

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ - ΑΛΙΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΙΧΘΥΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΣΕ ΙΧΘΥΟΚΛΩΒΟΥΣ
ΤΩΝ ΕΥΡΥΑΛΩΝ ΕΙΔΩΝ

ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

ΣΤΗΝ ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΑΙΤΩΛΟΑΚΑΡΝΑΝΙΑΣ

Εισηγητής:

Θεοφάνης Βορεινάκης

Καθηγητής Εφαρμογών

Οι σπουδάστριες:

Αργυρά Α. Ανδριοπούλου

Αθηνά Ε. Βλησμά

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, Ιανουάριος 1996

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΤΕΙ / Μ

Εγκρίνεται

Φ. Ροβανάκης

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΤΕΙ / Μ

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ -
Αριθ. Εγκρίσεως: 502

Τ.Ε.Ι. ΜΕΣΟΛΟΓΓΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ - ΑΛΙΕΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ ΙΧΘΥΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΠΑΧΥΝΣΗΣ ΣΕ ΙΧΘΥΟΚΛΩΒΟΥΣ
ΤΩΝ ΕΥΡΥΑΛΩΝ ΕΙΔΩΝ

ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

ΣΤΗΝ ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΑΙΤΩΛΟΑΚΑΡΝΑΝΙΑΣ

Εισηγητής:

Θεοφάνης Βορεινάκης

Καθηγητής Εφαρμογών

Οι σπουδάστριες:

Αρχυρή Α. Ανδριοπούλου

Αθηνά Ε. Βλησμά

ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ, Ιανουάριος 1996

Μια γερή και αυθεντική αλήθεια πρέπει να μπορεί να αντιστραφεί.
Όταν κάτι είναι αληθινό, το αντίθετό του πρέπει επίσης να είναι
αληθινό. Γιατί μια αλήθεια είναι μόνο μια σύντομη στερεότυπη
διατύπωση ενός βλέμματος που ρίχνουμε στον κόσμο από μια συγκεκριμένη
οπτική γωνία. Αλλά κάθε οπτική γωνία έχει και την αντίθετή της.

Χ. Έσσε

Αφιερώνεται στους γονείς μας,
και στους ανθρώπους που αγαπάμε
και μας αγαπούν

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

Πρόλογος σελ. 1

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

Εισαγωγή σελ. 4

Κεφάλαιο 1 - Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

1.1. Συστηματική κατάταξη σελ. 5

1.2. Γεωγραφική κατανομή - Οικολογία σελ. 5

1.3. Μορφολογία σελ. 6

1.4. Εξάπλωση κατά στάδια ανάπτυξης σελ. 6

1.5. Παράγοντες που καθορίζουν την εξάπλωση σελ. 7

1.6. Αναπαραγωγή σελ. 9

1.7. Γεννητικοί αδένες, κλίμακα γεννητικής ωριμότητας σελ. 9

1.8. Φάσεις ανάπτυξης σελ. 11

Κεφάλαιο 2 - Η τσιπούρα (*Sparus auratus*)

2.1. Συστηματική κατάταξη σελ. 14

2.2. Μορφολογία σελ. 14

2.3. Βιολογικός κύκλος - Ερμαφροδιτισμός σελ. 15

2.4. Διατροφή στο φυσικό περιβάλλον σελ. 16

2.5. Ανάπτυξη σελ. 17

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ & ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ

Εισαγωγή σελ. 19

Κεφάλαιο 1 - Ασθένειες μολυσματικής αιτιολογίας

1.1. Ιογενείς ασθένειες (Viral diseases)

1.1.1. Μολυσματική Νέκρωση του Παγκρέατος (Infectious Pancreatic Necrosis - I.P.N.) σελ. 20

1.1.2. Λεμφοκύστις (Lymphocystis) σελ. 21

1.1.3. Λοιμώδης Αιμορραγική Σηψαιμία (Viral Haemorrhagic Septicaemia - V.H.S.) σελ. 22

1.1.4. Distended Gut Syndrome - D.G.S. (Το σύνδρομο των διασταλμένων εντέρων) σελ. 23

1.1.5. Sea bass birnavirus σελ. 23

1.1.6. Ασθένεια των νευρικών συμπτωμάτων στο λαβράκι (Nervous syndrome in sea bass) σελ. 24

1.1.7. Ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια στο λαβράκι (Viral Encephalopathy and Retinopathy) σελ. 24

1.2. Μικροβιακές ασθένειες σελ. 25

1.2.1. VIBRIONACEAE	
1.2.1.1. <i>Vibrio</i> spp.	σελ. 25
1.2.1.2. <i>Aeromonas</i> spp.	σελ. 28
1.2.2. PSEUDOMONACEAE	σελ. 29
1.2.2.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	σελ. 30
1.2.3. ENTEROBACTERIACEAE	σελ. 31
1.2.3.1. <i>Edwardsiella ictalurii</i>	σελ. 31
1.2.4. PASTEURELLACEAE	σελ. 32
1.2.4.1. <i>Pasteurella piscicida</i>	σελ. 32
1.2.5. ΜΥΧΟΒΑΚΤΗΡΙΑ (Μυξοβακτηρίδια)	
1.2.5.1. <i>Flexibacter</i> spp.	σελ. 35
1.2.6. Επιθηλιοκύστη	σελ. 36
1.3. Παρασιτικές ασθένειες (Parasitic infections)	σελ. 36
1.3.1. Παρασιτικά πρωτόζωα	
1.3.1.1. Μικροσπορίδια	σελ. 36
1.3.1.2. Μυξοσπορίδια	σελ. 37
1.3.1.3. Βλεφαριδοφόρα	σελ. 37
1.3.1.4. <i>Cryptocaryon irritans</i>	σελ. 38
1.3.1.5. <i>Ichthyobodo (Costia) necatrix</i>	σελ. 39
1.3.2. Μετάζωα	
1.3.2.1. Μονογενή	σελ. 39
1.3.2.2. Διγενή	σελ. 40
1.3.2.3. Κεστώδη (Ταινίες)	σελ. 40
1.3.2.4. Νηματέλμινθες	σελ. 41
1.3.2.5. Ακανθοκέφαλα	σελ. 42
1.3.2.6. Βδέλλες	σελ. 42
1.3.3. Οστρακόδερμα	
1.3.3.1. Βραχίουρα	σελ. 42
1.3.3.2. Κωπήποδα	σελ. 42
1.3.3.3. Εργασιλιόμορφα	σελ. 43
1.3.3.4. Καλιγόμορφα	σελ. 43
1.3.3.5. Ισόποδα	σελ. 43
Κεφάλαιο 2 - Μη μολυσματικές ασθένειες	
2.1. Χειμερινό σύνδρομο της τσιπούρας (Winter Syndrome)	σελ. 44
2.2. Λιπώδης εκφύλιση του ήπατος	σελ. 45
2.3. Σπλαγγχνική κοκκιωμάτωση (Visceral granuloma)	σελ. 45
2.4. Βιταμίνη Β ₆ (Vitamin B ₆ - Pyridoxine)	σελ. 46

Κεφάλαιο 3 - Έλεγχος, Προφύλαξη και Θεραπεία με χρήση φαρμακευτικών ουσιών

3.1. Έλεγχος	σελ. 47
3.2. Ιδιότητες των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες	σελ. 48
3.3. Αντιβιοτικά - Θεραπεία	σελ. 49
3.4. Εμβόλια και αντιβιοτικά	σελ. 50
3.5. Έλεγχος της υγείας των ψαριών με ολοκληρωμένα <i>in vitro</i> διαγνωστικά μέσα	σελ. 51
3.6. Θεραπευτικές αγωγές - Προστασία του καταναλωτή	σελ. 52
3.7. Θεραπευτικές αγωγές - Περιβάλλον. Κατανόηση της δυναμικής της χρήσης φαρμάκων στις υδατοκαλλιέργειες	σελ. 53
3.8. Νέα ερευνητικά δεδομένα πάνω στη χρήση αντιβιοτικών στην τσιπούρα και το λαβράκι	σελ. 54

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΩΝ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Εισαγωγή	σελ. 57
----------	---------

Κεφάλαιο 1 - Μέθοδος δειγματοληψίας - Επεξεργασίας δειγμάτων

1.1. Δειγματοληπτική μέθοδος - Μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο	σελ. 58
1.2. Επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο	σελ. 58
1.3. Παρασιτολογικές εξετάσεις	σελ. 58
1.4. Βακτηριολογικές εξετάσεις	σελ. 59
1.4.1. Θρεπτικά υλικά	σελ. 59
1.4.2. Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα	σελ. 62
1.4.3. Μη ειδικά θρεπτικά υποστρώματα	σελ. 62
1.4.4. Διαδικασία απόκτησης καθαρών καλλιεργειών	σελ. 64
1.4.5. Χρώση μικροβίων κατά Gram	σελ. 64
1.4.6. Πρώτο στάδιο test ταυτοποίησης για Gram αρνητικά βακτήρια	σελ. 65
1.4.7. Πλήρης ταυτοποίηση των μικροβίων	σελ. 68
1.4.8. Μέθοδος API	σελ. 68
1.4.9. Αντιβιογράμμα	σελ. 69
1.4.9.1. Εκτέλεση αντιβιογράμματος	σελ. 70
1.4.10. Οροδιαγνωστική ταυτοποίηση των παθογόνων των ψαριών	σελ. 71
1.5. Ιστολογικές εξετάσεις	σελ. 74
1.5.1. Μέθοδοι και Υλικά	σελ. 75
1.5.2. Εισαγωγή στη μονιμοποίηση ιστού	σελ. 78
1.5.3. Έγκλειση ιστού	σελ. 78
1.5.4. Παρασκευή μικροσκοπικών τομών	σελ. 79
1.5.5. Επεξεργασία των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος	
1.5.5.1. Πρακτική της μονιμοποίησης	σελ. 79
1.5.5.2. Επεξεργασία των ιστών στην Ιστοκινέττα και τον Μικροτόμο	σελ. 79
1.5.5.3. Χρώσεις	σελ. 81

Κεφάλαιο 2 - Περιγραφή του πειράματος

2.1. Εισαγωγή

σελ. 84

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

σελ. 105

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ

σελ. 109

Βιβλιογραφία

σελ. 125

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο ερευνητικός χώρος εκπόνησης αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι το εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του καθηγητή κ. Θ. Βορεινάκη, του τμήματος Ιχθυοκομίας-Αλιείας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου. Η παρούσα εργασία είναι προϊόν της συνεργασίας μας με διάφορους ιχθυοπαραγωγούς στην ευρύτερη περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας (Αστακός, Βόνιτσα, Αμφιλοχία, Μύτικας, Μεσολόγγι), καθώς και με αξιόλογους επιστήμονες στον τομέα της Ιχθυοπαθολογίας. Η πειραματική διαδικασία σχεδιάστηκε και οργανώθηκε με τη βοήθεια του κ. Θ. Βορεινάκη, διήρκησε από το Νοέμβριο του 1994 έως τον Ιούνιο του 1995, και ήταν ένας συνδυασμός εργασίας στο πεδίο και στο εργαστήριο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση των παθολογικών προβλημάτων κατά το στάδιο της πάχυνσης σε ιχθυοκλωβούς των ευρύαλων ειδών (τσιπούρα-λαβράκι) στην ευρύτερη περιοχή της Αιτ/νίας, μέσω μιας τακτικής δειγματοληπτικής ανάλυσης, με τη χρησιμοποίηση μικροβιολογικών, ιστολογικών και παρασιτολογικών μεθόδων.

Στο σημείο αυτό θέλουμε να αναφέρουμε ότι ο βασικός λόγος της επιλογής των προαναφερθέντων ειδών έγκειται, τόσο στην εμπορική τους, όσο και στην καλή γνώση των βιολογικών παραμέτρων ανάπτυξής τους. Από την άλλη, η επιλογή των συγκεκριμένων μονάδων πάχυνσης έγκειται, αφ' ενός στη δυνατότητα εύκολης πρόσβασης σε αυτές από το χώρο επεξεργασίας των δειγμάτων και αναλύσεών τους, που ήταν το εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του Τ.Ε.Ι. -λαμβάνοντας πάντα υπόψη το γεγονός ότι τα ψάρια πρέπει να είναι ζωντανά κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο και πριν την επεξεργασία τους- και, αφ' ετέρου, στη συγκέντρωση πολλών μονάδων πάχυνσης στον συγκεκριμένο χώρο.

Η καλλιέργεια των ψαριών γινόταν με το σύστημα των πλωτών ιχθυοκλωβών και η τροφή αποτελούνταν από ξηρά σύμπηκτα (pellets) διάφορων εταιρειών ιχθυοτροφών.

Η παρούσα εργασία αποτελείται από τέσσερα μέρη. Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει μια εισαγωγή στα βιολογικά και ηθολογικά στοιχεία των εν λόγω ειδών (τσιπούρα-λαβράκι). Στο δεύτερο μέρος αναφέρονται οι κυριότερες ασθένειες που πλήττουν σήμερα τα εν λόγω ψάρια στην καλλιέργεια καθ' όλα τα στάδια εκτροφής και, κυρίως, κατά την πάχυνση. Επίσης, γίνεται μία αναφορά στη χρήση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων στην Ελλάδα σήμερα. Το τρίτο μέρος περιλαμβάνει τη μέθοδο δειγματοληψίας των ψαριών, τη μέθοδο επεξεργασίας των δειγμάτων, τις μικροβιολογικές και παρασιτολογικές αναλύσεις, την απομόνωση και ταυτοποίηση των παθογόνων αιτιών, καθώς και την παρασκευή ιστολογικών τομών. Στο τέταρτο μέρος παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που απορρέουν, και αξιολογούνται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, σε παράρτημα

παρουσιάζονται φωτογραφίες (μικροσκοπίου τύπου Olympus AH-2 BT) των ειδικών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν, καθώς και άλλες φωτογραφίες που παρουσιάζουν ιστοπαθολογικό ενδιαφέρον.

Κλείνοντας τον πρόλογο αυτό, που λειτουργεί ως σύντομη εισαγωγή, θα θέλαμε να τονίσουμε ότι η παρούσα εργασία δε στοχεύει στην εξαγωγή γενικευμένων συμπερασμάτων για την υγιεινή κατάσταση των ψαριών στις μονάδες εκτροφής με τις οποίες συνεργαστήκαμε. Στην περίπτωση αυτή θα ήταν απαραίτητος ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων ψαριών και μια εκτενέστερη εργαστηριακή επεξεργασία και μελέτη τους.

Θα θέλαμε επίσης να ευχαριστήσουμε:

- Τον καθηγητή μας κ. Θ. Βορεινάκη για τη βοήθειά του, για την προσφορά των υλικών μέσων του εργαστηρίου του και για την πολύτιμη συμβουλευτική συμπαράστασή του καθ' όλο το χρόνο εκπόνησης του πειραματικού μέρους της εργασίας.
- Τους ιχθυοπαραγωγούς - ιχθυοτρόφους για τη γενναιόδωρη προσφορά των δειγμάτων - ψαριών που χρησιμοποιήθηκαν.
- Την κ. Μ. Αλέξη του Ε.Κ.Θ.Ε. (Άγιος Κοσμάς Ελληνικού), για την άδεια χρησιμοποίησης του οπτικού μικροσκοπίου του εργαστηρίου ιχθυοπαθολογίας του Ε.Κ.Θ.Ε., για τη φωτογράφιση των ιστολογικών τομών, καθώς και την κ. Μ. Γιαγνίση για τη βοήθειά της κατά το στάδιο της φωτογράφισης.
- Τον κ. Π. Χριστοφιλογιάννη για τις χρήσιμες συμβουλές του πάνω σε θέματα σχετικής βιβλιογραφίας.
- Τον κ. Α. Καπίρη για τη βοήθειά του στην εκτύπωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά όλους εκείνους τους ανθρώπους που με διάφορους τρόπους μας βοήθησαν στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας καθ' όλα τα στάδιά της.

Ιανουάριος 1996

Ανδριοπούλου Αργυρώ

Βλησμά Αθηνά

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

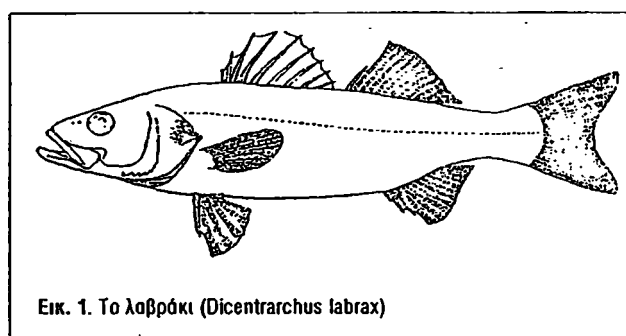
Πριν προχωρήσουμε στην παρουσίαση των νόσων στα ψάρια τσιπούρα και λαβράκι, θεωρήσαμε απαραίτητο να κάνουμε μία σχετικά εκτενή παρουσίαση - έκθεση των βιολογικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών του κάθε είδους, για την καλύτερη κατανόηση της παθολογίας τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

1.1. Συστηματική κατάταξη

Συνομοταξία:	Χορδωτά
Υποσυνομοταξία:	Σπονδυλωτά
Υπερομοταξία:	Γναθοστόματα
Ομάδα:	Ιχθύες
Ομοταξία:	Οστεϊχθύες
Υφομοταξία:	Κρασοπτερύγια
Τάξη:	Perciformes
Υπόταξη:	Percoidei
Οικογένεια:	Serranidae
Γένος:	<i>Dicentrarchus</i>
Είδος:	<i>Dicentrarchus labrax</i>



Εικ. 1. Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*)

Συνώνυμα	Ξένες ονομασίες
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	Αγγλ.: Bass, European seabass
<i>Morone labrax</i> (Linnaeus, 1758)	Γαλλ.: Bar, Loup, Bar european
<i>Labrax lupus</i> (Cuvier, 1817)	Γερμ.: Wolfbarsch
<i>Perca labrax</i> (Klein, 1775)	Ιταλ.: Branzino, Spigola
<i>Perca elongata</i> (St. Hilaire)	

1.2. Γεωγραφική κατανομή - Οικολογία

Είναι είδος που παρουσιάζει αρκετά πλατειά εξάπλωση. Εκτείνεται στον Ατλαντικό ωκεανό, από τις ακτές του Μαρόκου έως τη Βαλτική θάλασσα. Συναντιέται σε κάθε περιοχή της Μεσογείου και των γύρω θαλασσών, εισχωρώντας στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες. Ζει γενικά κατά μήκος των βραχωδών ζωνών, όμως συχνά καταφεύγει στις αμμώδεις περιοχές.

Είναι μεταναστευτικό ψάρι. Οι μεταναστεύσεις που πραγματοποιεί οφείλονται στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της αλατότητας. Την άνοιξη, πολυάριθμα ιχθύδια

προσεγγίζουν τις ακτές και εισέρχονται στις εκβολές ποταμών ή σε λιμνοθάλασσες, όπου η θερμοκρασία του νερού, κατά κανόνα, είναι μεγαλύτερη εκείνης της θάλασσας.

Είναι κατ' εξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος. Προσαρμόζεται και αναπτύσσεται εύκολα, ακόμη και σε σχεδόν γλυκά νερά. Οι ιδανικές συνθήκες αλατότητας για άριστη ανάπτυξη είναι 20‰ - 30‰. Η θερμοκρασία στην οποία διατρέφεται είναι 7-30°C (άριστες 14-28°C). Κάτω από 7°C σταματάει να τρώει, ενώ πεθαίνει όταν η θερμοκρασία κατέβει κάτω από 2°C.

1.3. Μορφολογία

Στο λαβράκι, το σώμα είναι ελαφρά κυλινδρικό, πεπλεγμένο στα πλευρά και οξυμένο προς το κεφάλι και την ουρά (σαν άτρακτος). Καλύπτεται από κτενοειδή λέπια, τα οποία επικαλύπτονται, και στην πλευρική γραμμή βρίσκονται 62 έως 80 (συνήθως 70).

Το βραγχιακό επικάλυμμα έχει στο πίσω μέρος του δύο ισχυρές άκανθες. Έχει δύο ραχιαία πτερύγια, από τα οποία το πρώτο έχει 8 με 10 σκληρές άκανθες, και το δεύτερο 1 σκληρή και 12 με 13 μαλακές άκανθες. Το εδρικό πτερύγιο έχει 3 σκληρές και 10 με 12 μαλακές άκανθες. Το χρώμα του είναι σκούρο γκρι στη ράχη, και άσπρο στην κοιλιά. Φθάνει σε μήκος το 1 m, με συνηθισμένο μέγεθος τα 20 με 55 cm, και μέγιστο βάρος 12 με 14 kg, με το συνηθισμένο να κυμαίνεται από 2 μέχρι 5 kg.

1.4. Εξάπλωση κατά στάδια ανάπτυξης

ΩΟΤΟΚΙΕΣ

Οι ωοτοκίες λαμβάνουν χώρα στις βραχώδεις παράκτιες περιοχές κατά κανόνα, κοντά στις εκβολές των ποταμών. Οι συλλήψεις ώριμων γεννητικά ατόμων από τα αλιευτικά σκάφη σε αυτές τις περιοχές, μας πληροφορούν ότι το βάθος της ωοτοκίας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 40 m.

ΑΥΓΑ

Τα αυγά εντοπίζονται στην παραλιακή ζώνη από την επιφάνεια μέχρι 30 m βάθος.

ΝΥΜΦΕΣ

Εντοπίζονται στο μεροπλαγκτόν των παράκτιων περιοχών, όπου αναπτύσσονται οι γεννήτορες και τα αυγά.

ΙΧΘΥΔΙΑ

Νεαρά ιχθύδια του είδους, μήκους 10-35 mm, αλιεύονται στις παράκτιες περιοχές, κοντά στις εκβολές ποταμών, λιμνοθαλασσών ή παράκτιων ελών, κυρίως από τις αρχές

της άνοιξης μέχρι τέλος Ιουνίου. Ιχθύδια μεγαλύτερου μεγέθους αλιεύονται προς το τέλος του Φθινοπώρου στις ίδιες περιοχές, όταν αυτά εγκαταλείπουν τα παράκτια εσωτερικά και υφάλμυρα νερά, αναζητώντας τις σταθερότερες συνθήκες της θάλασσας. Οι μεταναστεύσεις αυτές είναι μικρής έκτασης, όπως έχει αποδειχθεί με τις ιχθυοθετήσεις των μετακινούμενων ψαριών σε πολλές περιοχές. Αυτές οι μετακινήσεις σχετίζονται κυρίως με τη διατροφή των ιχθυδίων και τις συνθήκες του περιβάλλοντος, οι οποίες ευνοούν την προστασία και καλύτερη ανάπτυξή τους.

Το φαινόμενο αυτό τυγχάνει ιδιαίτερης εκματάλλευσης για τη σύλληψη ή συγκέντρωση αυτών των ψαριών σε ειδικά διαρρυθμιζόμενες περιοχές των λιμνοθαλασσών, στα πλαίσια των μεθόδων αλιευτικής και ιχθυοτροφικής διαχείρισης αυτών των παράκτιων οικοσυστημάτων.

ΕΝΗΛΙΚΑ ΑΤΟΜΑ

Εγκαταλείπουν τις λιμνοθάλασσες και τα παράκτια έλη από τις αρχές του χειμώνα, μετακινούμενα προς την ανοιχτή θάλασσα για την ωτοκία, και επιστρέφουν με την έναρξη της νέας περιόδου διατροφής από τις αρχές της άνοιξης.

1.5. Παράγοντες που καθορίζουν την εξάπλωση

Οι παράγοντες που καθορίζουν την εξάπλωση του είδους είναι πολύ λίγο γνωστοί, αφού το λαβράκι συναντιέται σε περιοχές με εντελώς διαφορετικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους. Οι κυριώτεροι αυτών των παραγόντων, κατά τον Barnabe (1989) είναι:

- Η θερμοκρασία

Σαν ευρύθερμο είδος, το λαβράκι συναντάται το χειμώνα σε θερμοκρασίες 5-6°C και το καλοκαίρι σε θερμοκρασίες 27-29°C, σε λιμνοθάλασσες της βόρειας και νότιας Μεσογείου, αντίστοιχα.

- Η αλατότητα (Salinity)

Σαν ευρύαλο είδος, το λαβράκι απαντάται σε νερά με αλατότητα από 0.5 έως και 90‰. Πάντως, οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης είναι μεταξύ 20 και 30‰.

- Το διαλυμένο οξυγόνο (Dissolved Oxygen)

Καθώς στο φυσικό περιβάλλον το οξυγόνο βρίσκεται σχεδόν πάντα κοντά στο επίπεδο κορεσμού, σπανίως παρατηρούνται μαζικοί θάνατοι του είδους από πτώση του διαλυμένου οξυγόνου στο φυσικό περιβάλλον. Στην εκτροφή έχουν μετρηθεί συγκεντρώσεις οξυγόνου μέχρι 2 mg/l, χωρίς να παρουσιαστούν θάνατοι. Σε δεξαμενές εκτροφής γεννητόρων, δεν

παρατηρούνται προβλήματα για συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου μέχρι και 3 mgr/lit, αλλά τα αυγά τα οποία λαμβάνονται δεν είναι βιώσιμα.

• Το είδος του βιότοπου

Συναντάται σε όλα τα είδη βιοτόπων, τόσο σε βραχώδεις, όσο και σε αμμώδεις περιοχές, καθώς και σε φυκιάδες. Όλα τα στάδια του είδους μπορούν να συναντηθούν σε μικρά βάθη, μόλις από 0.10 m. Μεγάλα άτομα του είδους αλιεύονται και σε βάθη μέχρι 90 m.

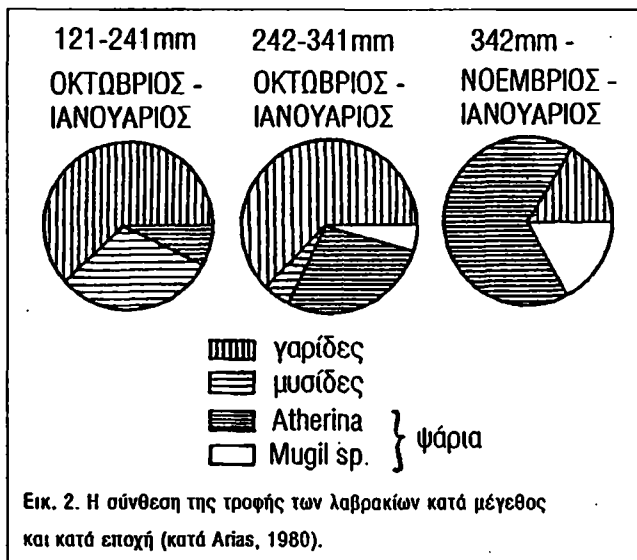
• Η θολερότητα

Το λαβράκι φαίνεται ότι προτιμάει τα ταραγμένα και θολά νερά των εκβολών των ποταμών, ή των παράκτιων περιοχών κατά τις θαλασσοταραχές. Η συχνότητα εμφάνισης του είδους σε αυτές τις περιοχές, συνδέεται με την εποχή της έντονης τροφοληψίας του.

• Διατροφή στο φυσικό περιβάλλον

Το λαβράκι ανήκει στην κατηγορία των σαρκοφάγων και αρπακτικών ψαριών. Ο τύπος πέψεως, τα είδη των ενζύμων που εκκρίνονται στον πεπτικό σωλήνα και ο τύπος των δοντιών, ερμηνεύουν απόλυτα αυτό το χαρακτηριστικό.

Μετά από έρευνες που έχουν γίνει πάνω στη διατροφή του είδους στο φυσικό περιβάλλον σε σχέση με την ηλικία, την εποχή και το περιεχόμενο των στομαχιών, έχει διαπιστωθεί ότι η βάση της διατροφής του ζώου αποτελείται από καρκινοειδή και μικρού μεγέθους ψάρια, κυρίως αφρόψαρα, όπως αθερίνες, σαρδέλλες και μικρά κεφαλόπουλα (εικ. 2).



Εικ. 2. Η σύνθεση της τροφής των λαβρακίων κατά μέγεθος και κατά εποχή (κατά Αγίας, 1980).

Σε άτομα μικρότερα από 40 cm, η διατροφή αποτελείται κατά 70-80% από αμφίποδα και κατά 20-30% από διάφορες προνύμφες εντόμων (χειρονομίδες), ενώ τα άτομα με μέγεθος μεγαλύτερο από 40 cm διατρέφονται κατά 80% από ψάρια και κατά 20% από καρκινοειδή και μαλάκια. Το λαβράκι είναι θηρευτής που κυνηγά ατομικά στο επιφανειακό υδάτινο στρώμα, επιτιθέμενο στη λεία του από κάτω, και αφού την επιλέξει (ώστε να ταιριάζει στις διαστάσεις του στόματός του) επιτίθεται, την αρπάζει και φεύγει. Πάνω στη διατροφή του έχουν γίνει πάρα πολλές έρευνες που αφορούν την ποιοτική και ποσοτική σύνθεση της τροφής του λαβρακίου στο

φυσικό περιβάλλον. Αυτές οι έρευνες έχουν δείξει τη μεγαλύτερη κατανάλωση τροφής κατά τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Αύγουστο.

1.6. Αναπαραγωγή

Στην περιοχή της Μεσογείου θάλασσας, η ωρίμανση των γονάδων αρχίζει το Δεκέμβριο και φθάνει στην ολοκλήρωσή της στο τέλος του ίδιου μήνα ή τον Ιανουάριο, όταν η θερμοκρασία του νερού κατέβει περίπου στους 12°C. Ακολουθεί η αναπαραγωγή, η οποία ολοκληρώνεται κατά το τέλος Μαρτίου με αρχές Απριλίου.

Στον Ατλαντικό ωκεανό η περίοδος αναπαραγωγής είναι μετατοπισμένη κατά 2-3 μήνες σε σχέση με αυτή της Μεσογείου, και πραγματοποιείται όταν η θερμοκρασία νερού κυμαίνεται σε 11-14°C. Όσον αφορά τη διαφοροποίηση του φύλου, το λαβράκι είναι είδος γονοχωριστικό, παρά το γεγονός ότι στην οικογένεια των *Serranidae* όπου ανήκει, ο ερμαφροδιτισμός είναι συχνό φαινόμενο.

Τα αρσενικά άτομα, έχει παρατηρηθεί ότι ωριμάζουν γεννητικά νωρίτερα από ότι τα θηλυκά. Στη Μεσόγειο, ώριμα γεννητικά αρσενικά άτομα βρίσκονται σε ηλικία 2-3 ετών με μήκος σώματος 23-34 cm, και θηλυκά 3-5 ετών με μήκος σώματος 31-40 cm.

Η γονιμοποίηση στο λαβράκι είναι εξωτερική. Το θηλυκό ελευθερώνει τα αυγά του, τα οποία γονιμοποιούνται από το σπέρμα του αρσενικού. Η σεξουαλική συμπεριφορά, τόσο στο φυτικό περιβάλλον όσο και στις δεξαμενές, έχει μελετηθεί και είναι η ίδια. Τα αρσενικά κολυμπούν απαλά πίσω και λίγο υψηλότερα από το θηλυκό, το οποίο ακολουθούν στις αργές μετατοπίσεις του. Το θηλυκό χαρακτηρίζεται από μία διεσταλμένη κοιλιακή χώρα. Τα αρσενικά που ακολουθούν το θηλυκό είναι, κατά κανόνα, μικρότερου μεγέθους, συνήθως δύο και σπάνια τρία στον αριθμό.

1.7. Γεννητικοί αδένες, κλίμακα γεννητικής ωριμότητας

Οι γεννητικοί αδένες στα ανώριμα άτομα, μοιάζουν με δύο λεπτά κορδόνια που ξανασυναντώνται στο ύψος του γεννητικού στομίου. Στα ενήλικα άτομα οι αδένες αυτοί έχουν στα δύο φύλα διαφορετική μορφολογία. Οι όρχεις είναι υπόλευκοι, υποτριγωνικού σχήματος, ενώ οι ωοθήκες έχουν χρώμα κίτρινο-πορτοκαλί και είναι περισσότερο κυλινδρικού σχήματος. Η εξέλιξη της γεννητικής ωριμότητας έχει καθοριστεί από τον Barnabe (1976) και έχει ως εξής:

1ο ΣΤΑΔΙΟ

Νεαρά άτομα, οι γονάδες είναι άχρωμες και νηματοειδείς. Το φύλο δεν μπορεί να προσδιοριστεί (εικ. 3).

2ο ΣΤΑΔΙΟ

Ανώριμα άτομα με φύλο που μπορεί να καθοριστεί. Στα θηλυκά άτομα η ωοθήκη παίρνει ένα χρώμα προς το κρεμ, η διάμετρος φθάνει τα 0.50 cm περίπου. Στα αρσενικά άτομα οι όρχεις έχουν τριγωνική τομή και είναι διαφανείς.

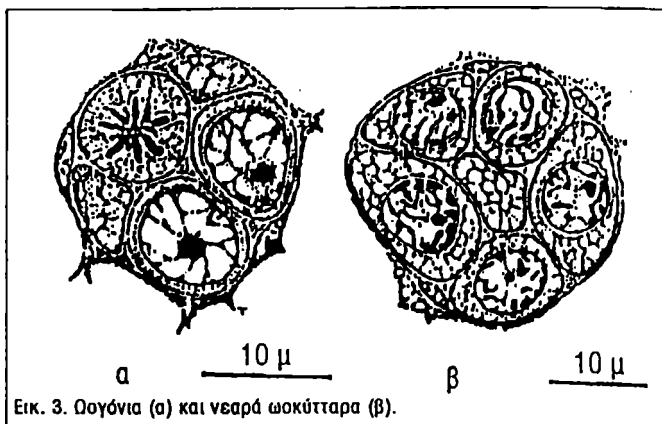
Κανένα ωοκύτταρο δεν είναι ορατό με γυμνό μάτι. Στο μικροσκόπιο σε μερικούς πυρήνες παρατηρούνται χρωματοσώματα με χαρακτηριστική όψη φτερωτής κλωστής. Διακρίνονται τρεις (3) ζώνες στο κυτταρόπλασμα. Μία φλοιώδης, μία ενδιάμεση και μία περί του πυρήνα (εικ. 4).

3ο ΣΤΑΔΙΟ

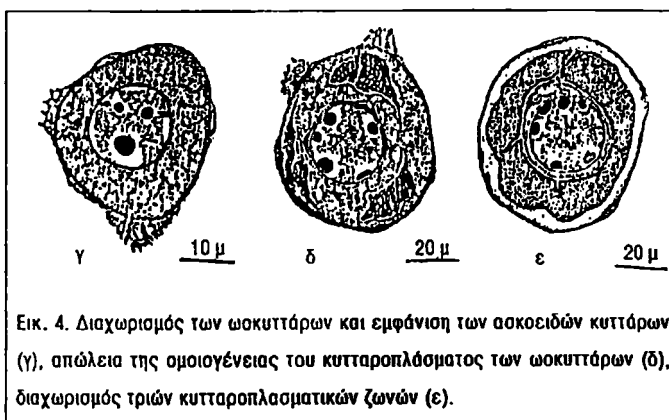
Η ωοθήκη με χαρακτηριστικό κρεμ χρώμα, παρουσιάζει μια γρανιτώδη υφή με πολλά πολυεδρικά ωοκύτταρα. Η ωοθήκη είναι συμπαγής, με διάμετρο 1 cm. Οι όρχεις εξελίσσονται ως προς το χρώμα τους προς γκρι-ροζ (εικ. 5).

4ο ΣΤΑΔΙΟ

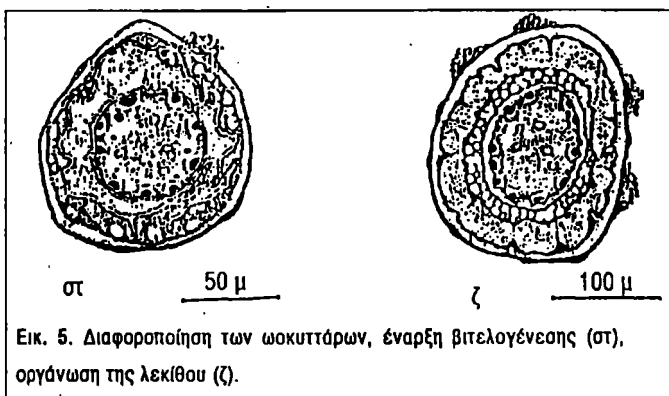
Η ωοθήκη έχει αποκτήσει ένα πορτοκαλί χρώμα και αρχίζει να φουσκώνει, πλησιάζοντας το μεγαλύτερο μέγεθός της, περίπου



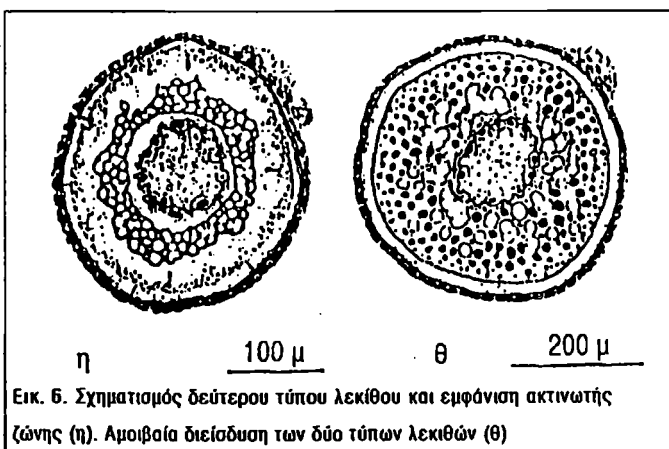
Εικ. 3. Οογόνια (α) και νεαρά ωοκύτταρα (β).



Εικ. 4. Διαχωρισμός των ωοκυττάρων και εμφάνιση των ασκοειδών κυττάρων (γ), απώλεια της ομοιογένειας του κυτταροπλάσματος των ωοκυττάρων (δ), διαχωρισμός τριών κυτταροπλασματικών ζωνών (ε).



Εικ. 5. Διαφοροποίηση των ωοκυττάρων, έναρξη βιτελογένεσης (στ), οργάνωση της λεκίθου (ζ).

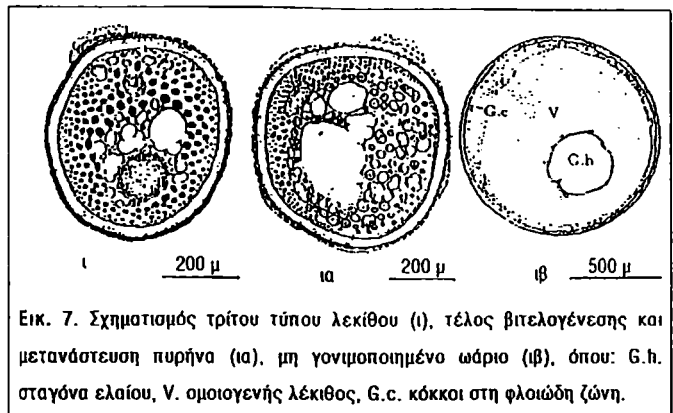


Εικ. 6. Σχηματισμός δεύτερου τύπου λεκίθου και εμφάνιση ακτινωτής ζώνης (η). Αμοιβαία διείσδυση των δύο τύπων λεκίθων (θ)

μέχρι 1.5 cm. Τα ωοκύτταρα είναι πλέον καλώς ορατά και αδιαφανή. Οι όρχεις είναι λευκοί. Σπέρμα υπάρχει μόνο στο κεντρικό τμήμα (εικ. 6).

5ο ΣΤΑΔΙΟ

Το γεννητικό υλικό αποβάλλεται μόλις ασκηθεί πίεση στην κοιλιά. Η περίοδος κατά την οποία μπορεί να αποβληθεί το σπέρμα στα αρσενικά, είναι μεγάλη σε σχέση με την ωορρηξία των θηλυκών. Η ωορρηξία γίνεται συγχρόνως με ένα πολύ ισχυρό φούσκωμα της κοιλιάς, το



Εικ. 7. Σχηματισμός τρίτου τύπου λεκίθου (i), τέλος βιτελογένεσης και μετανάστευση πυρήνα (ia), μη γονιμοποιημένο ωάριο (ib), όπου: G.h. σταγόνα ελαίου, V. ομοιογενής λέκιθος, G.c. κόκκοι στη φλοιώδη ζώνη.

οποίο συνδέεται με μία αύξηση του μεγέθους των ωοκυττάρων λόγω απορρόφησης νερού (φαινόμενο ενυδάτωσης). Η ενυδάτωση προηγείται κατά δύο ημέρες της ωοτοκίας. Η διάμετρος των ωοκυττάρων είναι περί τα 600 μ.

Τη στιγμή της ωοτοκίας το αυγό έχει την όψη μιας διαφανούς σφαίρας, μέσα στην οποία η λέκιθος σχηματίζει μία ομοιογενή κεντρική μάζα με ένα ή δύο σταγονίδια ελαίου (εικ. 7).

6ο ΣΤΑΔΙΟ

Χαρακτηρίζεται από τη μείωση του όγκου των γεννητικών αδένων και στα δύο φύλα είναι το στάδιο της γεννητικής ανάπαυσης.

1.8. Φάσεις ανάπτυξης

Από βιολογικής πλευράς οι φάσεις ανάπτυξης που διέρχεται το ψάρι από την εκκόλαψη μέχρι την αναπαραγωγική του ωριμότητα είναι τέσσερις (4), και κάθε μία χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα γνωρίσματα που απορρέουν από την ανατομική και φυσιολογική εξέλιξή του. Οι φάσεις αυτές είναι:

α) Φάση λεκιθοφόρου ιχθυδίου (προνύμφη)

Καλύπτει το χρονικό διάστημα από την εκκόλαψη μέχρι την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκκου και τη λήψη εξωτερικής τροφής από το στόμα. Η διάρκειά της εξαρτάται από τη θερμοκρασία του νερού, και κυμαίνεται από 3 ημέρες (23°C) έως 10 ημέρες (13°C). Συνήθως στη φύση διαρκεί 7 ημέρες. Χαρακτηριστικό αυτής της φάσης είναι η σταδιακή εξέλιξη της συμπεριφοράς πλεύσεως και η απόκτηση ενεργούς κολυμβητικής δυνατότητας εντός 4-5 ημερών, ακολουθώντας της εξής πορεία:

1η ημέρα:	Αρχική ακινησία, μικρές μετακινήσεις
2η ημέρα:	Κατακόρυφες μετακινήσεις
3η ημέρα:	Πλάγιες μετακινήσεις
4η-5η ημέρα:	Οριζόντια μετακίνηση και ολοκλήρωση της δυνατότητας μετακίνησης προς κάθε κατεύθυνση. Η παραπάνω περίοδος συνδέεται με την ανατομική και λειτουργική τελειοποίηση της νυκτικής κύστης και πλευρικής γραμμής, η οποία και καθορίζει την κολυμβητική ικανότητα. Τις επόμενες ημέρες εμφανίζονται σταδιακά τα φαινόμενα του φωτοτακτισμού και ρεοτακτισμού.

β. Φάση ατελών ιχθυδίων (νυμφών)

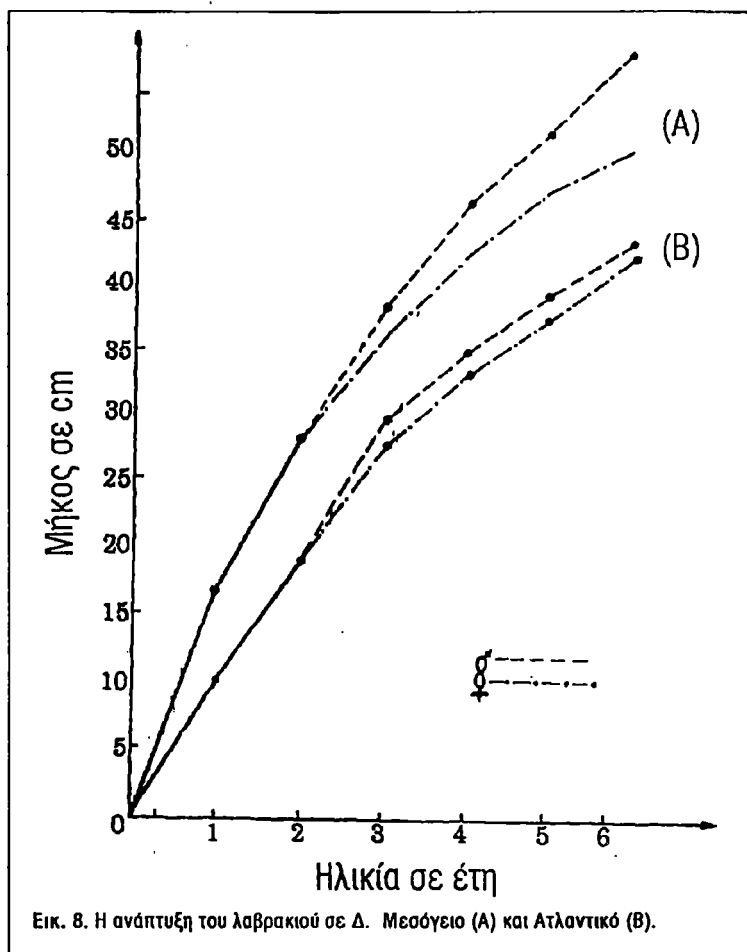
Αποτελεί συνέχεια της προηγούμενης και ολοκληρώνεται με την πλήρη ανατομική εξέλιξη του μυϊκού συστήματος (σωμίτες), των οργάνων αναπνοής (βράγχια) και των πτερυγίων. Η φάση ολοκληρώνεται την 40η-45η ημέρα. Χαρακτηριστικό της φάσης αυτής είναι η δυνατότητα αναζήτησης τροφής, η οποία αποτελείται αποκλειστικά από ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς.

γ. Φάση τέλειων ιχθυδίων

Η διάρκεια της φάσης αυτής συνδέεται με τη σωματική ανάπτυξη και αύξηση μέχρι τη γεννητική ωρίμανση. Το είδος της διατροφής εξαρτάται από την εποχή, την περιοχή διαβίωσης και το μέγεθος του ψαριού.

δ. Φάση ώριμων ατόμων

Αποτελεί την τελευταία φάση του βιολογικού κύκλου, και επεκτείνεται από την έναρξη της περιόδου αναπαραγωγής μέχρι το τέλος της ζωής του ζώου. Το λαβράκι εισέρχεται σ' αυτή τη φάση κατά το 2ο ή 3ο έτος της ζωής του, παράλληλα με την απόκτηση βάρους 300 gr περίπου. Οι ρυθμοί ανάπτυξης του λαβρακιού στο φυσικό περιβάλλον μπορούν να εκτιμηθούν από την κατά μήκος και την κατά βάρος αύξηση. Αυξήσεις, τόσο κατά μήκος όσο και κατά βάρος, εξαρτώνται από πάρα πολλούς παράγοντες, οι κυριώτεροι των οποίων είναι η θερμοκρασία και η αλατότητα. Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται η ανάπτυξη του λαβρακιού σε πληθυσμούς του Ατλαντικού και σε πληθυσμούς της Μεσογείου. Στους πρώτους παρατηρείται μια καθυστέρηση σε σχέση με αυτής της Μεσογείου, λόγω χαμηλότερων μέσων θερμοκρασιών του νερού. Κατά τους χειμερινούς μήνες, όταν η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από 12°C περίπου, η ανάπτυξη αναστέλλεται, έστω και αν τα ψάρια διατρέφονται. Αντιθέτως, ο ρυθμός ανάπτυξης αποκτά τις μέγιστες τιμές του όταν η θερμοκρασία νερού ανέρχεται και κυμαίνεται από 18 έως 28°C.



Το λαβράκι έχει μία μέγιστη τιμή του ρυθμού αύξησης από τον Ιούνιο μέχρι τον Οκτώβριο, και μια επιβραδυνόμενη ή μηδενική αύξηση από Νοέμβριο έως Μάιο. Μετά το τέλος του 3ου έτους της ηλικίας, η αύξηση των θυλικών είναι ελαφρώς ανώτερη εκείνης των αρσενικών.

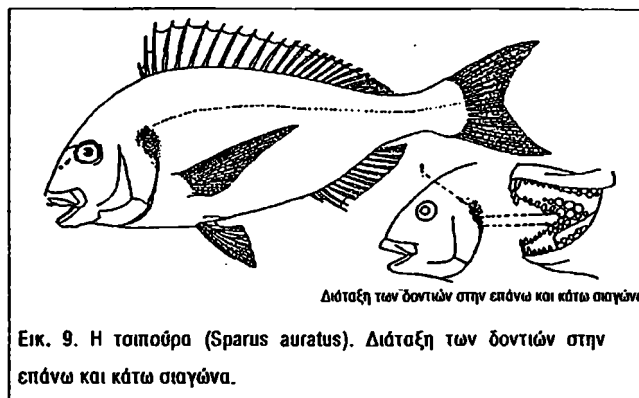
Στη Μεσόγειο η μέση αύξηση που παρατηρείται φανερώνει ότι το λαβράκι φθάνει στο ελάχιστο εμπορεύσιμο μέγεθος μετά το τέλος του δεύτερου καλοκαιριού (28.3 cm ή 213.6 gr), πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η ταχύτητα ανάπτυξής του μεταβάλλεται, ανάλογα με τις γεωγραφικές συνθήκες. Για παράδειγμα, στις ακτές του Ατλαντικού ωκεανού (Ισπανία, Πορτογαλία, Γαλλία), το εμπορεύσιμο μέγεθος επιτυγχάνεται σε 3 χρόνια (23-29 cm), ενώ στην Ιρλανδία σε 4 χρόνια (28.5 cm).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η τσιπούρα (*Sparus auratus*)

2.1. Συστηματική κατάταξη

Συνομοταξία:	Χορδωτά
Υποσυνομοταξία:	Σπονδυλωτά
Υπερομοταξία:	Γναθοστόματα
Ομάδα:	Ιχθύες
Ομοταξία:	Οστεϊχθύες
Υφομοταξία:	Κρασοπτερύγια
Τάξη:	Perciformes
Υπόταξη:	Percoidei
Οικογένεια:	Sparidae
Γένος:	Sparus
Είδος:	<i>Sparus auratus</i>



Συνώνυμα	Ξένες ονομασίες
<i>Sparus auratus</i> (Linnaeus, 1758)	Αγγλ.: Gilthead bream, Gilthead seabream
<i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)	Γαλλ.: Dorade, Dorade royal
<i>Chrysophrys aurata</i> (Cuvier, 1817)	Γερμ.: Goldbrassen
	Ιταλ.: Drada

2.2. Μορφολογία

Η τσιπούρα και τα λοιπά είδη της οικογένειάς της σχηματίζουν, από μορφολογική άποψη, ένα αρκετά ομοιογενές σύνολο ειδών που χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και συμπιεσμένο πλευρικά σώμα. Η διάμετρος του ματιού της είναι ίση με το 1/5 του μήκους του κεφαλιού. Η κάτω γνάθος είναι ελαφρά μικρότερη από την άνω, και υπάρχουν 4 με 6 κυνοδοντόμορφα δόντια στο μπροστινό μέρος κάθε γνάθου. Έχει επίσης 3 με 5 σειρές γομφιόμορφων δοντιών στην κάτω γνάθο και 3 με 4 στην άνω, ενώ τα 1 με 2 τελευταία δόντια κάθε γνάθου έχουν μεγάλο μέγεθος.

Στα βραγχιακά τόξα υπάρχουν 7 με 8 βραγχιακές άκανθες πολύ κοντά μεταξύ τους. Στο ρύγχος δεν υπάρχουν λέπια. Το μακρύ ραχιαίο πτερύγιο έχει 11 σκληρές και 12 με 13

μαλακές άκανθες, ενώ το εδρικό έχει 3 σκληρές και 11 με 12 μαλακές άκανθες. Τα λέπια είναι κτενοειδή, και στην πλευρική γραμμή υπάρχουν 73 με 85. Τα θωρακικά πτερύγια είναι μεγάλα και οξύλικτα, ενώ τα κοιλιακά είναι πολύ πιο μικρά. Έχει 4 πυλωρικές αποφύσεις. Το έντερό της είναι ευθύ και κοντό· είναι ανθεκτικό στα σχισίματα που τυχόν προκαλούνται από κελύφη οστρακοειδών.

Το χρώμα της ράχης της είναι γκριζογάλανο και στα πλευρά επικρατεί το ασημένιο, ενώ υπάρχουν και λεπτές οριζόντιες γκρι γραμμές. Ανάμεσα στα μάτια υπάρχει μία μαύρη χαρακτηριστική λουρίδα, καθώς και μία χρυσαφένια. Το πάνω μέρος του κεφαλιού είναι μαύρο, και η απόχρωση φθάνει μέχρι το βραγχιακό επικάλυμα, που καταλήγει σε κοκκινωπή άκρη.

Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φθάσει είναι 70 cm, με συνηθισμένο τα 20 με 30 cm, και το μέγιστο βάρος φθάνει τα 5 kg, με συνηθισμένο το 1.5 με 2 kg.

Ζει κοντά σε ακτές, σε βάθος από 5 μέχρι 30 m, και είναι ευαίσθητη σε χαμηλές θερμοκρασίες. Είναι ευρύαλο ψάρι και προτιμάει αλατότητες από 25 έως 42‰. Είναι ευαίσθητη στην έλλειψη οξυγόνου. Μερικά από τα είδη της οικογένειας αυτής διαβιούν μέσα στις λιμνοθάλασσες.

2.3. Βιολογικός κύκλος - Ερμαφροδιτισμός

Στην τσιπούρα έχει αποδειχθεί η ύπαρξη ενός πρωτανδρικού ερμαφροδιτισμού. Σύμφωνα με αυτόν, όλος ο πληθυσμός μέχρι το τέλος του 2ου έτους λειτουργεί σαν ένα σύνολο αρσενικών ατόμων. Από το τέλος του 2ου και αρχή του 3ου έτους, λαμβάνει χώρα αλλαγή φύλου και αρχίζουν να εμφανίζονται θηλυκά άτομα. Παρόλ' αυτά, η σεξουαλική αναστροφή δε φαίνεται να επηρεάζει το σύνολο των ατόμων, αφού μερικά από αυτά παραμένουν αρσενικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Για τους παράγοντες που καθορίζουν αυτή την αντιστροφή δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις. Υποστηρίζεται ότι, εκτός από την ηλικία, είναι πιθανόν το βάρος των ψαριών και η διατροφή τους να επηρεάζει αυτό το φαινόμενο.

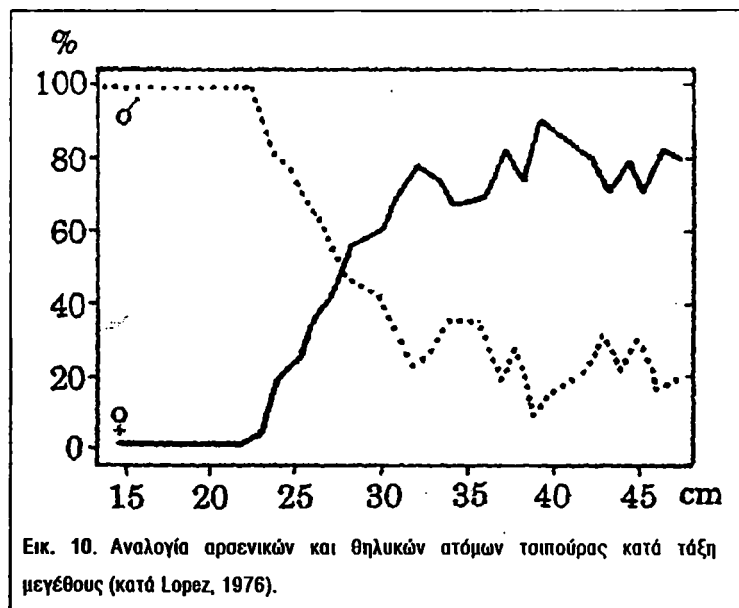
Στον πίνακα 1 παρουσιάζεται η αναλογία των φύλων σε σχέση με την ηλικία τους. Στο 1ο και στο 2ο έτος, το 100% των ατόμων του δείγματος είναι αρσενικά. Στο 3ο έτος η πλειοψηφία είναι αρσενικά, ενώ στο 4ο πλειοψηφούν τα θηλυκά άτομα. Στη συνέχεια, οι τσιπούρες οι μεγαλύτερες του 5ου έτους, εμφανίζονται όλες θηλυκές. Όσον αφορά τη σχέση του μήκους των ατόμων και του φύλου (εικ. 10), τα άτομα κάτω από 360 mm είναι συνήθως όλα αρσενικά, ενώ πάνω από 503 mm είναι μόνο θηλυκά. Τέλος, όσον αφορά το βάρος, άτομα μέχρι 200 gr είναι συνήθως αρσενικά, και στη συνέχεια αλλάζουν φύλο.

Παρατηρώντας τις γονάδες, μπορούμε να διακρίνουμε 5 φάσεις που χαρακτηρίζουν την αντιστροφή του φύλου (εικ. 11). Στα νεαρά άτομα (φάση α,β) είναι χαρακτηριστικοί οι αρσενικοί αδένες, οι οποίοι συνήθως παρουσιάζονται περισσότερο διηρημένοι. Μερικές φορές μπορεί να εντοπιστεί η αρχή μιας ωοθήκης (ένα στενό φιλέτο).

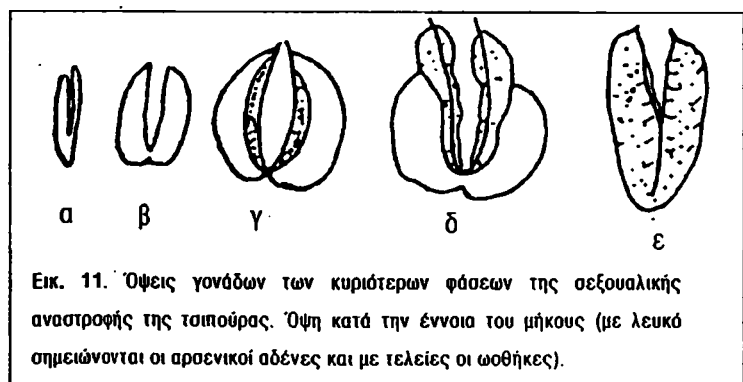
ΗΛΙΚΙΑ (ΕΤΗ)	ΑΡΣΕΝΙΚΑ	ΘΗΛΥΚΑ
1	100%	-
2	100%	-
3	84.3%	15.7%
4	12.1%	87.9%
5	-	100%
6	-	100%

Πίνακας 1. Ποσοστό αρσενικών και θηλυκών ατόμων, ανάλογα με την ηλικία στην τσιπούρα (κατά Αρίας, 1980)

Στα άτομα 2 ετών, οι αρσενικοί γεννητικοί αδένες είναι πεπλατυσμένοι, τριγωνικής μορφής (φάση γ), και συγχρόνως αρχίζει να αναπτύσσεται η ωοθήκη στην κοιλότητα, κατά μήκος του αρσενικού γεννητικού αδένα. Μετά το 3ο έτος, η πρόοδος της αναστροφής του φύλου είναι σημαντική (φάση δ), και συνυπάρχουν στο ίδιο περίπου μέγεθος οι αρσενικοί και θηλυκοί αδένες, αλλά σε αυτή τη φάση τα άτομα λειτουργού σαν αρσενικά. Τέλος (στη φάση ε), η αναστροφή έχει ολοκληρωθεί με την ανάπτυξη των ωοθηκών και την πλήρη ατροφία των αρσενικών αδένων.



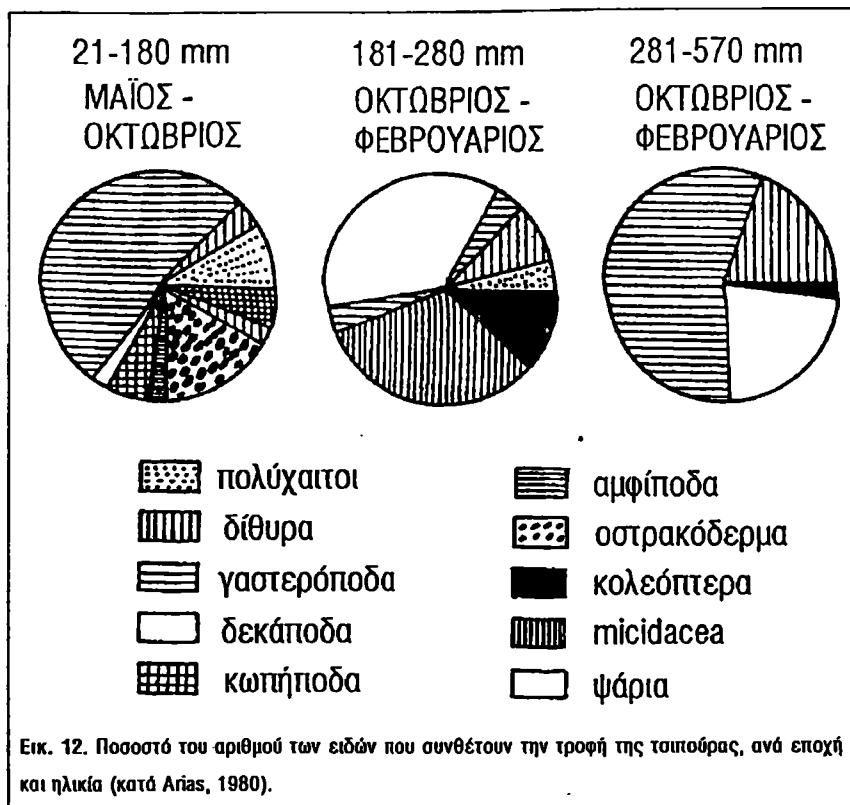
Εικ. 10. Αναλογία αρσενικών και θηλυκών ατόμων τσιπούρας κατά τάξη μεγέθους (κατά Lopez, 1976).



Εικ. 11. Όψεις γονάδων των κυριότερων φάσεων της σεξουαλικής αναστροφής της τσιπούρας. Όψη κατά την έννοια του μήκους (με λευκό σημειώνονται οι αρσενικοί αδένες και με τελείες οι ωοθήκες).

2.4. Διατροφή στο φυσικό περιβάλλον

Έχει αποδειχθεί ότι οι διατροφικές συνήθειες της τσιπούρας εξαρτώνται από το μέγεθός της. Τα μικρής ηλικίας ιχθύδια τρέφονται κυρίως με πολύχαιτους και μικρού μεγέθους καρκινοειδή (εικ. 12).



2.5. Ανάπτυξη

Η τσιπούρα είναι είδος που χαρακτηρίζεται από πολύ γρήγορη ανάπτυξη, και ακριβώς αυτό προσδίδει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον για τις καλλιέργειες. Μια τσιπούρα 3 ετών μπορεί να φθάσει σε μήκος 40-45 cm και βάρος 600-800 gr σε υφάλμυρα νερά, και σε μήκος 25-30 cm με βάρος 400-500 gr σε αλμυρά νερά (θάλασσα).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ & ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας εργασίας θα γίνει αναφορά στις κυριότερες ασθένειες που προσβάλλουν την τσιπούρα και το λαβράκι, υπό συνθήκες καλλιέργειας, καθ' όλα τα στάδια εκτροφής και, κυρίως, κατά το στάδιο της πάχυνσης. Οι ασθένειες διακρίνονται σε μολυσματικές (ιογενείς, μικροβιακές και παρασιτικές) και σε μη μολυσματικές. Επίσης, γίνεται μία αναφορά στη χρήση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και των εμβολίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.1. Ιογενείς ασθένειες (*Viral diseases*)

1.1.1. Μολυσματική Νέκρωση του Παγκρέατος (*Infectious Pancreatic Necrosis - I.P.N.*)

Η μολυσματική νέκρωση του παγκρέατος οφείλεται σε εικοσαεδρικό ιό χωρίς φάκελο, διαμέτρου 70 nm. Το RNA που περιέχεται, αποτελείται από δύο τμήματα διπλοτυλιγμένα.

Μετάδοση

Η μετάδοση της νόσου γίνεται οριζόντια και κάθετα. Προσβάλλει υγιείς λάρβες λαβρακίου (P. Christofilogiannis, 1992).

Στα νεαρά καλλιεργούμενα άτομα έχουμε χρόνια επίμονη μόλυνση, και ο ιός απομονώνεται από πολλά όργανα και κυρίως από τον νεφρό, ενώ απεκκρίνεται με τα κόπρανα και τα γεννητήσια προϊόντα (αυγά και σπέρμα). Η εμφάνιση της νόσου επιτυγχάνεται από παράγοντες στρες, όπως είναι ο υπερπληθυσμός, το υποβαθμισμένο περιβάλλον και η κακή διαχείριση. Η παθογένεια δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένη. Θεωρείται ότι γίνεται μέσω των βραγχίων και του πεπτικού συστήματος (προκειμένου για την οριζόντια μετάδοση βέβαια).

Κλινικά συμπτώματα και νεκροτομικά ευρήματα

Συνήθως, τα μεγαλύτερα ιχθύδια πεθαίνουν. Τα άρρωστα ψάρια εμφανίζουν σκούρο χρωματισμό, κολυμπούν με χαρακτηριστικές σπειροειδείς κινήσεις, έχουν εξοφθαλμία και διόγκωση της κοιλιάς. Οι απώλειες είναι μαζικές ή λίγες-λίγες, ανάλογα με τη μορφή που έχει η νόσος. Νεκροτομικά, ο παγκρεατικός ιστός εμφανίζει στικτές αιμορραγίες, ενώ το ήπαρ και ο σπλήνας είναι συχνά διογκωμένα και ωχρά. Η τροφή απουσιάζει από το στομάχι, αλλά πολύ συχνά βρίσκουμε στο έντερο καταρροϊκό έκκριμα.

Ιστοπαθολογία

Το μόνο ιστοπαθολογικό εύρημα είναι η εστιακή ή γενικευμένη καταστροφή της εξοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Το έντερο επίσης εμφανίζει χαρακτηριστικές νεκρώσεις του επιθηλίου του. Το επιθήλιο αυτό αποκολλάται και πέφτει στο κοίλο του εντέρου, συνεισφέροντας στο σχηματισμό του καταρροϊκού εκκρίματος. Τα ψάρια που διαφεύγουν τον άμεσο θάνατο, εμφανίζουν υποπλασία και ανάπτυξη ινώδους ιστού στο

πάγκρεας, με αποτέλεσμα την καχεξία τους. Τα ψάρια αυτά επιβιώνουν αρκετό χρονικό διάστημα και γίνονται φορείς της νόσου.

Θεραπεία - προφύλαξη

Δεν υπάρχει θεραπεία. Η προφύλαξη είναι ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος αποφυγής της μόλυνσης. Γι' αυτό το λόγο, δεν πρέπει να περιέχονται άρρωστα ψάρια στο χώρο εκτροφής, ενώ τα αυγά και τα ιχθύδια που εισάγονται, να προέρχονται από εγκαταστάσεις απαλλαγμένες από την νόσο. Η εκκρίωση της νόσου σε μολυσμένους χώρους εκτροφής γίνεται όταν όλα τα προσβεβλημένα ψάρια θανατωθούν, και οι εγκαταστάσεις απολυμανθούν (stamping out).

1.1.2. Λεμφοκύστις (*Lymphocystis*)

Η λεμφοκύστις είναι ασθένεια που οφείλεται σε DNA ιριδοϊό εικοσαεδρικού σχήματος και μεγέθους 300 μ, ο οποίος προσβάλλει τα επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και προκαλεί υπερβολική διόγκωσή τους (υπερπλασία έως 1000 φορές του αρχικού τους μεγέθους). Τα διογκωμένα κύτταρα φαίνονται μακροσκοπικά, υπό τη μορφή λευκών κύστεων μεγέθους κεφαλής καρφίτσας. Αναπτύσσονται προσομοιάζοντας τη μορφή σταφυλιού ή κουνουπιδιού.

Εντοπίζονται κυρίως στα θωρακικά, ραχιαίο και ουραίο πτερύγιο του ψαριού, και μερικές φορές στο δέρμα του κορμού των ψαριών (εικ. 1 παραρτήματος). Τα σωματίδια του ιού αναπτύσσονται στο κυτταρόπλασμα με χαρακτηριστική διάταξη (σε σειρές), που φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η διάγνωση μπορεί να γίνει με νωπά παρασκευάσματα, καθώς και κοινή ιστολογία. Και με τις δύο τεχνικές καθίστανται εμφανή τα γιγαντιαία επιθηλιακά κύτταρα, εξαιτίας της παρουσίας του ιού. Αρχικά, λόγω της ενδοκυτταρικής εντόπισης, ο ιός ξεφεύγει την αμυντική αντίδραση του οργανισμού. Αργότερα όμως, οι αλλοιώσεις οργανοποιούνται, οι πρώτες κύστεις σπάζουν, ο ιός εντοπίζεται από το αμυντικό σύστημα του οργανισμού και καταπολεμάται αποτελεσματικά. Πρόκειται δηλαδή για αυτοϊάσιμη νόσο.

Η ασθένεια παρατηρείται σε συνθήκες καλλιέργειας μόνο σε τσιπούρες (όλα τα μεγέθη). Επίσης, έχει παρατηρηθεί και σε άγρια άτομα τσιπούρας και γλώσσας. Η νόσος εμφανίζεται υπό μορφή επιζωοτίας σε παρτίδες γόνου, ιχθύδια (τσιπούρας) μεγέθους 1-2 gr) από μολυσμένους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, αρχίζοντας περίπου 6-10 ημέρες μετά την εγκατάσταση των ψαριών στους ιχθυοκλωβούς. Τα ψάρια στους εν λόγω

ιχθυογεννητικούς σταθμούς δεν εμφανίζουν μακροσκοπικά συμπτώματα. Είναι φορείς του ιού, και το στρες της μεταφοράς προκαλεί την εμφάνιση της νόσου.

Οι απώλειες που προκαλούνται από τη λεμφοκύστη κυμαίνονται από ασήμαντες έως μικρές (2-15%) και οφείλονται κυρίως στον καννιβαλισμό (οι αλλοιώσεις των πτερυγίων μειώνουν την κινητικότητα των ασθενών ψαριών που δεν μπορούν να αποφύγουν τα δαγκώματα των υγιών) και σε δευτερογενείς μυκοβακτηριακές μολύνσεις. Αν η μεταφορά γίνει κατά τους χειμερινούς μήνες, η ασθένεια είναι αυτοϊάσιμη, αλλά η εξέλιξή της είναι πιο αργή και μπορεί να διαρκέσει αρκετούς μήνες (συνήθως η πλήρης ίαση επέρχεται με την άνοδο των θερμοκρασιών στο τέλος της άνοιξης). Αν η μεταφορά του γόνου λάβει χώρα τους καλοκαιρινούς μήνες (θερμοκρασία >20°C), η εξέλιξη της αρρώστιας έχει ως εξής: Τα μακροσκοπικά συμπτώματα αναπτύσσονται μέσα σε μία εβδομάδα σε ένα ποσοστό 10-100% του ιχθυοαποθέματος. Η ασθένεια αυτοϊάται, οι αλλοιώσεις εκφυλίζονται και τα συμπτώματά της εξαφανίζονται πλήρως σε 25-30 ημέρες από την πρώτη εμφάνισή τους.

Η ασθένεια, σε συνθήκες καλλιέργειας, μεταδίδεται πολύ δύσκολα από κλουβί σε κλουβί. Τα ψάρια που νοσούν αναπτύσσουν ανοσία στον ιό και δεν ξαναμολύνονται. Καλό είναι να χορηγείται προφυλακτική αντιβίωση στη διάρκεια εμφάνισης της νόσου, ώστε να καταπολεμούνται οι δευτερογενείς μολύνσεις. Η επιζωοτολογία της ασθένειας δεν έχει μελετηθεί σε βάθος. Αφού όμως τα άγρια ψάρια είναι οι δεξαμενές του ιού, είναι λογική η υπόθεση ότι η νόσος εισάγεται στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς με τους άγριους γεννήτορες, οι οποίοι ακολούθως την διασπείρουν στα ευαίσθητα παράγωγά τους.

Οπωσδήποτε, αποφασιστικό ρόλο για την καταπολέμηση παρόμοιου τύπου διασποράς της μόλυνσης παίζουν τα κατάλληλα υγειονομικά μέτρα (απομονώσεις γεννητόρων, απολυμάνσεις εξοπλισμού κ.λπ.). Πρακτική που πρέπει να είναι αναπόσπαστη από την καλή λειτουργία κάθε ιχθυογεννητικού σταθμού.

1.1.3. Λοιμώδης Αιμορραγική Σηψαιμία (*Viral Haemorrhagic Septicaemia* - V.H.S.)

Το λαβράκι εύκολα και γρήγορα προσβάλλεται από τον V.H.S. ιό, α) με ένεση ή β) από φυσική μόλυνση σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C, αν και κανένα αποτέλεσμα δεν εμφανίζεται στους 20°C.

Υψηλές μολυσματικές δόσεις προκαλούν περισσότερο από 90% θνησιμότητες σε ψάρια στα οποία έχει γίνει ένεση, και γύρω στο 50% θνησιμότητες από μόλυνση προερχόμενη από το νερό. Τα άρρωστα ψάρια εμφανίζουν τα κλασικά συμπτώματα του V.H.S. (μελανός χρωματισμός (σκουροχρωμία), εξοφθαλμία, ληθαργικότητα, μερική αναιμία, πετέχειες

(στικτές αιμορραγίες) των μυών και των βραγχίων, καθώς και μαζικές αιμορραγίες της περιτοναϊκής κοιλότητας).

Ιστοπαθολογία

Τα μικροσκοπικά ευρήματα είναι αυτά που προκαλεί ένας ενδοθηλιοτρόπος ιός. Οι αιμορραγίες βρίσκονται, όπως είναι λογικό, συχνότερα σε όργανα με υψηλή αιμάτωση και σχετίζονται με την αιμοποιητική νέκρωση. Επιπλέον, συνυπάρχουν η υπερπλασία και η εκφύλιση του αιμοποιητικού ιστού σε σπλήνα, νεφρό και ήπαρ. Η εξοφθαλμία, που είναι κοινό σύμπτωμα, δε σχετίζεται με οίδημα της οφθαλμικής χώρας, που συνήθως την προκαλεί, αλλά με αιμορραγία του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού.

Προφύλαξη και θεραπεία

Δεν υπάρχει θεραπεία. Το μόνο αποτελεσματικό μέτρο είναι η αποφυγή της μόλυνσης. Η εκρίζωση της νόσου, όπου παρατηρείται, γίνεται με την θανάτωση όλων των ψαριών, την απολύμανση των εγκαταστάσεων και την αποφυγή της επαναμόλυνσης με την προμήθεια ψαριών από πηγές ελεύθερες της νόσου (*stamping out*). Τα ουδετεροποιημένα αντισώματα του αντι-V.H.S. έχουν βρεθεί στον ορό του λαβρακίου, το οποίο έχει ξεπεράσει τη μόλυνση.

1.1.4. *Distended Gut Syndrome - D.G.S. (Το σύνδρομο των διασταλμένων εντέρων)*

Μερικές φορές οι λάρβες της τσιπούρας δεν δύνανται να πέσουν τα *rotifers* και τους ναύπλιους της *Artemia*, και εμφανίζουν πρησμένη κοιλιά. Κινούνται χωρίς συγκεκριμένο προσανατολισμό, με στροβιλοειδή κίνηση και παρασύρονται παθητικά από το ρεύμα. Υποπτεύεται πως η αιτία του παραπάνω φαινομένου είναι ένας ιός διαμέτρου 80 nm, ο οποίος έχει βρεθεί στο εντερικό τοίχωμα.

1.1.5. *Sea bass birnavirus*

Η παρουσία *birnavirus* (ιού) έχει συνδεθεί με την ύπαρξη μαζικών θανάτων σε λάρβες λαβρακίου στη Γαλλία (σε εκκολαπτήρια), συνήθως 20 ημέρες μετά την εκκόλαψη, σε θερμοκρασία 19°C.

Οι ετοιμοθάνατες λάρβες εμφανίζουν διογκωμένη νηκτική κύστη και χοληδόχο κύστη, εξοφθαλμία, και κινούνται με σπειροειδή κίνηση. Η ιστοπαθολογική εικόνα που παρουσιάζουν είναι υπερτροφία της νηκτικής και της χοληδόχου κύστης.

1.1.6. Ασθένεια των νευρικών συμπτωμάτων στο λαβράκι (*Nervous syndrome in sea bass*)

Η ασθένεια των νευρικών συμπτωμάτων στο λαβράκι είναι μία νέα νόσος. Πρωτοεμφανίστηκε στη Μαρτινίκη σε καλλιεργούμενα λαβράκια κατά το πρώτο έτος της ζωής τους. Πιθανολογείται ότι οφείλεται σε εικοσαεδρικό ιό (*birnavirus*), ο οποίος βρέθηκε ότι προκαλεί βλάβες στα νευρικά κύτταρα, άμεσα συνδεδεμένες με εγκεφαλικές βλάβες (σπογγίωση). Οι βλάβες εντοπίζονται με ιστολογικά παρασκευάσματα του εγκεφάλου και του ματιού του ψαριού από το προσβεβλημένο άτομο. Η ασθένεια αυτή μόλις πρόσφατα εντοπίστηκε και στον Ελλαδικό χώρο σε λαβράκια, σε μονάδες πάχυνσης στον Αργολικό κόλπο, με όλα τα προαναφερθέντα συμπτώματα.

Προκαλεί μεγάλες θνησιμότητες και δεν εφαρμόζεται για την ώρα με μεγάλη επιτυχία (αποτελεσματικότητα) κάποια φαρμακευτική αγωγή.

1.1.7. Ιογενής Εγκεφαλοπάθεια και Αμφιβληστροειδοπάθεια στο λαβράκι (*Viral Encephalopathy and Retinopathy*)

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια -ή ιογενής νευρική νέκρωση (V.N.N.)- είναι μια σχετικά νέα ασθένεια, που εμφανίζεται σε λάρβες και μερικές φορές σε ενήλικα άτομα λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*), καλκανιού (*Scaphthalmus maximus*) και άλλων ειδών (π.χ. *Orhegnathus fasciatus* κ.λπ.)

Χαρακτηριστικό της ασθένειας είναι οι μαζικές (συχνά 100%) θνησιμότητες των προσβεβλημένων ατόμων).

Η αιτιολογία του συνδρόμου (V.N.N.) είναι ένας εικοσαεδρικός, χωρίς φάκελο, ιός, διαμέτρου 25-30nm, ο οποίος μέχρι πρόσφατα περιγράφεται ως *picornavirus*. Ο συνηθισμένος τρόπος μετάδοσης του ιού είναι ο κάθετος. Η διάγνωση βασίζεται σε παρατήρηση στο μικροσκόπιο (οπτικό ή ηλεκτρονικό) και σε πρόσφατα αναπτυγμένες ανασολογικές και μοριακές τεχνικές (μέθοδος ELISA και P.C.R. methods).

Κλινικά συμπτώματα

Τα κλινικά συμπτώματα του V.N.N. είναι τα ακόλουθα:

Ανώμαλη κολυμβητική συμπεριφορά, σπειροειδή κίνηση, πρήξιμο της νυκτικής κύστης, ανορεξία. Εκτός από τις αλλαγές που παρατηρούνται στο χρώμα, δεν υπάρχουν μακροσκοπικά ευρήματα. Ο ελάχιστος χρόνος εμφάνισης της ασθένειας στο λαβράκι είναι 10 μέρες μετά την εκκόλαψη. Η συνήθης "ορμητική" εκδήλωση της ασθένειας είναι 25-40 ημέρες μετά την εκκόλαψη, και η συνήθης αναλογία θνησιμότητας είναι 10% ανά μήνα (10% / μήνα).

Προφύλαξη

Δεν είναι εύκολος, πάντα, ο έλεγχος της ασθένειας, λόγω της κάθετης μετάδοσής της. Εξαρτάται από το είδος του ψαριού που κάθε φορά προσβάλλει αλλά, όπως σε όλες τις ασθένειες που οφείλονται σε ιούς, συνιστάται η αποφυγή της μόλυνσης, βεβαιώνοντας ότι δεν περιέχει ιό το νερό του εκκολαπτηρίου.

Αποφεύγεται η μεγάλη ιχθυοφόρτιση (μείωση της ιχθυοπυκνότητας σε μικρότερο / ίσο από 15-30 λάρβες ανά λίτρο). Επίσης συνιστάται από κάποιους ερευνητές, η μη τακτική ανανέωση - ανακύκλωση του νερού στις δεξαμενές εκτροφής.

Ιστοπαθολογία

Ιστοπαθολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν ο εγκέφαλος και το μάτι, όπου παρατηρείται κενотоποίηση.

1.2. Μικροβιακές ασθένειες

Γενικά, τα μικρόβια που έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις ασθενειών των εν λόγω ψαριών, είναι: **Μυξοβακτήρια, Δονάκια (Vibrio), Παστερέλλες, Αερομονάδες, Ψευδομονάδες**. Είναι όλα μικρόβια Gram αρνητικά, τα οποία φυσιολογικά σαπροφυτούν στο δέρμα, στα βράγχια και στους βλεννογόνους των ψαριών. Παρακάτω εξετάζεται κάθε ομάδα αναλυτικά:

1.2.1. VIBRIONACEAE

1.2.1.1. *Vibrio spp.*

Γενικά

Τα δονάκια (*Vibrio*) αποτελούν τα κύρια παθογόνα μικρόβια της τσιπούρας και του λαβρακίου. Πρωτοαπομονώθηκαν το 1893 από χέλια, από τον Cannestrini. Η νόσος ονομάστηκε αρχικά "ερυθρή πανώλη των χελιών", ενώ το 1974 καθιερώθηκε το όνομα "Vibriosis". Το 1975 η νόσος εντοπίστηκε και στην Ιαπωνία, μετά από μεταφορά μολυσμένων χελιών από την Ευρώπη. Τα κύρια παθογόνα είδη για τα ψάρια θεωρούνται τα: ***Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*** (θεωρείται σαν *V. anguillarum* - ορότυπος II), ***V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. damsela* και *V. vulnificus***.

Μορφολογία - Χαρακτηριστικά

Το μέγεθος του δονακίου (διπολικό βακτήριο με καμπυλωτό σχήμα) είναι 0.5 μ επί 1-2 μ και φέρει μαστίγιο στον ένα πόλο. Είναι Gram αρνητικό, κινητό μικρόβιο, προαιρετικά

αναερόβιο, που δεν παράγει χρωστική, με test οξειδάσης και καταλάσης θετικά, ζυμωτικό στη δοκιμασία Hugh-Leifson (O/F), ευαίσθητο στο βιμπριστατικό (O/129).

Το μικρόβιο απομονώνεται και αναπτύσσεται μετά από καλλιέργεια (24 ωρών στους 24.5°C) σε T.S.A. άγαρ (Tryptic Soy Agar) ή Marine agar ή Brain Heart Infusion agar, εμπλουτισμένα με NaCl (1.5 - 3.5%). Αναπτύσσεται εκλεκτικά στο ειδικό άγαρ T.C.B.S. (Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose agar), με αποικίες χρώματος πράσινου, εκτός του *V. anguillarum*, που σχηματίζει κίτρινες αποικίες οι οποίες αργότερα αποκτούν πράσινο χρώμα. Η ταυτοποίηση γίνεται με βιοχημικά test, όπως το γρήγορο σύστημα ταυτοποίησης API 20E ή με δοκιμή οροσυγκόλλησης.

Επιζωοτιολογία

Η βιμπρίωση είναι η πιο σημαντική νόσος των καλλιεργούμενων και των άγριων θαλασσινών ψαριών, αλλά σημαντικές εξάρσεις έχουν καταγραφεί και σε ψάρια του γλυκού νερού.

Η νόσος παρατηρείται όλο το χρόνο, και κυρίως κατά τους χειμερινούς ή ανοιξιάτικους μήνες, και είναι αρκετά μεταδοτική. Πρέπει να σημειωθεί ότι το *Vibrio* ανήκει στη μικροχλωρίδα του εντέρου των υγιών ψαριών. Ο πολλαπλασιασμός του γίνεται στην επιδερμίδα του ψαριού, όπου εισέρχεται μετά από τραυματισμό, και παράγει τοξίνη που κυκλοφορεί στο αίμα προκαλώντας αναιμία βαριάς μορφής.

Ο ακριβής τρόπος μεταφοράς του μικροβίου δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστός, αλλά σημαντικές υποψίες υπάρχουν για τη στοματική οδό. Επίσης, τα νεκρά ψάρια αποτελούν πηγή μόλυνσης για τα υπόλοιπα. Η περίοδος επώασης μετά από έκθεση στο βακτήριο είναι 3 ημέρες, εξαρτώμενη πάντα από τη λοιμογόνο δύναμη του βακτηρίου και το βαθμό ευπάθειας του ψαριού.

Η εξέλιξη της νόσου μπορεί να είναι **οξεία** (1-3 ημέρες), ιδιαίτερα σε λαβράκια μικρής ηλικίας, **υποξεία** (3-5 ημέρες) σε μεγαλύτερου μεγέθους ψάρια, ή **χρόνια**. Η καλύτερη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροβίου είναι μεταξύ 18 και 20°C αλλά, γενικά, η ευνοϊκή θερμοκρασία για την ανάπτυξη θεωρείται η πάνω από 11°C, ενώ το μικρόβιο δεν αντέχει πάνω από 37°C.

Γενικά, η βιμπρίωση είναι μία τυπική ασθένεια, εξαρτώμενη από στρεσοτικούς παράγοντες, και εμφανίζεται μετά από χειρισμούς κατά τη διαλογή των ψαριών, καθαρισμό των δεξαμενών, όχι σωστές απολυμάνσεις και, γενικά, όταν υπάρχουν δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες.

Κλινική παθολογία (συμπτώματα)

Τα βασικά εξωτερικά συμπτώματα της νόσου αποτελούν τα δερματικά έλκη και εξωτερικές αιμορραγικές διηθήσεις στη βάση των πτερυγίων (συνήθως κοιλιακών), στην κοιλιακή χώρα, καθώς και γύρω από την έδρα και το στόμα. Επίσης, στα εξωτερικά συμπτώματα ανήκουν: Εξόφθαλμος, απολέπιση, εντερίτιδα (με το έντερο γεμάτο υδαρές περιεχόμενο), πετέχειες, διόγκωση της κοιλιάς, η χοληδόχος κύστη είναι πάντα γεμάτη, συμφόρηση σπλάχνων, ανορεξία και σκούρος χρωματισμός. Στα λαβράκια, η έδρα διογκώνεται και τα περιπτώματα κρέμονται απ' αυτή με τη μορφή νήματος.

Ιστολογικά παρατηρείται νεφρική και σπληνική νέκρωση για τις υπεροξείες περιπτώσεις, και οξείες υποδερμικές βλάβες που εκτείνονται στους μύες, για τις οξείες περιπτώσεις. Στον σπλήνα και στον νεφρό προκαλείται μαζική καταστροφή του αιμοποιητικού ιστού, και στο ήπαρ εστιακή νέκρωση. Στο έλκος παρατηρείται οξεία μυνώδης νέκρωση, ενώ στο κέντρο του υπάρχει συσσωμάτωση από σαρκόπλασμα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ινική, με βακτήρια σκορπισμένα παντού.

Στις χρόνιες περιπτώσεις, η σοβαρή αιμολυτική αναιμία, που προκαλείται από τη λυτική τοξίνη των *Vibrio*, προκαλεί έντονες αποθέσεις αιμοσιδηρίνης στα μελανομακροφάγα κέντρα του υπολειπόμενου αιμοποιητικού ιστού του νεφρού και του σπλήνα.

Έλεγχος - Θεραπεία - Προφύλαξη

Όπως όλες οι μολυσματικές νόσοι, έτσι και η βιμπρίωση, καλό είναι να μπορεί να προληφθεί με την καλή διαχείριση των ιχθυοπληθυσμών, και ιδιαίτερα στα λαβράκια, που οι χειρισμοί (διαλογές κ.λπ.) και οι απώλειες λεπιών εξαιτίας αυτών, αποτελούν πύλες εισόδου των μικροβίων. Πάντως, σημαντική είναι η έγκαιρη διάγνωση της νόσου έτσι ώστε η λήψη αντιβιοτικών από το στόμα να έχει επιτυχία, πριν δηλαδή τα ψάρια εμφανίσουν ανορεξία.

Η θεραπεία γίνεται κυρίως με τη λήψη αντιβιοτικών από το στόμα. Η επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού γίνεται κατόπιν αντιβιοδιαγράμματος. Τα φάρμακα προσφέρονται με την τροφή (φαρμακούχος ιχθυοτροφή σε ποσοστό 1% της βιομάζας ημερησίως). Η οξυτετρακυκλίνη στην τροφή σε δόση 80mg/kg σωματικού βάρους / βιομάζα) την ημέρα για 10 ημέρες δίνει καλά αποτελέσματα. Χρησιμοποιούνται επίσης και οι συνδυασμένες σουλφοναμίδες (π.χ. Trimethoprim + Sulphadiazine) και το οξολινικό οξύ (30 mg/kg για 10 ημέρες), που όμως πρέπει να θεωρείται φάρμακο εφεδρείας. Προβληματική καθίσταται η θεραπεία κατά τη διάρκεια των χειμερινών εξάρσεων της ασθένειας, διότι τα ψάρια, λόγω μειωμένου μεταβολισμού, δε δέχονται τη φαρμακούχα τροφή.

Για τη θεραπεία της βιμπρίωσης χρησιμοποιούνται και τα μπάνια, κυρίως με Furazolidone (Φουραζολιδόνη). Προσοχή απαιτείται, γιατί η μακροχρόνια χορήγηση φαρμάκων έχει σαν συνέπεια το σχηματισμό ανθεκτικών στελεχών.

Τη σημαντικότερη λύση στην πρόληψη της νόσου και στη σωστή διαχείριση των ψαριών έχουν τα εμβόλια. Τα τελευταία παρασκευάζονται από αδρανοποιημένες καλλιέργειες παθογόνων δονακίων, μετά από ειδική επεξεργασία και, χορηγούμενα, ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών. Όμως, ο εμβολιασμός αντενδείκνυται εφόσον υπάρχει ενεργή λοίμωξη. Τα εμβόλια μπορούν να χορηγηθούν είτε ενέσιμα, είτε με εμβάπτιση, είτε με ψεκασμό, ή ακόμα και με την τροφή, και απορροφούνται μέσω του δέρματος και των βραγχίων. Μετά την πάροδο συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (συνήθως 10-12 μήνες), ο εμβολιασμός πρέπει να επαναληφθεί. Τα εμβόλια για την αντιμετώπιση της βιμπρίωσης, έχουν δώσει μέχρι σήμερα ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ αναμένεται η κυκλοφορία συνδυασμένων εμβολίων (π.χ. κατά της vibriosis και της pasteurellosis).

Για την πρόληψη συνιστάται η αποφυγή της έκθεσης σε στρες. Απαιτείται όσο το δυνατόν λιγότερη μεταχείριση με προληπτικά μπάνια, σωστές ιχθυοπυκνότητες και καθαρά δίκτυα με σωστό άνοιγμα "ματιού" στις μονάδες πάχυνσης.

Τα *Vibrio* επίσης, εμπλέκονται μαζί με τα *Mycobacteria*, προκαλώντας έλκη, κυρίως στα λαβράκια, και σηψαιμία κατά την είσοδο των δονακίων στην κυκλοφορία του αίματος. Για τη θεραπεία χορηγούνται αντιβιοτικά από το στόμα, καθώς και μπάνια.

1.2.1.2. *Aeromonas spp.*

Γενικά

Στην οικογένεια *Vibrionaceae* ανήκουν και οι Αερομονάδες. Τα πιο γνωστά παθογόνα είδη των ψαριών είναι τα: *Aeromonas hydrophila*₍₁₎, *A. salmonicida*, *A. punctata*₍₂₎ και *A. liquefaciens*₍₃₎. Τα παραπάνω στελέχη (1,2,3) αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου των ψαριών.

Απαντώνται συνήθως στο γλυκό νερό, και ιδιαίτερα σε αυτό με υψηλό οργανικό φορτίο. Παρόλ' αυτά όμως, εντοπίζονται (όχι συχνά) και στα θαλασσινά ψάρια (γι' αυτό ακριβώς το λόγο θεωρήσαμε αναγκαία τούτη την αναφορά στην ομάδα αυτή). Σχετίζονται συνήθως με αιμορραγικές σηψαιμίες, σε ψάρια τα οποία έχουν υποστεί έντονο σοκ στρεσορίσματος.

Κλινικά συμπτώματα - Παθολογία

Είναι όμοια με αυτά της αιμορραγικής σηψαιμίας από ψευδομονάδες.

Μορφολογία - Χαρακτηριστικά

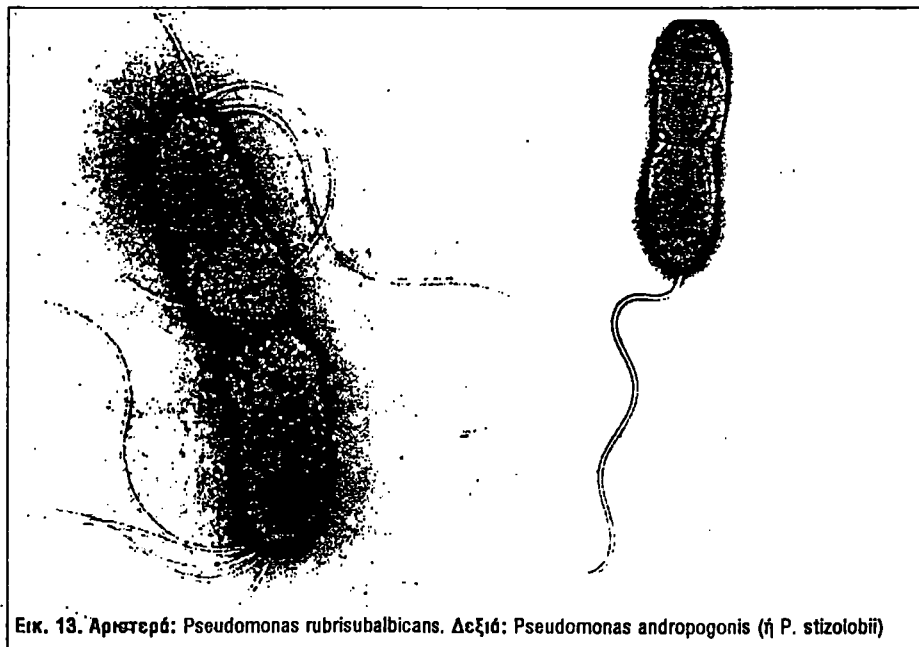
Είναι βακτηρίδια, Gram -, οξειδάση θετικά, που εμφανίζουν κινητές (*A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. liquaefaciens*) και μη κινητές (*A. salmonicida*) μορφές.

Καλλιέργεια

Τα είδη (1,2,3) απομονώνονται από τον νεφρό και το αίμα των ασθενούντων ψαριών, και καλλιεργούνται στο ειδικό εκλεκτικό υπόστρωμα Rimmier-Scotts άγαρ. Ενώ το είδος *A. salmonicida* απομονώνεται εύκολα από τις δερματικές βλάβες, το αίμα ή τον νεφρό των προσβεβλημένων ψαριών, και καλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ που παράγει μια καφέ χρωστική.

Θεραπεία - Προφύλαξη

Η καλύτερη θεραπεία είναι η πρόληψη. Συνιστάται αναβάθμιση του περιβάλλοντος (μείωση των οργανικών ρυπαντών και της θερμοκρασίας, όπου είναι εφικτό) και απομάκρυνση όλων των προσβεβλημένων ατόμων. Επίσης, συνιστάται θεραπεία με αντιβιοτικά και σουλφοναμίδες.

1.2.2. PSEUDOMONACEAE

Εικ. 13. Αριστερά: *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Δεξιά: *Pseudomonas andropogonis* (ή *P. stizolobii*)

Μορφολογία - Χαρακτηριστικά

Είναι βακτηρίδια με ευθεία ή και ελαφρώς καμπύλη μορφή, αλλά ποτέ ελικοειδής, μεγέθους 0.5-1.0 μm (διάμετρος) επί 1.5-5.0μm (μήκος). Είναι κινητά (σπάνια ακίνητα), με ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια (εικ. 13). Είναι αυστηρώς αερόβια. Ο μεταβολισμός

τους δεν είναι ποτέ ζυμωτικός, είναι χημειο-οργανότροφα, θετικά στην καταλάση και στην οξειδάση. Η % αναλογία G+C (γουανίνης και κυτοσίνης) στο DNA (mole% G+C of DNA) κυμαίνεται από 58 έως 76.

Αναπτύσσονται συνήθως σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 4°C και χαμηλότερες των 43°C. Η απομόνωση και η καλλιέργεια των ψευδομονάδων γίνεται κυρίως στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas* C.F.C. άγαρ. Πολλά είδη της οικογένειας παράγουν φωσφορίζουσες χρωστικές.

1.2.2.1. *Pseudomonas fluorescens*

Γενικά, απομονώθηκε για πρώτη φορά σε κυπρίνους το 1924.

Περιβάλλον

Βρίσκεται φυσιολογικά στο έδαφος και στο νερό, απομονώνεται όμως συχνά από τα αποσυντιθέμενα ψάρια.

Μορφολογία

Τα κύτταρα της *Pseudomonas fluorescens* είναι διαστάσεων 0.5-0.9μm x 2.3-2.8μm. Απαντώνται ατομικά ή σε ζεύγη, κινητά ή με τη βοήθεια πολικής πολύτριχης μεμβράνης.

Καλλιέργεια

Αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε κανονικά θρεπτικά υποστρώματα, και συνήθως παράγουν διαχύσιμες φωσφορίζουσες χρωστικές, ειδικά σε υποστρώματα που στερούνται σιδήρου. Οι αποικίες είναι στρογγυλές, ενώ αργότερα αναπτύσσουν ακτινωτές προεξοχές.

Επιζωοτιολογία

Η παρουσία του μικροβίου συνδέεται συνήθως με την ύπαρξη αιμορραγικής βακτηριδιακής σηψαιμίας. Η παθολογική αυτή κατάσταση είναι κλινικά πολύ όμοια με τις σηψαιμίες από αερομονάδες και, όπως κι αυτές οι μολύνσεις, σχετίζονται με στρες του περιβάλλοντος (υψηλές θερμοκρασίες και υπερπληθυσμός). Τα θαλασσινά ψάρια εμφανίζουν κυρίως χρόνια μορφή της νόσου.

Κλινική παθολογία

Η αιμορραγική σηψαιμία μπορεί να είναι οξεία ή χρόνια. Μεγάλες αιμορραγικές δερματικές αλλοιώσεις είναι το πιο γνωστό σύμπτωμα, ενώ μεγάλες απώλειες προκαλούνται αμέσως μετά την εμφάνιση των αλλοιώσεων. Νεκροτομικά, παρατηρείται υπεραϊμία των εσωτερικών αγγείων με αιμορραγίες, ενώ χρόνιες περιπτώσεις με ινώδη περιτονίτιδα έχουν περιγραφεί. Τα κυπρινοειδή δείχνουν ασκίτη (διόγκωση κοιλιάς με συγκέντρωση υγρού), επιπλέον των συμπτωμάτων αυτών.

Ιστοπαθολογία

Οι κύριες παθολογικές αλλαγές συμβαίνουν στο δέρμα και στον αιμοποιητικό ιστό. Στο δέρμα τα πρωιμότερα συμπτώματα είναι υπεραιμία των δερματικών αγγείων με έντονο οίδημα, που εκτείνεται και στη βασική στοιβάδα του δέρματος, ενώ ακολουθεί γρήγορα ελκοποίηση και επέκταση της βλάβης στους υποκείμενους μυς. Στον σπλήνα και στον νεφρό, οι βλάβες συνίστανται σε ρήξη των μελανομακροφάγων κέντρων, νέκρωση των αιμοποιητικών στοιχείων, καθώς και στην παρουσία μεγάλου αριθμού μακροφάγων που περιέχουν κοκκία μελανίνης. Στις χρόνιες περιπτώσεις, μόνο οι δερματικές αλλοιώσεις είναι εμφανείς.

Θεραπεία

Εξαιτίας της στενής συγγένειας των ψευδομοναδικών μολύνσεων και του υποβαθμισμένου περιβάλλοντος, μεγάλη βελτίωση των προσβεβλημένων ψαριών μπορεί να επιτευχθεί με τη μείωση της πυκνότητας των ψαριών και τη βελτίωση της ποιότητας του νερού.

Όπου έχει επιχειρηθεί θεραπεία, ικανοποιητικά αποτελέσματα έχει η χορήγηση καναμυκίνης ενδοπεριτοναϊκά, καθώς και τετρακυκλίνης διά της στοματικής οδού, με την προϋπόθεση ότι τα ψάρια εξακολουθούν να δέχονται τροφή.

1.2.3. ENTEROBACTERIACEAE

Γενικά

Τα εντεροβακτηριδιακά είναι μία μεγάλη ομάδα μικροβίων τα οποία είναι σαπρόφυτα, Gram αρνητικά και ζυμώνουν το θρεπτικό τους υπόστρωμα. Είναι κινητά, με τη χρήση τριχιδίων, ή μη κινητά. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 0.5-0.75μm επί 1.0-2.5μm.

1.2.3.1. *Edwardsiella ictaluri*

Το βακτηρίδιο *Edwardsiella ictaluri* είναι υπεύθυνο για υψηλές θνησιμότητες, που αναφέρονται στην Ισπανία, σε λαβράκια ηλικίας 2-3 μηνών (Panos Christofilogiannis, 1992). Είναι Gram αρνητικός βάκιλλος. Η αναλογία G+C στο DNA είναι 53 mole% (Hawke, 1981). Είναι μικρόβιο κινητό, και φέρει περίτριχο μαστίγιο. Η καλύτερη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 20 και 30°C.

Χαρακτηριστικά της ασθένειας

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στα κλινικά συμπτώματα που συνδέονται με την ασθένεια. Λίγο πριν το προσβεβλημένο άτομο πεθάνει, εμφανίζει νωθρότητα, κάνει κύκλους ή έχει σπειροειδή κολυμβητική κίνηση.

Τα εξωτερικά κλινικά συμπτώματα συχνά μπορεί να απουσιάζουν σε άτομα μεγαλύτερα των 15 cm σε μήκος, συμπεριλαμβανομένων και των ακόλουθων εξωτερικών αλλοιώσεων: Εξωτερικές αιμορραγίες στο δέρμα και γύρω από τη στοματική κοιλότητα, άχρωμα βράγχια, εξοφθαλμία, καθώς και ανοικτές τομές στην κεφαλική περιοχή.

Οι εσωτερικές αλλοιώσεις που έχουν τα προσβεβλημένα άτομα, είναι οι εξής: Οίδημα των αιμοποιητικών ιστών (σπλήνας και νεφρός), αιμορραγικές και νεκρωτικές περιοχές στο συκώτι, ασκητικό υγρό (γεμάτο με αίμα) στο περιτόναιο και πετεχεικές αιμορραγίες παντού στο εσωτερικό των μυικών τοιχωμάτων (Hawake, 1971). Συμπερασματικά, η ασθένεια θεωρείται σαν μία τυπική βακτηριακή σηψαιμική νόσος.

Θεραπεία

Για την αντιμετώπιση της νόσου, χρησιμοποιούνται χημειοθεραπευτικά με ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως είναι η οξυτετρακυκλίνη, το οξολινικό οξύ, η στρεπτομυκίνη κ.λπ.

1.2.4. PASTEURELLACEAE

Γενικά

Τα μικρόβια που ανήκουν στην οικογένεια αυτή, είναι βάκιλλοι (με ευθεία μορφή) κοντοί ή μακριοί, άκαμπτοι, μεγέθους 0.2-0.4μm x 0.4-2.0μm. Δε σχηματίζουν σπόρια (ανθεκτικές μορφές), είναι Gram αρνητικά και ακίνητα. Είναι μεσόφιλα και χημειο-οργανότροφα.

1.2.4.1. *Pasteurella piscicida*

Ιστορική αναδρομή

Το μικρόβιο πρωτοαπομονώθηκε το 1963 από τα είδη white perch και striped bass, στο βόρειο τμήμα του κόλπου Chesapeake των Η.Π.Α. (Sniesko et.al., 1964). Από τα άρρωστα ψάρια, 30 καλλιέργειες που απομονώθηκαν είχαν τα χαρακτηριστικά της παστερέλλας. Γι' αυτό το λόγο, η παθογόνος κατάσταση ονομάστηκε παστερέλλωσις. Στη συνέχεια, η ασθένεια εξαπλώθηκε και σε άλλα είδη, και είναι ιδιαίτερα δραστική και στο χώρο της Μεσογείου, ιδιαίτερα στη Γαλλία και στην Ιταλία. Στην Ελλάδα πρωτοαπομονώθηκε το 1991.

Χαρακτηριστικά του παθογόνου

Η παστερέλλωση προσβάλλει λαβράκια, τσιπούρες και γλώσσες. Είναι ένα σηψαιμικό νόσημα. Το παθογόνο αίτιο, είναι το μικρόβιο *Pasteurella piscicida*. Είναι ένα πολύ μικρό βακτηρίδιο, μεγέθους 0.5x1.5μm, έντονα διπολικό, οξειδάση και καταλάση θετικό, Gram αρνητικό, ευαίσθητο στο βιμπριοστατικό (0/129) και ακίνητο.

Απομόνωση του παθογόνου

Το βακτήριο μπορεί να απομονωθεί εμβολιάζοντας υλικό, που προέρχεται από τον νεφρό ή τον σπλήνα, σε marine 2216 άγαρ (Difco) ή σε nutrient άγαρ, ή σε αιματούχο άγαρ, και επώζονται σε θερμοκρασία 25°C για 48-72 ώρες.

Ένα γενικά αποδεκτό medium (θρεπτικό υπόστρωμα) που χρησιμοποιείται, έχει περιγραφεί (από τον Hashimoto et.al., 1989) και περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

1% (w/v) casamino acids / πολυπεπτόνη
0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)
0.2% (w/v) γαλακτόζη
1% (w/v) sodium glutamate
0.5% (w/v) οξικό μαγνήσιο (magnesium acetate)

Το παραπάνω medium μπορεί να στερεοποιηθεί, αν σε αυτό προστεθεί 1% (w/v) άγαρ. Στα "κλασικά" media, αναπτύσσονται λαμπερές γκριζο-κίτρινες κυρτές αποικίες, που έχουν διάμετρο 1-2 mm, μετά από χρόνο επώασης 72 ωρών (Kusuda & Yamaoka, 1972).

Επιζωοτιολογία - Παθογένεια

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η παστερέλλωση είναι μία σοβαρή ασθένεια, τόσο των καλλιεργούμενων όσο και των άγριων πληθυσμών (εικ. 2,3,4 παραρτήματος).

Διάγνωση

Η νόσος εμφανίζεται σε τρεις μορφές:

α) **Υπεροξεία.** Αιφνίδιοι μαζικοί θάνατοι χωρίς εξωτερικά συμπτώματα. Εσωτερικά παρατηρείται μόνο μία ελαφρά συμφόρηση των σπλάχνων. Η μορφή αυτή προσβάλλει κυρίως τα λαβράκια μικρής ηλικίας, και προκαλεί μεγάλες απώλειες.

β) **Οξεία.** Αδιαθεσία, ανορεξία, αιμορραγικές διηθήσεις στην κοιλιακή χώρα, συμφόρηση των σπλάχνων, λευκόφαια κοκκιώματα στον σπλήνα (granulomatus deposits), μεγέθους από κεφαλή καρφίτσας έως μπιζελιού. Ο θάνατος επέρχεται σε μερικές ημέρες. Η μορφή

αυτή προσβάλλει το γόνιμο του λαβρακιού και της τσιπούρας και, αν δεν ελεγχθεί, προκαλεί επίσης σοβαρές απώλειες.

γ) Χρόνια. Λίγες εξωτερικές αιμορραγικές διηθήσεις στην κοιλιά, ασκίτης (διόγκωση κοιλιάς με συγκέντρωση υγρού) και κοκκιώματα στον σπλήνα. Η χρόνια μορφή προκαλεί σταθερή, αλλά χαμηλή θνησιμότητα σε μεγαλύτερου μεγέθους λαβράκια και τσιπούρες.

Επιζωοτιολογία - Παθογένεια

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η παστερέλλωση είναι μία σοβαρή ασθένεια, τόσο των καλλιεργούμενων όσο και των άγριων πληθυσμών (Sniesko et.al. 1964, Kusuda & Yamaoka 1972, Ohnishi et.al. 1982, Yasunaga et.al. 1983).

Μεγάλες θνησιμότητες του ποσοστού 40-50% του στοκ εμφανίζονται κυρίως κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών. Δυστυχώς, οι λόγοι γι' αυτά τα ξεσπάσματα είναι ακόμα ασαφείς και άγνωστοι.

Πιστεύεται ότι η μόλυνση εμφανίζεται στο θαλασσινό νερό σε θερμοκρασίες γύρω στους 25°C (Yasunaga et.al., 1983). Ο Toranzo (Toranzo et.al., 1982) επινόησε μία σειρά πειραμάτων επιβίωσης, και συμπέρανε ότι η *Pasteurella piscicida* είχε μικρή διάρκεια ζωής στα γλυκά νερά, καθώς και στα νερά των εκβολών ποταμών. Επιπλέον, στα γλυκά νερά ο οργανισμός δεν μπορεί να καλλιεργηθεί μετά τις 48 ώρες στους 20°C. Η επιβίωση στα νερά των εκβολών (αλατότητα 12⁰/₀₀) ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν τις θέσεις των Janssen και Surgalla, σύμφωνα με τις οποίες ο οργανισμός δεν εμφανίζεται να επιβιώνει για πολύ, μακριά από το ψάρι. Επιπλέον είχε υποτεθεί ότι η μεταφορά της ασθένειας μπορεί να γίνεται από ψάρι σε ψάρι. Αν και αυτή η συλλογιστική θυμίζει τις αναφορές τις σχετικές με την εξάπλωση της Furunculosis, δε θα έπρεπε να παραβλέψουμε το γεγονός ότι η *P. piscicida* μπορεί να επιβιώσει στο νερό, παραμένοντας αδρανής ή σε λανθάνουσα μορφή.

Πειραματική μόλυνση - μετάδοση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ενδομυϊκή ένεση, ή διά της στοματικής οδού ή με εμβάπτιση. Η κατάληξη του παθογόνου ελέγχεται με τη μέθοδο των φθορίζόντων αντισωμάτων (Kawahara et.al., 1989). Το παθογόνο εγκαθίσταται στον νεφρό και στον σπλήνα πριν εξαπλωθεί στα βράγχια, στην καρδιά, στο έντερο και στα πυλωρικά τυφλά. Αν η μόλυνση γίνει διά του στόματος, το παθογόνο εμφανίζεται στο στομάχι πριν εξαπλωθεί στα εσωτερικά όργανα. Εντός των ιστών του προσβεβλημένου ατόμου, η *P. piscicida* συσσωρεύεται στα μακροφάγα (Nelson et.al., 1989).

Έλεγχος - Θεραπεία

Η θεραπευτική αγωγή που πρέπει να ακολουθείται, είναι η έγκαιρη χορήγηση του ενδεδειγμένου αντιβιοτικού από το στόμα. Τα συνηθέστερα χημειοθεραπευτικά είναι το οξολινικό οξύ και η οξυτετρακυκλίνη. Μεγάλη σημασία έχει η έγκαιρη διάγνωση, ούτως ώστε η αντιβίωση να αρχίσει προτού εξαπλωθεί η ασθένεια, και όσο τα ψάρια εξακολουθούν τα τρώνε.

1.2.5. MYXOBACTERIA (Μυξοβακτηρίδια)

1.2.5.1. *Flexibacter spp.*

Γενικά

Τα μυξοβακτηρίδια είναι μακριά, λεπτά, εύκαμπτα, Gram αρνητικά βακτήρια. Παρουσιάζουν μία περιέργη συστολική κίνηση, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί μόνο σε νωπά παρασκευάσματα.

Καλλιέργεια

Το καλύτερο καλλιεργητικό υπόστρωμα για το μικρόβιο, είναι άγαρ με τρυπτόνη. Πάντως για πρώτη απομόνωση είναι αρκετό, υπόστρωμα με λίγη πεπτόνη και 1% άγαρ. Το θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να είναι φτωχό σε θρεπτικά υλικά, και να παρέχει την απαραίτητη υγρασία που χρειάζεται το μικρόβιο για την ανάπτυξή του. Τη διάγνωση βοηθάει, εκτός από τις χαρακτηριστικές αποικίες, και η παραγωγή χαρακτηριστικής οσμής.

Κλινική παθολογία

Οι βλάβες συνήθως περιορίζονται στο δέρμα του κεφαλιού και της πλάτης, καθώς και στα βράγχια. Στα τελευταία, οι βλάβες είναι περισσότερο νεκρωτικές, και ο θάνατος γρηγορότερος. Επίσης, χάνουν τη μαλακή τους υφή και εμφάνιση, και οι λαμέλες καλύπτονται με λευκή βλέννα ή νεκρωτικό υλικό (ιστό), το οποίο αναπτύσσεται 2 με 3 ημέρες μετά τους χειρισμούς. Στο δέρμα οι βλάβες εξελίσσονται σε αιμορραγικά έλκη, που καλύπτονται από νεκρωτικό ιστό.

Ιστολογικά

Υπάρχει επιδερμική σπογγίωση, νέκρωση και έλκη, με επέκταση της νέκρωσης στη βασική στοιβάδα του δέρματος και περιφερειακή υπεραιμία και αιμορραγίες.

Θεραπεία

Η βελτίωση του περιβάλλοντος, η αύξηση της οξυγόνωσης του νερού, η αποφυγή στρεσσαρίσματος των ψαριών κατά τους διάφορους χειρισμούς (κυρίως κατά την αλλαγή

των διχτυών στους ιχθυοκλωβούς), ο έλεγχος του επιπέδου της οργανικής ουσίας και της θερμοκρασίας του νερού, είναι παράγοντες που βοηθούν πολύ στη θεραπευτική αγωγή.

Τα θεραπευτικά λουτρά με διάλυμα θειικού χαλκού ή με πράσινο του μαλαχίτη, καθώς και η χρήση υπερμαγγανικού καλίου, έχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

1.2.6. ΕΠΙΘΗΛΙΟΚΥΣΤΗ

Μια άλλη νόσος που προσβάλλει τσιπούρες και λαβράκια μέχρι 50 gr και οφείλεται σε μικροοργανισμούς τύπου χλαμύδια ή μυκόπλασμα, είναι η επιθηλιοκύστη.

Εμφανίζεται με τη μορφή μικροσκοπικών κύστεων στο επιθήλιο των βραγχίων, και προκαλεί υπερπλασία των βραγχιακών νηματίων (εικ. 5 παραρτήματος) και υπερέκκριση βλέννας. Οι κύστεις περιέχουν μικροοργανισμούς μεγέθους μικρότερου των συνηθισμένων μικροβίων, οι οποίοι (μικροοργανισμοί) βάζονται ισχυρά βασεόφιλοι και διακρίνονται αμυδρά στο μικροσκόπιο με καταδυτικό φακό. Η νόσος έχει σαν συνέπεια τη μείωση της λειτουργικότητας των βραγχίων, και καθιστά τα ψάρια ευαίσθητα σε κάθε είδους στρες που αυξάνει τις ανάγκες σε οξυγόνο. Μπορεί να προκαλέσει μεγάλες απώλειες, αν διαφύγει την προσοχή και επιχειρηθούν διάφορες εργασίες που περιλαμβάνουν μεταχείριση των ψαριών (διαλογή, θεραπείες κ.λπ.).

1.3. Παρασιτικές ασθένειες (*Parasitic infections*)

Γενικά

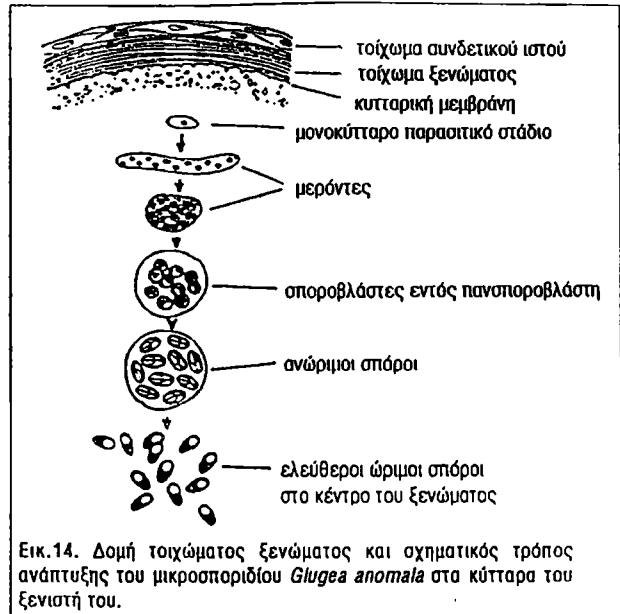
Πολλά παράσιτα με διάφορες εντοπίσεις έχουν παρατηρηθεί σε τσιπούρες και λαβράκια, τα περισσότερα όμως δεν προκαλούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις. Συνήθως επιπλέκουν μικροβιακές νόσους δευτερογενώς.

1.3.1. ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΖΩΑ

1.3.1.1. Μικροσπορίδια

Τα μικροσπορίδια είναι παρασιτικά πρωτόζωα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ωοειδούς σπόρου, συνήθως μήκους $>7\mu\text{m}$. Κάθε σπόρος περιέχει ένα πολικό σωλήνα, μέσω του οποίου εκτινάσσεται η μολύνουσα μορφή του παρασίτου (σποροβλάστης) στους ιστούς του ξενιστή. Ακολούθως, φθάνοντας στο όργανο επιλογής, διεισδύει στα κύτταρα, όπου υφίσταται μερογονία και σπορογονία. Μερικά από τα παράσιτα αυτά, προκαλούν υπερτροφία των μολυσμένων κυττάρων, σχηματίζοντας μεγάλες λευκωπές κύστεις που μοιάζουν με ψευδομονάδες, τα ξενώματα.

Αυτά τα παράγωγα της αντίδρασης μεταξύ παρασίτου - ξενιστή, περιβάλλονται από σχετικά παχύ τοίχωμα, εσωτερικά του οποίου περιφερειακά υπάρχουν τα πρώιμα στάδια του παρασίτου, που εξελίσσονται σε μερόντες. Οι ώριμοι σπόροι βρίσκονται στο κέντρο. Στα τελευταία του στάδια, το ξένωμα μπορεί να περιέχει δεκάδες χιλιάδες μολυσματικών σπόρων (εικ. 14).



1.3.1.2. Μυξοσπορίδια

Τα μυξοσπορίδια είναι και αυτά παρασιτικά πρωτόζωα, με δομή και βιολογικό κύκλο όμοιο σχεδόν των μικροσποριδίων. Το μέγεθός τους όμως είναι πολύ μεγαλύτερο, 8-25 μ.

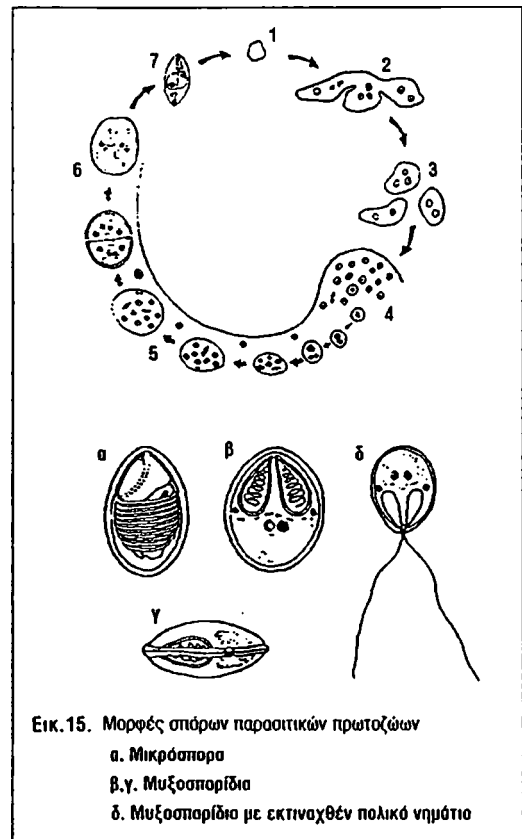
Οι σπόροι τους περιέχουν διπλές αποικειδείς μορφές, στις οποίες είναι περιελιγμένα τα πολικά νημάτια (εικ. 15). Μετά την κατάποση, τα πολικά νημάτια εκτινάσσονται και απελευθερώνουν τη μολύνουσα μορφή. Η Τελευταία, φθάνει με το κυκλοφορικό σύστημα στους ιστούς, και εξελίσσεται σε πολυπύρηνο πλασμάδιο στο οποίο αρχίζει η σπορογονία (4-6). Ξενώματα πάντως όπως των μικροσποριδίων δεν σχηματίζονται.

Τα μικροσπορίδια και τα μυξοσπορίδια βάφονται εκλεκτικά σε νωπά παρασκευάσματα με χρώση κυανού του μεθυλενίου (Bleu de Methylene),

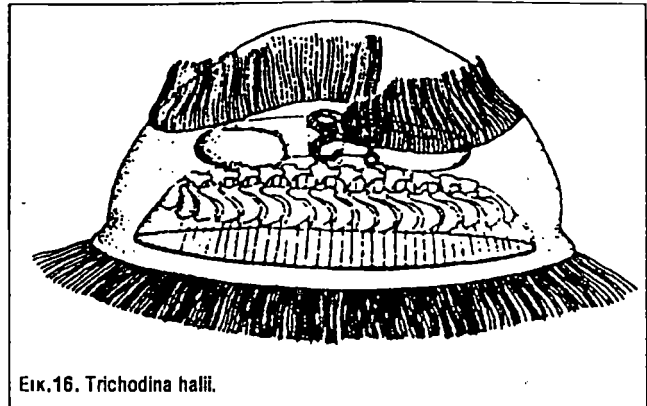
υδατικό διάλυμα 1%. Σκόπιμο είναι τα υπό εξέταση ψάρια να παραμείνουν 24 ώρες στο ψυγείο. Τότε εκτινάσσεται η πολική μεμβράνη και βάφεται από τη χρωστική.

1.3.1.3. Βλεφαριδοφόρα

Τα εκτοπαράσιτα αυτά χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο πυρήνων, ενός μακροπυρήνα και ενός μικροπυρήνα, καθώς και από μεγάλο αριθμό βλεφαρίδων, οι οποίες



περιβάλλουν όλο το σώμα του παρασίτου, οργανωμένες σε δακτυλίους (εικ. 16 και εικ. 6 παραρτήματος). Τα οργανίδια αυτά, προσδίδουν στα βλεφαριδοφόρα πολύ χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση.



Εικ.16. *Trichodina halii*.

Τα παράσιτα αυτά, υπό κανονικές συνθήκες είναι σχεδόν αβλαβή αλλά, με

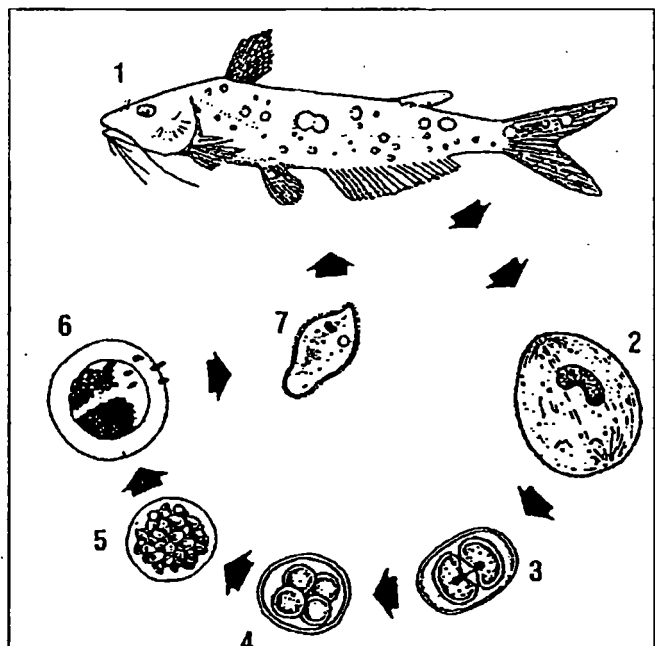
συνθήκες υπερπληθυσμού των υδατοκαλλιεργειών και αυξημένο οργανικό φορτίο, μπορεί να εξελιχθούν σε επικίνδυνα παθογόνα.

Η γεωγραφική τους εξάπλωση είναι κοσμοπολίτικη. Περίπου 70 είδη ανήκουν στο γένος της τριχοδίνας, τα οποία παρασιτούν στα βράγχια ψαριών του γλυκού, υφάλμυρου και θαλασσινού νερού.

1.3.1.4. *Cryptocaryon irritans*

Το βλεφαριδοφόρο *Cryptocaryon irritans* είναι το αντίστοιχο θαλασσινό παράσιτο προς το παράσιτο του γλυκού νερού *Ichthyophthirius multifiliis*. Και τα δύο είδη προκαλούν την εμφάνιση της νόσου της "λευκής κηλίδας" ή *Ich*.

Ο βιολογικός τους κύκλος είναι πολύ όμοιος (εικ. 17). Το αυξητικό στάδιο (τροφόντης) εισέρχεται κάτω από το δέρμα και την βραγχιακή επιφάνεια του ξενιστή, υποβοηθούμενος από την περιστροφική κίνησή του.



Εικ. 17. Στάδια ανάπτυξης του *Ichthyophthirius multifiliis*

1. Ψάρι ξενιστής, με λευκές δερματικές παρασιτικές κύστες.
2. Ενήλικο παράσιτο (0.1-1.0mm), με τον χαρακτηριστικό πεταλοειδή μακροπυρήνα.
- 3-5. Στάδια διαίρεσης.
6. Ήρμιο παράσιτο, το οποίο απελευθερώνει τομίτες.
7. Μολυσματικός τομίτης, ο οποίος ενεργητικά αναζητεί τον ξενιστή του.

Η φλεγμονώδης αντίδραση του ξενιστή προκαλεί την εγκύστρωση του παρασίτου, και συγχρόνως εξασφαλίζει τη διατροφή του. Οι κύστες, διαμέτρου

1mm, είναι λευκές, ορατές με το μάτι, ενώ με το μικροσκόπιο παρατηρούμε το παράσιτο να περιστρέφεται διαρκώς μέσα στην κύστη του. Ορατός είναι ακόμη και ο πεταλοειδής μακροπυρήνας (εικ. 7, 8 παραρτήματος). Αφού το παράσιτο φθάσει στο μέγεθος των 500

σπάζει την κύστη του, διαφεύγει από τον ξενιστή και ξαναεγκυστρώνεται στον πυθμένα της δεξαμενής ή του ενυδρείου. Εκεί διαιρείται και παράγει σε εκατοντάδες τις μολύνουσες μορφές ή τομίτες.

Λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, του υπερπληθυσμού και της μικρής απόστασης πυθμένα και ξενιστών, τα παράσιτα πολλαπλασιάζονται υπερβολικά, μολύνουν μαζικά τους ξενιστές τους, στους οποίους προκαλούν δραματικές απώλειες. Αυτές οφείλονται στην εκτεταμένη καταστροφή του δέρματος και των βραγχίων.

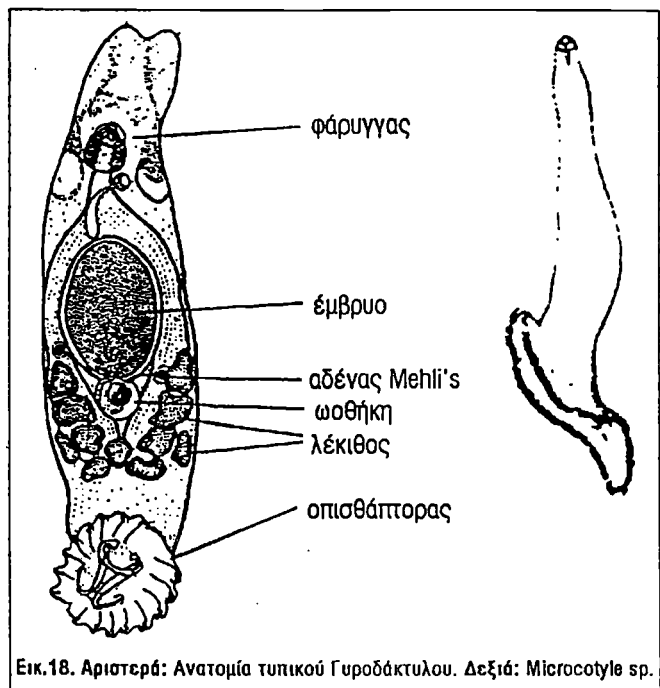
1.3.1.5. *Ichthyobodo (Costia) necatrix*

Παρασιτεί σε ψάρια του γλυκού νερού, κυρίως σωλομονοειδή και κυπρινοειδή, στο δέρμα και στα βράγχια, αλλά έχει αναφερθεί η παρουσία του και σε ιχθυογεννητικούς σταθμούς ευρύαλων ψαριών. Κυρίως τα νεαρά ψάρια υφίστανται τις συνέπειες του παράσιτου αυτού. Το σχήμα του είναι χαρακτηριστικά τριγωνικό και συγκρατείται στην επιφάνεια του δέρματος με μαστίγιο. Εύκολα αναγνωρίζεται σε νωπά παρασκευάσματα. Ο έντονος παρασίτισμός του εμφανίζεται σε νεαρά, εξασθενημένα άτομα. Το δέρμα υπερπλάσσεται και παράγει άφθονη βλέννα. Μακροσκοπικά, παρατηρούμε πλάκες γαλαζωπού χρώματος.

1.3.2. METAZOA

1.3.2.1. Μονογενή

Πρόκειται για παράσιτα μήκους έως 3mm, τα οποία παρασιτούν στα βράγχια όλων των ψαριών του γλυκού και του θαλασσινού νερού. Από το αυγό εκκολάπτεται η λάρβα, που ονομάζεται ογκομειρακίδιο. Αυτό βρίσκει τον ξενιστή του, προσκολλάται στις βραγχιακές σχισμές με τη βοήθεια του οπισθάππορα, ο οποίος διαθέτει άγγιστρα, και παραμένει εκεί ισοβίως. Ο αριθμός και η διάταξη των άγγιστρων είναι πολύ χρήσιμα για την ταυτοποίηση των παρασίτων. Τα σπουδαιότερα μονογενή παράσιτα ανήκουν στα γένη του Γυροδάκτυλου και του Δακτυλόγυρου.



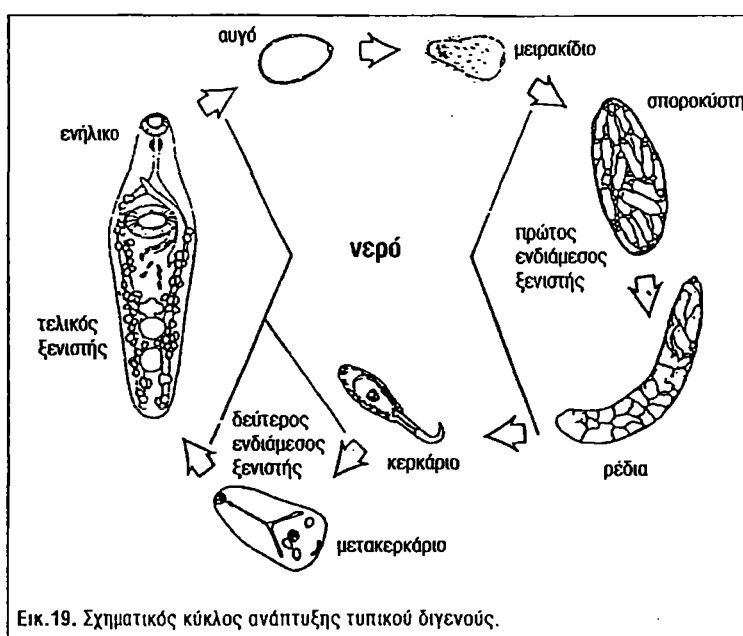
Εικ.18. Αριστερά: Ανατομία τυπικού Γυροδάκτυλου. Δεξιά: *Microcotyle* sp.

Το παράσιτο *Pseudogyrodactylus spp.*, παρασιτεί στα βράγχια των καλλιεργούμενων χελιών. Ευτυχώς είναι ευαίσθητο σε χημειοθεραπευτικά ενσωματωμένα στην τροφή των χελιών, όπως Mebentazole και Albentazole. Επίσης, στους ελεύθερους και καλλιεργούμενους πληθυσμούς τσιπούρας και λαβρακιού ταυτοποιήθηκαν στη χώρα μας τα μονογενή παράσιτα *Microcotyle labraduis*, *Microcotyle chrysophryii*, *Diplectanum aequaus*. Και τα παραπάνω παρασιτούν στα βράγχια των ξενιστών τους (εικ. 18).

1.3.2.2. Διγενή

Τα τυπικά διγενή παράσιτα είναι ερμαφρόδιτα, διαθέτουν δύο μυζητήρες, έναν στοματικό και έναν κοιλιακό, και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 1 έως 5 μ. Παρασιτούν σε όλα τα είδη των ψαριών.

Ο βιολογικός τους κύκλος είναι πολύπλοκος, και περιλαμβάνει δύο ενδιάμεσους ξενιστές. Τα ψάρια χρησιμεύουν σαν ενδιάμεσοι και τελικοί



Εικ. 19. Σχηματικός κύκλος ανάπτυξης τυπικού διγενούς.

ξενιστές. Ο πρώτος ενδιάμεσος ξενιστής είναι μαλάκιο, συνήθως σαλιγκάρι. Το αυγό εκκολάπτεται, εμφανίζεται το μειρακίδιο, που διατρύπεί το σώμα του σαλιγκαριού και εισχωρεί στο ήπαρ του, όπου εξελίσσεται σε σποροκύστη. Από αυτήν παράγονται θυγατρικές μορφές, οι ρέδια, οι οποίες εξελίσσονται σε κερκάρια. Τα τελευταία εγκαταλείπουν ενεργητικά τον ξενιστή τους και αναζητούν τον δεύτερο, στον οποίο εγκαυστρώνονται σε μετακερκάρια. Τα τελευταία, όταν ο δεύτερος ξενιστής φαγωθεί από τον τελικό, αναπτύσσονται σε ώριμα παράσιτα.

Όπως είναι λογικό να αναμένεται, τα διγενή παράσιτα δεν προκαλούν προβλήματα στις οργανωμένες υδατοκαλλιέργειες, διότι σε αυτές δεν είναι δυνατή η ολοκλήρωση του βιολογικού τους κύκλου (εικ. 19).

1.3.2.3. Κεστώδη (Ταινίες)

Είναι παράσιτα αποκλειστικά ενδοπαρασιτικά, με έμμεσο βιολογικό κύκλο, ο οποίος περιλαμβάνει δύο ενδιάμεσους ξενιστές. Σε αυτούς δε συμβαίνει σεξουαλική

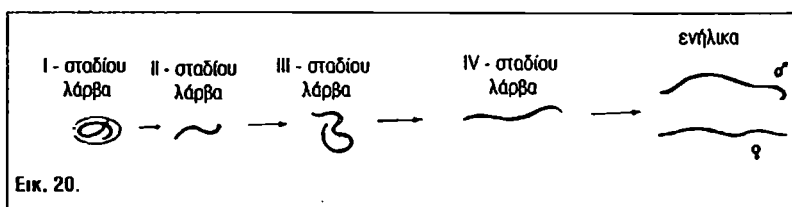
αναπαραγωγή. Ο πρώτος ενδιάμεσος είναι πλαγκτονικό κωπήποδο, π.χ. κύκλωπας, ενώ τα ψάρια μπορεί να είναι ο δεύτερος ενδιάμεσος ή ο τελικός ξενιστής. Τελικός ξενιστής μπορεί να είναι και σαρκοφάγα, στα οποία συμπεριλαμβάνεται και ο άνθρωπος.

Το παράσιτο είναι ερμαφρόδιτο. Αποτελείται από τη σκωληκοκεφαλή, που το συγκρατεί στο εντερικό τοίχωμα του ξενιστή (δεν έχει στόμα), και πολλές όμοιες σωματικές διαιρέσεις, τις προγλωττίδες, που αποτελούν το σώμα του παρασίτου ή σκώληκα. Τα αυγά στο νερό, εκκολάπτονται σε ενεργητικά κινούμενα κορακίδια.

Αυτά βρίσκουν τον πρώτο ενδιάμεσο ξενιστή, μεταβάλλονται σε προκερκοειδή και εγκυστρώνονται, αυτός τρώγεται από τον δεύτερο ενδιάμεσο ξενιστή, όπου το παράσιτο μεταβάλλεται σε πληροκερκοειδές και εγκυστρώνεται. Τέλος, και αυτός τρώγεται από τον τελικό ξενιστή. Στο έντερο του τελικού ξενιστή, το παράσιτο αποκτά την τέλεια μορφή του. Τρέφεται απορροφώντας θρεπτικά στοιχεία του ξενιστή. Τα κεστώδη στους ενδιάμεσους και τελικούς τους ξενιστές -τα ψάρια- ελάχιστη ζημιά προκαλούν. Στην οργανωμένη ιχθυοκαλλιέργεια είναι αδύνατο να ολοκληρώσουν το βιολογικό τους κύκλο, λόγω έλλειψης ενδιάμεσων ξενιστών.

1.3.2.4. Νηματέλμινθες

Τα νηματώδη, όπως είναι περισσότερο γνωστά, είναι σκουλήκια γονοχωριστικά, με σώμα χωρίς εξωτερικές



Εικ. 20.

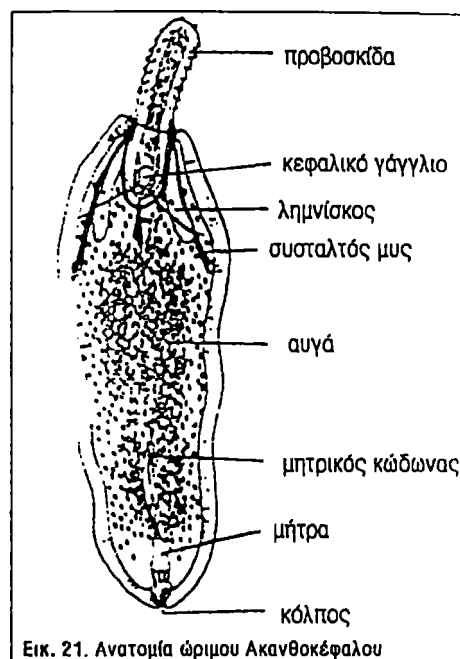
διαιρέσεις, και πλήρως ανεπτυγμένο πεπτικό σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει στόμα, οισοφάγο, έντερο και πρωκτό. Το μήκος τους είναι συνήθως μερικά εκατοστά.

Έχουν κοσμοπολίτικη εξάπλωση σε όλες τις θάλασσες. Ο βιολογικός τους κύκλος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια λαρβών, στα οποία τα παράσιτα υφίστανται μεταμόρφωση, πλησιάζοντας συνεχώς και περισσότερο την ενήλικη μορφή τους (εικ. 20). Οι ενδιάμεσοι ξενιστές, στους οποίους εγκυστρώνονται οι λάρβες, είναι για το στάδιο I καρκινοειδή, για τα στάδια II και III διάφορα ψάρια, και για το στάδιο IV και τα ενήλικα τελικοί ξενιστές, θαλάσσια θηλαστικά όπως οι φώκιες και τα δελφίνια. Τα νηματώδη παράσιτα στα ψάρια, ελάχιστη ενόχληση προκαλούν.

1.3.2.5. Ακανθοκέφαλα

Τα ενήλικα ακανθοκέφαλα είναι παράσιτα του εντέρου των σπονδυλωτών, διαθέτουν κεφαλή με ακανθωτή προβοσκίδα, και είναι γονοχωριστικά. Το μήκος τους είναι μερικά μ (εικ. 21). Ο βιολογικός τους κύκλος είναι έμμεσος.

Τα αυγά, που περιέχουν τον μολύνοντα ακάνθορα, αποβάλλονται στο περιβάλλον με τα κόπρανα και μολύνουν τον ενδιάμεσο ξενιστή, ο οποίος είναι οστρακόδερμο, π.χ. *Gammarus*. Τελικοί ξενιστές είναι πάρα πολλά είδη ψαριών. Τα παράσιτα αυτά, ελάχιστο πρόβλημα προκαλούν στις υδατοκαλλιέργειες.



Εικ. 21. Ανατομία ώριμου Ακανθοκέφαλου

1.3.2.6. Βδέλλες

Πρόκειται για αιματοφάγα παράσιτα με χαρακτηριστικό ευλύγιστο σώμα -μήκους μερικών εκατοστών- και δύο μυζητήρες, με άμεσο βιολογικό κύκλο και χαρακτηριστική κίνηση. Παρασιτούν κυρίως στα ψάρια του γλυκού νερού, και οι βλάβες που προκαλούν είναι, όχι μόνο αυτές της αιμοποσίας, αλλά και της μετάδοσης αιμοπαρασίτων.

1.3.3. ΟΣΤΡΑΚΟΔΕΡΜΑ

1.3.3.1. Βραχίουρα

Πρόκειται για παράσιτα με πεπλατυσμένο σώμα -μήκους μερικών χιλιοστών- που διαθέτουν μεγάλα μάτια, ζεύγος κοιλιακών μυζητήρων και στοματικών μορίων, τα οποία έχουν μετασχηματιστεί σε αιχμηρό όργανο. Με αυτό διατρυπών το σώμα του ξενιστή τους, ενώ ταυτόχρονα εκχύνουν πεπτικό υγρό. Τέτοιο τραύμα μπορεί να είναι θανατηφόρο για μικρά ψάρια. Ο βιολογικός τους κύκλος είναι άμεσος. Το γνωστότερο είδος παρασιτικών βραχίουρων είναι ο *Argulus foliaceus*, ο οποίος παρασιτεί σε πολλά είδη ψαριών του γλυκού νερού.

1.3.3.2. Κωπήποδα

Πρόκειται για πολύ μεγάλη κατηγορία παρασίτων του γλυκού, υφάλμυρου και θαλασσινού νερού. Ο βιολογικός τους κύκλος συνίσταται από ένα έως πέντε στάδια ναυπλίων που ζουν ελεύθερα, και ένα έως πέντε κωπηποδικά στάδια, ελεύθερα ή

παρασιτικά. Τα ώριμα θηλυκά άτομα διαθέτουν ζεύγος καλά αναπτυγμένων ωοθηκών. Υπάρχουν χαρακτηριστικές ομάδες κωπηπόδων:

1.3.3.3. Εργασιλιόμορφα

Είναι μικρά παράσιτα, μήκους 2mm, που ο βιολογικός τους κύκλος περιλαμβάνει τρία ναυπλιακά και τρία κωπηποδικά στάδια. Τα παράσιτα αυτά παρασιτούν στα βράγχια των ψαριών των υφάλμυρων και γλυκών νερών. Παρασιτεί μόνο το ώριμο θηλυκό. Το συνηθέστερο είδος είναι το *Ergasilus lisae*.

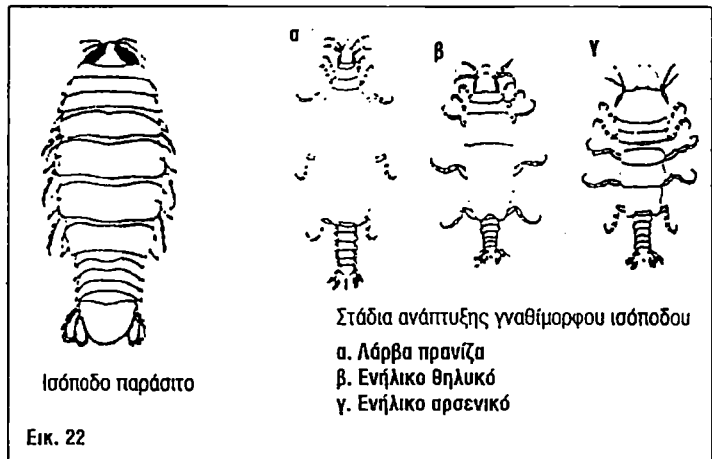
Στη λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου, και συγκεκριμένα στο τμήμα της ανατολικής Κλείσοβας όπου τα νερά έχουν μειωμένη αλατότητα, διαπιστώθηκε έντονος παρασιτισμός των βραγγίων από *Ergasilus lisae* σε ελεύθερες τσιπούρες και κεφάλους.

1.3.3.4. Καλιγόμορφα

Εξωτερικά μοιάζουν με τα βραχίουρα. Παρασιτούν στα ψάρια του θαλασσινού νερού. Παρασιτικό είναι το πρώτο κωπηποδικό στάδιο και τα ενήλικα παράσιτα. Παράσιτα του τύπου αυτού είναι οι κάλιγοι και οι λεπεοφθειρίοι.

1.3.3.5. Ισόποδα

Πρόκειται για κοσμοπολίτικα παράσιτα των ψαριών του γλυκού και του θαλασσινού νερού. Το μήκος τους είναι μερικά εκατοστά. Προσκολλώνται στο δέρμα, στη βραγχιακή και στη στοματική κοιλότητα των ξενιστών τους. Αποτελούν τα γνωστότερα παράσιτα των ψαριών, κοινότερα γνωστά σαν ψείρες.



Ενδιαφέρουσα ομάδα των ισόποδων αποτελούν τα **γναθίμορφα**. Τα θηλυκά παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές από τα αρσενικά, ενώ παράσιτα είναι μόνο οι λάρβες πρανίζα (εικ. 22). Η λάρβα καταπίνει τεράστιες ποσότητες αίματος του ξενιστή, αποκολλάται και πέφτει στον λασπώδη βυθό, όπου σκάβει στοές. Εκεί ενηλικιώνεται και δεν τρέφεται πλέον, αλλά τα ενήλικα παράγουν τη νέα γενεά λαρβών.

Το παράσιτο είναι μέλος της παρασιτικής ομάδας της παρασιτικής πανίδας της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου, όπου παρασιτεί στις τσιπούρες.

ΠΑΡΑΣΙΤΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ

ΕΝΤΟΠΙΣΗ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
ΔΕΡΜΑ	ΔΙΝΟΜΑΣΤΙΓΟΦΟΡΑ (<i>Amyloodinium ocellatum</i>), ΠΡΩΤΟΖΩΑ (<i>Trichodina</i> sp., <i>Tripartiella</i> sp., <i>Cryptocaryon irritans</i> , <i>Porostoma notatum</i>), ΜΟΝΟΓΕΝΗ ΤΡΗΜΑΤΩΔΗ (<i>Gyrodactylus</i> sp.)
ΠΤΕΡΥΓΙΑ	ΙΣΟΠΟΔΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ (λάρβες <i>Pranizae</i> [Gnathidae])
ΟΦΘΑΛΜΟΙ	ΠΡΩΤΟΖΩΑ (<i>Cryptocaryon irritans</i>)
ΜΥΙΚΕΣ ΜΑΖΕΣ	ΣΠΟΡΟΖΩΑ (<i>Glycea</i> sp., <i>Kudoa</i> sp.), ΔΙΓΕΝΗ ΤΡΗΜΑΤΩΔΗ (μετακερκάρια των <i>Acanthostomum</i> sp., <i>Timoniella</i> sp.)
ΒΡΑΓΧΙΑ	ΔΙΝΟΜΑΣΤΙΓΩΤΑ (<i>Amyloodinium ocellatum</i>), ΠΡΩΤΟΖΩΑ (<i>Trichodina</i> sp., <i>Tripartiella</i> sp., <i>Cryptocaryon irritans</i> , <i>Porostoma notatum</i> , <i>Colpronema</i> sp.), ΜΟΝΟΓΕΝΗ ΤΡΗΜΑΤΩΔΗ (<i>Gyrodactylus</i> sp., <i>Microcotyle chrysophryi</i> , <i>Furnestia echenesis</i> , <i>Diplectanum aequans</i> , <i>Lamellodiscus</i> sp.), ΚΩΠΗΠΟΔΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ (<i>Caligus minimus</i> , <i>Caligus</i> sp., <i>Ergasilus</i> sp.), ΙΣΟΠΟΔΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ (<i>Anilorca physodes</i> , <i>Nerocila orbigny</i>)
ΒΡΑΓΧΙΟΚΑΛΥΜΑΤΑ	ΚΩΠΗΠΟΔΑ ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΗ (<i>Lernaiolophus suttanus</i> , <i>Colobomatus labrachis</i>)
ΠΕΠΤΙΚΟΣ ΣΩΛΗΝΑΣ	ΣΠΟΡΟΖΩΑ (<i>Haemogregarina</i> sp., <i>Myxobolus</i> sp., <i>Myxidium</i> sp.), ΔΙΓΕΝΗ ΤΡΗΜΑΤΩΔΗ (<i>Acanthogostomum imbutiforme</i> , <i>Timoniella praeteritum</i> , <i>Cainocreadium labrachis</i> , <i>Plagiororus obolatus</i>)
ΗΠΑΡ	ΣΠΟΡΟΖΩΑ (<i>Haemogregarina</i> sp., <i>Myxobolus</i> sp., <i>Myxidium</i> sp.), ΔΙΓΕΝΗ ΤΡΗΜΑΤΩΔΗ (μετακερκάρια των: <i>Acanthostomum</i> sp., <i>Timoniella</i> sp., <i>Labratrema</i> sp.)
ΧΟΛΗΔΟΧΟΣ ΚΥΣΤΗ	ΣΠΟΡΟΖΩΑ (<i>Ceratomyxa</i> sp., <i>Myxobolus</i> sp., <i>Myxidium</i> sp.)
ΝΕΦΡΟΣ	ΣΠΟΡΟΖΩΑ (<i>Glugea</i> sp., <i>Kudoa</i> sp., <i>Haemogregarina</i> sp., <i>Myxobolus</i> sp.)
ΣΠΛΗΝΑΣ	ΣΠΟΡΟΖΩΑ (<i>Haemogregarina</i> sp.)

SEA-BASS and SEA-BREAM DISEASES¹	
VIRAL DISEASES²	BACTERIAL DISEASES³
Lymphocystis	Vibrionaceae
Viral Erythrocytic Infection	<i>V. anguillarum</i>
I.P.N.	<i>V. ordalii</i>
V.H.S.	<i>V. alginolyticus</i>
Sea bass birnavirus	<i>V. damsela</i> . Επίσης, <i>V. splendidus</i> I,II, <i>V. fluvialilis</i> I, <i>V. pelagius</i> II, <i>V. costicola</i> , <i>V. nereis</i> , <i>Aeromonas</i> spp.
Distended Gut Syndrome	Pastereullaceae
Sea bream papilloma	<i>Pasteurella piscisida</i>
	Enterobacteriaceae
MISCELLANEOUS DISEASES⁴	<i>Edwardsiella ictaluri</i>
Non functional swim-bladder	Pseudomonadaceae
Swim-bladder hypertrophy	<i>Pseudomonas</i> spp.
Deformities	Cytophagaceae
Lordosis	<i>Chondrococcus</i> spp.
White stripe disease	Myxobacteriaceae
Cannibalism	<i>Mycobacterium marinum</i>
Sunburn	
DIET RELATED DISEASES⁵	VITAMIN DEFICIENCIES⁶
Systemic granuloma	Ascorbic acid
Fatty livers	Vitamin E
Intestinal steatosis	Vitamin B ₆ (Pyridoxine)
Broken neck syndrome	
¹ Ασθένειες λαβρακιού και τσιπούρας	⁴ Διάφορες ασθένειες
² Ιογενείς ασθένειες	⁵ Ασθένειες που σχετίζονται με τη διατροφή
³ Βακτηριακές ασθένειες	⁶ Έλλειψη βιταμινών

Βιοχημικό profile των βακτηρίων	Vibrio anguillarum I (Νούσιος - Αλ. Νέα, 153)	Vibrio anguillarum (Austin & Austin, 1987)	Vibrio damsela	Vibrio alginolyticus	Vibrio carchariae	Vibrio cholerae	Vibrio ordalii	Vibrio vulnificus	Flexibacter columnaris	Pasteurella piscicida	Pseudomonas fluorescens
ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
ΟΞΕΙΔΩΣΗ (O) / ΖΥΜΩΣΗ (F) ΓΛΥΚΟΖΗΣ	F	F	F	F	F	F	F	F	O / -	F	O
ΟΞΕΙΔΑΣΗ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ΚΑΤΑΛΑΣΗ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BETA - GALACTOSIDASE	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ARGININE - DIHYDROLASE	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
LYSINE DECARBOXYLASE	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
ORNITHINE DECARBOXYLASE	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΙΤΡΙΚΩΝ	V	+	-	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	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ O/129	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΕΣ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

2.1. Χειμερινό Σύνδρομο της Τσιπούρας (*Winter Syndrome*)

Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ένα ιδιαίτερο σύνδρομο εμφανίζεται, το οποίο χαρακτηρίζεται από φουσκωμένη κοιλιά (*swollen belly*) και αυξημένες θνησιμότητες.

Από πειραματικές παρατηρήσεις, το σύνδρομο συνδέεται με τις μεθόδους διαχείρισης που εφαρμόζει μία μονάδα, καθώς και με τους ρυθμούς τροφοδοσίας πριν τη χειμερινή περίοδο. Μελέτες που έγιναν από το Ε.Κ.Θ.Ε. (Karanikolas, et.al.), έδειξαν ότι τα προσβεβλημένα ψάρια εμφάνιζαν έντονα φαινόμενα ασκίτη και ανώμαλη κολύμβηση. Δεν παρατηρήθηκαν ανωμαλίες, αλλά οίδημα ήταν εμφανές, τόσο στο δέρμα όσο και σε όλα τα εσωτερικά όργανα. Το έντερο ήταν διεσταλμένο και γεμάτο από υγρό και μία άμορφη λευκή μάζα. Στα πρώιμα στάδια του συνδρόμου, το ασκητικό υγρό ήταν καθαρό και διαφανές, και δε διακρίνονταν βακτήρια. Σε πιο προχωρημένα στάδια του συνδρόμου, το ασκητικό υγρό ήταν θολό και ήταν δυνατή η διάκριση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα προσβεβλημένα ψάρια ήταν εκείνα που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη ανάπτυξη.

Αποτελέσματα

Από αναλύσεις που έγιναν στη σάρκα των ψαριών, προκύπτει ότι τα προσβεβλημένα ψάρια περιείχαν σημαντικά λιγότερες πρωτεΐνες και περισσότερα λίπη και τέφρα στο σώμα τους απ' ότι τα υγιή. Επιπλέον, το ηπατοσωματικό τους περιεχόμενο ήταν σημαντικά υψηλό. Το συκώτι των άρρωστων ψαριών περιέχει χαμηλότερα επίπεδα γλυκογόνου και υψηλότερα επίπεδα λιπών. Ο ασκίτης που παρατηρείται, είναι ένδειξη υδρομεταλλικής ανισορροπίας. Στην παρούσα περίπτωση δεν μπορεί να προκλήθηκε από βακτήρια, εφόσον τα τελευταία ήταν απόντα στα πρώτα στάδια του φαινομένου. Η σύνδεση του φαινομένου με μία έντονη διατροφή τους μήνες που προηγούνται του χειμώνα, καθώς και η μείωσή του από περιορισμένη παροχή τροφής, οδηγούν σε ένα διατροφικό πρόβλημα. Η αιτιολογία του είναι ακόμα αδιασαφήνιστη, όμως η παρουσία του σχετίζεται με διατροφικούς παράγοντες.

Ιστολογικές αλλαγές σε ψάρια που πάσχουν από το σύνδρομο του χειμώνα

Εξετάστηκαν ιστοί όπως συκώτι, βράγχια, καρδιά και σπλήνας των ψαριών που υπέφεραν από το προαναφερθέν σύνδρομο.

Οι ιστολογικές εξετάσεις έδειξαν ότι οι ιστοί που εμφανίζουν τις πιο σταθερές αλλοιώσεις - βλάβες που οφείλονται στο winter syndrome είναι το συκώτι και ο σπλήνας.

Ο αιμοποιητικός ιστός είναι μία πολύ συνηθισμένη περιοχή "αποίκισης" βακτηρίων, και αυτό δημιουργεί χαρακτηριστικές αλλοιώσεις στο συκώτι και στον σπλήνα. Βρέθηκαν κοκκιώματα στον σπλήνα του προσβεβλημένου ψαριού, τα οποία πιθανόν να οφείλονται σε βακτηριακή μόλυνση. Εφόσον βέβαια δε βρέθηκαν βακτήρια κατά τα πρώτα στάδια του συνδρόμου, είναι πιθανόν ότι η μόλυνση ήταν μία δευτερογενής μόλυνση, που οφειλόταν στη μείωση της άμυνας του οργανισμού του ψαριού.

Το συκώτι των προσβεβλημένων ψαριών παρουσιάζει την παρακάτω εικόνα:

Έλλειψη κανονικής δομής, μείωση του αριθμού των ηπατοκυττάρων, πύκνωση των πυρήνων, ινώδεις αλλαγές, ατροφία ή ακόμα και εξαφάνιση των παγκρεατικών νησίδων (εικ. 9 παραρτήματος).

Ινώδεις αλλαγές παρατηρήθηκαν και στον σπλήνα (εικ. 10 παραρτήματος). Οι εκφυλιστικές αλλαγές στα λίπη των ηπατοκυττάρων είναι ένα πολύ κοινό χαρακτηριστικό των καλλιεργούμενων ψαριών. Αυτές είναι συνδεδεμένες με ελλείψεις των απαραίτητων λιπαρών οξέων, καθώς και με τη χρήση ταγγισμένων λιπών.

2.2. Λιπώδης εκφύλιση του ήπατος

Η κατάσταση αυτή διακρίνεται ιστολογικά σαν λιπώδης νέκρωση των ηπατικών κυττάρων (εικ. 11 & 12 παραρτήματος). Μακροσκοπικά, το ήπαρ εμφανίζεται διογκωμένο, και έχει χρώμα λευκόφαιο ή φαιοπράσινο. Συχνά η κατάσταση προκαλείται από υπερβολική διατροφή. Είναι τόσο διαδεδομένη γενικά στα καλλιεργούμενα ψάρια, που κατά κάποιο τρόπο θεωρείται φυσιολογική.

2.3. Σπλαγχνική κοκκιωμάτωση (*Visceral Granuloma*)

Η νόσος εμφανίζεται στις τσιπούρες όλων των μεγεθών, και χαρακτηρίζεται από κοκκιώματα διαμέτρου 1-2 mm, σκληρά σε τομή, που αναπτύσσονται κυρίως στον σπλήνα και σπανιότερα στον νεφρό. Συνοδεύεται από εκφύλιση των ουροφόρων σωληναρίων του νεφρού. Τα κοκκιώματα περιείχαν κρυστάλλους του αμινοξέος τυροσίνη. Πιστεύεται ότι είναι σύνδρομο διατροφικής αιτιολογίας.

Εμφανίζεται το χειμώνα, και προξενεί εξασθένηση του άμυντικού συστήματος των ψαριών, καθώς και ευαισθησία σε δευτερογενείς μολύνσεις.

2.4. Βιταμίνη B₆ (Vitamin B₆ - Pyridoxine)

Τα κύρια χαρακτηριστικά συμπτώματα της έλλειψης βιταμίνης B₆ στην τσιπούρα είναι η υπερευαισθησία, η άτακτη κολυμβητική συμπεριφορά, η αργή ανάπτυξη, οι κληρονομικές αλλαγές, η εστιακή νέκρωση στον εγκέφαλο και η σκολίωση.

Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα θνησιμότητας είναι πολύ υψηλά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΛΕΓΧΟΣ, ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

3.1. Έλεγχος

Οι περισσότερες αρρώστιες μπορούν να προληφθούν με την καλή περιποίηση των ψαριών. Ειδικά στα λαβράκια, που από τη φύση τους χάνουν εύκολα λέπια, δημιουργούνται πύλες εισόδου για μόλυνση από βακτήρια, ειδικά *Vibrio*.

Για την πρόληψη, η αποφυγή έκθεσης των ψαριών σε στρες παίζει πολύ σημαντικό ρόλο.

- Πρέπει να διατηρείται η σωστή πυκνότητα των εκτρεφόμενων ψαριών ανά κυβικό μέτρο.
- Το περιβάλλον εκτροφής (π.χ. δίχτυα) πρέπει να είναι όσο το δυνατόν καθαρό.
- Τα ψάρια πρέπει να μεταχειρίζονται όσο το δυνατόν λιγότερο. Μετά από κάθε μεταχείριση, καλό είναι να γίνεται ένα προληπτικό μπάνιο με αντιβιοτικό.
- Απαιτείται η χορήγηση κατάλληλης ποσότητας τροφής και διανομής της.

Ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη των ασθενειών (ειδικά των βακτηριακών) είναι τα εμβόλια. Το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού των ψαριών μπορεί, με τα ειδικά κύτταρά του, να αποτυπώνει κομμάτια από ορισμένες πρωτεΐνες των βακτηριακών κυττάρων -αντιγόνα- και να παρασκευάζει ειδικές πρωτεΐνες -αντισώματα- που καταστρέφουν τα βακτήρια όταν τα ξανασυναντήσουν -ανοσία-. Αυτή τη φυσιολογική λειτουργία εκμεταλλεύεται ο εμβολιασμός.

Τα εμβόλια αποτελούνται συνήθως από αδρανοποιημένα / νεκρά παθογόνα βακτήρια, που ενώ δεν μπορούν πλέον να προκαλέσουν νόσο, διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, ώστε να παράγει ειδικά αντισώματα εναντίον των συγκεκριμένων βακτηρίων.

Κύρια χαρακτηριστικά των νεκρών βακτηριακών εμβολίων

- Πρέπει το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών να είναι ώριμο να αντιδράσει (λαβράκια, τσιπούρες 1.5-2 gr).
- Απαιτούνται περίπου 2 εβδομάδες από τον εμβολιασμό για τη δημιουργία ανοσίας.
- Η ανοσία διαρκεί αρκετούς μήνες, αφού δεν περιέχουν ζωντανά κύτταρα.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι χορήγησης των εμβολίων:

1. Εμβάπτιση

Διάλυση του υγρού εμβολίου σε πλαστικό δοχείο με νερό εκτροφής. Προσθήκη ψαριών σε κατάλληλη πυκνότητα για λίγο χρόνο (π.χ. 30 δευτερόλεπτα), αποστράγγιση και επιστροφή στο χώρο εκτροφής. Ο παραπάνω τρόπος εμβολιασμού εξασφαλίζει οικονομία στο κόστος αγοράς των εμβολίων, αλλά απαιτεί πολλά εργατικά χέρια και μεγάλο χρόνο εφαρμογής.

2. Λουτρό

Τα ιχθύδια παραμένουν στην αρχική δεξαμενή (στον ιχθυογεννητικό σταθμό ή στο όχημα / σκάφος μεταφοράς, όπου απλώς μειώνεται η στάθμη του νερού μέχρι τη μέγιστη ανεκτή ιχθυοπυκνότητα). Προστίθεται το εμβόλιο ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή αναλογία, ενώ παράλληλα χορηγείται οξυγόνο. Τα ψάρια παραμένουν στο διάλυμα του εμβολίου για τουλάχιστον 1 ώρα, οπότε θεωρούνται εμβολιασμένα. Ακολουθεί μεταφορά στο χώρο εκτροφής ή επαναφορά της κανονικής στάθμης του νερού. Απαιτούνται λίγα εργατικά χέρια και χρόνος, αλλά μεγαλύτερο κόστος σε εμβόλιο. Υπάρχει ευκολία διενέργειας σε όλα τα μεγέθη των ψαριών.

3. Ψεκασμός

Γίνεται με ειδικό ψεκαστήρα σε ελάχιστο χρόνο έκθεσης, π.χ. 5 δευτερόλεπτα. Τα ψάρια σ' αυτή τη διαδικασία γλιστρούν σε κεκλιμένο επίπεδο. Απαιτούνται λίγα εργατικά χέρια και χρόνος, και λιγότερο κόστος εμβολίου.

4. Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση

Χορηγείται χωρίς διάλυση στην περιοχή εμπρός από τα κοιλιακά πτερύγια. Το ελάχιστο σωματικό βάρος των ψαριών πρέπει να είναι 25 gr. Βεβαίως, τα ψάρια αναισθητοποιούνται, μέχρι πλήρους ακινησίας, προ της χορήγησης.

3.2. Ιδιότητες των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες θα πρέπει να είναι:

1. Αποτελεσματικά

Να επιτυγχάνεται δηλαδή, σε ικανοποιητικό βαθμό, η είσοδός τους στους ιστούς και να σκοτώνουν τον παθογόνο παράγοντα χωρίς αρνητικές επιδράσεις στο ψάρι.

2. Καλής ποιότητας

Δηλαδή να έχουν εξασφαλισμένη καλή ποιότητα από φορτίο σε φορτίο, και να παραμένουν σταθερά σε σύσταση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους.

3. Ασφαλή

Το θέμα της ασφάλειας είναι πάρα πολύ σημαντικό, γιατί αναφέρεται:

A) Στην ασφάλεια εκείνου του οποίου κάνει τη θεραπεία

Το φάρμακο δε θα πρέπει να έχει τοξικές ή άλλες αλλεργιογόνες ιδιότητες ή, αν έχει, θα πρέπει να αναγράφονται για την προστασία του χειριστή.

B) Στην ασφάλεια του ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ

Το κάθε φάρμακο θα πρέπει να μεταβολίζεται γρήγορα, να εξαλείφεται από τον ιστό του ψαριού και να μην αφήνει τοξικά ή καρκινογενή κατάλοιπα κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος.

3.3. Αντιβιοτικά - Θεραπεία

Για τη θεραπεία χρησιμοποιούνται τα αντιβιοτικά τα οποία δίνονται στα ψάρια, είτε ενσωματωμένα στην τροφή είτε υπό μορφή μπάνιου. Το μπάνιο προτιμάται στις οξείες καταστάσεις, αφού τότε τα προσβεβλημένα ψάρια χάνουν την όρεξή τους και δεν μπορούν να επωφεληθούν από την ενσωμάτωση του αντιβιοτικού στην τροφή. Για το μπάνιο, οι πιο κατάλληλες είναι οι χημικές ενώσεις, γνωστές σαν νιτροφουράνια ή φουρανάση, η φουραζολιδόνη, καθώς και η φορμόλη και το υπερμαγγανικό κάλιο.

Στους κλωβούς το μπάνιο γίνεται με τη βοήθεια ενός αδιεπέραστου σάκκου, ο οποίος περικυκλώνει τον κλωβό και δεν επιτρέπει την κυκλοφορία του νερού. Στη συνέχεια, το φάρμακο διαλύεται και τα ψάρια παραμένουν επί 20 έως 30 λεπτά. Κατά τη διάρκεια του μπάνιου καλό είναι να διοχετεύεται οξυγόνο με τη βοήθεια φιάλης.

Το μπάνιο επαναλαμβάνεται κάθε μέρα επί 5 έως 10 ημέρες, ανάλογα με τη σοβαρότητα της αρρώστιας. Τα πιο συνήθη αντιβιοτικά που προστίθενται στην τροφή, είναι η τετρακυκλίνη, το οξολινικό οξύ και οι σουλφοναμίδες.

Σαν ορισμός, αντιβιοτικό είναι η χημική ουσία -φυσική ή συνθετική- που φυσιολογικά παράγεται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς για να εμποδίζει την ανάπτυξη (μικροβιο-στατικό) ή να σκοτώνει (μικροβιο-κτόνο) άλλους ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς. Τη φυσική αυτή δράση εκμεταλλεύεται η θεραπευτική εναντίον των παθογόνων μικροβίων.

Για την αποτελεσματική χρήση αντιβιοτικών πρέπει:

- Η συγκεκριμένη νόσος να έχει διαγνωσθεί.
- Να έχει διαπιστωθεί η ευαισθησία του υπεύθυνου μικροοργανισμού (π.χ. βακτήριο) στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

- Να είναι γνωστό το δοσολογικό σχήμα, καθώς και ο τρόπος χορήγησης του αντιβιοτικού που επιλέχθηκε.
- Να είναι εξακριβωμένος ο χρόνος αναμονής μέχρι την εξαφάνιση των καταλοίπων του αντιβιοτικού από τους ιστούς του ψαριού.
- Να είναι πρακτικά εφικτή η χορήγηση του αντιβιοτικού, π.χ. εγκαίρως με την τροφή πριν εμφανιστεί ανορεξία στα ψάρια.

Βακτηριδιακή αντίδραση σε φάρμακα

Μερικά βακτηρίδια είναι φυσικά ανθεκτικά σε ορισμένα φάρμακα, π.χ. η πενικιλίνη έχει μικρό αποτέλεσμα εναντίον των περισσότερων Gram αρνητικών μικροβίων.

Πολύ ανυσηχτική είναι η ικανότητα μεταφοράς αντίστασης σε ένα ιδιαίτερο φάρμακο από τον ένα μικροοργανισμό στον άλλον, όταν αυτοί μεγαλώνουν μαζί. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μεταφορά ενός επιπλέον χρωματοσωματικού γενετικού υλικού του επισώματος ή **R (Resistance)** παράγοντας μεταξύ στελεχών ή ειδών μικροβίων.

Η παρατεταμένη χρήση αντιβιοτικών σε χαμηλές δόσεις για την πρόληψη των ασθενειών, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των Gram αρνητικών μικροβίων, που είναι φορείς του R παράγοντα, εξαιτίας της εκλεκτικής δράσης που ασκούν τα αντιβιοτικά σε αυτά. Η συνεχής χρήση αντιβιοτικών **ΧΩΡΙΣ ANTIBIOΔΙΑΓΡΑΜΜΑ** προκαλεί επιλογή στελεχών που φέρουν τον παράγοντα R και μπορεί να προκαλέσει την έκρηξη επιδημιών, των οποίων το παθογόνο αίτιο είναι ανθεκτικό στη χρήση συγκεκριμένων αντιβιοτικών.

3.4. Εμβόλια και αντιβιοτικά

Εκεί που ένα εμβόλιο εφαρμόζεται σαν μέσο προφύλαξης από μία νόσο πριν την εμφάνισή της, ένα αντιβιοτικό εφαρμόζεται για τη θεραπεία της όταν εκδηλωθεί. Στον πίνακα φαίνονται οι βασικές λειτουργικές διαφορές μεταξύ εμβολίων και αντιβιοτικών.

ΕΜΒΟΛΙΑ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ
1. Αποτελεσματική μακρόχρονη προστασία, ακόμη και μετά από μία μόνο εφαρμογή.	1. Βραχυπρόθεσμη προστασία. Ανάγκη συχνών επαναλήψεων.
2. Ελάχιστες απώλειες, παρά την εμφάνιση της νόσου στην περιοχή.	2. Αρκετή θνησιμότητα μέχρι να "τιάσει" η θεραπεία.
3. Χορηγούνται σε όλα τα ψάρια ΠΡΙΝ νοσήσουν.	3. Χορηγούνται συνήθως με την τροφή μετά την εμφάνιση της νόσου. Τα άρρωστα ψάρια δεν παίρνουν θεραπεία.
4. Δεν αφήνουν κατάλοιπα στον οργανισμό των ψαριών.	4. Κατάλοιπα παραμένουν στη σάρκα ή τα όργανα των ψαριών. Απαιτείται ορισμένος χρόνος αναμονής πριν την εξαίεση.
5. Δεν προκαλείται η δημιουργία ανθεκτικών στελεχών.	5. Ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών μικροβίων από τη συχνή χρήση.
6. Εμβόλια υπάρχουν και εναντίον των νοσημάτων από ιούς.	6. Χωρίς θεραπευτικό αποτέλεσμα στα ιογενή νοσήματα.
7. Ακίνδυνα / αδρανή στο περιβάλλον	7. Επηρεάζουν το υγρό οικοσύστημα, στο οποίο εφαρμόζονται.

Τόσο τα εμβόλια, όσο και τα αντιβιοτικά, όταν εφαρμόζονται σωστά, αποτελούν ικανά όπλα για τον περιορισμό της εμφάνισης και των συνεπειών των ασθενειών. Όμως, ενώ τα εμβόλια μπορεί να χρησιμοποιούνται ανεπιφύλακτα, τα αντιβιοτικά μόνο όταν υπάρχει νόσος και χωρίς υπερβολές, για να μην επιβαρύνεται το περιβάλλον ούτε να δημιουργούνται ανθεκτικά μικροβιακά στελέχη.

3.5. Έλεγχος της υγείας των ψαριών με ολοκληρωμένα *in vitro* διαγνωστικά μέσα

Τα ολοκληρωμένα *in vitro* διαγνωστικά (kits), είναι μοντέρνα εργαλεία για την πρόληψη και διαχείριση της υγείας των εντατικά εκτρεφόμενων ψαριών όλων των μεγεθών. Χαρακτηρίζονται *in vitro*, διότι εφαρμόζονται σε πρόσφατα θανατωμένα δείγματα ψαριών ή οργάνων τους.

Με τη βοήθεια των διαγνωστικών αυτών μέσων αποκαλύπτονται τα ψάρια - φορείς και ο βαθμός της μόλυνσής τους, και όταν ακόμη δεν εμφανίζουν συμπτώματα ή όταν το νόσημα στην εκτροφή βρίσκεται σε ύφεση. Επιβεβαιώνεται επίσης η διάγνωση νόσου που βρίσκεται σε εξέλιξη.

Στην πράξη λαμβάνεται τυχαίο δείγμα από τα ψάρια που πρέπει να ελεγχθούν με τα αποστειρωμένα υλικά δειγματοληψίας που περιέχει το διαγνωστικό. Στη συνέχεια, μετά την προσθήκη σειράς αντιδραστηρίων με ενδιάμεσους χρόνους αναμονής, διακρίνονται τα θετικά από τα αρνητικά αποτελέσματα, με βάση την αλλαγή του χρώματος. Η ένταση του

χρωματισμού που παίρνει κάθε δείγμα, χαρακτηρίζει και το βαθμό της μόλυνσης. Για την εύκολη οπτική διάκριση του χρώματος, τα διαγνωστικά περιλαμβάνουν θετικά και αρνητικά δείγματα - μάρτυρες για σύγκριση. Συνολικά, η διαδικασία διαρκεί περίπου 2 με 3 ώρες για 40-50 δείγματα.

Διαγνωστικά κιτ για την τσιπούρα και το λαβράκι υπάρχουν:

- Για παστερέλλωση από *Pasteurella piscicida*, κυρίως στην τσιπούρα.
- Για δονακίωση από *Vibrio anguillarum*, κυρίως στο λαβράκι.

3.6. Θεραπευτικές αγωγές - Προστασία του καταναλωτή

Τα τελευταία χρόνια, στο επίπεδο των επιτροπών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπως και σε όλα τα μεγάλα επιστημονικά συνέδρια σε θέματα υδατοκαλλιεργειών, δύο βασικά θέματα μονοπωλούν το ενδιαφέρον.

1. Προστασία του καταναλωτή καλλιεργούμενων ψαριών.
2. Μείωση ή έλεγχος των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από τις υδατοκαλλιέργειες.

Όσον αφορά το πρώτο θέμα, έχει άμεση σχέση με τη χρήση διάφορων ουσιών στις υδατοκαλλιέργειες (απολυμαντικά, αναισθητικά, αντιμικροβιακά φάρμακα κ.λπ.).

Για όλα τα παραπάνω φάρμακα, και με στόχο τη μείωση ή εξάλειψη των πιθανοτήτων να φθάσουν κατάλοιπά τους στον καταναλωτή, έχουν θεσπιστεί νομοθετικά οι λεγόμενες περίοδοι αναμονής.

Περίοδος αναμονής είναι το χρονικό διάστημα (από το τέλος μιας θεραπείας μέχρι την πώληση των ψαριών) το οποίο θα πρέπει να περάσει, ώστε τα κατάλοιπα του φαρμάκου να φθάσουν σε τέτοιο επίπεδο στη σάρκα του ψαριού, ώστε να μην προκαλούν καμία βλάβη στον καταναλωτή (αυτό το επίπεδο ονομάζεται **μέγιστο επίπεδο καταλοίπων**).

Οι περίοδοι αναμονής εξαρτώνται από τη θερμοκρασία του νερού, γιατί ο μεταβολικός ρυθμός των ψαριών επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία του νερού. Έτσι λοιπόν, η μέτρηση των περιόδων αναμονής γίνεται σε βαθμομέρες.

Βαθμομέρα είναι το άθροισμα της μέσης θερμοκρασίας του νερού για κάθε μέρα από την περίοδο αναμονής. Έτσι, 2 ημέρες με μέση θερμοκρασία νερού 10°C και 3 ημέρες με μέση θερμοκρασία νερού 12°C, δίνουν σύνολο 56 βαθμομέρες (2 x 10 + 3 x 12).

Είναι εξαιρετικά σημαντικό, κάθε φορά που γίνεται μία θεραπεία να κρατιούνται οι περίοδοι αναμονής ευλαβικά, γιατί οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης αρχίζουν να πραγματοποιούν ελέγχους καταλοίπων αντιβιοτικών σε παρτίδες που εισάγονται σε κάθε χώρα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, στην περίπτωση που κάποιος παραγωγός, βιαστικά και

απερίσκεπτα, προσπαθήσει να εξάγει φορτίο ψαριών που πριν λίγες ημέρες υποβλήθηκαν σε θεραπεία, όχι μόνο να οδηγηθεί σε απόρριψη, και ίσως σε κατάσχεση της εισαγόμενης ποσότητας, αλλά να απαγορευτούν νομοθετικά, προς συμμόρφωση, οι εισαγωγές από Ελληνικές εταιρείες στη συγκεκριμένη χώρα, και η τιμή του προϊόντος να υποστεί καθολική καθίζηση, οδηγώντας τη βιομηχανία σε κρίση.

3.7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΑΓΩΓΕΣ - ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ. Κατανόηση της δυναμικής της χρήσης φαρμάκων στις υδατοκαλλιέργειες

Οι κύριες μορφές εφαρμογής θεραπευτικών αγωγών στις υδατοκαλλιέργειες είναι, είτε η θεραπεία με μπάνιο, είτε η προσθήκη του φαρμάκου μέσα στην τροφή.

Για την αιτιολόγηση των οικονομικών επιπτώσεων της χρήσης φαρμάκων, θα πρέπει να γίνει κατανοητή η δυναμική των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων σε ένα τόσο ανοιχτό σύστημα όπως είναι οι μονάδες υδατοκαλλιεργειών. Όσες φορές ένα φάρμακο χορηγείται με τη μορφή μπάνιου, εισέρχεται άμεσα απευθείας στο υδατικό περιβάλλον. Από την άλλη πλευρά, φάρμακα που δίνονται με την τροφή μπαίνουν στο υδατικό περιβάλλον με τρεις τρόπους:

1. Ένα ποσοστό περίπου 30% της τροφής με το αντιβιοτικό, πέφτει στο βυθό απευθείας πριν καταναλωθεί από τα ψάρια. Η τροφή αυτή καταναλώνεται από άλλα ψάρια ή ασπόνδυλα, ή διασπάται από μικροοργανισμούς του βυθού.
2. Σε μια δεύτερη μορφή, το ποσοστό του φαρμάκου που δεν έχει μεταβολιστεί, εξέρχεται στα κόπρανα και εκκρίνεται από το νεφρό, το ήπαρ (με τη χολή) και τα βράγχια, φθάνοντας επίσης στο βυθό.
3. Μεταβολίτες του φαρμάκου εκκρίνονται από το ψάρι σαν τελικά προϊόντα μεταβολισμού.

Έτσι λοιπόν, το φάρμακο ή οι μεταβολίτες του, πέρα από την επίδρασή τους στον προς θεραπεία ιχθυοπληθυσμό, έχουν μια γενικότερη επίδραση στο γύρω μικροπεριβάλλον.

Η ύπαρξη αυξημένων επιπέδων αντιβιοτικού στο βυθό, κάτω από τα κλουβιά, οδηγεί σε αύξηση της ανθεκτικότητας των περιβαλλοντικών βακτηρίων στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Αυτό είναι δυνατόν να οδηγήσει στην άμεση μεταβίβαση (R-πλασμίδια) της ανθεκτικότητας σε παθογόνα για τα ψάρια βακτήρια, που με τη σειρά τους οδηγούν σε υποτροπή των θνησιμοτήτων και της παθολογικής κατάστασης, την οποία στην αρχή επιχειρήσαμε να θεραπεύσουμε (συχνό φαινόμενο οι υποτροπές περιστατικών vibriosis [δονακίωσης] κάθε 15 ημέρες).

Η επιβάρυνση του περιβάλλοντος της μονάδας με αλόγιστη και μη ελεγχόμενη, από κτηνίατρο-ιχθυοπαθολόγο, χρήση αντιβιοτικών, πέρα από το ότι είναι ασύμφορη οικονομικά, οδηγεί σταθερά στην υπερφόρτιση του υδάτινου οικοσυστήματος και μειώνει τα περιθώρια αντίδρασης σε μετέπειτα επιδημίες ασθενειών.

3.8. Νέα ερευνητικά δεδομένα πάνω στη χρήση αντιβιοτικών στην τσιπούρα και το λαβράκι

Η ερευνητική εργασία που γίνεται από τον κτηνίατρο, ιχθυοβιολόγο (MSc.), ιχθυοπαθολόγο (MSc.) κ. Πάνο Χριστοφιλογιάννη, με χρηματοδότηση του Σ.Ε.Θ. -και από τέλος Σεπτέμβρη και της Γ.Γ.Ε.Τ. (πρόγραμμα ΥΠΕΡ)- έχει δώσει μερικά σημαντικά μέχρι τώρα συμπεράσματα.

1. Είναι εμφανής η αύξηση του ποσοστού εμφάνισης ασθενειών σε περιοχές που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια υπερεντατικοποίηση της παραγωγής.
2. Είναι εμφανής, και εργαστηριακά αποδεδειγμένη (με δεδομένα τιμών M.I.C¹), η αύξηση του ποσοστού εμφάνισης ανθεκτικών στην οξυτετρακυκλίνη Gram αρνητικών βακτηρίων.
3. Ανησυχητική, που ίσως εγκυμονεί κάποιους κινδύνους στο μέλλον, είναι η ολοένα αυξανόμενη εμφάνιση περιστατικών θνησιμοτήτων που οφείλονται σε Gram θετικούς κόκκους, οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στο οξολινικό οξύ, αλλά σχετικά ευαίσθητοι στην οξυτετρακυκλίνη.
4. Από τα δεδομένα του πρώτου εργαστηριακού (H.P.L.C.) πειράματος φαρμακοκινητικής του οξολινικού οξέος στην τσιπούρα, έγινε αντιληπτό ότι ο μεταβολισμός του φαρμάκου είναι (στους 20°C) εξαιρετικά γρήγορος, με αποτέλεσμα το επίπεδο των καταλοίπων του οξολινικού οξέος στη σάρκα και το ήπαρ του ψαριού να πέφτει κάτω από τα επικίνδυνα για τον καταναλωτή όρια σε πολύ λιγότερες βαθμομέρες (80) από αυτές που αναφέρονται στις νομοθετικές οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (500 βαθμομέρες). Η νομοθεσία όμως, παραμένει στις 500 βαθμομέρες, και αυτό είναι το όριο που πρέπει να ακολουθείται.

Περαιτέρω πειράματα στο λαβράκι πραγματοποιούνται αυτή τη στιγμή, ώστε να συλλεχθούν περισσότερα επιστημονικά στοιχεία και να προσδιοριστεί επιστημονικά ένα ασφαλές χρονικό πλαίσιο, το οποίο να ακολουθείται στο μέλλον ως περίοδος αναμονής του οξολινικού οξέους για την τσιπούρα και το λαβράκι.

¹ Η ελάχιστη συγκέντρωση διαλύματος αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του αντίστοιχου βακτηρίου, αντιστοιχεί στην ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού (M.I.C.).

Προσοχή θα πρέπει να δίνεται κατά την παρασκευή τροφών αναμειγμένων με αντιβιοτικό γιατί, σύμφωνα με αναλύσεις τροφών που έγιναν στο εργαστήριο πειραματικής διατροφής του Ε.Κ.Θ.Ε., ένα μεγάλο ποσοστό (έως και 45%) του αντιβιοτικού μένει προσκολλημένο με το ιχθυέλαιο, ή άλλο λάδι, στα τοιχώματα του δοχείου που γίνεται η ανάμειξη της τροφής με το αντιβιοτικό. Θα πρέπει λοιπόν να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ανάμειξη των τροφών με αντιβιοτικό, για τη μείωση των απωλειών.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΩΝ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στο τρίτο μέρος της παρούσας εργασίας θα αναφερθούμε στις μέχρι σήμερα γνωστές μεθόδους δειγματοληψίας και αναλύσεων - επεξεργασίας των δειγμάτων στους εργαστηριακούς χώρους.

Θα γίνει μία εκτενής αναφορά στα υλικά και στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εκπόνηση των βακτηριολογικών, παρασιτολογικών και ιστολογικών εξετάσεων. Κατόπιν, θα αναφερθούμε στις δειγματοληψίες που έγιναν κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και στα βακτηριολογικά και ιστολογικά ευρήματα που προκύπτουν από αυτές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ - ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

1.1. Δειγματοληπτική μέθοδος - Μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο

Για τη διενέργεια ιχθυοπαθολογικών εξετάσεων, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση η αποστολή ζωντανών ψαριών. Τα νεαρά ψάρια αλλοιώνονται λόγω εισβολής που πραγματοποιεί η μικροβιακή τους χλωρίδα σε όλους τους ιστούς. Επομένως, οι μικροβιολογικές (βακτηριολογικές) εξετάσεις σε νεκρά ψάρια είναι άνευ αξίας, και το ίδιο ισχύει σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό και για τις παρασιτολογικές και ιστολογικές εξετάσεις.

Καθίσταται λοιπόν απόλυτα κατανοητή η επιστημονική αναγκαιότητα και ορθότητα της μεταφοράς ζωντανών ψαριών από τις μονάδες εκτροφής προς το εργαστήριο. Τα δειγματοληφθέντα ψάρια, αφού συλλέγονται με απόχη αποφεύγοντας πιθανούς τραυματισμούς καθώς αυτά χτυπιούνται σ' αυτή, τοποθετούνται σε διπλή στερεή σακούλα πλαστικού, η οποία περιέχει νερό στο 1/3 του όγκου της, το οποίο υπερκορέννεται με οξυγόνο. Στη συνέχεια οι σακούλες τοποθετούνται σε ισοθερμικό δοχείο και μεταφέρονται, το ταχύτερο δυνατό, στο εργαστήριο.

1.2. Επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο

Τα δείγματα - ψάρια, μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο, θανατώνονται, είτε με πλήρη αποκεφαλισμό είτε με μερικό, οπότε τέμνεται ο νωτιαίος μυελός. Αποφεύγεται η αναισθητοποίηση των ψαριών με χρήση αναισθητικών ουσιών (*MS-222* ή *Quinaldine* κ.λπ.), εφόσον θα γίνουν και παρασιτολογικές εξετάσεις. Οι προαναφερθείσες ουσίες σκοτώνουν τα παράσιτα στο δείγμα.

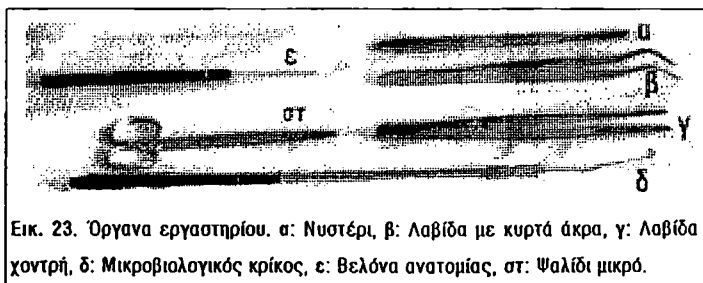
Κατόπιν, αφού τα ψάρια ζυγιστούν και μετρηθεί το μήκος τους (εφόσον βέβαια τα παραπάνω στοιχεία μας ενδιαφέρουν), τοποθετούνται στον πάγκο εργασίας σε καθαρή απολυμασμένη επιφάνεια και πάνω σε καθαρό χαρτί εργαστηρίου ή πετσέτα. Εξετάζεται πρωταρχικά η εξωτερική επιφάνεια των ψαριών και ανιχνεύεται η ύπαρξη παρασίτων στο δέρμα και στα βράγχια, με την εφαρμογή παρασιτολογικών εξετάσεων.

1.3. Παρασιτολογικές εξετάσεις

Φτιάχνονται νωπά παρασκευάσματα με σύνθλιψη από τον ύποπτο ιστό. Ξέσματα από τις βλάβες ή μικρά τεμάχια ιστών, τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες με

απεσταγμένο νερό, P.B.S², ή φυσιολογικό ορό, και καλύπτονται με καλυπτρίδα. Κατόπιν εξετάζονται σε μεγάλη μεγέθυνση με καταδυτικό φακό και με σταγόνα κεδρελαίου επί της καλυπτρίδας, και παρατηρείται η ύπαρξη ή όχι παρασίτων.

Εφόσον πραγματοποιηθεί η παρασιτολογική εξέταση, απολυμαίνεται η εξωτερική επιφάνεια του ψαριού, καθώς και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για τη νεκροψία. Τα όργανα - εργαλεία αυτά, είναι τα ακόλουθα: Ψαλίδι, μικρό και μεγάλο, νυστέρι, λαβίδα χοντρή και λαβίδα με κυρτά άκρα (εικ. 23).



Εικ. 23. Όργανα εργαστηρίου. α: Νυστέρι, β: Λαβίδα με κυρτά άκρα, γ: Λαβίδα χοντρή, δ: Μικροβιολογικός κρίκος, ε: Βελόνα ανατομίας, στ: Ψαλίδι μικρό.

1.4. Βακτηριολογικές εξετάσεις

Στη συνέχεια ανοίγεται το ψάρι κατά μήκος της νυκτικής κύστης, κόβοντας περίπου στο 1/4 της απόστασης μεταξύ της πλευρικής γραμμής και της κατώτερης κοιλιακής επιφάνειας. Αποκαλύπτονται έτσι τα εσωτερικά όργανα, τα οποία αφαιρούνται με προσοχή. Από αυτά επιλέγονται τεμάχια για ιστολογικές εξετάσεις. Κατόπιν, εφόσον αποκαλύπτεται και ο νεφρός, λαμβάνεται υλικό από αυτόν με τον μικροβιολογικό κρίκο (επιλέγεται ο νεφρός διότι θεωρείται το σημαντικότερο όργανο για το σκοπό αυτό) και εμβολιάζονται τα τρυβλία πετρί (petri) με τα θρεπτικά υποστρώματα.

Κατά το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά υποστρώματα, ευρέως διαδεδομένα, το T.S.A. άγαρ και το T.C.B.S. άγαρ. Ο εμβολιασμός (σπορά) γίνεται με διάφορους τρόπους, εξαρτώμενος από τον μικροβιολόγο. Ένας συνήθης τρόπος είναι η σπορά με τρεις κινήσεις, με σκοπό την τελική λήψη μεμονωμένων αποικιών.

Η απομόνωση καθαρών καλλιεργειών από την αρχή (από την πρώτη καλλιέργεια) σημαίνει ότι υπάρχει αιμορραγική σηψαιμία, δηλαδή ένα συγκεκριμένο μικρόβιο έχει πολλαπλασιαστεί και έχει κατακλύσει όλα τα όργανα του ψαριού, καθώς βεβαίως και το αίμα.

1.4.1. Θρεπτικά υλικά

Για την πραγματοποίηση των βακτηριολογικών εξετάσεων χρησιμοποιούνται ειδικά θρεπτικά υλικά.

² P.B.S. = Buffer Phosphate Saline

- Σύσταση

Είναι μείγματα διάφορων ουσιών, τα οποία προσφέρουν ευνοϊκές συνθήκες για τη διατροφή και τον πολλαπλασιασμό μικροβίων *in vivo* (σε τεχνητό περιβάλλον). Μερικές από τις ουσίες είναι πράγματι θρεπτικές για τα μικρόβια, ενώ άλλες είναι παράγοντες αυξησεως ή προστατεύουν την ανάπτυξη των μικροβίων. Σαν πρώτες ύλες χρησιμοποιούνται οι εξής βασικές ουσίες:

i) Πεπτόνη

Είναι βιομηχανικό προϊόν που παρασκευάζεται από διάφορες λευκωματούχες ουσίες όπως το κρέας, το τυρί, η ινική κ.λπ., μετά από ειδική επεξεργασία πεπτικών ενζύμων. Συνέπεια της επεξεργασίας αυτής, περιέχει μείγμα προπεπτών, πεπτών, πολυπεπτιδίων, αμινοξέων, βιταμινών, υδατανθράκων, διάφορα άλατα, μη αζωτούχες ουσίες και ίχνη λιπαρών οξέων. Όλες οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε υδατοδιαλυτή μορφή, που δεν καταστρέφεται ή πήγνυται με την επίδραση της θερμότητας. Η χημική σύνθεση των διάφορων πεπτονών που παρασκευάζονται από διάφορους οίκους, αλλά και από τον ίδιο οίκο, ποικίλλει. Εξάλλου, αναλόγως της περιεκτικότητας σε διάφορες αζωτούχες και μη ουσίες, οι πεπτόνες διακρίνονται σε διάφορα είδη. Οι κοινότερες πεπτόνες που προσφέρονται στο εμπόριο, εκτός από την κοινή πεπτόνη, είναι οι εξής:

Τρυπτόζη: Διαφέρει από την κοινή πεπτόνη στο ότι περιέχει, εκτός από τα στοιχεία της, και τις εκχυλισματικές ουσίες του κρέατος, δεν περιλαμβάνει όμως υδατάνθρακες. Η τρυπτόζη χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό του θρεπτικού ζωμού σε συνδυασμό με την πεπτόνη.

Πρωτεόζη: Είναι είδος πεπτόνης πλουσιότερη σε πεπτές ουσίες του κρέατος. Προστίθεται στο ζωμό για εμπλουτισμό, προκειμένου να γίνει παραγωγή μικροβιακών τοξινών.

Τρυπτόνη: Είναι πλούσια σε τρυπτοφάνη. Χρησιμοποιείται για δοκιμές βιοχημικού χαρακτήρα των μικροβίων (παραγωγή ινδόλης κ.λπ.).

ii) Σάκχαρα

Τα διάφορα σάκχαρα προστίθενται στα θρεπτικά υλικά για ενίσχυση της ανάπτυξης των μικροβίων, είτε για τη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων. Τα συνηθέστερα είναι τα ακόλουθα:

Μονοσακχαρίδια: Γλυκόζη, (δεξτρόζη ή σταφυλοσάκχαρο), λαιβουλόζη, μαννόζη, γαλακτόζη.

Δισακχαρίδια: Λακτόζη (γαλακτοσάκχαρο), σουκρόζη (σακχαρόζη), μαλτόζη (βυνοσάκχαρο).

Τρισακχαρίδια: Ραφφινόζη.

Πολυσακχαρίδια: Άμυλο, γλυκογόνο, ινσουλίνη, δεξτρίνη.

Γλυκοσίδια: Σαλικίνη, αισκουλίνη.

Αλκοόλες: Γλυκερίνη, ινοσιτόλη.

Πεντόζες: Αραβινόζη, ξυλόζη, ραμνόζη.

iii) Εκχύλισμα κρέατος

Από το κρέας εκχυλίζονται στο νερό διάφορες ουσίες, αζωτούχες και μη, όπως και διάφορα άλατα. Οι ουσίες αυτές είναι ευδιάλυτες στο νερό και δεν πήγνυνται με θέρμανση. Οι αζωτούχες εκχυλισματικές ουσίες είναι κυρίως οι βάσεις της πουρίνης, η κρεατινίνη, η κρεατίνη, το ινοσιτολικό οξύ, τα αμινοξέα. Μη αζωτούχες ουσίες, είναι το γλυκογόνο, το σταφυλοσάκχαρο, η μαλτόζη, ο ινοσίτης. Στο εμπόριο φέρεται σε μορφή σκόνης.

- Άλατα

Στα θρεπτικά υλικά προστίθενται άλατα τα οποία χρησιμοποιούνται από τα μικρόβια σαν συμπληρωματικές ουσίες, είτε γιατί με την παρουσία τους ρυθμίζεται η πυκνότητα των ιόντων υδρογόνου, είτε γιατί δρουν σαν ανασταλτικές ουσίες ανάπτυξης μερικών μικροβίων.

- Άγαρ

Είναι ουσία εκχυλισματική των φυκών, που χρησιμοποιείται σαν στερεωτικό των υγρών θρεπτικών ουσιών. Χημικά, αποτελείται από πολυσακχαρίτες ισχυρά ενωμένους με άλατα ασβεστίου, οι οποίοι δεν διασπώνται από τα μικρόβια, στα οποία δεν προσφέρουν θρεπτικές ουσίες. Στο εμπόριο φέρεται σαν σκόνη καθαρή που διαλύεται σε νερό 100°C, αλλά στερεοποιείται σε θερμοκρασία κάτω των 42°C με μορφή πηκτωματώδους ύλης άριστης συνεκτικότητας (μοιάζει με ζελέ).

- Αίμα - Ορός αίματος

Προστίθενται στα θρεπτικά υλικά, γιατί περιέχουν θρεπτικές ουσίες και ένζυμα που ευνοούν την ανάπτυξη ορισμένων απαιτητικών μικροβίων, και διότι με τα λευκώματα και τα ένζυμα τους εξουδετερώνουν βλαβερά για την ανάπτυξη των μικροβίων προϊόντα του μεταβολισμού τους.

- Δείκτες

Προστίθενται στα θρεπτικά υλικά σε μικρές ποσότητες, γιατί με την αλλαγή της χροιάς τους υποδηλώνουν την μεταβολή της αντιδράσεως του υλικού. Επίσης χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή των θρεπτικών υλικών για την ρύθμιση της αντιδράσεώς τους (pH).

1.4.2. Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα

- Απομόνωση του *Vibrio spp.*

Το άγαρ με χολικά άλατα θειοθειικής σακχαρόζης (T.C.B.S.) των εταιρειών B.B.L., Difco, Oxoid, ευνοεί την ανάπτυξη των παθογόνων *Vibrio* (εκτός από το *V. ordalii*), ενώ αναστέλλει την αύξηση των υπόλοιπων βακτηρίων. Τα *Vibrio* σχηματίζουν πράσινες και κίτρινες αποικίες (ανάλογα με το είδος), οι οποίες είναι ευκολοδιάκριτες από τις αποικίες άλλων βακτηριδίων.

- Απομόνωση της *Pseudomonas spp.*

Τα υλικά που κυκλοφορούν στο εμπόριο, περιέχουν την αντισηπτική ουσία *κετριμίδη* (*Pseudosell agar* της B.B.L., *Pseudomonas C.F.C. agar* της Oxoid), η οποία εμποδίζει αποτελεσματικά την ανάπτυξη των περισσότερων *Gram* αρνητικών βακτηριδίων, και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκλεκτική απομόνωση των ψευδομονάδων.

- Απομόνωση της *Aeromonas hydrophila*.

Χρησιμοποιείται το άγαρ Rimler- Shotts, το οποίο περιέχει ορισμένα αμινοξέα, μαλτόζη και το αντιβιοτικό νοβοβοκίνη, το οποίο επιτρέπει τη γρήγορη ανάπτυξη της *Aeromonas hydrophila*. Αυτό το μικρόβιο προκαλεί το σχηματισμό κίτρινων αποικιών (εξαιτίας της ζύμωσης της μαλτόζης) χωρίς μαύρο κέντρο (δε σχηματίζεται υδρόθειο) μετά από 24ωρη επώαση στους 37°C. Η επώαση στους 37°C είναι απαραίτητη για να προληφθεί η πιθανή ανάπτυξη της *Aeromonas salmonicida*, η οποία παράγει αποικίες με παρόμοια χρωστική αλλά σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

1.4.3. Μη ειδικά θρεπτικά υποστρώματα

ι) Υποστρώματα γενικής χρήσεως

Η πλειοψηφία των παθογόνων μικροβίων των ψαριών δεν είναι πολύ απαιτητική στις διατροφικές της απαιτήσεις. Έτσι, για την καλλιέργειά τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσεως ή αιματούχο άγαρ³, αν και το T.S.A. agar (τρυπτόνη-σόγια-πεπτόνη άγαρ) είναι διαθέσιμο από πολλές εταιρείες (T.S.A. των B.B.L.,

T.C.B.S. (Thiosulphate-citrate-bile-sucrose agar)	
Peptone	10.0 gr
Yeast extract	5.0 gr
Sodium thiosulphate	10.0 gr
Sodium citrate	10.0 gr
Ox bill	8.0 gr
Sucrose	20.0 gr
sodium chloride	10.0 gr
Ferric citrate	1.0 gr
Bram-thymol blue	0.04 gr
Thymol blue	0.04 gr
Agar	14 gr
Water	1000 ml

³ Με την προσθήκη, στο τρυπτικούχο άγαρ, 5% απινιδωμένου αίματος (άπηκτο) θηλαστικού (συνήθως προβάτου), παρασκευάζεται αιματούχο άγαρ.

Difco, Oxoid) και αποτελεί το υπόστρωμα εκλογής στα περισσότερα εργαστήρια. Ευνοεί την ανάπτυξη όλων των αερομονάδων, βιμπρίων του γλυκού νερού, ψευδομονάδων, φλαβοβακτηρίων, εντεροβακτηρίων, παστερελλών, στρεπτόκοκκων, μικρόκοκκων και νοκαρδίων, και παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι φαίνεται καθαρά η παρουσία της καφέ χρωστικής που παράγεται από την πλειοψηφία των στελεχών της *A. salmonicida*, τα οποία απομονώνονται από τα σολωμονοειδή.

Αν και το T.S.A. agar, αλλά και μερικές συνθέσεις θρεπτικών άγαρ, περιέχουν 0,5% NaCl (βάρους / όγκο) ορισμένα βίμπριο του θαλασσινού νερού, και ειδικότερα το *Vibrio anguillarum*, απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση αλάτων για την πρωτογενή τους απομόνωση. Στην περίπτωση αυτή προστίθεται αλάτι, ώστε να επιτύχουμε τελική συγκέντρωση 2% (βάρους / όγκο). Εναλλακτικά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το θαλασσινό άγαρ της Difco, το οποίο περιέχει μεταλλικά στοιχεία σε διπλάσια συγκέντρωση από αυτή του θαλασσινού νερού. Μόλις απομονωθούν τα βίμπριο, αυτά μπορεί να χάσουν την αλλοφυλία τους και έτσι να ανακαλλιεργηθούν σε κοινό υπόστρωμα T.S.A.

Χρησιμοποιείται επίσης, το B.H.I. άγαρ (Brain Heart Infusion agar), το οποίο παρασκευάζεται από εγκέφαλο και καρδιά μόσχου. Σ' αυτό αναπτύσσονται πολύ καλά οι μικροοργανισμοί, αλλά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο.

B.H.I. (Brain Heart Infusion agar)	
Calf brains infusion from	200 gr
Beef extract infusion from	250 gr
Protease peptone	10 gr
Dextrose	2 gr
Sodium chloride	5 gr
Sodium phosphate (dibasic)	2.5 gr
Agar	15 gr
Water	1000 ml

T.S.A. (Tryptic Soy Agar)	
Tryptone	15.0 gr
Soytone	5.0 gr
Sodium chloride	5.0 gr
Agar	15.0 gr
Water	1000 ml

ii) Υποστρώματα φτωχά σε θρεπτικά υλικά

Τα μυξοβακτηρίδια, που αποτελούν μία πολύ εξαπλωμένη ομάδα παθογόνων βακτηριδίων των ψαριών, είτε δεν αναπτύσσονται καθόλου ή αναπτύσσονται πολύ λίγο σε T.S.A. άγαρ ή παρόμοια υλικά. Οι οργανισμοί αυτοί απαιτούν σχετικά χαμηλά επίπεδα θρεπτικών στοιχείων και άγαρ, και τα στελέχη από το γλυκό νερό απομονώνονται

καλύτερα σε *Cytorhaga agar*. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί υλικό γενικής χρήσεως αραιωμένο, ώστε να περιέχει 1/10 των θρεπτικών υλικών και 1% άγαρ.

Καλύτερα ακόμη αποτελέσματα επιτυγχάνονται με πρόσφατα παρασκευασμένο υλικό και επώαση αυτού σε υγρή ατμόσφαιρα, ώστε να υπάρχει αρκετή υγρασία για τις αποικίες που παρουσιάζουν μαζική ανάπτυξη στην επιφάνεια του υλικού. Λίγα στελέχη μυξοβακτηριδίων ανέχονται τη μεταφορά σε γλυκό νερό αλλά και το αντίθετο, δηλαδή η απομόνωσή τους από τα θαλασσινά ψάρια πρέπει να επιχειρείται σε κυτοφάγα άγαρ, τα οποία περιέχουν 50-70% φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό ή θαλασσινό άγαρ (*marine agar*).

iii) Εμπλουτιστικά υλικά

Αυτά απαιτούνται μόνο για την απομόνωση του *Haemophilus piscium*, *Renibacterium salmoninarum*, και *Mycobacterium spp.* Ο *H. piscium* έχει απαιτήσεις για τριφωσφορική αδενοσίνη ή κο-καρβοξυλάση. Οι απαιτήσεις αυτές ικανοποιούνται με τη χρήση Mueller Hinton agar (των Difco, Oxoid) που περιέχουν 2 mg/ml κο-καρβοξυλάση.

1.4.4. Διαδικασία απόκτησης καθαρών καλλιιεργειών

Μετά την πρώτη καλλιέργεια από τα δείγματα των ψαριών, αποκτούμε σε 24 ώρες καλλιέργειες με μεικτές συνήθως αποικίες, εκτός και εάν, όπως έχουμε ήδη αναφέρει σε περίπτωση σηψαιμίας, απομονώσουμε το παθογόνο αίτιο σε καθαρή μορφή. Μέλημά μας είναι η απομόνωση μεμονωμένων αποικιών, δηλαδή οι καθαρές καλλιέργειες. Διότι μόνο με καθαρές καλλιέργειες είναι δυνατή η μελέτη των χαρακτήρων ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού, προκειμένου να επιτευχθεί η ταυτοποίησή του ή η εκτέλεση αντιβιογράμματος κ.λ.π.

Με τον μικροβιολογικό κρίκο ανακαλλιιεργούμε μια ξεχωριστή αποικία. Η ανακαλλιέργεια εκτελείται στο μισό του τρυβλίου petri, ώστε να εξοικονομούνται υλικά, και πάντοτε με τρεις διαδοχικές αραιώσεις ώστε να αποκτούμε στο τέλος ξεχωριστές αποικίες. Για την απόκτηση καθαρής καλλιέργειας απαιτούνται 48 ώρες. Μπορούμε πλέον να προχωρήσουμε στην εκτέλεση των δοκιμών προκαταρκτικής κατάταξης των μικροβίων, πλήρους ταυτοποίησης, αντιβιογράμματος κ.λ.π. Η όλη διαδικασία, η οποία τερματίζεται με τη λήψη του αντιβιογράμματος, διαρκεί 72 ώρες.

1.4.5. Χρώση μικροβίων κατά Gram

Πρόκειται για τη συνηθέστερη χρησιμοποιούμενη χρώση των μικροβίων των κυττάρων. Σύμφωνα με το χρώμα το οποίο αποκτούν τα μικρόβια μετά τη βαφή τους, με τη χρώση αυτή

κατατάσσονται σε *Gram* θετικά μπλε χρώματος και *Gram* αρνητικά κόκκινου. Η μέθοδος αποτελεί και κριτήριο ταυτοποίησης των μικροβίων. Τα χρωματισμένα με τον τρόπο αυτό βακτήρια, καθιστούν εμφανές και το σχήμα τους. Συνήθως, τα *Gram* αρνητικά είναι μικρόβια σχήματος βακτηρίας (ραβδιού), από την οποία ονομάζονται βακτήρια, ενώ τα *Gram* θετικά έχουν σχήμα κόκκου. Και οι δύο ομάδες παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά όπως:

1. Παθογένεια: Συνήθως στην ιχθυοπαθολογία μας απασχολούν λοιμώξεις οι οποίες οφείλονται σε *Gram* αρνητικά βακτήρια, τα οποία προκαλούν αιμορραγικά σηψαιμικά νοσήματα.
2. Κίνηση: Τα βακτήρια είναι συνήθως κινητά, ενώ οι κόκκοι είναι πάντοτε ακίνητοι.
3. Ευαισθησία στα χημειοθεραπευτικά: Τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι ευρέως φάσματος κατά των *Gram* αρνητικών λοιμώξεων.

Η χρώση εκτελείται ως εξής:

Από καθαρή καλλιέργεια 24 ωρών⁴, σχηματίζεται ένα λεπτό μικροβιακό στρώμα (film) σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με τη βοήθεια σταγόνας απεσταγμένου νερού ή P.B.S. Το στρώμα αυτό στεγνώνει με τη βοήθεια φλόγας, ώστε να μην ξεπλένονται τα μικροβιακά κύτταρα από την πλάκα. Πρέπει επίσης να είναι λεπτό, για να επιτρέπει την μικροσκοπική παρατήρηση. Ακολουθώς:

α) Βάφεται στην πρώτη χρωστική ***Crystal violet*** επί 3 λεπτά. Ξεπλένεται με νερό, στεγνώνει με απορροφητικό χαρτί και

β) βάφεται με τη δεύτερη χρωστική, η οποία είναι διάλυμα ιωδίου ***Lugol*** επί 2 λεπτά. Ξεπλένεται με νερό και αλκοόλη. Η αλκοόλη ξεβάφει το ***Crystal violet*** από το κυτταρικό τοίχωμα των *Gram* αρνητικών μικροβίων μόνο. Επειδή όμως και αυτά τα μικρόβια πρέπει να βαφτούν, για να γίνει δυνατή η μικροσκοπική τους παρατήρηση βάφονται με

γ) μια κόκκινη χρωστική, συνήθως ***φουξίνη*** ή ***σαφρανίνη*** επί 1 λεπτό. Ξεπλένεται το παρασκεύασμα με νερό, στεγνώνει και παρατηρείται μικροσκοπικά με καταδυτικό φακό.

1.4.6. Πρώτο στάδιο test ταυτοποίησης, για *Gram* αρνητικά βακτήρια

i) Δοκιμή οξειδάσης (Oxidase activity)

Τοποθετούμε δύο ή τρεις (2 ή 3) σταγόνες του αντιδραστήριου της οξειδάσης σε ένα τεμάχιο διηθητικού χαρτιού. Με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου, απλώνουμε δείγμα της υπό εξέταση μικροβιακής καλλιέργειας επάνω στο αντιδραστήριο. Σε μερικά

⁴ Πρόκειται για απαραίτητη προϋπόθεση, αφού σε αυτήν τα μικροβιακά στελέχη επιδεικνύουν τους τυπικούς βιοχημικούς τους χαρακτήρες, σε παλαιότερες καλλιέργειες τα μικρόβια μπορεί να χρωματιστούν διαφορετικά, π.χ. ενώ οι κόκκοι βάφονται τυπικά μπλε, στις γερασμένες καλλιέργειες πολλοί βάφονται και κόκκινοι.

δευτερόλεπτα παρουσιάζεται η τυχόν θετική αντίδραση, η οποία υποδηλώνεται από την εμφάνιση πορφυρού χρώματος. Σε αντίθετη περίπτωση δεν υπάρχει αλλαγή χρώματος. Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τεμάχια χαρτιού, τα οποία είναι εμποτισμένα με το αντιδραστήριο της οξειδάσης, και που προσφέρονται έτοιμα στο εμπόριο. Η αντίδραση της οξειδάσης είναι σπουδαία στην ταυτοποίηση των μικροβίων. Τα διαχωρίζει σε **ox+** (οξειδάση θετική) και σε **ox-** (οξειδάση αρνητική). Κριτήριο σημαντικό για την προκαταρκτική τους ταυτοποίηση, αφού τα **ox-** βακτήρια ανήκουν στην ομάδα των εντεροβακτηριακών (*coliforms*) βακτηρίων, με τελείως διαφορετικούς βιοχημικούς χαρακτήρες από τα **ox+**, καθώς και διαφορετικής μικροβιολογικής συμπεριφοράς (τα *coliforms* έχουν υγειονομική κυρίως σημασία, ενώ τα **ox+** είναι κυρίως υπεύθυνα για την εμφάνιση σηψαιμιών στα ζωντανά ψάρια).

ii) Δοκιμή οξειδώσεως-ζυμώσεως της γλυκόζης (oxidation-fermentation of glucose - O/F)

Με τη δοκιμή αυτή, διευκρινίζεται εάν ένα θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει υδατάνθρακες, συνήθως γλυκόζη, χρησιμοποιείται από ένα μικροβιακό στέλεχος, οξειδωτικά ή ζυμωτικά. Το υλικό περιέχει γλυκόζη 1% βάρος / όγκο και δείκτη pH, π.χ. μπλε της βρωμοθυμόλης, ο οποίος δίνει πράσινο χρώμα στο στείρο υπόστρωμα. Το υλικό τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, σε ζευγάρια στα οποία ο ένας σωλήνας είναι ανοιχτός, ενώ ο δεύτερος καλύπτεται με στρώμα παραφινέλαιου πάχους 1 cm, ώστε να αποκλείεται η οξειδωτική δράση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Τέλος, και οι δύο σωλήνες εμβολιάζονται με τον μικροβιολογικό κρίκο, με πρώτο τον ανοιχτό σωλήνα. Οι σωλήνες επωάζονται και εξετάζονται εάν χρησιμοποιούν τους υδατάνθρακες (με τη χρήση του υδατάνθρακα παράγεται οξύ και ο δείκτης αλλάζει χρώμα από πράσινο σε κίτρινο).

Κίτρινο χρώμα και στους δύο σωλήνες σημαίνει ότι το μικρόβιο χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ζυμωτικά, ενώ το ίδιο χρώμα μόνο στον ανοιχτό σωλήνα σημαίνει οξείδωση. **Καμία αντίδραση και στους δύο σωλήνες**, σημαίνει ότι το ερευνώμενο βακτήριο δε χρησιμοποιεί το σάκχαρο του υποστρώματος. Οι πιθανές αντιδράσεις σημειώνονται ως εξής: O/F +/+ , +/-, -/-.

iii) Δοκιμή καταλάσης

Χρησιμοποιείται για να αποδειχθεί εάν ένα βακτηριδιακό στέλεχος παράγει το ένζυμο καταλάση. Το ένζυμο αυτό καταλύει την αντίδραση $2\text{H}_2\text{O}_2 \text{ ----> } 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο είναι δηλητήριο, παράγεται κατά τον αερόβιο μεταβολισμό των μικροβίων, ενώ το αυτό δε συμβαίνει με τα αναερόβια μικρόβια. Υπάρχει επίσης στους ιστούς και το αίμα. Η δοκιμή εκτελείται ως εξής: Σε καθαρή

αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούνται μερικές αποικίες του υπό εξέταση μικροβίου, και κατόπιν προστίθενται και μερικές σταγόνες υπεροξειδίου του υδρογόνου. Θετική αντίδραση σημαίνει παραγωγή φυσαλίδων οξυγόνου (O_2), οι οποίες είναι εύκολα ορατές μακροσκοπικά. Προσοχή να μη χρησιμοποιούνται καλλιέργειες από αιματούχο άγαρ, διότι δίνει αντιδράσεις εσφαλμένες θετικά.

iv) Δοκιμή κινητικότητας

Με τη δοκιμή αυτή διακρίνουμε τα κινητά από τα ακίνητα μικρόβια. Κίνησή σημαίνει ύπαρξη κατάλληλων για το σκοπό αυτό οργανιδίων, όπως είναι τα μαστίγια και οι βλεφαρίδες. Μετά από επώαση 24 ωρών καθαρής καλλιέργειας, μια μεμονωμένη αποικία αραιώνεται με σταγόνα απεσταγμένου νερού και τοποθετείται σε καλυπτρίδα. Η τελευταία, με λίγη βαζελίνη, προσαρμόζεται στο κοίλωμα ειδικής αντικειμενοφόρου πλάκας, με τη σταγόνα προς το εσωτερικό του κοίλου. Στη συνέχεια, αναστρέφεται η πλάκα, και με τη βοήθεια καταδυτικού φακού παρατηρείται αν τα μικρόβια είναι κινητά ή όχι. Ενεργητική κίνηση σημαίνει να διασχίζουν τα μικρόβια το οπτικό πεδίο από τη μια άκρη στην άλλη. Τοπική μόνο κίνηση είναι αποτέλεσμα της παθητικής κίνησης σωματιδίων Brown.

v) Ευαισθησία στο βιμπριοστατικό (0/129) και τη νοβοβιοκίνη.

Με τη δοκιμή αυτή μπορούμε να διακρίνουμε τα ευαίσθητα στους παράγοντες αυτούς μικρόβια, όπως τα *Vibrio* και την *Pasteurella piscicida*, από συγγενικά είδη όπως είναι οι αερομονάδες. Και οι δύο προαναφερθέντες παράγοντες αναστέλλουν την ανάπτυξη των ευαίσθητων σε αυτούς μικροβίων και χρησιμεύουν για τη διαφορική τους διάγνωση. Είναι εμποτισμένα σε χάρτινα δισκία, τα οποία χρησιμοποιούνται όπως και τα δισκία του αντιβιογράμματος, σχηματίζοντας ή όχι δακτύλιο αναστολής αναπτύξεως. Επίσης μπορούμε να κάνουμε ανακαλλιέργειες με μερικές πυκνές παράλληλες γραμμές σποράς. Πάνω στις γραμμές τοποθετούμε τα δισκία και παρατηρούμε την τυχόν ανάπτυξη μετά από επώαση.

■ Όλα τα προαναφερόμενα προκαταρκτικά test, έχουν σκοπό να βοηθήσουν τον μικροβιολόγο να κατατάξει προκαταρκτικά το μικρόβιο που απομόνωσε σε κάποια μεγάλη κατηγορία, π.χ. αερομονάδες, εντεροβακτηριακά ή *Vibrio*, και μετά να προχωρήσει στη λεπτομερή ταυτοποίηση, χρησιμοποιώντας τις αναγκαίες κατά περίπτωση βιοχημικές δοκιμασίες, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με το μικροβιακό είδος. Για μια ακόμη φορά επισημαίνουμε την ανάγκη να χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες μετά από 24 ώρες επώασης, ώστε οι αντιδράσεις να είναι οι τυπικές του είδους.

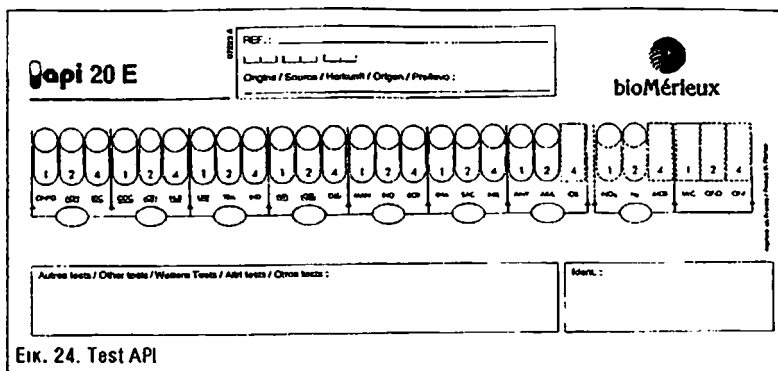
1.4.7. Πλήρης ταυτοποίηση των μικροβίων.

Μετά την προκαταρκτική κατάταξη (screening) των απομονωθέντων μικροβιακών στελεχών στις μεγάλες μικροβιακές οικογένειες, ακολουθεί η λεπτομερής βιοχημική τους εξέταση -βάσει επιπλέον βιοχημικών δοκιμασιών- ώστε να καταστεί δυνατή η ταυτοποίησή τους, τουλάχιστον στο επίπεδο του είδους. Η μεθοδολογία αυτή αποτελεί την κλασική διαδικασία μικροβιολογικής ταυτοποίησης και δεν κρίνεται πλέον ικανοποιητική. Πρόκειται στην πραγματικότητα για μελέτη του μικροβιακού φαινοτύπου. Είναι μια ταυτοποίηση κατά προσέγγιση (*Presumptive identification*). Απαιτείται μελέτη του μικροβιακού γονοτύπου, δηλαδή του γενετικού του υλικού, ώστε η ταυτοποίηση να είναι απόλυτη. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται μελετούνται από την ανοσολογία και ανοσοδιαγνωστική. Στην πραγματικότητα όμως πρόκειται για μεθόδους μοριακής βιολογίας, στις οποίες περιλαμβάνεται η κλασική μέθοδος παραγωγής αντισωμάτων από πειραματόζωα. Η ποιοτική ανίχνευσή τους πραγματοποιείται με οροσυγκόλληση, ενώ η ποσοτική εκτίμηση με τον εύρεση του τίτλου. Η νεότερη έρευνα χρησιμοποιεί τα φθορίζοντα αντισώματα, τα μονοκλωνικά αντισώματα και την ανίχνευσή τους με την μέθοδο *ELISA*, την ανασύνδεση του μικροβιακού DNA και την ανίχνευσή του με τη μέθοδο *immunoblot*, το άθροισμα G+C (Γουανίνη + Κυτοσίνη) του μικροβιακού κυττάρου, καθώς και την ηλεκτροφόρηση *PAGE*. Τέλος, εκτός από την ταυτοποίηση για να ικανοποιηθούν πλήρως οι βασικές αρχές της μικροβιολογίας όσον αφορά την παθογένεια του απομονωθέντος μικροβίου, είναι απαραίτητη η πειραματική αναπαραγωγή της νόσου σε υγιή ψάρια και η εκ νέου απομόνωση του ίδιου μικροβίου από τα νοσούντα πειραματόζωα (Koch's postulates).

1.4.8. Μέθοδος API

Εκτός από τις προαναφερθέντες μεθόδους, κατά την προκαταρκτική ταυτοποίηση των απομονωθέντων μικροβίων για την πλήρη βιοχημική ταυτοποίηση απαιτούνται ακόμη 25 περίπου βιοχημικές δοκιμασίες (test). Πρόκειται κυρίως για δοκιμασίες ανίχνευσης τυχόν χρησιμοποίησης, εκ μέρους των υπό εξέταση μικροβίων, διάφορων χημικών ουσιών. Οι δοκιμασίες αυτές εκτελούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, και αποτελούν τη μέθοδο κλασικής βιοχημικής ταυτοποίησης. Επειδή ο τρόπος αυτός είναι κοπιώδης και πολυέξοδος, η σύγχρονη τεχνολογία παράγει όλα αυτά τα υλικά μαζί σε κατάλληλη συσκευασία. Με την τεχνολογία αυτή χρησιμοποιούνται μικροποσότητες σε λιοφυλόμενη μορφή. Πρωτοκατασκευάστηκαν στη Γαλλία με το εμπορικό όνομα *API*. Υπάρχουν διαφορετικού τύπου *API* με διαφορετική σύνθεση υποστρωμάτων, ανάλογα με τη γενικότερη ομάδα στην οποία ανήκει το υπό εξέταση μικρόβιο. Περισσότερο

χρησιμοποιούνται οι τύποι *API 20E* και *API 20NE*. Ο αριθμός 20 σημαίνει πόσες βιοχημικές δοκιμασίες περιέχονται, τα δε αρχικά: E=εντεροβακτηριακά (enterobacteriaceae) και NE=μη εντεροβακτηριακά



(non enterobacteriaceae). Ο μικροβιολόγος αποφασίζει ποιον τύπο να χρησιμοποιήσει μετά την εκτέλεση της δοκιμασίας οξειδάσης. Τα ox+ είναι μη εντεροβακτηριακά, και τα ox- εντεροβακτηριακά. Το κάθε αντιδραστήριο βρίσκεται σε κυψελίδα, η οποία ενυδατώνεται με ποσότητα μικροβιακού εναιωρήματος. Το υλικό επωάζεται και, σύμφωνα με την αλλαγή χρώματος του υποστρώματος, σημειώνεται το θετικό ή μη αποτέλεσμα. Οι δοκιμασίες χωρίζονται σε επτά τριάδες. Το κάθε μέλος της τριάδας βαθμολογείται με 1,2,4 σύνολο 7 μονάδες (εικ. 24). Είναι το λεγόμενο ψηφιακό (digit system) σύστημα. Μετά την εκτέλεση της δοκιμής και της βαθμολόγησής της, ο επταψήφιος αριθμός που προκύπτει συγκρίνεται με τους αριθμούς του βιβλίου στελεχών. Αν οι αριθμοί συμφωνούν, τότε υπάρχει ταυτοποίηση με το αντίστοιχο μικροβιακό στέλεχος. Η ταυτοποίηση βαθμολογείται σε **ανεκτή, καλή, πολύ καλή και εξαιρετή**, σύμφωνα με τα όρια εμπιστοσύνης της τράπεζας δεδομένων του συστήματος. Βεβαίως μπορεί να μην υπάρχει ταυτοποίηση.

1.4.9. Αντιβιογράμμα

Το αντιβιογράμμα είναι ένα είδος βιολογικής δοκιμασίας, με την οποία ο μικροβιολόγος αναγνωρίζει σε ποιο συγκεκριμένο αντιβιοτικό το μικροβιακό στέλεχος που απομόνωσε είναι ευαίσθητο ή ανθεκτικό, και σε ποιο βαθμό. Επομένως είναι μία ιδιαίτερα πολύτιμη μέθοδος, αφού δίνει τη δυνατότητα χρήσης του σωστού αντιβιοτικού, το οποίο καταπολεμά αποτελεσματικά το νόσημα. Επιπλέον εξοικονομείται χρόνος και χρήμα, αφού απαγορεύεται η τυχαία επιλογή αντιβιοτικών, των οποίων η αλόγιστη χρήση προκαλεί την εμφάνιση ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών υποχρεώνει σε συνεχή έρευνα για τη σύνθεση νέων αντιβιοτικών.

1.4.9.1. Εκτέλεση αντιβιογράμματος

1η μέθοδος

Απαιτούμενα υλικά: Χρησιμοποιούνται τρυβλία με το ειδικό για την περίπτωση άγαρ Mueller-Hinton.

Μερικές αποικίες καθαρής καλλιέργειας μικροβίου 24 ωρών, εμβολιάζονται σε σωλήνα με θρεπτικό ζωμό (nutrient broth) σε θερμοκρασία 30°C για 2-3 ώρες. Βασικό στοιχείο είναι η επίτευξη τελικής συγκέντρωσης πληθυσμού της τάξεως 10⁷.

Από το θρεπτικό ζωμό, ποσότητα 0.1ml απλώνεται στο άγαρ με τη βοήθεια υάλινης σπάτουλας, κατόπιν τοποθετούνται οι χάρτινοι δίσκοι με τα εμποτισμένα αντιβιοτικά, και το τρυβλίο ανεστραμμένο επωάζεται 18-24 ώρες. Διαβάζονται οι δακτύλιοι αναστολής αναπτύξεως των μικροβίων και επιλέγεται για θεραπεία το αντιβιοτικό που σχηματίζει το δακτύλιο με τη μεγαλύτερη διάμετρο.

Τα αντιβιοτικά μπορεί: α) Να μη σχηματίσουν δακτύλιο, οπότε η ευαισθησία σε αυτά των μικροβίων είναι μηδενική, και β) να σχηματίσουν μικρό ή μεγάλο δακτύλιο, ανάλογα τη δραστηρότητά τους. Πάνω σε κάθε δίσκο είναι τυπωμένα τα αρχικά του περιεχόμενου αντιβιοτικού, καθώς και η περιεκτικότητά του σε mgr. Τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά είναι:

Οξολινικό οξύ	OA ₁₀
Οξυτετρακυκλίνη	T ₃₀
Μείγμα σουλφοναμιδών σουλφαθειαζίνης - Τριμεθοπρίνης (Tribrissen)	SXT ₂₅
Φουραζολιδόνη	FR ₅₀
Νορφολαξίνη	NOP ₁₀

Η συνολική διάρκεια απόκτησης αντιβιογράμματος είναι περίπου 72 ώρες. Εικοσιτέσσερις (24) ώρες απαιτούνται για την πρώτη απομόνωση από τα ψάρια - δείγματα, ακολουθούν ακόμη 24 ώρες για την απόκτηση καθαρής καλλιέργειας και την τρίτη ημέρα εκτελείται το αντιβιογράμμα.

2η μέθοδος

Υλικό από νεφρό ενοφθαλμίζεται σε T.S.A. +2% NaCl και επωάζεται για 24-48 ώρες, με στόχο την ανάπτυξη καθαρών αποικιών, οι οποίες ανακαλλιεργούνται για τη δημιουργία και διατήρηση - φύλαξη καθαρών στελεχών. Μια αποικία διαλύεται σε T.S. broth για 18 ώρες

(h) και η οπτική πυκνότητα του broth ρυθμίζεται σε 0.125 στα 550nm (που αντιστοιχεί σε Mc Farland Standard 0.5 ή σε 1.5×10^8 βακτηριακά κύτταρα / ml). 10 μ l⁵ από το διάλυμα διαλύονται σε 10 ml στείρο M.H. broth. 300 ml από το εναιώρημα αυτό ενοφθαλμίζονται σε M.H. Agar και, αφού αφεθεί για 2 λεπτά (min) να στεγνώσει, γίνεται η εναπόθεση των δισκίων αντιβιοτικών. Κατόπιν, τα petri τοποθετούνται ανεστραμμένα για 24 ώρες στους 25°C και στη συνέχεια γίνεται η μέτρηση των ζωνών αναστολής (Barker et. al. 1995), με βάση μια από τις παρακάτω μεθόδους - προτάσεις:

**Προτάσεις στη βιβλιογραφία
για την αξιολόγηση των ζωνών αναστολής σε αντιβιογράμματα**

Richard Collins
Aquaculture for veterinarians <13mm
Well in excess of 20mm

Gavin Barber
M.A.F.F. Fish Diseases Lab, Weymouth
Handb of Bacteriology: 6-15mm
ΜΕΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ: 15-20mm ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ >25mm

**Val Inglis, Nick Freridus
Institute of Aquaculture University of Stirling**

Αντιβιοτικό	Δόση	+++	++	+	-
O.T.C.	30 μ gr	28 mm	19 mm	12 mm	0 mm
O.A.	2 μ gr	25	17	12	0
Co-trimoxazole	25 μ gr	29	20	11	0
Sulfaturazole	100 μ gr	29	20	11	0
Nitrofurandoin	100 μ gr	26	17	11	0
Furazolidone	50 μ gr	26	17	11	0

mm zone of inhibition (ζώνη αναστολής σε mm)

1.4.10. Οροδιαγνωστική ταυτοποίηση των παθογόνων των ψαριών

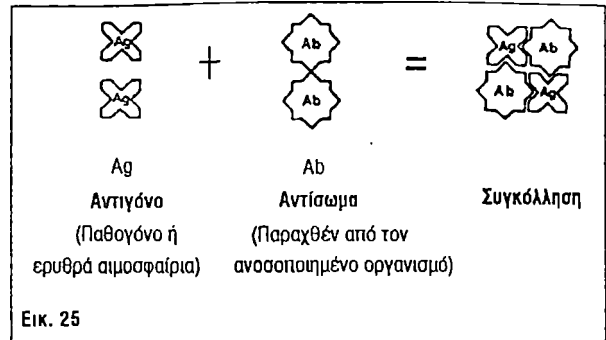
Αντικειμενικός σκοπός

Σκοπός της οροδιαγνωστικής είναι να επιτευχθεί η ταυτοποίηση ενός βακτηρίου με τη μέθοδο οροσυγκολλήσεως σε πλάκα, χρησιμοποιώντας γνωστό αντιγόνο.

Εισαγωγή

⁵ μ l = μικρόλιτρα

Η "κλασική" ταυτοποίηση των βακτηριδίων με τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων ή αντιδράσεων σακχάρων και ενζύμων, είναι χρονοβόρα και πολλές φορές δύσχρηστη. Η σωστή ταυτοποίηση απαιτεί τη χρησιμοποίηση μεγάλου αριθμού δοκιμασιών, ώστε να φθάσουμε στο



επίπεδο γένους ή είδους. Για να πραγματοποιηθούν όμως αυτές οι εξετάσεις απαιτούνται 48, τουλάχιστον, ή περισσότερες ώρες. Η οροδιαγνωστική προσφέρει γρήγορη και ακριβή μέθοδο διάγνωσης. Η ορολογιακή ταυτοποίηση βασίζεται στην αντίδραση του ειδικού αντιγόνου (πρωτεΐνες ή λιποπολυσακχαρίτες μικροβίων και ιών) με το ειδικό αντίσωμα που παρήχθη στον οργανισμό, σαν αποτέλεσμα (αντίδραση) της έκθεσής του στο ειδικό αντιγόνο ασθένειας ή εμβολιασμού. Η οροσυγκόλληση (agglutination) του αντιγόνου (π.χ. βακτήρια ή ερυθρά αιμοσφαίρια) συμβαίνει όταν τα αντισώματα του αντιορού (antiserum-antisera) αντιδρούν με το ειδικό αντιγόνο. Τότε σχηματίζονται ομάδες συγκολλημένων κυττάρων (βακτηρίων ή αιμοσφαιρίων) ορατές με γυμνό οφθαλμό. Η εικόνα 25 εξηγεί πολύ απλά την οροσυγκόλληση.

Υλικό

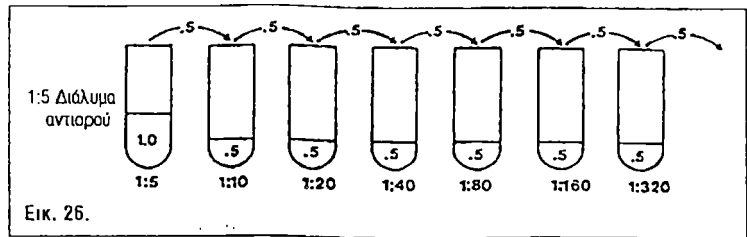
Απαιτείται:

- Καθαρή καλλιέργεια του μικροβίου, π.χ. *Aeromonas hydrophila* ή άλλο είδος μικροβίου, ή ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Καθαρή καλλιέργεια αγνώστου μικροβίου.
- 2 σωλήνες φυσιολογικού ορού - 5ml φυσιολογικού ορού σε κάθε σωλήνα.
- 20 ορολογικά σωληνάκια.
- Φιάλη φυσιολογικού ορού.
- Αντικειμενοφόροι πλάκες.
- Βαμβακοφόροι στυλεοί.
- Πιπέτες του 1 ml.
- Πιπέτες Pasteur.

Διαδικασία

1. Προετοιμάζονται δεκαοχτώ ορολογικά σωληνάρια με 0.5 ml φυσιολογικού ορού ανά σωλήνα και τοποθετούνται σε διπλή σειρά, αφήνοντας τον πρώτο σωλήνα κάθε σειράς άδειο.

2. Χρησιμοποιώντας πιπέτα του 1 ml, μεταφέρεται 1 ml από το 1:5 διαλυμένο αντιορό της *Aeromonas hydrophila* (ή άλλον ειδικό αντιορό) στο άδειο



σωληνάριο της πρώτης σειράς. Μετά μεταφέρονται διαδοχικά 0.5 ml του 1:5 αντιορού σε κάθε επόμενο σωληνάριο, όπως φαίνεται στην εικόνα 26.

3. Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη εργασία (2) με τον υπό εξέταση άγνωστο ορό.

4. Παραλαμβάνεται κάποια ποσότητα καλλιεργήματος *Aeromonas hydrophila* με βαμβακοφόρο συλυέο, και αναμειγνύονται στο σωλήνα με τα 5 ml φυσιολογικού ορού. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με την άγνωστη καλλιέργεια (που όμως πρώτιστα έχει ταυτοποιηθεί βιοχημικά).

5. Από κάθε σωληνάριο διαδοχικής υποδιπλασιαστικής αραιώσης γνωστού αντιορού *Aeromonas hydrophila* του υπό εξέταση ορού, τοποθετείται μια σταγόνα σε κάθε άκρο αντικειμενοφόρου πλάκας.

6. Με πιπέτα Pasteur, τοποθετείται μια σταγόνα του εναιωρήματος της *Aeromonas hydrophila* στις πλάκες με τις σταγόνες των αντιορών.

7. Η προηγούμενη διαδικασία **ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΤΑΙ** με το άγνωστο μικρόβιο και την άλλη σειρά γνωστού αντιορού *Aeromonas hydrophila* και του άγνωστου υπό εξέταση ορού.

8. Ανακατεύονται τα δύο υγρά στην αντικειμενοφόρο, κουνώντας την δεξιά-αριστερά.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

α) Παρατηρείται μία συγκόλληση, η οποία είναι ορατή σε 10-30 λεπτά, και η οποία αυξάνει σε ένταση με τη διάρκεια. Το αρνητικό αποτέλεσμα χαρακτηρίζεται με ομοιογενή εμφάνιση του υπό εξέταση υγρού. Καταγράφονται τα αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας τα σύμβολα (συν) "+" και (πλην) "-". Η έντονη συγκόλληση εκφράζεται με "++++", η ελαφρά με "+", και η αρνητική με "-". Η εξέταση αυτή αποτελεί την ποιοτική απόδειξη της παρουσίας των ειδικών αντισωμάτων.

β) Είναι εφικτός και ο υπολογισμός της ποσότητας των κυκλοφορούντων αντισωμάτων, με τη μέτρηση του τίτλου. Αυτή είναι η ποσοτική απόδειξη της παρουσίας των ειδικών αντισωμάτων. Η μέτρηση του τίτλου προσφέρει σπουδαίες διαγνωστικές δυνατότητες. Όσο υψηλότερος είναι, τόσο εντονότερη η παραγωγή των αντισωμάτων, δηλαδή η μόλυνση βρίσκεται σε οξύ στάδιο. Αντίθετα, η πτώση του σημαίνει ότι και η μόλυνση είναι σε αποδρομή (στάδιο θεραπείας). Με τον έλεγχο του τίτλου είναι εφικτή η επισήμανση των θετικών φορέων ενός νοσογόνου παράγοντα, έτσι ώστε να ληφθούν τα κατάλληλα θεραπευτικά μέτρα χωρίς να είναι απαραίτητη η απομόνωση του νοσογόνου αιτίου. Επίσης, με τη μέτρηση του τίτλου ελέγχεται η αποτελεσματικότητα του εμβολίου. Δηλαδή κατά πόσο μια ανοσοποίηση με εμβολιασμό είναι επιτυχημένη και προσφέρει προστασία στον εμβολιασθέντα οργανισμό ή όχι. Και αυτό διότι και τα εμβόλια δεν είναι τίποτε άλλο παρά αντιγόνα των παθογόνων οργανισμών, οι οποίοι έχουν χάσει με κατάλληλη επεξεργασία τη λοιμογόνο τους δύναμη, αλλά διατηρούν την αντιγονική. Με τη χρήση λοιπόν των εμβολίων, αναγκάζεται το ανοσοποιητικό σύστημα των εμβολιασμένων οργανισμών να παράγει ειδικά αντισώματα, και μάλιστα σε ικανοποιητική ποσότητα (τίτλο) τα οποία προστατεύουν (δίνουν ανοσία) όταν συμβεί η πραγματική μόλυνση από το παθογόνο αίτιο, εναντίον του οποίου έχει πραγματοποιηθεί ο εμβολιασμός.

γ) Τέλος, ελέγχεται αν το μικρόβιο που χρησιμοποιήθηκε ως *Aeromonas hydrophila* είναι πράγματι αυτό, καταγράφεται το άγνωστο μικρόβιο (*A. hydrophila* ή όχι), καθώς και ο τίτλος του αντιορού.

1.5. Ιστολογικές εξετάσεις

Σκοπός της μεθόδου αυτής, η οποία αποτελεί βασική διαγνωστική μέθοδο στην ιχθυολογία, είναι η παρασκευή μόνιμων μικροσκοπικών παρασκευασμάτων ιστών των υπό εξέταση ψαριών. Οι ιστολογικές τομές προσφέρουν, αφ' ενός τη δυνατότητα διεξαγωγής συμπερασμάτων για τη γενική παθολογική κατάσταση των δειγμάτων, αφ' ετέρου καθορίζουν το είδος των ακόλουθων εργαστηριακών αναλύσεων που θα απαιτηθούν για την ακριβή διάγνωση της νόσου. Οι περισσότερες, αν όχι όλες, παθολογικές καταστάσεις στα ψάρια, προκαλούν ειδικές αλλοιώσεις των οργάνων τους, η παρατήρηση των οποίων επιτρέπει σε έναν έμπειρο ιχθυοπαθολόγο να προβεί σε γρήγορη και ακριβή διάγνωση της νόσου. Βέβαια, η σωστή διάκριση των αλλοιώσεων προϋποθέτει ερευνητή ασκημένο πρώτα στη φυσιολογική εμφάνιση των ιστών, ώστε να καθίσταται ικανός στη διάκριση των ειδικών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων, προχωρώντας στην σωστή διάγνωση.

1.5.1. Μέθοδοι και υλικά

- Υλικά

Χρησιμοποιούνται χειρουργικά νυστέρια, λεπίδες διάφορων μεγεθών, λεπτά ψαλίδια, ζυγαριά ακριβείας, απόχες, ιχθυόμετρα και πλαστικά μπουκαλάκια δειγματοληψίας των 100 ml, που περιέχουν μονιμοποιητικό υγρό. Η μονιμοποίηση χρησιμεύει για να εμποδίσει την αποσύνθεση των ιστών, πήζουν τα λευκώματα και καθηλώνουν τα ιστικά στοιχεία, και γι' αυτό πρέπει να γίνεται όσο είναι δυνατόν ταχύτερα μετά τον αποχωρισμό τους από το σώμα. Τα μονιμοποιητικά υγρά που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι τα ακόλουθα:

i) Φορμαλίνη (Φορμόλη)

ΣΥΣΤΑΣΗ	
Φορμόλη	100ml
Χλωριούχο νάτριο	9gr
Νερό, στήλης ή κοινό	1000ml

Είναι υδατικό διάλυμα 40% αερίου φορμαλδεϋδης (άκρατη φορμόλη). Χρησιμοποιείται σε αραιώση 1:9 (10% του προηγούμενου -πυκνού- διαλύματος) με κοινό νερό. Αποδίδει καλύτερα με προσθήκη 0.9% χλωριούχου νατρίου (NaCl) ή αλατούχος φορμόλη (formal saline). Για τη μονιμοποίηση χρειάζονται 6-24 ώρες, αναλόγως του όγκου του υλικού. Η φορμόλη είναι το συνηθέστερο και φθηνότερο μονιμοποιητικό υγρό.

ii) Οινόπνευμα

Το απόλυτο (100°), προκαλεί απότομη αφυδάτωση και συρρίκνωση των ιστών και, εάν το ιστοτεμάχιο είναι μεγάλο, μπορεί να μονιμοποιηθεί στην περιφέρεια ενώ το κέντρο να μείνει αμονιμοποίητο. Μικρά τεμάχια ιστών μονιμοποιούνται σε οινόπνευμα 70°-75°, για μεγαλύτερα όμως χρησιμοποιείται οινόπνευμα πυκνότερο (95°-96°), όπως είναι το λεγόμενο "καθαρό" του φαρμακείου ή, εν ανάγκη, και το κοινό "πράσινο", διότι το πυκνότερο αυτό οινόπνευμα παίρνει νερό από τον σχετικώς ογκώδη ιστό, και γρήγορα αραιώνει. Γενικά όμως, το οινόπνευμα δεν είναι πολύ καλό μονιμοποιητικό υγρό και οπωσδήποτε η φορμόλη πρέπει να προτιμάται.

(iii) Διχλωριούχος υδράργυρος (sublime-mercuric chloride)

Συνήθως συνδυάζεται με άλλες ουσίες, με τις οποίες αποτελεί σύνθετα μονιμοποιητικά υγρά, όπως π.χ. το υγρό Zenker. Χρησιμοποιείται μόνο σαν κεκορεσμένο διάλυμα, αλλά μπορεί να προκαλέσει συρρίκνωση του ιστού. Μονιμοποιεί ταχύτερα αλλά, πολλές φορές,

στους ιστούς εναποτίθενται άλατα. Αυτά αφαιρούνται αν προστεθούν μερικές σταγόνες διαλύματος Lugol στις πρώτες (μικρού βαθμού) αλκοόλες κατά την αφυδάτωση των τεμαχίων για την έγκλειση σε παραφίνη.

(iv) Διχρωμικό κάλιο (potassium bichromate)

Υδατικό διάλυμα 2-3%. Συνήθως προστίθεται -στην αναλογία αυτή- σε διάλυμα φορμόλης 10% (υγρό Muller), ή συνδυάζεται με άλλα μονιμοποιητικά υγρά. Μονιμοποιεί ταχύτατα. Μετά τη μονιμοποίηση, χρειάζεται πολλές ώρες απόπλυση του ιστού σε νερό, προκειμένου να αφαιρεθεί η φαιά χρωστική που προσλαμβάνεται από τους ιστούς.

v) Πικρικό οξύ (υγρό Bouins)

ΣΥΣΤΑΣΗ	
Πικρικό οξύ (picric acid) - κεκορεσμένο υδατικό διάλυμα	75 ml
Φορμόλη άκρατη	25 ml
Οξικό οξύ (glacial acetic acid)	5 ml

Χρησιμοποιείται σαν κεκορεσμένο υδατικό διάλυμα και αναμειγνύεται με φορμόλη, οπότε καλείται υγρό Bouin. Είναι κατάλληλο για όλους τους ιστούς, και κυρίως για τις γονάδες.

vi) Υγρό Zenker & Zenker Formol

ΣΥΣΤΑΣΗ	
Διχλωριούχος υδράργυρος (mercuric chloride)	5 gr
Διχρωμικό κάλιο (potassium bichromate)	2.5 gr
Θειικό νάτριο (sodium sulphate)	1 gr
Νερό	100 ml

Πριν από τη χρήση, προστίθεται ή οξικό οξύ 5ml, ή άκρατη φορμόλη (Zenker-Formol). Χωρίς οξικό οξύ ή φορμόλη, το μητρικό διάλυμα διατηρείται για πολύ καιρό. Είναι εξαιρετικό μονιμοποιητικό υγρό, ειδικά για σπλήνα. Τα ιστοτεμάχια όμως, χρειάζονται πολλές ώρες απόπλυση σε τρεχούμενο νερό (συνήθως όλη τη νύχτα), προκειμένου να αφαιρεθεί η περίσσεια του καλίου.

- **Δειγματοληψία**

Η ιστολογική εξέταση των ψαριών είναι εφικτή μόνο με δείγματα από ψάρια που θυσιάζονται. Η πορεία που ακολουθείται είναι η εξής:

1. Επιλογή δείγματος, απομάκρυνση από τη δεξαμενή ή ιχθυοκλωβό, μεταφορά στο χώρο δειγματοληψίας (ζωντανό).
2. Καταγραφή μετρικών χαρακτηριστικών ηλικίας και ιστορικού.
3. Ευθανασία. Η συνήθης διαδικασία για να θανατώσουμε τα ψάρια αμέσως πριν από την εξέταση, συνίσταται σε πλήρη ή μερικό αποκεφαλισμό, και στη χρήση αναισθητικών ουσιών σε μεγάλη δόση.

Πορεία ενεργειών που ακολουθείται / Διαδικασία

Η πορεία ενεργειών που ακολουθείται είναι η εξής:

i) Μακροσκοπική εξέταση των βραγχίων, π.χ. χρωματισμός (σκοτεινός, ασυνήθιστης έντασης ή έντονος αποχρωματισμός), υπερβολική έκκριση βλέννας, υπερπλασία των βραγχιακών νημάτων, συγκόλληση αυτών, ύπαρξη αιμορραγιών, ύπαρξη τυχόν παρασίτων κ.λπ.

ii) Μακροσκοπική εξέταση δέρματος και πτερυγίων για τυχόν ύπαρξη αλλοιώσεων. Πολλές ασθένειες, στις οποίες περιλαμβάνονται και χρόνιες μορφές σηψαιμικών νόσων, προκαλούν διάφορες αλλοιώσεις, π.χ. έλκη, νέκρωση θωρακικών πτερυγίων και ουράς, αιμορραγικές διηθήσεις στην κοιλιακή χώρα κ.λπ.

iii) Καταγραφή και λήψη τμημάτων ιστού από τις περιοχές αλλοιώσεων και μονιμοποίηση. Όταν παρατηρούνται εμφανείς αλλοιώσεις στο δέρμα, τότε αφαιρείται ένα ή περισσότερα τμήματα δέρματος από δύο περιοχές εμπρός από το ραχιαίο πτερύγιο, καθώς και από το κέντρο της πλευρικής γραμμής. Μετά την εξέταση και λήψη ιστών δέρματος και βραγχίων, διανοίγεται (ασηπτικά) η σωματική κοιλότητα, ώστε να αποκαλυφθούν τα εσωτερικά όργανα. Η κοιλιακή επιφάνεια του σώματος καθαρίζεται πρώτα με το κατάλληλο απολυμαντικό, και μετά διενεργείται τομή με μαχαιρίδιο στη μεσαία γραμμή του κοιλιακού τοιχώματος, αρχίζοντας πρώτα από τη μέση απόσταση μεταξύ των κοιλιακών πτερυγίων. Η τομή επεκτείνεται προς την έδρα με προσοχή, προς αποφυγή τμήσεως του εντέρου. Οι τυχόν συμφύσεις μεταξύ των κοιλιακών τοιχωμάτων και των εσωτερικών οργάνων διαχωρίζονται προσεκτικά.

Μια άλλη τεχνική είναι η εξής:

Μετά τη διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας στη μέση γραμμή, αφαιρείται η μία πλευρά του κοιλιακού τμήματος, κάνοντας ημικυκλική τομή από την έδρα ως τη βάση των

θωρακικών πτερυγίων. Το πλεονέκτημά της είναι η δυνατότητα μιας συνολικής παρατήρησης των εσωτερικών οργάνων. Ακολουθεί λεπτομερής παρατήρηση και καταγραφή όλων των νεκροτομικών ευρημάτων, π.χ. πιθανή συμφόρηση σπλάχνων, πετέχειες (στικτές αιμορραγίες) οργάνων και εκτεταμένη απόθεση λίπους στο περιτόναιο, ξένα σώματα στην περιτοναϊκή κοιλότητα, ασκίτης, εξίδρωμα παρουσία ενδοπαρασίτων (κεστώδη, τρηματώδη), χρώμα ήπατος (καφετιές κηλίδες).

Ακολουθεί λήψη, είτε των κατάλληλων τμημάτων των οργάνων, είτε ολόκληρα τα όργανα, μονιμοποίηση και αποστολή των δειγμάτων και ιστορικού στα αρμόδια εργαστήρια. Όταν το μέγεθος του ψαριού είναι τόσο μικρό, ώστε να μην υπάρχει δυνατότητα δειγματοληψίας με τον παραπάνω τρόπο, τότε τοποθετούνται ολόκληρα στο μονιμοποιητικό υγρό και σε αραιή πυκνότητα.

Τα τμήματα των οργάνων πρέπει να κόβονται σε μικρά τεμάχια για να διευκολύνεται η γρήγορη διείδυση του μονιμοποιητικού υγρού και, επομένως, η μονιμοποίηση στο σύνολο του ιστολογικού παρασκευάσματος. Ο όγκος του μονιμοποιητικού υγρού πρέπει να είναι 20-30 φορές μεγαλύτερος του όγκου του ιστού.

1.5.2. Εισαγωγή στη μονιμοποίηση ιστού

Η μονιμοποίηση χρησιμεύει, όπως ήδη αναφέρθηκε, για να εμποδίσει την αποσύνθεση των ιστών, και γι' αυτό πρέπει να γίνεται όσο είναι δυνατόν ταχύτερα μετά τον αποχωρισμό τους από το σώμα. Μετά τη μονιμοποίηση ακολουθούν τα επόμενα στάδια:

1.5.3. Έγκλειση ιστού

Πραγματοποιείται με εμφύσηση των προς επεξεργασία τεμαχίων ιστού σε ένα εύπλαστο και στερεό μέσο, το οποίο έχει σκοπό να τον διατηρήσει και να επιτρέψει την εκτέλεση λεπτών τομών πάχους μερικών μικρών. Το κοινότερο χρησιμοποιούμενο μέσο είναι η παραφίνη, που είναι στέρεη στη συνήθη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και λιώνει σε μεγαλύτερη. Στους 56-59°C λιώνει η παραφίνη που χρησιμοποιείται για ιστολογικά παρασκευάσματα. Σε λιωμένη (σε κλίβανο) παραφίνη, θα κρυώσει και θα στερεοποιηθεί. Πριν από την έγκλειση σε παραφίνη χρειάζεται αφυδάτωση του ιστού, γιατί η παραφίνη δεν αναμειγνύεται με το νερό.

Η αφυδάτωση γίνεται με μία σειρά οιοπνεύματα 70°, 95° και 100°. Για να γίνει η έγκλειση, η αφυδάτωση πρέπει να είναι τέλεια. Επειδή η παραφίνη είναι ελάχιστα διαλυτή στην αλκοόλη, μεταξύ των οιοπνευμάτων και παραφίνης παρεμβάλλεται ένα υγρό (ξυλόλη) που αναμειγνύεται εύκολα, τόσο με την παραφίνη όσο και με την αλκοόλη.

1.5.4. Παρασκευή μικροσκοπικών τομών

Μετά την έγκλειση, οι κύβοι της παραφίνης με τον περιεχόμενο ιστό κόβονται σε λεπτές τομές πάχους 5 μικρών, με τη βοήθεια ειδικών οργάνων (μικροτόμοι). Οι τομές τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες, βάφονται με κατάλληλες χρωστικές και καλύπτονται με βάλαμο του Καναδά και καλυπτρίδα.

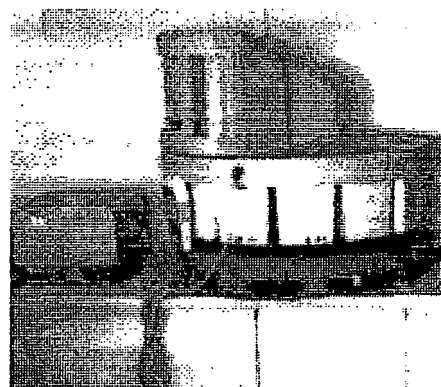
1.5.5. Επεξεργασία των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος

1.5.5.1. Πρακτική της μονιμοποίησης

Οι ιστοί κόπηκαν σε τεμάχια επιφάνειας 2cm³ και πάχους 4-5mm, ενώ ο όγκος του μονιμοποιητικού υγρού (φορμόλη 10%) ήταν 20-30 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τον ιστό. Στη συνέχεια, στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου, έγινε η κατεργασία των δειγμάτων.

1.5.5.2. Επεξεργασία των ιστών στην Ιστοκινέττα και τον Μικροτόμο

Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα των ιστών πλένονται, και ακολουθεί το πρόγραμμα έγκλεισης στην παραφίνη. Η διαδικασία έχει ως εξής: Τα τεμάχια των ιστών τοποθετούνται σε ειδικές μικρές πλαστικές κασετίνες (διάτρητες) και, στη συνέχεια, σ' ένα μεγάλο καλάθι, το οποίο αποτελεί εξάρτημα



ΕΙΚ. 27. Ιστοκινέττα

ενός αυτόματα κινούμενου οργάνου, της ιστοκινέττας (Histokinette). Το μηχάνημα αυτό εμβαπτίζει τους ιστούς στα διάφορα υγρά, αφυδάτωσης, διαύγασης και διήθησης, για τόσο χρόνο όσο αυτό έχει προηγουμένως προγραμματιστεί από τους χρήστες. Η ιστοκινέττα που υπάρχει στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας είναι της SANDON, CITABEL 1000 (εικ. 27).

Αναλυτικότερα, τα υγρά που εμβαπτίζονται οι ιστοί είναι:

1. Για αφυδάτωση. Αλκοόλες διάφορων βαθμών.
2. Για διαύγαση. Ξυλόλη η Histo-clear (κάνει ότι ακριβώς και η Ξυλόλη).
3. Για διήθηση. Για την εμπότιση του ιστού χρησιμοποιήθηκε λιωμένη παραφίνη με σημείο τήξεως 56-58°C.

Το πρόγραμμα παραμονής των ιστών στα διάφορα υγρά της ιστοκινέττας που εφαρμόστηκε, ήταν το παρακάτω:

1. Στη φορμόλη 10%	1 ώρα
2. Σε απεσταγμένο νερό	1 ώρα
3. Σε αλκοόλη 80°	1 ώρα
4. Σε αλκοόλη 95° (πρώτη)	2 ώρες
5. Σε αλκοόλη 95° (δεύτερη)	1 ώρα
6. Σε απόλυτη αλκοόλη (πρώτη)	1 ώρα
7. Σε απόλυτη αλκοόλη (δεύτερη)	2 ώρες
8. Στην ξυλόλη (πρώτη)	2 ώρες
9. Στην ξυλόλη (δεύτερη)	2 ώρες
10. Σε λυομένη παραφίνη (πρώτη)	2 ώρες
11. Σε λυομένη παραφίνη (δεύτερη)	2-3 ώρες
	Σύνολο 18 ώρες

Όταν οι ιστοί περάσουν από όλα τα παραπάνω στάδια, ανοίγεται η ιστοκινέττα και οι ιστοί τοποθετούνται σε νέα μεταλλικά καλούπια, στα οποία πέφτει λιωμένη παραφίνη από ειδικό μηχάνημα και στην κορυφή τοποθετείται ένα ειδικό πλαστικό, το οποίο εξυπηρετεί στην αρίθμηση αλλά και στην αρχειοθέτηση του συγκεκριμένου ιστού. Όταν η παραφίνη κρυώσει, το μπλοκ της παραφίνης με τον ιστό τοποθετείται σε ψυκτική πλάκα, με θερμοκρασία κοντά στους 0°C, διαδικασία που βοηθάει στη λήψη καλύτερων ιστολογικών τομών από το μηχάνημα του μικροτόμου που ακολουθεί.

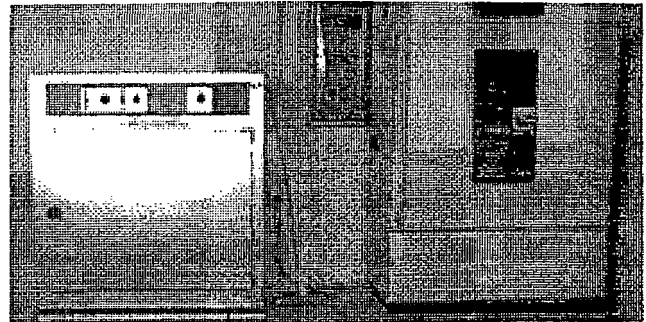
Προτού ξεκινήσει η διαδικασία της κοπής, πρέπει προηγουμένως να έχει ετοιμαστεί το λουτρό (εικ. 28), μια ειδική συσκευή μέσα στην οποία τοποθετείται νερό και



Εικ. 28. Μικροτόμος (αριστερά) και λουτρό (δεξιά)

ζελατίνη σε αναλογία 5% (200ml νερού / 10gr ζελατίνη, 2 με 3 κουταλάκια του γλυκού) και το οποίο κρατείται θερμό σε θερμοκρασία 40°C αυτόματα, σε όλη τη διάρκεια που κόβονται τομές, οι οποίες απλώνονται σε αυτό με σκοπό να πάρουν καλύτερο σχήμα. Πριν αρχίσει η κοπή των τομών, ο μικροτόμος (εικ. 28) ρυθμίζεται στα 5μm ώστε το πάχος των τομών να

είναι 5μμ. Τα μαχαίρια πρέπει να αλλάζονται αρκετά τακτικά. Με την παρατεταμένη χρήση χάνουν την ακονιστική τους ικανότητα και σχίζουν τις τομές.



Εικ. 29. Κλίβανοι επώασης

Αφού κοπούν οι τομές και πάρουν την καλύτερη φόρμα τους μέσα στο λουτρό,

επιλέγονται οι καλύτερες από αυτές με τη βοήθεια καθαρών αντικειμενοφόρων πλακών. Κατόπιν τοποθετούνται σε κλίβανο (εικ. 29) σε θερμοκρασία 60°C για 20-30 λεπτά περίπου για να στεγνώσουν. Μετά το στέγνωμα, οι τομές είναι έτοιμες για τη βαφή.

1.5.5.3. Χρώσεις

Πριν από την εφαρμογή οποιασδήποτε μεθόδου χρώσεως, εφαρμόζεται αποπαραφίνωση κατιούσα, με σκοπό η παραφίνη που είχαν οι τομές να διαλυθεί και να ενυδατωθεί βαθμιαία ο ιστός, λόγω του ότι οι περισσότερες χρωστικές είναι υδατικά διαλύματα. Η αποπαραφίνωση κατιούσα περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ξυλόλη	15'
2. Ξυλόλη	15'
3. Αλκοόλη 95°	1'
4. Αλκοόλη 80°	1'
5. Αλκοόλη 70°	1'
6. Νερό βρύσης	1'

Στη συνέχεια εφαρμόζεται η μέθοδος χρώσεων που αναφέρεται πιο κάτω (εικ. 30). Μετά το τέλος των χρώσεων εφαρμόζεται και αποπαραφίνωση ανιούσα, με σκοπό την αφυδάτωση και διαύγαση των τομών πριν φτάσουν στο τελικό στάδιο της παρατήρησης στο μικροσκόπιο. Τα στάδια της αποπαραφίνωσης είναι τα εξής:

1. Αλκοόλη 70°	5-6 γρήγορες εμβαπτίσεις
2. Αλκοόλη 80°	5-6 γρήγορες εμβαπτίσεις
3. Αλκοόλη 95°	5-6 γρήγορες εμβαπτίσεις
4. Απόλυτη αλκοόλη	5-6 γρήγορες εμβαπτίσεις

5. Απόλυτη αλκοόλη	5-6 γρήγορες εμβαπτίσεις
Για διαύγαση:	
6. Ξυλόλη	5'
7. Ξυλόλη	5'
8. Ξυλόλη	5'

Χρώση αιματοξυλίνης - εωσίνης

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα:

- α. Αιματοξυλίνη PAPANICOLAOU 9253 Merk
- β. Εωσίνη G. 15935 Merk

Τεχνική

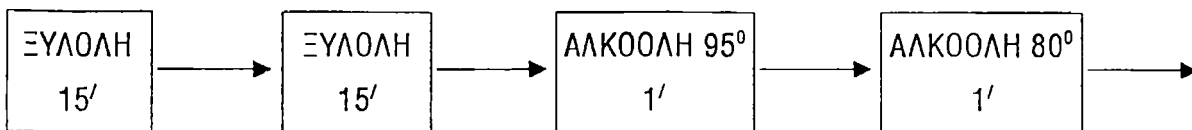
1. Αποπαραφίνωση κατιούσα
2. Ξέπλυμα με νερό βρύσης (σύντομο)
3. Βαφή με αιματοξυλίνη (5 λεπτά)
4. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
5. Διαφοροποίηση με οξυνισμένο οινόπνευμα
6. Λίθιο (σύντομες εμβαπτίσεις)
7. Εωσίνη (5 λεπτά)
8. Ξέπλυμα με νερό βρύσης
9. Αποπαραφίνωση ανιούσα

Αποτέλεσμα

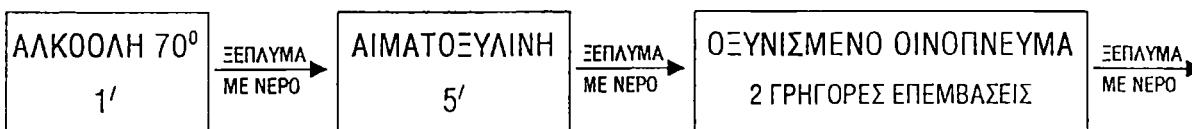
Χρησιμοποιείται κατά κόρον στις ιστολογικές τομές η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, διότι δίνει πολύ καλή γενική άποψη του ιστού. Οι πυρήνες χρωματίζονται μπλέ, το κυτταρόπλασμα και ο συνδετικός ιστός ερυθρά, ενώ οι μύες ροζ.

ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ - ΕΩΣΙΝΗΣ

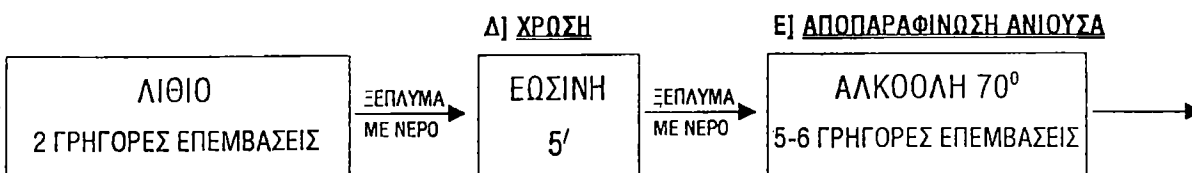
Α) ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΚΑΤΙΟΥΣΑ



Β) ΧΡΩΣΗ

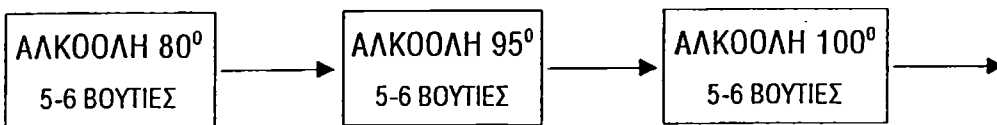


Γ) ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

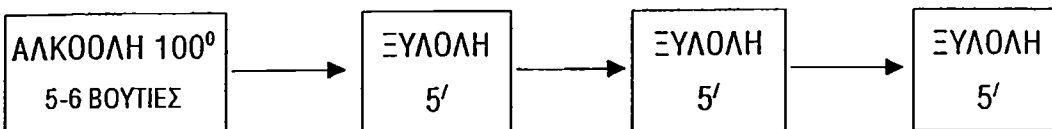


Δ) ΧΡΩΣΗ

Ε) ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΩΣΗ ΑΝΙΟΥΣΑ



ΣΤ) ΔΙΑΥΓΑΣΗ



Εικόνα 30

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

2.1. Εισαγωγή

Για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας επιλέχθηκαν 6 μονάδες πάχυνσης στο χώρο της Αιτωλοακαρνανίας (2 μονάδες στον Αστακό, 1 στην Αμφιλοχία, 1 στη Βόνιτσα, 1 στο Μύτικα και 1 στο Μεσολόγγι).

Η καλλιέργεια των ψαριών στις μονάδες αυτές γινόταν με το σύστημα των πλωτών ιχθυοκλωβών, και η τροφή αποτελούνταν από ξηρά σύμπηκτα (pellets) διάφορων εταιρειών ιχθυοτροφών.

Η επιλογή των παραπάνω σταθμών δεν έγινε τυχαία αλλά, όπως ήδη αναφέρθηκε και στον πρόλογο, έγινε λαμβάνοντας υπόψη κυρίως τη δυνατότητα πρόσβασης των γραφόντων σε αυτές. Επιπλέον, επιδιώχθηκε να γίνει μία όσο το δυνατόν καλύτερη κάλυψη της περιοχής, ως χώρος ανάπτυξης υδατοκαλλιεργειών.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιούνται μία ή δύο φορές το μήνα (αλλά υπήρξαν και φορές που δεν πραγματοποιήθηκαν κάποιες προσχεδιασμένες λόγω τεχνικών δυσκολιών), και η συχνότητά τους εξαρτόταν από την εμφάνιση ή όχι κάποιας νόσου στις παραπάνω μονάδες - σταθμούς. Για ευνόητους λόγους δεν αναφέρονται τα ονόματα των μονάδων, αλλά χρησιμοποιούνται γράμματα της αλφαβήτου που αντιστοιχούν σε κάθε μονάδα.

Επιλέγονταν ψάρια ανεξαρτήτου μεγέθους, που εμφάνιζαν κλινικά συμπτώματα νόσησης, όπως έλκη, ερυθρότητες, σκούρυνση του δέρματος, ανώμαλη ή μειωμένη κινητικότητα, ή που απλά παρουσίαζαν ανορεξία. Τα δείγματα που επιλέγονταν ήταν τυχαία, και ο αριθμός τους εξαρτόταν από την έκταση του προβλήματος.

Θεωρήθηκε αναγκαία και η μέτρηση κάποιων φυσικών, κυρίως, παραμέτρων, όπως θερμοκρασία, αλατότητα και θολερότητα, για την εξασφάλιση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας του ιστορικού των ψαριών.

Παρακάτω αναφέρονται, με χρονολογική σειρά, οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά το χρονικό διάστημα **Νοέμβριος 1994 - Ιούνιος 1995**, καθώς και τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις βακτηριολογικές και ιστολογικές εξετάσεις που έγιναν. Τα σύμβολα που χρησιμοποιούνται, ερμηνεύονται ως εξής: + θετική αντίδραση, - αρνητική αντίδραση, **S** ευαισθησία, **R** ανθεκτικότητα, **V** μεταβλητό αποτέλεσμα.

1η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 3/11/1994

Μονάδα: Α'

Θερμοκρασία: 19°C

Αλατότητα: 30‰

Διαφάνεια / Δίσκος του Secchi: 8 m

Είδος	Ηλικία (μήνες)	Κλινικά συμπτώματα
1. <i>Sparus auratus</i> (τσιπούρα)	1	Απώλεια δέρματος στην κοιλιακή περιοχή, εκφυλισμένα βράγχια.
2. <i>Dicentrarchus labrax</i> (λαβράκι)	2	Έντονη σηψαμία στη βάση των περυγίων και στο στόμα, δερματικά έλκη, σκούρος χρωματισμός.

Βακτηριολογική εξέταση

Λήφθηκε δείγμα νεφρού για καλλιέργεια σε T.S.A. άγαρ (Oxoid). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 24.5°C για 24 ώρες (incubation). Μετά τις 24 ώρες, και εφόσον υπήρξε ανάπτυξη μικροβίων στο T.S.A. άγαρ, έγινε ανακαλλιέργεια σε νέο T.S.A. άγαρ για την απομόνωση μεμονωμένων αποικιών, και το τρυβλίο επωάστηκε στον κλίβανο στους 24.5°C για άλλες 24 ώρες. Από τις μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν, έγιναν τα ακόλουθα test και βιοχημικές αντιδράσεις:

	No 1. <i>S. auratus</i>	No 2. <i>D. labrax</i>
Οξειδάση	+	+
Καταλάση	+	+
Χρώση Gram	-	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά	κινητά
Οξείδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F	F
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες	κίτρινες αποικίες
API 20E 24h	4-1-4-6-5-2-5 (αταυτοποίητο)	3-0-1-5-5-2-4 (αταυτοποίητο)

API 20E 48h	4-1-4-6-7-7-7 (αυτοποίητο)	3-1-1-7-7-7-6 (αυτοποίητο)
<u>Αντιβιογράμμα</u>		
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:		
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)	S (+++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	R	R
Τριμεθοπρίνη-σουλφασιαζίνη (SXT)	R	R
Φουράνια (Fu)	S (+++)	R

Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω test, προκύπτει ότι το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε εμφανίζει πολλά από τα στοιχειώδη και κατ' εξοχήν χαρακτηριστικά των *Vibrio* και, προφανώς, ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae*.

Ιστολογικά ευρήματα

Λαβράκι

Συκώτι: Το συκώτι παρουσιάζει κατά τόπους (εστιακή) λιπώδης εκφύλιση, κατά τα άλλα η εικόνα του είναι φυσιολογική.

Βράγχια: Στα βράγχια δεν εμφανίζεται κάποια αλλοίωση, έχουν φυσιολογική μορφή.

Τσιπούρα

Συκώτι: Η εικόνα που παρουσιάζει το συκώτι, είναι φυσιολογική (φαινομενικά υγιές) αλλά, εξαιτίας προβλημάτων που προκύπτουν από τη λήψη του οργάνου και τη μονιμοποίησή του (fixation), δε διευκολύνεται η καλύτερη παρατήρηση και αξιολόγηση της τομής.

Έντερο: Τα ίδια προβλήματα (fixation problems) υπάρχουν και στην τομή του εντέρου.

Δέρμα: Παρατηρείται μωσαγία (εστιακή) και διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα (εικ. 13 παραρτήματος).

2n ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 14/11/1994

Μονάδα: Β'

Είδος: *Sparus auratus*

Βάρος: 192.5 gr

Μήκος: 22.2 cm

Θερμοκρασία νερού: 19°C

Διαφάνεια / Δίσκος secchi: 3.82 m

Αλατότητα: 30‰

Ιστορικό: Κανένας πρόσφατος χειρισμός. Ανορεξία (διάρκειας 4 ημερών).

Κλινικά συμπτώματα: Καμιά εμφανής εξωτερική αλλοίωση.

Βακτηριολογική εξέταση

Λήφθηκε δείγμα νεφρού για καλλιέργεια σε T.S.A. άγαρ (Oxoid), καθώς και σε Mc Conkey άγαρ (Oxoid). Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 24.5°C για 24 ώρες (incubation). Μετά τις 24 ώρες, και εφόσον υπήρξε ανάπτυξη μικροβίων στο T.S.A. άγαρ και μηδενική ανάπτυξη στο Mc Conkey άγαρ, έγινε ανακαλλιέργεια σε νέο T.S.A. άγαρ για την απομόνωση μεμονωμένων αποικιών και το τρυβλίο επωάστηκε στον κλίβανο στους 24.5°C για άλλες 24 ώρες. Από τις μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν, έγιναν τα ακόλουθα test και βιοχημικές αντιδράσεις:

	S. auratus (τσιπούρα)
Οξειδάση	+
Καταλάση	+
Χρώση Gram	- (κοντός βάκιλλος)
Κινητικότητα (Motility)	κινητά
Οξείδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κολλώδεις κίτρινες αποικίες (mucoid)
API 20E 24h	7-1-2-3-5-2-5 (αταυτοποίητο)
API 20E 48h	7-1-2-3-5-2-5 (αταυτοποίητο)
<u>Αντιβιογράμμα</u>	
<i>Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:</i>	
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)
Οξυτετρακυκλίνη (T₃₀)	S (++)

Φουράνια (Fu)	R (+)
0/129	S (++)

Ιστολογικά ευρήματα

Συκώτι: Φυσιολογική μορφή ιστού.

Βράγχια: Φυσιολογική δομή

3η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 23/11/1994

Μονάδα: Γ' Αστακού

Θερμοκρασία: 20°C

Αλατότητα: 40‰

Είδος	Βάρος (gr)	Μήκος (cm)
1. D. labrax	214.3	27.5
2. D. labrax	449.3	33.4
3. S. auratus	65.82	15.2

Ιστορικό: Στο λαβράκι Νο 1 είχε χορηγηθεί αντιβίωση (οξολινικό οξύ) για χρονικό διάστημα 12 ημερών. Στο λαβράκι Νο 2 είχε χορηγηθεί αντιβίωση (οξολινικό οξύ) για χρονικό διάστημα 10 ημερών, κατόπιν παρέμεινε χωρίς αντιβίωση για άλλες 10 ημέρες, και χορήγηση εκ νέου αντιβίωσης για ακόμα 2 ημέρες έως την ημέρα που συλλήφθηκε. Στην τσιπούρα είχε χορηγηθεί αντιβίωση (οξυτετρακυκλίνη) πριν από 30 ημέρες από τη στιγμή της σύλληψης.

Κλινικά συμπτώματα: Τα λαβράκια εμφάνιζαν κοκκινίλες γύρω από το στόμα, καθώς και στη βάση των κοιλιακών και του εδρικού πτερυγίου.

Βακτηριολογική εξέταση

Από το λαβράκι Νο 1, δεν αναπτύχθηκε κάποιο στέλεχος στο T.S.A. άγαρ κατά την πρώτη καλλιέργεια, γεγονός που ερμηνεύεται λόγω της εφαρμογής φαρμακευτικής αγωγής (χορήγηση οξολινικού οξέος για 12 ημέρες, μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας). Από τη βακτηριολογική εξέταση που έγινε στα ψάρια Νο 2 και Νο 3 -με την ίδια διαδικασία όπως και στις προηγούμενες δειγματοληψίες- προκύπτουν τα ακόλουθα:

	No 2. <i>D. labrax</i>	No 3. <i>S. auratus</i>
Οξειδάση	+	+
Καταλάση	+	+
Χρώση Gram	-	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά	κινητά
Οξειδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F	F
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες	κίτρινες αποικίες
API 20E 24h	7-1-5-7-7-7-7 (αταυτοποίητο)	7-1-5-7-7-7-7 (αταυτοποίητο)
API 20E 48h	7-1-5-7-7-7-7 (αταυτοποίητο)	7-1-5-7-7-7-7 (αταυτοποίητο)
<u>Αντιβιογράμμα</u>		
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:		
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)	S (+++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (++)	S (++)
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (++)	S (++)
Φουράνια (Fu)	S (+)	
O/129	S (+)	S (+)

Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της βακτηριολογικής εξέτασης, προκύπτει ότι το υπό εξέταση στέλεχος ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae*, και είναι τα *Vibrio spp.*

Ιστολογικά ευρήματα

Λαβράκι

Συκώτι: Το συκώτι παρουσιάζει μια σχετικά καλή εικόνα, από πλευράς λιπώδους εκφύλισης.

Βράγχια: Στα βράγχια διαπιστώθηκε η ύπαρξη μονογενούς παρασίτου (εικ. 14 παραρτήματος).

4η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 8/12/1994

Μονάδα: Α' Αστακού

Είδος	Βάρος (gr)	Μήκος (cm)	Κλινικά συμπτώματα	Ιστορικό
1. <i>D. labrax</i>	70.26	39.05	Εξωτερική αιμορραγία	Χορήγηση αντιβίωσης (οξυτετρακυκλίνης) για χρονικό διάστημα 5 ημερών
2. <i>D. labrax</i>	39.1	35	Εξωτερική αιμορραγία	>>
3. <i>S. auratus</i> *	32.8	33.8	Φουσκωμένη κοιλιά, κίτρινο συκώτι	Κανένας πρόσφατος χειρισμός
4. <i>S. auratus</i>	56.2	15	Αιμορραγία	Κανένας πρόσφατος χειρισμός

* Σημείωση: Στο ψάρι Νο 3 βρέθηκε αιματοκρίτης 10% και αιμοσφαιρίνη 6.3 gr / 100 ml αίματος.

Βακτηριολογική εξέταση

Από τη βακτηριολογική εξέταση που έγινε -με την ίδια διαδικασία όπως και στις προηγούμενες δειγματοληψίες- στα ψάρια Νο 1 (λαβράκι), Νο 3 (τσιπούρα) και Νο 4 (τσιπούρα), προκύπτουν τα ακόλουθα:

	No 1. <i>D. labrax</i>	No 3. <i>S. auratus</i>	No 4. <i>S. auratus</i>
Οξειδάση	+	+	+
Καταλάση	+	+	+
Χρώση Gram	- (βάκιλλοι)	- (βάκιλλοι)	- (βάκιλλοι)
Κινητικότητα (Motility)	κινητά	κινητά	κινητά
Οξείδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F	-/- καμία αντίδραση	-/- καμία αντίδραση
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες	κίτρινες αποικίες	κίτρινες αποικίες
API 20E 24h	3-0-2-7-5-2-4 (αταυτοποίητο)	0-1-2-5-1-2-5 (αταυτοποίητο)	1-2-0-4-1-0-4 (<i>Pseudomonas cepacia</i>)
API 20E 48h	3-0-2-7-5-2-4 (αταυτοποίητο)	0-1-2-5-1-2-5 (αταυτοποίητο)	1-2-0-4-1-0-4 (<i>Pseudomonas cepacia</i>)

<u>Αντιβιόγραμμα</u>			
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:			
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)	S (++)	S (+)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (++)	S (+++)	S (++)
Τριμεθοπρίνη- σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (++)	S (++)	S (+++)
Φουράνια (Fu)	S (++)	S (+)	S (++)
0/129	S (+)	S (+)	S (+)

Συμπεράσματα

Το στέλεχος που προκύπτει από το λαβράκι Νο 1, έχει πολλά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Vibrionaceae*. Επομένως, θα μπορούσαμε να το κατατάξουμε στα *Vibrio spp.*, αν και από το test API δεν προκύπτει κάποιο σαφές αποτέλεσμα. Το στέλεχος που προκύπτει από την τσιπούρα Νο 3 δεν ταυτοποιείται, τόσο από το test API, όσο και από τις επιμέρους βιοχημικές αντιδράσεις. Έχει πολλά από τα βασικά χαρακτηριστικά των *Vibrio*, αλλά δεν μπορούμε να το κατατάξουμε σε αυτά. Το στέλεχος που προκύπτει από την τσιπούρα Νο 4, ταυτοποιήθηκε από το test API και είναι το είδος *Pseudomonas ceracia*.

Ιστολογικά ευρήματα

Τσιπούρα Νο 1 & Νο 2

Συκώτι: Στο συκώτι υπάρχει εμφανής λιπώδης εκφύλιση. Κατά τα άλλα έχει φυσιολογική μορφή (εικ. 15 παραρτήματος).

Βράγχια: Τα βράγχια παρουσιάζουν μία σχετικά καλή εικόνα. Εμφανίζονται νεκρωτικές εστίες με φλεγμονώδη αντίδραση στο βραγχιακό επιθήλιο, ανάμεσα σε δύο δευτερογενή νημάτια (τελεγκεκτασία). Πιθανή αιτία είναι ίσως κάποιο βακτήριο (εικ. 16).

5η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Την 1η/2/1995 πραγματοποιήθηκε επίσκεψη στη μονάδα Β' (Αμφιλοχία), με σκοπό τη συγκέντρωση περισσότερων στοιχείων για την κατανόηση του φαινομένου του Αμβρακικού. Ενόσ περιοδικού, θα λέγαμε, φαινομένου, κατά το οποίο γίνεται αναστροφή των υδάτων (αυτό που αποκαλούν οι ντόπιοι "μπατάρισμα των νερών"), και που έχει σαν αποτέλεσμα το μαζικό θάνατο όλων των υδρόβιων οργανισμών της περιοχής. Το φαινόμενο αυτό ήταν η

αιτία για το μαζικό θάνατο των περισσότερων ψαριών της Μονάδας Β'. Στη συνέχεια, αναφέρονται λεπτομερώς οι συνθήκες και τα αποτελέσματα του φαινομένου.

Ημερομηνία: 21/12 έως 22/12/1994.

Θερμοκρασία: Στις 21/12, 1η ημέρα του φαινομένου, η θερμοκρασία ήταν 14°C. Στις 22/12 έφτασε τους 32-36°C, και διατηρήθηκε σε αυτά τα επίπεδα για 48 ώρες. Σε αυτό το χρονικό διάστημα η θερμοκρασία δεν παρέμενε σταθερή, αλλά αυξομειωνόταν από 24°C έως 32 με 36°C. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου ήταν 0.3 mgr/lit.

Καιρικές συνθήκες: Δύο ημέρες πριν την εμφάνιση του φαινομένου έβρεχε καταρακτωδώς, ενώ έπνεαν βορειοανατολικοί άνεμοι. Μόλις άλλαξε η φορά των ανέμων (από βορειοανατολικούς σε νότιους), εμφανίστηκε το φαινόμενο της αναστροφής των υδάτων.

Διαύγεια νερού: Υπήρχε έντονη θολερότητα, και κατά διαστήματα διαυγή νερά, ανάλογα με τα ρεύματα.

Συμπεριφορά των ψαριών τις προηγούμενες ημέρες: Τα ψάρια εμφάνιζαν φυσιολογική συμπεριφορά.

Συμπεριφορά των ψαριών κατά τη διάρκεια του φαινομένου: Τα ψάρια παρουσίαζαν μη ομαλή πλεύση, ήταν ιδιαίτερα στρεσοαρισμένα, ανέβαιναν στην επιφάνεια για να αναπνεύσουν οξυγόνο και κατόπιν πέθαιναν. Στους φυσικούς πληθυσμούς, πρώτοι πέθαναν οι γωβιοί και οι γλώσσες.

Το παραπάνω φαινόμενο είναι ένα μη περιοδικό αλλά συχνό, που συνδέεται με τη μορφολογία, τη γεωλογία, καθώς και με τις φυσικοχημικές παραμέτρους του Αμβρακικού κόλπου. Η τελευταία φορά που είχε παρατηρηθεί, με ανάλογες καταστροφικές συνέπειες, ήταν το 1986 στην ίδια ακριβώς περιοχή.

Παρόμοιο φαινόμενο με το προαναφερθέν, είναι και αυτό των μαζικών θανάτων ψαριών στη λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού. Τελευταία αναφορά σε αυτό, έγινε το Νοέμβριο του 1990, όπου σημειώθηκαν μαζικοί θάνατοι ψαριών (μερικές δεκάδες τόννοι) που, από μεταγενέστερες μελέτες και εκτιμήσεις, διαπιστώθηκε ότι οφείλονταν στη διαταραχή του αλοκλινούς, καθώς και στην παραγωγή και έκλυση υδροθείου (H₂S) το οποίο, λόγω τοξικότητας, προκάλεσε το θάνατο των ψαριών.

Η παρουσία υδροθείου (οσμή κλούβιου αυγού) δεν επιβεβαιώθηκε και στην περίπτωση του φαινομένου του Αμβρακικού, πιθανόν όμως η αιτία του να είναι η ίδια (έκλυση υδροθείου).

6η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 14/2/1995

Μονάδα: Δ' Βόνιτσα

Θερμοκρασία: 12.5°C

Αλατότητα: 30‰

Είδος	Βάρος (gr)	Μήκος (cm)
1. <i>Dicentrarchus labrax</i>	114.6	21.5
2. <i>Pagrus major</i> (κόκκινη τσιπούρα)	62	15.6
3. <i>Sparus auratus</i>	13	10
4. <i>Sparus auratus</i>	8.6	8.8
5. <i>Sparus auratus</i>	97.7	18.7

Ιστορικό των ψαριών: Οι τσιπούρες Νο 3 και Νο 4 εμφάνισαν, 1 μήνα πριν τη δειγματοληψία, λευκές κηλίδες στη ράχη. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε με επιτυχία, με μπάνια φουραζολιδόνης.

Κλινικά συμπτώματα: Κανένα από τα ψάρια δεν εμφάνισε κάποιο εξωτερικό σύμπτωμα.

Βακτηριολογική εξέταση

Έγινε καλλιέργεια από νεφρό, σε T.S.A. άγαρ, και ανακαλλιέργεια στις 48 ώρες, πάλι σε T.S.A. άγαρ, από τα δείγματα Νο 2 και Νο 3, ενώ από τα Νο 1, 4 και 5, δεν αναπτύχθηκε κάποιο μικρόβιο. Από τις μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν, έγιναν τα ακόλουθα test και βιοχημικές αντιδράσεις:

	No 2. <i>Pagrus major</i> (κόκκινη τσιπούρα)	No 3. <i>Sparus auratus</i> (τσιπούρα)
Οξειδάση	+	+
Καταλάση	+	+
Χρώση Gram	-	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά	κινητά
Οξειδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	+/- (O)	-/- καμία αντίδραση
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες	πράσινες αποικίες

API 20E 24h	1-0-0-4-0-0-4 (<i>Pasteurella</i> spp.)	0-0-0-5-0-0-4 (<i>Pseudomonas</i> spp.)
API 20E 48h	1-0-0-4-0-0-4 (<i>Pasteurella</i> spp.)	0-0-0-5-0-0-4 (<i>Pseudomonas</i> spp.)
<u>Αντιβιογράμμα</u>		
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:		
Οξολινικό οξύ (OA)	R	R
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	R	R
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	R	R
Φουράνια (Fu)	S (+++)	S (+++)
0/129	R	R

Συμπεράσματα

Το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε από το ψάρι Νο 2, ταυτοποιήθηκε μέσω του API 20E, και αντιστοιχεί στα είδη της *Pasteurella*. Βέβαια, τα επιμέρους χαρακτηριστικά, που προκύπτουν από τα διάφορα test που αναφέρθηκαν, δεν επιβεβαιώνουν την παραπάνω ταυτοποίηση, διότι, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, τα είδη της οικογένειας *Pasteurellaceae* είναι ακίνητα και ζυμωτικά, ενώ το στέλεχος που προκύπτει δεν φέρει τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Γι' αυτούς λοιπόν τους λόγους, η ταυτοποίηση δε γίνεται δεκτή.

Το στέλεχος που απομονώθηκε από το ψάρι Νο 3, ταυτοποιήθηκε μέσω του API 20E και αντιστοιχεί στο γένος *Pseudomonas*.

Ιστολογική εξέταση

Δεν κρατήθηκαν τμήματα οργάνων για ιστολογική εξέταση.

7η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 8/3/1995

Μονάδα: Γ' Αστακού

Θερμοκρασία: 15.5°C

Αλατότητα: 40‰

Είδος	Βάρος (gr)	Μήκος (cm)
No 1. <i>S. auratus</i> (τσιπούρα)	75.2	18.5
No 2. <i>S. auratus</i> (τσιπούρα)	69.4	16.8
No 3. <i>S. auratus</i> (τσιπούρα)	71.2	17.2
No 4. <i>D. labrax</i> (λαβράκι)	273	28.5

Ιστορικό των ψαριών: Κανένας πρόσφατος χειρισμός και καμία παρουσία κάποιας νόσου.

Κλινικά συμπτώματα: Η τσιπούρα No 1 είχε δερματικά έλκη (απουσία ενός μεγάλου τμήματος δέρματος από τη μία πλευρά). Η τσιπούρα No 2 είχε ατελές βραγχιακό επικάλυμα. Η τσιπούρα No 3 είχε φυσιολογική εμφάνιση. Τέλος, το λαβράκι (No 4) είχει εξωτερική αιμορραγία.

Βακτηριολογική εξέταση

Έγινε καλλιέργεια από νεφρό σε T.S.A. άγαρ, και ανακαλλιέργεια στις 48 ώρες, πάλι σε T.S.A. άγαρ, από τα δείγματα No 2 και 4. Στα δείγματα No 1 και 3, δεν αναπτύχθηκε κάποιο μικρόβιο. Από τις μεμονωμένες αποικίες που προέκυψαν, έγιναν τα ακόλουθα test και βιοχημικές αντιδράσεις.

	No 2. <i>S. auratus</i> (τσιπούρα)	No 4. <i>D. labrax</i> (λαβράκι)
Οξειδάση	+	+
Καταλάση	+	+
Χρώση Gram	-	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά	κινητά
Οξειδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	-/- καμία αντίδραση*	-/- καμία αντίδραση*
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	καμία ανάπτυξη	κίτρινες αποικίες
API 20E 24h	1-0-0-1-0-0-4 (<i>Pseudomonas paucimobilis</i>)	3-0-0-7-5-2-4 (αταυτοποίητο)
API 20E 48h	1-0-0-1-0-0-4 (<i>Pseudomonas paucimobilis</i>)	3-0-0-7-5-2-4 (αταυτοποίητο)

<u>Αντιβιογράμματα</u>		
<i>Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:</i>		
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)	S (++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (++)	S (++)
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (+++)	S (+++)
Φουράνια (Fu)	S (++)	S (++)
0/129	S (+)	R

* Σημείωση: Είχε γίνει λάθος στην παρασκευή του αντιδραστήριου -δεν είχε προστεθεί γλυκόζη- γι' αυτό και δεν προκύπτει καμία αντίδραση.

Συμπεράσματα

Το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε από το ψάρι Νο 2, ταυτοποιήθηκε μέσω του API 20E και αντιστοιχεί στο είδος *Pseudomonas paucimobilis*. Το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε από το ψάρι Νο 4, δεν ταυτοποιήθηκε μέσω του API 20E, αλλά εμφανίζει πολλά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Vibrionaceae*, και θα μπορούσαμε να το κατατάξουμε στο γένος *Vibrio*.

Ιστολογικά ευρήματα

Τσιπούρα (ψάρι Νο 2)

Βράγχια: Ύπαρξη μονογενούς παρασίτου, *Trichodina* spp. (εικ. 17 παραρτήματος)

Λαβράκι (ψάρι Νο 4)

Συκώτι: Παρατηρείται έντονη λιπώδης εκφύλιση (εικ. 18 παραρτήματος).

Βράγχια: Ύπαρξη μονογενούς παρασίτου της οικογένειας *Dactylogyridae* (εικ. 19, 20 παραρτήματος) και επιθηλιοκύστη.

8η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 6/4/1995

Μονάδα: Γ' Αστακού

Είδος: *Sparus auratus*

Βάρος: 40 gr

Μήκος: 12.5 cm

Θερμοκρασία: 16°C

Αλατότητα: 40‰

Ιστορικό: Κανένας πρόσφατος χειρισμός.

Κλινικά συμπτώματα: Φουσκωμένη κοιλιά και αργή κίνηση.

Βακτηριολογική εξέταση

Από τη βακτηριολογική εξέταση που έγινε, με την ίδια διαδικασία όπως και στις προηγούμενες δειγματοληψίες, προκύπτουν τα ακόλουθα:

	S. auratus (τσιπούρα)
Οξειδάση	+
Καταλάση	+
Χρώση Gram	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά
Οξειδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	-/- καμία αντίδραση*
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες
API 20E 24h	0-0-0-5-0-2-4 (<i>Pasteurella</i> spp.)
<u>Αντιβιογράμμα</u>	
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:	
Οξολινικό οξύ (OA)	S (++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (++)
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (+)
O/129	S (+)

* Σημείωση: Το αντιδραστήριο είχε παρασκευαστεί με λάθος τρόπο -δεν είχε προστεθεί γλυκόζη- γι' αυτό και το αποτέλεσμα είναι λανθασμένο.

Συμπεράσματα

Το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε, ταυτοποιήθηκε μέσω του API 20E και αντιστοιχεί στο γένος *Pasteurella*. Βέβαια τα επιμέρους χαρακτηριστικά, που προκύπτουν από τα διάφορα test που αναφέρθηκαν, δεν επιβεβαιώνουν την παραπάνω ταυτοποίηση.

Διότι, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, τα είδη της οικογένειας *Pasteurellaceae* είναι ακίνητα και ζυμωτικά, ενώ το στέλεχος που προκύπτει δε φέρει τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Γι' αυτούς λοιπόν τους λόγους, η ταυτοποίηση δε γίνεται δεκτή.

Ιστολογική εξέταση

Δεν κρατήθηκαν τμήματα οργάνων για ιστολογική εξέταση.

9η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 4/5/1995

Μονάδα: Γ' Αστακού

Είδος: *Sparus auratus*

Βάρος: 33.2 gr

Μήκος: 18.9 cm

Ιστορικό: Κανένας πρόσφατος χειρισμός.

Κλινικά συμπτώματα: Κανένα, φυσιολογική μορφή.

Βακτηριολογική εξέταση

Από τη βακτηριολογική εξέταση που έγινε προκύπτουν τα ακόλουθα:

	<i>S. auratus</i> (τσιπούρα)
Οξειδάση	+
Καταλάση	+
Χρώση Gram	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά
Οξείδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες
API 20E 24h	0-0-6-4-0-0-4 (αταυτοποίητο)
API 20E 48h	1-0-2-6-1-0-4 (αταυτοποίητο)

<u>Αντιβιογράμμα</u>	
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:	
Οξολινικό οξύ (OA)	S (++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (++)
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (+++)
O/129	S (+)

Συμπεράσματα

Το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε, δεν ταυτοποιείται μέσω του API 20E, αλλά εμφανίζει πολλά χαρακτηριστικά της οικογένειας *Vibrionaceae*. Θα μπορούσαμε, επομένως, να το κατατάξουμε στην οικογένεια αυτή.

Ιστολογική εξέταση

Δεν κρατήθηκαν τμήματα οργάνων για ιστολογική εξέταση.

10η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 10/5/1995

Μονάδα: Δ' Μεσολογίου

Είδος	Βάρος (gr)	Μήκος (cm)	Ιστορικό	Κλινικά συμπτώματα
No 1. <i>S. auratus</i> γόνος (5 ψάρια)	1.50	3.50	Πρόσφατο "στοκάρισμα" των κλωβών με γόνο. Πολλές θνησιμότητες ανά κλωβό, μη δικαιολογήσιμες.	Εμφάνιζαν βλάβη στα βράγχια και στο δέρμα (εκδορές).
No 2. <i>D. labrax</i>	218.9	-	Θνησιμότητες και κανένας πρόσφατος χειρισμός.	Έντονες αιμορραγίες, ερυθρότητες στη βάση του εδρικού και των κοιλιακών πτερυγίων.

Παρασιτολογική εξέταση

Από την τσιπούρα λήφθηκε τμήμα από βράγχιο και ξέσμα από δέρμα και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με απεσταγμένο νερό, όπου καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και,

κατόπιν, εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο σε μεγάλη μεγέθυνση όπου διαπιστώθηκε η ύπαρξη μυξοβακτηριδίων, πολλών τον αριθμό.

Η ίδια εξέταση επαναλήφθηκε και με το ίδιο αποτέλεσμα και για άλλα άτομα τσιπούρας (γόνος) που είχαν συλλεχθεί κατά την ίδια δειγματοληψία.

Η παρασιτολογική εξέταση που έγινε στο ψάρι Νο 2 (λαβράκι) δεν οδήγησε στη διαπίστωση της παρουσίας κάποιου παρασίτου.

Βακτηριολογική εξέταση

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε T.S.A. άγαρ από εγκέφαλο και νεφρό, από το ψάρι Νο 1 (τσιπούρα), κατά την οποία δεν αναπτύχθηκαν μικρόβια. Προφανώς, η αιτία των μαζικών θανάτων ήταν τα μυξοβακτηρίδια. Για το λαβράκι, τα βιοχημικά test έδειξαν την παρακάτω εικόνα:

	No 2. <i>D. labrax</i>
Οξειδάση	+
Καταλάση	+
Χρώση Gram	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά
Οξειδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	κίτρινες αποικίες
<u>Αντιβιογράμμα</u>	
<i>Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:</i>	
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (+++)
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (++)
Φουράνια (Fu)	S (++)
O/129	S (++)
API 20E 24h	2-0-4-7-5-2-4 (<i>Vibrio anguillarum</i> , ορότυπος Ιβ)

<i>Αναλυτικά:</i>	
Beta - galactosidase	+
Arginine - dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Δοκιμασία κιτρικών	V
Παραγωγή H ₂ S	-
Ουρεάση	-
Tryptophane desaminase	-
Παραγωγή ινδόλης	+
Voges - proskauer	+
Ρευστοποίηση ζελατίνης	+
<i>Παραγωγή οξέος από:</i>	
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Sorbitol	+
Rhamnose	-
Sucrose	+
Melibiose	-
Amygdalin	-
Arabinose	-

Συμπέρασμα

Από τα παραπάνω test (βιοχημικά και μη), προκύπτει ότι το απομονωθέν στέλεχος είναι το είδος *Vibrio anguillarum* - βióτυπος 1.

Ιστολογικά ευρήματα**Τσιπούρα**

Μάτι: Φυσιολογική μορφή

Βράγχια: Φυσιολογική μορφή

Έντερο: Σε καλή κατάσταση

Καρδιά: Παρατηρείται έντονη αιμορραγία γύρω από την καρδιά (εικ. 21 παραρτήματος).

Λαβράκι

Σπλήνας: Παρατηρείται εστιακή φλεγμονή στο σπλήνα, διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα (εικ. 22 παραρτήματος).

11η ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Ημερομηνία: 3/6/1995

Μονάδα: Ε' Μύτικα

Είδος	Βάρος (gr)	Μήκος (cm)	Ιστορικό	Κλινικά συμπτώματα
No 1. D. labrax	164	-	Χορήγηση αντιβίωσης (οξολινικό οξύ) για 10 ημέρες.	Έντονες ερυθρότητες στο στόμα και στη βάση των πτερυγίων.
No 2. D. labrax	200	-	Χορήγηση αντιβίωσης (οξολινικό οξύ) για 10 ημέρες.	Έντονες ερυθρότητες στο στόμα και στη βάση των πτερυγίων.

Βακτηριολογική εξέταση

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε T.S.A. άγαρ από νεφρό, και από τα δύο ψάρια, και τα στελέχη που απομονώθηκαν φέρουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

	No 1. D. labrax	No 2. D. labrax
Οξειδάση	+	+
Καταλάση	+	+
Χρώση Gram	-	-
Κινητικότητα (Motility)	κινητά	κινητά

Οξειδωση (O) / Ζύμωση (F) της γλυκόζης	F	F
Ανάπτυξη σε T.C.B.S.	πράσινες αποικίες	
API 20E 24h	3-0-4-7-5-2-4 (<i>V. anguillarum</i> - ορότυπος Ιβ)*	0-0-0-4-0-0-4 (αυτοποίητο)
<u>Αντιβιογράμμα</u>		
Ευαισθησία / Ανθεκτικότητα σε:		
Οξολινικό οξύ (OA)	S (+++)	S (+++)
Οξυτετρακυκλίνη (T ₃₀)	S (+++)	S (++)
Τριμεθοπρίνη-σουλφαθειαζίνη (SXT)	S (+++)	S (++)
Φουράνια (Fu)	S (++)	S (++)
O/129	S (++)	S (++)

* Από εργαστήριο Lauven

Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω test, προκύπτει ότι το απομονωθέν στέλεχος είναι το είδος *Vibrio anguillarum*, ορότυπος Ιβ.

Ιστολογικά ευρήματα

Συκώτι: Σχετικά καλή κατάσταση.

Πάγκρεας: Επίσης σε καλή κατάσταση, συμφόρηση στα αγγεία (εικ. 23 παραρτήματος).

Βράγχια: Αιμορραγία και υπερπλασία βραγχιακού επιθηλίου, συνένωση των δευτερογενών νηματίων (εικ. 24 παραρτήματος).

ΜΕΡΟΣ ΤΕΤΑΡΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- Ποιες είναι οι πιθανότητες, ένα βασικό μεθοδολογικό εργαλείο της βακτηριολογίας, όπως το API, να έχει περιορισμένη, ή ακόμα και αμφισβητήσιμη αξιοπιστία και εγκυρότητα (validity);
- Τι γίνεται σε επίπεδο καθημερινής πρακτικής (σε μονάδες) όταν εμφανιστεί κάποιο πρόβλημα με αυξημένη θνησιμότητα και πριν επιχειρηθεί οποιαδήποτε πρακτική θεραπεία;
- Πόσο συχνό είναι το φαινόμενο του "τσαρλατανικού πειραματισμού", όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου χημειοθεραπευτικού, την εφαρμογή της δέουσας δοσολογίας, καθώς και τους χρόνους θεραπείας που εφαρμόζονται από τους ιχθυοπαραγωγούς - ιχθυοτρόφους στον Ελλαδικό χώρο;

Στην εργασία αυτή, και έχοντας στο νου μας σ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της τα παραπάνω ερωτήματα, επιχειρήσαμε να σκιαγραφήσουμε το "όντως είναι" στο χώρο των υδατοκαλλιεργειών (κατά το στάδιο της πάχυνσης), ως προς την ειδικότερη περιοχή της ιχθυοπαθολογίας, για να μπορέσουμε να μιλήσουμε για το "δέον γενέσθαι". Έχοντας ολοκληρώσει την ερευνητική μας δουλειά, είμαστε σε θέση να διατυπώσουμε κάποια συμπεράσματα που θεωρούμε ότι απαντούν στα παραπάνω ερωτήματα. Πιο συγκεκριμένα:

- Το σύστημα ταχείας ταυτοποίησης API (API 20E και API 20NE), παρ' όλο που είναι ένα γρήγορο μέσο για την πλήρη βιοχημική ταυτοποίηση των μικροβίων, και χρησιμοποιείται ευρύτατα στη μικροβιολογία (και στην ιχθυοπαθολογία), παρουσιάζει προβλήματα κατά την εφαρμογή του.

Διίστανται οι απόψεις από τους μικροβιολόγους και τους ιχθυοπαθολόγους σχετικά με τους χρόνους "διαβάσματος" - ανάγνωσης των βιοχημικών δοκιμασιών του API. Άλλοι το "διαβάζουν" στις 24 ώρες και άλλοι στις 48 ώρες. Κι αυτό γιατί άλλοτε οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στις 24 ώρες, και άλλοτε απαιτούνται 48 ώρες, έως ότου πραγματοποιηθούν όλες. Βέβαια, αυτό εξαρτάται και από το πόσο γρήγορη ανάπτυξη έχει το μικροβιακό στέλεχος που εξετάζεται κάθε φορά. Πολλές φορές όμως, τυγχάνει να μην έχουμε πλήρη ταυτοποίηση ούτε στις 24, αλλά ούτε και στις 48 ώρες, κι αυτό διότι το νούμερο που προκύπτει από το API δεν ταυτοποιείται με βάση τα νούμερα που υπάρχουν στο βιβλίο στελεχών. Η παραπάνω αδυναμία ταυτοποίησης του API, καθώς και η λάθος, σε πολλές περιπτώσεις, ταυτοποίηση που δίνει, δικαιολογούνται από τη φύση του test.

Το test API πρωτοκατασκευάστηκε στη Γαλλία, με σκοπό την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροβίων ανώτερων θηλαστικών, και δη ανθρώπινων παθογόνων. Κατανοείται λοιπόν πλήρως η αδυναμία του να ταυτοποιήσει, να δώσει απάντηση για στελέχη που απομονώνονται κυρίως από ψάρια, όταν μάλιστα η μικροβιολογία η σχετική με τους θαλάσσιους οργανισμούς, και δη με τους ιχθύες, βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό επίπεδο.

Καθώς γνωρίζουμε, οι μελέτες οι σχετικές με τα παθογόνα μικρόβια των ιχθύων (υφάλμυρων και αλμυρών νερών) είναι σε εξέλιξη. Μελλοντικά, πιθανόν όταν οι γνώσεις μας για τα παθογόνα των θαλασσινών ψαριών είναι περισσότερο ολοκληρωτικές, μπορεί το test API να δώσει καλύτερα αποτελέσματα, και ίσως αποτελέσει ένα αξιόπιστο μέσο ταυτοποίησης μικροβίων, καθώς και ένα αναμφισβήτητο εργαλείο στα χέρια των ιχθυοπαθολόγων. Για την ώρα όμως, δρα συμπληρωματικά και κατά περίπτωση, σε συνδυασμό με άλλες αντιδράσεις (test).

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βακτήρια που ανιχνεύτηκαν, κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβιος 1994 - Ιούνιος 1995, σε μονάδες πάχυνσης του νομού Αιτωλοακαρνανίας, ανήκουν, στην πλειοψηφία τους, στην οικογένεια *Vibrionaceae*, και δη στο γένος *Vibrio*. Η παραπάνω διαπίστωση ήταν αναμενόμενη, δεδομένου ότι η κυριότερη ασθένεια βακτηριακής φύσεως που πλήττει σήμερα τις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες, είναι η βιμπρίωση.

Όσον αφορά τις συνήθειες πρακτικές των μονάδων πάχυνσης, διαπιστώσαμε ότι, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, δεν είχαν καμία επιστημονική στήριξη, και ότι εξαντλούνταν στη χορήγηση μη κατάλληλων πάντοτε χημειοθεραπευτικών προϊόντων, βασιζόμενοι στο τι φαρμακευτική πολιτική εφάρμοζαν οι "γείτονες" - ιχθυοπαραγωγοί της περιοχής. Διακινδυνεύοντας με αυτό τον τρόπο τη χορήγηση μη κατάλληλου φαρμάκου με απρόβλεπτες δυσμενείς συνέπειες, τόσο για την υγεία των ψαριών της μονάδας όσο και για την ίδια της την υπόσταση.

Στο σημείο αυτό, και πριν περάσουμε στη διατύπωση από την πλευρά μας μερικών προτάσεων, θα θέλαμα να αναφερθούμε στις δυσκολίες που συναντήσαμε καθ' όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας εργασίας, και κυρίως κατά το πειραματικό στάδιο.

Η πρώτη δυσκολία έχει να κάνει με το γεγονός ότι οι σταθμοί δειγματοληψίας έπρεπε να είναι κοντά στο χώρο επεξεργασίας και αναλύσεως, που δεν ήταν άλλος από το εργαστήριο ιχθυοπαθολογίας του Τ.Ε.Ι. Μεσολογγίου. Το παραπάνω, από μόνο τού αποτέλεσε έναν περιοριστικό παράγοντα για την επιλογή περισσότερων σταθμών σε ευρύτερες περιοχές εντός και εκτός του νομού Αιτωλοακαρνανίας.

Αντιμετωπίσαμε αρκετά σοβαρό πρόβλημα πρόσβασης, λόγω απουσίας ιδιωτικού μεταφορικού μέσου, σε πολλές από τις μονάδες που επιλέχθηκαν, και πολλές φορές, εξαιτίας αυτού του προβλήματος, δεν πραγματοποιήθηκαν προγραμματισμένες δειγματοληψίες.

Μια δεύτερη δυσχέρεια, στην οποία "σκόνταψε" πολλές φορές τούτη η εργασία κατά την εξέλιξή της, αναφέρεται στο ελλειπές θεωρητικό, και κυρίως μεθοδολογικό επίπεδο γνώσεών μας, λόγω έλλειψης προηγούμενης εμπειρίας μας, τόσο στην εφαρμογή των μικροβιολογικών τεχνικών, αλλά κυρίως των ιστολογικών.

Συνέπεια του παραπάνω, ήταν να γίνουν αρκετά λάθη από την πλευρά μας, κυρίως κατά το στάδιο της ιστολογική επεξεργασίας των δειγμάτων. Δημιουργία πολλών artefacts στις ιστολογικές τομές, καθώς και προβλήματα που οφείλονταν στο "φιξάρισμα" (fixating) των οργάνων που κρατήθηκαν για ιστολογικές αναλύσεις (fixation problems).

Οι παραπάνω δυσκολίες αναφέρονται με σκοπό να δικαιολογηθεί η ύπαρξη πιθανών αδυναμιών, που έχει η εργασίας μας, αλλά και με σκοπό να ενημερωθούν για τα προβλήματα που πιθανόν συναντήσουν συνάδελφοί μας, που στο μέλλον εκπονήσουν παρόμοια εργασία με το ίδιο γνωστικό αντικείμενο. Έχοντας κάνει τις παραπάνω διαπιστώσεις, θα θέλαμε σε αυτό το σημείο να κάνουμε ορισμένες προτάσεις για το "δέον γενέσθαι".

1. Όταν εμφανιστεί κάποιο πρόβλημα με αυξημένη θνησιμότητα, και πριν επιχειρηθεί οποιαδήποτε πρακτική θεραπεία, στέλνονται δείγματα για βακτηριακή εξέταση από τον υπεύθυνο ιχθυοπαθολόγο, και ακολουθούνται οι οδηγίες του πριν και μετά τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος.
2. Αποφυγή των πειραματισμών με τις δοσολογίες ή τους χρόνους θεραπείας, και εκτέλεση κατά γράμμα των οδηγιών του ιχθυοπαθολόγου.
3. Για την εφαρμογή οποιασδήποτε θεραπευτικής αγωγής, θα πρέπει να υπάρχει συνταγή και συγκεκριμένες οδηγίες από κτηνίατρο - ιχθυοπαθολόγο.
4. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ των φαρμακευτικών ουσιών, σύμφωνα με τις συνθήκες που αναγράφονται πάνω στη συσκευασία (φύλαξη σε σκιά, αποφυγή υψηλής θερμοκρασίας, αποφυγή υγρασίας), σε ειδικούς χώρους και χρήση τους μόνο από συγκεκριμένα έμπειρα άτομα, μόνο κατόπιν εντολής του ιχθυοπαθολόγου.
5. Κάθε φορά που χρησιμοποιείται μια ποσότητα φαρμάκου, θα πρέπει να αναγράφεται, σε ειδικό μητρώο, η ακριβής ποσότητα, ο αριθμός της παρτίδας, ο κλωβός ή η δεξαμενή στην οποία έγινε η θεραπεία, η δοσολογία που ακολουθείται (και ο χρόνος της θεραπείας

αν πρόκειται για μπάνιο) και όποια σχόλια σχετικά με την αντίδραση των ψαριών κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

6. Η ΑΝΑΜΕΙΞΗ του αντιβιοτικού στην τροφή, θα πρέπει να γίνεται προσεκτικά. Το αντιβιοτικό προστίθεται σε τροφή ίση με (ή και λιγότερο, σε μεγάλα ψάρια) το 1% του ζώντος βάρους. Το αντιβιοτικό θα πρέπει να προστίθεται αρχικά σε αραβοσιτέλαιο ή ιχθυέλαιο (200ml λάδι για κάθε 5 kg τροφή), να ανακατεύεται καλά και σταδιακά να προστίθεται στην τροφή υπό ανάδευση.

7. Η ΧΟΡΗΓΗΣΗ της τροφής με το αντιβιοτικό γίνεται νωρίς το πρωί (στο πρώτο γεύμα) και πολύ προσεκτικά και υπομονετικά, ώστε να καταναλωθεί απευθείας και να μη φεύγει στο βυθό, γιατί τα άρρωστα ψάρια χάνουν συνήθως την όρεξή τους.

8. Στον ιχθυοπληθυσμό που παρουσιάζει πρόβλημα θνησιμοτήτων, θεωρείται χρήσιμο να χορηγείται, ταυτόχρονα με το αντιβιοτικό, και ΒΙΤΑΜΙΝΗ C (2g βιταμίνη C ανά kg τροφής), ιδιαίτερα στο λαβράκι.

9. Το κλουβί με το πρόβλημα των θνησιμοτήτων, παρακολουθείται στενά, απομακρύνονται τα νεκρά καθημερινά, και καίγονται ή γίνεται η υγειονομική ταφή τους (με ασβέστη).

10. Αποφεύγονται οι βίαιοι και περιττοί χειρισμοί, και τα εργαλεία, που χρησιμοποιούνται σε κλωβούς με θνησιμότητες, δε μεταφέρονται ή χρησιμοποιούνται πουθενά αλλού.

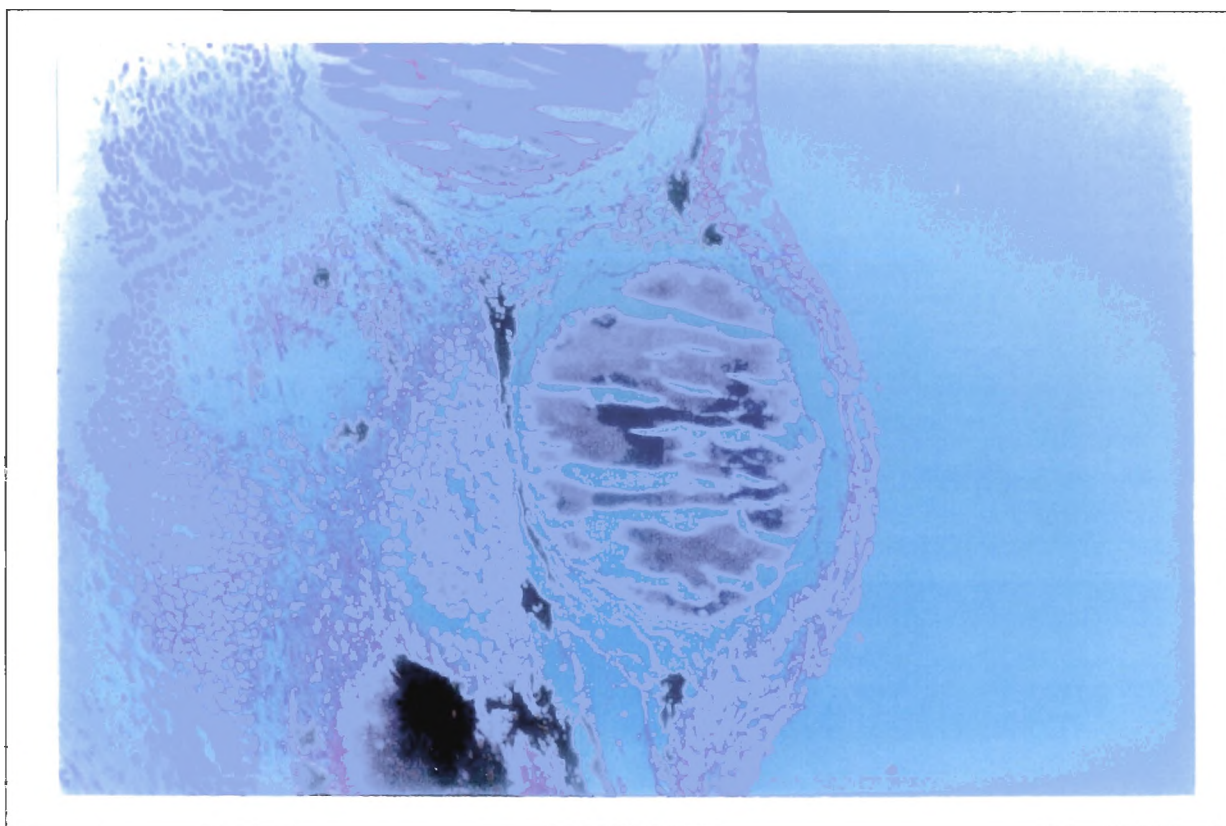
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι προτάσεις αυτές προκύπτουν από την περιγραφή της ισχύουσας πραγματικότητας στο χώρο των υδατοκαλλιεργειών, κατά το στάδιο της πάχυνσης σε ιχθυοκλωβούς. Διότι... όπως λέει κι ο ποιητής, *"μονάχα η πραγματικότητα θα μας διδάξει πως την πραγματικότητα θα αλλάξουμε"* (Μπρεχτ).

...ΚΑΙ ΤΩ ΘΕΩ ΔΟΞΑ

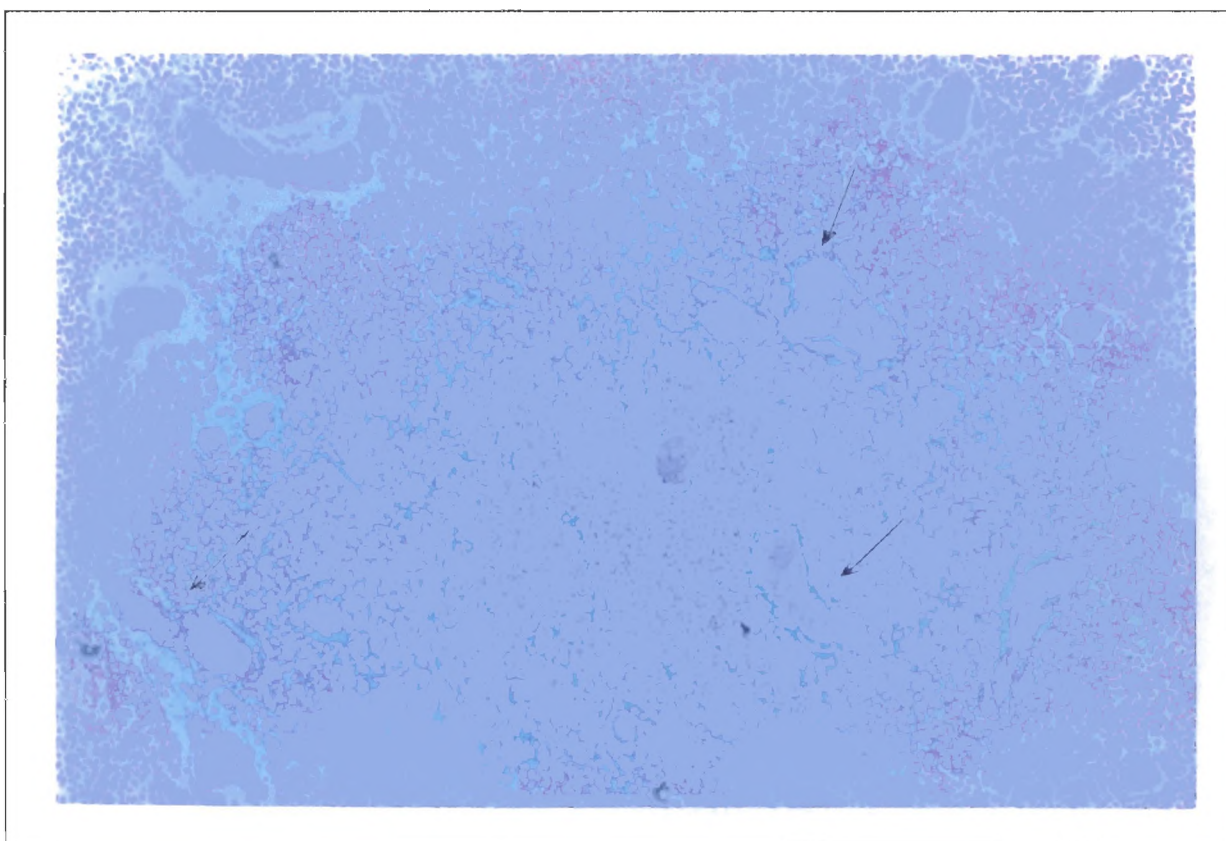
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ

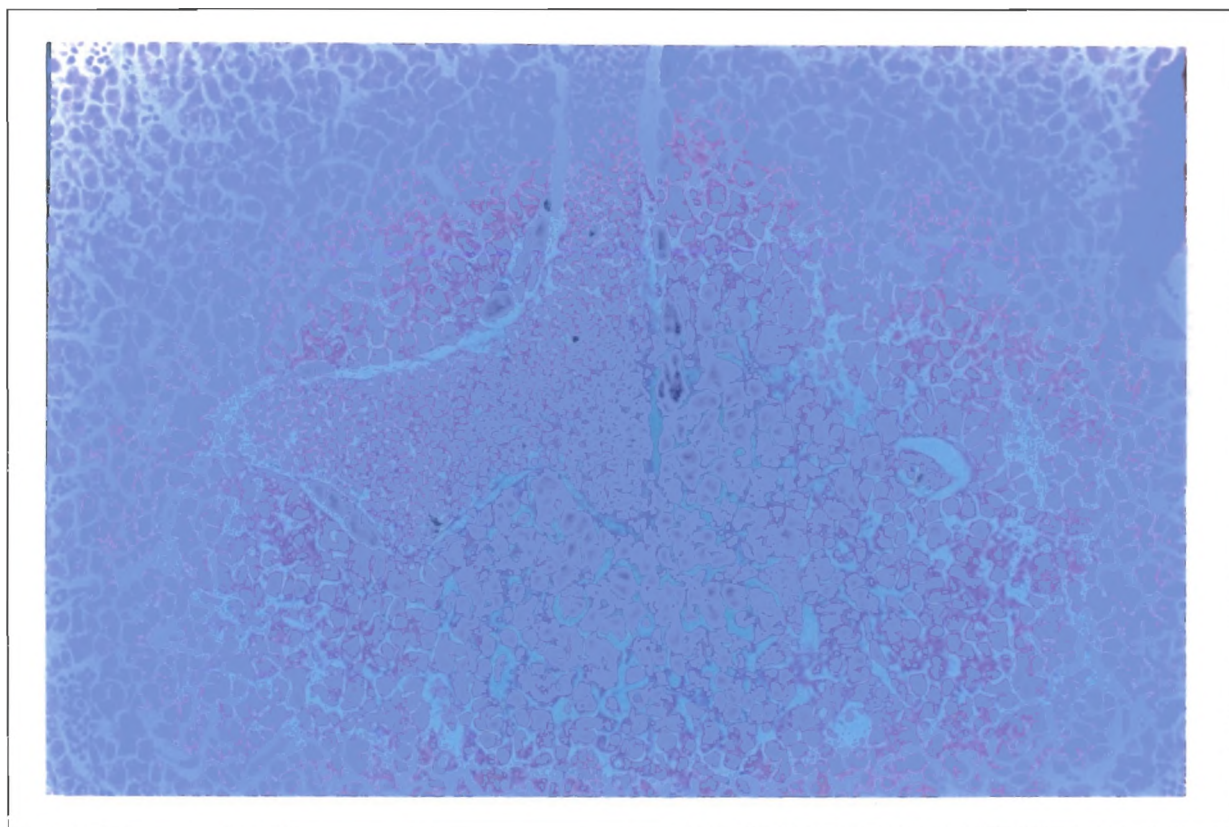
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΥΡΗΜΑΤΩΝ



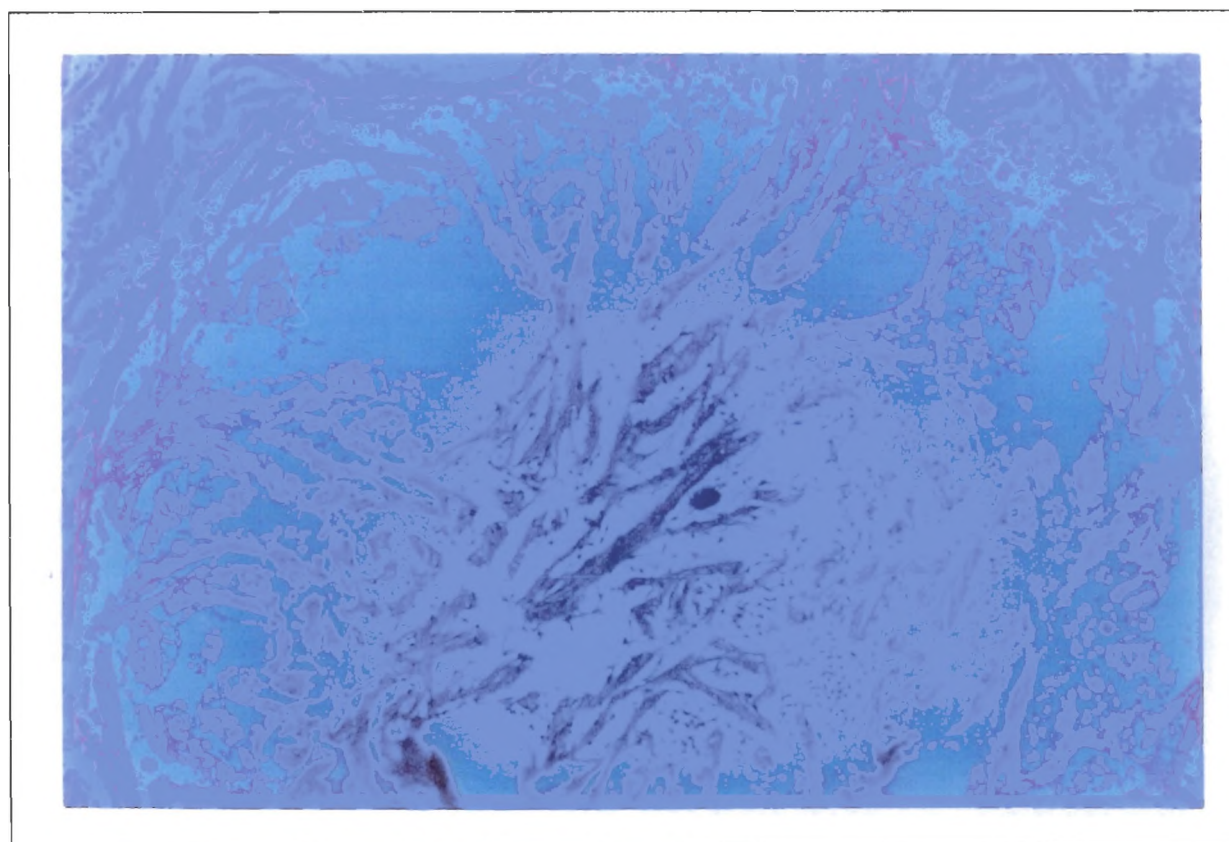
Εικ. 1. Λεμφοκίστες σε ουραίο πτερόγιο. Μεγέθυνση 20 Χ.



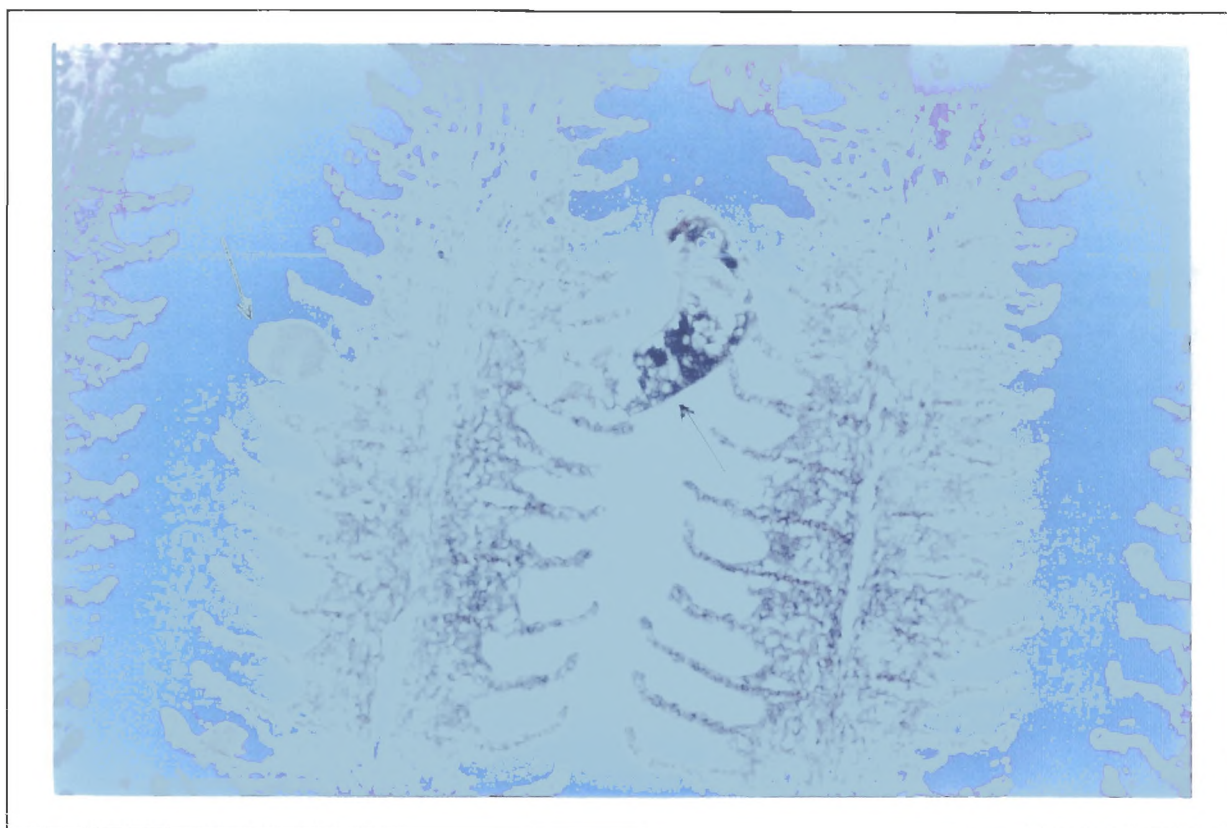
Εικ. 2. Βακτηριακή λοίμωξη από *Pasteurella spp.* Κοκκιώματα στον στήλινα. Μεγέθυνση 20 Χ



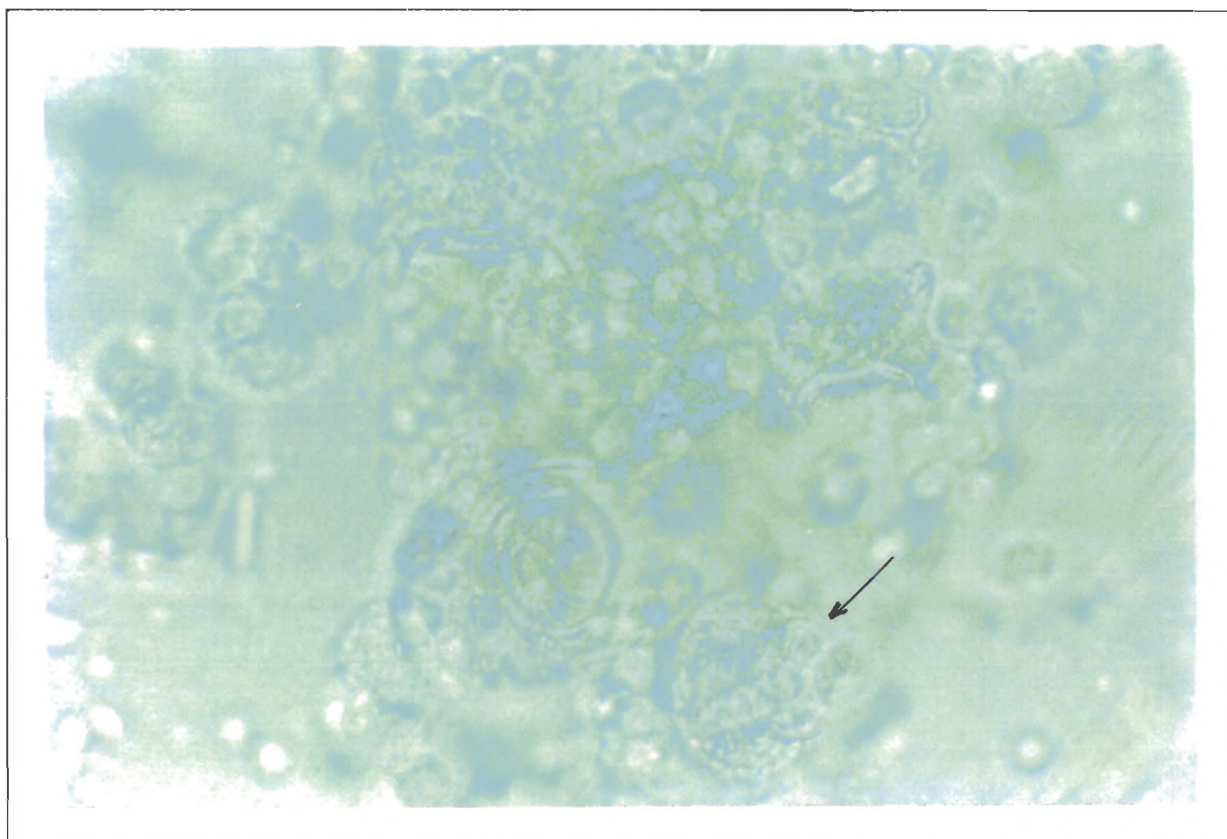
Εικ. 3. Βακτηριακή λοίμωξη από *Pasteurella spp.* Συκώτι. Μεγέθυνση 20 X.



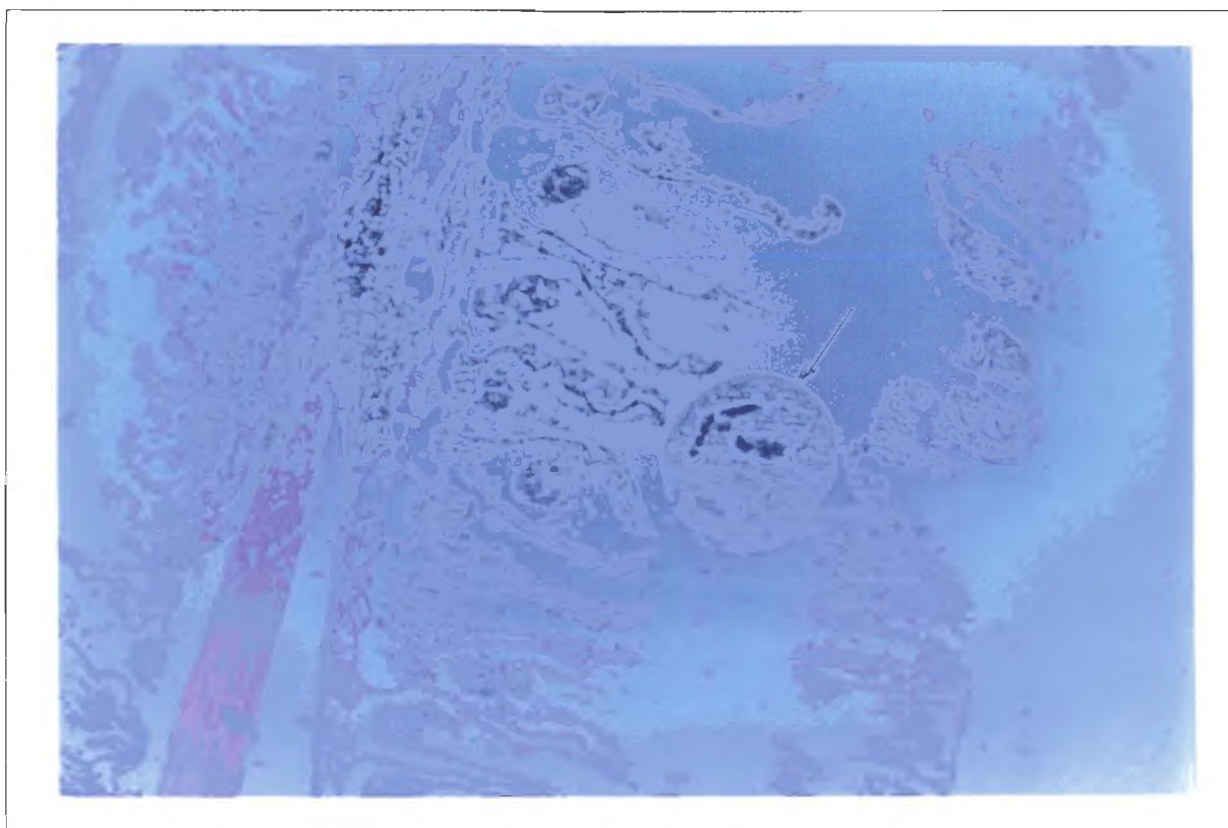
Εικ. 4. Βακτηριακή λοίμωξη από *Pasteurella spp.* Καρδιά. Μεγέθυνση 20 X



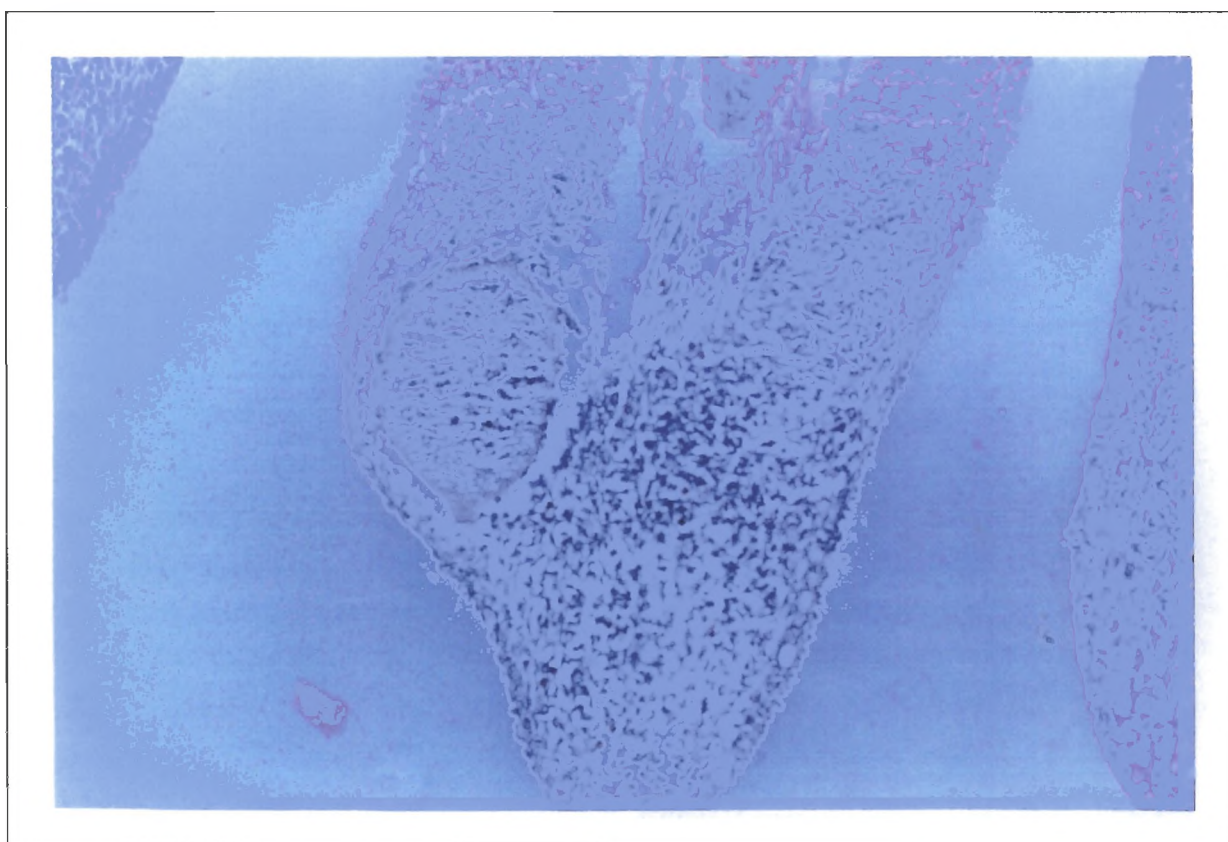
Εικ. 5. Επιθηλιοκύστις και Μονογενές παράσιτο. Μεγέθυνση 20 X.



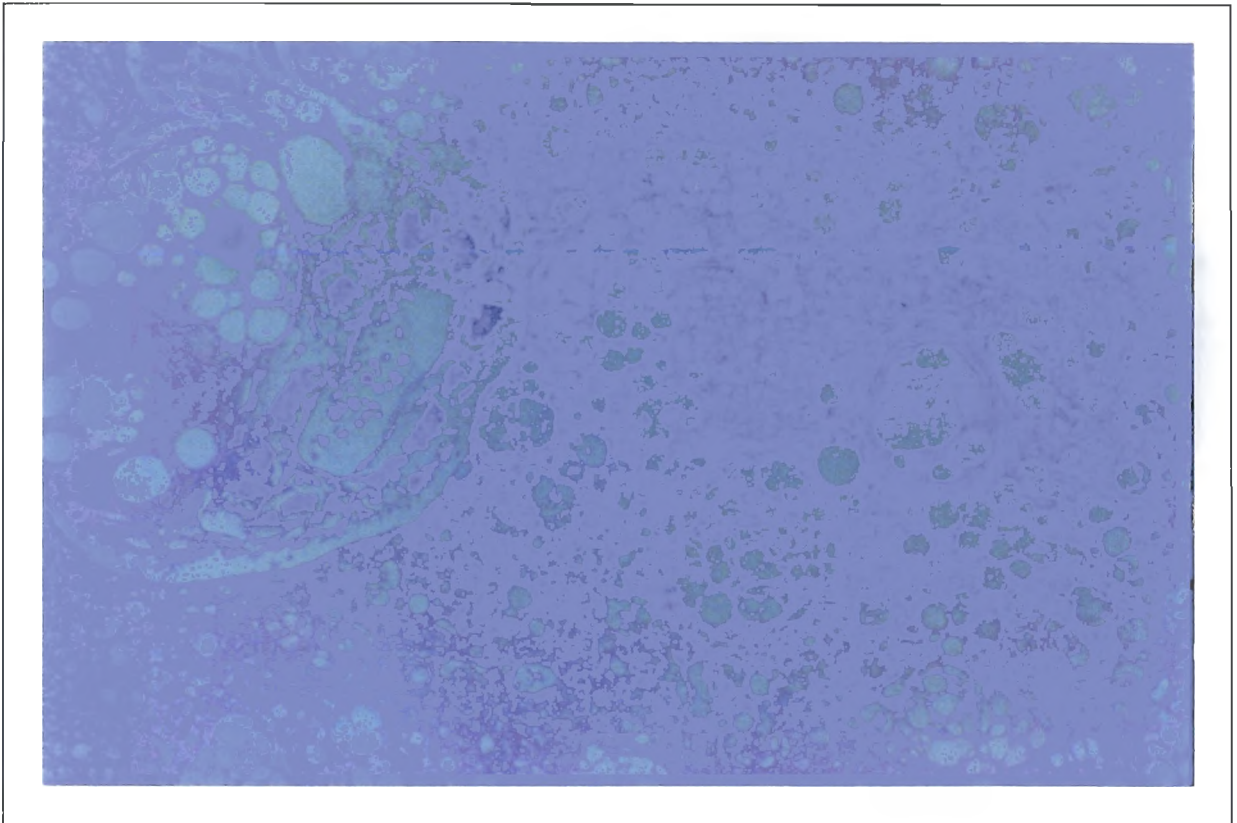
Εικ. 6. *Trichodina* spp. Μεγέθυνση 20 X.



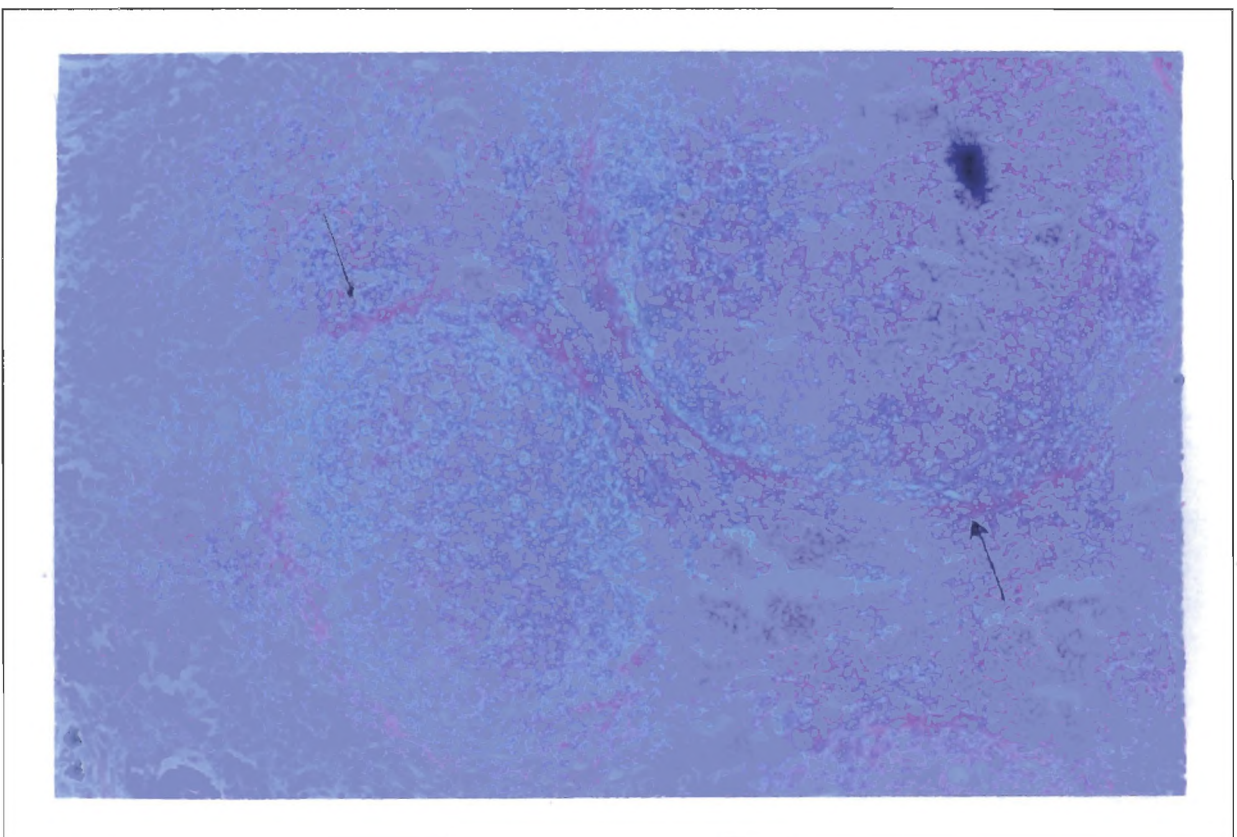
Εικ. 7. *Cryptocaryon spp.* Μεγέθυνση 20 X.



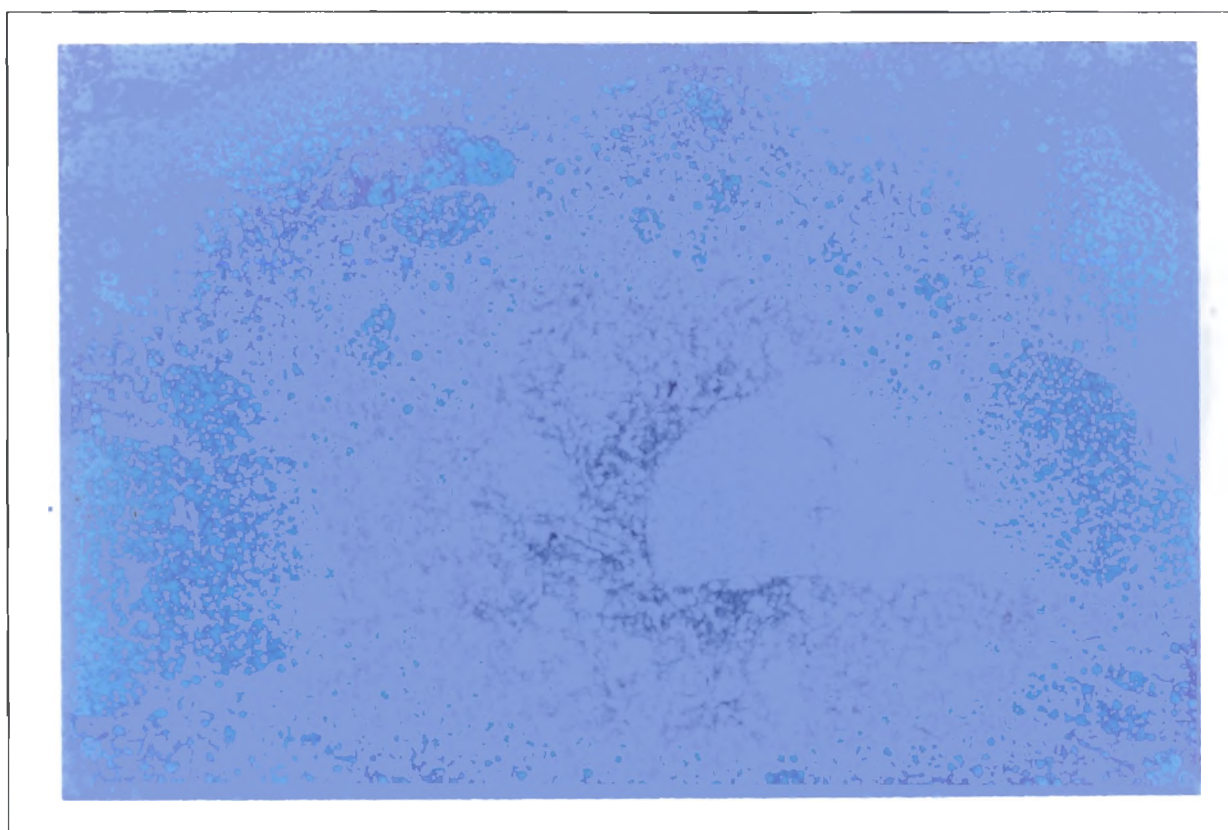
Εικ. 8. *Cryptocaryon spp.* σε βράγχια τσιπούρας. Μεγέθυνση 20 X.



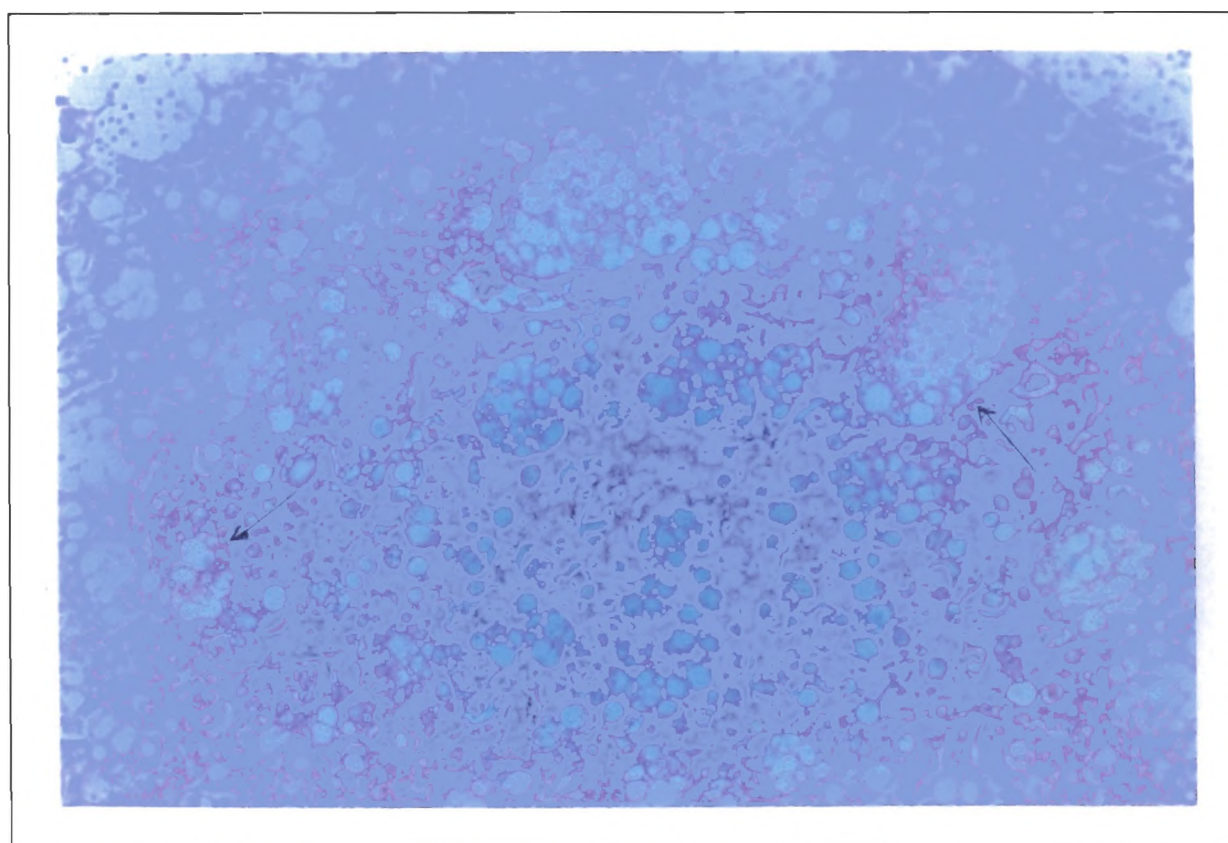
Εικ. 9. Συκώτι από πολύ άρρωτο ψάρι, προσβεβλημένο από το **Winter Syndrome**. Μεγέθυνση 20 X.



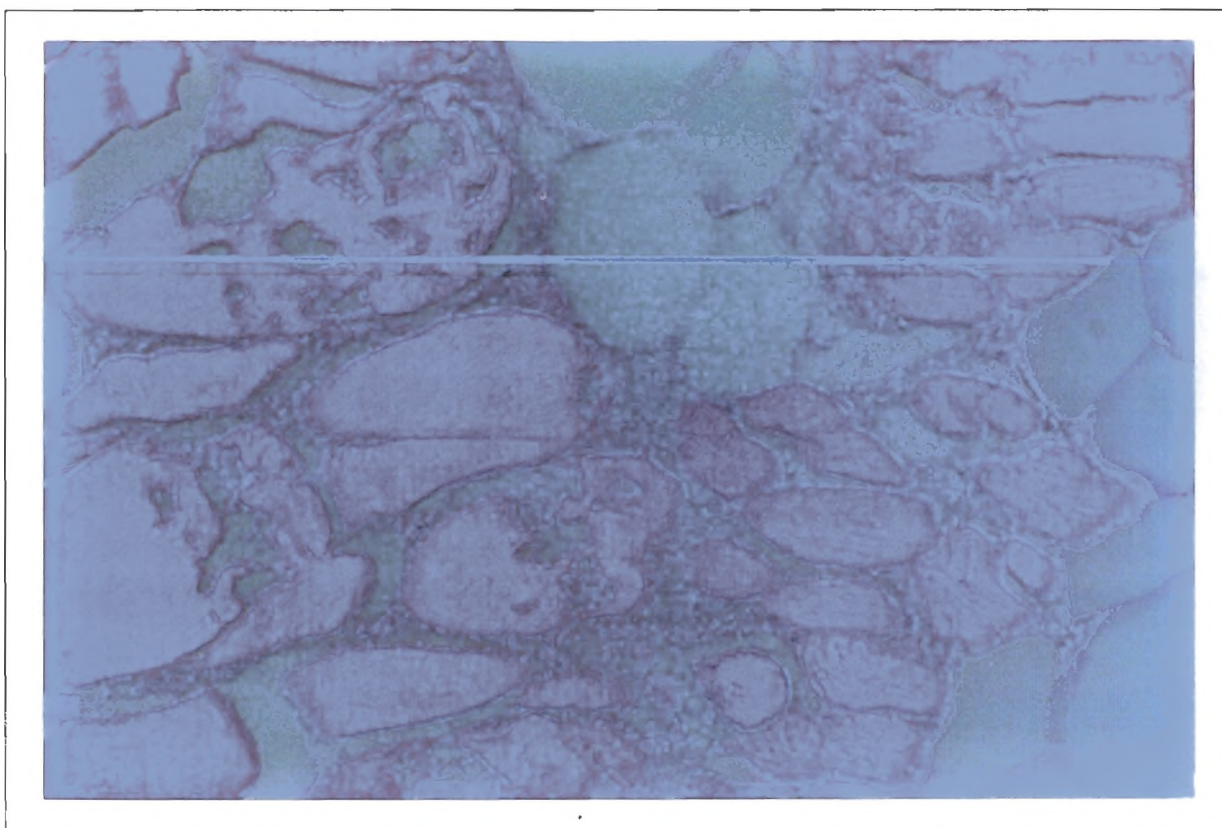
Εικ. 10. Ύπαρξη κοκκιωμάτων σε σπλήνα, ψαριού προσβεβλημένου από το **Winter Syndrome**. Μεγέθυνση 20 X.



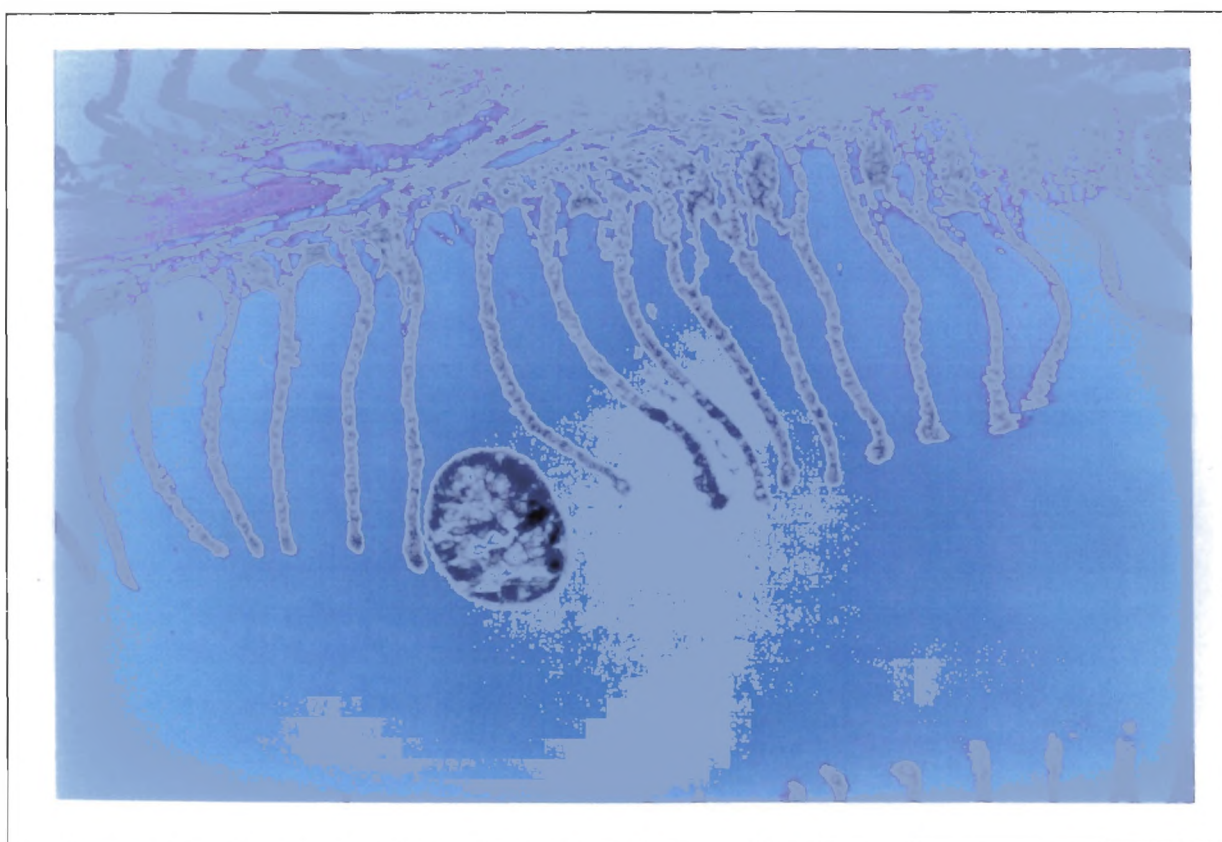
Εικ. 11. Λιπώδης εκφύλιση του ήπατος. Μεγέθυνση 20 X.



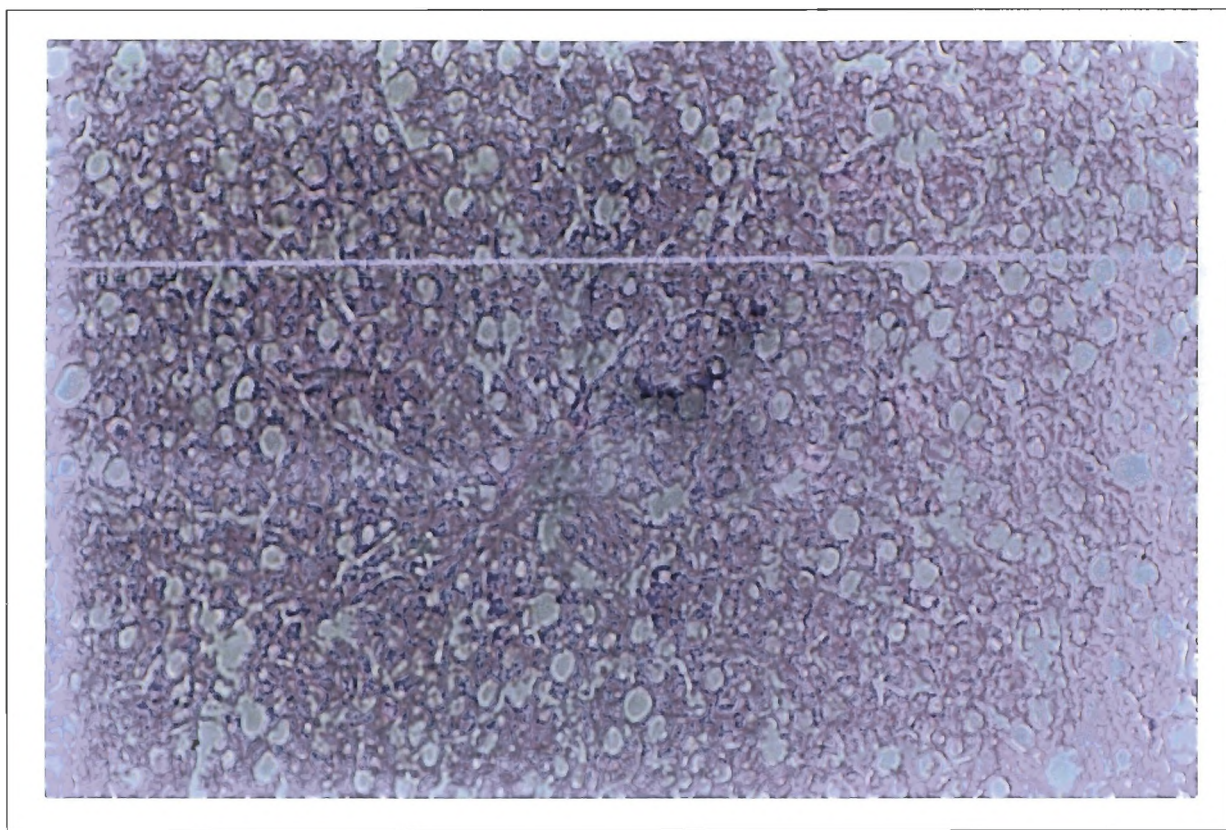
Εικ. 12. Έντονη λιπώδης εκφύλιση του ήπατος από υπερκατανάλωση extruded τροφής σε 700 gr ψάρι (ταιπούρα). Βλέπουμε υπερβολικά αποθέματα λίπους. Μεγέθυνση 20 X.



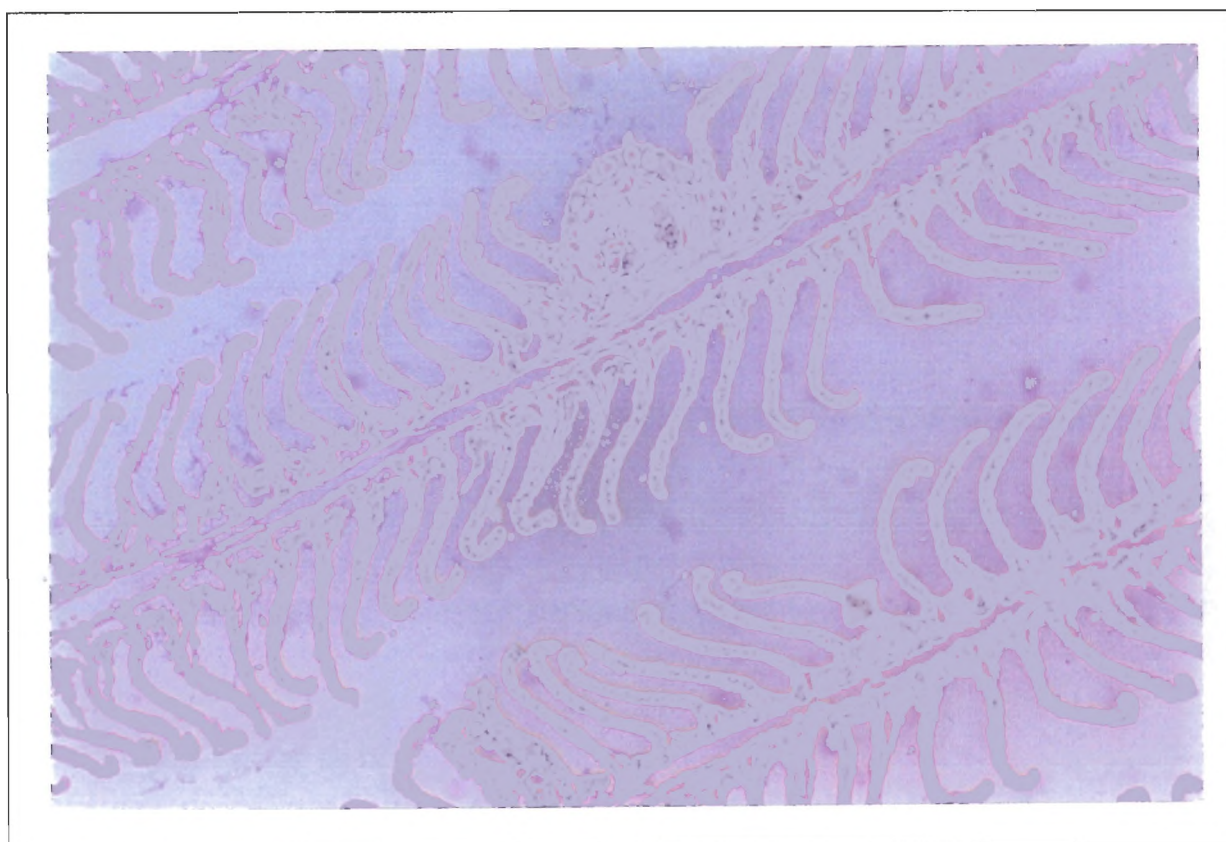
Εικ. 13. Μυοφαγία. Μεγέθυνση 20 Χ.



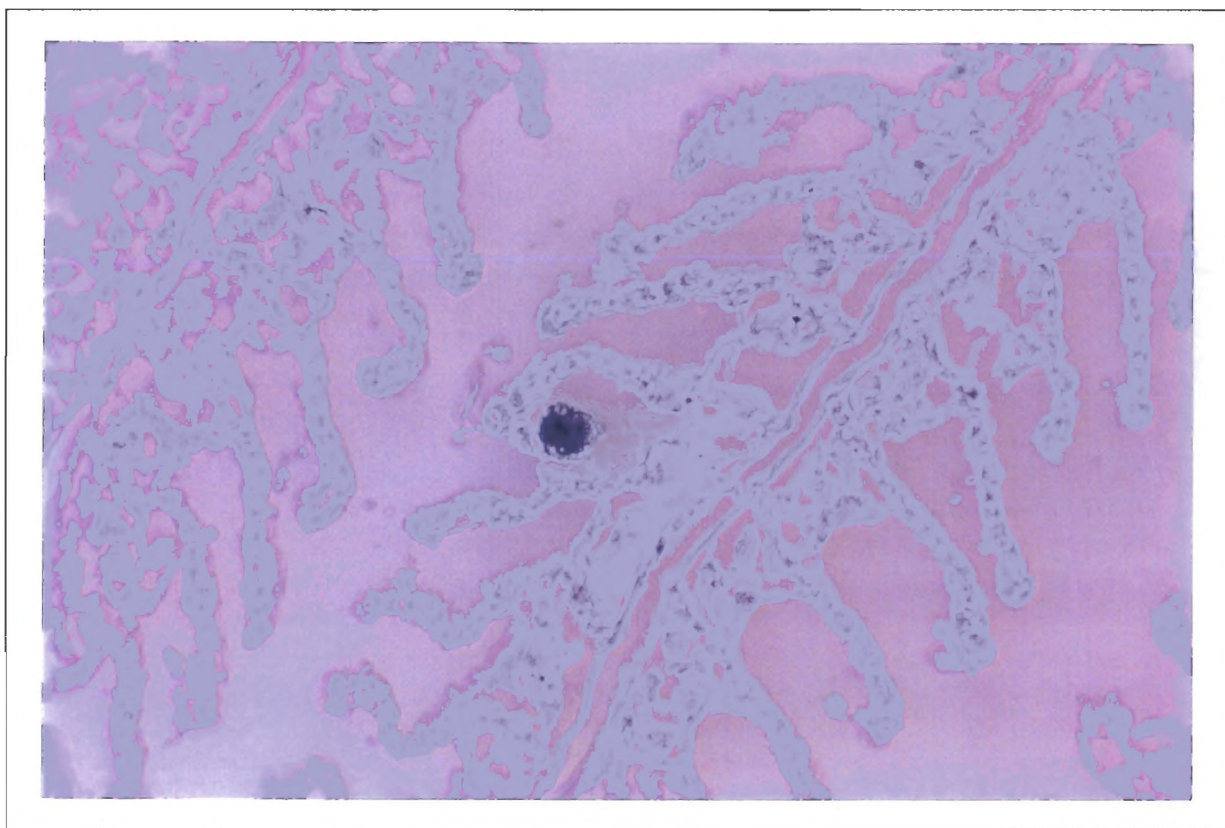
Εικ. 14. Μονογενές παράσιτο. Μεγέθυνση 20 Χ.



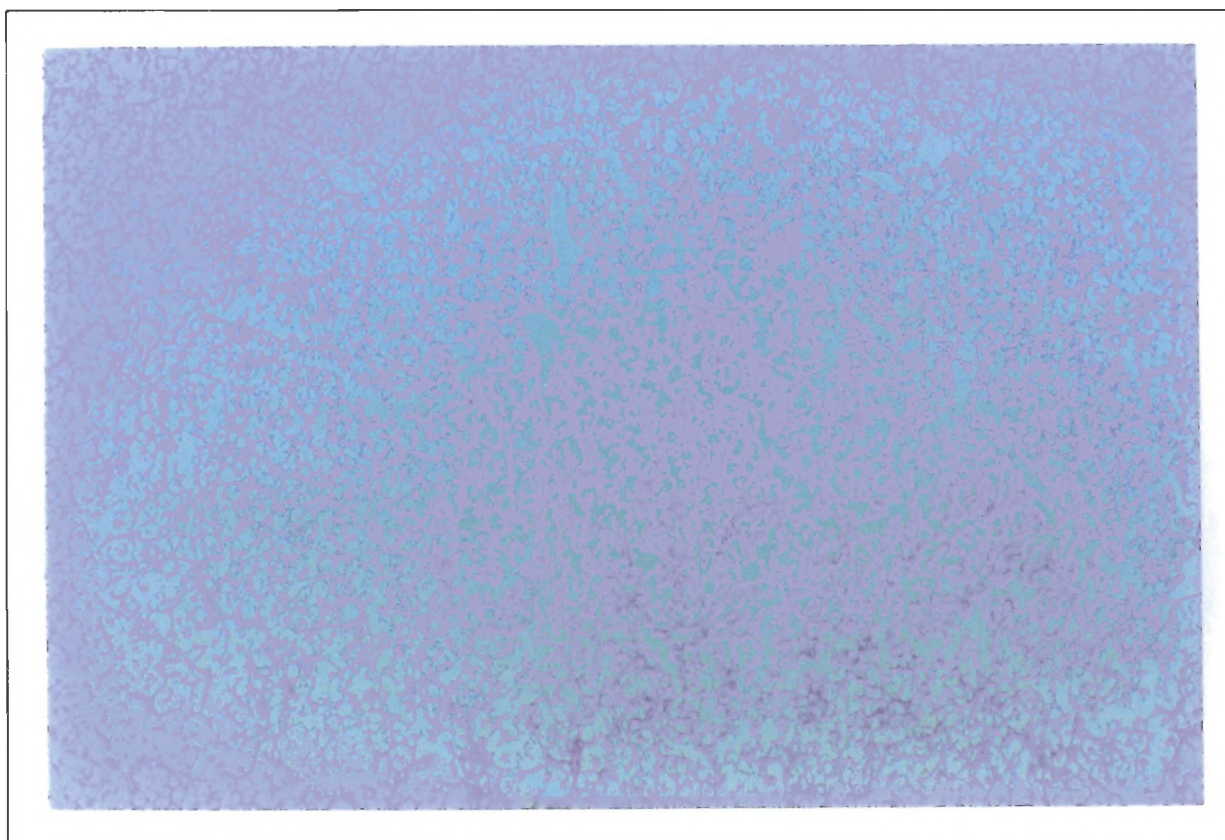
Εικ. 15. Λιπώδης εκφύλιση σε συκώτι. Μεγέθυνση 20 X.



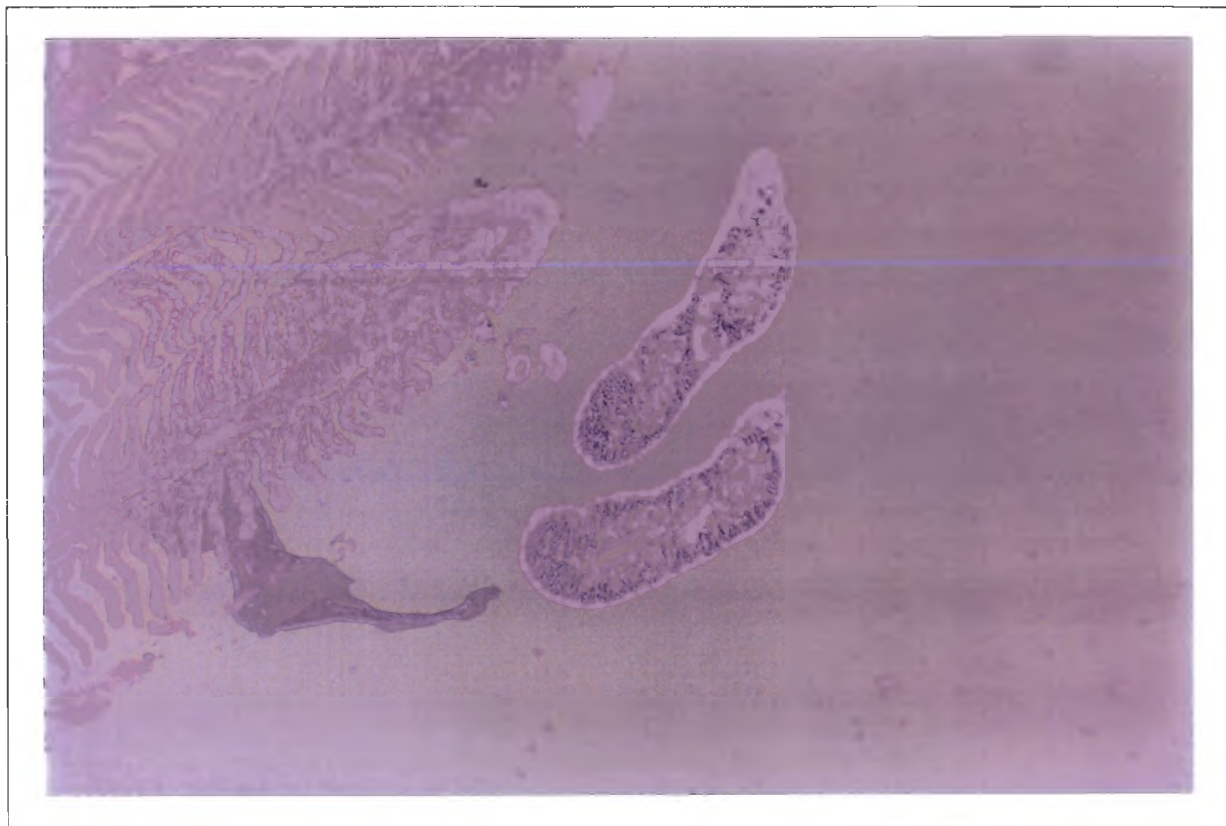
Εικ. 16. Τελεγκεκτασία σε βράγχια. Νεκρωτικές εστίες με φλεγμονώδη αντίδραση στο βραγχιακό επιθήλιο, ανάμεσα σε δύο δευτερογενή βραγχιακά νημάτια. Μεγέθυνση 20 X.



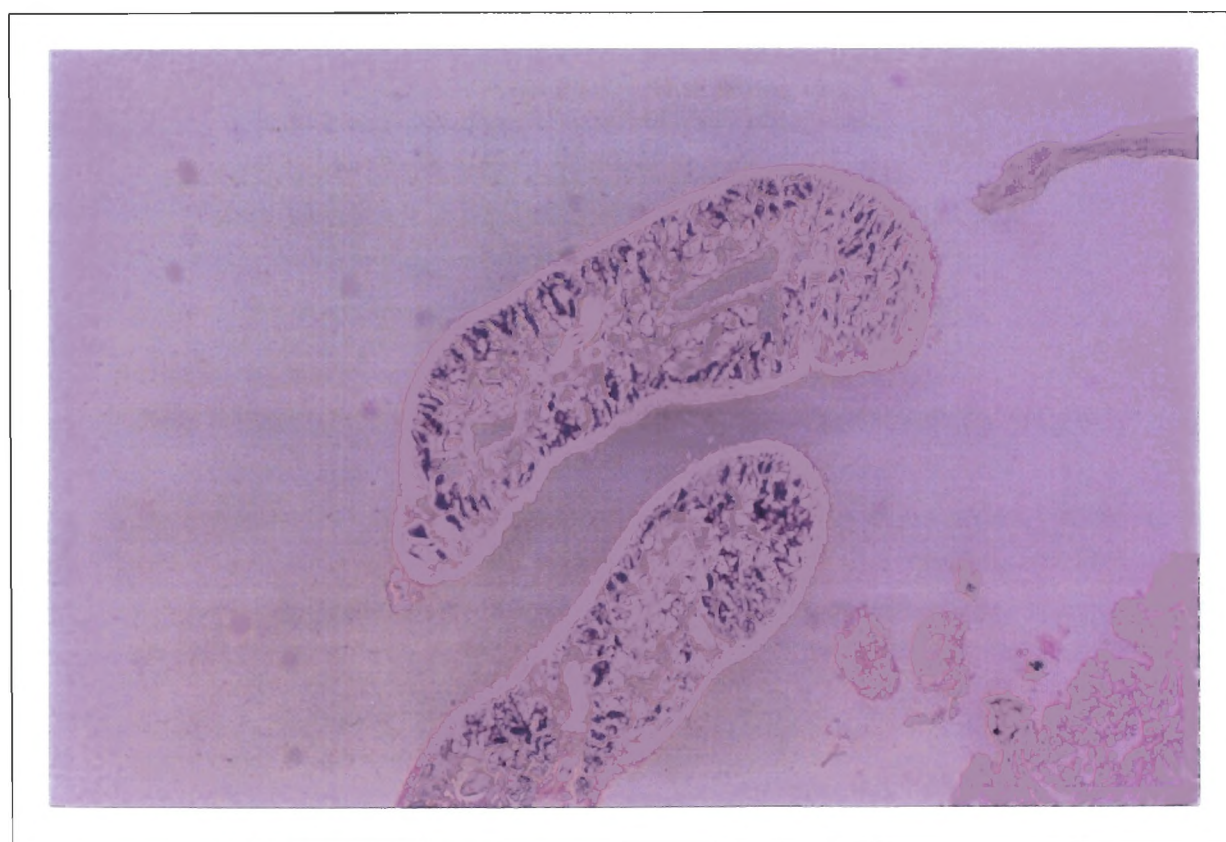
Εικ. 17. *Trichodina* spp. Μεγέθυνση 20 X.



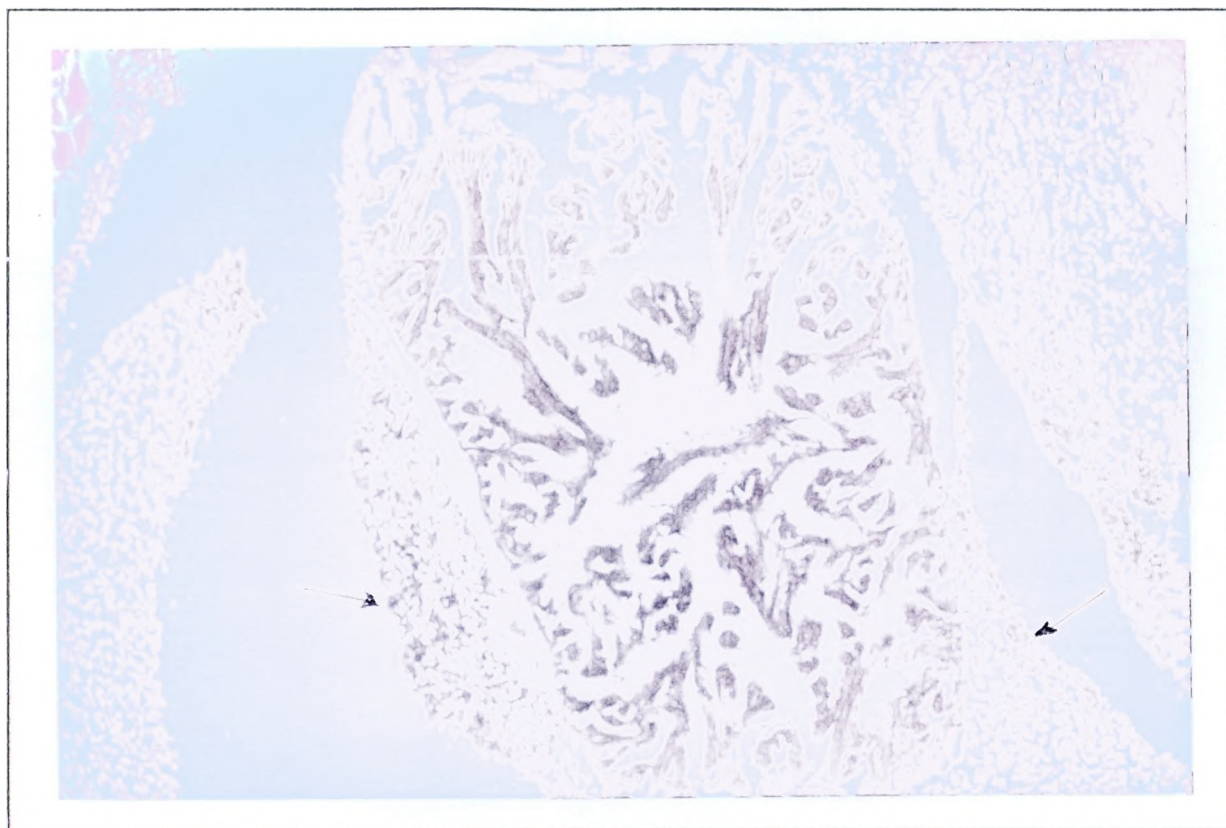
Εικ. 18. Έντονη λιπώδης εκφύλιση. Μεγέθυνση 10 X.



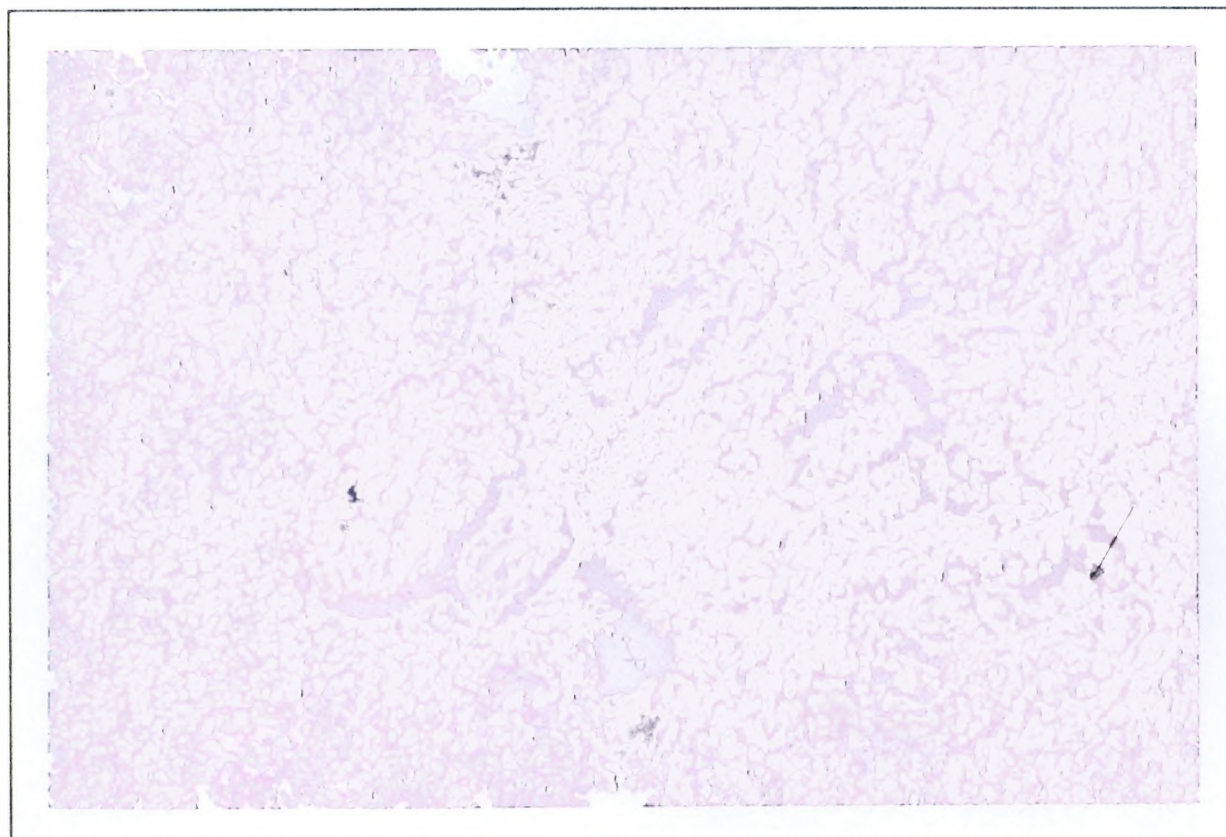
Εικ. 19. Μονογενές παράσιτο της οικογένειας *Dactylogyridae*. Μεγέθυνση 20 Χ



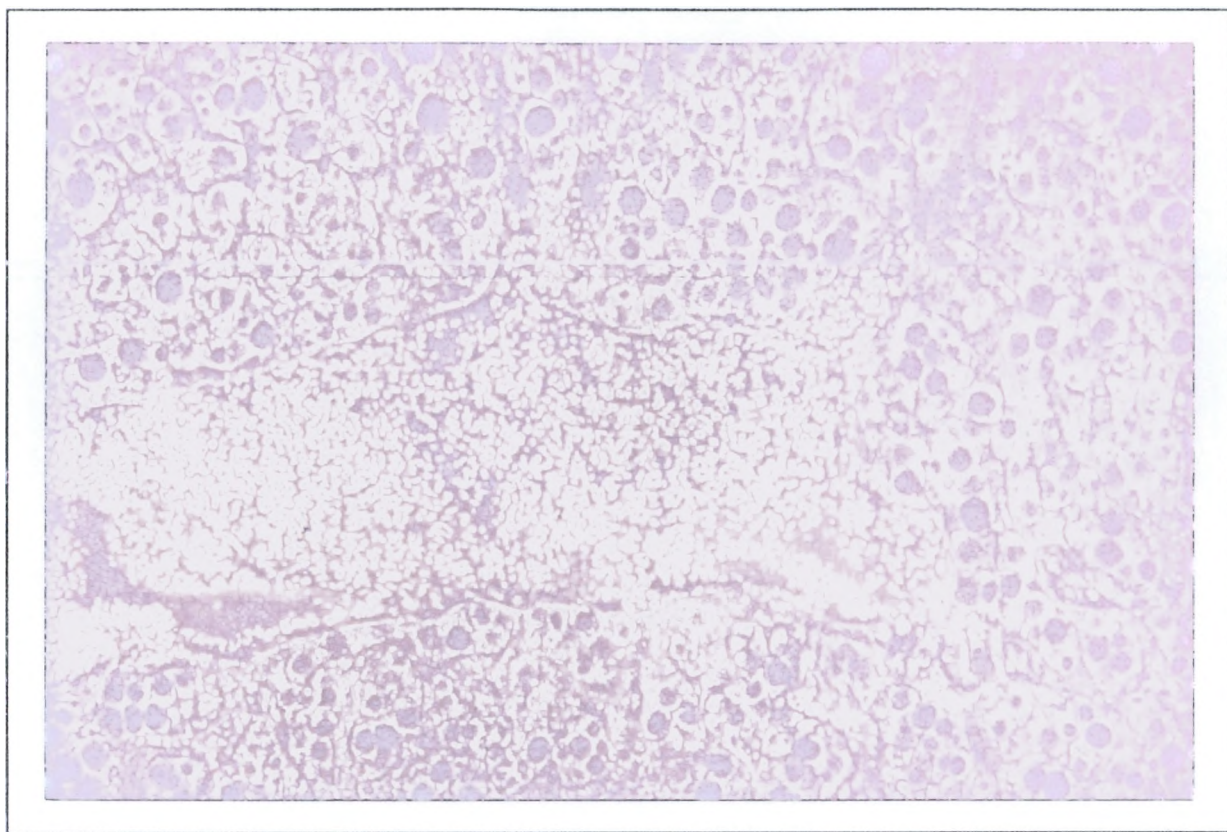
Εικ. 20. Μονογενές παράσιτο της οικογένειας *Dactylogyridae*. Μεγέθυνση 40 Χ.



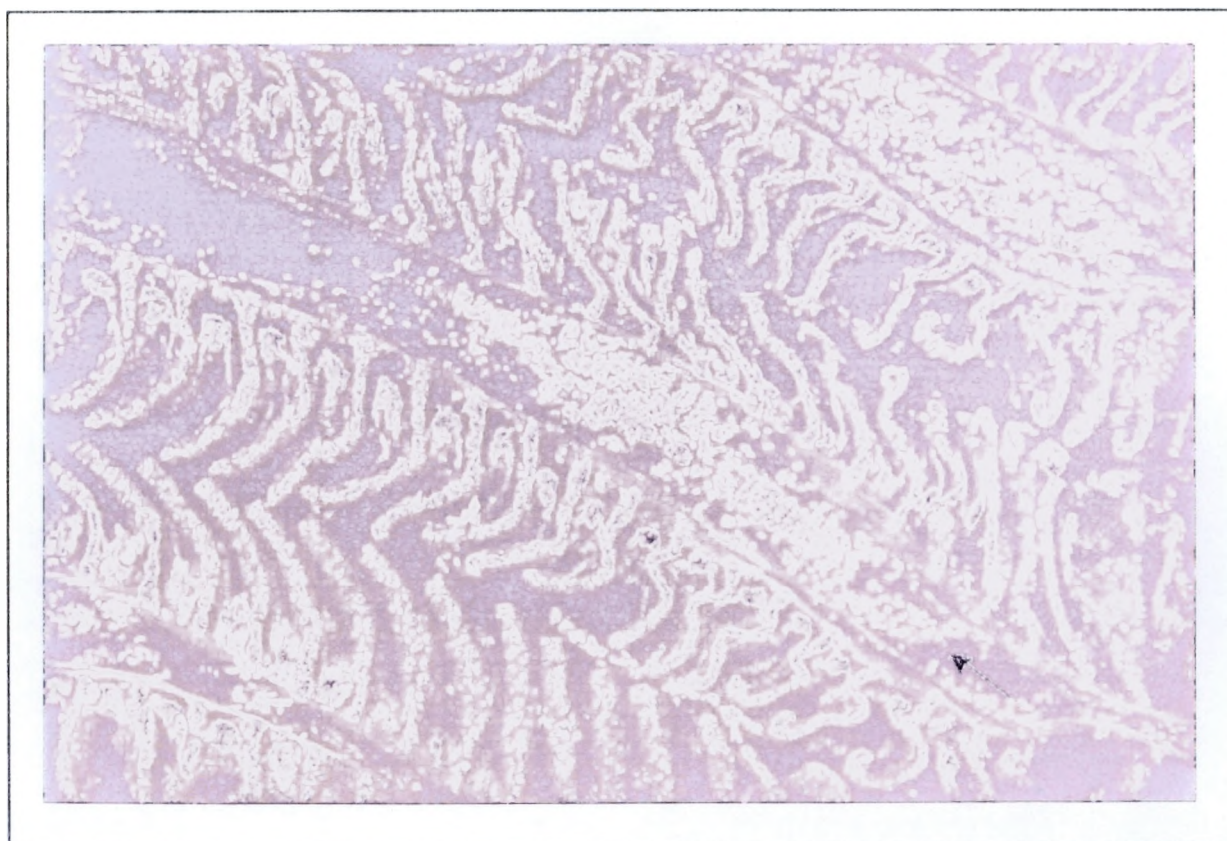
Εικ. 21. Αιμορραγία γύρω από την καρδιά. Μεγέθυνση 20 Χ.



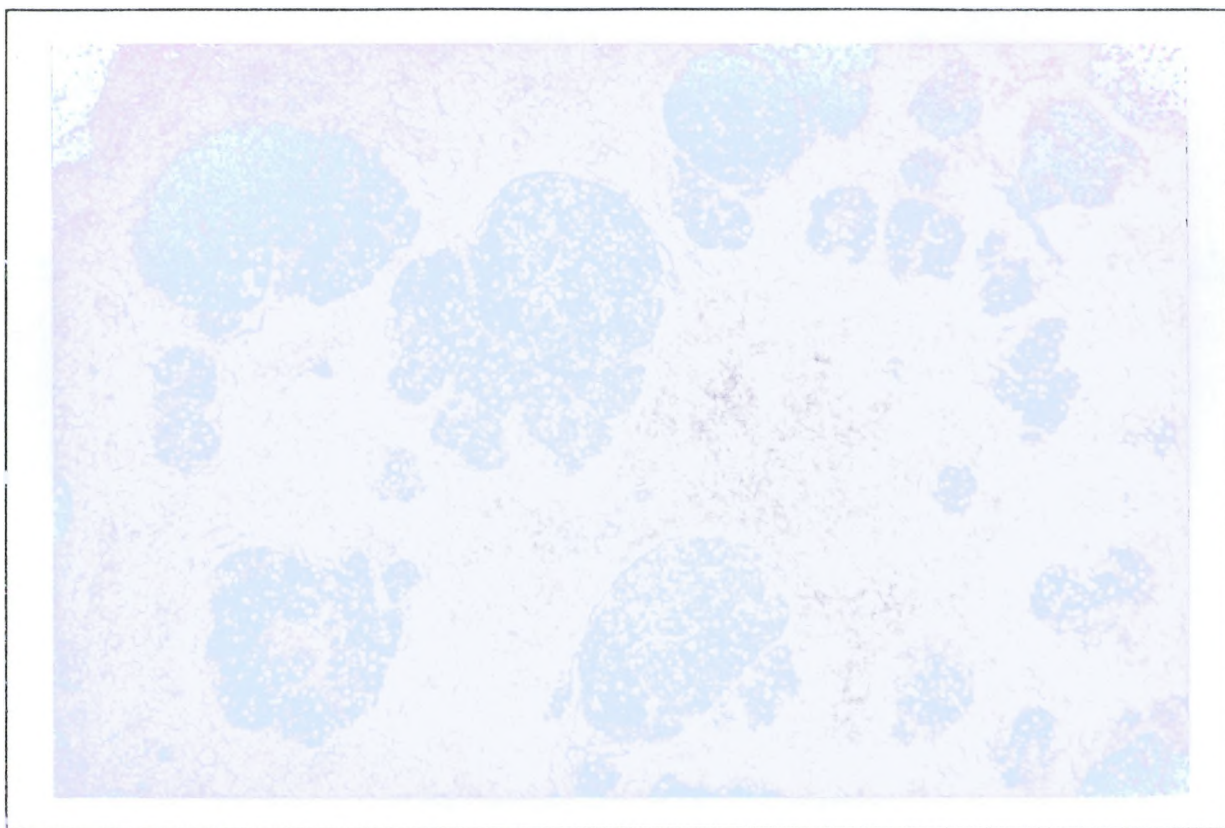
Εικ. 22. Εστιακή φλεγμονή στον σπλήνα. Μεγέθυνση 20 Χ.



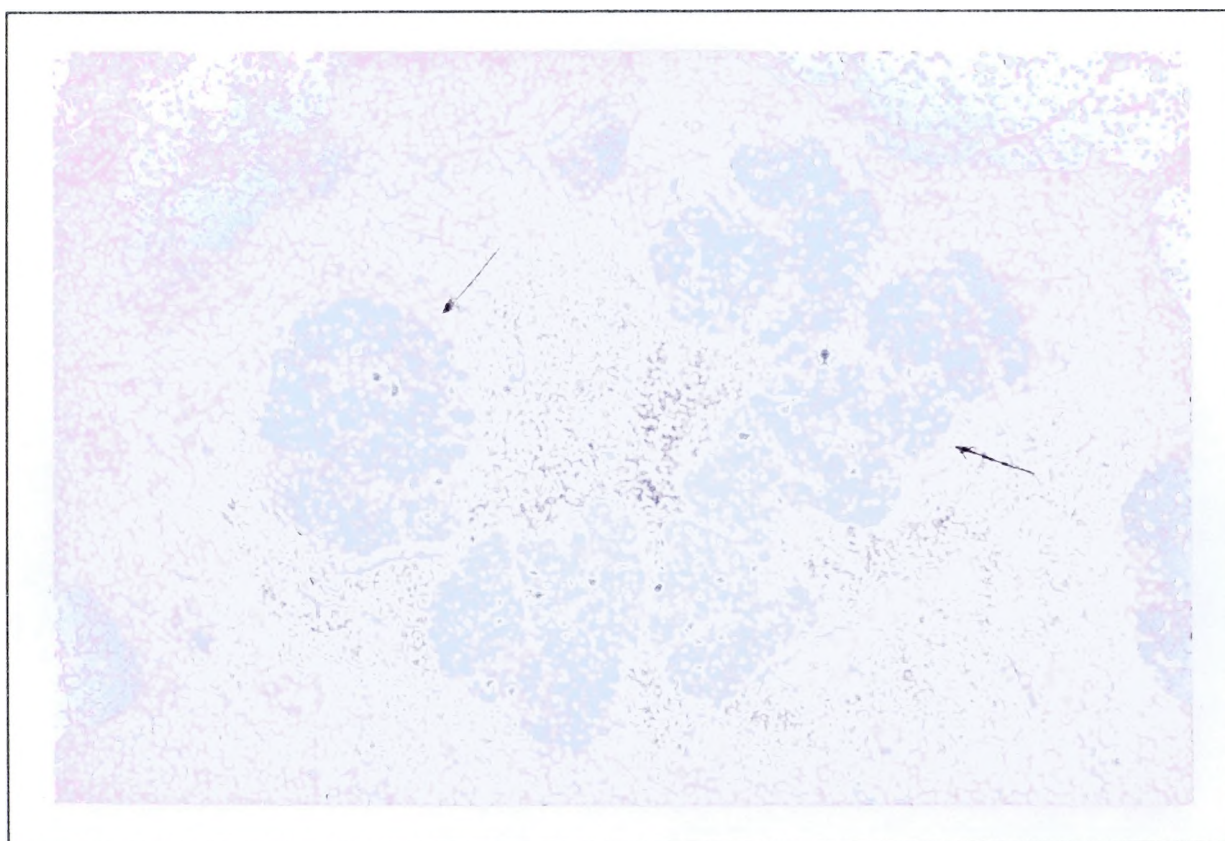
Εικ. 23. Συκώτι. Συμφόρηση και αιμορραγία στα αγγεία. Μεγέθυνση 40 X.



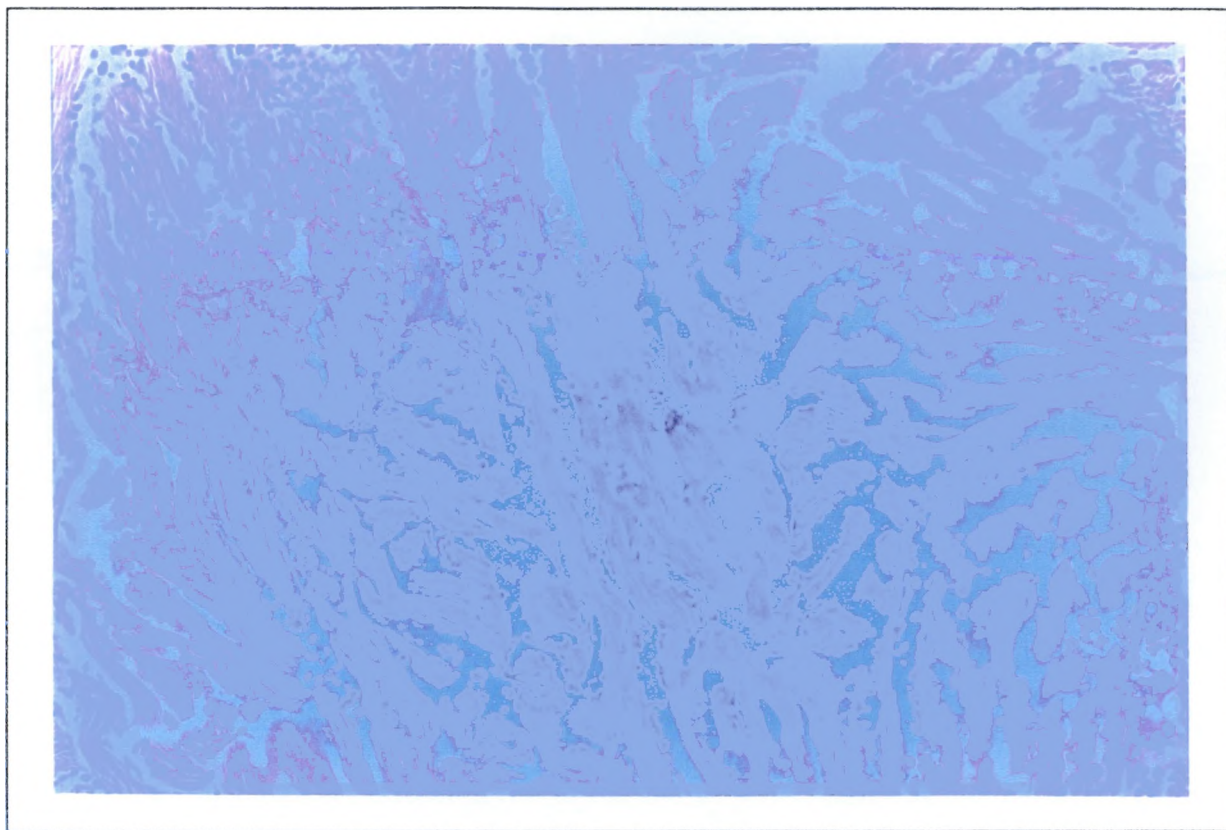
Εικ. 24. Βράγχια. Αιμορραγία και υπερπλασία βραγχιακού επιθηλίου. Μεγέθυνση 40 X.



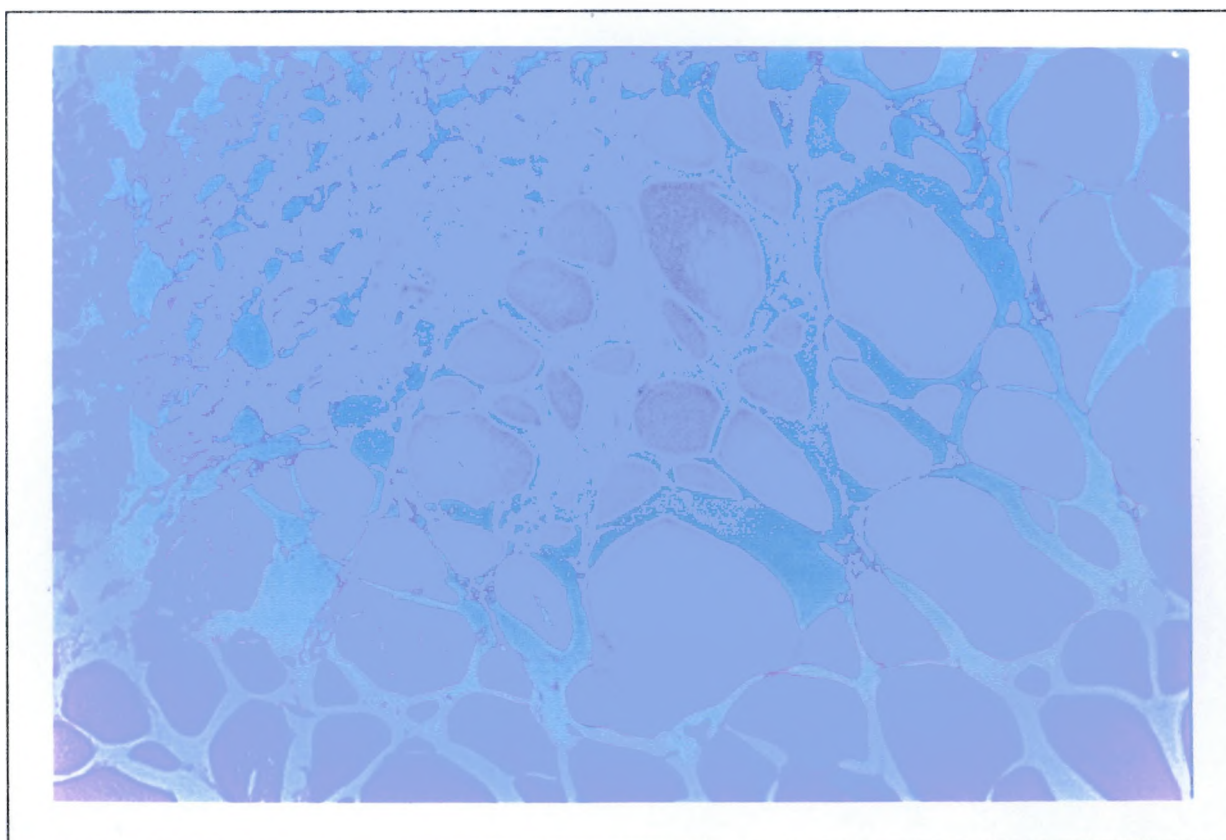
Εικ. 25. Σπλήνας. Έντονη λιπώδης εκφύλιση από υπερκατανάλωση extruded τροφής, σε 700 gr ψάρι (τσιπούρα). Μεγέθυνση 20 Χ.



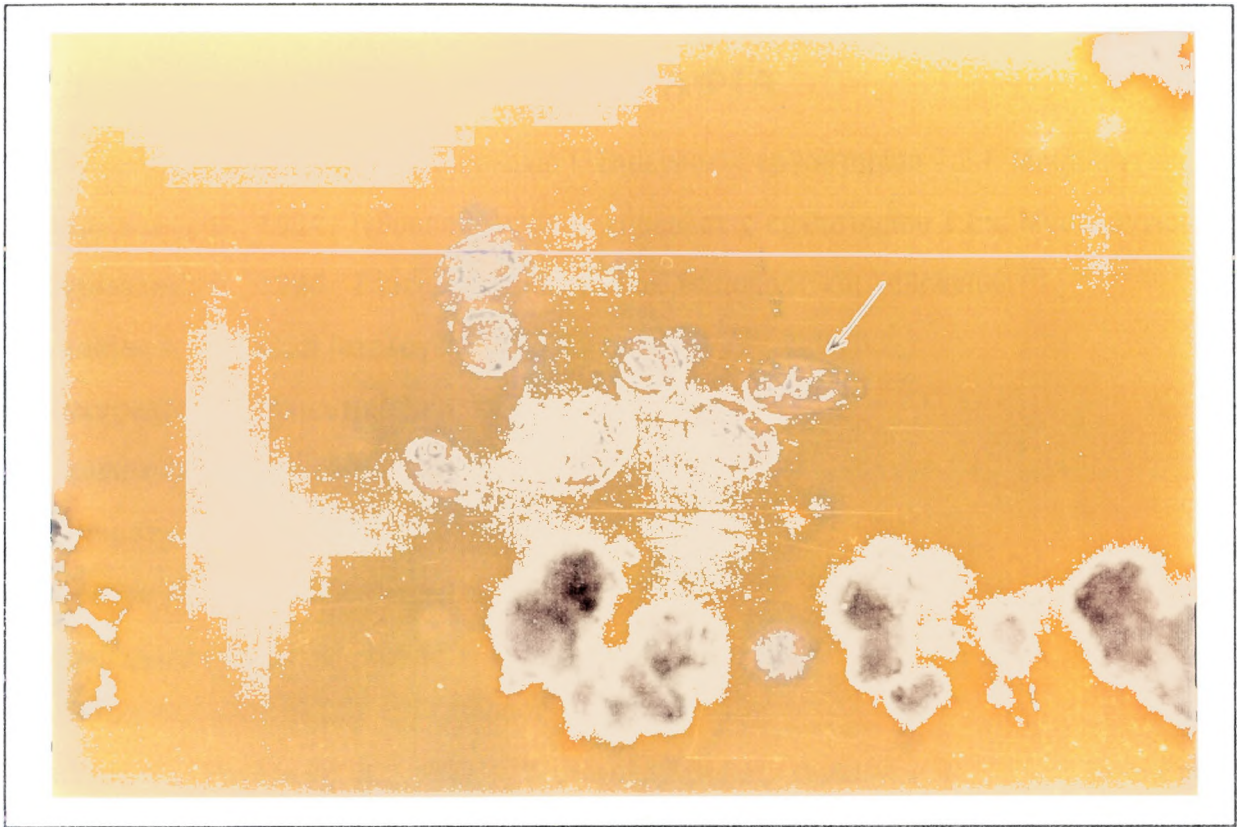
Εικ. 26. Παρόμοια περίπτωση με την προηγούμενη.



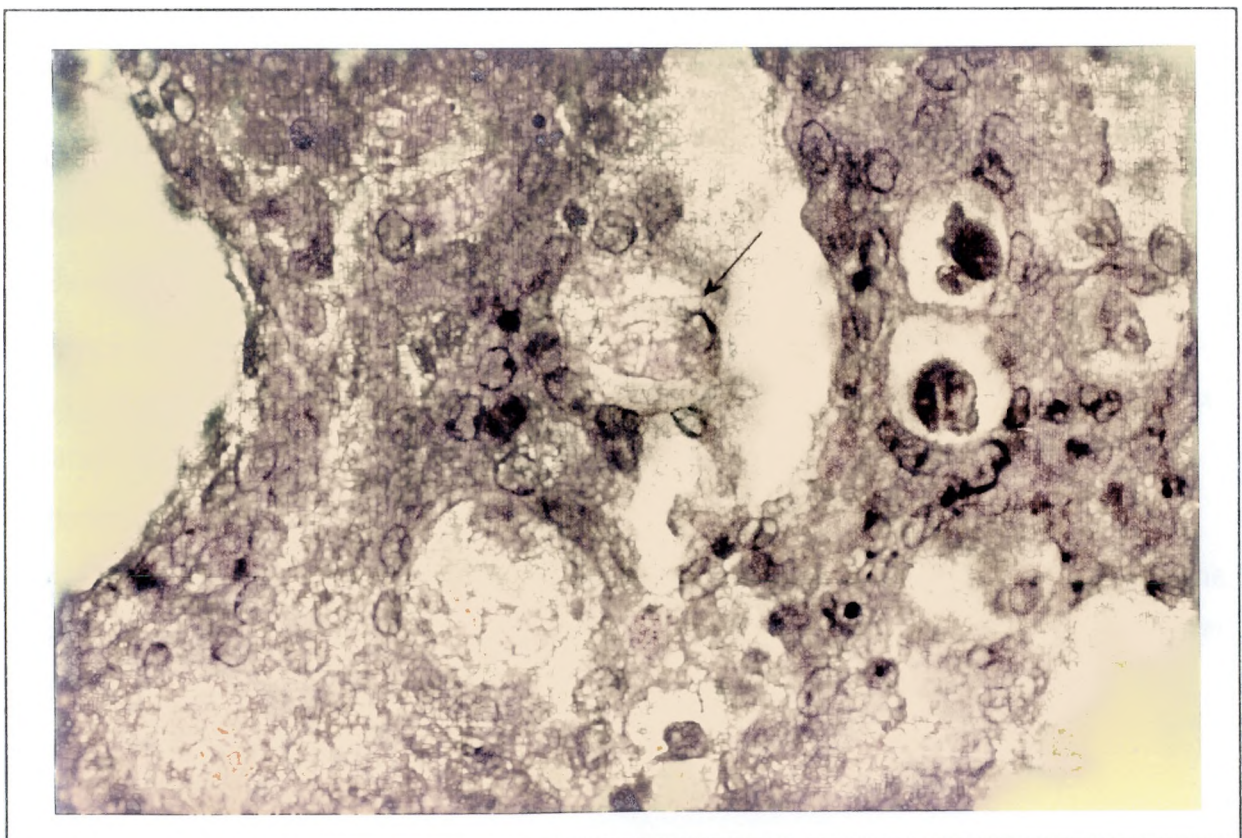
Εικ. 27. Καρδιά Παρατηρείται μωφαγία και αιμορραγία, εξαιτίας υπερκατανάλωσης extruded τροφής
Μεγέθυνση 20 X.



Εικ. 28. Μωφαγία (οποιασδήποτε αιτιολογίας). Μεγέθυνση 20 X.



Εικ. 29. *Myxidium spp.* σε χολή λαβρακίου. Μεγέθυνση 20 X.



Εικ. 30. *Myxidium spp.* σε έντερο λαβρακίου. Μεγέθυνση 20 X.

- Grisez L., Reyniers J., Ollevier F. Lab. for ecology and aquaculture. Zoological Institute. Leuven, Belgium. Histological observations of *Vibrio anguillarum* Infections in sea bream and sea bass larvae.
- Grisez L., 1995. Προσωπική επικοινωνία.
- Post G. Text Book of Fish Health.
- Robert J.R. Fish Pathology.
- Robert J.R. Microbial Diseases of Fish.