γιατί μας εμπιστεύτηκε έναν σημαντικό μέρος του εργαστηρίου για το οποίο είναι υπεύθυνος αλλά και όλα τα υλικά ώστε να μπορέσουμε να εγκαταστήσουμε τα ενυδρεία και να προχωρήσει έτσι το πείραμα. Μαζί με τον κ. Χώτο ευχαριστούμε και τον κ. Βλάχο Νίκο και την πειραματική ομάδα του που μας βοήθησαν σε αρκετές περιπτώσεις .

Στην συνέχεια οφείλουμε να ευχαριστήσουμε τους ιχθυογεννητικούς σταθμούς **RIO PESCA** και **“ΘΑΛΑΣΣΑ”** των ομίλων **Σελόντα** και **Νηρέυς** αντίστοιχα , για την έγκαιρη παροχή ιχθυδίων, όταν αυτός ζητήθηκε. Επίσης θέλουμε να ευχαριστήσουμε το ίδρυμα **«Ε.Κ.Θ.Ε»** για την άμεση διάθεση καλλιέργειας βακτηρίου *Vibrio anguillarum* ορότυπου 1.

Θα θέλαμε ακόμα να ευχαριστούμε για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους στις διάφορες απορίες μας , τους καθηγητές κα. Παρπούρα Άλκηστης , κ. Βιδάλη Κοσμά τον κ. Αργυρίου Θανάση καθώς και τον κ.Λεονάρδο Ιωάννη με την βοήθεια του οποίου έγινε η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τους γονείς μας, οι οποίοι μας συμπαραστάθηκαν και μας υποστήριξαν σε κάθε μας επιλογή κατά την διάρκεια των τριών χρόνων της φοίτησής μας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η καλλιέργεια του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) αλλά και γενικότερα η υδατοκαλλιέργεια στην Ελλάδα γνωρίζει μια άνθιση. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των παραγωγών αλλά και μεταξύ των χωρών παραγωγής έκανε επιτακτική την ανάγκη της αύξησης της παραγωγής αλλά και της βελτίωσης της ποιότητας του τελικού προϊόντος. Η συνεχής πρόοδος πραγματοποιείται με την προσεκτική αναζήτηση των προβλημάτων σε κάθε τμήμα της παραγωγής, από την εκκόλαψη των ιχθυδίων, έως την συσκευασία και την προσπάθεια λύσης αυτών.

Ύστερα από προσωπική εργασία σε μονάδες πάχυνσης παρατηρήσαμε το ειδικό βάρος που έχει στις υδατοκαλλιέργειες ο τομέας των ασθενειών αφού επηρεάζουν άμεσα και τάχιστα την οικονομική εξέλιξη της παραγωγής. Αυτός είναι ο λόγος άλλωστε για τον οποίο έχει αυξηθεί σημαντικά η κατανάλωση αντιβιοτικών ενώ τελευταία εξελίσσονται και τα εμβόλια. Σαν νέοι Ιχθυολόγοι στον χώρο θελήσαμε να προσεγγίσουμε από μια επιστημονική γωνία το πρόβλημα, με σκοπό την παρατήρησή, την αξιολόγηση και την γνώση.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει σαν αντικείμενο μια από τις πιο γνωστές και συχνά εμφανιζόμενες στον ελλαδικό χώρο ασθένειες που πλήττει συνήθως το λαβράκι, την βιμπρίωση. Επιλέξαμε σαν αντικείμενο πειραματισμού τα ιχθύδια του λαβρακιού γιατί πιστεύουμε πως το πρόβλημα πρέπει να αντιμετωπίζεται εν τη γενέσει του. Ασχοληθήκαμε με την πιο αποτελεσματική κατά την γνώμη των ιχθυοπαθολόγων και παραγωγών αντιμετώπιση του προβλήματος, δηλαδή την πρόληψη με τα εμβόλια. Αυτό συμβαίνει γιατί, αντίθετα με τα αντιβιοτικά, Παρέχουν μακρόχρονη προστασία ακόμη και μετά από μια μόνο εφαρμογή, έχουμε μηδαμινές απώλειες παρά την εμφάνιση της νόσου στην περιοχή, χορηγούνται σε όλα τα ψάρια πριν νοσήσουν, δεν αφήνουν κατάλοιπα στον οργανισμό των ψαριών, δεν προκαλούν την δημιουργία ανθεκτικών στελεχών μικροβίων, είναι ακίνδυνα / αδρανή στο περιβάλλον και στον άνθρωπο, αυξάνουν τον συντελεστή

μετατρεψιμότητας και μειώνουν το κόστος παραγωγής από την αποφυγή χρήσης αντιβιοτικών.

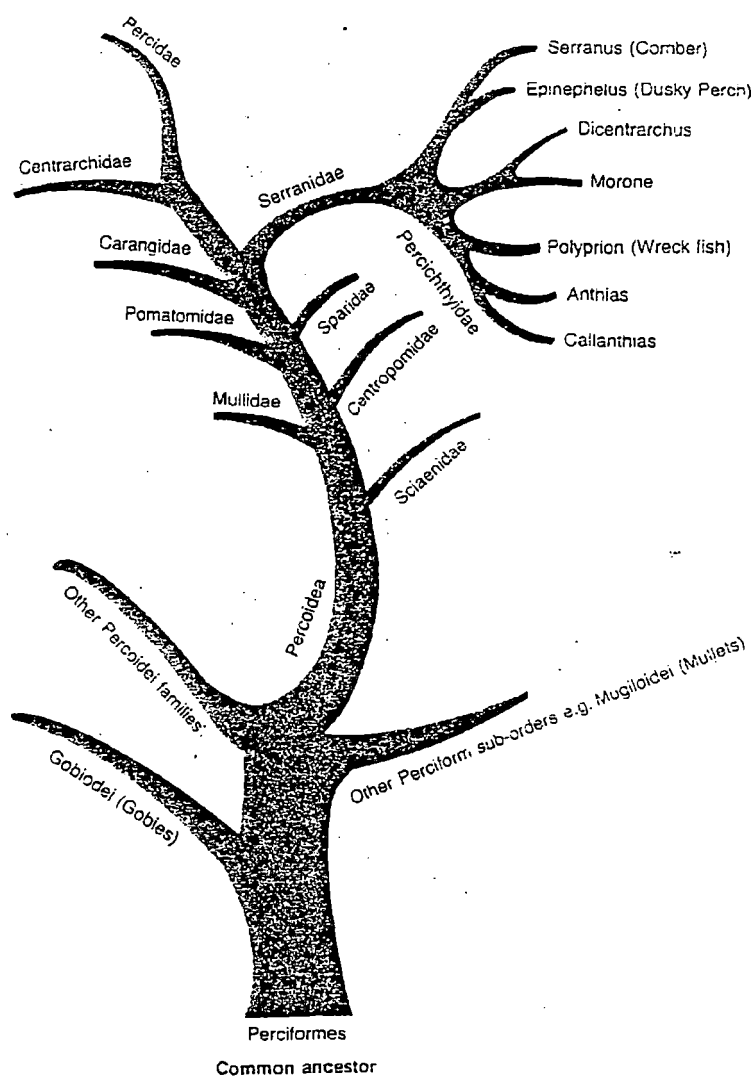
Έγινε μια προσπάθεια να προσεγγίσουμε και να γνωρίσουμε την επίδραση της ασθένειας στον νεοαναπτυσσόμενο οργανισμό καθώς και την επίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος των εμβολιασμένων και μη ιχθυδίων.

Για τον σκοπό αυτό διατηρούσαμε 2 ενυδρεία των 180 λίτρων με 180 ιχθύδια το κάθε ένα ως αποθεματικό πληθυσμό, 8 ενυδρεία των 40 λίτρων με 30 ιχθύδια το κάθε ένα χωρισμένα σε δύο ομάδες. Η πρώτη αποτελούσε τον εμβολιασμένο πληθυσμό και η δεύτερη τον μη εμβολιασμένο πληθυσμό. Για να έχουμε αντικειμενικά αποτελέσματα χρειαζόμασταν και ένα μέτρο σύγκρισης. Αυτόν τον ρόλο έπαιξε ένα ενυδρείο 40 λίτρων με 30 ιχθύδια που περιείχε τους μάρτυρες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΤΟ ΛΑΒΡΑΚΙ

1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΙΑ

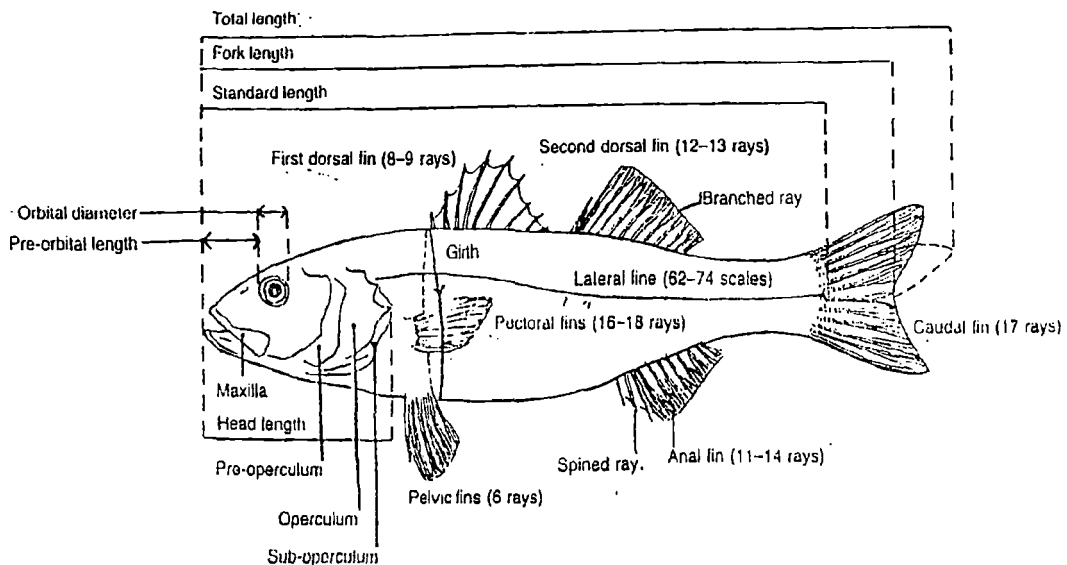


Εικόνα: Συστηματική κατάταξη

Το παρόν αποδεκτό επιστημονικό όνομα του λαβρακιού στην Ευρώπη είναι το *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus). Πρόσφατες δημοσιεύσεις στις Η.Π.Α. αναφέρονται σε αυτό ως *Morone labrax* (e.g. Waldman, 1986) ένα όνομα το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στην Ευρώπη για 100 χρόνια έως τα τέλη του 1960. Η συστηματική κατάταξη που γενικά είναι αποδεκτή στην Ευρώπη είναι η ακόλουθη :

ΟΜΟΤΑΞΙΑ	:OSTEICHTHYES
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ	:ACTINOPTERYGII
ΤΑΞΗ	:PERCIFORMES
ΥΠΟΤΑΞΗ	:PERCOIDEI
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	:SERRANIDAE
ΓΕΝΟΣ	:DICENTRARCHUS
ΕΙΔΟΣ	:DICENTRARCHUS LABRAX

1.1.2. ΓΕΝΙΚΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ



Εικόνα: Μορφολογία λαβρακιού

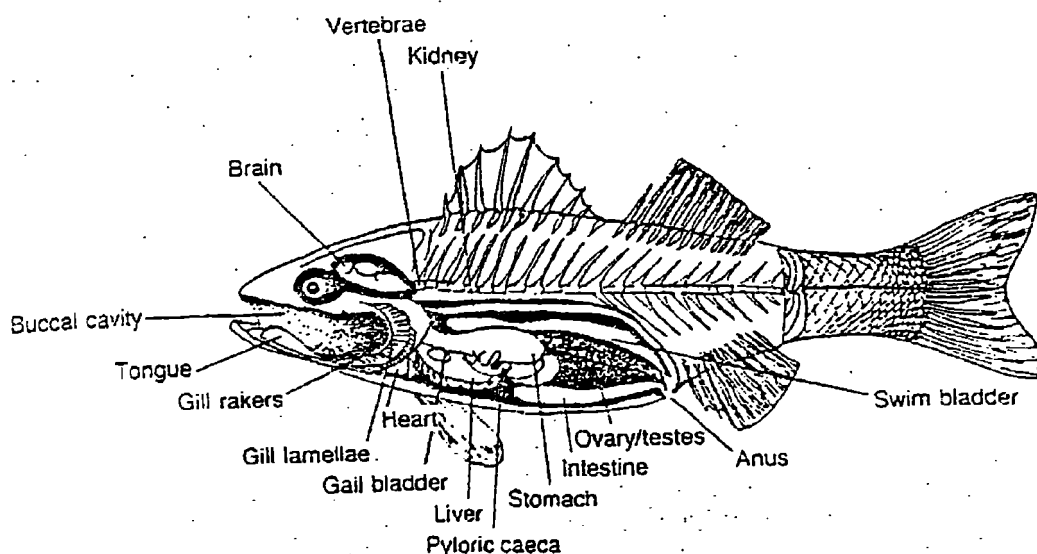
Τα κοιλιακά πτερύγια του λαβρακιού (μαζί με αυτά των άλλων μελών του είδους) είναι τοποθετημένα αρκετά μπροστά από την κοιλιακή χώρα και ελαφρώς πίσω από τα θωρακικά πτερύγια που βρίσκονται αρκετά πίσω από τα βραγχιακά επικαλύμματα. Τα θωρακικά πτερύγια έχουν το καθένα 16 – 18 μαλακές ακτίνες. Τα δύο ραχιαία πτερύγια είναι χωρισμένα. Το πρώτο ραχιαίο πτερύγιο έχει 8 – 9 μαλακές ακτίνες και το πίσω ραχιαίο πτερύγιο έχει την πρώτη ακτίνα σκληρή και 11 – 12 διακλαδισμένες (μαλακές) ακτίνες. Η πρώτη ακτίνα των κοιλιακών πτερυγίων τα οποία έχουν 5 μαλακές (διακλαδισμένες) ακτίνες, και οι 3 πρώτες ακτίνες του εδρικού πτερυγίου (το οποίο έχει 9 – 11 μαλακές ακτίνες), είναι πολύ σκληρές και κοφτερές. Το ουραίο πτερύγιο είναι δίλοβο και φυσιολογικά έχει 17 μαλακές (διακλαδισμένες) ακτίνες, αλλά μπορεί να έχει και λιγότερες, έως 13, και είναι χρωματισμένο γκρι, ενώ καμιά φορά τα θωρακικά και τα κοιλιακά πτερύγια έχουν αχνές μπλε άκρες.

Το σώμα του λαβρακιού είναι καλυμμένο από μεγάλα, κανονικά κοινά λέπια, και το χρώμα του ποικίλει πολύ εξαρτώμενο από την προέλευση του ψαριού, έχοντας εύρος από σκούρο γκρι, μπλε ή πράσινο στην ράχη και λευκό ή υποκίτρινο στην κοιλιά. Τα πλευρά είναι ασημο-μπλέ, καμιά φορά υπόχρυσα ή χάλκινα στο χρώμα. Οι ορατές άκρες των λεπτιών είναι συχνά στην κόψη τους μαύρες, ειδικά σε μεγαλύτερα δείγματα. Τα λέπια είναι tooth-like στο ορατό τους τμήμα ενώ αυτά στο κεφάλι είναι λεία χωρίς μια ξεκάθαρη τμηματοποίηση. Η κορυφή του κεφαλιού δεν έχει λέπια. Το κεφάλι στα νεαρά λαβράκι φαίνεται αρκετά μυτερό, αλλά γίνεται κοίλο στα μεγαλύτερα σε ηλικία λαβράκια, και σκιάζεται με χρώματα από σκούρο γκρι ή μαύρο από πάνω, μεταλλικές αποχρώσεις του ασημιού, έως το χρυσό και μπλε-μοβ στις πλευρές και βραγχιακά επικαλύμματα. Το κάθε βραγχιακό έχει δύο λείες (κοφτερές) αρθρώσεις στο δεύτερο άκρο. Τα μάτια είναι σχετικά μεγάλα για θαλασσινό ψάρι και το μάτι είναι ασημί-άσπρο, χρυσίζον. Το στόμα είναι μεγάλο με ένα χαρακτηριστικό *Perciform* "Gladstone bag" σχήμα όταν ανοίγει, και η γνάθος του ξεχωρίζει. Η γλώσσα έχει τμήματα με δόντια, με οδοντικές πλάκες ριζωμένες στους μαλακούς ιστούς της γλώσσας. Υπάρχουν μικρές περιοχές με δόντια στο κάτω μέρος του στόματος, στην κεντρική οδοντική πλάκα πάνω στο οστό του ουρανίσκου και στις δύο πλευρές της κορυφής του στόματος. Υπάρχουν ακόμη μικρές περιοχές με δόντια μέσα στο στόμα μπροστά από την γλώσσα. Αυτά τα χαρακτηριστικά (μαζί με το βραγχιακό

προ – επικαλυμματικό οστό) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς.

Το λαβράκι τον πρώτο χρόνο έχει την τάση να είναι πιο άτονο χρωματικά στην εμφάνιση από ότι συμβαίνει στα γηραιότερα ψάρια, και συνήθως έχει σκούρες κηλίδες στο πίσω και πάνω μέρος. Φυσιολογικά αυτές οι κηλίδες εξαφανίζονται όταν το ψάρι γίνεται ενός χρόνου, αν και ορισμένα άτομα τις διατηρούν καλά και τον δεύτερο χρόνο.

1.1.3. ANATOMIA



Εικόνα: Ανατομία λαβρακιού

Στις δημοσιευμένες περιγραφές δεν έχει δοθεί μεγάλη σημασία στην ανατομία του λαβρακιού αλλά στο παραπάνω σχήμα παρουσιάζεται ένα απλοποιημένο διάγραμμα. Για περισσότερες λεπτομέρειες στην ανατομία, πεπτικό σύστημα, νευρικό σύστημα, μυς και φυσιολογία προτείνεται ο Graig (1987), που έκανε μια πολύ αναλυτική μελέτη της Πέρκας (*Perca fluviatilis*) η οποία αν και από διαφορετική οικογένεια, έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την οικογένεια των *Serranidae*.

Ο Βου Αιν (1977) δουλεύοντας στην Τυνησία, μελέτησε τη μορφολογία και την ανατομία του *D.labrax* και του *D.punctatus* και περιέγραψε τα κύρια σκελετικά χαρακτηριστικά. Κρανίο, οστά βραγχιακών επικαλυμμάτων, οτόλιθος, σπονδύλους, ακτίνες πτερυγίων και λέπια. Ορισμένοι τομείς μελετήθηκαν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια π.χ. οι οτόλιθοι, από τους Boulineau-Coatanea (1968) που εργάζονταν στην Βρετανία. Αναφορές για τον σκελετό του λαβρακιού γίνονται συχνά, όμως μόνο με το μέτρημα των σπονδύλων για διαγνωστικούς σκοπούς. Ο Gravién (1961) π.χ. μετρά 25 για το μαροκινό λαβράκι, το οποίο ταιριάζει τόσο στο *D.labrax* όσο και στο *D.punctatus*, αν και ο Βου Αιν κατέγραψε λίγα λαβράκια με 24 σπονδύλους.

Είναι κοινό πως στα κυνηγητικά είδη, ο πεπτικός σωλήνας, όπως και του λαβρακιού, είναι σχετικά κοντός και τα έντερα είναι σχεδόν ευθύγραμμα χωρίς περιστροφές και καμπύλες, μέσα στην κοιλιακή χώρα. Τα βασικά όργανα, καρδιά, συκώτι, στομάχι και σπλήνα βρίσκονται αρκετά μπροστά, αφήνοντας έτσι χώρο για την ωρίμανση γονάδων και για την συσσώρευση μεσοεντερικού λίπους. Όπως όλα τα *Perciformes* το λαβράκι φυσόκλειστο, έχοντας μια κλειστή νηκτική κύστη (αεροκύστη) η οποία δεν συνδέεται με τον οισοφάγο.

1.1.4. ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

Η καλλιέργεια του λαβρακιού πιθανών πρώτα έγινε από τους Ρωμαίους που συλλάμβαναν άγριο γόνου και τον ανέθρεφαν σε μικρές συγκεντρώσεις νερού και σε δεξαμενές. Ανά τους αιώνες, εκτατικά συστήματα σε λιμνοθάλασσες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη λαβρακιών με έναν λογικό βαθμό επιτυχίας, ειδικά γύρω από την Μεσόγειο, αλλά και στην ακτή του Ατλαντικού στην Γαλλία, μεταξύ νότιας Βρετανίας και του Arcachon (Clement, 1990). Τα τελευταία 20 χρόνια η εκτατική καλλιέργεια του λαβρακιού αναπτύχθηκε ταχέως βασισμένη κυρίως σε κυβερνητικά υποστηριζόμενα πειραματικά συστήματα. Σήμερα η οικονομικά βιώσιμη παραγωγή έχει γίνει μια πραγματικότητα και τα αρχικά προβλήματα που είχαν να κάνουν με την παραγωγή γόνου λαβρακιού από αυγά που εκκολάπτονται σε αιχμαλωσία έχουν ξεπεραστεί σε μεγάλο βαθμό. Σαν συνέπεια, οι μονάδες τώρα μπορούν να εγγυηθούν συνήθως εφοδιασμούς υψηλής ποιότητας

διαλεγμένων κατά μέγεθος ψαριών σε μια σταθερή τιμή, μια προσφορά που δεν μπορεί να καλυφθεί από χονδρέμπορους άγριου λαβρακιού, που πρέπει να βασίζονται σε εποχιακές και μάλλον απρόβλεπτες αλιεύσεις. Πολλή από την γνώση που κερδίστηκε από την καλλιέργεια λαβρακιού (και άλλων ειδών) στα πρόσφατα χρόνια έχει επισκοπηθεί και περιληφθεί από τον Bergabe (1990), και έτσι έχει περιοριστεί η καταμέτρηση των τρόπων καλλιέργειας σε μια βασική περιγραφή.

Η καλλιέργεια του λαβρακιού γίνεται με τις ακόλουθες 4 κύριες καλλιέργειες:

Εκτατική – χρησιμοποιώντας το φυσικό περιβάλλον με μη αυξανόμενη παροχή τροφής.

Ημiekτατική - με θερμοκρασίες περιβάλλοντος αλλά σε συγκεντρώσεις νερού ή σε κλουβιά με συμπληρωματική παροχή τροφής.

Εντατική – σε τεχνητά θερμαινόμενο νερό π.χ. νερό από σταθμούς ενέργειας που χρησιμοποιείται ως ψυκτικό μέσο και αποβάλλεται, με μια πλήρως βιομηχανοποιημένη παροχή τροφής.

Παραγωγή γόνου από εκκόλαψη – για ανάπτυξη με τις μεθόδους 2 και 3.

Σημείωση: Άγριος γόνος συλλαμβάνεται και χρησιμοποιείται στις κατηγορίες 1 έως 3.

1.1.5. ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Είναι ψάρι κοινό σε ολόκληρη την περιοχή της Μεσογείου, καθώς και τις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού Ωκεανού.

1.1.6. ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ – ΒΙΟΤΟΠΟΣ

Το λαβράκι είναι ευρύθερμο και ευρύαλο ψάρι, με δυνατότητα επιβίωσης σε νερά διάφορων θερμοκρασιών και αλατοτήτων. Έτσι προσαρμόζεται και σε γλυκά νερά. Προτιμά όμως τα υφάλμυρα νερά όπου το συναντάμε κυρίως την Άνοιξη. Μερικές φορές ανεβαίνει το ποτάμι. Στη θάλασσα επιστρέφει κυρίως κατά την διάρκεια της αναπαραγωγής. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι συχνάζει

σε παράκτια ύδατα ανεξάρτητα από το βάθος τους. Συναντάται σε μια ποικιλία βιοτόπων από βραχώδεις και αμμώδεις περιοχές και φυκάδες.

1.1.7. ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Το λαβράκι είναι αρπακτικό, αδηφάγο ψάρι, που τρέφεται με μικρά ψάρια, καρκινοειδή, κεφαλόποδα, μαλάκια, κ.λ.π. Η δίαιτα ενός ψαριού 2 ετών ή και μεγαλύτερων περιλαμβάνει κυρίως μικρά ψάρια (σαρδέλες, γαύροι) και ασπόνδυλα.

1.1.8. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Είναι γονοχωριστικό είδος. Στην περιοχή της Μεσογείου, η αναπαραγωγή του πραγματοποιείται συνήθως κατά το διάστημα, από το τέλος Οκτωβρίου ως τις αρχές Μαρτίου. Η εντονότερη αναπαραγωγική δραστηριότητα παρατηρείται κατά τον Ιανουάριο. Σύμφωνα με τις σχετικές μελέτες τα θηλυκά άτομα δεν ωριμάζουν γεννητικά αν η αλατότητα είναι κάτω από 10 ‰ . Κατά την αναπαραγωγή συναθροίζεται σε κοπάδια.

1.2. VIBRIOSIS

1.2.1. Αντιπρόσωποι της οικογένειας *Vibrionaceae*

Τα είδη *vibrio* εμφανίσθηκαν ως μάλιστα των θαλάσσιων ψαριών και οστρακοειδών. Στην Ιαπωνία οι ετήσιες απώλειες τώρα πλησιάζουν τα 15.000.000 Yen. Το ανανεωμένο ενδιαφέρον κατέληξε στην περιγραφή νέων ειδών και σε μία καλύτερη κατανόηση της βιολογίας των αναγνωρισμένων τάξεων (*taxa*). Πολλά είδη περιγράφηκαν ως παθογόνα των ιχθύων. Επιπρόσθετα τα *Vibrio* που ήταν δύσκολο να προσδιοριστούν τώρα έχουν εντοπισθεί (Yasunabu et al. 1988; Masumura et al., 1989 ; Muroga et al., 1990). Πρέπει να τονισθεί πως από τα αποτελέσματα των rRNA φύλο γενετικών στοιχείων, έχει προταθεί πως τα παθογόνα των ιχθύων *Vibrio anguillarum* και *V. damsela* πρέπει να μεταφερθούν στο νέο γένος, *Listonella* (Mac Danell και Colwell, 1985). Το *Listonella damsella* μετατράπηκε περιστασιακά σε *Photobacterium damsella* (Smith et al., 1991).

Υπάρχει αντίθεση στον ρόλο του *V. parahaemolyticus* ως παθογόνο των ιχθύων, και δεν είμαστε απόλυτα ευχαριστημένοι με τις αποδείξεις. Έτσι για τον σκοπό αυτού του κεφαλαίου, βγήκε το συμπέρασμα πως μικροοργανισμός δεν αποτελεί ένα αξιόπιστο παθογόνο των ιχθυδίων. Ωστόσο οργανισμός με ενδιάμεσα χαρακτηριστικά ανάμεσα σε *V. alginolyticus* έχουν απομονωθεί από προσβεβλημένα milkfish στις Φιλιππίνες (Muroga et al., 1984α).

1.2.2 *Listonella anguillarum* (= *Vibrio anguillarum*).

Τα "red -pest" (που αναφέρονται ιστορικά ως *pestis rubra anguillarum* και *erysipelosis anguillarum*) προκάλεσαν καταστροφικές απώλειες σε χέλια που υπήρχαν σε περιοχές με αλμυρό νερό στην Ιταλία κατά την διάρκεια του 18ου και 19ου αιώνα. Η τέλεια περιγραφή σε μία έξαρση των "red- pest" σε χέλια το 1718 είναι η πρώτη αναφορά για ασθενείς σε ιχθύες στην Ευρωπαϊκή λογοτεχνία (Bonoweri, 1761). Η βιμπρίωση κέρδισε σημαντική φήμη στην υδατοκαλλιέργεια και έχει γίνει ένας βασικός περιοριστικός παράγοντας στην

επιτυχημένη ανάπτυξη των σαλμονειδών (Mahuken, 1975). Για να αναφέρουμε ένα παράδειγμα, στην Δανία, η ασθένεια κατέληξε σε αυξημένη απώλειες του 30% ανάμεσα σε χέλια (Bruun and Heiburg, 1935). Μια έκδοση ανέφερε πως η βιμπρίωση εμφανίζεται σε περισσότερες από 14 χώρες και έχει προσβάλει σχεδόν 48 είδη θαλασσίων ειδών. Η βιμπρίωση φαίνεται πως πρωτοπαρουσιάστηκε στα ευρωπαϊκά ύδατα. Η βόρεια Αμερική απέφυγε την εξάπλωση μέχρι το 1953 (Cross et al., 1977). Η άφιξη της βιμπρίωσης στην Ιαπωνία έγινε το 1975 από εισαγόμενα χέλια από την Γαλλία (Muroga et al., 1976a,b). Τα στοιχεία δείχνουν επίσης πως η ασθένεια παρουσιάζεται και σε γλυκά νερά (Muroga, 1975; Ghittino and Andruetto, 1977). Αυτό δείχνει πως η βιμπρίωση είναι μία ευρέως διαδεδομένη ασθένεια. Συνεπώς, η βιβλιογραφία αναφέρει με ανακοινώσεις νέες απομονώσεις μέσω εικασιών, που αργά οδηγούν σε σύγχυση. Ωστόσο θα φανεί πως κατά βάση η βιμπρίωση είναι ένα σύνδρομο που προκαλείται από μία πολυπλοκότητα των βίμπριο (see Schiewe, 1981). Εδώ έμφαση θα δοθεί στο *V. anguillarum* (=Listohella anguillarum).

Ο συνήθης παράγοντας του "red -pest" στα χέλια απομονώθηκε πρώτα από τον Canestrini (1893), που προσδιόρισε τον οργανισμό ως *Bacterium anguillarum*. Μία άλλη υπόθεση σε χέλια ερευνήθηκε στην Σουηδία κατά την διάρκεια του 1907 από τον Bergman (1909) και το όνομα *V. anguillarum* χρεώνεται σε αυτόν τον επιστήμονα. Ένας υπολογισμός της ακριβούς ταξινομικής θέσης του οργανισμού θα δοθεί αργότερα.

1.2.3. Χαρακτηριστικά της ασθένειας

Ταιριαστές αλλά τρομακτικές περιγραφές έχουν γίνει για την φύση της βιμπρίωσης στους ιχθύες. Για τους μικροβιολόγους η ασθένεια μπορεί να θεωρηθεί ως άλλη μία αιμορραγική σηψαιμία. Τυπικά, τα προσβεβλημένα ψάρια παρουσιάζουν αποχρωματισμό, παρουσία νεκρών κόκκινων περιοχών στον κοιλιακό μυ, και αιμορραγίες στη βάση των πτερυγίων, γύρω από τον οισοφάγο, μέσα στο στόμα (υπάρχει ομοιότητα με το εντερικό κόκκινο στόμα (enteric red mouth), που προκαλείται από το *Yersinia ruckeri*). Το έντερο και το τελευταίο άκρο του πεπτικού σωλήνα μπορεί να είναι

διασταλμένο και γεμισμένο με κολλώδες υγρό. Μπορεί να παρουσιασθεί και εξόφθαλμος (Anderson and Congroy, 1970). Στον σολομό του Ειρηνικού στον γόνο του, μία βακτηριαιμία στα αρχικά στάδια της ασθένειας. Από ιστολογικές εξετάσεις μπορεί να βγει το αποτέλεσμα πως υπάρχουν παθολογικές αλλαγές στο αίμα, στους συνδετικούς ιστούς στα βράγχια, στο νεφρό, συκώτι (αναιμία), αργότερα στην γαστροεντερική περιοχή, και διόγκωση της σπλήνας. Τα βακτηριακά κύτταρα φαίνεται πως είναι ομοιόμορφα κατανομημένα στους μολυσμένους ιστούς, αν και η μεγαλύτερη συγκέντρωση τους βρίσκεται στο αίμα (Tajima et al., 1981; Ranjom et al., 1984). Συνήθως τα μολυσμένα ψάρια γίνονται μη ενεργητικά (νωχελικά), ανορεξία (αυτό μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα στη χημειοθεραπεία), και παρουσιάζεται μεγάλη θνησιμότητα.

1.2.4. Απομόνωση του παθογόνου.

Το παθογόνο μπορεί να άμεσα να ανακτηθεί από μολυσμένο ιστό με τη χρήση trypton soya agar (Traxler and Li, 1972) θρεπτικό υπόστρωμα (Muroga et al., 1976a, b) και brain heart infusion άγαρ (Tajima) με πρόσθεση χλωριούχο νάτριο σε 0,5-3,5% (w/v), θαλασσινού νερού άγαρ και thiasulphate sitrate bile salt sucrose άγαρ (Bolinches et al., 1988) με επώαση στους 15-25°C για περίοδο μέχρι 7 ημέρες (Isolation and Identification of fish bacterial pathogen by G. Nicolas Frerichs BVMS, PhD, MRCUS, Dip. Bact. Institute of Acqaculture University of Stirling, Scotland, 1984).

1.2.5. Χαρακτηρισμός του παθογόνου.

Η ταξινόμηση του παθογόνου είχε μεγάλη ιστορία, που κλιμακώθηκε στην διατύπωση και ονομασία ενός δεύτερου είδους, i.e.. *V. ordalli*. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη του ορότυπου 2 *V. anguillarum* (Schiewe, 1981). Η πολυπλοκότητα στην ταξινομική κατανόηση άρχισε με την αναγνώριση από τον Nybelin (1935) των δυο οροτύπων. Αυτοί διαφοροποιήθηκαν με βάση μερικών βιοχημικών αντιδράσεων. Μία επερχόμενη ομάδα, για παράδειγμα οροτύπος C αναγνωρίσθηκε από τον Smith (1961). Αυτοί οι ορότυποι

διακρίθηκαν ακολούθως: -Τύπος Α γνωστός ως *V.anguillarum forma typica* παράγει ινδόλη και οξύ από μανιτόλη και σακχαρόζη.- Τύπος Β αναφέρεται ως *V. anguillarum forma anguillcida*, δεν παράγει ινδόλη ή οξύ από μανιτόλη ή σακχαρόζη. - Τύπος C ονομασμένος ως *V. anguillarum forma ophthalmica* , παράγει οξύ από μανιτόλη και σακχαρόζη , αλλά δεν παράγει ινδόλη.

Δύο περαιτέρω ορότυποι , π.χ. ο D και ο E, περιγράφηκαν αργότερα, που και οι δύο παρήγαγαν ινδόλη, αλλά όχι οξύ από μανιτόλη. Ο ορότυπος D, αλλά όχι ο E, παράγει οξύ από σακχαρόζη. Από σύγχρονης πλευράς στην βακτηριακή ταξινόμηση, αυτές οι περιγραφές είναι ανεπαρκείς. Όμως έτυχαν εκτίμησης και αναγνώρισης στη ετερογενία μέσα στα είδη. Ο ορότυπος C αξίζει ειδική αναφορά γιατί αυτό προτάθηκε για Ιαπωνικά μέτρα της rainbow trout, και ονομάστηκε *V. piscium var. japonicus* (David, 1927; Hoshina, 1956). Αξιοσημείωτο είναι πως αρχικά αναγνωρίστηκαν ως ανάμοια με το *V.anguillarum*. Αλλιώς πρέπει να δεχτεί πως το ξεχωριστό όνομα μπορεί να έχει επηρεάσει στην άγνοια της ύπαρξης του *V.anguillarum* όπως περιγράφεται από τον Berkman (1909). Η σχέση αυτών των επονομαζόμενων βιότυπων με το *V.ichthyodermis* , όπως περιγράφεται από τον Wells και τον ZoBell (1934) ,και τον οργανισμό που ονομάστηκε ως *V.anguillcida* (Nishibuchi και Muroga,1977) χρειάζεται διελεύκανση. Σίγουρα το τελευταίο θεωρήθηκε ως το πιο όμοιο με τα *V.anguillarum* και *V.fischeri*.

Η πολυπλοκότητα των μελετών των Harrell et al. (1976), Ohnishi και Muroga (1976), Hastein και Smith (1977), Schiewe et al. (1977), Baumann et al. (1977), Kusuda et al. (1979), Ezura et al.(1980), Lee et al. (1981), Kaper et al. (1983) και West et al. (1983) παρουσίασαν πολύ καθαρά την ετερογενεία μέσα στο *V.anguillarum*. Οι Hastein και Smith (1977) διέκριναν δύο υποομάδες από μια αρχική ανάλυση αντιπάλων σε στοιχεία που μάζεψαν από 163 απομονώσεις και 28 τεστ. Μια παραπλήσια κατάληξη, πχ. σε δύο υποομάδες, είχαν οι Schiewe et al. (1977), Baumann et al. (1978), Ezura et al. (1980), και ο Lee et al. (1981). Από τις 50 απομονώσεις που μελετήθηκαν με αριθμητική ταξινόμηση, ο Kusuda et al. (1979) διέκρινε τρεις ομάδες. Αυτές ομοίαζαν με το *V.anguillarum* (χωρισμένο σε τρεις υποομάδες), μία ομάδα στενά συγγενική με το *V.parahaemolyticus*, και μια ομάδα είχε στενή σχέση με το *V.ichthyodermis*. Οι Kaper et al. (1983) αναγνώρισε τέσσερις ομογενείς φαινοτύπους ανάμεσα στις απομονώσεις

που δέχονταν ως *V.anguillarum*. Αυτή η άποψη ενισχύθηκε από μια μεταγενέστερη μελέτη του West et al. (1983). Η τάξη μετονομάστηκε σε *Listonella*, δηλαδή *Listonella anguillarum* (Mac donell et al.,1986). Η περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη για να αποκαλυφθεί η χασοτική ταξινόμηση που περιστοιχίζει τα παθογόνα για τα ψάρια, *Vibrio*. Για το παρόν ο προσδιορισμός του *Listonella anguillarum* φαίνεται να είναι :

λευκού χρώματος, κυκλικές, ογκώδεις και γυαλιστερές αποικίες (0,5X1,5μm), ζυμωτικό, gram- δονάκια, που είναι κινητά από ένα πολικό μαστίγιο. Παράγονται καταλάση, οξειδάση, ινδόλη, β-γαλακτοσιδάση και αργινίνη δυοδρολάση, αλλά όχι H₂S, λυσίνη ορνιθίνη δυκαρβοξυλάση φαινυλαλανίνη δυαμινάση ή ουρεάση, παράγονται. Μαζί με άλλα *Vibrio*, ευαισθησία παρατηρείται με τον βιμπριοστατικό παράγοντα, O129. Ένα θετικό αποτέλεσμα συνήθως καταγράφεται για την Voges-Proskauer αντίδραση, αλλά και με τη δοκιμασία με κόκκινο του μεθυλίου. Με δοκιμασία ζελατίνης, DNA, λιπίδια και αμύλου, αλλά όχι και αεσκουλίνη που υποβαθμίζεται. Τα νιτρικά μειώνονται. Ανάπτυξη παρατηρείται στους 15-37°C, και σε 0,3-3,0 (w/v) όπως επίσης και 7% (w/v) sodium chloride. Οι citrate, malonate και η tartate χρησιμοποιούνται. Οι οργανισμοί παράγουν οξύ από arabinose, cellobiose, galactose, glycerol, maltose, mannitol, sorbitol, sucrose, trehalose, αλλά όχι από adonitol, dulcitol, erythritol, inositol, lactose, melibiose, raffinose, rhamnose, salicin ή xylose . Η G+C αναλογία του DNA είναι 45,6 moles% (Table 12.1 ; Smith , 1961 ; Kiehn και Pacha , 1969 ; Evelin , 1971 , Muroga et al., 1976 a,b ; Schiewe et al., 1981 , Baumann et al., 1984) .

Τα περαιτέρω αποτελέσματα μπέρδεψαν περισσότερο την κατανόηση του *L.anguillarum* (Bolinges et al.1990). Η εγκαθίδρυση των οροτύπων επέκτειναν τα σύνορα των ειδών (ή τους φαινοτύπους τους). Αρχικά τρεις ορότυποι αναγνωρίστηκαν ως απομονώσεις από τοις βορειοδυτικές περιοχές των U.S.A. στα σαλμονοειδή, στην Ευρώπη, και στον βορειοδυτικό Ειρηνικό (U.S.A.) (Pacha και Lein ,1969). Αυτό υποστηρίχθηκε από την δουλειά των Ιαπώνων επιστημόνων (Aoki et al .1981 ,Muroga et al.1984b). Με περαιτέρω ανάλυση ο αριθμός των οροτύπων αυξήθηκε στους έξι (Kitao et al.,1983) . Έτσι σε μια γιγαντιαία μελέτη με 267 απομονώσεις από μαγιάτικα, χέλια και

πέστροφες, ο Kitao και άλλοι συνάδελφοί προσδιόρισαν τους οροτύπους A , B , C , D , E και F ως αποτέλεσμα διασταυρωμένων συγκολλήσεων και διασταυρωμένης απορρόφησης δοκιμασίες με ισοθερμικά O (σωματικά) αντιγόνα. Η πλειοψηφία, 243 απομονώσεις, αναφέρονται στον ορότυπο A. Επίσης είναι αξιοσημείωτο πως μερικές απομονώσεις δεν εντάχθηκαν σε κανέναν από τους οροτύπους (Muroga et al., 1984b). Αυτό επιδρά στην φύση λιποσακχαρίνης στο κυτταρικό τοίχωμα, που επιδρά και στην φύση του οροτύπου (Johnson , 1977 , Aoki et al., 1981) και στην ανοσογενετική. Πιο πρόσφατα, οι Sørensen και Larsen (1986) ανέφεραν την παρουσία 10 O-αντιγόνου οροτύπους, βασισμένες στην εξέταση 495 απομονώσεων. Οι ορότυποι O1 και O2 περιέχουν πλασμίδια, αλλά δεν υπάρχει προφανή συσχέτιση ανάμεσα στην παρουσία τέτοιου εξωχρωμοσωμικού DNA και βιοχημικών ιδιοτήτων (Larsen και Olsen , 1991) .

1.2.6. Διάγνωση

Αν και οι διαγνωστικοί πίνακες μπορεί να είναι επαρκείς για την αναγνώριση των φρέσκων καλλιεργειών, η προσοχή έχει επικεντρωθεί σε γρήγορες τεχνικές. Για παράδειγμα ο Kent (1982) και ο Maugeri et al . (1983) έδωσαν έμφαση στην χρησιμότητα του API 20E ταχείας διάγνωσης σύστημα . Ο Kent παρουσίασε το προφίλ του *L. anguillarum* ως εξής :

+ v - - + - - - v + + + + - + - + - v +

όταν ο Maugeri και οι συνάδελφοί του δημοσίευσαν έναν άλλο τύπο ,

v + - - v - - - v v v + + - - - v - + v +

όπου τον συμβολίζει ένα μεταβλητό αποτέλεσμα. Σίγουρα είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί το πρωτόκολλο για χρήση στα θαλάσσια βακτήρια . Έτσι, ήταν απαραίτητο να καλλιεργήσουν τα βακτήρια σε 2-3% (w/v) NaCl περιβάλλον αντί απιονισμένου νερού, και τα στείρα tests επωάστηκαν σε Θ 25°C αντί σε 37°C για περίπου 48h. Ο Maugeri et al. (1983) θεώρησε ότι ήταν σωστό εκπονηθούν κάποια επιπρόσθετα tests, ευαίσθητα στο O/129, για να επιβεβαιωθεί πως οι απομονώσεις ήταν σίγουρα κινητικές και ήταν καλυμμένες από τον βιμπριοστατικό παράγοντα. Όμως, μερικές καλλιέργειες μπορεί να είναι ανθεκτικές στην δράση του O/129 (Muroga et al., 1979) και

φαίνεται πως είναι μη-κινητές. Το τελευταίο φαινόμενο μπορεί να δημιουργηθεί από έκθεση στην εν μέρη στατική λειτουργία μερικών αντιμικροβιακών ενώσεων .

Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για να επιβεβαιωθεί η ακριβής αντίδραση για το *L.anguillarum* .

Η ταυτοποίηση του *L.anguillarum* στους ιστούς των ψαριών επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας μονομερώς 16S rRNA συχνότητες και ένα συγκεκριμένο 16S rRNA ολιγονουκλεοτιδικό έμβολο (Rehnstan et al.,1989). Το περιοριστικό όριο ήταν 5×1000 cells/ml σε καλλιέργεια ή σε κομμάτια ιστού .

Μια άλλη άποψη αφορά τον περιορισμό ενός θερμοασταθές O - αντιγόνου, ορισμένο το K - 1 αντιγόνο από συγκόλληση σε αντικειμενοφόρο πλάκα (Tajima et al.,1987). Μέχρι τώρα τα στοιχεία δείχνουν πως αυτό το αντιγόνο είναι συγκεκριμένο στο *L.anguillarum* .

1.2.7. Χαρακτηριστικά του *Listonella anguillarum* ορότυπος 1

Χαρακτηριστικά	<i>V. (Listonella) anguillarum</i> ορότυπος 1
3-12 polar flagella	-
Lateral flagella on solid media	-
Swarming	-
Straight rods	-
PHB accumulation	-
Pigment	-
Arginine dihydrolase	+
Oxidase	+
Nitrate reduction	+
Luminescence	-
D-Glucose, gas	-
Acetoin and/or diacetyl production	+
Na ⁺ required for growth	+
Organic growth factor requirement	-
4°C, growth	-
30°C, growth	+
35°C, growth	+
40°C, growth	-
Amylase	+
Gelatinase	+
Lipase	+
Alginase	-
Chitinase	+
Utilization of:	
Acetate	+
Aconitate	+
β-Alanine	-
D-Alanine	+
L-Alanine	d
γ-Aminobutyrate	-
δ-Aminovalerate	-
L-Arabinose	+
L-Arginine	-
L-Aspartate	+
Butyrate	-
Caprate	d
Caproate	+
Caprylate	+
Cellobiose	+
Citrate	+
Citrulline	-

Ethanol	-
D-Galactose	d
D-Galacturonate	-
D-Gluconate	+
L-glutamate	+
Glutarate	-
D-Glucuronate	-
DL-Glycerate	+
Glycine	-
Heptanoate	-
L-Histidine	+
<i>p</i> -Hydroxybenzoate	-
β -Hydroxybutyrate	-
<i>myo</i> -Inositol	d
Isobutyrate	-
α -Ketoglutarate	+
DL-Lactate	+
Lactose	-
L-Leucine	-
DL-Malate	+
D-Mannitol	+
D-Mannose	+
Melibiose	-
L-Ornithine	-
Pelargonate	-
L-Proline	+
Propanol	-
Propionate	+
Putrescine	-
Pyruvate	+
Quinate	-
L-Rhamnose	-
D-Ribose	d
Salicin	-
L-Serine	+
D-Sorbirol	+
Sucrose	+
Trehalose	+
L-Tyrosine	-
Valerate	-
D-Xylose	-

- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology –9 (Table 5.52A)

1.2.8. Έλεγχος

1.2.8.1. Εμβόλια

Το *L. anguillarum* είναι ένας από τους λίγους επιτυχείς υποψήφιους για εξέλιξη εμβολίου. Υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια, που φαίνεται πως συνεχώς κερδίζουν έδαφος στις υδατοκαλλιέργειες. Ειρωνικά τα αίτια για την επιτυχία αυτών των προϊόντων είναι πολύ περίεργα. Υπάρχουν λίγα στοιχεία που δείχνουν πως τα εμβολιασμένα ψάρια γενικά διαβιών πιο καλά, π.χ. παρουσιάζουν γενικά καλύτερη υγεία και ανάπτυξη αντί αυτών που δεν έχουν εμβολιασθεί (Kajita et al., 1990).

Η ανοσογεννητική φαίνεται πως είναι μια αντικατόπτριση στην παρουσία θερμοσταθερών (100-121°C) λιποπολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τοίχωμα (Salati et al., 1989), που μπορεί να ελευθερωθούν σε μία καλλιέργεια (Chart και Trust, 1984 ; Evelyn , 1984). Αυτοί οι αντίπαλοι υψηλού μοριακού βάρους π.χ. 100KDa (Evelyn και Ketcheson, 1980), υπολογίζονται να προσφέρουν προστασία στους προσβαλλόμενους οργανισμούς. Επίσης, οι ενώσεις μπορούν να αντέξουν ισχυρές μεθόδους δίωξης. Οι Craft και Trust (1984) απομόνωσαν, από την εξωτερική μεμβράνη, δύο δευτερεύοντες πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 45-51 KDa, οι οποίες ήταν έμφυτα αντιγόνα. Μία ασθενής αντιγονική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 40KDa ήταν επίσης παρόν. Ίσως αυτές είναι θερμοευαίσθητες, και αυτό εξηγεί τους λόγους για την μεγαλύτερη προστασία που επιτεύχθηκε με τα φορμόλη αν ενεργεί εμβόλια συγκριτικά με τα μη ανεκτικά στην θερμότητα προϊόντα (Kusuda et al., 1978; Itami και Kusuda, 1980). Η φύση των πολυσακχαριτών ως ανοσογόνα παρουσιάσθηκε καθαρά από τον Salati et al., (1989). Αυτοί οι ερευνητές έκαναν ένεση (ενδοπεριτονιακά) φυσικούς λιποσακχαρίτες (0,05-0,5mg) σε αγυ. Οι διαφορές εμβολισμένων και μη εμβολιασμένων ήταν 0% και 87%. Η διαδικασία της ανοσίας με ενδοπεριτονιακή έγχυση είχε απήχηση και σε άλλα είδη όπως κυπρίνος, γιαπωνέζικο χέλι, γιαπωνέζικο πλατύψαρο, πέστροφα και στην *red sea bream* (Nakamura et al., 1990). Υπάρχει εξέλιξη για ζωντανά έτοιμα εμβόλια με επιτυχία (Norquist et al., 1989). Όμως μπορεί να υπάρχουν προβλήματα με τις αρχές όσων αφορά την χρήση τους στα ψάρια .

Με χρονολογική σειρά, τα περισσότερα προγράμματα για ανάπτυξη των εμβολίων συγκεντρώθηκαν σε προϊόντα, που περιείχαν κύτταρα *L. anguillarum* και *V. ordalii* (Nagai et al., 1989). Σε διάφορες περιπτώσεις, αυτά εφαρμόστηκαν σε ψάρια με ένεση, με την τροφή (από το στόμα), με μπάνιο /ή εμβάπτιση, με ψεκάσμο και με εδρική ή στοματική παροχέτευση. Τα στοιχεία έχουν δείξει πως η στοματική εφαρμογή, ίσως η πιο σίγουρη μέθοδος, δεν έχει και την ανάλογη επιτυχία. Αντιθέτως με τις ενέσεις έχουμε πολύ καλές πληροφορίες. Για παράδειγμα, οι Baudin - Laurecin και Tangtrongpiros (1989) ανέφεραν αυξανόμενα ποσοστά θνησιμοτήτων ανάμεσα σε ομάδες πειραματισμού ψαριών, όπως ακολουθούν:

μη εμβολιασμένα πειραματόζωα 33,8%
στοματικά εμβολιασμένα ψάρια 31,7%
με εμβάπτιση εμβολιασμένη ομάδα 2,1%
ομάδα εμβολιασμένη με ένεση 1,4%

Παρόμοια συμπεράσματα, αν και γενικά πιο επιθυμητή για στοματική εμβολίαση, εκδόθηκαν από τους Amend και Johnson (1981) και τον Horne et al., (1982). Οι Amend και Johnson (1981) ανακάλυψαν τις ακόλουθες θνησιμότητες σε εμβολιασμένα σαλμονοειδή:

μη εμβολιασμένα πειραματόζωα 52%
στοματικά εμβολιασμένα ψάρια 27%
με εμβάπτιση εμβολιασμένη ομάδα 4%
με ψεκάσμο εμβολιασμένα ψάρια 1%
ομάδα εμβολιασμένη με ένεση 0%

Αυτό συγκρίνεται με την δουλειά του Horne et al., (1982), που ανέφερε τις εξής θνησιμότητες:

μη εμβολιασμένα πειραματόζωα 100%
στοματικά εμβολιασμένα ψάρια 94%
με εμβάπτιση εμβολιασμένα ψάρια 53%
ομάδα εμβολιασμένη με ένεση 7%

Σε αναλυτική εξέταση των αποτελεσμάτων της στοματικής αγωγής με εμβόλια στην chinook salmon, ο Fryer et al., (1978) κατέγραψε πως μέγιστη προστασία γινόταν με τροφοληψία 2mg αποξηραμένο εμβόλιο /g τροφής για 15 μέρες σε θερμοκρασίες έστω και 3,9°C. Ένα σημαντικό αποτέλεσμα ήταν

η παρατήρηση πως περαιτέρω θεραπεία δεν απέδιδε σε μεγαλύτερη προστασία. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη εάν παρατεταμένος εμβολιασμός συμβουλευθεί μέσω της στοματικής οδού. Η αιτία για τα προφανή αποθαρρυντικά αποτελέσματα με στοματικό εμβολιασμό μπορεί να είναι η διάλυση του εμβολίου μέσα στον πεπτικό σωλήνα (Johnson και Amend , 1983). Για να λυθεί αυτό το πρόβλημα, οι Johnson και Amend (1983) δημιούργησαν εμβόλια με ζελατίνη, και τα έδωσαν στοματικά ή εδρικά για να αποφύγουν την πέψη στο στομάχι ή στο έντερο. Αποκομήθηκαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπου οι θνησιμότητες είχαν ως εξής:

μη εμβολιασμένα πειραματόζωα 97%

εμβολιασμοί (χωρίς ζελατίνη) στοματικά 35%

εμβολιασμοί (με ζελατίνη) στοματικά 69%

εμβολιασμοί (χωρίς ζελατίνη) εδρικά 37%

εμβολιασμοί (με ζελατίνη) εδρικά 75%

Παρόμοια ενθαρρυντικά στοιχεία εκδόθηκαν από τον Dec et al., (1990). Αυτοί οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν εμπορικά εμβόλια (παραγόμενα από τους Rhône - Merieux) που παρασχέθηκαν στοματικά σε turbot και λαβράκι. Μετά από 28 ημέρες οι θνησιμότητες είχαν ως εξής:

στοματικά εμβολιασμένα λαβράκια 11,3%

μη εμβολιασμένα λαβράκια 40,9%

στοματικά εμβολιασμένα καλκάνι 19,2%

εμβολιασμένα καλκάνι 65,4%

Ανάμειξη εμβολίου με φυσική τροφή, π.χ. πλαγκτό, έδειξαν αποτελέσματα με την ayu (Kawai et al., μη 1989). Έτσι σε ένα πείραμα, 7,6% από τα εμβολιασμένα πέθαναν, ενώ 35,8% μη εμβολιασμένα πέθαναν.

Παρακάμπτωντας τα επιβλαβή αντίκτυπα στο στομάχι και του ανώτερου μέρους του εντέρου ο εμβολιασμός είναι αποτελεσματικός και πρέπει να συνεχίσει. Αυτό δείχνει πως οι τεχνικές με μικροκάψουλες μπορεί να είναι σημαντικές για την ανάπτυξη των στοματικών εμβολιασμών. Ένα σημαντικό σημείο είναι η περιπλοκή της οπίσθιας περιοχής του γαστροεντερικού σωλήνα με την σωστή λειτουργία των στοματικών εμβολίων. Επίσης αυτή η περιοχή είναι και η μία από τις πρώτες που εμφανίζεται το παθογόνο. Έτσι , πρέπει να ειπωθεί πως η καλύτερη προστασία παρέχεται με μεθόδους που έχουν να κάνουν με περιοχές που παρουσιάζεται η ασθένεια.

Σε αντίθεση με τις στοματικές μεθόδους, η ένεση έχει αποδειχθεί ό,τι είναι η τελειότερη μέθοδος εμβολιασμού σε ψάρια κατά της βιμπρίωσης, με εξέλιξη / ανάπτυξη υψηλών ποσοτήτων ανοσίας (Antipa, 1976; Antipa και Amend, 1977; Sawyer και Strout, 1977; Harrell, 1978; Evelyn και Ketcheson, 1980). Δυστυχώς η τεχνική είναι αργή, και δείχνει απαραίτητη μόνο για μεγάλα ή ακριβά ψάρια. Εντούτοις, πολλοί τύποι προετοιμασίας, περιλαμβανόμενων και των heat-killed και μορφοποιημένων εμβολίων, έχουν εκτιμηθεί με ένεση. Επιπρόσθετα, παροδική ανοσία (με ένεση) έχει παρουσιάσει την μεταβολή την ανοσίας ανάμεσα στα ψάρια. Σε μία σύγκριση, παρουσιάστηκε καθαρά πως οι προετοιμασίες με heat-killed ήταν πιο επιτυχείς από τα προϊόντα που επεξεργάστηκαν με την φορμόλη, όταν δόθηκαν με ένεση. Αναφορά έχει γίνει στην εργασία του Antipa (1976), που έκανε ένεση σε chinook salmon με εμβόλια και σε σύγκριση με το παθογόνο παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες θνησιμότητες:

μη εμβολιασμένα πειραματόζωα 85,4%

μορφοποιημένο εμβόλιο 37,8%

heat-killed εμβόλιο 22,3%

Οι τεχνικές εμβάπτισης βολεύουν περισσότερο για τον εμβολιασμό των ιχθύων στο περιβάλλον ενός ιχθυοτροφείου. Πιο σωστά, αρκετή προσοχή δόθηκε στην υπεροσμωτική διήθηση, που περιλαμβάνει χρήση ισχυρού διαλύματος αλατιού αρχικά με την εμβάπτιση με εμβόλιο (Croy και Amend, 1977; Aoki και Kitao, 1978; Nakajima και Chikahata, 1979; Antipa et al., 1980; Giorgetti et al., 1981). Όμως είναι τώρα αποδεκτό πως η τεχνική είναι απόλυτα μη στρεσογόνα στα ψάρια (Busch et al., 1978), και το επίπεδο της προστασίας που επιτεύχθηκε είναι μόνο συγκρίσιμο με την πιο απλή μέθοδο απευθείας εμβάπτισης (Antipa et al., 1980), που συχνά προτιμάται. Μάλιστα, πολλά άρθρα έχουν εκδοθεί σχετικά με τα πλεονεκτήματα της εμβάπτισης σε εμβόλιο (Hastein et al., 1980; Song et al., 1980; Amend και Johnson, 1981; Giorgetti et al., 1981; Horne et al., 1982; Johnson et al., 1982a, b), με άλλα λόγια 2h, τεχνική "μπάνιου" (Egidius και Andersen, 1979).

Μια άλλη βελτίωση έχει να κάνει με χρήση ψεκαστικών χαμηλής πίεσης, που είναι εύκολα στην χρήση, και σίγουρα πιο οικονομικά σε ποσότητα εμβολίου που δίνεται (Gould et al., 1978). Η επιτυχία παρουσιάστηκε με 0%

θνησιμότητα σε μία ομάδα ψαριών που ψεκάστηκαν με εμβόλιο συγκριτικά με 80% θνησιμότητα σε πειραματόζωα που προσβλήθηκαν (Gould et al., 1978).

Όλες οι προαναφερθείσες μέθοδοι βοηθούν τα ψάρια να αναπτύξουν ανοσία στο παθογόνο. Αυτός ο παράγοντας συζητήθηκε αρκετά, σχετικά με την chinook salmon, από τον Fryer et al., (1972). Έχει υπολογισθεί πως ο τίτλος της οροσυγκόλλησης (agglutination titre) είναι 1:8192, εξαρτώμενο από τα είδη των ψαριών που χρησιμοποιούνται (Groberg , 1982). Η ανάπτυξη ανοσίας είναι καθαρά μία λειτουργία της θερμοκρασίας του νερού, και γενικά χημικά αντισώματα σχηματίζονται σε υψηλές παρότι σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, στην coho salmon, αυτά τα αντισώματα εμφανίζονταν σε 25 ημέρες με 6°C ενώ σε 10 μέρες σε θερμοκρασία 18°C (Groberg , 1982). Η σχετική φτωχή επίδοση των στοματικών εμβολίων σχετίζεται με την ανικανότητα του ψαριού να αναπτύξει χημικά αντισώματα (Fryer et al., 1978; Gould et al., 1978; Kusuda et al., 1978; Groberg , 1982). Όμως , ο ρόλος αυτών των αντισωμάτων για την προστασία κατά της ασθένειας είναι αβέβαιος.

1.2.9. Χημειοθεραπεία.

Αντιμικροβιακές ενώσεις έχουν αποδειχθεί ό,τι είναι πολύ χρήσιμες στην καταπολέμηση της *Vibriosis*. Είναι ίσως ειρωνικό πως έχει δοθεί έμφαση στην χρήση φαρμάκων ως τροφικά συμπληρώματα, γιατί η *vibriosis* έχει χαρακτηριστεί από την ανορεξία που προκαλεί. Επομένως, οι αντιμικροβιακές ενώσεις πρέπει να δίνονται (με την τροφή) πολύ νωρίς κατά την διάρκεια του κύκλου της ασθένειας εάν θέλουμε να επιτύχουμε. Οι μελετητές έχουν προσδιορίσει την αξία αρκετών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των χλωραμφενικόλη, φουράνια, νιτροφουραζόνη, οξολινικό οξύ, οξυτετρακυκλίνη και σουλφαμεραζίνη. Ως ένα σχόλιο, συμβουλεύουμε προσοχή όταν σκεφτόμαστε την χρήση φαρμακευτικών ουσιών, και ειδικότερα αντιβιοτικών, εξαιτίας του ενδεχόμενου ρίσκου της αντίστασης ένα γεγονός που οφείλεται στα πλασμίδια, με άλλα λόγια R παράγοντες (Aoki , 1988). Ο Aoki et al., (1974) ανέφερε πως 65/68 *L. anguillarum* απομονώσεις είχαν R παράγοντες, που μετέφεραν την αντίσταση στην χλωραμφενικόλη, στην στρεπτομυκίνη,

στις σουλφαναμίδες και στην τετρακυκλίνη. Έτσι εάν οι R παράγοντες βρίσκονται σε αφθονία, δεν είναι πιθανόν τα κοινά αντιβιοτικά να επέμβουν σημαντικά στον κύκλο την ασθένειας.

1.2.10. Διαχείριση.

Βασική καλή υγιεινή (ποιότητα νερού) και πρακτικές εποπτείας της φάρμας μπορούν να ελαττώσουν επιτυχώς πολλά από τα προβλήματα που προκαλεί η vibriosis. Στην περίπτωση των χελιών, Kocylowski (1963) πρότεινε μεταφορά σε κρύο, καλά αεριζόμενο νερό, με άλλα λόγια δε συνθήκες λιγότερο προσφορές για το παθογόνο. Ίσως είναι σωστό να αναφέρουμε το παλιό απόφθεγμα πως “η καθαριότητα είναι κοντά στην θεότητα” δηλαδή την απομάκρυνση των νεκρών ψαριών καθημερινά.

1.2.11. Μικροβιακός ανταγωνισμός.

Μερικά μέλη της μικροχλωρίδας των ψαριών έχουν βρεθεί να είναι ανασταλτικοί παράγοντες για το *L. anguillarum*. Έτσι, η πιθανότητα υπάρχει στην αναζήτηση φυσικών μηχανισμών ελέγχου της ασθένειας. Σε μία μελέτη >400 βακτηριακών απομονώσεων από τον γαστροεντερικό σωλήνα, από την επιφάνεια του καλκανιού (turbot), από την ιχθυοτροφή και από το νερό, 28% από αυτές βρέθηκαν να είναι ανασταλτικές στο *L. anguillarum* (Westerdahl et al., 1991). Είναι ενδιαφέρον πώς τα περισσότερα από τα ανασταλτικά βακτήρια πάρθηκαν από την εντερική βλέννα. Αυτή είναι άλλη μία περιοχή που δικαιολογεί περαιτέρω έρευνα.

1.3. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.3.1 Τι είναι ένα εμβόλιο

Η έκθεση ενός σπονδυλωτού ζώου σε μία μόλυνση συχνά έχει ως αποτέλεσμα, σε όσα έχουν επιζήσει, να τα κάνει να αντιστέκονται σε μια επερχόμενη ασθένεια η οποία προκαλείται από τον ίδιο παθογενετικό οργανισμό. Αυτή η αντίσταση, που καλείται αποκτώμενη ανοσία, είναι ειδικά για το παθογόνο που προκαλεί την συγκεκριμένη ασθένεια και υπάρχει για μια σχετικά μεγάλη περίοδο χρόνου (ανοσοποιητική μνήμη). Βασίζεται πάνω σε μια μετέπειτα αλλαγή στους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων του σώματος η οποία είναι αποτέλεσμα της έκθεσής τους στα ξένα μορίδια που αποτελούν το παθογόνο. Αυτά τα ξένα μορίδια καλούνται αντιγόνα και είναι σχεδόν πάντα πρωτεΐνες. Η ειδικότητα και η μνήμη είναι δύο από τα στοιχεία κλειδιά που αναδεικνύονται από τον εμβολιασμό αφού η αντίδραση της αποκτώμενης ανοσίας είναι πιο δυνατή στην δεύτερη αναμέτρηση με το αντιγόνο. Τα εμβόλια είναι προπαρασκευές αντιγόνων τα οποία έχουν προέλθει από παθογόνους οργανισμούς, που γίνονται μη-παθογόνοι από διάφορα μέσα, τα οποία θα ερεθίσουν το ανοσοποιητικό σύστημα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αυξηθεί η αντίσταση στην ασθένεια από επόμενη μόλυνση από ένα παθογόνο.

Προκαλώντας μια προστατευτική αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι ενός παθογόνου οργανισμού, πριν το άτομο (οργανισμός) να εκτεθεί φυσικά στο παθογόνο (“προφύλαξη”) φαίνεται εκ πρώτης όψεως ένας αλάνθαστος τρόπος να προλαμβάνουμε μια μολυσματική ασθένεια. Δυστυχώς, το να πετύχουμε αυτόν τον σκοπό δεν είναι εύκολο. Τα εμβόλια πρέπει να είναι ασφαλή (χωρίς παρενέργειες) και ικανά (να εισάγουν ένα υψηλό επίπεδο) και ενώ μερικές φορές έχει γίνει δυνατό να επιτευχθούν αυτά τα χαρακτηριστικά χρησιμοποιώντας απλές μεθόδους (συνήθως θερμότητα ή χημική απενεργοποίηση των καλλιέργειών των παθογόνων μικροοργανισμών) στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας βαθμός ποιοτικής καθαρότητας ή ένας εμπλουτισμός είναι αναγκαίος και το πρόβλημα βρίσκεται πια, στην ταυτοποίηση των σχετικών αντιγόνων, εν μέσω εκατοντάδων που είναι

παρώντα, τα οποία είναι σημαντικά στην διέγερση μιας προστατευτικής ανοσοποιητικής αντίδρασης (απάντησης).

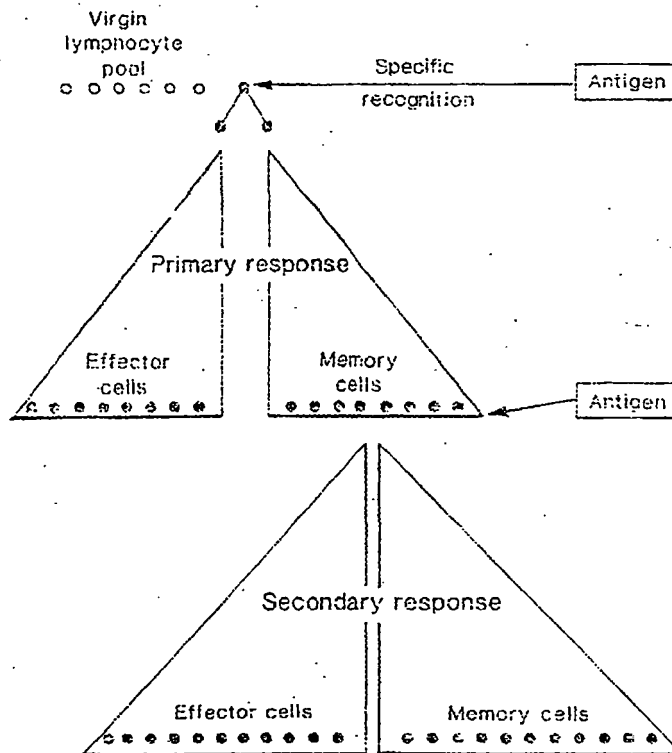
Τα εμβόλια είναι γενικά δύο τύπων: Νεκρά εμβόλια, τα οποία αποτελούνται από ανενεργά παθογόνα ή παράγωγά τους, και ζωντανά εμβόλια (*attenuated vaccines*), τα οποία είναι εξασθενημένα παθογόνα με χαμηλή ή καθόλου δύναμη. Παρ' όλα αυτά, οι μοντέρνες τεχνικές έχουν βελτιωθεί πάρα πολύ και υπάρχει ποικιλία στις μεθόδους παραγωγής εμβολίων.

Πριν περιγράψουμε τι κάνουν τα εμβόλια και πώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι αναγκαίο πρώτα να κατανοήσουμε την βάση πάνω στην οποία λειτουργούν διεγείροντας το συγκεκριμένο ανοσοποιητικό σύστημα.

1.3.2. Το ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα

Η ειδική ή αποκτώμενη ανοσοποιητική αντίδραση (απάντηση) έχει δύο μέρη: την *humoral immunity* (παραγωγή αντισωμάτων) και την ανοσία των μεσαζόντων κυττάρων (CMI). Η έκθεση σε ένα αντιγόνο έχει σαν αποτέλεσμα την διέγερση ενός μικρού αριθμού παρθένων (νέων) λεμφοκυττάρων τα οποία είναι ικανά να αναγνωρίζουν το αντιγόνο μέσω ειδικών αποδεκτών των αντιγόνων (σχέδιο 1.1). Αυτά τα ειδικά λεμφοκύτταρα αποτελούν ένα κλώνο. Οι μικροοργανισμοί έχουν πολλά διαφορετικά αντιγόνα στην επιφάνειά τους και το κάθε αντιγόνο είναι ικανό να αναγνωρίζεται από ένα διαφορετικό κλώνο λεμφοκυττάρων. Στην διέγερση ένας κλώνος περνά στην αναπαραγωγή με την διαφοροποίηση των θυγατρικών κυττάρων τα οποία έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες βασιζόμενες στον πληθυσμό στον οποίο ο κλώνος των λεμφοκυττάρων ανήκει.

Υπάρχουν δύο κύριοι πληθυσμοί λεμφοκυττάρων. Τα "T" λεμφοκύτταρα τα οποία πηγάζουν από τον θύμους αδένες, και τα "B" λεμφοκύτταρα τα οποία πηγάζουν από το bursa of Fabricius των πουλιών ή από το bone marrow των θηλαστικών. Η πηγή των κυττάρων αυτού του τύπου στους τελεοστέους δεν είναι ακριβώς γνωστή αν και πιθανόν είναι να είναι ο νεφρός.



Σχέδιο 1.1

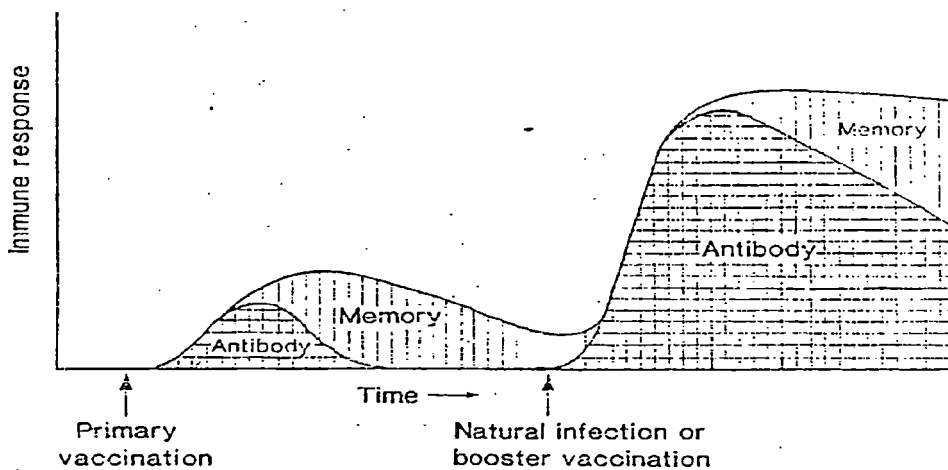
1.3.2.1. Humoral immunity

Στην πρωταρχική έκθεση σε ένα αντιγόνο, τα T και B κύτταρα συνεργάζονται στην αντίδραση. Τα B λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε κύτταρα πλάσματος τα οποία παράγουν αντιγόνα συγκεκριμένα για το διεγερμένο αντιγόνο ή μέσα στα κύτταρα τα οποία είναι ικανά να γίνουν κύτταρα πλάσματος σε δευτερεύουσα έκθεσή τους στο αντιγόνο και γι' αυτό καλούνται κύτταρα μνήμης.

Τα T κύτταρα έχουν διαφορετική λειτουργία. Τα αυθεντικά (αρχικά) συνεργάσιμα T κύτταρα ονομάζονται κύτταρα βοηθοί και αυτός ο κλώνος, στην αρχική διέγερση από το αντιγόνο, αναπαράγεται σε ένα μακράς – ζωής βοηθητικό κύτταρο μνήμης έτσι ώστε σε επόμενη έκθεση στο αντιγόνο θα υπάρξει ένας αυξανόμενος αριθμός από T βοηθητικά κύτταρα για να συνεργασθούν με τον αυξανόμενο αριθμό των B κυττάρων μνήμης έτσι ώστε η παραγωγή αντισωμάτων έναντι ενός αντιγόνου σε δευτερεύουσα έκθεση

φαίνεται στο αίμα πιο γρήγορα και φτάνει σε υψηλότερη συγκέντρωση από ότι μετά την πρωταρχική έκθεση (σχέδιο 1.2).

Είναι η ικανότητα των κυττάρων μνήμης να επιδρούν με ταχείς και υψηλού επιπέδου αντιδράσεις που μετρούν για την αυξανόμενη αντίδραση που ακολουθεί την έκθεση σε ένα παθογόνο ή σε ένα εμβόλιο.



Σχέδιο 1.2: Η σχέση μεταξύ του μεγέθους της ανοσοποιητικής αντίδρασης στην πρωτεύουσα και δευτερεύουσα ανοσοποίηση και της εγκαθίδρυσης και επιμονής της ανοσοποιητικής μνήμης.

1.3.2.2 Ανοσία μεσαζόντων κυττάρων (CMI)

Ο T λεμφοκυτταρικός πληθυσμός εκτός από το ότι έχει T – βοηθητικούς κλώνους, κατέχει ακόμα κλώνους οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την CMI. Αυτός ο παράγοντας της ανοσοποιητικής δράσης έχει ευρεία ακτίνα και επιστρατεύει τα μακροφάγα τα οποία αποτελούν την κύρια γραμμή μη – ειδικής άμυνας του σώματος, μέσω της φαγοκύτωσης και της πέψης με την επίθεση σε μικροοργανισμούς. Στην αρχική διέγερση από το αντιγόνο οι T λεμφοκυτταρικοί κλώνοι διαφοροποιούνται σε μερικούς ποικίλους κυτταρικούς λειτουργικούς τύπους που εμπεριέχονται (μετέχουν) στο CMI. Αυτά περιλαμβάνουν:

(α). Κύτταρα δολοφόνοι : Αυτά τα κυτοτοξικά (cytotoxic) T κύτταρα είναι ικανά να συνδέονται με ξένα κύτταρα μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από την φυσική επαφή μεταξύ των T λεμφοκυττάρων και του κυτταρικού στόχου.

(β) Κύτταρα παραγωγής λεμφοκίνης : Κατά τη διέγερση από το αντιγόνο ένας κλώνος από τα κύτταρα T που επιδρούν απελευθερώνοντας humoral παράγοντες που καλούνται λεμφοκίνες (ή interleukins) που αυξάνουν την μη – ειδική δυνατότητα άμυνας των μακροφάγων. Αυτά τα «ενεργοποιημένα» μακροφάγα είναι τότε, πολύ πιο ικανά να καταπολεμούν, μη ειδικά, τις μολύνσεις.

(γ) Κατασταλτικά κύτταρα :Οι παραπάνω αντιδράσεις ονομάζονται θετική ανοσία. Προφανώς, η παραγωγή των αντισωμάτων και της λεμφοκίνης πρέπει να ρυθμίζεται κατά την διάρκεια μιας ανοσοποιητικής αντίδρασης, και πραγματοποιείται με την αναπαραγωγή των κατασταλτικών κυττάρων τα οποία παρέχουν την διαδικασία την παύσης ή αρνητικής ανοσίας. Αυτό το μέρος της ειδικής ανοσοποιητικής αντίδρασης είναι πολύ σχετική με τον εμβολιασμό αφού το αποτέλεσμα του ελέγχου (διαχείρισης) αντιγόνων, εξαρτώμενη πάνω σε μια ποικιλία παραγόντων, συμπεριλαμβάνει την μοριακή του δομή, δρόμος(τρόπος) ελέγχου(διαχείρισης), συγκέντρωση ή ηλικία του ζώου, μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία μεταξύ θετικής και αρνητικής ανοσίας. Προφανώς ο σκοπός του εμβολιασμού είναι να διεγείρει το θετικό ενδεχόμενο που είναι επιθυμητό αλλά είναι πιθανών να ενισχύσει το αντίθετο φαινόμενο αντί να αυξήσει την αντίσταση του οργανισμού (οι χειρισμοί με αντιγόνα κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν στην μη αντίδραση του οργανισμού στο αντιγόνο, η οποία ονομάζεται ανοσοποιητική ανοχή).

Πρόσφατη μελέτη με θηλαστικά έδειξε ότι τα μορίδια του αντιγόνου έχουν διαφορετικά αναγνωριστικά μέρη (epitopes) για τα B κύτταρα, τα T βοηθητικά κύτταρα (Th) και τα T κατασταλτικά κύτταρα (Ts). Η σχετική ανοσοποιογένεση (ικανότητα να δημιουργείται / διεγείρεται μια απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος) ενός αντιγόνου σε ένα ζώο εξαρτάται από την σχετική κυριαρχία αυτών των epitopes. Αυτό καθορίζεται γενετικά, και μπορεί να διαφέρει ακόμη και μεταξύ γενεών ποντικών. Έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατό να αυξηθεί η ικανότητα του αντιγόνου να διεγείρει το ανοσοποιητικό

σύστημα, μετακινώντας ενζυματικά, το epitope που είναι υπεύθυνο για την διέγερση των Ts κυττάρων. Αυτή η μορφή της μηχανικής πρωτεϊνών μπορεί να αποδειχθεί πάρα πολύ σημαντική στο μέλλον στην παραγωγή εμβολίων υψηλής αποτελεσματικότητας.

1.3.3. Τι κάνει ένα εμβόλιο;

Ο σκοπός του εμβολιασμού είναι να παρέχει σε ένα άτομο την αντίσταση σε μια ασθένεια χωρίς να πρέπει να περάσει από μια πιθανών επικίνδυνη μόλυνση. Είναι σημαντικό, παρ' όλα αυτά, να εκτιμήσουμε πως η προστασία που αναπτύσσεται μετά τον εμβολιασμό ή την φυσική έκθεση σε ένα παθογόνο είναι προστασία κατά της ασθένειας, και όχι αναγκαστικά κατά της μόλυνσης. Πράγματι η φύση της παρασιτικής σχέσης μεταξύ του ξενιστή και του παρασίτου δεν θα πρέπει να θεωρείται σαν μια θανατηφόρο πάλη μεταξύ των ανταγωνιστών. Για καλά εδραιωμένα παράσιτα η φύση της σχέσης είναι μια σχέση συνύπαρξης με την μικρότερη ζημιά στον ξενιστή. Από τους 150 περίπου παθογενείς οργανισμούς που επηρεάζουν τους ανθρώπους πολλοί είναι γνωστοί να εμφανίζονται με μια κατάσταση χωρίς συμπτώματα και με την απουσία, εκείνη την εποχή ή αργότερα, των σημάδιών της ασθένειας. Μια παρόμοια κατάσταση ισχύει το ίδιο για τα ψάρια και για πολλούς από τους παθογόνους οργανισμούς τους. Είναι ένα λογικό επιχείρημα ότι η αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος είναι βασική για να εξομαλύνει το 'μονοπάτι' για την ειρηνική συνύπαρξη, παρά το ότι σε μερικές περιπτώσεις υπάρχει μια καταγιστική αρχή της σχέσης μεταξύ του ξενιστή και του παρασίτου με συχνά σημαντικές θνησιμότητες και για τους δύο. Έτσι λοιπόν φαίνεται, πως τα εμβόλια προστατεύουν κατά των ξεσπασμάτων της ασθένειας αλλά όχι αναγκαία κατά της χρόνιας(με επιμονή) μόλυνσης σε ένα χωρίς συμπτώματα στάδιο.

Τα εμβόλια λειτουργούν προκαλώντας μια προστατευτική ανοσοποιητική αντίδραση η οποία, από την ικανότητα των κυττάρων μνήμης, παραμένει για σχετικά μεγάλες χρονικές περιόδους, αν και ο ακριβής χρόνος της διάρκειάς τους ποικίλει. Η εγκαθίδρυση της κατάστασης της μνήμης αυτής, αναφέρεται ο όρος «ανοσοποίηση». Η φυσική έκθεση σε μόλυνση ενεργεί ως προώθηση στην ανοσία που παράγεται από τον εμβολιασμό με

την προϋπόθεση πως τα κύτταρα μνήμης είναι ακόμα παρόντα (Σχέδιο 1.2). Κατά την απουσία της φυσικής αυτής έκθεσης, άλλος ένας εμβολιασμός είναι αναγκαίος για να διατηρηθεί το επίπεδο ανοσίας.

1.3.4. Τα μέρη της προστατευτικής ανοσίας

Τα δύο μέρη της αποκτώμενης ανοσοποιητικής αντίδρασης μπορούν να δράσουν είτε στο σύστημα, μέσα στους ιστούς του σώματος, ειδικά στα όργανα του φαγοκυτταρικού φιλτραρίσματος (η σπλήνα και το νεφρό των τελεοστέων ψαριών) ή στα εξωτερικά όργανα (το έντερο, τα βράγχια και το δέρμα). Μέχρι ενός ορισμένου σημείου τα εξωτερικά όργανα και τα όργανα του συστήματος αντιδρούν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Έτσι λοιπόν μπορεί να είναι σημαντικός ο τρόπος χειρισμού ενός εμβολίου, και πρέπει να είναι κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διεγείρει την πιο κατάλληλη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να παρέχει προστασία. Στην ιατρική τα εμβόλια μπορεί να γίνονται με ένεση, μέσω του στόματος ή με ψεκασμό με σκοπό να διεγερθεί μια ανοσοποιητική αντίδραση στο κατάλληλο μέρος. Για τα ψάρια λίγα είναι γνωστά για τις ανοσοποιητικές αντιδράσεις μέσω των εξωτερικών οργάνων και ενώ τα εμβόλια κατά της βιμπρίωσης, μέσω εμβάπτισης, ενώ παρέχουν προστασία, έχουν σαν αποτέλεσμα την πολύ φτωχή παραγωγή αντισωμάτων στο οργανικό σύστημα, είναι πιθανών η προστατευτική ανοσία να βασίζεται στις μεμβράνες παραγωγής βλέννας (mucus). Είναι πιθανό η προστασία κατά ορισμένων άλλων ασθενειών των ψαριών να απαιτεί δυνατές αντιδράσεις του συστήματος και η πρακτική των εμβαπτίσεων ίσως να μην είναι κατάλληλη για την διέγερση αυτού.

Σε τέτοιες περιπτώσεις ο εμβολιασμός με ένεση μπορεί να είναι αναπόφευκτος, εκτός και αν βελτιωμένες μέθοδοι εμβάπτισης ή μέσω στόματος εμβολιασμού επιτευχθούν.

1.3.5. Τι κάνει ένα εμβόλιο αποτελεσματικό

Ένα αποτελεσματικό εμβόλιο πρέπει να είναι ασφαλές, ανοσοποιητικό (immunogenic) και προστατευτικό.

1.3.5.1. Ασφάλεια

Ένα εμβόλιο πρέπει να εξομοιώνει την φυσική μόλυνση παράγοντας ανοσία, αλλά δεν πρέπει να παράγει κλινική ασθένεια. Τα νεκρά ή ανενεργά εμβόλια είναι συνήθως πιο ασφαλή από τα ζωντανά αλλά ακόμα και αυτά μπορούν να δημιουργήσουν μη επιθυμητές παρενέργειες. Τα ζωντανά (attenuated) εμβόλια απαιτούν ειδική προσοχή. Είναι συνήθως εξασθενημένα αλλά δεν είναι εντελώς αδύναμα. Πριν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια, είναι βασικό να αποδειχθεί πέρα από κάθε λογική αμφιβολία ότι μια εξασθενημένη γενεά μικροβίων δεν θα μετατραπεί σε μια αυξανόμενη ή πλήρη δυναμικά γενεά μικροβίων *in vivo*. Ο de Kinkelin (κεφάλαιο 14) περιγράφει κάποια από τα προβλήματα που έχουν να κάνουν με τα ζωντανά VHS εμβόλια για ιούς. Μοντέρνες τεχνικές γενετικής μηχανικής έχουν κάνει την διαδικασία ατόνησης (εξασθένησης) πιο ακριβή και μη αντιστρεπτή, ενώ παράλληλα υπάρχει ταχεία εξέλιξη στην ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και ασφαλών ζωντανών εμβολίων για χρήση στην ιατρική για τους ανθρώπους.

1.3.5.2 Ανοσοποίηση

Δεν είναι όλα τα αντιγόνα, τα οποία έχουν σχέση με την τοξικότητα και την παθογένεια ενός μικροβίου παθογόνου, ικανά στο να προκαλούν μια αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει με πολλά αντιγόνα που σχετίζονται με την *Aeromonas salmonicida*, που είναι πολύ φτωχά στην ανοσοποιογένεση στους σαλμονοειδείς ξενιστές αλλά είναι ανοσοποιητικά στα κουνέλια. Η φτωχή ανοσοποίηση στον ξενιστή, ειδικά στα αντιγόνα που σχετίζονται με την τοξικότητα, μπορεί να αντιπροσωπεύει μια προσαρμογή του παθογόνου για την αποφυγή της καταστροφής του από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Σε τέτοιες περιπτώσεις είναι αναγκαία η αλλαγή του αντιγόνου για να βελτιωθεί η ανοσοποίηση στον ξενιστή γιατί τα αντιγόνα που έχουν μείνει αυξάνουν τα αντισώματα στα σχετικά μορίδια. Η μέθοδος για να γίνει αυτό περιλαμβάνει προσάρτηση σε ανοσοποιητικούς μεταφορείς π.χ. οι πρωτεΐνες σε adjuvants, π.χ alum ή χωρίζοντας το μορίδιο

ώστε να απομακρυνθούν τα epitopes τα οποία διεγείρουν τα T κατασταλτικά κύτταρα.

1.3.5.3 Διέγερση της προστατευτικής ανοσίας

Προφανώς ο σκοπός του εμβολιασμού είναι να προστατεύει κατά ασθενειών και γι' αυτό ένα εμβόλιο πρέπει να περιλαμβάνει προστατευτικά αντιγόνα όπως αυτά τα οποία συνεισφέρουν στην δημιουργία της ασθένειας και τα οποία διεγείρουν την παραγωγή προστατευτικών αντισωμάτων ή CMI όταν χρησιμοποιηθεί στην ανοσοποίηση. Έτσι λοιπόν για να έχει αξία ένα εμβόλιο πρέπει να αυξάνει μια ανοσοποιητική αντίδραση στους δυναμικούς παράγοντες του παθογόνου. Γι' αυτόν τον λόγο είναι πολύ σημαντική η δουλειά επάνω στους μηχανισμούς αυτών των παραγόντων.

Όλοι οι μικροοργανισμοί και τα προϊόντα τους συνθέτονται από πολλά διαφορετικά αντιγόνα και ενώ πολλά θα αυξήσουν την παραγωγή των αντισωμάτων, εκτός αν αυτά τα αντισώματα μπορούν να εξουδετερώσουν τα συστατικά της παθογένειας, είναι χωρίς αξία στην παροχή προστασίας. Είναι σημαντικό να συνειδητοποιήσουμε ότι τεστ στα επίπεδα αντισωμάτων στον ορό αίματος που ακολουθεί τον εμβολιασμό μπορεί να μην δώσει ταυτοποίηση στον βαθμό της προστασίας εκτός αν είναι ενάντια στα προστατευτικά αντιγόνα. Ένα καλό παράδειγμα είναι η αύξηση υψηλών επιπέδων οροσυγκολυτικών αντισωμάτων στα σαλμονοειδή εμβολιασμένα με *Aeromonas salmonicida* αλλά αυτά τα αντισώματα δεν είναι καθόλου προστατευτικά.

Οι κοινές μέθοδοι της παρασκευής εμβολίων έχουν να κάνουν με την ανάπτυξη παθογόνων με καλλιέργειες σε τεχνητά μέσα (υποστρώματα) και ιούς με καλλιέργειες σε ιστούς. Κάτω από αυτές τις συνθήκες μπορούν να συμβούν αντιγονικές αλλαγές έτσι ώστε δεν παράγονται σημαντικοί παράγοντες στο *in vivo*. Αυτό εφαρμόζεται περισσότερο στα νεκρά ή ανενεργά εμβόλια απ' ότι στα ζωντανά, αλλά ακόμα και εξασθενημένες γενεές ή γενεές με κοντινή αντιγονική ομοιότητα στο δυνατό παθογόνο μπορεί εν μέρει να μην είναι κατάλληλο π.χ. οι εξασθενημένες γενεές του IPN ιού. Η εφαρμογή της γνώσης των ειδικών συνθηκών που απαιτούνται για την

παραγωγή προστατευτικών αντιγόνων χρησιμοποιώντας *in vitro* καλλιέργειες προφανώς θα βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εμβολίων.

1.3.6 Η φύση των εμβολίων *vibrio*

Τα εμβόλια για *vibrio* που υπάρχουν στο εμπόριο στο βόρειο ημισφαίριο περιέχουν μίξεις των πιο κοινών ειδών που προκαλούν ασθένεια π.χ. *V.anguillarum* και *V.ordalii*. Η πλειοψηφία αυτών των εμβολίων είναι απλές ανενεργές καλλιέργειες που περιέχουν μίγμα ολόκληρων κυττάρων και εξωκυτταρικών προϊόντων. Σε λίγες περιπτώσεις τα βακτήρια έχουν απομονωθεί είτε με χημικές ή φυσικές μεθόδους.

Τα προστατευτικά αντιγόνα του *V.anguillarum* φαίνονται να είναι οι θερμοσταθεροί (στους 100 - 121°C) λιποπολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία μπορούν ακόμα να ελευθερωθούν στο αιώρημα της καλλιέργειας. Αυτά τα μεγάλα μοριακού βάρους συστατικά π.χ. 100 kilodaltons (Kd) είναι ικανά να αντισταθούν σε μεθόδους απομάκρυνσης. Οι Chart και Trust απομόνωσαν, από την εξωτερική μεμβράνη, δύο άλλες πρωτεΐνες με μοριακά βάρη 49 – 51 kd που ήταν δυνατά αντιγόνα. Ακόμα, μια ασθενής αντιγονική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 40 kd ήταν παρόν. Αυτά τα αντιγόνα μπορεί να είναι θερμομεταβλητά (ασταθή) κάτι που μπορεί να είναι πλεονέκτημα για την καλύτερη προστασία που πετυχαίνεται με εμβόλια που παρασκευάζονται με φορμόλη ώστε να γίνουν ανενεργά, συγκρινόμενα με τα προϊόντα που παίρνουμε με την θανάτωση μέσω της θέρμανσης.

Η ανάπτυξη των ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων είναι κατά μεγάλο μέρος ακαδημαϊκή αφού είναι δυνατόν να υπάρξουν προβλήματα με τις αρμόδιες αρχές για την χορηγία αδείας για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες.

Είναι πιθανό τα εμβόλια για το *Vibrio* να γίνουν πιο περίπλοκα απ' ό τι οι σημερινές απλές κατασκευές. Ενώ η χρήση των τεχνικών της γενετικής μηχανικής για την παραγωγή αντιγόνων σε μεγάλες ποσότητες έχει προταθεί, είναι αμφίβολο για το εάν ένα εμβόλιο μπορεί να παρασκευαστεί με τέτοιες μεθόδους σε μια τιμή η οποία θα είναι αποδεκτή από την βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών.

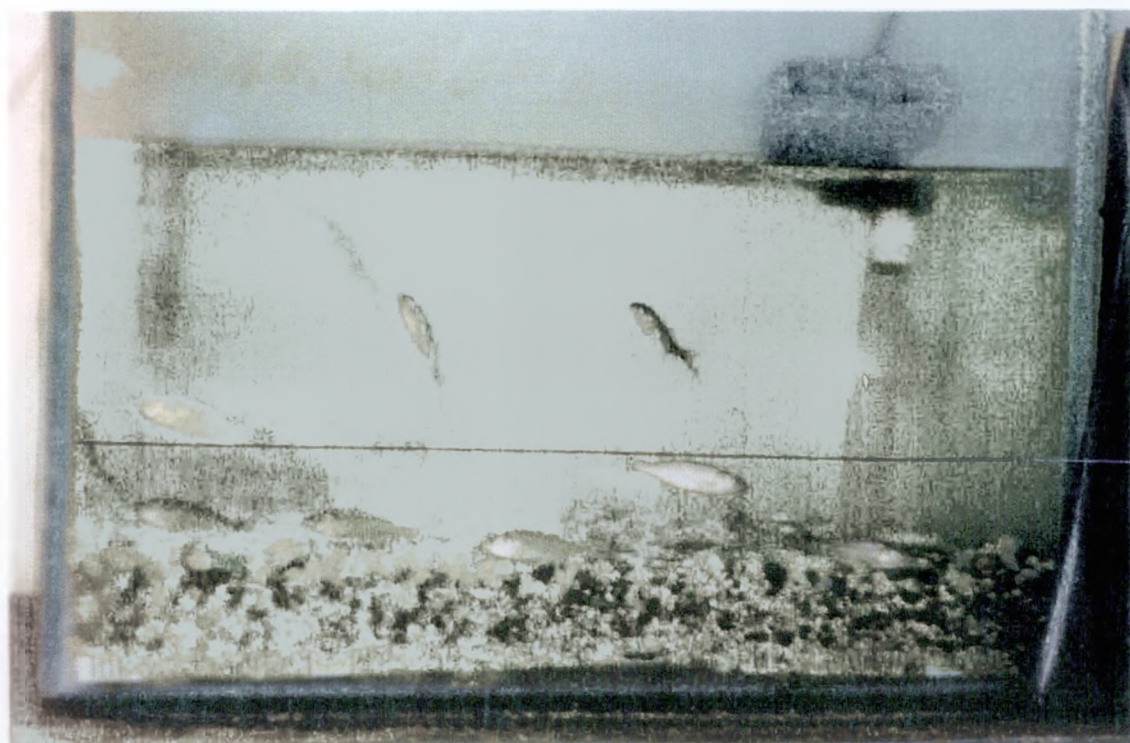
Μια περιοχή όπου μπορεί να περιμένουμε μια βελτίωση στην κατασκευή (σχηματισμό), είναι η πρόσθεση υδατοδιαλυτών – προσθυμάτων στα με εμβάπτιση χορηγούμενα εμβόλια με σκοπό να βελτιωθεί η δύναμη και η διάρκεια της προστασίας τους.

Ενώ γίνεται κάποια πειραματική δουλειά στα εμβόλια τα οποία περιέχουν είδη *Vibrio* διαφορετικά από τα *V.anguillarum* και *V.ordalii*, δεν υπάρχουν ακόμα διαθέσιμα εμβόλια στο εμπόριο τα οποία να περιέχουν άλλα είδη *Vibrio* που είναι γνωστό ότι είναι παθογόνα για τα ψάρια, αν και στην Νορβηγία οι εργασίες που γίνονται είναι πολύ προχωρημένες για την παραγωγή ενός εμβολίου κατά της *coldwater vibriosis* που προκαλείται από το *V.salmonicida* έχοντας και επιτυχή αποτελέσματα σε δοκιμές στο πεδίο χρησιμοποιώντας ολόκληρη καλλιέργεια αντιγόνων χορηγούμενο με εμβάπτιση.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μεθοδολογία που ακολουθήσαμε και που αναφέρεται παρακάτω, βασίστηκε στην εργασία του κ. Νούσια που αφορά τις δοκιμές μολυσματικότητας των ελληνικών στελεχών *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1 σε λαβράκι μέσου βάρους 2gr., όπως αυτή δημοσιεύτηκε στα Αλιευτικά Νέα (Τεύχος Μαρτίου 1994 σελ. 66 – 72). Με αυτόν τον τρόπο κατορθώσαμε να τηρήσουμε τους κανόνες του Koch.

2.1. Ενυδρεία



Εικόνα: Αντιπροσωπευτικό ενυδρείο

Στα ενυδρεία που κατασκευάσαμε προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε ένα τεχνητό περιβάλλον αντίγραφο του φυσικού περιβάλλοντος όπου τα ψάρια αναπτύσσονται και επιβιώνουν.

Για αυτόν τον λόγο τα ενυδρεία λειτουργούσαν με εσωτερικό βιολογικό φίλτρο. Έτσι λοιπόν μια απλή περιγραφή ενός από τα ενυδρεία θα ήταν ένα καλό παράδειγμα του τρόπου λειτουργίας του κάθε ενυδρείου. Τα ενυδρεία ήταν κατασκευασμένα από γυαλί το οποίο κολλήθηκε εξωτερικά με σιλικόνη διάφανη (εμπορίου). Πριν οποιαδήποτε περαιτέρω χρήση το ενυδρείο, που έπαιρνε την μορφή παραλληλεπίπεδου.

Στην συνέχεια έπρεπε να δημιουργηθεί εσωτερικά του ενυδρείου ο θαλάσσιος μικρόκοσμος τον οποίο προαναφέραμε. Πρώτιστα τοποθετήσαμε έναν πλαστικό συναρμολογούμενο ψευδοπυθμένα (εμπορίου) ο οποίος επιτρέπει την ελεύθερη διέλευση του νερού μέσα από τα κενά δημιουργούνται διαμέσω των σπειρών που διαθέτει. Στο επάνω μέρος του ο ψευδοπυθμένας έχει εγκοπές στις οποίες τοποθετούνται σωλήνες μέσα από τους οποίους γίνεται η κυκλοφορία του νερού. Οι σωλήνες αυτοί είναι δύο σε κάθε ενυδρείο, και τοποθετούνται σε δύο ακραία σημεία του ψευδοπυθμένα, όπου και εφαρμόζουν και σταθεροποιούνται. Στον ένα σωλήνα τοποθετείται εσωτερικά μια αερόπετρα (εμπορίου). Η παροχή αέρα γίνεται μέσω σωληνώσεων που επικοινωνούν με την κεντρική αντλία αέρα. Ο σκοπός της αερόπετρας είναι να οξυγονώνει το νερό καθώς και να βοηθάει, με την υποστήριξη της πίεσης του ατμοσφαιρικού αέρα, την υπερχείλιση του νερού από το πάνω άκρο του σωλήνα. Επίσης η κίνηση των φυσαλίδων εμποδίζει οποιαδήποτε στρωμάτωση που προκαλείται από τοπικές διαφορές στην θερμοκρασία και επίσης απομακρύνει το συσσωρευμένο διοξείδιο του άνθρακα που βρίσκεται στα κατώτερα στρώματα (Hawkins et al, 1981). Έτσι με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουμε την απαραίτητη οξυγόνωση του νερού καθώς και την κυκλοφορία του μέσα σε ένα κλειστό σύστημα. Στην αντίθετη μεριά υπάρχει ένας κυκλοφορητής. Η συσκευή αυτή που μας βοηθάει να επιτύχουμε ένα βέλτιστο επίπεδο ανακύκλωσης του θαλασσινού νερού έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

Q_{min} l / h : 150

Q_{max} cm : 450

Watt : 5

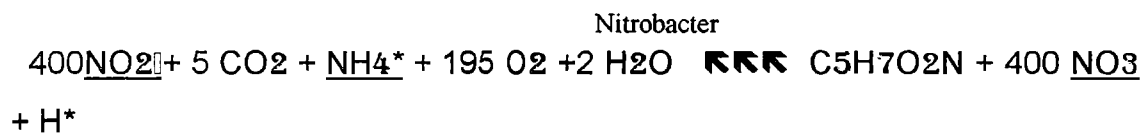
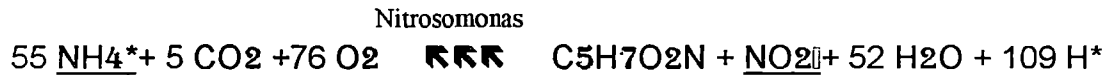
Μετά την τοποθέτηση των παραπάνω υλικών στο εσωτερικό των ενυδρείων ακολουθεί η τοποθέτηση της πέτρας που θα αποτελέσει το βιολογικό φίλτρο του κάθε ενυδρείου. Η πέτρα αυτή που αποτελείται από ψιλό

χαλίκι καθώς και από λάβα πλένεται προσεκτικά ώστε να απομακρυνθούν τυχών σκουπίδια και επικίνδυνα βακτηρίδια. Στην συνέχεια η πέτρα ξηραίνεται πριν τοποθετηθεί στην βάση των ενυδρείων. Η ποσότητα του φίλτρου που πρέπει να τοποθετηθεί σε κάθε ενυδρείο πρέπει να είναι αρκετή (περίπου 1/5 του συνολικού όγκου) ώστε να δίνει την δυνατότητα στα θαλάσσια βακτήρια να εποικήσουν σε μεγάλους αριθμούς με σαφές σκοπό τον ικανοποιητικό καθαρισμό του νερού από επικίνδυνες ουσίες για τα ψάρια.

Οι αποικοδομητές αυτών των ουσιών, οι οποίες είναι η αμμωνία και τα νιτρώδη που παράγονται, είναι τα βακτήρια *Nitrosomonas* και *Nitrobacter* τα οποία αποικοδομούν την αμμωνία σε νιτρικά ως εξής :



ή ακόμα πιο αναλυτικά (Hawkins et al, 1981):



Το τελικό προϊόν αυτού το κύκλου του αζώτου που είναι τα νιτρικά (NO_3^-) δεν είναι τοξικά και δεν επηρεάζουν την σωστή λειτουργία του ενυδρείου (Hawkins et al. 1981). Τα βακτήρια λοιπόν αυτά βρίσκονται στο εμπόριο και χορηγούνται με δοσολογία 0,2 ml / lt . Εμείς όμως, προσθέταμε κατά βούληση μέχρι να επιτύχουμε την σωστή λειτουργία των ενυδρείων. Όταν αυτά τα βακτήρια απελευθερώνονται στο νερό εποικούν κυρίως την πέτρα και δευτερευόντως την υδάτινη στήλη. Επίσης ένας άλλος τρόπος για να καταπολεμήσουμε την τοξική για τα ψάρια αμμωνία εντός των ενυδρείων είναι η ανάπτυξη άλγεων που καταναλώνουν την αμμωνία (Hawkins et al, 1981).

Το νερό που χρησιμοποιήσαμε το συλλέγαμε από την περιοχή της Τουρλίδας , τοποθεσία της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου. Η πλήρωση των ενυδρείων γινόταν μέχρι τα 4/5 του ύψους των. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν να καλύπτεται το 1/3 του κυκλοφορητή ώστε ο έλικας του να βρίσκεται εντός του νερού , και δεύτερον να μην καλύπτει την άκρη του δεύτερου σωλήνα που περιέχει την αερόπετρα έτσι ώστε να γίνεται καλύτερη ανακύκλωση.

2.2. Stress

Επειδή το λαβράκι ομολογουμένως είναι ένας πολύ ευαίσθητος οργανισμός, για να αποφύγουμε το αυξημένο stress που θα προκαλούσε η συνεχής παρουσία μας στον χώρο, καλύψαμε την πρόσοψη των ενυδρείων με μαύρα κομμάτια πλαστικού. Αυτή η απόφαση πάρθηκε γνωρίζοντας πως οι στρεσογόνες καταπιέζουν ορισμένες αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αντίδραση από τον οργανισμό (stress) έχει να κάνει με αντιδράσεις στην φυσιολογία και την συμπεριφορά του οργανισμού, οι οποίες μπορεί να βοηθούν το ψάρι να προσαρμόζεται σε μια νέα κατάσταση, αλλά αν το stress είναι πολύ σοβαρό ή παρατεταμένο, μπορεί να υπερβεί την ικανότητα του ψαριού να προσαρμοστεί, έχοντας σαν αποτέλεσμα μια γενική κατάρρευση του ανοσοποιητικού και άλλων συστημάτων. Έτσι λοιπόν η αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού θα μειωθεί (A.E.Ellis, Optimizing factors for fish Vaccination, Fish Vaccinatin).

2.3. Τροφοδοσία νερού και αποστείρωση

2.3.1. Τροφοδοσία νερού

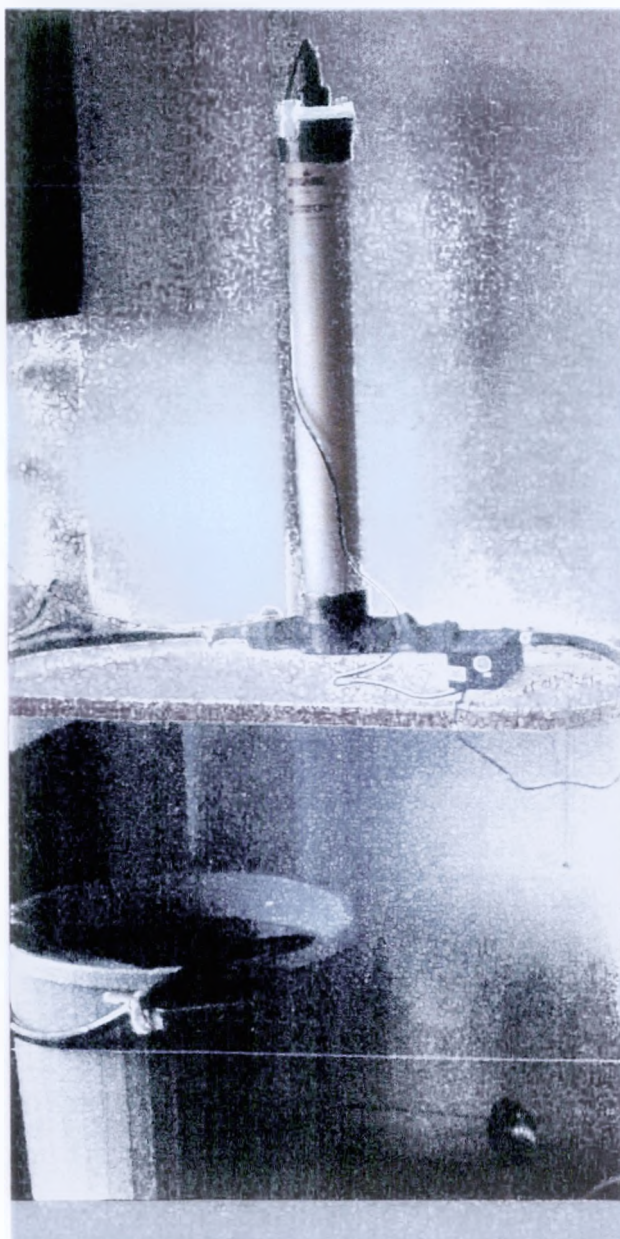
Ιδιαίτερη σημασία δώσαμε στην ποιότητα του νερού που χρησιμοποιήσαμε. Ξεκινήσαμε χρησιμοποιώντας αλάτι από τις αλυκές Μεσολογγίου – Αιτωλικού και νερό βρύσης δημιουργώντας ένα υδάτινο διάλυμα 37%. Ύστερα όμως από παρατηρήσεις σε μια ομάδα λαβρακιών που εισάγαμε σε κάποια ενυδρεία αποφασίσαμε πως το νερό έδειξε πως δυσκολεύει τα ιχθύδια να προσαρμοστούν στο νέο υδάτινο περιβάλλον τους και μακροπρόθεσμα τα οδηγούσε σε θάνατο. Αυτό ίσως να συμβαίνει γιατί το τεχνητό θαλασσινό νερό δεν εμπεριέχει όλα τα ιχνοστοιχεία του φυσιολογικού θαλασσινού νερού.

Έτσι λοιπόν επιλέξαμε ένα σημείο στην περιοχή «Τουρλίδα» της περιοχής Μεσολογγίου όπου παρατηρήσαμε πως το νερό στην περιοχή αυτή παραμένει ποιοτικά σχετικά το ίδιο, αφού δεν επικρατούν ισχυρά ρεύματα ή

άλλοι οφθαλμοφανείς λόγοι που να επηρεάζουν την ποιότητα του νερού. Από το σταθερό σημείο αυτό σε τακτικά χρονικά διαστήματα λαμβάναμε ποσότητες νερού με δοχεία τα οποία μεταφέραμε στο εργαστήριο Ιχθυολογίας της σχολής μας.

2.3.2. Αποστείρωση

Η αποστείρωση γινόταν με την χρήση ενός ειδικού αποστειρωτήρα που λειτουργούσε κάνοντας εφαρμογή την χρησιμότητα της UV ακτινοβολίας (ultraviolet light). Το μήκος κύματος αυτής της ακτινοβολίας κυμαίνεται από 240 έως 280nm , με καλύτερα αποτελέσματα όταν δουλεύει στα 254nm (Hawkins et al, 1981). Η ακτινοβολία UV έχει την ικανότητα να σκοτώνει όλους τους μικροοργανισμούς τους οποίους περιλαμβάνει μέσα στο φάσμα της ή καλύτερα να τους στασιμοποιεί. Αυτό που μας ενδιαφέρει πιο πολύ από όλα είναι πως η ακτινοβολία UV απενεργοποιεί πλήρως το βακτήριο νιβγιο , γεγονός που μας αποδεσμεύει του προβλήματος στειρότητας των ενυδρείων πριν την έκθεση των ιχθυδίων σε αυτό το βακτήριο (Hawkins et al, 1981). Ο αποστειρωτήρας αυτός (Εικόνα) ήταν μια ιδιοκατασκευή που αποτελούταν από τα εξής υλικά : ένα κεντρικό σωλήνα ο οποίος περιείχε μια λάμπα UV ακτινοβολίας και στο κατώτερο σημείο του αποχέτευση - παροχέτευση. Ο σωλήνας αυτός ήταν στερεωμένος σε σταθερή βάση. Από την παροχέτευση ξεκινούσε ένας σωλήνας ο οποίος μέσω ενός κυκλοφορητής κατέληγε σε ένα μεγάλο δοχείο. Στην συνέχεια από το δοχείο έφευγε από το ανώτερο σημείο ένας σωλήνας που κατέληγε στην αποχέτευση του αποστειρωτήρα. Έτσι με αυτόν τον τρόπο το νερό της λιμνοθάλασσας ανέβαινε μέσω του κυκλοφορητή στην παροχέτευση από το κατώτερο μέρος του δοχείου και κατέληγε αποστειρωμένο από την αποχέτευση πάλι στο δοχείο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχανόταν η καλύτερη δυνατή αποστείρωση με την συνεχή κυκλοφορία του νερού. Το δοχείο του συστήματος είχε όγκο 70 λίτρα ενώ η αποστείρωση διαρκούσε εμπειρικά 12 ώρες για κάθε 70 λίτρα.



Εικόνα: Εγκατάσταση U.V.

Το σύστημα αυτό της αποστείρωσης λειτουργούσε πολύ συχνά γιατί εκτός από την πλήρωση των ενυδρείων ήταν απαραίτητη η ανανέωση κάθε 3 ημέρες του νερού σε κάθε ενυδρείο, σε ποσοστό 10% του υπάρχοντος όγκου νερού (εμπειρικά). Αυτό ήταν απαραίτητο γιατί έπρεπε να ανανεώνονται κάποιες ουσίες που καταναλώνονται από τα ψάρια ή μειώνονται κατά την ανακύκλωση του νερού , όπως το διαλυμένο οξυγόνο , κάποια ανιόντα

(διττανθρακικά άλατα, ανθρακικά άλατα) και μερικά κατιόντα (μαγνήσιο, ασβέστιο) (Hawkins et al, 1981).

Επίσης το σύστημα αποστείρωσης λειτουργούσε και για την αποστείρωση γλυκού νερού. Αυτό γινόταν γιατί υπήρχε πρόβλημα εξάτμισης και όπως αναφέρει ο Hawkins (1981) η εξάτμιση επιδρά στην ποιότητα του θαλασσινού νερού με την αύξηση της αλατότητας, των νιτρικών και των συγκεντρώσεων των περισσοτέρων άλλων ουσιών που βρίσκονται διαλελημένα μέσα στο θαλασσινό νερό. Για αυτούς τους λόγους προσθέτουμε γλυκό αποστειρωμένο νερό, ενώ η ποσότητα που έπρεπε να προστεθεί στα ενυδρεία υπολογίζεται ως εξής από τον τύπο:

$$V_a = V_i \left(1 - \frac{S_i}{S_n} \right)$$

όπου V_a = όγκος γλυκού νερού που πρέπει να προστεθεί, V_i = ο αρχικός όγκος νερού του ενυδρείου πριν την εξάτμιση, S_i = η αρχική αλατότητα πριν την εξάτμιση, S_n = η αλατότητα του ενυδρείου μετά την εξάτμιση (Hawkins et al, 1981).

2.4. Ρύθμιση των ενυδρείων (conditioning)

Η ρύθμιση των ενυδρείων έγινε πολύ προσεκτικά έχοντας πάντα υπόψη την βιομάζα που θέλουμε να διατηρήσουμε για μεγάλο χρονικό διάστημα στα ενυδρεία μας. Γι' αυτόν τον λόγο αμέσως μετά την κατασκευή των ενυδρείων ξεκίνησε η ρύθμισή τους με χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl_2). Γνωρίζοντας όμως το οργανικό φορτίο των ενυδρείων μας, μελλοντικά θα αυξανόταν σημαντικά λόγω της εντατικής διατροφής που είχαμε προγραμματίσει και συνεπώς λόγω των απορριμμάτων / απεκκρίσεων των ιχθυδίων πήραμε την απόφαση πως η καλύτερη ρύθμιση των ενυδρείων θα ήταν αυτή η οποία θα γινόταν με πραγματικούς πληθυσμούς ιχθυδίων μεγέθους και αριθμού ίδιους με αυτούς που σκοπεύαμε να τοποθετήσουμε.

Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε 3 αλιεύσεις γόνου σε γύρω περιοχές απ' όπου προμηθευτήκαμε τελικά έναν αξιόλογο αριθμό ιχθυδίων της οικογένειας των Mugilidae του απαιτούμενου μεγέθους.

Η αλιεία του γόνου έγινε χρησιμοποιώντας ένα πεζόβολο, στις ρηχές αμμώδεις περιοχές του δέλτα του Αχελώου / Εύηνου. Στην συνέχεια ο γόνος που αλιεύθηκε μεταφέρθηκε μέσα σε ειδικά δοχεία στα οποία υπήρχε συνεχής παροχή αέρα στο εργαστήριο Ιχθυολογίας. Αφού έγινε μια πρώτη διαλογή βασιζόμενη σε οπτικά κριτήρια, για την ποιότητα του γόνου στα ιχθύδια που προορίζονταν να τοποθετηθούν στα ενυδρεία μας, έγινε 'μπάνιο' σε φορμόλη. Αυτό το 'μπάνιο' ήταν ένας προληπτικός χειρισμός που σκοπό είχε να απαλλάξει τα ιχθύδια από τυχών παράσιτα και βακτήρια που ίσως να επιμόλυναν το περιβάλλον των ενυδρείων μας.

Η διαδικασία είχε διάρκεια 20 λεπτά της ώρας ενώ η δοσολογία ήταν 200ppm φορμόλης η οποία διαλύθηκε σε ένα έτοιμο δοχείο με καλά οξυγονωμένο θαλασσινό νερό. Με το πέρας των 20 λεπτών τα ιχθύδια κατανεμήθηκαν στα ενυδρεία και καθημερινά αυξάναμε τον αριθμό με σκοπό να φθάσουμε μια ιχθυοφόρτιση κατά μισή φορά μεγαλύτερη από αυτή που είχαμε σκοπό να διατηρήσουμε με τα λαβράκια. Κατ' αυτόν τον τρόπο ήμασταν σίγουροι πως τα ενυδρεία δεν θα είχαν ποτέ πρόβλημα ιχθυοφόρτισης ή αυξημένα επίπεδα αμμωνίας αφού θα είχαν ρυθμιστεί με υπεράριθμο πλήθος ίδιου μεγέθους γόνου από τον προγραμματισμένο.

Το αποτέλεσμα που είχαμε μετά από τακτικές μετρήσεις αμμωνίας, νιτρωδών και νιτρικών ήταν να σταθεροποιήσουμε την αμμωνία σε επίπεδα μικρότερα του 0,1 mg / l, τα νιτρώδη σε επίπεδα μικρότερα του 0,3 mg / l ενώ τα νιτρικά στα 15 mg / l και άνω (ενδεικτικά).

2.5. Μεταφορά ιχθυδίων και εγκλιματισμός

Η μεταφορά γόνου λαβρακιού έγινε στις 4 Ιουλίου 1997 από τον ιχθυογεννητικό σταθμό **ΝΗΡΕΑ** της περιοχής Χιλιαδού Δωρίδως. Τα λαβράκια μέρος των οποίων αγοράσαμε με την οικονομική βοήθεια του Τμήματός μας και τα υπόλοιπα ήταν χορηγεία του ιχθυογεννητικού σταθμού,

είχαν μέσο βάρος 1,8 γρ. Η μεταφορά των λαβρακιών έγινε με την βοήθεια του φορτηγού που διαθέτει το T.E.I.

Ο συνολικός αριθμός των ατόμων λαβρακιού που προμηθευτήκαμε ήταν 600 άτομα αφού διαθέταμε 8 ενυδρεία των 40 λίτρων και 2 ενυδρεία των 210 λίτρων. Η μεταφορά του γόνου έγινε με την βοήθεια ειδικών δοχείων μεταφοράς γόνου που ήταν επενδεδημένες από κομμάτια φελιζόλ στα τοιχία γεγονός που έκανε τα δοχεία θερμομονωτικά.

Τα ψάρια, που σημειωτέον είχαν να ταϊστούν δύο μέρες για την αποφυγή του στρες, προέρχονταν από την ίδια δεξαμενή ώστε να μην επικρατούν διαφορετικές συνθήκες εκτροφής και ανάπτυξης. Η περισυλλογή έγινε με ειδικές απόχες οι οποίες είχαν πολύ μικρό άνοιγμα ματιού ώστε να μην επέλθουν τραυματισμοί στα νεαρά ιχθύδια. Πριν την συλλογή των ιχθυδίων από την δεξαμενή τα δοχεία μεταφοράς γέμισαν με νερό των δεξαμενών, το οποίο οξυγονώθηκε με την χρήση μπουκάλας καθαρού οξυγόνου μέχρι το επίπεδο κορεσμού του. Στην συνέχεια τα ψάρια χωρισμένα σε τρεις ομάδες των 200 ατόμων τοποθετήθηκαν στα τρία δοχεία μεταφοράς. Αφού ολοκληρώθηκε το παραπάνω στάδιο οι σακούλες σφραγίσθηκαν στο πάνω μέρος τους και τοποθετήθηκαν στο πίσω μέρος του βαν.

Η οξυγόνωση του νερού κατά την διάρκεια της μεταφοράς έγινε με ένα απλό σύστημα αερισμού. Από μια απλή αεραντλία ξεκινούσαν τρία σωληνάκια από τα οποία το κάθε ένα, έχοντας στην άκρη του μία αερόπετρα εμπορίου, κατέληγε στο εσωτερικό της κάθε σακούλας με άμεση συνέπεια την οξυγόνωση του νερού κατά την διάρκεια της μεταφοράς του γόνου στα ενυδρεία των εγκαταστάσεων του T.E.I. Ο χρόνος μεταφοράς του γόνου ήταν 45 λεπτά της ώρας κατά της διάρκεια της οποίας γίνονταν συνεχείς μετρήσεις με την βοήθεια του οξυγονόμετρου ώστε να έχουμε άμεσο έλεγχο του ποσοστού οξυγόνου σε κάθε δοχείο μεταφοράς.

Στην συνέχεια αφού τα δοχεία μεταφέρθηκαν στον χώρο των ενυδρείων άρχισε η διαδικασία προσαρμογής των ιχθυδίων στο περιβάλλον του κλειστού συστήματος των ενυδρείων. Αφού ανοίξαμε τις σακούλες προσθέσαμε μικρή ποσότητα αναισθητικού φαινοξυαιθανόλης, εμπειρικά ανάλογα με τις αντιδράσεις, με αποτέλεσμα να μειωθούν οι αντιδράσεις των νεαρών ιχθυδίων. Ακολούθως τα ψάρια μεταφέρθηκαν με την χρήση μικρών αποχών σε δοχεία τα οποία περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα αναισθητικού. Το

νερό που περιείχαν τα δοχεία καθώς και τα ενυδρεία αυτά ήταν αποστειρωμένο θαλασσινό νερό ίδιας θερμοκρασίας και αλατότητας με αυτό που περιείχαν τα δοχεία μεταφοράς. Αυτό επιτεύχθηκε με συνεχείς μετρήσεις των βιολογικών παραμέτρων και αναμείξεις των δύο ειδών νερού. Η ιδιαίτερη προσοχή που δόθηκε σε αυτό το στάδιο ήταν άκρως απαραίτητη γιατί σε προηγούμενες απόπειρες εγκλιματισμού γόνου λαβρακιού υπήρξε θνησιμότητα 100%. Αυτό είχε συμβεί γιατί η αλατότητα και η θερμοκρασία του νερού των δοχείων μεταφοράς και των ενυδρείων δεν ήταν απολύτως ίδιες. Ακόμα γιατί οι χειρισμοί δεν έγιναν κάτω από συνθήκες αναισθησίας με την αύξηση του stress των ιχθυδίων και τον τραυματισμό αυτών.

Όπως προαναφέρθηκε η αναισθησία πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά προηγήθηκε η μερική αναισθησία και ακολούθως έγινε η ολική. Σε περίπτωση που πραγματοποιούταν καθολική αναισθησία σε ένα μόνο στάδιο, υπήρχε περίπτωση τα νεαρά ιχθύδια, λόγω του έντονου στρες που υποβάλλονται από το στάδιο της φυσιολογικής κατάστασης στην άμεση αναισθητοποίηση, να μην καταφέρουν να ανανήψουν με αποτέλεσμα να έχουμε μαζικούς θανάτους.

Όταν έγινε η ολική αναισθησία, τα ιχθύδια κατανεμήθηκαν στα ενυδρεία ως εξής:

ΕΝΥΔΡΕΙΟ A (stock)	=	180 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ B (stock)	=	180 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 1	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 2	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 3	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 4	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 5	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 6	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 7	=	30 ιχθύδια
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 8	=	30 ιχθύδια

ΑΡΧΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΕΝΥΔΡΕΙΩΝ

ΜΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ A (stock)
180 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B.= 1,8 γρ
ΜΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ B (stock)
180 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 1
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8 γρ
ΜΗ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 2
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8 γρ
ΜΗ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 3
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 4
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 5
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΜΗ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 6
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΜΗ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 7
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 8
30 ΙΧΘΥΔΙΑ
M.B. = 1,8γρ
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ

- Συνολικά τα ιχθύδια που αγοράσθηκαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό «ΘΑΛΑΣΣΑ» του ομίλου επιχειρήσεων **ΝΗΡΕΑΣ** ήταν 600.
- Τα ενυδρεία 1 – 8 είχαν το καθένα εσωτερικό όγκο 45 λίτρα, ενώ τα ενυδρεία A και B είχαν το καθένα συνολικό όγκο 210 λίτρα. Η ρύθμιση των ενυδρείων έγινε σε διάστημα έξι μηνών, στην αρχή με χλωριούχο αμμώνιο και βακτήρια εμπορίου και στην συνέχεια με νεαρά άτομα της οικογένειας των κεφαλοειδών τα οποία αλιεύτηκαν από διάφορες περιοχές της λιμνοθάλασσας Μεσολογγίου-Αιτωλικού και τοποθετήθηκαν στα ενυδρεία αφού πρώτα τους έγινε μπάνιο σε αραιό διάλυμα φορμόλης.
- Τα ιχθύδια που βρίσκονταν στα ενυδρεία A και B θα χρησιμοποιούνταν για αντικαταστάσεις σε τυχών απώλειες των άλλων ενυδρείων, αλλά και ως μάρτυρες στην πορεία του πειράματος

Μετά από τους προσεκτικούς αυτούς χειρισμούς παρατηρήσαμε πως η συμπεριφορά των ιχθυδίων στα ενυδρεία ήταν άριστη. Στα ιχθύδια δεν χορηγήθηκε τροφή τις επόμενες 48 ώρες για τον καλύτερο εγκλιματισμό αυτών. Το ποσοστό θνησιμότητας λόγω εγκλιματισμού τις δύο πρώτες μέρες ήταν:

$$\text{ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ : } M (\%) = 155 / 600 = 25,83 \%$$

$$\text{ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ : } S (\%) = 445 / 600 = 74,16 \%$$

Οι κυριότερες απώλειες παρατηρήθηκαν στα μικρά ενυδρεία μέχρι και ολοκληρωτική θανάτωση σε ορισμένα από αυτά (3,5,7,8). Η αντίδραση μας σε αυτήν την κατάσταση ήταν να καλύψουμε τις απώλειες αυτές, αναπληρώνοντας αυτά τα ενυδρεία με ιχθύδια του Ενυδρείου Α. Παράλληλα, μετά την πάροδο της δεύτερης ημέρας άρχισε κανονικά η διατροφή στα ενυδρεία όπου τα ιχθύδια είχαν συνέλθει από το σοκ της μεταφοράς.

Αυτή η ελάττωση των ιχθυδίων στο απόθεμα Α διευθετήθηκε με νέα μεταφορά γόνου. Ο αριθμός των ιχθυδίων που προμηθευτήκαμε ήταν 210 άτομα και η μεταφορά τους καθώς και οι συνθήκες εγκλιματισμού τους ήταν παρόμοιες με την προηγούμενη. Όλα τα άτομα εισήχθησαν στο ενυδρείο Α με καθ' όλα σωστές διαδικασίες, όμως αργότερα παρουσιάστηκαν κάποια προβλήματα. Τα ιχθύδια ενώ ανένησαν της αναισθησίας διατηρήθηκαν νωχελικά για τις επόμενες τέσσερις ημέρες, ενώ παράλληλα δεν έδειχναν καμία αντίδραση στην θέα της τροφής. Μετά την πάροδο των τεσσάρων ημερών άρχισαν οι θάνατοι ,και μέσα σε δύο μέρες πέθαναν και τα 210 ιχθύδια. Καθ' όλη αυτή την χρονική διάρκεια γίνονταν συνεχείς μετρήσεις των βιολογικών παραμέτρων του ενυδρείων, και κάθε φορά βρίσκονταν ικανοποιητικές. Το μόνο αξιοπρόσεκτο φαινόμενο που παρατηρήθηκε ήταν η συνεχής θολερότητα που άρχισε να υφίσταται από την δεύτερη μέρα της εισαγωγής των ιχθυδίων στο ενυδρείο. Επίσης από το γεγονός ό,τι τα ιχθύδια βρίσκονταν νεκρά με τα βραγχιακά επικαλύμματα ανοικτά, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα πως πιθανόν τα ψάρια πέθαναν από ασφυξία, που προκλήθηκε από την υπερβολική συγκέντρωση ιλύς στην υδάτινη στήλη.

Συνεπώς , επειδή ο καθαρισμός του ενυδρείου και η επαναρρίθμιση του θα αποτελούσε μακροχρόνια διαδικασία, αποφασίσαμε να διατηρήσουμε μόνο ένα ενυδρείο για απόθεμα, δηλαδή το ενυδρείο Β. Επίσης αποφασίσαμε να δημιουργήσουμε άλλο ένα ενυδρείο στο οποίο τοποθετήσαμε 30 λαβράκια,

τα οποία πήραμε από το ενυδρείο Β ώστε να αποτελέσουν τον μάρτυρα του πειράματος.

2.6. Διατροφή

Η ανάπτυξη και η καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος των ιχθυδίων αποδείχτηκε σε πειράματα που έγιναν σε ιχθύς που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες με σκοπό να διαφέρουν οι ρυθμοί ανάπτυξης τους, πως η προστατευτική ανοσία μεταβάλλεται (σχετίζεται) με το σωματικό μέγεθος και όχι την ηλικία (A.E Ellis, Ontogeny of the Immune System in Teleost Fish σελ.29). Η σχέση μεταξύ της ωριμότητας του ανοσοποιητικού συστήματος και του βάρους της λάρβας ή του ιχθυδίου λαβρακιού προσεγγίζεται με γραμμική συνάρτηση που εκφράζεται ως εξής:

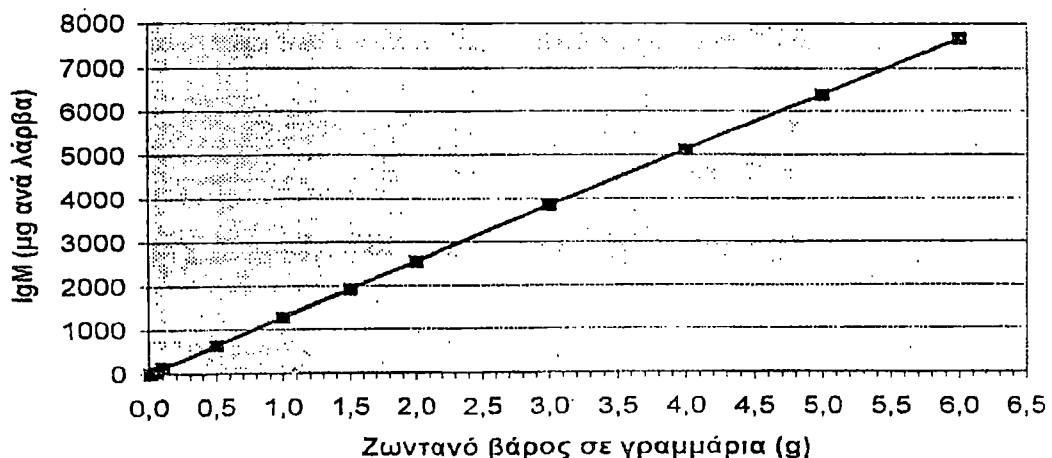
$$Y = 1,279X + 0,92 \quad (r^2 = 0,94)$$

Όπου: **Y** η περιεκτικότητα ανοσοσφαιρινών τύπου M (IgM) σε **μg** ανά λάρβα
Και **X** το ζωντανό βάρος σε **mg** της λάρβας / ιχθυδίου λαβρακιού

Η περιεκτικότητα των ανοσοσφαιρινών IgM (M – like protein level) στο νεαρό λαβράκι συμβαδίζει με την βαθμιαία τελειοποίηση των ιστών και οργάνων του ανοσοποιητικού συστήματος (θύμος αδένας, πρόσθια μοίρα του νεφρού) και χρησιμεύει σαν δείκτης της ωριμότητάς του και κατ' επέκταση της δυνατότητας του ψαριού να αξιοποιήσει ένα εμβόλιο.

Μελετήθηκε σε λάρβες και ιχθύδια λαβρακιού από 0.01 g. (10 mg) μέχρι 6 g. . Το διάγραμμα που ακολουθεί δείχνει την σχέση που υπάρχει.

Περιεκτικότητα ανοσοσφαιρίνης IgM σε λάρβες και ιχθύδια λαβρακιού ανάλογα με το ζωντανό βάρος



Είναι προφανές ότι ο εμβολιασμός αρχίζει να αποδίδει ακόμη και από το βάρος του 0.5 g. . Αν υπολογισθεί όμως η μεγάλη διαφορά που υπάρχει στην απόδοση του εμβολιασμού με την αύξηση του βάρους των ιχθυδίων έστω και κατά ένα γραμμάριο, σε συνδυασμό με τις επιπτώσεις της καταπόνησής (stress) από την εφαρμογή του εμβολιασμού στα πολύ μικρά ιχθύδια, τότε συμπεραίνεται ότι ο εμβολιασμός αξίζει ουσιαστικά να διενεργείται, τουλάχιστον στο λαβράκι, από το βάρος του 1,5g. και άνω.(Βαρβαρίγγος Π., Στρατηγικές εμβολιασμού παχυνόμενων λαβρακιών, Vet-care) .

Επίσης οι καλές ανοσοποιητικές αντιδράσεις στον εμβολιασμό βασίζονται πάνω στην καλή κατάσταση και στην υγεία του οργανισμού. Επειδή οι προστατευτικοί παράγοντες θα συντεθούν ενώ η λειτουργία των κυττάρων διατηρείται στο ψάρι, θα πρέπει να παρέχεται ισορροπημένη διαίτα ώστε αυτό να έχει τις διατροφικές ανάγκες που απαιτεί (A.E Ellis Optimizing Factors for Fish Vaccination, σελ.34).

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, και σε συνδυασμό με την προσωπική μας πεποίθηση πως η εργασία σε κάθε τομέα θα πρέπει να πλησιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο τις πραγματικές συνθήκες, αποφασίσαμε πως η διατροφή θα πρέπει να είναι ίδια με αυτή αντίστοιχων ιχθυδίων της ίδιας ηλικίας ενός ιχθυογεννητικού σταθμού.

Έτσι λοιπόν χρησιμοποιήσαμε την τροφή της εταιρίας INVE η οποία χορηγείται σε ιχθύδια αυτής της ηλικίας σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Τα χαρακτηριστικά της τροφής είναι:

Τροφή: PROVIMI

ΑΝΑΛΥΣΗ:

Ολική πρωτεΐνη	51%
Ολικό λίπος	10%
Ολική κυτταρίνη	1,5%
Τέφρα	10%
Υγρασία	10%

Μικροσυστατικά προστιθέμενα ανά κιλό:

Βιταμίνη A	20.000 I.U.
Βιταμίνη D3	2.000 I.U.

Βιταμίνη Ε	100 mg.
Βιταμίνη C-st.	500 mg.
Ethoxyquin	
Χαλκός	5 mg.

Το ημερήσιο σιτηρέσιο υπολογίσθηκε με βάση το επί της % του ζώντος βάρους που για μέγεθος 1 – 5 gr. και θερμοκρασία 20 – 25 °C είναι 3 – 6 % (Λαβράκι και Τσιπούρα, σελ. 260, Πίνακας 3.2, Γ.Χώτος – Ι.Ρογδάκης). Προσωπική μας επιλογή ήταν το 4,5 % και έτσι η διατροφή των ιχθυδίων στα ενυδρεία έγινε ως εξής:

Ενυδρεία Α , Β stock (Από 180 ιχθύδια το καθένα, Μ.Β.=1,8gr.)

180 ιχθύδια × 1,8 gr. = 324 gr. × 4,5/100 = 14,58 gr. για το κάθε ενυδρείο ημερησίως.

Ενυδρεία 1 – 8 (Από 30 ιχθύδια, Μ.Β.=1,8gr.)

30 ιχθύδια × 1,8 gr = 54 gr. × 4,5 / 100 = 2,43 gr. για το κάθε ενυδρείο ημερησίως.

Συνολικά απαιτούνταν 48,6 gr. τροφής για 600 ιχθύδια λαβρακιού ημερησίως τα οποία κατανέμονταν σε 6 γεύματα ως εξής:

8:00 (30% συνολικής τροφής)	} →	{ 4,374 gr. 2,187 gr 1,458 gr 2,187 gr 4,374 gr	} ENYΔΡΕΙΑ A , B
11:00 (15% » »)			
13:00 (10% » »)			
18:00 (15% » »)			
20:00 (30% » »)			

8:00 (30% συνολικής τροφής)	} →	{ 0,729 gr. 0,365 gr 0,243 gr 0,365 gr 0,729 gr	} ENYΔΡΕΙΑ 1 έως 8
11:00 (15% » »)			
13:00 (10% » »)			
18:00 (15% » »)			
20:00 (30% » »)			

Το ωράριο που ακολουθήσαμε στην διατροφή έγινε σύμφωνα με ένα τυπικό ωράριο ενός ιχθυογεννητικού σταθμού, και ξεκίνησε στις 6 / 7 / 1997 μετά την πάροδο δύο ημερών από την εισαγωγή των ιχθυδίων στα ενυδρεία, για τον καλύτερο εγκλιματισμό αυτών.

Στις 11 / 7 / 1997 έγινε μέτρηση μέσου βάρους στα ενυδρεία 1, 2 και 4 και βρέθηκε πως τα ιχθύδια είχαν M.B. (1) = 2,24 γρ., M.B. (2) = 2,52 γρ. και M.B. (4) = 3,52γρ.. Συγκρινόμενα με το M.B. της ίδιας παρτίδας νεοεισερχόμενων ατόμων από τον ιχθυογεννητικό σταθμό στις 10 / 7 / 1997 με M.B. = 2,084 γρ., βλέπουμε την σημασία της τυπικής σε ωράριο και ποσότητα διατροφής, αλλά και την σημασία των σταθερών παραμέτρων που είχαμε στο εργαστήριο όπως θερμοκρασία και stress.

2.6.1. Προβλήματα και αντιμετώπιση

Προσπαθήσαμε σε όλη την διάρκεια του πειράματος να είμαστε συνεπείς με τα ωράρια που είχαμε θεσπίσει έτσι ώστε οι αρχικοί μας στόχοι να γίνουν εφικτοί. Αυτό αφορούσε κυρίως την διατροφή, έτσι λοιπόν φροντίζαμε το ημερήσιο πρόγραμμα διατροφής να τηρείται πιστά.

Στις 13 / 7 παρατηρήσαμε πως τα ιχθύδια του ενυδρείου B δεν έτρωγαν καθόλου. Το ίδιο συνέβη και στις 14 / 7, ημέρα κατά την οποία από το συγκεκριμένο ενυδρείο είχαμε και 6 απώλειες. Αυτή ήταν μια συμπεριφορά που δεν μπορούσαμε να εξηγήσουμε έχοντας υπόψη την έως τότε συμπεριφορά των ιχθυδίων κατά την διατροφή, η οποία ήταν άψογη. Παρατηρήσαμε πως τα ιχθύδια απέκτησαν την συνήθεια να συναθροίζονται κατακόρυφα στη μια γωνιά του ενυδρείου. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα τα υπόλοιπα ιχθύδια στα άλλα ενυδρεία είχαν φυσιολογική συμπεριφορά και διατρέφονταν κανονικά.

Έτσι λοιπόν προς αναζήτηση του αιτίου που προκαλούσε αυτή την συμπεριφορά, ξεκινήσαμε μετρήσεις αμμωνίας, νιτρωδών, νιτρικών και pH και βρήκαμε αντίστοιχα 0,025 mg / lt, 0,15 mg / lt, 60 mg / lt και pH 6,8 ενώ η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 22,7°C. Στις 18 / 7 / 1997 τα ιχθύδια του ενυδρείου B βρέθηκαν όλα νεκρά, με τα βραγχιακά επικαλύμματά τους

ανοικτά, σημάδι ασφυξίας, κάτι που εκείνη την στιγμή θεωρήσαμε παράδοξο αφού το επίπεδο του οξυγόνου στο νερό ήταν αρκετό, λόγω των δύο αντλιών Hydrea που χρησιμοποιούσαμε.

Αφού εξαντλήσαμε όλες τις μετρήσεις που μπορούσαμε να κάνουμε, καταλήξαμε πως για τον θάνατο των ιχθυδίων δεν οφειλόταν στην αμμωνία, στα νιτρώδη ή στο οξυγόνο. Έτσι λοιπόν πήραμε δείγματα βραγχίων για να εξετάσουμε την τυχών παρουσία παρασίτων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τον θάνατο των ιχθυδίων. Μετά από εξέταση τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως δεν υπήρχαν παράσιτα και άρα το περιβάλλον του ενυδρείου μας ήταν απαλλαγμένο από τέτοιους οργανισμούς.

Έτσι λοιπόν αφαιρετικά, καταλήξαμε ότι η πιθανή αιτία θανάτου ήταν η υπερβολική ποσότητα αιωρούμενων στερεών στην στήλη του νερού. Κατά αυτήν την εκδοχή επειδή η ανανέωση του νερού ήταν πολύ μικρή ενώ η χορηγούμενη τροφή αρκετή έως πολλά, τα αιωρούμενα στερεά συνεχώς αυξάνονταν. Λόγω της συνεχής λειτουργίας των αντλιών αυτά δεν είχαν τον απαραίτητα χρόνο να κατακάτσουν και έτσι η στήλη του νερού να καθαρίσει. Έτσι λοιπόν υπήρξε μια συνεχής αύξηση των αιωρούμενων στερεών τα οποία επικάθονταν στην επιφάνεια των βραγχίων των ιχθυδίων, με αποτέλεσμα την κάλυψη των επιθηλιακών κυττάρων. Συνεπώς η ανταλλαγή των αερίων με το περιβάλλον ήταν δύσκολη έως αδύνατη και έτσι επήλθε ο θάνατος από ασφυξία. Αυτή η εκδοχή δικαιολογεί και το φαινόμενο των ανοικτών βραγχιακών επικαλυμμάτων σε όλα τα ιχθύδια.

2.7. Εμβολιασμός ιχθυδίων

Η 25 / 7 ήταν η ημέρα του εμβολιασμού. Την ημέρα αυτή τα ιχθύδια είχαν M.B.= 2,5gr.. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήσαμε την πρώτη ομάδα ενυδρείων που αποτελούνταν από 4 ενυδρεία των 30 λίτρων με 30 ιχθύδια το κάθε ένα Έτσι λοιπόν συνολικά την ημέρα αυτή εμβολιάστηκαν συνολικά 120 ιχθύδια λαβρακιού.

Ως μέθοδο εμβολιασμού επιλέξαμε την μέθοδο του 'μπάνιου'. Έτσι λοιπόν για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήσαμε μια μαύρη κυκλική επίπεδη δεξαμενή όγκου V=1000lt..



Εικόνα: Δεξαμενή εμβολιασμού

Την γεμίσαμε με 200lt αποστειρωμένο με U.V. θαλασσινό νερό το οποίο συλλέξαμε από το ίδιο σημείο που παίρναμε νερό για τα ενυδρεία. Στην συνέχεια τοποθετήσαμε το μπουκάλι με το εμβόλιο στο εσωτερικό της δεξαμενής, έτσι ώστε αυτό να αποκτήσει την ίδια θερμοκρασία με το νερό της δεξαμενής. Αφού αδειάσαμε το εμβόλιο στην δεξαμενή (1lt. εμβολίου σε 200lt. νερού) άρχισε η παροχή αέρα μέσω πωρόλιθου και οξυγόνου μέσω φιάλης, έτσι ώστε το επίπεδο του οξυγόνου στο νερό της δεξαμενής να είναι συνεχώς 7 mg/lt.. Για να είμαστε σίγουροι πως έχουμε πετύχει κάτι τέτοιο παίρναμε συνεχώς μετρήσεις με το οξυγονόμετρο.

Στην συνέχεια συλλέξαμε προσεκτικά με απόχες τα ψάρια από τα ενυδρεία και τα τοποθετήσαμε στην δεξαμενή. Η εισαγωγή του πρώτου ιχθυδίου από την εισαγωγή του τελευταίου είχαν χρονική διαφορά 10 λεπτών. Μετρώντας τον χρόνο από την εισαγωγή του τελευταίου ιχθυδίου αφήσαμε τα ιχθύδια στην δεξαμενή για δύο ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος αρχίσαμε την συλλογή τους αφού πρώτα με την βοήθεια

αναισθητικού (φαινοξυαιθανόλη) πετύχαμε μια ελαφριά νάρκωση των ιχθυδίων για την ευκολότερη περισυλλογή τους, η οποία διάρκεσε 10 λεπτά. Θα πρέπει να διευκρινίσουμε πως το αναισθητικό που χρησιμοποιήσαμε δεν επηρεάζει το εμβόλιο και τη δράση του, κάτι που αποτελεί ιδιότητα του εμβολίου, ενώ το συγκεκριμένο αναισθητικό θα πρέπει να πούμε πως δρα απολυμαντικά και έτσι απολυμαίνει τις επιφάνειες των ιχθυδίων που τυχόν τραυματίστηκαν από τους χειρισμούς.



Εικόνα: Χορηγούμενο εμβόλιο



Εικόνα: Μέτρηση οξυγόνου



Εικόνα: Εμβολιασμός ιχθυδίων

Τα ιχθύδια μετά την επιστροφή τους στα ενυδρεία είχαν φυσιολογική συμπεριφορά ενώ έφαγαν κανονικά το απογευματινό γεύμα τους.

Στην συνέχεια η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε για τα υπόλοιπα ιχθύδια ακολουθώντας την ίδια ακριβώς διαδικασία χωρίς όμως την προσθήκη του εμβολίου. Αυτό έγινε για να έχουν υποστεί τα ιχθύδια τους ίδιους χειρισμούς σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Από την επόμενη ημέρα η διατροφή επανήλθε στην συνήθης δοσολογία και συχνότητα.

2.7.1. Διάρκεια της ανοσίας μετά από εμβάπτιση-λουτρό σε εμβόλιο VIBROGEN 2

Στο ερώτημα πόσο θα κρατήσει η ανοσία, δηλαδή πόσο μεγάλο θα είναι το διάστημα κατά το οποίο το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών «θυμάται» τον εμβολιασμό, η πρακτική πείρα που έχει συγκεντρωθεί είναι ήδη αρκετή για να συμπεράνει, ότι το μέγεθος / ηλικία των ψαριών εκτροφής καθορίζει όχι μόνο τον βαθμό ανταπόκρισης στο εμβόλιο αλλά και την διάρκεια της ανοσίας (μνήμη).

Όταν τα νεαρά λαβράκια εμβολιάζονται με την μέθοδο της εμβάπτισης (immersion, deep) ή του λουτρού (transportation method) η ανοσία διατηρείται για διάστημα που κυμαίνεται από 4 έως 12 μήνες ανάλογα με το μέγεθος των λαβρακιών κατά τον εμβολιασμό.

Η ανοσία αναμένεται να διαρκέσει τουλάχιστον 120 μέρες όταν τα λαβράκια έχουν μέσο βάρος 1,5 g. . Όταν το μέσο βάρος φθάσει τα 2 g. η διάρκεια της ανοσίας θα ξεπεράσει τις 180 μέρες, ενώ όταν έχουν ελάχιστο βάρος 4 g. μπορεί να αγγίξει και τις 365 μέρες (Βαρβαρίγγος Π., Στρατηγικές εμβολιασμού παχυνόμενων λαβρακιών, Vet-care.).

2.8. Αναζήτηση βακτηρίου *Listonella anguillarum* ορότυπος 1

2.8.1. Ιστορικό αναζήτησης

Η προσπάθειά μας για την εύρεση του βακτηρίου *Listonella anguillarum* αρχικά ξεκίνησε από τις μονάδες που βρίσκονταν εντός του νομού

Αιτωλοακαρνανίας. Μετά από συνεχείς προσπάθειες δεν κατορθώσαμε να έχουμε επιτυχές αποτέλεσμα. Προσπαθήσαμε να έρθουμε σε επικοινωνία με τοπικούς ιχθυοκαλλιεργητές, όμως η απάντησή τους ήταν αρνητική για τις μονάδες τους αλλά και για μονάδες με τις οποίες είχαν επικοινωνία.

Στην συνέχεια προσπαθήσαμε να επικοινωνήσουμε με μονάδες του νομού Φθιώτιδας. Όμως και σε αυτή την περίπτωση δεν φανήκαμε τυχεροί γιατί δεν πήραμε καμία θετική απάντηση στο ερώτημά μας εάν παρουσιάζονταν στις διάφορες μονάδες κάποιο από τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί το *Listonella anguillarum*.

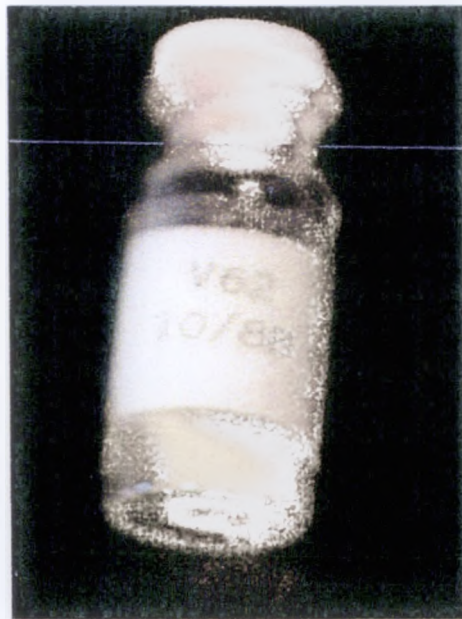
Και ενώ αρχίσαμε να εγκαταλείπουμε τις προσπάθειές μας, κάποια από τις τελευταίες προσπάθειες ευδοκίμησε. Συγκεκριμένα μία μονάδα στην περιοχή του Μύτιγγα παρουσίαζε έντονα σημάδια της ασθένειας βιμπρίωσης όπως ερυθροστομία, έλκη, λευκά πτερύγια, λευκά σημάδια στο κεφάλι, ενώ είχε παράλληλα θνησιμότητα στους πληθυσμούς των λαβρακιών μικρού μεγέθους. Έτσι λοιπόν την ίδια μέρα σπεύσαμε στην μονάδα με σκοπό να συλλέξουμε μερικά από τα λαβράκια που παρουσίαζαν τα παραπάνω συμπτώματα.

Τα νεαρά άτομα μεταφέρθηκαν μέσα σε ειδικά δοχεία μεταφοράς με κατάλληλες συνθήκες οξυγόνωσης. Αφού έφθασαν στο ιχθυοπαθολογικό εργαστήριο, πήραμε δείγμα από τα βράγχια για εξέταση ύπαρξης τυχών παρασίτων, από το νεφρό και το συκώτι για καλλιέργειές σε γενικό υπόστρωμα T.S.A 2%NaCl (Trypton soya agar), από τέσσερα λαβράκια επιλεκτικά πριν αυτά θανατωθούν. Μετά από επώαση 24 ωρών προχωρήσαμε σε ανακαλλιέργεια σε εκλεκτικό υπόστρωμα T.C.B.S 2%NaCl(Thio - sulfate - bile salts) άγαρ.

Στην συνέχεια αφού κάναμε όλα τα τεστ ταυτοποίησης είχαμε τα ακόλουθα αποτελέσματα: gram -, κινητά, οξειδάση +, καταλάση +, O/F +/- και έδειξε ευαισθησία στο βιμπριοστατικό. Όμως στο τεστ οροσυγκόλλησης *Listonella anguillarum* δεν πραγματοποιήθηκε οροσυγκόλληση με αποτέλεσμα να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα πως το βακτήριο ήταν του γένους *Listonella* όχι όμως το είδος *Listonella anguillarum*. Τέλος αφού εφαρμόσαμε και το τεστ API 20E ταυτοποιήσαμε το βακτήριο ως *Vibrio alginolyticus* (API PROFILES) γεγονός που μας αποθάρρυνε της σκέψης ότι βρήκαμε τον παθογενή παράγοντα του πειράματος μας.

2.8.2. Εύρεση του βακτηρίου

Η επόμενη κίνησή μας ήταν να αναζητήσουμε το βακτήριο σε διάφορα ινστιτούτα στον ελληνικό χώρο αλλά και στο εξωτερικό. Παράλληλα βρισκόμασταν σε συνεχή επαφή με τον κ. Βαρβαρίγγο ο οποίος με την ιδιότητα του ιχθυοπαθολόγου είχε συχνή επαφή με ιχθυοκαλλιέργειες σε όλη την Ελλάδα. Ακολουθώντας η επαφή μας με το Ινστιτούτο PASTER δεν απέφερε θετικό αποτέλεσμα. Ύστερα από συνενόηση με τον κ. Νούσια και συνεργασία του με ιταλικό Ινστιτούτο προμηθευτήκαμε το βακτήριο σε λυοφυλιομένη μορφή. Ηεπιαναφορά όμως του βακτηρίου σε φυσιολογικές συνθήκες δεν επιτεύχθηκε λόγω του παρατεταμένου χρόνου διατήρησής του (έτος λυοφύλλησης 1988) . Τελικά μετά από επικοινωνία με στελέχη του Εθνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών, μέσω του κ. Χατζηευσταθίου πήραμε θετική απάντηση.



Εικόνα: Βακτήριο σε λυοφυλιομένη μορφή

Συγκεκριμένα μας πληροφόρησαν πως διατηρούσαν μία καθαρή καλλιέργεια του βακτηρίου *Listonella anguillarum* ορότυπος 1 και πως ήταν διατεθειμένοι να μας την διαθέσουν εάν την χρειαζόμασταν. Έτσι σπεύσαμε να πάρουμε το βακτήριο το οποίο μας παραδόθηκε σε ειδική συσκευασία που είχε ως σκοπό την διατήρηση της καλλιέργειας σε χαμηλή θερμοκρασία, ενέργεια που αποσκοπεί στην συντήρηση της καλλιέργειας. Μετά από διάρκεια τεσσάρων ωρών, χρόνος που διάρκεσε η διαδρομή Αθήνα-Μεσολόγγι, έγινε η ανακαλλιέργεια στο ιχθυοπαθολογικό εργαστήριο σε γενικό υπόστρωμα T.S.A 2%NaCl. Μετά από ένα 24ωρο παρατηρήσαμε πως σχηματίστηκαν αποικίες, και έτσι προχωρήσαμε στην ανακαλλιέργειά του σε εκλεκτικό υπόστρωμα T.C.B.S 2%NaCl. Παράλληλα κάναμε όλα τα τεστ ρουτίνας που μας έδειξαν πως το βακτήριο είναι gram -, κινητό, οξειδάση +, καταλάση +, oxidation / fermentation +/+. Μετά από 24 ώρες παρατηρήσαμε πως σχηματίστηκαν κίτρινες αποικίες στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα γεγονός που ενισχύει τις πιθανότητες το βακτήριο να είναι το *Vibrio anguillarum*. Στην συνέχεια έγιναν το τεστ οροσυγγόλλησης και το τεστ API, με τα οποία ταυτοποιήσαμε πλήρως το βακτήριο ως *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1.

2.9. Ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις

Στις 8/9/97 έγινε ανακαλλιέργεια του *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1 σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA + 2%NaCl ώστε στις 9/8 να διαθέταμε καλλιέργειες 24 ωρών. Προχωρήσαμε σ' αυτό το βήμα αφού ταυτοποιήσαμε με όλα τα τεστ ρουτίνας (δοκιμή κινητικότητας, χρώση κατά gram, καλλιέργεια σε TCBS, δοκιμή οξειδάσης, δοκιμή καταλάσης, O/F, αντιβιογράμμα, τεστ API 20E, οροσυγκόλληση) τις καλλιέργειες που προμηθευτήκαμε από το Ε.Κ.Θ.Ε. . Το βακτήριο ταυτοποιήθηκε με τον αριθμό 3047527 (API profiles) ως *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1 και είχε τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Κινητό
2. Gram –
3. Δημιουργεί κίτρινες καλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα TCBS

4. Είναι ζυμωτικό (F)
5. Οξειδάση +
6. Καταλάση +
7. Ευαίσθητο στο βιμπριοστατικό 0 /129
8. Δοκιμή οροσυγκόλλησης +

2.9.1. Υλικά και μέθοδοι

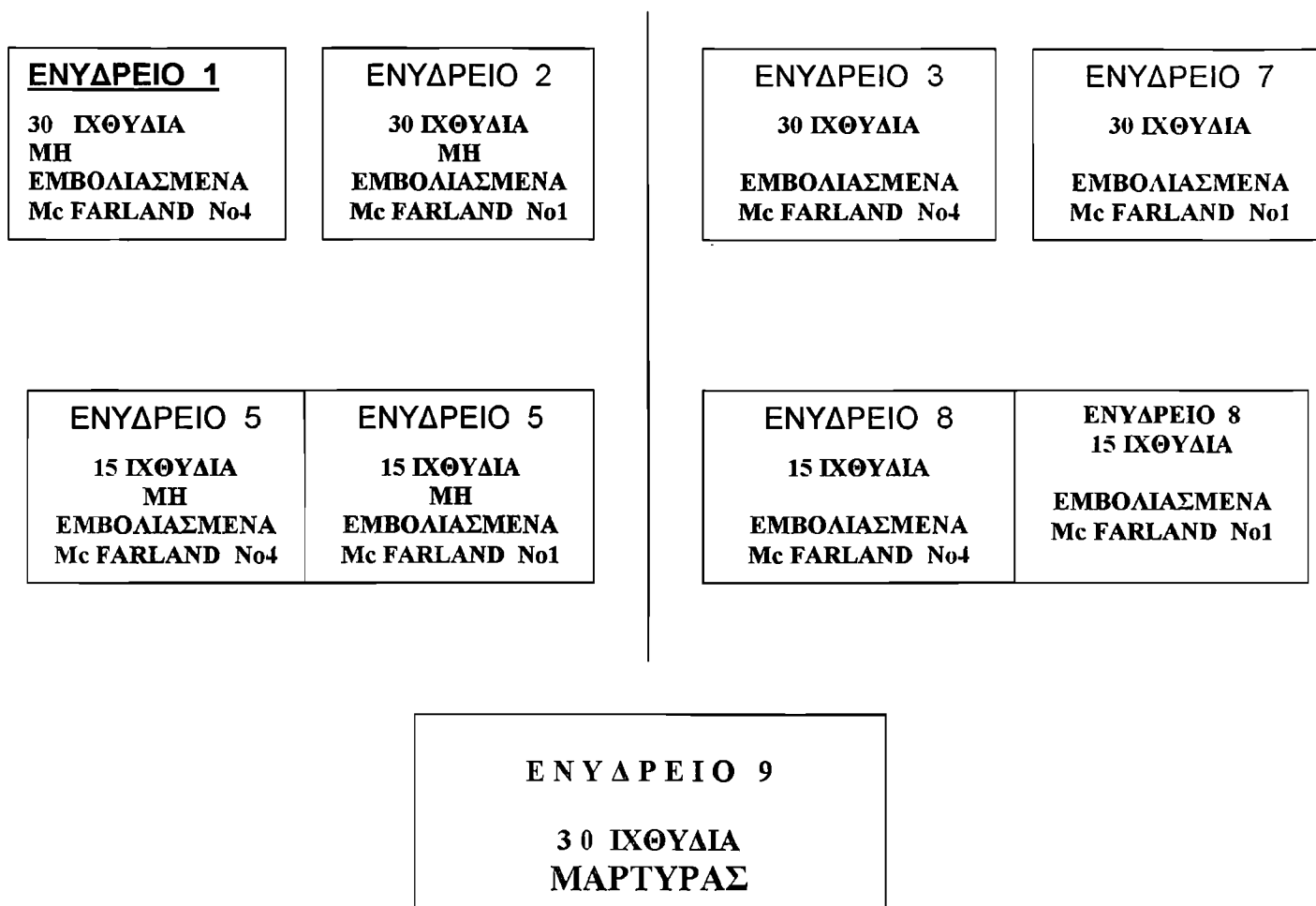
Στις 9/9/97 από τις καλλιέργειες των 24 ωρών του βακτηρίου πήραμε αποικίες και δημιουργήσαμε διαλύματα φυσιολογικού ορού 2%NaCl με αποικίες από το βακτήριο που με οπτική σύγκριση με τα διαλύματα McFarland αντιστοιχούσαν στα διαλύματα Νο1 και Νο4. Λίγο πριν την δημιουργία των διαλυμάτων, τα βακτήρια δοκιμάστηκαν σε τεστ κινητικότητας όπου βρέθηκε πως είναι κινητά, κάτι που έγινε για να διαπιστώσουμε πως είναι ζωντανά.

Η δημιουργία του κάθε διαλύματος για το κάθε ενυδρείο γινόταν ξεχωριστά και χρονικά, λίγο πριν ασχοληθούμε με το αντίστοιχο ενυδρείο. Λόγω του αριθμού των ενυδρείων, το ενυδρείο 3 και το ενυδρείο 8 χωρίστηκαν στη μέση με την βοήθεια σήτας ώστε το ½ των ιχθυδίων του κάθε ενυδρείου να είναι εμβολιασμένο με διάλυμα πυκνότητας McFarland No4 και το άλλο ½ με Νο1.Χρησιμοποιώντας ένα δοχείο 100lt. όπου προσθέσαμε ποσότητα (κρίνοντας με βάση την συμπεριφορά των ιχθυδίων) φαινοξυαιθανόλης. Με γρήγορες κινήσεις με την βοήθεια απόχης τα ιχθύδια μεταφέρθηκαν από το ενυδρείο στο δοχείο. Η χορηγηθείσα ποσότητα για κάθε ιχθύδιο ήταν 0,1 ml το οποίο αντιστοιχεί για κάθε Νο McFarland στην εξής συγκέντρωση βακτηρίων :

$$\text{McFarland No 1} = 30 \times 10^6 \text{ cfu}$$

$$\text{McFarland No 4} = 120 \times 10^6 \text{ cfu}$$

ΕΝΔΟΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΕΣ ΕΚΧΥΣΕΙΣ
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΥΔΡΕΙΩΝ



- Για τις ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις χρησιμοποιήθηκαν 210 ιχθύδια λαβρακιού, μέσου βάρους 3,83 γρ.
- Τα ενυδρεία 5 και 8 ,όπως φαίνεται και στο σχήμα, χωρίστηκαν με πλαστικό πλέγμα ώστε να χρησιμοποιηθούν 45 ιχθύδια ,αριθμός στατιστικά επαρκής για κάθε εναλλαγή του πειράματος.
- Το ενυδρείο 9 , χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας του πειράματος, αφού στα 30 ιχθύδια που περιείχε έγιναν όλες οι διαδικασίες που έγιναν στα υπόλοιπα 180 ιχθύδια όμως τελικά σε αυτά έγιναν ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις με Νάτριο χλωριούχο Ε.Φ. 111 (φυσιολογικό ορό).

Συνολικά εμβολιάσθηκαν 180 ιχθύδια με τις παραπάνω συγκεντρώσεις ενώ στον μάρτυρα του έγιναν ενέσεις με φυσιολογικό ορό 2% NaCl (Νάτριο Χλωριούχο Ε.Φ. 111).

Επίσης θα πρέπει να σημειωθεί πως χορηγούσαμε οξυγόνο καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας, με την βοήθεια πωρόλιθου και φιάλης οξυγόνου. Τέλος είναι σημαντικό να αναφέρουμε πως στα ιχθύδια τους είχε γίνει 48ωρή νηστεία.

2.9.2. Διαδικασία ενδοπεριτοναϊκών εκχύσεων

Όπως είπαμε και πιο πριν, οι ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις έγιναν στις 9 Σεπτεμβρίου 1997. Στα νεαρά λαβράκια είχε προηγηθεί νηστεία δύο ημερών με προφανή σκοπό την μείωση του στρες που θα υποβάλλονταν κατά την διαδικασία των εκχύσεων.

Πριν αρχίσει η διαδικασία είχαμε διαμορφώσει κατάλληλα τον εργαστηριακό χώρο. Πιο συγκεκριμένα είχαμε έτοιμη την δεξαμενή, που θα υποδεχόταν αρχικά τα ιχθύδια, γεμισμένη με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό το οποίο οξυγονωνόταν συνεχώς με την βοήθεια μιας αεραντλίας και μιας φιάλης οξυγόνου. Δίπλα σε αυτή την δεξαμενή υπήρχε μια μικρότερη όπου θα γινόταν η ολική αναισθητοποίηση των νεαρών ιχθυδίων. Σε αυτό το δοχείο είχε παρασκευαστεί διάλυμα θαλασσινού νερού και αναισθητικού φαινοξυαιθανόλης.

Πάνω σε έναν πάγκο είχαν τοποθετηθεί όλα τα απαραίτητα σύνεργα για να γίνει εφικτή η πραγματοποίηση της διαδικασίας. Έτσι λοιπόν με την βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα ομογενοποιήσαμε το διάλυμα φυσικού ορού – αποικίες βακτηρίου και ενώ το συγκρίναμε με το πρότυπο διάλυμα της κλίμακας McFARLAND No4 (θολερότητα), αρχίσαμε να μεταφέρουμε τα νεαρά ιχθύδια από το ενυδρείο 1 στο δοχείο όπου θα γινόταν η αναισθητοποίηση. Στην συνέχεια όταν τα ιχθύδια αναισθητοποιούνταν πλήρως, χορηγούσαμε με ένεση ποσότητα 0,1ml από το διάλυμα, με την βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης(1 ml). Ακολούθως τοποθετούσαμε το κάθε λαβράκι που εμβολιάζε στο αντίστοιχο ενυδρείο.

Η ίδια διαδικασία έγινε στα ενυδρεία 3, σε 15 ιχθύδια του 5^{ου} ενυδρείου και σε 15 ιχθύδια του 8^{ου} ενυδρείου. Ταυτόχρονα με τη επανεγκατάσταση των

λαβρακιών στα ενυδρεία τους χορηγούσαμε οξυγόνο ώστε να ανανήψουν γρήγορα από το αναισθητικό που τους χορηγήθηκε. Πρέπει επίσης να σημειώσουμε πως παρασκευάζαμε καινούργιο διάλυμα για κάθε ομάδα ενυδρείων.

Στην συνέχεια ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία για τα ενυδρεία 2,7,σε 15 λαβράκια του 5^{ου} και στον ίδιο αριθμό σε λαβράκια του 8^{ου} ενυδρείου. Σε αυτήν όμως την περίπτωση παρασκευάσαμε διαλύματα φυσικού ορού – αποικίες βακτηρίου που συγκρίθηκαν με το πρότυπο διάλυμα της κλίμακας McFARLAND No1.

Όταν ολοκληρώθηκε η παραπάνω διαδικασία, ακολούθησαν οι ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις στα λαβράκια που θα χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρες του πειράματος. Σε αυτά τα ιχθύδια χορηγήθηκε φυσικός ορός, αφού τους έγινε πρώτα ολική αναισθησία.

Κατά την διάρκεια των εκχύσεων είχαμε κάποια θνησιμότητα που καταχωρείται ως θνησιμότητα χειρισμών. Πιο συγκεκριμένα δεν ανένηψαν από την διαδικασία 12 ιχθύδια από το ενυδρείο 5(δεξιά), δύο από το 5(αριστερά), τρία από το ενυδρείο 1, ένα από το ενυδρείο 3, και ένα από το ενυδρείο 8(δεξιά). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε πως στο ενυδρείο 5(δεξιά) έγινε διπλή αναισθητοποίηση. Η δεύτερη συγκέντρωση αναισθητικού που χρησιμοποιήσαμε έδρασε αθροιστικά ως προς την πρώτη και έτσι τελικά η ποσότητα που χορηγήθηκε τελικά στα ιχθύδια ήταν θνησογόνος, γεγονός που δικαιολογεί τόσο μεγάλη θνησιμότητα.



Εικόνα: Ενδοπαιριτοναϊκή έκχυση

ΗΜΕΡΑ ΕΝΔΟΠΕΡΙΤΟΝΑΪΚΩΝ ΕΚΧΥΣΕΩΝ

Η διαδικασία των ενδοπεριτοναϊκών εκχύσεων ολοκληρώθηκε στις 1:45 μ.μ.. Η παρατήρηση της συμπεριφοράς των λαβρακιών άρχισε από εκείνη την στιγμή. Ο παρακάτω πίνακας μας δείχνει τους θανάτους των ιχθυδίων μετά το πέρας της διαδικασίας:

<u>Ωρες</u> ΕΝΥΔΡΕΙΑ	4:30	5:30	6:30	7:30	8:30	9:30	10:30	11:30	0:30	1:30	2:30	3:30	4:30	5:30	6:30	7:30	8:30	9:30	10:30	11
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 1 Νο4	1	2	4	4	7	5	2	2												
ΕΝ. 5 αριστ. Νο4		1	1	1	4	2	2	2												
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 3 Νο4				1	3	4	4	5	7	3	2									
ΕΝ. 8 αριστ. Νο4				1	2	2	3	3	3	1										
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 2 Νο1				1	2	8	8	5	4	2										
ΕΝ. 5 δεξιά Νο1								2	1											
ΕΝΥΔΡΕΙΟ 7 Νο1								1	1	1	4	5	7	3	3	2				1
ΕΝ. 8 δεξιά Νο1									3		5			2	2					1
ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΕΝ. 9																				

- Το ενυδρείο 1 είχε απώλειες λόγω χειρισμών 3 άτομα
- Το ενυδρείο 5 αριστερά είχε απώλειες λόγω χειρισμών 2 άτομα
- Το ενυδρείο 3 είχε απώλειες λόγω χειρισμών 1 άτομο
- Το ενυδρείο 5 δεξιά είχε απώλειες λόγω χειρισμών 12 άτομα
- Το ενυδρείο 8 δεξιά είχε απώλειες λόγω χειρισμών 1 άτομο
- Στο ενυδρείο 7 ένα λαβράκι επέζησε μέχρι την επόμενη μέρα στις 16:30, ενώ το τελευταίο επέζησε μέχρι τις 20:30 της ίδιας μέρας
- Στο ενυδρείο 8 δεξιά ένα λαβράκι επέζησε μέχρι την επόμενη μέρα στις 22:30, ενώ ένα ακόμα ζει.

2.10. Ταυτοποίηση θνησογόνου παράγοντα

Μετά το τέλος των ενδοπεριτοναϊκών εκχύσεων, ξεκίνησε η παρατήρηση της συμπεριφοράς των λαβρακιών. Όχι πολύ αργότερα είχαμε και τις πρώτες απώλειες μεταξύ των μη εμβολιασμένων λαβρακιών που τους είχε γίνει ένεση με εναίσιμο διάλυμα το οποίο είχε συγκριθεί με το πρότυπο διάλυμα της κλίμακας Mc FARLAND No4.



Εικόνα: Συμπεριφορά των ιχθυδίων μετά τις ενδοπαιριτοναϊκές εκχύσεις

Ταυτόχρονα, τα ιχθύδια τα οποία είχαν μόλις απεβιώσει, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας για να τους γίνουν οι απαραίτητες εξετάσεις ώστε να διαπιστώσουμε το θνησογόνο αίτιο.

Αφού πήραμε 4 νεκρά ιχθύδια από κάθε ενυδρείο, προχωρήσαμε σε απολύμανση της εξωτερικής επιφάνειας των ιχθυδίων. Στην συνέχεια ανοίξαμε τα ιχθύδια κατά μήκος της νηκτικής κύστης και κόψαμε περίπου $\frac{1}{4}$ της απόστασης μεταξύ της πλευρικής γραμμής και της κατώτερης κοιλιακής επιφάνειας. Αφαιρέσαμε με την λαβίδα τον ιστό που περιβάλλει τα σπλάχνα και με την βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου πήραμε δείγματα από τα

νεφρά όλων των ιχθυδίων, με τα οποία έγιναν καλλιέργειες σε γενικό θρεπτικό υπόστρωμα T.S.A. 2% NaCl.



Εικόνα: Εξέταση ιχθυδίων μετά τον θάνατο

Μετά την πάροδο 24 ωρών παρατηρήσαμε πως είχαν αναπτυχθεί αποικίες σε όλα τα υποστρώματα. Ακολούθως προχωρήσαμε σε ανακαλλιέργειες σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα T.C.B.S. 2% NaCl και από εκεί σε υποστρώματα T.S.A παίρνοντας αυτή την φορά απομονωμένες αποικίες, για να έχουμε καθαρές καλλιέργειες. Έτσι λοιπόν μετά από 48 ώρες είχαμε καθαρές καλλιέργειες σε TSA και προχωρήσαμε στα τεστ ρουτίνας για να διαπιστώσουμε εάν όντως τα λαβράκια υπέκυψαν λόγω του βακτηρίου που τους χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά.

Τα τεστ ρουτίνας μας έδειξαν πως το βακτήριο που απομονώσαμε είχε τα εξής χαρακτηριστικά: ήταν gram - , κινητό, οξειδάση +, καταλάση +. Στην συνέχεια τα τεστ που ακολούθησαν μετά το πέρας 24 ωρών μας έδειξαν πως το βακτήριο είναι ευαίσθητο στο βιμπριοστατικό 0/129 και πως είναι

οξειδωτικό – ζυμωτικό. Μετά από αυτά τα τεστ ακολούθησαν τα τεστ API 20E και το τεστ της οροσυγκόλλησης, με τα οποία ταυτοποιήσαμε ως θνησογόνο παράγοντα το βακτήριο *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ

Χαρακτηριστικά των απομονωθέντων από λαβράκι ελληνικών στελεχών του *Vibrio anguillarum* βιότυπος 1 της εργασίας του κ. Νούσια σε σύγκριση με τα αποτελέσματά μας από το API test.

	Χαρακτηριστικά του test API κατά τον κ. Νούσια για το <i>V.anguillarum</i> ορότυπος 1	Χαρακτηριστικά του test API κατά την εργασία μας για το <i>V.anguillarum</i> ορότυπος 1
BETA-GALACTOSIDASE	+	+
ARGININE-DIHYDROLASE	+	+
LYSINE DECARBOXYLASE	-	-
ORNITHINE DECARBOXULASE	-	-
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΙΤΡΙΚΩΝ	V	V
ΠΑΡΑΓΩΓΗ H ₂ S	-	-
ΟΥΡΕΑΣΗ	-	-
TRYPTOPHANE DESAMINASE	-	-
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΙΝΔΟΛΗΣ	+	+
VOGUES – PROSKAUER	+	+
ΡΕΥΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΖΕΛΑΤΙΝΗΣ	+	+
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ:		
GLUCOSE	+	+
MANNITOL	+	+
INOSITOL	-	-
SORBITOL	+	+
RHAMNOSE	-	+
SUCROSE	+	+
MELIBIOSE	-	-
AMYGDALIN	-	+
ARABINOSE	-	-

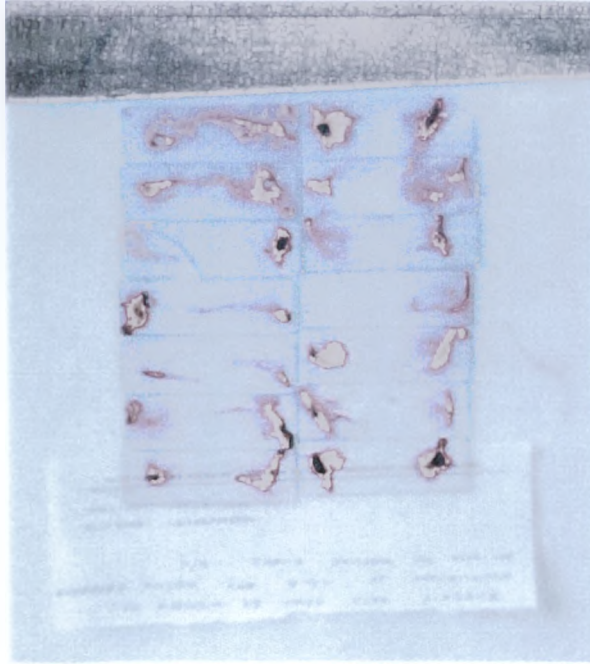
Κατά την ταυτοποίηση με την χρήση του API 20 E, ορισμένα βιοχημικά τεστ δεν προέκυψαν ίδια με την αρχική ταυτοποίηση του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε. Όμως σύμφωνα με την οδηγία του Nordic Manual for the Surveillance and Diagnosis of Diseases in farmed Salmonids και ειδικότερα με τον παρακάτω πίνακα που προσδιορίζει τα είδη σύμφωνα με τις βιοχημικές αντιδράσεις των βιοχημικών ουσιών αργινίνη, λυσίνη, ορνιθίνη, παραπέμπουν στο βακτήριο *Vibrio anguillarum* ορότυπο 1 και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των παραπάνω τεστ και ιδιαίτερα της οροσυγκόλλησης είμαστε σίγουροι πως το βακτήριο αυτό αποτελεί τον θνησογόνο παράγοντα που οφείλεται για τον θάνατο των ιχθυδίων.

Είδη του γένους <i>Vibrio</i>	ALO - test
<i>Vibrio anguillarum</i>	+/-/-
<i>Vibrio damsela</i>	+/-/-
<i>Vibrio ordalii</i>	-/-/-
<i>Vibrio salmonicida</i>	-/-/-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-/+/+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-/+/+
<i>Vibrio logeii</i>	-/+/-
<i>Vibrio fischeri</i>	-/+/-

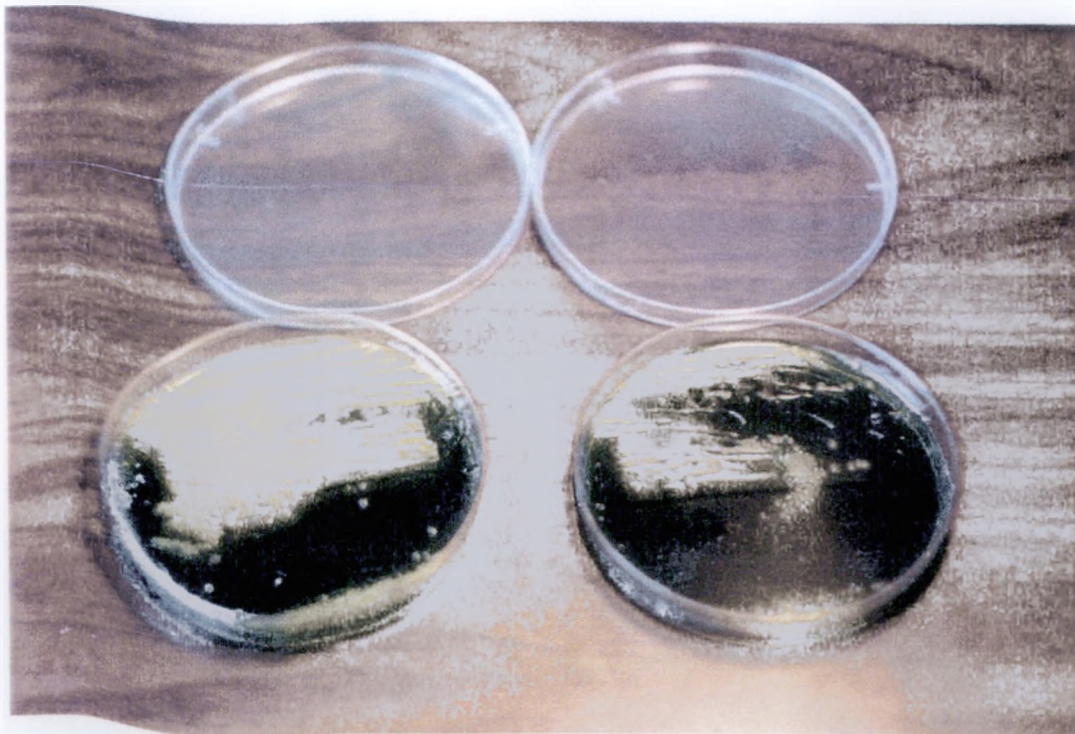
Οι διαφορετικές αντιδράσεις σε ορισμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά οφείλονται στο ότι η διατήρηση του βακτηρίου έγινε με συνεχείς ανακαλλιέργειες. Γεγονός που προκάλεσε την απώλεια ορισμένων πλασμιδίων από τον μικροοργανισμό και έτσι εμφανίζονται και ορισμένες μικροδιαφορές στις αντιδράσεις με τα βιοχημικά σε σχέση με τον αρχικά απομονωμένο μικροοργανισμό (Austin and Austin).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειώσουμε πως τα ιχθύδια που αποτελούσαν τους μάρτυρες του πειράματος, για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά το πέρας του πειράματος διαβίωναν κανονικά γεγονός που αποδεικνύει την ορθότητά μας και την προσοχή που δώσαμε στους χειρισμούς. Το ενυδρείο αυτό επιβεβαιώνει, πως η θνησιμότητα που προήλθε

στα υπόλοιπα ενυδρεία, οφείλεται καθαρά σε παθογόνο παράγοντα, ο οποίος όπως αποδείχθηκε είναι το βακτήριο *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1.



Εικόνα: Χρώση Gram (-)



Εικόνα: Δοκιμή T.C.B.S (Κίτρινες αποικίες)



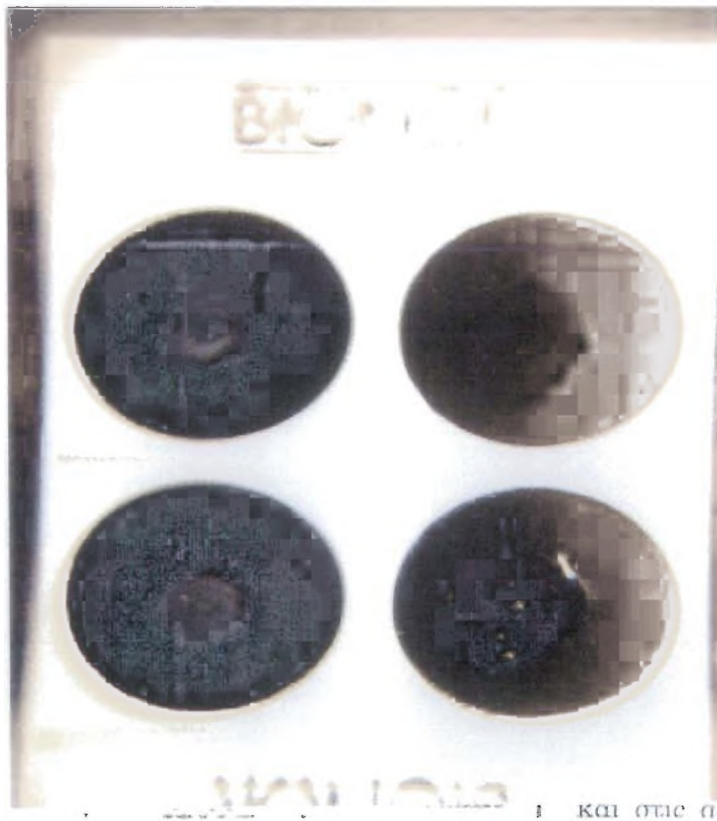
Εικόνα: Δοκιμή οξειδάσης (+)



Εικόνα: Δοκιμή καταλάσης (+)



Εικόνα: Test API 20E



Εικόνα: Δοκιμή οροσυγκόλλησης (+)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 1ος ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

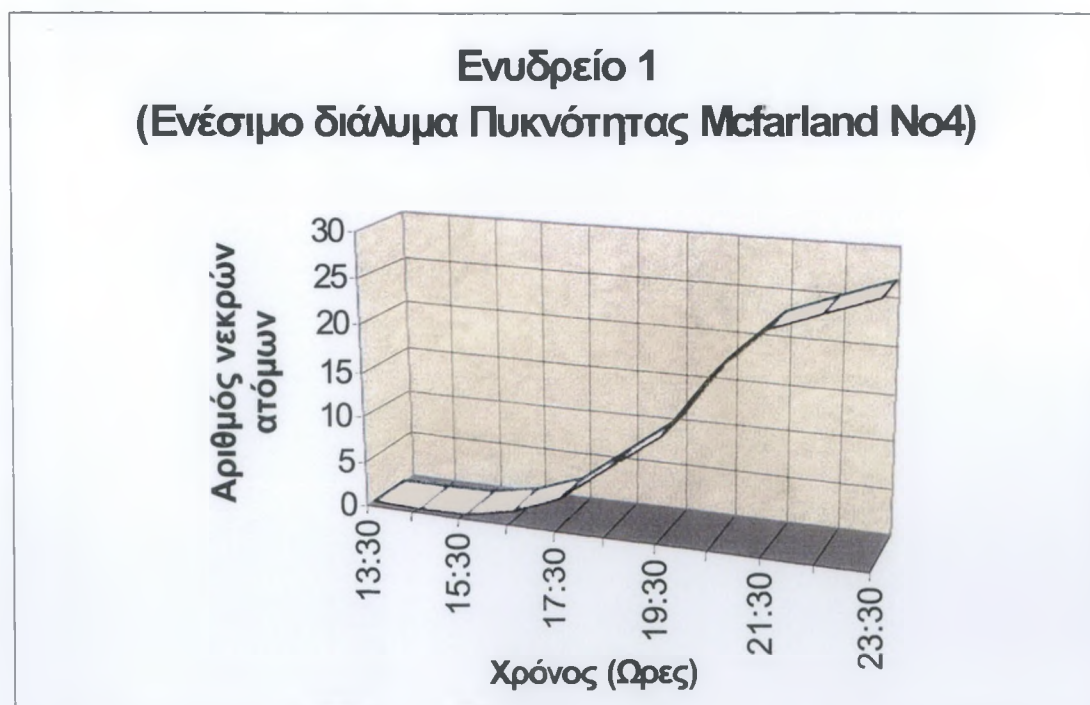
Μετά από τις ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις αφήσαμε τα ιχθύδια σε ηρεμία και ξεκινήσαμε την παρατήρησή τους, καθώς και την καταγραφή των θνησιμοτήτων. Για την καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων τα αποδώσαμε γραφικά με τους εξής τρόπους : με τρισδιάστατα γραφήματα, με ιστογράμματα και επίσης αποδώσαμε τις εξισώσεις των τάσεών τους. Αυτή η επεξεργασία έγινε για τις ομάδες των εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων ιχθυδίων, ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε διάλυμα πυκνότητας McFarland No1 και No4, αλλά και για τους πληθυσμούς του κάθε ενυδρείου ξεχωριστά.

Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων για κάθε ενυδρείο :

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 1

Το ενυδρείο αυτό περιέχει μη εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No4 στο οποίο όλα τα ιχθύδια απεβίωσαν μέσα σε 10 ώρες από την ώρα της έναρξης της παρατήρησής μας με τον ρυθμό που φαίνεται στο γράφημα.

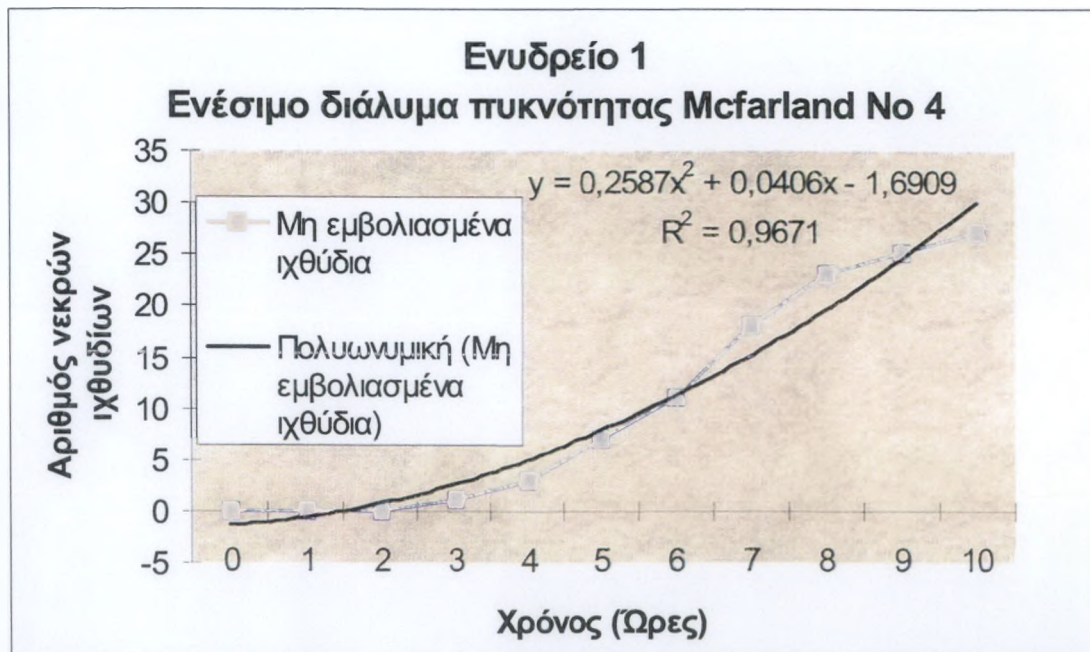
	Αριθμός νεκρών ατόμων
13:30	0
14:30	0
15:30	0
16:30	1
17:30	3
18:30	7
19:30	11
20:30	18
21:30	23
22:30	25
23:30	27



- Ώρα έναρξης (0) =13:30
- Αριθμός νεκρών ατόμων λόγω χειρισμών = 3

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση τάσης και την εξίσωση που την διέπει.

	Μη εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	1
4	3
5	7
6	11
7	18
8	23
9	25
10	27

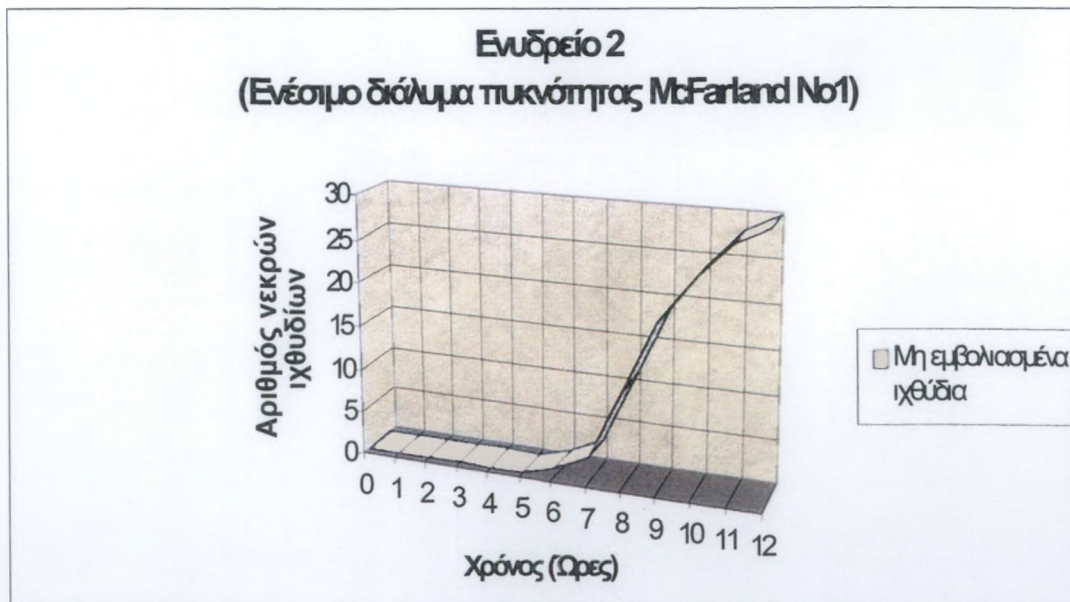


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 3
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 2

Το ενυδρείο αυτό περιέχει μη εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland Νο1 και στο οποίο όλα τα ιχθύδια απεβίωσαν μέσα σε 12 ώρες από την ώρα έναρξης της παρατήρησής μας με τον ρυθμό που φαίνεται στο γράφημα.

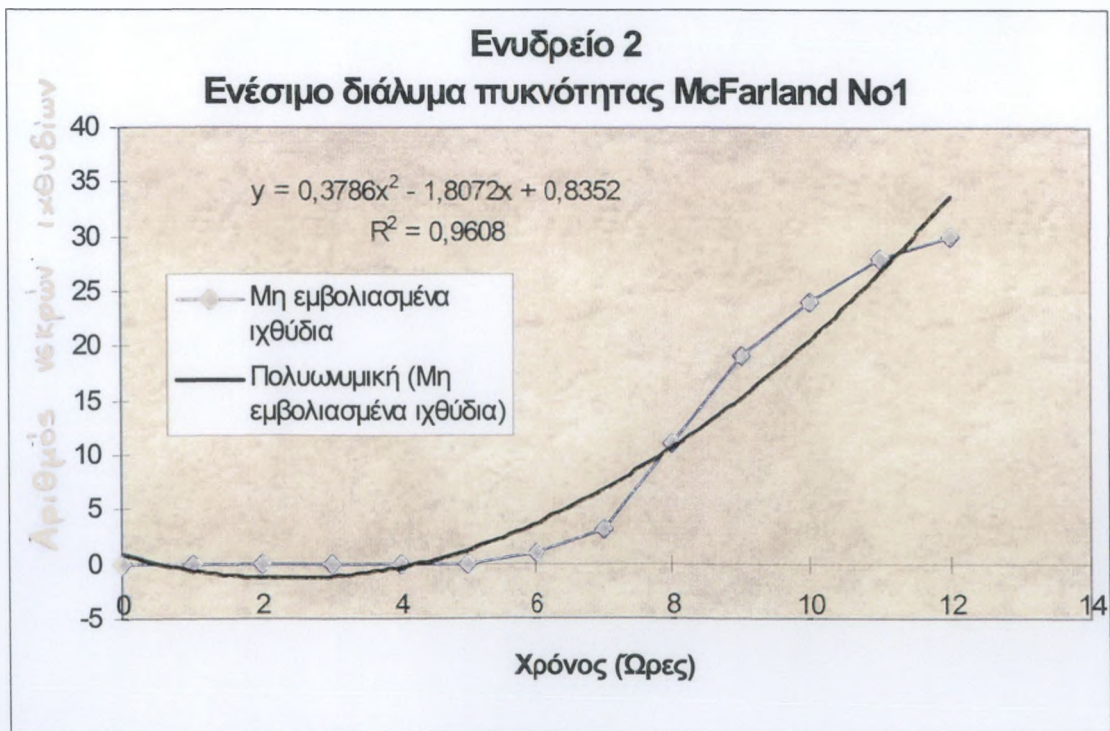
Μη εμβολιασμένα ιχθύδια	
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	3
8	11
9	19
10	24
11	28
12	30



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 0
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση της τάσης και την εξίσωση που την διέπει.

	Μη εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	3
8	11
9	19
10	24
11	28
12	30

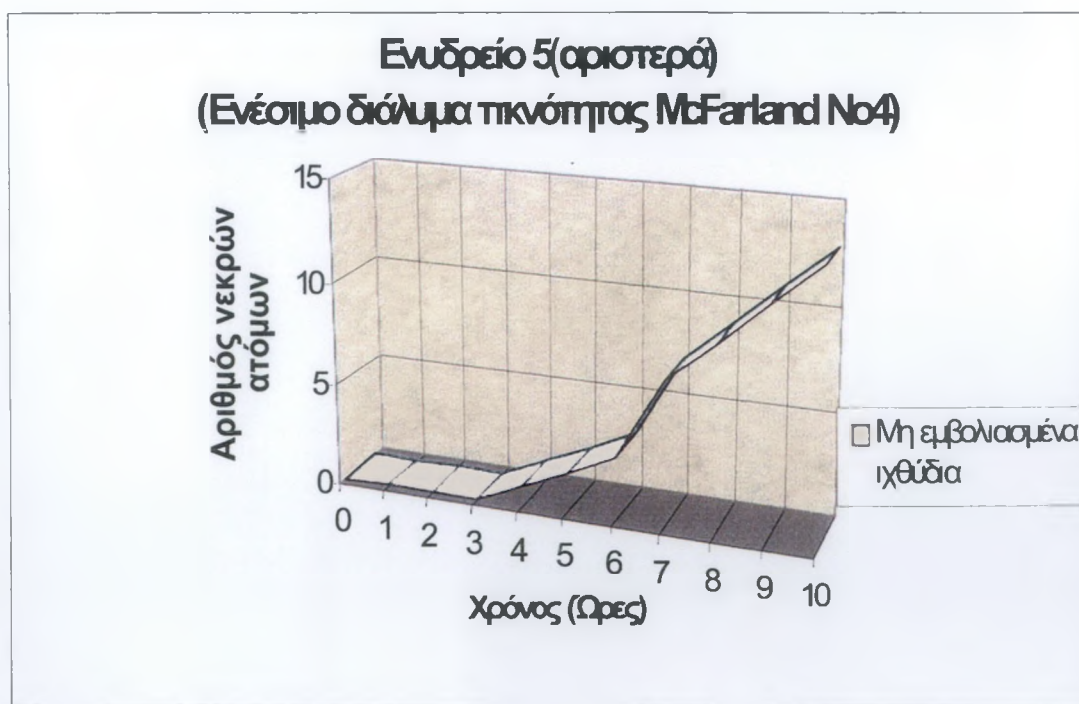


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 0
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 5 (ΑΡΙΣΤΕΡΑ)

Το ενυδρείο αυτό περιείχε 15 μη εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No4 στο οποίο όλα τα ιχθύδια απεβίωσαν μέσα σε 10 ώρες από τη ώρα έναρξης της παρατήρησής μας με τον ρυθμό που φαίνεται στο γράφημα.

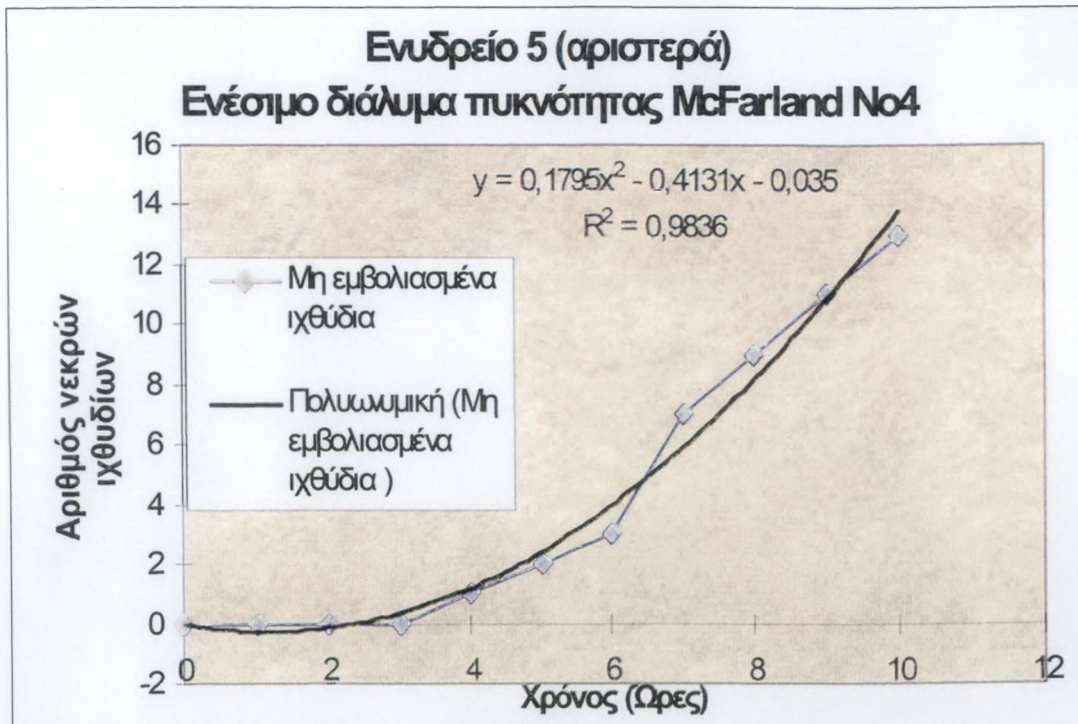
	Μη εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	1
5	2
6	3
7	7
8	9
9	11
10	13



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 2
- Ώρα έναρξης (0) =13:30

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση της τάσης και την εξίσωση που την διέπτει

Μη εμβολιασμένα ιχθύδια	
0	0
1	0
2	0
3	0
4	1
5	2
6	3
7	7
8	9
9	11
10	13

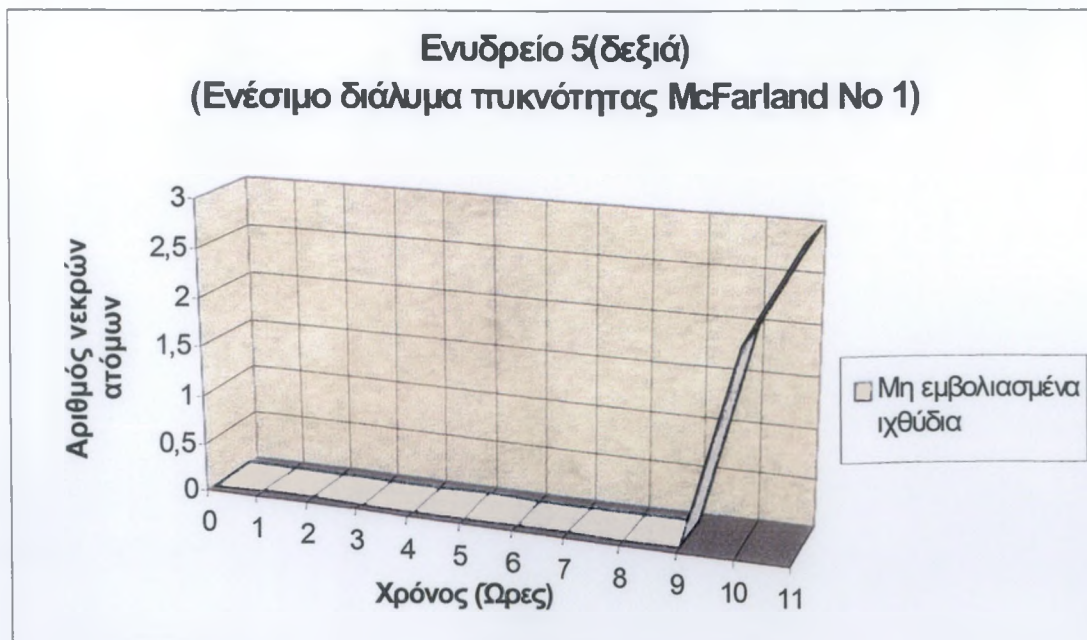


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 2
- Ωρα έναρξης (0) = 13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 5 (ΔΕΞΙΑ)

Το ενυδρείο αυτό περιείχε 15 μη εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No1. Όμως αυτό το ενυδρείο παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα και αυτό γιατί λόγω χειρισμών με τη λανθασμένη χρήση του αναισθητικού είχαμε μια απώλεια 12 ατόμων και γι' αυτόν τον λόγο δεν μπορούν να βγουν αξιόλογα συμπεράσματα από τα γραφήματα αυτά.

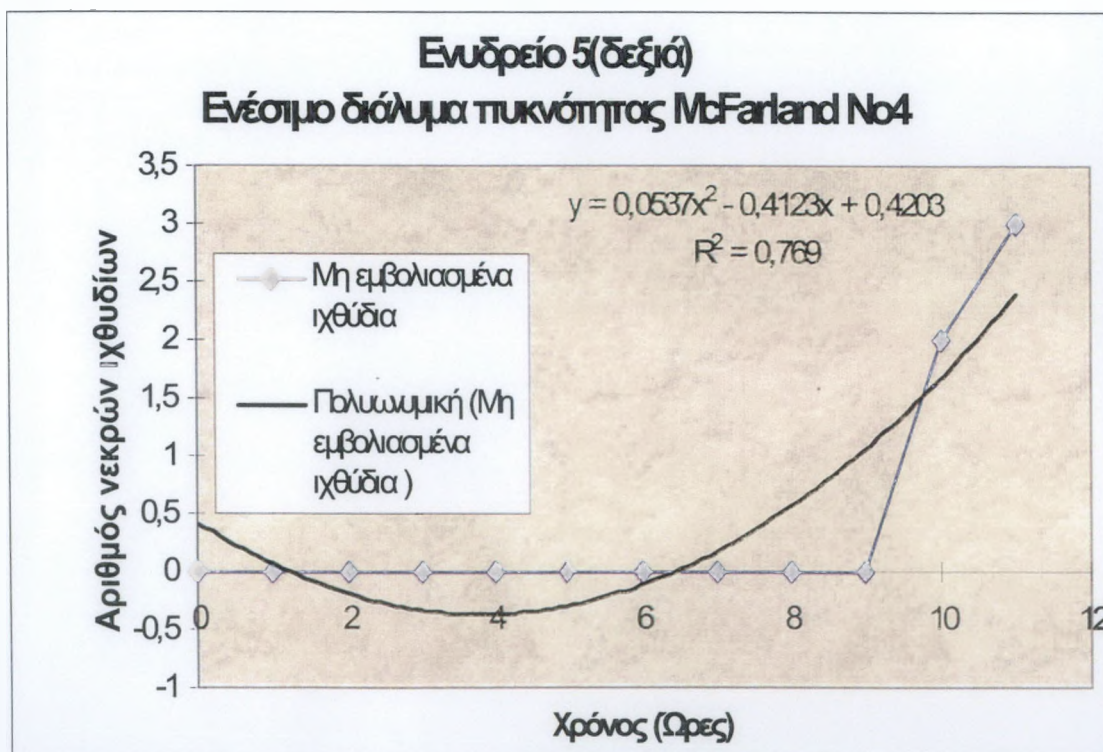
Μη εμβολιασμένα ιχθύδια	
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	2
11	3



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 12
- Ωρα έναρξης (0) = 13:30

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση της τάσης και την εξίσωση που την διέπει

Μη εμβολιασμένα ιχθύδια	
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	2
11	3

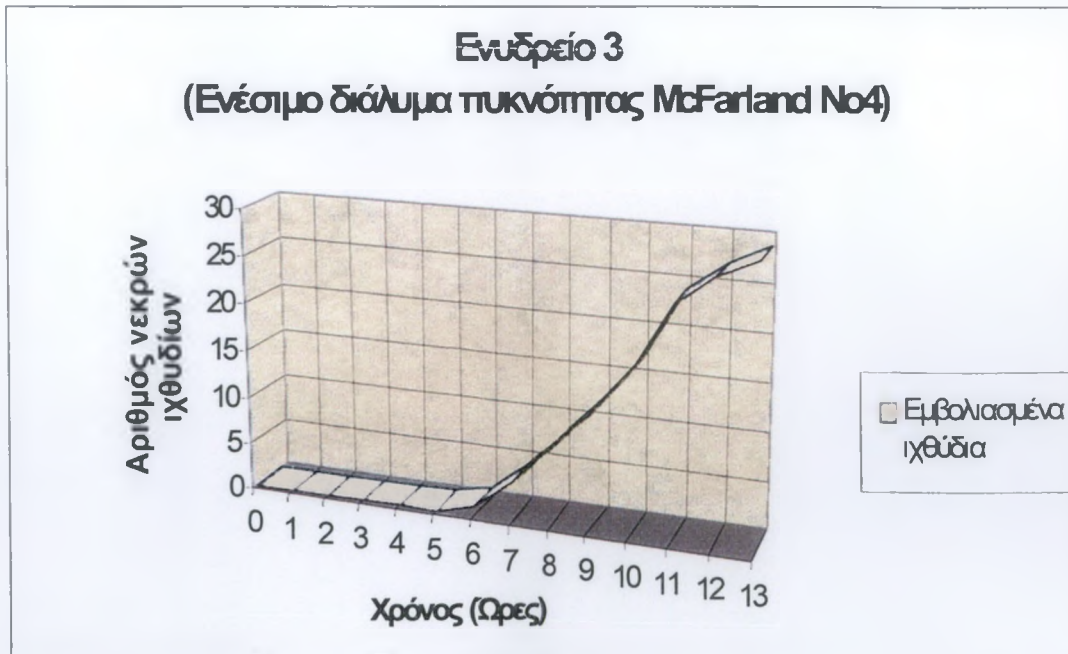


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 12
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 3

Το ενυδρείο αυτό περιείχε εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No4 στο οποίο όλα τα ιχθύδια απεβίωσαν μέσα σε 12 ώρες από την ώρα της έναρξης της παρατήρησής μας, με τον ρυθμό που φαίνεται στο γράφημα.

	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	4
8	8
9	12
10	17
11	24
12	27
13	29

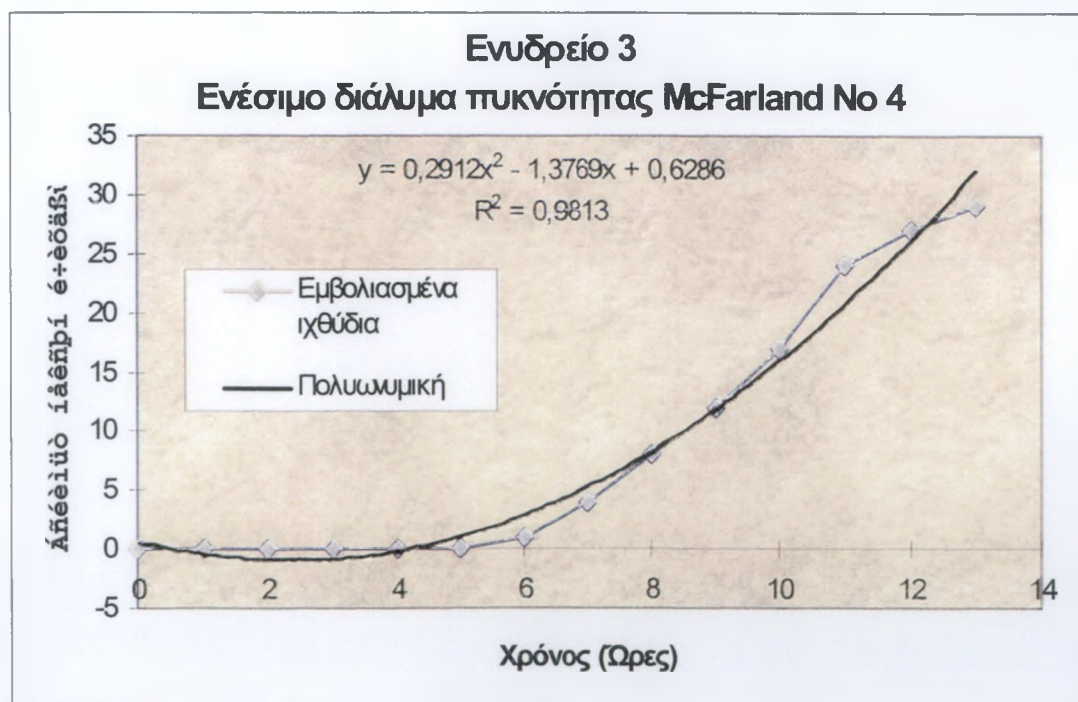


Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 1

Ωρα έναρξης (0) = 13:30

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση της τάσης και την εξίσωση που την διέπει.

	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	4
8	8
9	12
10	17
11	24
12	27
13	29

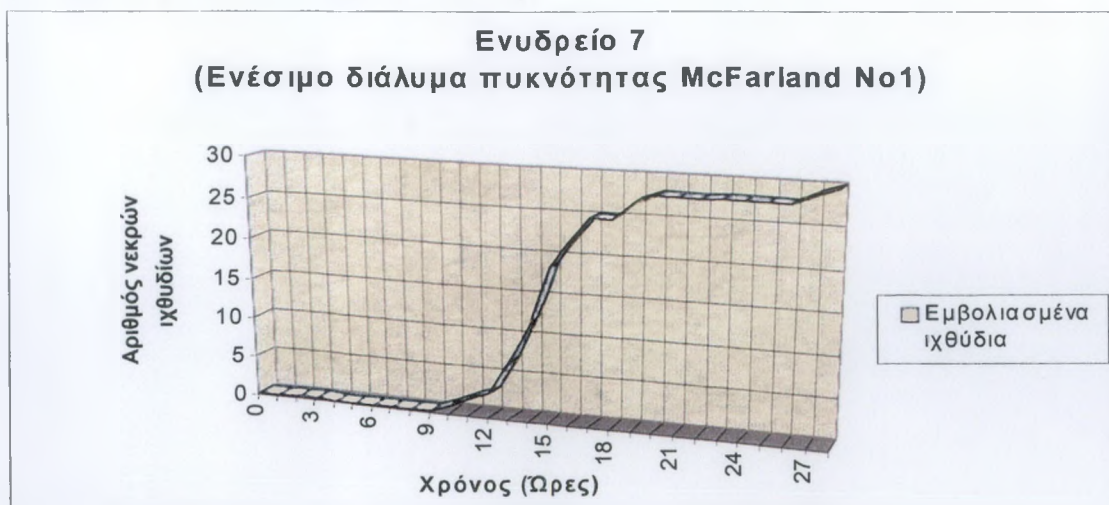


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 1
- Ώρα έναρξης (0) =13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 7

Αυτό είναι ένα ενυδρείο του οποίου τα αποτελέσματα ως αναφορά την θνησιμότητα των ιχθυδίων διαφοροποιούνται κατά πολύ σε σχέση με τα αποτελέσματα των ενυδρείων που εξετάσαμε έως τώρα. Αφορά εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No1. Στο πρώτο γράφημα βλέπουμε πως ο χρόνος επιβίωσης των ιχθυδίων είναι μεγαλύτερος κατά πολύ από όλα τα υπόλοιπα, ενώ στην εξίσωση τάσης παρατηρούμε τον ρυθμό της θνησιμότητας των ιχθυδίων.

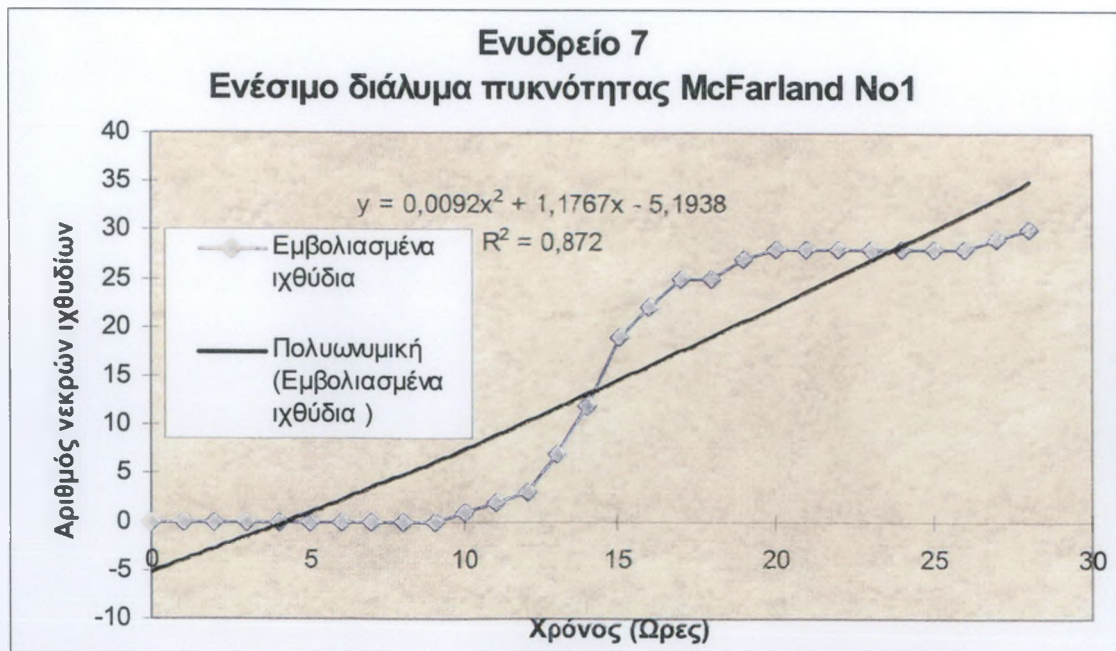
	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	1
11	2
12	3
13	7
14	12
15	19
16	22
17	25
18	25
19	27
20	28
21	28
22	28
23	28
24	28
25	28
26	28
27	29
28	30



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 0
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση τάσης και την εξίσωση που την διέπει.

	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	1
11	2
12	3
13	7
14	12
15	19
16	22
17	25
18	25
19	27
20	28
21	28
22	28
23	28
24	28
25	28
26	28
27	29
28	30

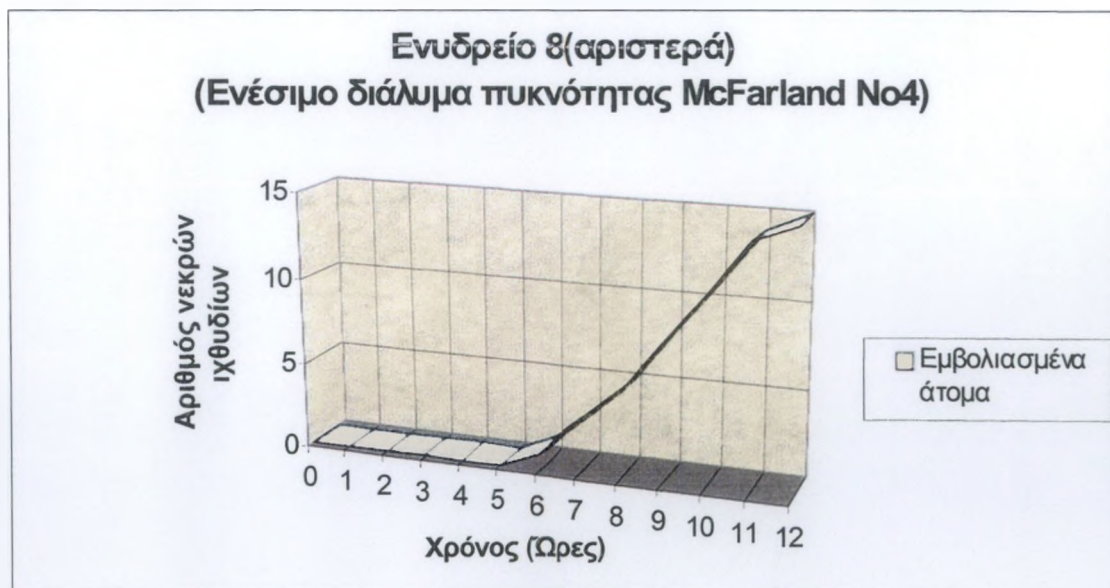


- Αριθμός νεκρών λόγω χειρισμών = 0. Ώρα έναρξης (0) = 13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 8 (ΑΡΙΣΤΕΡΑ)

Το ενυδρείο αυτό περιείχε εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No4 στο οποίο όλα τα ιχθύδια απεβίωσαν μέσα σε 12 ώρες από την ώρα έναρξης της παρατήρησής μας, με τον ρυθμό που φαίνεται στο γράφημα.

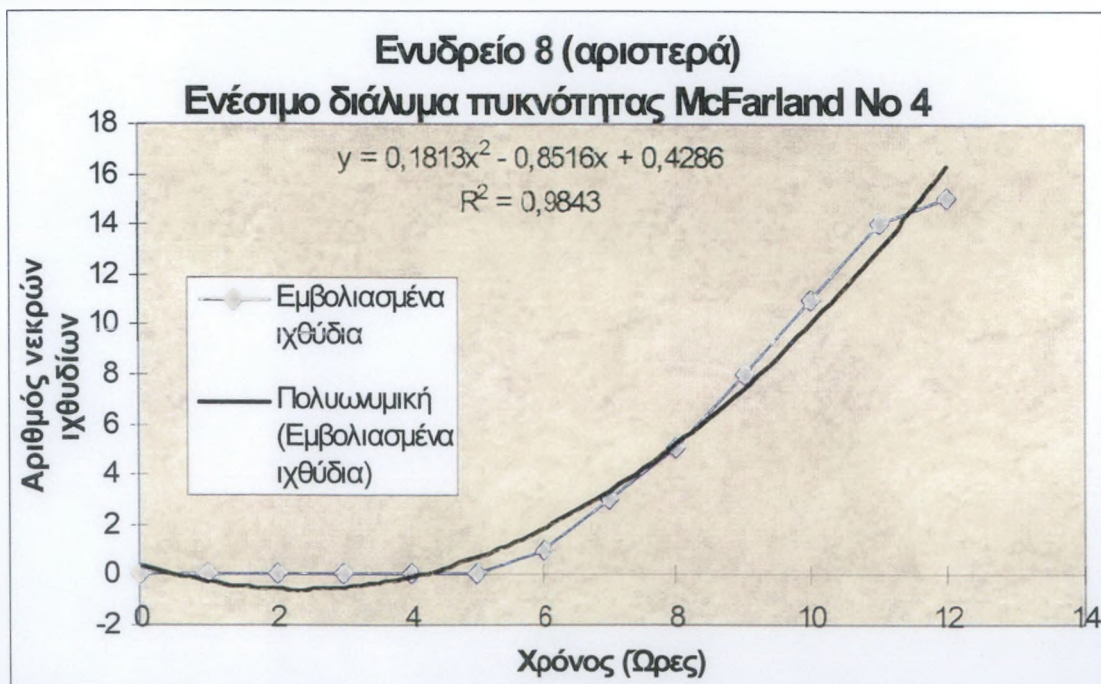
	Εμβολιασμένα άτομα
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	3
8	5
9	8
10	11
11	14
12	15



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 0
- Ώρα έναρξης (0) =13:30

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση τάσης και την εξίσωση που την διέπει.

	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	1
7	3
8	5
9	8
10	11
11	14
12	15

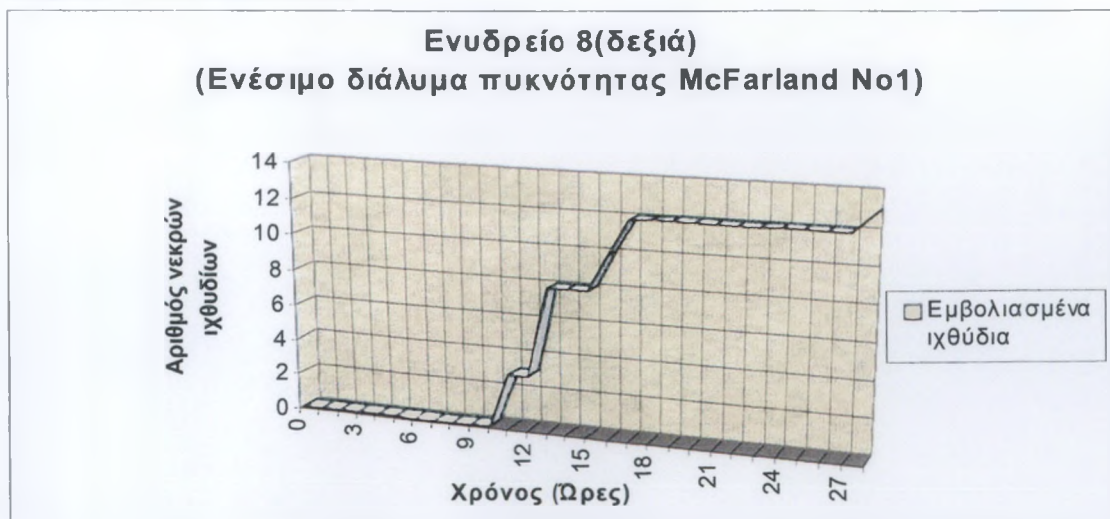


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 0
- Ωρα έναρξης (0) = 13:30

ΕΝΥΔΡΕΙΟ 8 (ΔΕΞΙΑ)

Τα αποτελέσματα του ενυδρείου αυτού συμβαδίζουν και έτσι επιβεβαιώνουν και αυτά του ενυδρείου 7. Παρατηρήσαμε την ίδια παρατεταμένη, συγκριτικά πάντα, βιωσιμότητα των ιχθυδίων που χρονικά είναι υπερδιπλάσια αυτής των άλλων ενυδρείων.

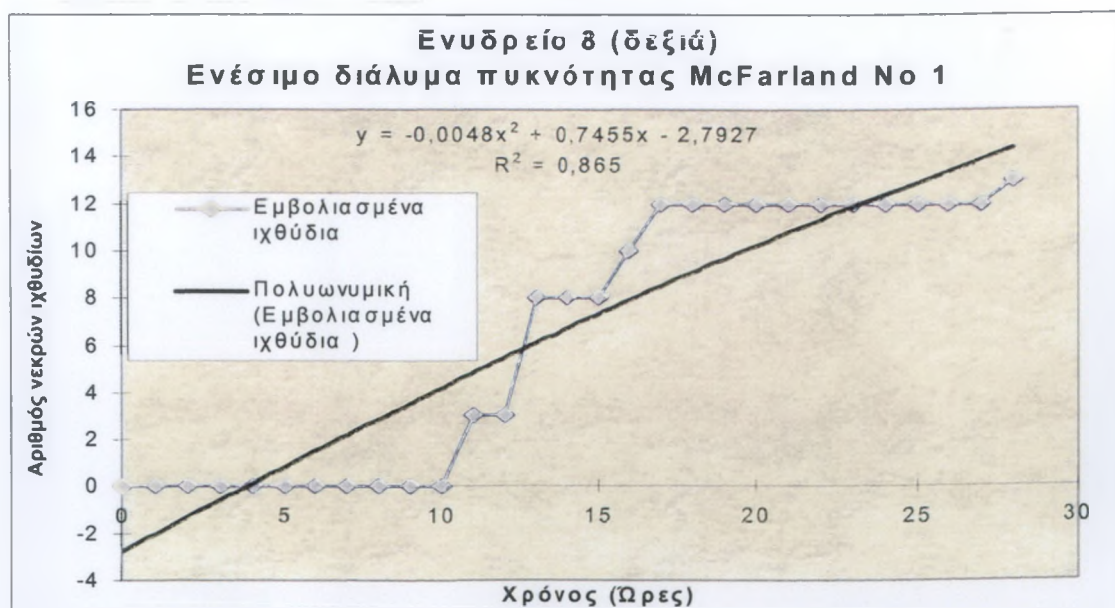
	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	3
12	3
13	8
14	8
15	8
16	10
17	12
18	12
19	12
20	12
21	12
22	12
23	12
24	12
25	12
26	12
27	12
28	13



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 1
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30. Ένα ιχθύδιο ζει ακόμη.

Το δεύτερο γράφημα μας δείχνει την εξίσωση τάσης και την εξίσωση που την διέπει.

	Εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	3
12	3
13	8
14	8
15	8
16	10
17	12
18	12
19	12
20	12
21	12
22	12
23	12
24	12
25	12
26	12
27	12
28	13

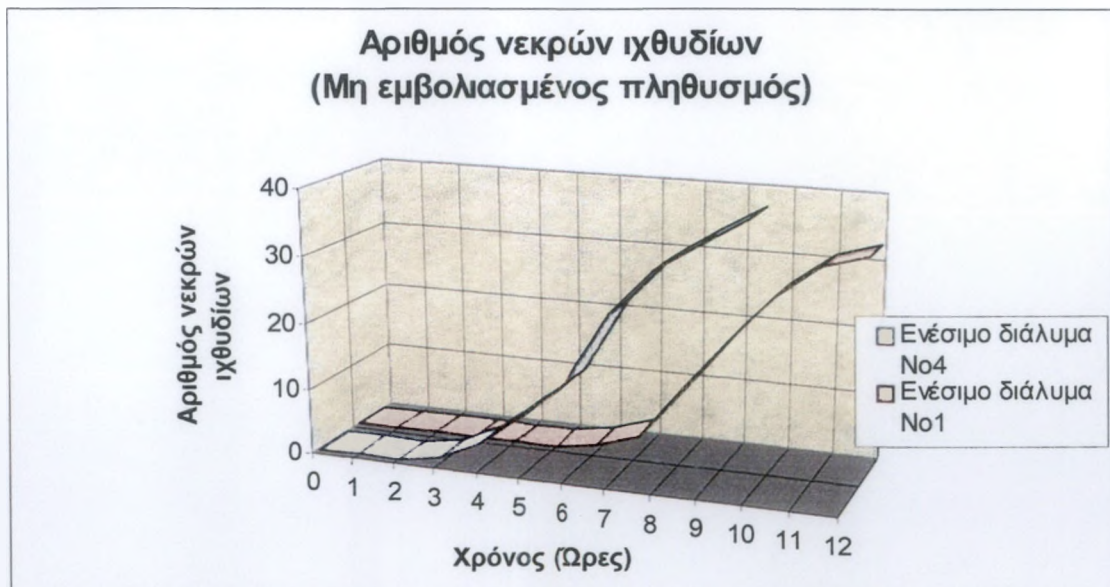


- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών = 1
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30.
- Ένα ιχθύδιο ζει ακόμη

Τα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί αποτελούν τα συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων πληθυσμών ιχθυδίων στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No1 και No4.

Στον μη εμβολιασμένο πληθυσμό παρατηρούμε πως η ολική θνησιμότητα στα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε το ενέσιμο διάλυμα με τη μικρότερη πυκνότητα βακτηρίων επέρχεται μόλις δύο ώρες αργότερα από την χρονική στιγμή στην οποία απεβίωσαν όλα τα ιχθύδια τα οποία είχα δεχθεί την μεγαλύτερη ποσότητα βακτηρίων. Παρατηρούμε επίσης πως η κλίση των διαγραμμάτων είναι παρόμοια, κάτι που φανερώνει πως ο ρυθμός του θανάτου των ιχθυδίων είναι σχεδόν ο ίδιος.

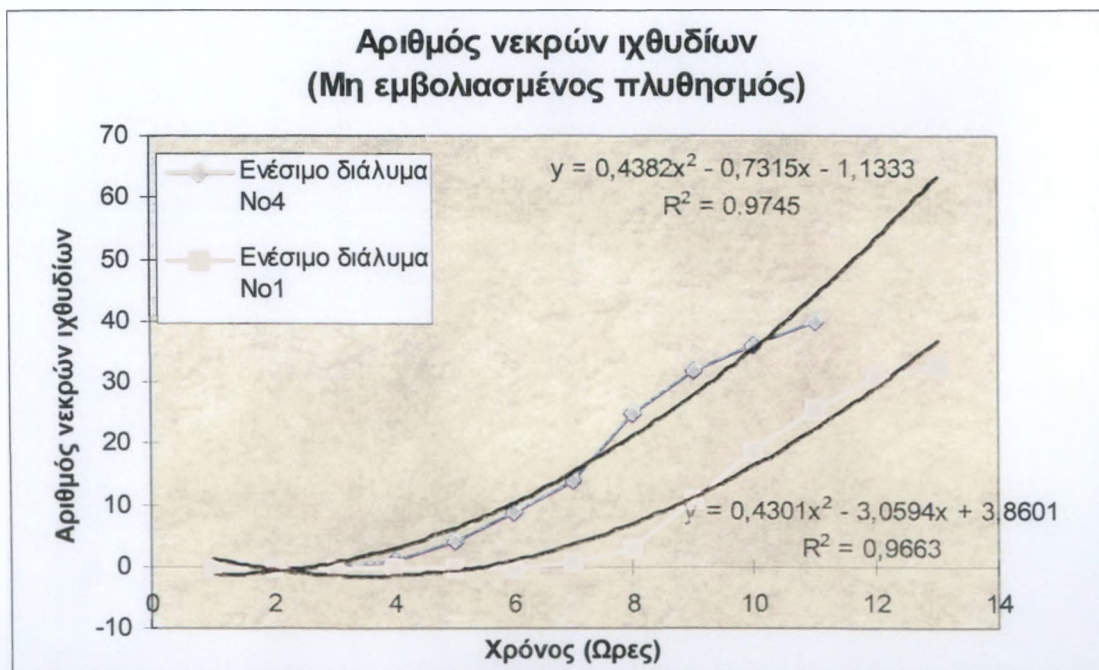
	Ενέσιμο διάλυμα No4	Ενέσιμο διάλυμα No1
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	1	0
4	4	0
5	9	0
6	14	1
7	25	3
8	32	11
9	36	19
10	40	26
11		31
12		33



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών: Από το ενέσιμο διάλυμα No4 = 5, από το ενέσιμο διάλυμα No1 = 12.
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

Ακολουθεί το σχεδιάγραμμα στο οποίο φαίνονται συγκριτικά οι γραφικές παραστάσεις και οι εξισώσεις των τάσεων που τις διέπουν.

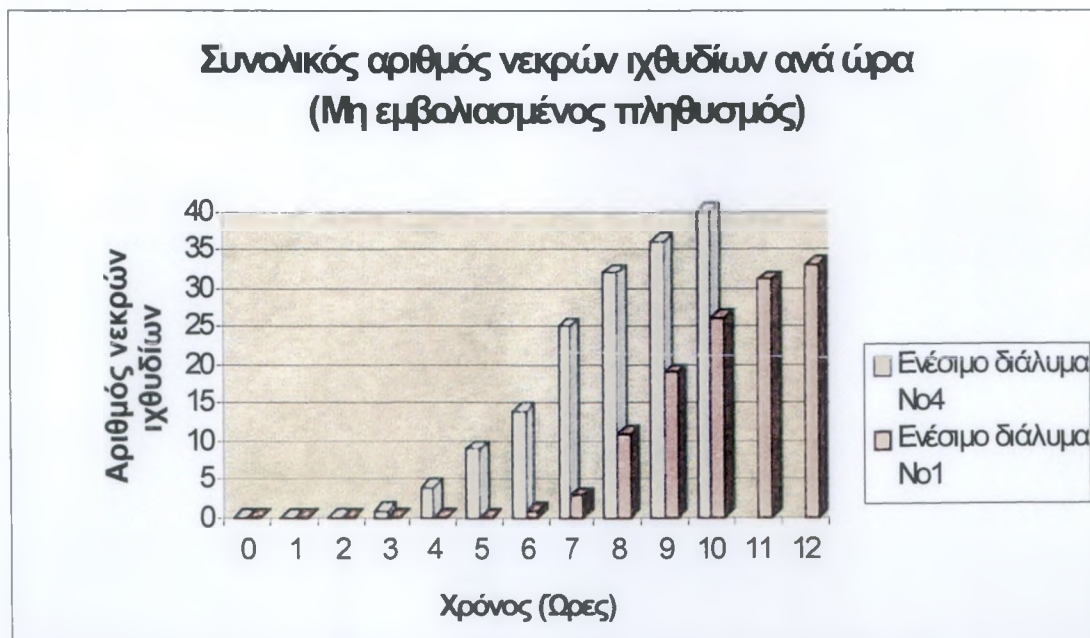
	Ενέσιμο διάλυμα Νο4	Ενέσιμο διάλυμα Νο1
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	1	0
5	4	0
6	9	0
7	14	1
8	25	3
9	32	11
10	36	19
11	40	26
12		31
13		33



- Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών :Από το ενέσιμο διάλυμα Νο4 = 5,από το ενέσιμο διάλυμα Νο1 = 12
- Ώρα έναρξης (0) =13:30

Το ιστόγραμμα που ακολουθεί μας δίνει μια αναλυτική σύγκριση των θνησιμοτήτων ανά ώρα. Αναφαίρεται σε δύο ομάδες ιχθυδίων που δεν έχουν εμβολιαστεί, στα οποία όμως έχει χορηγηθεί η μεγάλη συγκέντρωση και η μικρή συγκέντρωση βακτηρίων αντιστοίχα.

	Ενέσιμο διάλυμα Νο4	Ενέσιμο διάλυμα Νο1
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	1	0
4	4	0
5	9	0
6	14	1
7	25	3
8	32	11
9	36	19
10	40	26
11		31
12		33

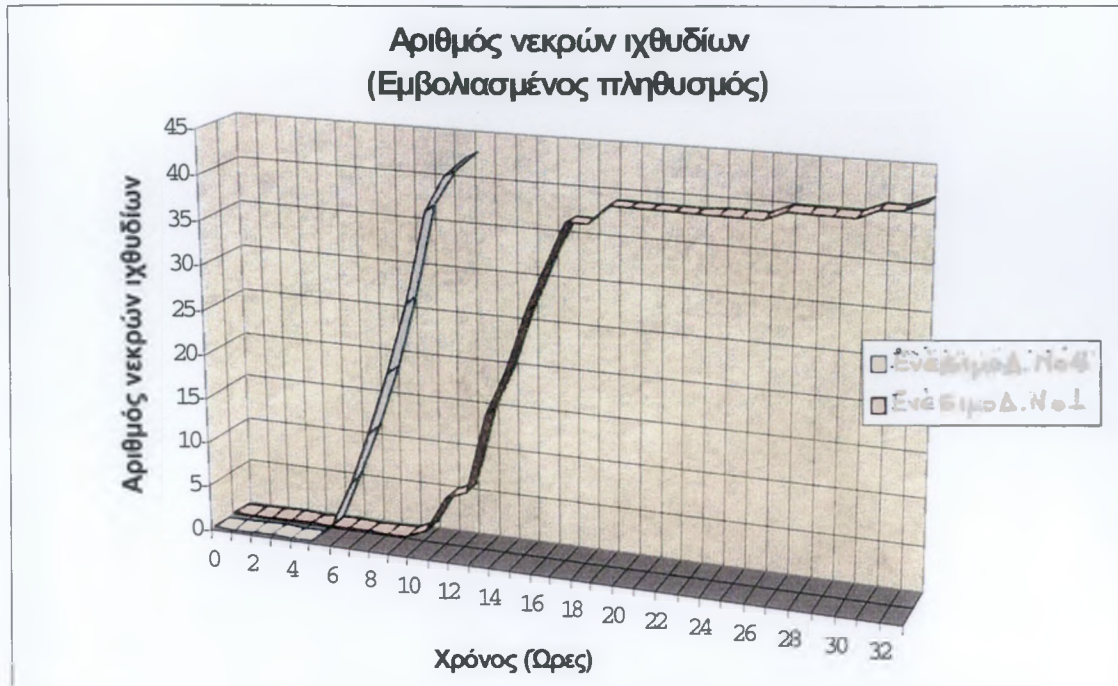


Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών:

- Από το ενέσιμο διάλυμα Νο4 = 5
- Από το ενέσιμο διάλυμα Νο1 = 12
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

Το διάγραμμα αυτό παρουσιάζει τις διαφορές στη θνησιμότητα εμβολιασμένων ιχθυδίων στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας Νο1 και Νο4. Εύκολα παρατηρούμε πως η ολική θνησιμότητα για τα ιχθύδια με την μικρότερη χορηγηθείσα ποσότητα βακτηρίων επέρχεται στο τριπλάσιο χρονικό διάστημα σε σχέση με αυτή των ιχθυδίων με την μεγαλύτερη χορηγηθείσα ποσότητα βακτηρίων. Παρατηρούμε δηλαδή μια παρατεταμένη αντοχή των ιχθυδίων αυτών.

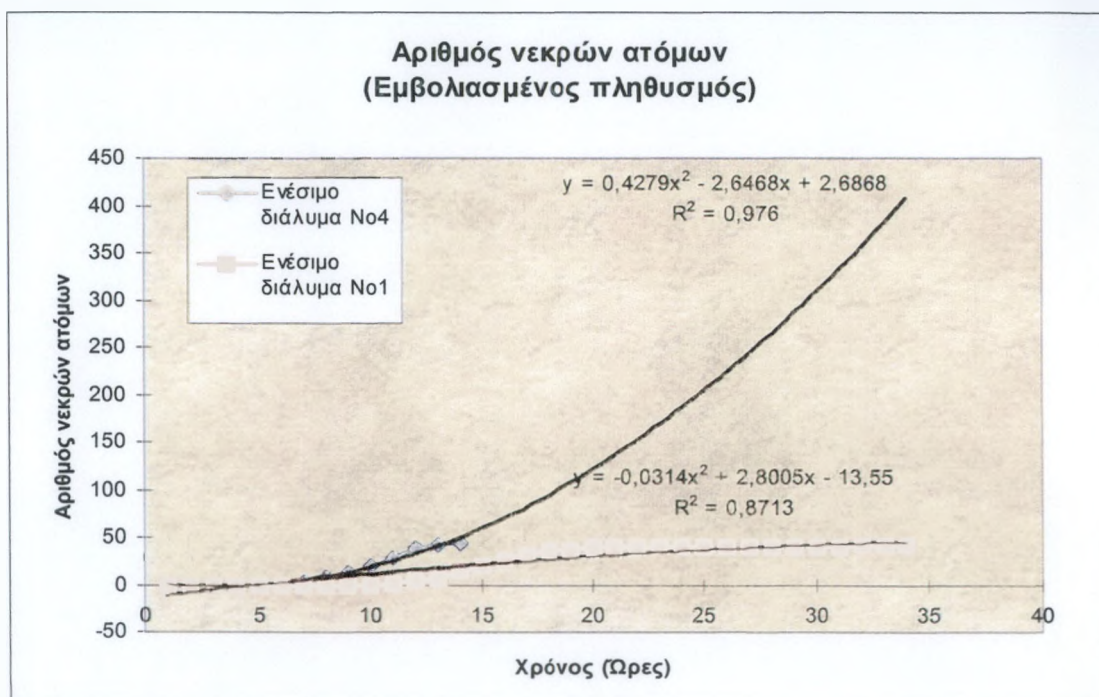
	Ενέσιμο διάλυμα Νο4	Ενέσιμο διάλυμα Νο1
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	2	0
7	7	0
8	13	0
9	20	0
10	28	1
11	38	5
12	42	6
13	44	15
14		20
15		27
16		32
17		37
18		37
19		39
20		39
21		39
22		39
23		39
24		39
25		39
26		39
27		40
28		40
29		40
30		40
31		41
32		41
33		42



Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών :

- Με το ενέσιμο διάλυμα Νο4 = 1
- Με το ενέσιμο διάλυμα Νο1 = 2
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30
- Ένα άτομο από αυτά με το ενέσιμο διάλυμα Νο1 ζει ακόμη.

Η εξίσωση των τάσεων των δύο γραφημάτων είναι πολύ ενδιαφέρουσα και αυτό γιατί μας υποδεικνύει για έναν πολύ μεγαλύτερο αριθμό ιχθυδίων την πορεία των γραφημάτων, και έτσι παρατηρούμε την χαρακτηριστική διαφορά αυτών. Μια πορεία που δηλώνει πως η θνησιμότητα των ιχθυδίων στα οποία χορηγήθηκε η μικρότερη ποσότητα βακτηρίων από ένα σημείο και μετά σταθεροποιείται και δεν αυξάνει άλλο, ενώ αντίθετα στα άλλα ιχθύδια παρατηρούμε μια εκθετική αύξηση της θνησιμότητας σε έναν υποθετικά μεγάλο πληθυσμό.

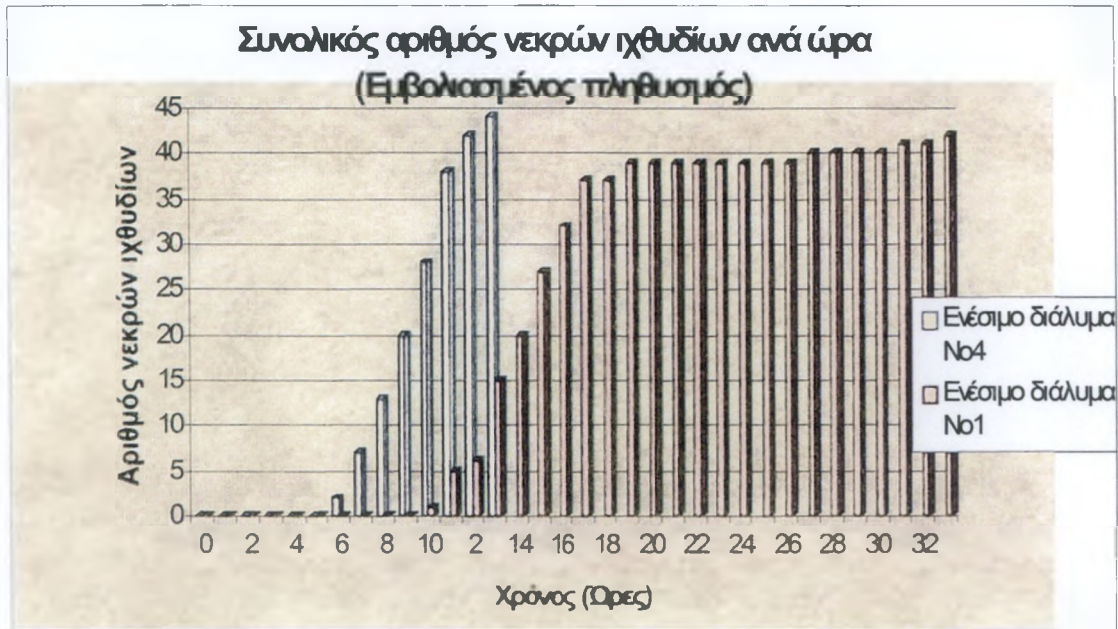


Αριθμός νεκρών ιχθυδίων λόγω χειρισμών:

- Από το ενέσιμο διάλυμα Νο4 = 1
- Από το ενέσιμο διάλυμα Νο1 = 2
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30
- Ένα άτομο από αυτά με το ενέσιμο διάλυμα Νο1 ζει ακόμη.

Στα συγκριτικά ιστογράμματα που ακολουθούν παρατηρούμε πως 10 ώρες μετά τις ενδοπεριτοναϊκές εκχύσεις, τα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε το ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No4 παραπάνω από τα μισά έχουν πεθάνει (28/44), ενώ στα ιχθύδια με το διάλυμα McFarland No1 έχουμε μόλις ένα νεκρό.

Τρεις ώρες αργότερα, στην πρώτη κατηγορία ιχθυδίων που αναφερθήκαμε όλα τα ιχθύδια βρίσκονται νεκρά ενώ στην δεύτερη κατηγορία ιχθυδίων το ίδιο χρονικό διάστημα έχουμε το 1/3 του πληθυσμού νεκρό και η ολική θανάτωση του πληθυσμού επέρχεται μετά το πέρας της 33^{ης} ώρας από την ώρα έναρξης της παρατήρησής μας.



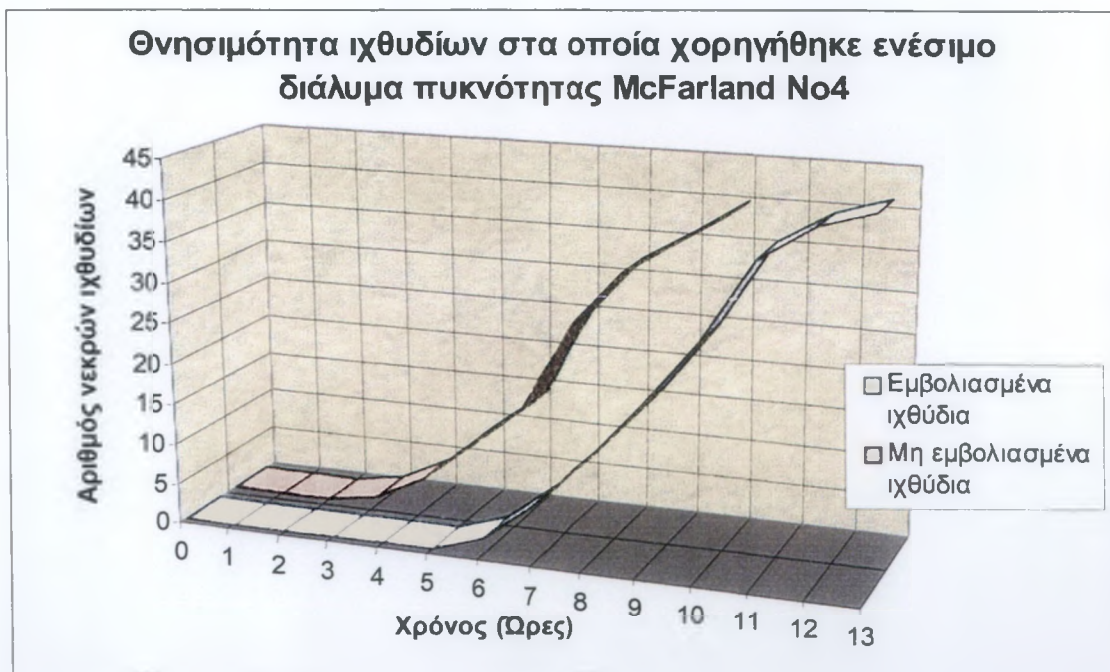
Αριθμός νεκρών ατόμων λόγω χειρισμών :

- Από το ενέσιμο διάλυμα No4 = 1
- Από το ενέσιμο διάλυμα No1 = 2
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30
- Ένα άτομο από αυτά με το ενέσιμο διάλυμα No1 ζει ακόμη.

Τα παρακάτω γραφήματα αποτελούν την συγκριτική παρουσίαση των εμβολιασμένων έναντι των μη εμβολιασμένων ιχθυδίων.

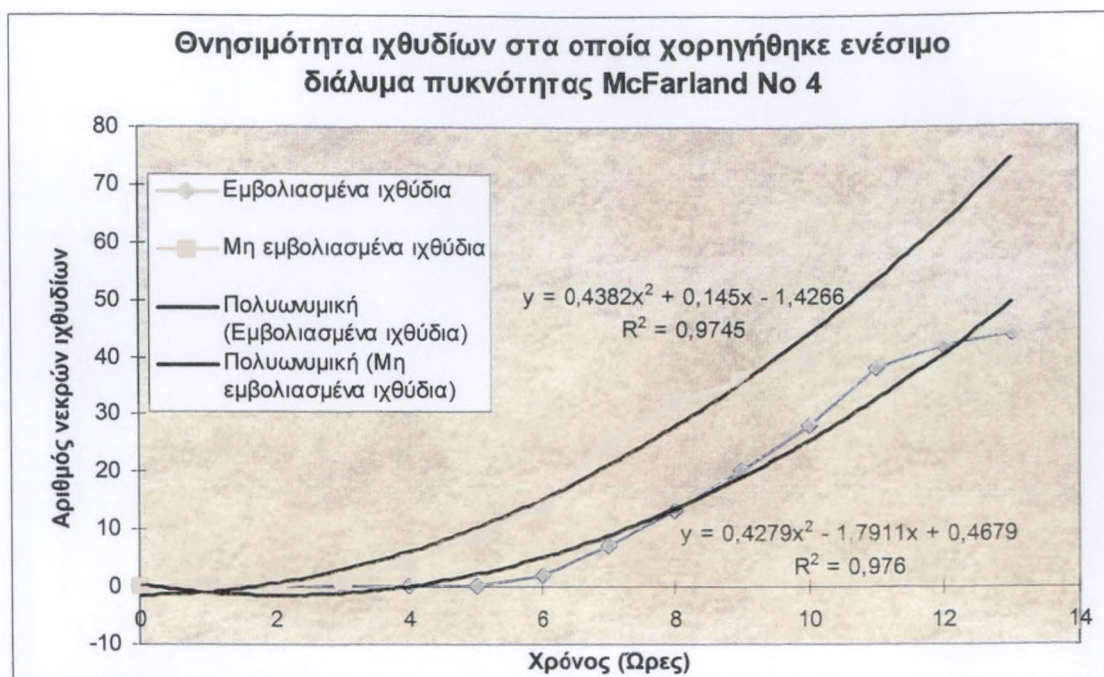
Πρώτα θα σχολιάσουμε την κατηγορία αυτή των ιχθυδίων στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No4.

	Εμβολιασμένα ιχθύδια	Μη εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	1
4	0	4
5	0	9
6	2	14
7	7	25
8	13	32
9	20	36
10	28	40
11	38	
12	42	
13	44	



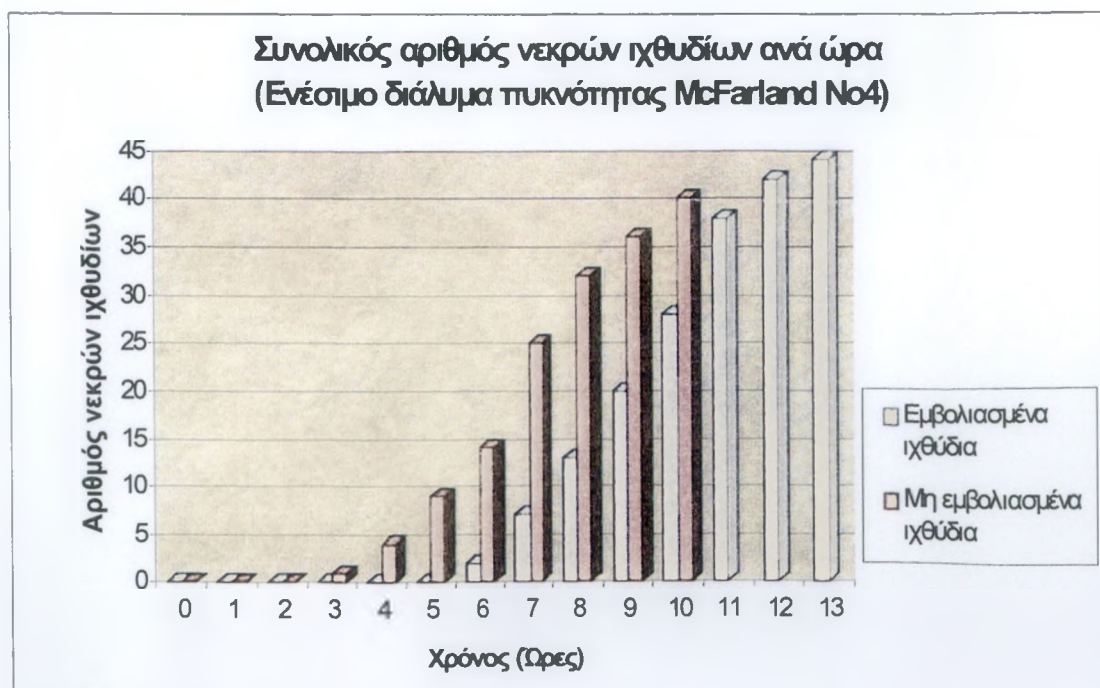
Απώλειες λόγω χειρισμών:

- Εμβολιασμένα ιχθύδια = 2
- Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 5
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30



Απώλειες λόγω χειρισμών:

- Εμβολιασμένα ιχθύδια = 1
- Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 5. Ώρα έναρξης (0) = 13:30



Απώλειες λόγω χειρισμών:

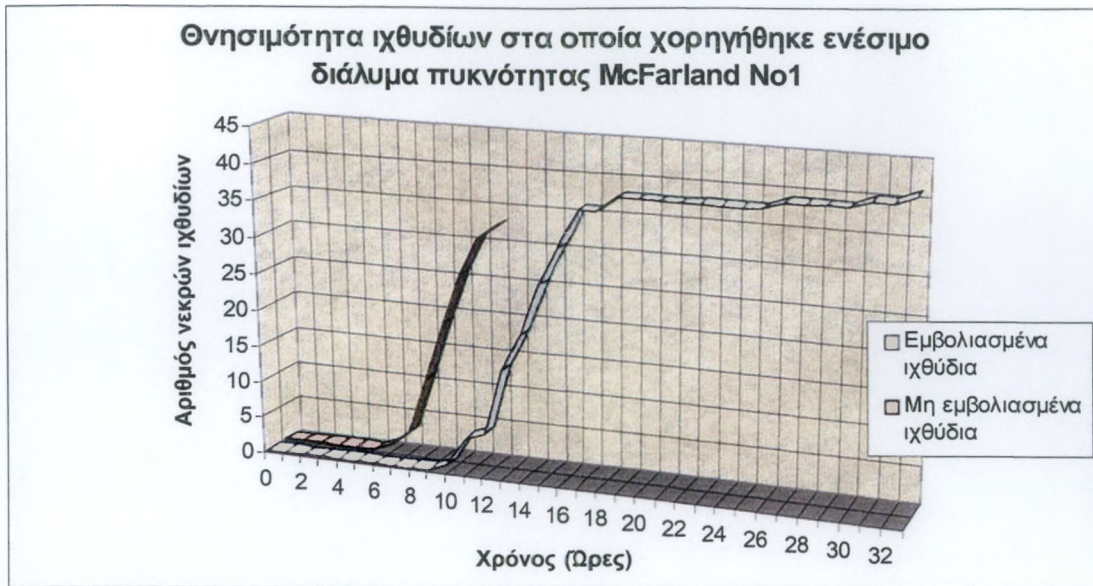
- Εμβολιασμένα ιχθύδια = 1
- Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 5
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30

Παρατηρήσαμε λοιπόν πως σε όλα τα παραπάνω σχεδιαγράμματα φαίνεται πως ο ρυθμός της θνησιμότητας είναι ο ίδιος και ότι η μόνη διαφορά είναι ότι στα εμβολιασμένα ιχθύδια η ολική θνησιμότητα επέρχεται μόνο τρεις ώρες αργότερα. Η εξίσωση των τάσεων αναδεικνύει την ομοιότητα των δύο αυτών γραφημάτων και την επιβεβαίωση του ισχυρισμού πως καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών δεν εμφανίζεται. Στο ιστόγραμμα που εμφανίζει συγκριτικά την θνησιμότητα των δύο πληθυσμών, η μόνη παραπάνω πληροφορία που μας δίνεται είναι πως σε κάθε ώρα ο αριθμός των νεκρών εμβολιασμένων ιχθυδίων είναι κατά το 1/3 μικρότερος του αριθμού των νεκρών μη εμβολιασμένων ιχθυδίων. Ενδεικτικά αναφέρουμε:

	<u>Νεκρά:</u>	<u>Εμβολιασμένα</u>	<u>Μη εμβολιασμένα</u>
7 ^η ώρα παρατήρησης:		7	25
8 ^η ώρα παρατήρησης:		13	32

Συνεχίζουμε με τα γραφήματα που αφορούν την θνησιμότητα εμβολιασμένων και μη ιχθυδίων στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα πυκνότητας McFarland No1.

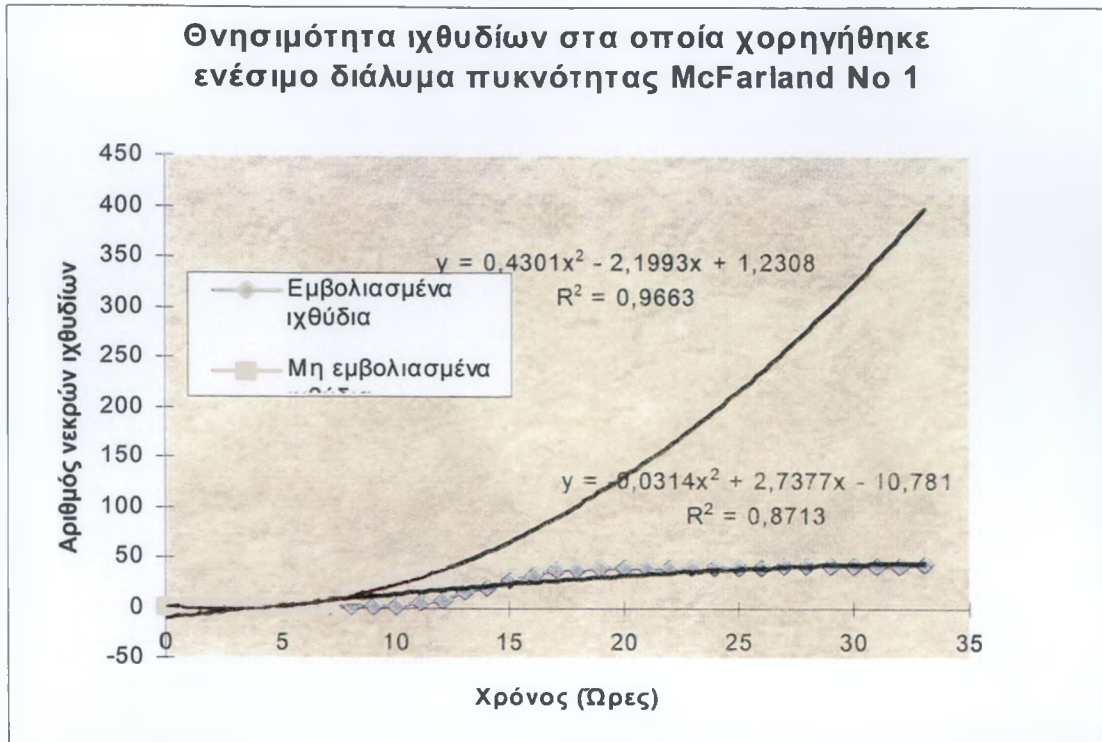
	Εμβολιασμένα ιχθύδια	Μη εμβολιασμένα ιχθύδια
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	1
7	0	3
8	0	11
9	0	19
10	1	26
11	5	31
12	6	33
13	15	
14	20	
15	27	
16	32	
17	37	
18	37	
19	39	
20	39	
21	39	
22	39	
23	39	
24	39	
25	39	
26	39	
27	40	
28	40	
29	40	
30	40	
31	41	
32	41	
33	42	



Απώλειες λόγω χειρισμών :

- Εμβολιασμένα ιχθύδια = 2
- Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 12
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30
- Ένα από τα εμβολιασμένα ζει ακόμη.

Το παραπάνω γράφημα φανερώνει την τεράστια διαφορά μεταξύ των εμβολιασμένων και μη ιχθυδίων για αυτήν την πυκνότητα βακτηρίων. Παρατηρούμε πως η ολική θνησιμότητα επέρχεται σε τριπλάσιο χρόνο στα εμβολιασμένα ιχθύδια απ' ότι στα μη εμβολιασμένα, ενώ η εξίσωση των τάσεων και η γραφική απεικόνισή τους για έναν υποθετικά μεγάλο πληθυσμό που ακολουθεί, δείχνει πως ενώ για τα μη εμβολιασμένα ιχθύδια έχουμε μια εκθετική αύξηση της θνησιμότητας, για τα εμβολιασμένα ιχθύδια παρατηρούμε πως η θνησιμότητα περιορίζεται σε λιγότερα από 50 άτομα και σταθεροποιείται. Τα συγκριτικά ιστογράμματα εκφράζουν καλύτερα την διαφορά μεταξύ εμβολιασμένων και μη ιχθυδίων αφού φαίνεται πως 10 ώρες μετά την έναρξη της παρατήρησής μας, ο μη εμβολιασμένος πληθυσμός είναι νεκρός κατά τα 2/3 του, ενώ στον εμβολιασμένο πληθυσμό έχουμε μόνο μία απώλεια. Δύο ώρες αργότερα όπου όλα τα μη εμβολιασμένα βρίσκονται νεκρά, στα εμβολιασμένα έχουμε μόνο 6 απώλειες. Η ολική θνησιμότητα έρχεται 31 ώρες αργότερα από την ώρα 0.



Απώλειες λόγω χειρισμών :

- Εμβολιασμένα ιχθύδια = 2
- Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 12
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30. Ένα από τα εμβολιασμένα ιχθύδια ακόμη ζει.



- Απώλειες λόγω χειρισμών : Εμβολιασμένα ιχθύδια = 2, Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 12. Ώρα έναρξης 13:30. Ένα από τα εμβολιασμένα ακόμη ζει.

3.2 2ος ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Μετά το τέλος του πειραματικού μέρους της πτυχιακής μας εργασίας, είχαμε αποκομίσει σημαντικές γνώσεις, τόσο γενικές όσο και ειδικές που σχετίζονται με τις ανάγκες του πειράματος. Έτσι λοιπόν αφού η εμπειρία πλέον υπήρχε αποφασίσαμε να συνεχίσουμε το πειράμα μας χρησιμοποιώντας δύο ακόμα συγκεντρώσεις βακτηρίων, πολύ μικρότερες όμως αυτή την φορά.

3.2.1 Εγκλιματισμός

Γι' αυτόν τον σκοπό μετά την ευγενική χορηγία της εταιρίας ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε. υδατοκαλλιέργειες Χίου υπ/μα Χιλιαδού Δωρίδος, μεταφέραμε 180 ιχθύδια λαβρακιού μέσου βάρους 2,5 gr στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου ιχθυολογίας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου.

Η μεταφορά και ο εγκλιματισμός έγινε με τον τρόπο που περιγράψαμε αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο (βλ. Παρ. 2,5) έχοντας 100 % επιβίωση και στα δύο στάδια. Έτσι λοιπόν διατηρήσαμε σε δύο ενυδρεία των 35 lt από 35 ιχθύδια και σε δύο ενυδρεία των 40 lt από 40 ιχθύδια ενώ ένα ενυδρείο με 30 ιχθύδια αποτελούσε τον μάρτυρά μας.

3.2.2 Εμβολιασμός ιχθυδίων

Στις 11/4/98 και αφού είχαν περάσει 10 ημέρες από τον εγκλιματισμό των ιχθυδίων προχωρήσαμε στον εμβολιασμό των ιχθυδίων. Όπως και την προηγούμενη φορά έτσι και τώρα μετά την ευγενική χορηγία του εμβολίου (Vibrogen 2), από την εταιρία Vet-Care προχωρήσαμε στον εμβολιασμό των ιχθυδίων ακολουθώντας ακριβώς την ίδια μέθοδο όπως αυτή περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.7.

Μετά το πέρας 315 βαθμοημερών, δηλαδή 15 ημερών με σταθερή θερμοκρασία 21C από την ημέρα που έγινε ο εμβολιασμός ξεκινήσαμε όλες τις απαιτούμενες προετοιμασίες για την χορήγηση του βακτηρίου.

3.2.3 Ταυτοποίηση βακτηρίου

Το βακτήριο μετά από 24 h καλλιέργεια ταυτοποιήθηκε με βάση τα παρακάτω αποτελέσματα ως *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1.

- Δοκιμή κινητικότητας +
- Χρώση Gram -
- Αναπτύσσονται κίτρινες καλλιέργειες σε TCBS
- Οξειδάση +
- Καταλάση +
- O/F ζημωτικό
- Δοκιμή ευαισθησίας στο βιμπριοστατικό O/129 (S)
- Στο API 20E το βακτήριο ταυτοποιήθηκε με τον αριθμό 3047524
- Δοκιμή οροσυγκόλλησης +

3.2.4 Υλικά και μέθοδοι

Η 26/4 ήταν η ημέρα των ενδοπαιριτωναϊκών εκχύσεων. Αρχικά κάναμε μια δοκιμή κινητικότητας από την καλλιέργεια των 24 h του βακτηρίου για να πιστοποιήσουμε πως τα βακτήρια είναι ζωντανά.

Στην συνέχεια δημιουργήσαμε ένα διάλυμα φυσιολογικού ορού 2% NaCl και αποικιών του βακτηρίου. Γνωρίζουμε πως στην κλίμακα McFarland το διάλυμα που χαρακτηρίζεται ως 0,5 έχει πυκνότητα ακριβώς 0,545 και αντιστοιχεί σε 150×10^6 c.f.u. / ml (colonies forming units).

Με την βοήθεια ενός νεφελομέτρου μετρήσαμε την πυκνότητα του διαλύματος που δημιουργήσαμε. Η ένδειξη που πήραμε ήταν 0,560 την οποία και κρίναμε ως ικανοποιητική, γιατί προσεγγίζει την πυκνότητα του πρότυπου McFarland 0,5 του οποίου γνωρίζουμε την συγκέντρωση. Γνωρίζουμε λοιπόν πως στο διάλυμά μας έχουμε τουλάχιστον 150×10^6 c.f.u./ml .

Στην συνέχεια προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση δεκαδικών αραιώσεων του αρχικού διαλύματος, με αποτέλεσμα στην δεύτερη αραιώση να έχουμε 150×10^4 c.f.u./ml και στην τρίτη 150×10^3 c.f.u./ml

Η ποσότητα που χορηγήσαμε στα ιχθύδια με την βοήθεια ένεσης ινσουλίνης, ενδοπαιριτοναϊκά ακολουθώντας την ίδια μέθοδο όπως περιγράφουμε αναλυτικά στην παρ. 2.9.2 ήταν 0,1 ml . Δηλαδή τελικά η συγκέντρωση των βακτηρίων που δέχθηκαν τα ιχθύδια χρησιμοποιώντας την δεύτερη αραιώση ήταν 15000 c.f.u. / ιχθύδιο, ενώ χρησιμοποιώντας την τρίτη αραιώση ήταν 1500 c.f.u. / ιχθύδιο.

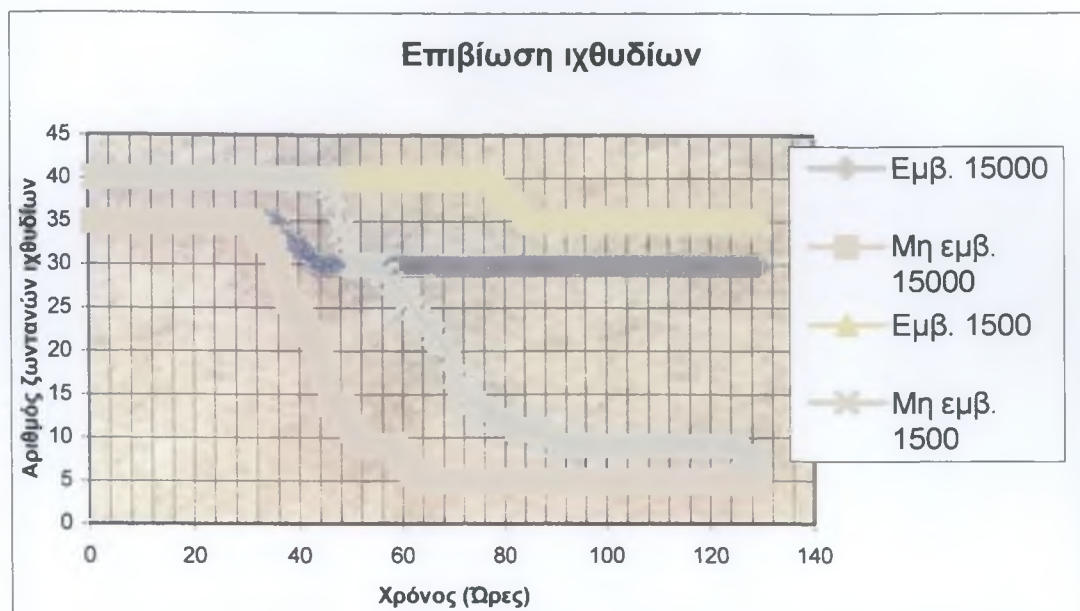
Ταυτόχρονα με την πραγματοποίηση των δεκαδικών αραιώσεων κάναμε καλλιέργειες σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA με 0,1 ml από την κάθε αραιώση. Με αυτόν τον τρόπο καταμετρήσαμε μετά από 24 h τις αποικίες που αναπτύχθηκαν και επιβεβαιώσαμε πως ο αριθμός των βακτηρίων που χορηγήσαμε ταιριάζει με τον μαθηματικό υπολογισμό μας.

Η διαδικασία των ενδοπαιριτωναϊκών εκχύσεων ξεκίνησε στις 14:30 και τελίωσε στις 16:00, ώρα που αποτέλεσε τον χρόνο έναρξης της παρατήρησής μας. Το χρονικό διάστημα της παρατήρησής μας ήταν 6 ημέρες δίνοντάς μας τα παρακάτω αποτελέσματα.

Μετά από κάθε απώλεια ιχθυδίων κάναμε ταυτοποίηση του θνησογόνου παράγοντα, και κάθε φορά προέκυπτε το βακτήριο που είχαμε αρχικά χορηγήσει.

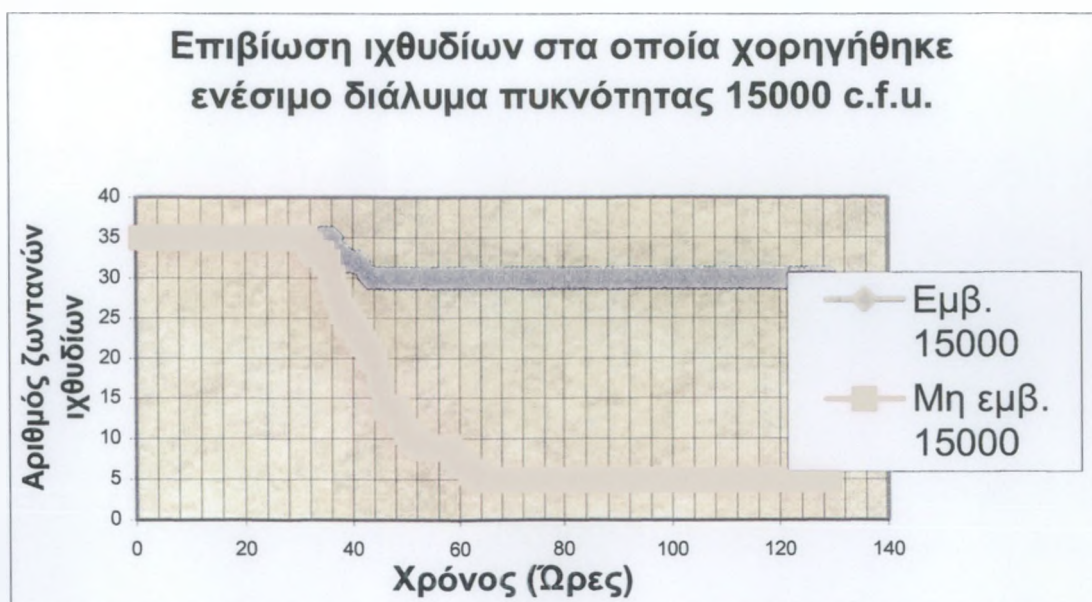
3.2.5 Αποτελέσματα

Χρόνος	Εμβ. 15000	Μη εμβ. 15000	Εμβ. 1500	Μη εμβ. 1500
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

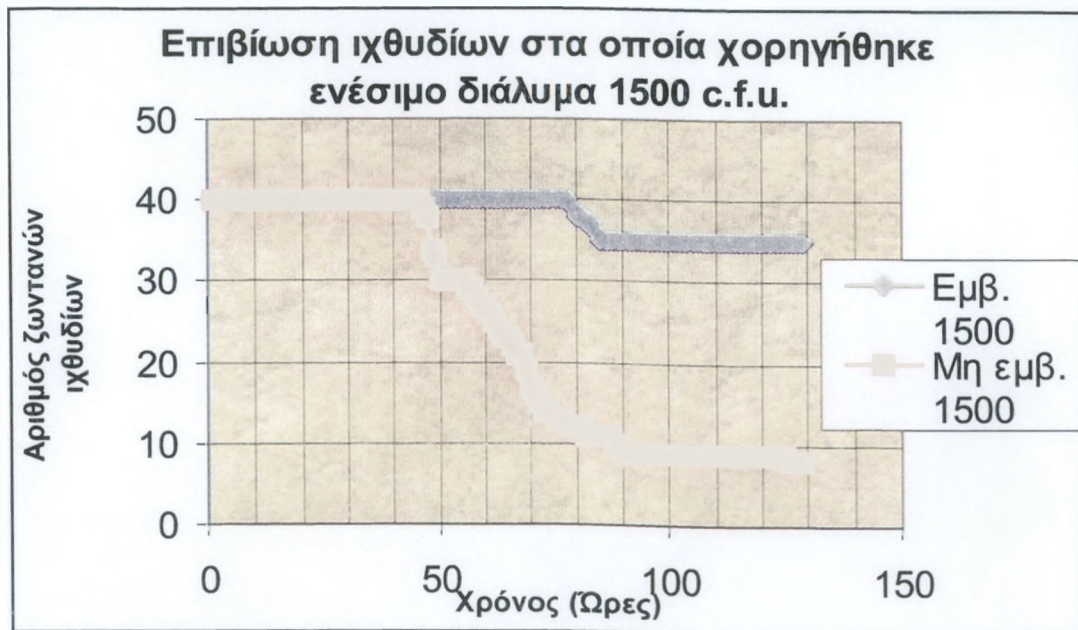


Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ο αριθμός των ιχθυδίων που διαβιώνουν σε σχέση με τον χρόνο παρατήρησης. Όπως παρατηρούμε σε μια σύγκριση των εμβολιασμένων ιχθυδίων των δύο ομάδων βλέπουμε πως έχουν σχεδόν την ίδια θνησιμότητα με την μόνη διαφορά πως αυτή ξεκινά με μια διαφορά 43ων ωρών στα εμβολιασμένα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε ποσότητα βακτηρίων 15000 c.f.u.

Αντίστοιχα στους πληθυσμούς των μη εμβολιασμένων ιχθυδίων παρατηρούμε την ίδια συμπεριφορά ως αναφορά την θνησιμότητα, με μια διαφορά 14 ωρών.



Σε αυτό το διάγραμμα παρατηρούμε τη διαφοροποίηση στην επιβίωση μεταξύ των εμβολιασμένων ιχθυδίων και μη, στα οποία χορηγήθηκε ενέσιμο διάλυμα 15000 c.f.u. .Οι θανάτοι στα εμβολιασμένα ιχθύδια ξεκινούν 5 ώρες αργότερα από τα μη εμβολιασμένα και περιορίζονται σε 5 άτομα, ενώ στα μη εμβολιασμένα φθάνουν στα 30 άτομα.



Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η διαφορά στην επιβίωση μεταξύ εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων ιχθυδίων, στα οποία χορηγήθηκε ποσότητα βακτηρίων 1500 c.f.u. .Εύκολα παρατηρούμε πως την στιγμή που αρχίζουν οι πρώτες θνησιμότητες στα εμβολιασμένα ιχθύδια (93η ώρα παρατήρησης), οι οποίες περιορίζονται σε 5 ιχθύδια, στο αντίστοιχο χρονικό διάστημα στα μη εμβολιασμένα ιχθύδια έχουμε ήδη 28 απώλειες και τελικά φθάνουν στα 32 άτομα.

3.2.6 Συμπεριφορά ιχθυδίων

Ημερ.	Εμβ.15000	Μη Εμβ.15000	Εμβ 1500	Μη Εμβ. 1500
26/4	Φυσιολογική συμπεριφορά	Φυσιολογική συμπεριφορά	Φυσιολογική συμπεριφορά	Φυσιολογική συμπεριφορά
27/4	Φυσιολογική συμπεριφορά Διατροφή φυσιολογική	16:00 Εμφάνιση απεκρίματος υπό την μορφή λευκής ίνας στα περισσότερα ιχθύδια. Ανορεξία Πρώτες απώλειες	Φυσιολογική συμπεριφορά. Διατροφή φυσιολογική.	23:30 Στροβιλισμός και πρόσκρουση των περισσότερων ιχθυδίων στον πυθμένα. Μερική ανορεξία.
28/4	Φυσιολογική συμπεριφορά Διατροφή φυσιολογική Πρώτες απώλειες	Μειωμένη κινητικότητα. Ανορεξία	Φυσιολογική συμπεριφορά. Διατροφή φυσιολογική	Εμφάνιση απεκρίματος υπό την μορφή λευκής ίνας. Πρώτες απώλειες
29/4	Φυσιολογική συμπεριφορά. Διατροφή φυσιολογική	(Εναπομείναντα ιχθύδια) αρχίζουν να διατρέφονται κανονικά Μειωμένη κινητικότητα	Φυσιολογική συμπεριφορά Διατροφή φυσιολογική (εκτός από λίγα) Πρώτες απώλειες	Νωχελική συμπεριφορά Μερική ανορεξία
30/4	Εναπομείναντα ιχθύδια Φυσιολογική συμπεριφορά και διατροφή	Εναπομείναντα ιχθύδια Φυσιολογική συμπεριφορά και διατροφή	Εναπομείναντα ιχθύδια Φυσιολογική συμπεριφορά και διατροφή	Εναπομείναντα ιχθύδια Φυσιολογική συμπεριφορά και διατροφή
1/5	ΚΑΜΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗ			

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αυτή η πτυχιακή εργασία πιστεύουμε πως αποτελεί μια πρωτοποριακή ερευνητική δουλειά όσον αφορά το πλαίσιο για το οποίο εκπονήθηκε αλλά και για την ελληνική επιστημονική κοινότητα που ασχολείται με τον χώρο της Ιχθυολογίας-Ιχθυοπαθολογίας. Επόμενο είναι λοιπόν κατά την εκπόνησή της να έγιναν και κάποια λάθη, δικαιολογημένα άλλωστε αφού δεν ακολουθήσαμε την πεπατημένη αλλά χαράξαμε τον δικό μας δρόμο. Στα λάθη όμως αυτά σταθήκαμε, τα εξετάσαμε από κοντά, τα διορθώσαμε και μαζί με την επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πειράματος, αποτελούν ένα σύνολο συμπερασμάτων στα οποία καταλήξαμε και τα οποία παραθέτουμε σ' αυτήν την ενότητα.

4.1. Εγκλιματισμός

Επειδή ο εγκλιματισμός και η πάχυνση ιχθυδίων λαβρακιού σε ενυδρεία ήταν κάτι πρωτοποριακό, αλλά και επειδή με κάτι τέτοιο δεν είχαμε ξανασχοληθεί, θεωρήσαμε πως πριν τον εγκλιματισμό του πληθυσμού των λαβρακιών με τον οποίο θα πειραματιζόμασταν, καλό θα ήταν να κάνουμε δοκιμαστικό εγκλιματισμό και πάχυνση λαβρακιών με άλλο πληθυσμό, έτσι ώστε να αποκτήσουμε την καλύτερη εμπειρία.

Αρκετές αποτυχημένες προσπάθειες εγκλιματισμού έγιναν μέχρι να πετύχουμε τον στόχο μας μέσα από τις οποίες συμπεράναμε πως για έναν επιτυχημένο εγκλιματισμό απαιτούνται κατ' αρχήν πολύ προσεκτικοί χειρισμοί κατά την παραλαβή και μεταφορά του πληθυσμού αφού το λαβράκι, σαν οργανισμός, χαρακτηρίζεται ως πολύ ευαίσθητος. Γι' αυτόν τον λόγο άλλωστε ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην θερμοκρασία και στην αλατότητα του νερού του δοχείου μεταφοράς και του νερού του ενυδρείου, παράμετροι που θα πρέπει να είναι ίδιες πριν την εισαγωγή των ιχθυδίων. Θα πρέπει εδώ να σημειώσουμε πως μετά από προσπάθειες εγκλιματισμού λαβρακιών, είναι δύσκολο αν όχι ακατόρθωτο να γίνει εγκλιματισμός σε τεχνητό θαλασσινό

νερό το οποίο δημιουργείται από αλάτι αλυκών και γλυκό νερό. Μια τέτοια προσπάθεια επιφέρει μια σταδιακή μακροχρόνια θνησιμότητα στον πληθυσμό, κάτι που μας ανάγκασε για το πείραμά μας να συλλέγουμε και να αποστειρώνουμε όγκους θαλασσινού νερού. Αυτή η δυσκολία εγκλιματισμού πιθανό είναι να οφείλεται στην έλλειψη ορισμένων ιχνοστοιχείων από το αλάτι των αλυκών, τα οποία όμως χρειάζονται τα ιχθύδια και βρίσκονται άφθονα στο θαλασσινό νερό.

Στην συνέχεια θα πρέπει να πούμε πως για ανώδυνους χειρισμούς χωρίς τραυματισμούς και απώλειες, καλό θα είναι τα ιχθύδια λίγο πριν την εισαγωγή τους στα ενυδρεία, να είναι υπό την επήρεια αναισθητικού.

Λόγω της μεγάλης κινητικότητας στον χώρο μπροστά από τα ενυδρεία παρατηρήσαμε πως τα ιχθύδια ήταν συνεχώς κάτω από stress. Αποφασίσαμε λοιπόν την κάλυψη της πρόσοψης των ενυδρείων μια ενέργεια που είχε σαν αποτέλεσμα τον καλύτερο εγκλιματισμό, συμπεριφορά και διατροφή των ιχθυδίων.

Ακολουθώντας τα παραπάνω πεποίθησή μας είναι πως ο εγκλιματισμός ιχθυδίων λαβρακιού, πλέον είναι κάτι εύκολο.

4.2. Διατροφή

Σκοπός μας ήταν όχι μόνο η διατροφή για την συντήρηση των ιχθυδίων, αλλά η διατροφή με σκοπό την πάχυνσή τους. Λόγο της αυξημένης ποσότητας τροφής που χορηγούσαμε σε ένα περιορισμένο χώρο με μη ανανεώσιμο νερό είχαμε σαν αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση αιωρούμενων σωματιδίων στην υδάτινη στήλη. Αυτό είχε σαν συνέπεια την επικόλλησή τους στα επιθηλιακά κύτταρα των βραγχίων των ιχθυδίων με κατάληξη τον θάνατό τους από ασφυξία λόγω δυσλειτουργίας των βραγχίων.

Καταλήξαμε λοιπόν στο συμπέρασμα πως για να επιτύχουμε τον σκοπό μας, τα γεύματα των ιχθυδίων θα πρέπει να ήταν πολλά (καταλήξαμε σε 6) με μικρές ποσότητες τροφής στο κάθε ένα, ενώ η χορήγηση της τροφής θα έπρεπε να είναι σταδιακά ανάλογη με την προθυμία και την όρεξη των ιχθυδίων. Με αυτόν τον τρόπο η συσσώρευση οργανικής ύλης στον πυθμένα του ενυδρείου ή στην υδάτινη στήλη είναι αδύνατη.

4.3 Το *Vibrio anguillarum* ορότυπος 1 ως πρόβλημα στις υδατοκαλλιέργειες.

Κατά την αναζήτηση του βακτηρίου ήρθαμε σε επαφή με πάνω από 20 μονάδες πάχυνσης την εποχή που η νόσος βρισκόταν σε έξαρση. Οι περισσότερες μονάδες δεν αντιμετώπιζαν κανένα πρόβλημα βιμπρίωσης ή υποστήριζαν πως κάτι τέτοιο συμβαίνει, αλλά και σε όσες εντοπίσαμε πρόβλημα, η απομόνωση και η ταυτοποίηση του παθογόνου παράγοντα μας υπέδειξε βακτήρια του είδους *Vibrio alginolyticus*.

Με βάση τα παραπάνω καταλήξαμε στο έμμεσο συμπέρασμα πως η πολιτική της πρόληψης έχει αποτέλεσμα. Είδαμε δηλαδή πως ο εμβολιασμός ενάντια στο *Vibrio anguillarum* αποδίδει αφού δεν βρήκαμε κρούσματα στο πεδίο που οφείλονται σ' αυτό. Παραδόξως όμως αυτό έδωσε την ευκαιρία σε άλλα είδη του γένους *Vibrio* να εξαπλωθούν και να αποτελέσουν τον παθογόνο παράγοντα της νόσου. Τα παραπάνω δεν σημαίνουν πως ο κόσμος των υδατοκαλλιεργειών απαλλάχθηκε από το πρόβλημα που ονομάζεται *Vibrio anguillarum*, αλλά πως είναι σωστή τακτική να προσπαθείς να προλαμβάνεις μια ασθένεια από να την καταπολεμάς.

4.4 Διατήρηση βακτηρίου

Από την μέρα που πέρασε στην κατοχή μας το βακτήριο έως την μέρα που το χρησιμοποιήσαμε, πέρασε αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα γεγονός που γνωρίζαμε εκ των προτέρων ότι θα συμβεί. Έτσι λοιπόν έπρεπε να βρούμε έναν τρόπο να διατηρήσουμε την καλλιέργειά μας. Αποφασίσαμε να πετύχουμε κάτι τέτοιο με τις συνεχείς και καθημερινές ανακαλλιέργειές του.

Αυτή η τακτική τελικά δεν αποδείχθηκε ικανοποιητική και αυτό γιατί τα βακτήρια από τις συνεχείς ανακαλλιέργειές τους, έχασαν κάποια πλασμίδια με αποτέλεσμα την διαφορετική αντίδρασή τους σε ορισμένα βιοχημικά χαρακτηριστικά. Εκτός αυτού ο κίνδυνος μιας επιμόλυνσης είναι υψηλός, σε περίπτωση που δεν τηρείται αυστηρά η διαδικασία ανακαλλιέργειας. Έτσι λοιπόν ως εναλλακτική λύση θα προτείναμε την καλλιέργειά του σε Nutrient agar, υπόστρωμα που επιτρέπει την ανάπτυξη του βακτηρίου μακροχρόνια

και με αυτόν τον τρόπο καθιστά την καλλιέργεια δυναμική, για τουλάχιστον ένα μήνα.

4.5 Ρυθμός ανάπτυξης

Ένα σημαντικό συμπέρασμα που έρχεται να τεκμηριώσει τις υποψίες των παραγωγών, προκύπτει από την σύγκριση των Μέσων Βαρών των διαφορετικών ομάδων ιχθυδίων του πειράματος. Στις 11/7 έγιναν μετρήσεις M.B. από τα ενυδρεία 1 και 3. Στο ενυδρείο Νο1 υπήρχαν μη εμβολιασμένα ιχθύδια τα οποία βρέθηκαν να έχουν M.B.: 2,24γρ. ενώ στο ενυδρείο Νο3 με τα εμβολιασμένα με VIBROGEN 2 ιχθύδια το M.B.: 2,52γρ. .

Παρατηρήθηκε δηλαδή μια διαφορά 0,3γρ. περίπου η οποία θα πρέπει να σημειώσουμε είναι σημαντική γι' αυτή την ηλικία. Γνωρίζοντας πως όλα τα ιχθύδια προήλθαν από τους ίδιους γεννήτορες και αναπτύσσονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες με το ίδιο πρόγραμμα διατροφής, έχοντας την μόνη διαφορά τον εμβολιασμό της μιας ομάδας, μπορούμε να καταλήξουμε μόνο σε ένα συμπέρασμα.

Στον κάθε οργανισμό μπορεί να υπάρχουν παθογόνοι μικροοργανισμοί που όμως εκδηλώνονται με χρόνια και ήπια πολλές φορές μορφή, χωρίς εμφάνιση συμπτωμάτων και χωρίς ύπαρξη απωλειών. Κάτι τέτοιο όμως για να γίνει, προϋποθέτει την συνεχή δημιουργία αντισωμάτων από τον οργανισμό και άρα την συνεχή κατανάλωση ενέργειας γι' αυτόν τον σκοπό. Η χορήγηση του εμβολίου ισχυροποιεί από νωρίς κατά τέτοιο τρόπο και σε τέτοιο βαθμό το ανοσοποιητικό σύστημα, έτσι ώστε ο οργανισμός να απαλλάσσεται οριστικά από τέτοιου είδους δευτερεύουσες παθήσεις και να διοχετεύει την καταναλισκόμενη ενέργεια υπό άλλη περίπτωση, στην ανάπτυξη.

Έτσι λοιπόν φαίνεται πως το εμβόλιο δημιουργεί πλεονεκτήματα περισσότερα απ' ότι λόγους για τους οποίους αρχικά ξεκίνησε η χορήγησή του.

4.6 Συμπεράσματα επί των αποτελεσμάτων

4.6.1 1ος πειραματικός έλεγχος

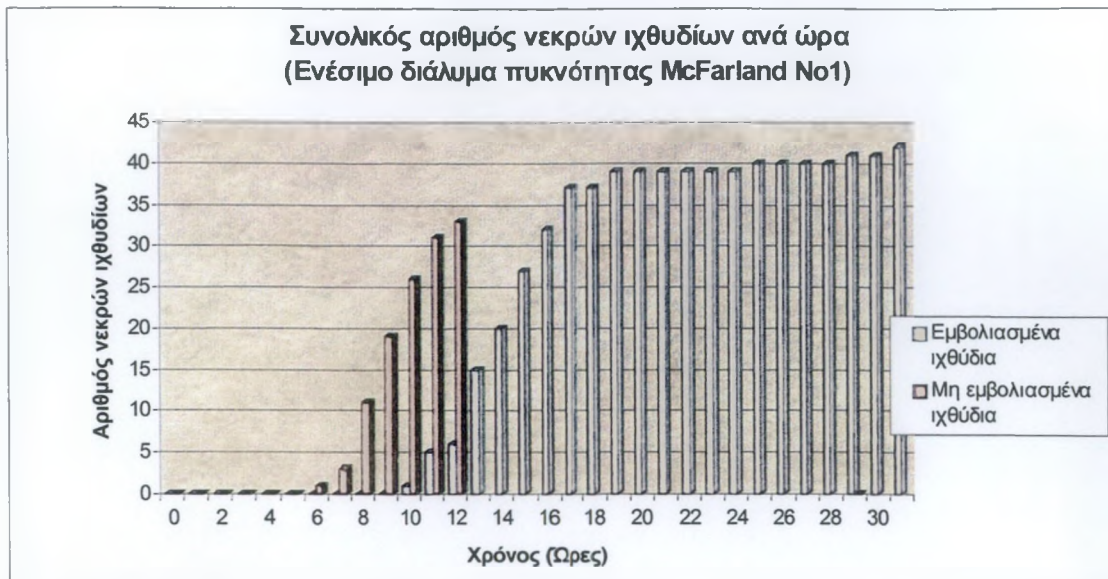
Στο προηγούμενο κεφάλαιο παραθέσαμε γραφικά τα αποτελέσματα και μέσα από την σύγκριση των ομάδων εμβολιασμένα – μη εμβολιασμένα ιχθύδια για όλες τις συγκεντρώσεις βακτηρίων. Επειδή σαν τελικό αποτέλεσμα είχαμε 100% θνησιμότητα για όλες τις παραπάνω κατηγορίες, για το πρώτο πείραμα, το μόνο που μπορούμε να πούμε με σιγουριά είναι πως οι συγκεντρώσεις που επιλέξαμε ήταν όπως αποδείχθηκε πολύ μεγάλες. Έτσι λοιπόν εκείνο που μπορούμε να συγκρίνουμε είναι ο χρόνος που επέρχεται η θνησιμότητα για την κάθε ομάδα ιχθυδίων και επί αυτού να καταλήξουμε σε ενδείξεις και όχι σε αποδείξεις.

Έτσι λοιπόν από τα αποτελέσματα, βλέπουμε πως για την μεγαλύτερη συγκέντρωση βακτηρίων που χορηγήθηκε στα εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα ιχθύδια, τα αποτελέσματα ως προς τον χρόνο ήταν τα ίδια. Όσον αφορά την μικρότερη συγκέντρωση βακτηρίων υπήρχαν εμφανείς διαφορές στον χρόνο θανάτου που φαίνονται πολύ καλά στα παρακάτω ιστογράμματα.



Απώλειες λόγω χειρισμών:

- Εμβολιασμένα ιχθύδια = 1
- Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 5
- Ώρα έναρξης (0) = 13:30



- Απώλειες λόγω χειρισμών : Εμβολιασμένα ιχθύδια = 2, Μη εμβολιασμένα ιχθύδια = 12. Ώρα έναρξης 13:30. Ένα από τα εμβολιασμένα ακόμη ζει.

Εδώ βλέπουμε πως τα εμβολιασμένα ιχθύδια είχαν κατά 2/3 μεγαλύτερο χρόνο επιβίωσης από τα μη εμβολιασμένα. Αυτό, λαμβάνοντας υπ' όψη όλα τα δεδομένα και τις παραμέτρους, μπορεί να σημαίνει μόνο ότι λόγω του εμβολίου, το ανοσοποιητικό σύστημα αυτών των ιχθυδίων, δημιούργησε αντισώματα τα οποία μετά την πρόκληση της ασθένειας προστάτευσαν τον οργανισμό. Όμως ο αριθμός των μικροβίων που εισαγάγαμε στα ιχθύδια αποδείχθηκε υπερβολικά μεγάλος. Τόσο μεγάλος που υπερβαίνει τον αριθμό των αντισωμάτων που το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθυδίων είναι ικανό να παράγει ακόμα και με συνεχείς ρυθμούς. Κάτι τέτοιο είχε σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση της ασθένειας μετά από, συγκριτικά πάντα, πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Η παρατεταμένη αυτή επιβίωση συγκριτικά με τα μη εμβολιασμένα ιχθύδια, όπως φαίνεται μπορεί να αποδοθεί μόνο στην χρήση του εμβολίου, και αυτό από μόνο του, λαμβάνοντας υπ' όψη τον υπερβολικά μεγάλο αριθμό βακτηρίων που εισαγάγαμε, αποτελεί σαφή ένδειξη της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος κατά της βιμπρίωσης, λόγω της «επαγρύπνησής» του, που οφείλεται στο χορηγούμενο εμβόλιο.

Κλείνοντας αυτή την ενότητα θα θέλαμε να παρατηρήσουμε πως ο υπερβολικά μεγάλος αριθμός βακτηρίων που τυχαία επιλέχθηκε, φαίνεται να

περιορίζει το μέγεθος της διαφοράς των εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων ιχθυδίων και άρα την αξία του εμβολίου.

4.6.2 2ος πειραματικός έλεγχος

Κατά τον δεύτερο πειραματικό έλεγχο όπως προαναφέραμε, σε ποσοστά θνησιμότητας / επιβίωσης είχαμε τα εξής αποτελέσματα :

	Εμβ. 15000	Μη Εμβ.15000	Εμβ. 1500	Μη Εμβ. 1500
Σύνολο	5 νεκρά	30 νεκρά	5 νεκρά	32 νεκρά
	Θν. 14.2%	Θν. 85.7%	Θν. 12.5%	Θν. 80%
	Επ. 85.7%	Επ.14.3%	Επ. 87.2%	Επ. 20%

Οι συγκεντρώσεις του βακτηρίου που χρησιμοποιήσαμε μας έδωσαν περίπου τα ίδια αποτελέσματα. Αυτό σημαίνει πως οι συγκεντρώσεις αυτές τόσο η μεγάλη όσο και η μικρή ήταν ανεκτικές (φυσιολογικές) για τα ιχθύδια και για τις ανάγκες του πειράματος. Η διαφορά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων ήταν πως στην μικρότερη είχαμε την ευκαιρία να παρατηρήσουμε τα ψάρια να νοσούν πριν πεθάνουν. Αυτό μας έδωσε την ευκαιρία να κάνουμε μια σειρά από πολύ σημαντικές παρατηρήσεις τις οποίες και έχουμε καταγράψει υπό μορφή πίνακα στο κεφάλαιο που αφορά τη συμπεριφορά 3.2.6.

Ερμηνεύοντας τον πίνακα της συμπεριφοράς 3.2.6 καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα. Ουσιαστικά το πρώτο συμπέρασμα που βγαίνει αφορά την γενικότερη συμπεριφορά των ιχθυδίων και ειδικότερα την διατροφή τους. Βλέπουμε λοιπόν πως στα ιχθύδια στα οποία χορηγήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ιχθυδίων η ανορεξία ξεκίνησε στις πρώτες 24 ώρες ενώ σε αυτά που χορηγήθηκε η μικρότερη, ξεκίνησε μετά από 48 ώρες. Το σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει και αφορά άμεσα τους παραγωγούς είναι το ότι κατά το ξέσπασμα της ασθένειας σε μή εμβολιασμένα λαβράκια το περιθώριο αντίδρασης της καταπολέμησης της νόσου με αντιβιοτικά είναι 24 με 48 ώρες, αφού αυτά χορηγούνται στοματικά με τις τροφές, γιατί πέρα αυτού του διαστήματος τα ιχθύδια είναι ανόρεκτα. Φαίνεται να είναι πολύ δύσκολο να

αντιμετοπίσουμε μια ασθένεια με χορήγηση αντιβιοτικών μέσω των τροφών όταν σύμπτωμά της είναι η ανορεξία.

Το αποτέλεσμα σε αυτήν την περίπτωση θα ήταν μεγάλο κόστος από τις απώλειες των ιχθυδίων (η θνησιμότητα ανέρχεται στο 85.7%), κόστος από την χορήγηση των αντιβιοτικών και χάσιμο χρόνου από το χρονοδιάγραμμα της παραγωγής αφού ο ρυθμός ανάπτυξης προσωρινά διακόπτεται / ελαττώνεται. Όλα τα παραπάνω προβλήματα στην περίπτωση των εμβολιασμένων ιχθυδίων, με την μέθοδο του μπάνιου, αποδείξαμε ότι δεν υφίστανται αφού μόνο το 12.5% του πληθυσμού νοσεί ενώ η διατροφή και άρα ο ρυθμός ανάπτυξης δεν διακόπτονται.

Τα αποτελέσματα ως αναφορά την επιβίωση / θνησιμότητα καταγράφηκαν ανα ώρα, όπως φαίνεται στην παράγραφο 3.2.5, και ελέγχθηκαν με τις εξισώσεις παλινδρόμησης και τα όρια εμπιστοσύνης τους δείχνοντάς μας πως τα αποτελεσματά μας είναι στατιστικά δεκτά και άρα σωστά.

Ποιό συγκεκριμένα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτουν οι εξής πίνακες και εξισώσεις που διέπουν τις συναρτήσεις:

Εμβ 15000 $y = 3,5677 - 0,0015x$ με όρια εμπιστοσύνης (- 0,00169 έως -0,00131)

Στατιστικά παλινδρόμησης	
Πολλαπλό R	0,813174
R Τετράγωνο	0,661252
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,658585
Τυπικό σφάλμα	0,040377
Μέγεθος δείγματος	129

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερία	SS	MS	F	Σημαντικότητα F	
S						
Παλινδρόμηση	1	0,404176	0,404176	247,91	1,21468E-31	
Υπόλοιπο	127	0,207053	0,00163			
Σύνολο	128	0,611229				
	Συντελεστής	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	3,567702	0,008424	423,5018	6E-202	3,551031403	3,5843717
Μεταβλητή X 1	-0,0015	9,55E-05	-15,7452	1E-31	-0,00169207	-0,001314244

Μη εμβ 15000 $y = 4,0032 - 0,0207x$ με όρια εμπιστοσύνης (-0,0225 έως -0,01904)

Στατιστικά παλινδρόμησης

Πολλαπλό R	0,903476
R Τετράγωνο	0,816268
Προσαρμοσμέ νο R	0,814821
Τετράγωνο Τυπικό σφάλμα	0,369859
Μέγεθος δείγματος	129

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	77,18335019	77,18335	564,22	1,47314E-48
Υπόλοιπο	127	17,37303122	0,136796		
Σύνολο	128	94,55638142			

	Συντελεστής	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	4,003286	0,077166862	51,8783	2E-87	3,850586255	4,15598483
Μεταβλητή X	-0,02077	0,00087449	-23,7534	1E-48	-0,02250258	-0,019041666

ΕΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Εμβ.1500 $y = 3,7551 - 0,00145x$ με όρια εμπιστοσύνης (- 0,0016 έως -0,00129)

Στατιστικά παλινδρόμησης

Πολλαπλό R	0,8541468
R Τετράγωνο	0,7295667
Προσαρμοσμέ νο R	0,7274373
Τετράγωνο Τυπικό σφάλμα	0,03309
Μέγεθος δείγματος	129

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F
Παλινδρόμηση	1	0,375149	0,375149	342,6168	7,11588E-38
Υπόλοιπο	127	0,139059	0,001095		
Σύνολο	128	0,514207			

	Συντελεστής	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	3,7551357	0,006904	543,918	1E-215	3,741474199	3,768797201
Μεταβλητή X 1	-0,001448	7,82E-05	-18,5099	7,12E-38	-0,001602992	-0,001293356

ΈΞΟΔΟΣ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΟΣ

Μη Εμβ.1500 $y = 4,3126 - 0,01678x$ με όρια εμπιστοσύνης (- 0,01777 έως -0,01579)

Στατιστικά παλινδρόμησης

Πολλαπλό R	0,947876
R Τετράγωνο	0,8984689
Προσαρμοσμένο R Τετράγωνο	0,8976695
Τυπικό σφάλμα	0,2118102
Μέγεθος δείγματος	129

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ

	βαθμοί ελευθερίας	SS	MS	F	Σημαντικότητα F	
Παλινδρόμηση	1	50,41985448	50,41985	1123,848	6,18144E-65	
Υπόλοιπο	127	5,697673352	0,044864			
Σύνολο	128	56,11752783				

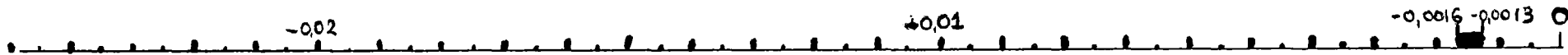
	Συντελεστής	Τυπικό σφάλμα	t	τιμή-P	Κατώτερο 95%	Υψηλότερο 95%
Τεταγμένη επί την αρχή	4,312691	0,044191812	97,59027	2,7E-121	4,225243349	4,400138585
Μεταβλητή X 1	-0,016789	0,000500802	-33,5238	6,18E-65	-0,017779806	-0,015797813

Συγκρίνοντας τα όρια εμπιστοσύνης των εξισώσεων των εμβολιασμένων και των μη εμβολιασμένων ιχθυδίων στα οποία χορηγήθηκε συγκέντρωση βακτηρίων 15000 c.f.u. προκύπτει ότι τα διαστήματά τους όχι μόνο δεν ταυτίζονται, αλλά και ότι έχουν σαφή διαφορά μεταξύ τους τοποθετούμενα στον άξονα (x). Το ίδιο συμβαίνει και για τα ιχθύδια στα οποία έχει χορηγηθεί συγκέντρωση βακτηρίων 1500 c.f.u , όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.

Αυτή η διαφορά που παρουσιάζεται οφείλεται στο εμβόλιο και αυτό γιατί αν δεν υπήρχε ο εμβολιασμός φυσιολογικά τα διαστήματα αυτά θα έπρεπε να ταυτίζονται.

ΟΡΙΑ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ

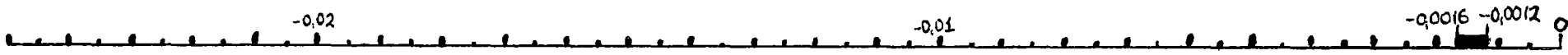
ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ (15.000 ζ.φ.α.)



ΜΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΗ (15.000 ζ.φ.α.)



ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ (1.500 ζ.φ.α.)



ΜΗ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ (1.500 ζ.φ.α.)



Άρα η προστασία του εμβολιασμού με μπάνιο αποδεικνύεται από τα ποσοστά των επιβιώσεων που προέκυψαν από το πείραμά μας και πιστοποιούνται στατιστικά από τα παραπάνω.

Ο βαθμός προστασίας που παρέχει το εμβόλιο με την μέθοδο του μπάνιου κρίνεται από το σχετικό ποσοστό επιβίωσης R.P.S. (Relative Percent Survival) και δίνεται από τον τύπο :

$$R.P.S. = \left(1 - \frac{\% \text{Θνησ. Εμβ.}}{\% \text{Θνησ. Μη Εμβ.}} \right) \times 100\%$$

Από την παραπάνω σχέση έχουμε τα εξής αποτελέσματα :

$$R.P.S. \text{ (μετά από χορήγηση 15000 c.f.u.)} = 83,44\%$$

$$R.P.S. \text{ (μετά από χορήγηση 1500 c.f.u.)} = 84,38 \%$$

Έτσι λοιπόν βλέπουμε πως ακόμη και ο εμβολιασμός με την μέθοδο του μπάνιου που είναι ο κατά σειρά 3ος σε απόδοση από τις μεθόδους που υπάρχουν, παρέχει υψηλή προστασία στον πληθυσμό των ιχθυδίων.

Αυτό για την παραγωγή σημαίνει πως σταματά η αβεβαιότητα και ο κίνδυνος από αναμενόμενες επιζωοτίες δονακίωσης, αποφεύγονται οι θνησιμότητες και το κόστος των θεραπευτικών επεμβάσεων, βελτιώνεται η μετατρεψιμότητα της τροφής διότι παύουν οι υποκλινικές λοιμώξεις από *Vibrio* που δεν εκδηλώνονται με θνησιμότητες. Τέλος επιταχύνεται η παραγωγική διαδικασία αφού δεν υπάρχουν αναστολές του ρυθμού σωματικής αύξησης των ψαριών από παθολογικά φαινόμενα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Sea Bass . Biology , exploitation and conservation . Graham D. and Michael G. Pawson . Published by CHARMAN and HALL . Fish and Fisheries Series 12. First edition 1994 . σελ. 18 – 20, 22, 12, 13
- Isolation and Identification of fish bacterial pathogen by G. NICOLAS FRERICHS BVMS, PhD, MRCUS, Dip. Bact. Institute of Aquaculture University of Stirling, Scotland, 1984.
- Bacterial Fish Pathogens . disease in farmed and wild fish . second edition Brian Austin and Dawn A. Austin . First Published in 1993 by Ellis Horwood Limited . σελ. 265 – 278
- Ενημερωτικό δελτίο Vet – care Ltd. Vacc. 1/NOE '94. Εμβόλια και αντιβιοτικά .
- Fish Vaccination . Edited by Dr. E. Ellis . Academic press Limited 1988 . σελ. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 70, 71, 33, 29, 34 .
- Σημειώσεις Ιχθυοπαθολογία 2 (ειδική παθολογία ψαριών) . Εξάμηνο 5^ο , Βορεινάκης Θεοφάνης , 1993 , σελ. 21
- Υδατοκαλλιέργειες Ευρύαλων Ψαριών . Λαβράκι & Τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης . Γ. Χώτος, Ι. Ρογδάκης . Εκδόσεις "Ιων" 1.4.3. Διατροφή και ανάπτυξη . σελ.260
- Σημειώσεις Ιχθυοπαθολογία 1 , Εξάμηνο 4^ο, Βορεινάκης Θεοφάνης , 1995, σελ. 18 – 19 .

- Aquarium Systems . Edited by A.D. Hawkins . Department of agriculture and Fisheries for Scotland , Marine Laboratory , Aberdeen , Scotland. Σελ. 5, 28, 84, 85, 89, 98 .
- Nordic Manual for the Surveillance and Diagnosis of Diseases in farmed Salmonids , Nordiske Seminar- og Arbejbs-rapportes 1992:545 p.65 : πίνακας 4: Identification of *Vibrio* species by means of the 'ALO-test'
- Αλιευτικά νέα – Μάρτιος 1994: Η εργασία του κ.Νούσια για την πειραματικά αναπαραγωγή της νόσου που προκαλεί το βακτήριο *V.anguillarum* ορότυπος 1, σελ.68, 69.