



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Υδατοκαλλιέργειες» -

«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη της εποχιακής εμφάνισης και της θνησιμότητας που προκαλούνται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το παράσιτο *Sparicotyle chrysophryi* στο εκτρεφόμενο είδος *Sparus aurata* σε μονάδες εκτροφής της περιοχής του Αστακού»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΠΑΓΩΝΗΣ

ΑΜ : 00143

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ε. Γουρζιώτη, Ερευνήτρια, Επιβλέπουσα
Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Νοσημάτων Ιχθύων και Καρκινοειδών, Τμήμα
Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών, Διεύθυνση Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών,
Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
2. Κ. Μπιτχαβά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Εφηρμοσμένης Υδροβιολογίας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Β. Μπακόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής
Επιτροπής
Εργαστήριο Ασθενειών Υδρόβιων Οργανισμών, Τμήμα Ωκεανογραφίας και
Θαλάσσιων Βιοεπιστημών, Πανεπιστήμιο Αιγαίου

ΚΑΡΔΙΤΣΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2024



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

**IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS**

MASTER THESIS

«Study of the seasonality and mortality caused by the bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and the parasite *Sparicotyle chrysophrii* in farmed species *Sparus aurata* in farms in Astakos region»

POST GRADUATAE STUDENT

CHARALAMBOS PAGONIS

ADVISOR COMMITTEE

1. E. Gourzioti, Researcher, Supervisor
National Reference Laboratory of Fish and Crustacean Diseases, Department of Pathology of Aquatic Organisms, Athens Veterinary Center, Ministry of Rural Development and Food
2. K. Bitchava, Associate Professor, Member of advisor committee
Laboratory of Applied Hydrobiology, Department of Animal Science, Agricultural University of Athens
3. V. Bakopoulos, Associate Professor, Member of advisor committee
Laboratory of Diseases of Aquatic Organisms, Department of Marine Sciences, University of Aegean

KARDITSA, JANUARY 2024

**Στην οικογένειά μου, και τους γονείς μου, που είναι πάντα
αρωγοί σε κάθε προσπάθειά μου...**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια καταγραφής και σύγκρισης αποτελεσμάτων που αφορούν την εποχιακή εμφάνιση και την θνησιμότητα που προκαλείται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το παράσιτο *Sparicotyle chrysophrii* στο εκτρεφόμενο είδος *Sparus aurata* σε δύο μονάδες εκτροφής στην περιοχή του Αστακού. Σημαντικό στοιχείο αποτελεί ότι οι καταγραφές αφορούν συνθήκες πραγματικής παραγωγικής διαδικασίας. Η εντατική χρήση θαλάσσιων κλωβών έχει αναμφίβολα συνδυαστεί με την επιταχυνόμενη αύξηση της παραγωγής εκτρεφόμενων ψαριών στην περιοχή της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Τα κρούσματα ασθενειών, όπως και στην δική μας μελέτη που αφορά την προσβολή της τσιπούρας από το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το *Sparicotyle chrysophrii*, θεωρούνται σημαντική απειλή για τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών.

Στο 1^ο κεφάλαιο η εργασία αναφέρεται στις ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα, τα κύρια εκτρεφόμενα είδη, και ειδικότερα στο είδος *Sparus aurata*. Γίνεται εκτενής αναφορά στη βιολογία του είδους, τα παθολογικά προβλήματα στην εκτροφή με ιδιαίτερη έμφαση στα δύο κύρια παθογόνα που μελετήθηκαν και τους τρόπους αντιμετώπισής τους. Στο 2^ο κεφάλαιο περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήσαμε για τις διαδικασίες ταυτοποίησης των νοσημάτων, την καταγραφή και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τα δεδομένα της παραγωγικής διαδικασίας ενός έτους που μελετήσαμε. Στο 3^ο κεφάλαιο παραθέτουμε τα αποτελέσματα των εργαστηριακών αναλύσεων και κυρίως την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων παραγωγής. Τέλος, στο 4^ο κεφάλαιο γίνεται η ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, καθώς και τα συμπεράσματα και οι προτάσεις που στηρίζονται στα ευρήματα της μελέτης αυτής.

ABSTRACT

This master thesis, is a first attempt to record and compare results regarding the seasonal appearance and mortality caused by the bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and the parasite *Sparicotyle chrysophrii* in farmed species *Sparus aurata* in two farms in Astakos region. An important fact is that the records concern the conditions of production process. The intensive use of sea cages has undoubtedly been combined with the accelerated growth of farmed fish production in the Mediterranean region, including Greece. The outbreaks of diseases, as in our own study concerning the infestation of sea bream by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Sparicotyle chrysophrii*, are considered a major threat to the aquaculture sector worldwide, as they affect fish growth, cause production reduction, increase costs and fish welfare problems. In the 1st chapter, the work refers to fish farming in Greece, the main farmed species, and particular the species *Sparus aurata*. An extensive reference is made to the biology of the species, the pathological problems in ongrowing farms with special emphasis on the two main pathogens studied and the ways to deal with them. The 2nd chapter describes the materials and methods we used for the disease identification procedures, the recording and processing of the results from the data of the production process of one year that we studied. In the 3rd chapter we list the results of the laboratory analyzes and mainly the statistical processing of the production data. Finally, in the 4th chapter there is an analysis of the results of our own research, as well as conclusions and proposals based on the findings of this study.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Γουρζιώτη Ευγενία, ερευνήτρια και επιβλέπουσα της εργασίας, για την καθοδήγησή της, τη συνεχή και αμέριστη βοήθεια της και την ηθική στήριξή της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Μπακόπουλο Βασίλειο., Αναπληρωτή Καθηγητή, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής και την κα. Μπιτχαβά Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Μέλος Συμβουλευτικής επιτροπής για την κριτική ανάγνωση του κειμένου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κολιό Παναγιώτη, τεχνικό διευθυντή της εταιρείας AVRAMAR A.E, για την έγκρισή του στην πρόσβαση των παραγωγικών δεδομένων της εταιρείας, καθώς και όλους τους συναδέλφους που συνεργάζομαι καθημερινά στις μονάδες εκτροφής του Αστακού. Θα ήταν παράλειψή μου, αν δεν ευχαριστούσα τον φίλο κ. Κλαουδάτο Δημήτρη, Επίκουρο Καθηγητή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη συνεισφορά του. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, και τους γονείς μου, που με στηρίζουν καθημερινά καθώς και για όσα έχουν κάνει για μένα μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο.....	7
1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1.1	Ιχθυοκαλλιέργειες – αναγκαιότητα (γενικά) και ειδικά στην Ελλάδα.....	7
1.2	ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΕΙΔΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ	12
1.2.1	Αλιεία και υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα, στην ΕΕ και παγκόσμια και η οικονομική τους διάσταση.....	12
1.2.2	Καλλιεργούμενα θαλάσσια είδη στην Ελλάδα. Στατιστικά στοιχεία ΕΛΟΠΥ 2021.....	18
1.3	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ.....	24
1.3.1	Ταξινόμηση, κατάταξη, βιολογία της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>).....	24
1.3.2	Ταξινόμηση της <i>Sparus aurata</i> (Russel et al., 2014; Schoch, et al., 2020)...	27
1.3.3	Μορφολογία και βιολογικά χαρακτηριστικά.....	27
1.3.4	Νοσήματα της τσιπούρας (<i>Sparus aurata</i>) και αιτιολογικοί παράγοντες.....	29
1.4	ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ΣΤΟ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟ ΕΙΔΟΣ <i>Sparus aurata</i>	32
1.4.1	Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά του <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> και subsp. <i>damsela</i>	32
1.5	ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ <i>Sparicotyle chrysophrii</i> ΚΑΙ Η ΝΟΣΟΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ <i>Sparus aurata</i>	46
1.5.1	Εισαγωγή. Παράσιτα	46
1.5.2	Μονογενή παράσιτα στα ψάρια.....	48
1.5.3	Ταξινόμηση και φυλογένεση του παράσιτου <i>Sparicotyle chrysophrii</i>	51
1.5.4	Επιδημιολογία. Διάγνωση.....	54
1.5.5	Πρόληψη και διαχείριση	58
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο	61
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	61
2.1.1	Σκοπός της δικής μας έρευνας.....	61
2.1.2	Δειγματοληψίες - Περιοχή δειγματοληψίας	61
2.1.3	Μακροσκοπική και Μικροσκοπική εξέταση	64
2.1.4	Βακτηριολογική εξέταση (βιοχημική ταυτοποίηση).....	64
2.1.5	Παρασιτολογική εξέταση	66

2.1.6	Ιστοπαθολογική εξέταση.....	67
2.1.7	Μοριακή ταυτοποίηση-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	68
2.1.8	Αντιβιόγραμμα.....	70
2.1.9	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	71
³	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	72
3.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
3.1.1	Μακροσκοπική και Μικροσκοπική εξέταση	72
3.1.2	Βακτηριολογική εξέταση	74
3.1.3	Παρασιτολογική εξέταση	76
3.1.4	Ιστοπαθολογική εξέταση.....	76
3.1.5	Μοριακή ταυτοποίηση- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	79
3.1.6	Αντιβιόγραμμα.....	80
3.1.7	Στατιστική ανάλυση.....	81
⁴	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	102
4.1	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	102
4.2	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	105
4.2.1	<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>	107
4.2.2	<i>Sparicotyle chrysophrii</i>	109
4.3	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ - ΣΥΝΕΧΙΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	113
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 Ιχθυοκαλλιέργειες – αναγκαιότητα (γενικά) και ειδικά στην Ελλάδα

1.1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Το 1984 άρχισε η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα. Στα πρώτα στατιστικά στοιχεία για το έτος 1984 καταγράφηκαν 400 τόνοι συνολικής παραγωγής. Παράλληλα όμως, εμφανίστηκαν και τα πρώτα διλήμματα αναφορικά με τις πιθανές επιπτώσεις στο φυσικό παράκτιο περιβάλλον, που οδήγησαν σε ακραίες συμπεριφορές και αντιδράσεις (π.χ. η πυρπόληση μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας στην Αιδηψό).

Αποφασιστικής σημασίας ήταν η έγκαιρη αναγνώριση του νεοφυσούς προβλήματος από το Υπουργείο Γεωργίας το οποίο επωμίστηκε την ευθύνη δημιουργίας των κατάλληλων συνθηκών για επενδύσεις στην υδατοκαλλιέργεια και συγχρόνως την προστασία των ευρωπαϊκών κονδυλίων που δίνονταν για αυτόν τον σκοπό (Βουλή των Ελλήνων, ΕΙΔΙΚΗ ΜΟΝΙΜΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, Γ4, 2018).

Οι χρηματοδοτημένες μελέτες και εκπονημένα έργα έως το 2000, με στόχο τη διερεύνηση της επίπτωσης της υδατοκαλλιέργειας στο θαλάσσιο περιβάλλον, στην Ελλάδα και στις χώρες της Ε.Ε. έδειξαν ότι δεν παρατηρείται σημαντική αρνητική επίπτωση που να είναι απαγορευτική η υδατοκαλλιέργεια (Βουλή των Ελλήνων, ΕΙΔΙΚΗ ΜΟΝΙΜΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, Γ4, 2018).

Ειδικότερα, για την περιοχή του Αστακού στην Αιτωλοακαρνανία, το 1995 πραγματοποιήθηκε έργο που αφορούσε στην επίδραση της ιχθυοκαλλιέργειας στο περιβάλλον. Αυτό που αποτυπώθηκε ήταν ότι υπήρχε συγκέντρωση πολλών οργανισμών (ψαριών) σε μικρό γεωγραφικό χώρο τα οποία σιτίζονταν με εξωγενή τροφή. Ωστόσο, οι μετρήσεις έδειξαν ότι η χημική ισορροπία του θαλάσσιου περιβάλλοντος δεν είχε διαταραχθεί αναφορικά με κάποιες συγκεκριμένες χημικές παραμέτρους που αφορούσαν στα αμμωνιακά νιτρώδη και στα νιτρικά άλατα. Τα θειώδη, τα οποία παρουσίαζαν κάποια διακύμανση, ήταν σε εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις και αυτό είναι ενδιαφέρουσα παράμετρος διότι τα θειώδη είναι δηλητήρια για τα ψάρια, καθώς είναι προϊόντα αναερόβιας αποικοδόμησης οργανικής

ύλης κάτω από τους κλωβούς. Η απόσταση της επίπτωσης της μονάδας σε σχέση με τις αναγνωρισμένες επιπτώσεις βρέθηκε ότι είναι έως 50 μέτρα γύρω από τους κλωβούς.

1.1.1.2 Διατροφική αξία ψαριών

Τα ψάρια περιέχουν πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας (Τριχοπούλου, 2004; <http://www.fao.org/infoods>; <http://nutrition.med.uoc.gr/GreekTables>). Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για να χρησιμοποιηθούν από τον οργανισμό (όπως και το λευκό και κόκκινο κρέας), έχοντας ως επιπλέον πλεονέκτημα τους την περιεκτικότητα σε πολύ λιγότερες ποσότητες λίπους και ακόμα λιγότερες κορεσμένου λίπους (Kafatos, et al., 2000; Καφάτος, και συν., 2001; Τζουβάρα – Καραγιάννη, 2000; <https://www.msc.org/>).

Το συνολικό ποσοστό του λίπους στα ψάρια διαφέρει ανάλογα με το είδος τους, την εποχή αλίευσης τους και τις συνθήκες διαβίωσης τους στη θάλασσα ή στο ιχθυοτροφείο. Τα άπαχα ψάρια, όπως π.χ γλώσσα, μπακαλιάρος, πέρκα, χριστόψαρο, γαλέος, φαγκρί, συναγρίδα, λαβράκι κ.ά., έχουν ολικό ποσοστό λίπους που κυμαίνεται από 0% έως 5% περίπου. Τα μέτρια λιπαρά και τα λιπαρά ψάρια, όπως τόνος, σολομός, σκουμπρί, κολιός, παλαμίδα, ξιφίας, κέφαλος, κουτσομούρα, έχουν αντίστοιχα ολικό ποσοστό λίπους που κυμαίνεται από 6% έως 20% λιπαρά. Το λίπος των ψαριών περιέχει κατά 25%-30% λιγότερα συνολικά κορεσμένα λιπαρά, σε σχέση με το κρέας. Τα κορεσμένα λιπαρά ευθύνονται για την αύξηση της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων που αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση και ανάπτυξη των καρδιαγγειακών παθήσεων λόγω της δημιουργίας αθηρωματικών (αθηρωσκληρωτικών) πλακών στις αρτηρίες (Frostegård, 2013; Ouimet, et al., 2019; Guijarro, et al., 2021; Duell, 2023).

Τα ψάρια αποτελούν εξαιρετική και κύρια πηγή ω-3 λιπαρών οξέων. Πρόκειται για λιπαρά οξέα που ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να συνθέσει μόνος του και πρέπει να τα λαμβάνει υποχρεωτικά μέσω της διατροφής του (Riccardi, et al., 2022; Lampsas, et al., 2023). Τα ω-3 λιπαρά οξέα συμβάλλουν στην πρόληψη της στεφανιαίας νόσου και των αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων, ενισχύουν το νευρικό σύστημα και υποστηρίζουν το αμυντικό σύστημα του οργανισμού (Abdelhamid, et al., 2018; Hu, et al., 2019; Watanabe & Tatsuno, 2020; Elagizi, et al., 2021). Τα ψάρια θαλάσσης τείνουν να έχουν περισσότερο ποσοστό λιπαρών οξέων στην σάρκα τους,

όταν αλιεύονται στην κατάλληλη ηλικία και όχι ως γόννοι, μόνο όμως από μη μολυσμένες θάλασσες καθώς το λίπος του ψαριού αποτελεί αποθήκη βαρέων μετάλλων, όπως ο υδράργυρος ή άλλων ουσιών, όπως οι διοξίνες, εξαιρετικά επιβλαβών για την υγεία του ανθρώπου (Bellassoued, et al., 2013; Lopes, et al., 2020; Boente-Juncal, et al., 2020).

Όλα τα ψάρια περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιταμίνης Α, ιώδιο, ασβέστιο, σελήνιο και βιταμίνη D (Alvheim, et al., 2020; Abdollahi, et al., 2021).

Σύμφωνα με την πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής, η κατανάλωση ψαριών εβδομαδιαία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 2-3 μερίδες ψαριών όλων των ειδών, εκ των οποίων οι μισές θα πρέπει να προέρχονται από λιπαρά ψάρια πλούσια σε ω3 λιπαρά οξέα (Τριχοπούλου, 2004; Τζουβάρα – Καραγιάννη, 2000). Τα 150 gr καθαρισμένου ψαριού αντιστοιχούν σε μία μικρομερίδα ψαριού (www.diaitologia.gr/diatrofiki-axia-psariou).

1.1.1.3 Θεσμικό πλαίσιο. Κοινοτικές οδηγίες

Το ευρωπαϊκό θεσμικό πλαίσιο είναι από τα αυστηρότερα παγκοσμίως, εν αντιθέσει με τα αντίστοιχα τρίτων χωρών από τις οποίες όμως εισάγεται στην ΕΕ για κατανάλωση το 70% των ψαριών (FAO statistics, 2022).

Ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας δεν έχει αξιοποιήσει πλήρως τις δυνατότητες ανάπτυξης του. Απαιτείται ένα νομικό πλαίσιο που να είναι εξορθολογισμένο, αξιόπιστο και σαφώς ελκυστικό για τις ευρωπαϊκές επιχειρήσεις. Συνεκτιμώντας τους τρεις πυλώνες: της οικονομικής, κοινωνικής και περιβαλλοντικής βιωσιμότητας θα μπορεί να ανταποκριθεί στις ολοένα αυξανόμενη ζήτηση για βρώσιμα θαλασσινά προϊόντα (European Parliament, Committee of Agriculture Development, 2022).

Η Ειδική Γραμματεία Υδάτων (ΕΓΥ) είναι το αρμόδιο όργανο για τη διαχείριση των εσωτερικών, των παράκτιων υδάτων, αλλά και για την εφαρμογή θαλάσσιας στρατηγικής για την καλή κατάσταση των θαλασσών.

Το σχέδιο δράσης της ΕΓΥ, βάσει της ευρωπαϊκής οδηγίας 2008/56 ή οποία έχει γίνει νόμος του ελληνικού κράτους, αφορά την αξιολόγηση των μετρήσεων του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., των φυσικοχημικών παραμέτρων για την ποιότητα, τη βιοποικιλότητα και οτιδήποτε άπτεται των οικοσυστημάτων. Βάσει της αποτίμησης της κατάστασης, ανά δετία λαμβάνονται μέτρα βελτίωσης με στόχο την καλή περιβαλλοντική κατάσταση (good environmental status) των θαλασσών.

Υπεύθυνη για την στρατηγική εφαρμογή της Οδηγίας 2008/56 είναι η Ειδική Γραμματεία Υδάτων και ακολουθούν οι περιφερειακοί τομείς και τα αρμόδια όργανα αδειοδοτήσεων, ενώ επιμέρους μέτρα έχουν εγκριθεί σε εθνικό επίπεδο. Σημειώνεται ότι υπάρχουν και σχετικές οδηγίες από την Ε.Ε που αφορούν τη λειτουργία μονάδων υδατοκαλλιέργειας στις περιοχές NATURA 2000 (Gantioler, et al., 2010; TEEB, 2010; European Commission, 2013).

Το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων έχει προβεί σε σειρά ενεργειών, όπως έκδοση υπουργικών αποφάσεων, τροποποίηση του νόμου για τις ομάδες παραγωγών ώστε να έχουν τη δυνατότητα οι υδατοκαλλιεργητές να συνεταιριστούν και να προωθήσουν το προϊόν στο εξωτερικό και να φτιάξουν brand name για το ελληνικό ψάρι υδατοκαλλιέργειας.

Αποτιμάται ότι το υπάρχον θεσμικό πλαίσιο είναι ολοκληρωμένο και απομένει η έκδοση υπουργικής απόφασης που να ρυθμίζει τις κενές θέσεις που θα προκύψουν από τη δημιουργία των Περιοχών Οργανωμένης Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (Π.Ο.Α.Υ.).

Τέλος, το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, σχεδιάζει την ολοκλήρωση της αξιολόγησης του πολυετούς και την σύνταξη του Εθνικού Προγράμματος Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (Ε.Π.Α.Υ.) και την ενεργοποίηση του Εθνικού Συστήματος Διαπίστευσης (Ε.Σ.Υ.Δ) που θα εγκρίνει την Ε.Π.Α.Υ.

Τα προϊόντα ιχθυοκαλλιεργειών και υδατοκαλλιεργειών πρέπει να πληρούν τις διεθνείς απαιτήσεις προτύπων συστημάτων διαχείρισης ποιότητας για την ιχθυλασιμότητα [HACCP/GHP/Codex Alimentarius, ISO9001:2008; ISO22000:2008] και την ασφάλεια [ISO22000:2005GR, ISO9001:2015GR] (International Organization for Standardization, 1947; <http://www.who.int/en/>).

1.1.1.4 Ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο παραγωγής τροφίμων, με μέσο ετήσιο ρυθμό άνω του 6,2% (FAO, 2012). Ο κλάδος των Μεσογειακών ιχθυοκαλλιεργειών και ευρυάλιων ιχθύων συγκαταλέγεται στους δυναμικότερους τομείς της πρωτογενούς παραγωγής στην Ελλάδα, καθιστώντας την χώρα μας 6η σε σειρά παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιέργειας στην Ευρώπη και 1η στην παραγωγή θαλάσσιων ειδών, κυρίως τσιπούρα και λαβράκι, κατακτώντας ηγετική θέση τόσο μεταξύ των χωρών της Ε.Ε., όσο και παγκοσμίως, έχοντας το 50% της

ευρωπαϊκής παραγωγής (Συμπόσιο Ιχθυοκαλλιέργειας, Ελλάδα, 2020; ΕΛΟΠΥ, 2022; FAO, 2022; FEAP, 2020). Ο ετήσιος τζίρος για το 2022 είναι περίπου στα 700 εκατ. ευρώ, με το 80% να αφορά τις εξαγωγές, ενώ για την επόμενη πενταετία ο τζίρος θα ξεπεράσει το 1 δισ. ευρώ (ΕΛΟΠΥ, 2022; Χριστιάνα Καλογήρου γενική γραμματέας Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων του υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης στο Συμπόσιο Ιχθυοκαλλιέργειας 2022 που πραγματοποιήθηκε από το Πανεπιστήμιο Πατρών).

Στους στρατηγικούς στόχους της ελληνικής κυβέρνησης είναι η ανάπτυξη 3% έως το 2025 και μακροπρόθεσμα μέχρι το 2030 να αυξηθεί στο 5%, με ταυτόχρονη αύξηση νέων θέσεων εργασίας, καθώς και η ολοκλήρωση εφαρμογής του Χωροταξικού Σχεδιασμού, μέσω της αξιοποίησης 88,8 εκατ. ευρώ του ΠΑΛΥΘ 2021-2027 και 34,4 εκατ. ευρώ από το Ταμείο Ανάπτυξης (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων (FAO) εκτιμά ότι η παγκόσμια ζήτηση για αλιευτικά προϊόντα βαίνει διαρκώς αυξανόμενη και οι ετήσιες ανάγκες για αλιεύματα αυξάνονται με ρυθμό 3,2% (FAO, 2022).

Σήμερα στην Ελλάδα, το 80% της παραγωγής των περίπου 300 εταιρειών του κλάδου ιχθυοκαλλιέργειας εξάγεται σε χώρες της Ε.Ε και στις ΗΠΑ και ισοδυναμεί σε 450 εκατομμύρια καταναλωτές (FAO statistics, 2022). Είναι ενδεικτικό ότι τον Ιανουάριο 2022 οι εξαγωγές αυξήθηκαν κατά 34% σε σύγκριση με το 2021, καθιστώντας την ιχθυοκαλλιέργεια στην πρώτη θέση της ζωικής παραγωγής που κατευθύνεται στο εξωτερικό (www.megaron.gr/15-16-apriliou-2022-sunedrio-ichthuokalliergeias-2022).

Στόχος είναι η επίτευξη του χαμηλού οικολογικού αποτυπώματος των ιχθυοκαλλιεργειών, με σκοπό την ανάπτυξη της «γαλάζιας οικονομίας» και τη μετάβαση στα λεγόμενα «βιώσιμα διατροφικά συστήματα» (FAO, 2018; FAO, 2020a; FAO, 2022).

1.1.1.5 Στόχοι και προκλήσεις έως το 2030

Ο FAO σε έγγραφο του περιγράφει έναν οδικό χάρτη για τον μετασχηματισμό των υδάτινων συστημάτων διατροφής που τον ονομάζει "Γαλάζιο μετασχηματισμό", παρέχοντας μια πυξίδα για το έργο σχετικά με τα υδάτινα συστήματα διατροφής με χρονικό ορίζοντα το 2022-2030. Ο εν λόγω οδικός χάρτης για τον «Γαλάζιο μετασχηματισμό» ευθυγραμμίζεται με τη Διακήρυξη του 2021 για τη βιώσιμη αλιεία

και υδατοκαλλιέργεια της Επιτροπής Αλιείας (COFI) του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και το Στρατηγικό Πλαίσιο του FAO 2022-2031. Επικεντρώνεται στα στοιχεία που θα μεγιστοποιήσουν την συμβολή των υδάτινων συστημάτων διατροφής στους στόχους βιώσιμης ανάπτυξης (ΣΒΑ).

Ο οδικός χάρτης πορείας για τον "Γαλάζιο μετασχηματισμό" (FAO) αναγνωρίζει την σημασία των υδάτινων συστημάτων διατροφής ως μοχλών για την απασχόληση, την οικονομική ανάπτυξη, την κοινωνική ανάπτυξη και την περιβαλλοντική ανάκαμψη, τα οποία στηρίζουν τους ΣΒΑ. Αναγνωρίζει επίσης την ανάγκη υποστήριξης της Ατζέντας 2030 μέσω του μετασχηματισμού σε πιο αποτελεσματικά, χωρίς αποκλεισμούς, ανθεκτικά και βιώσιμα υδατικά συστήματα τροφίμων για καλύτερη παραγωγή, καλύτερη διατροφή, καλύτερο περιβάλλον και καλύτερη ζωή, χωρίς να μείνει πίσω κανείς (FAO, 2018; FAO. 2020a; FAO, 2022).

Για την οικονομία Ελλάδας, που ως χώρα διαθέτει 15.000 χιλιόμετρα ακτογραμμής, παρέχεται το πλεονέκτημα να έχει κυρίαρχο ρόλο στη Μεσόγειο και να μπορεί να μετατραπεί σε κύριο ευρωπαϊκό πυλώνα για την ανάπτυξη της «γαλάζιας οικονομίας», αποτελώντας εθνική προτεραιότητα η ανάπτυξη του κλάδου ιχθυοκαλλιέργειας.

1.2 ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΕΙΔΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ

1.2.1 Αλιεία και υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα, στην ΕΕ και παγκόσμια και η οικονομική τους διάσταση

Στην μακραίωνη ιστορία της ανθρώπινης ζωής, σημαντικός παράμετρος στη διατροφή του ανθρώπου κατέχει η αλιεία ως τομέας δραστηριότητας της επιβίωσης του (Στεργίου & Τσίκληρας, 2015).

Η αλιεία είναι κλάδος της οικονομίας, ιδιαίτερα σύνθετος. Τα αλιεύματα δεν αποτελούν κατ' αποκλειστικότητα προϊόντα αλίευσης, αλλά γενικότερα θεωρούνται προϊόντα προερχόμενα από το υδάτινο περιβάλλον (θαλασσινό ή γλυκό νερό).

Αυξανόμενος διαχρονικά ο παγκόσμιος πληθυσμός, αυξήθηκαν και οι ανάγκες κάλυψης των διατροφικών αναγκών, που σηματοδότησαν την ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών έχοντας ως χρήσιμο εργαλείο την αναπτυσσόμενη τεχνολογία.

Η υδατοκαλλιέργεια κατά FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) είναι «η εκτροφή σε φυσικό ή ελεγχόμενο θαλάσσιο περιβάλλον ή εσωτερικά ύδατα». Πλέον, οι υδατοκαλλιέργειες που αποτελούν βασική παραγωγική πηγή αλιευμάτων, είναι ένας ταχύτατα αναπτυσσόμενος κλάδος από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 (FAO, 2019).

Σε παγκόσμιο, ευρωπαϊκό και ελληνικό επίπεδο, ο τομέας της αλιείας και της υδατοκαλλιέργειας αποτελούν σημαντικούς τομείς οικονομίας, ενώ ειδικότερα για την Ελλάδα ο κλάδος αυτός της πρωτογενούς παραγωγής συμβάλλει θεαματικά στο ΑΕΠ της χώρας και στην εθνική οικονομία γενικότερα (Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Αλιείας Και Θάλασσας 2014 – 2020), σχήμα 1.1.

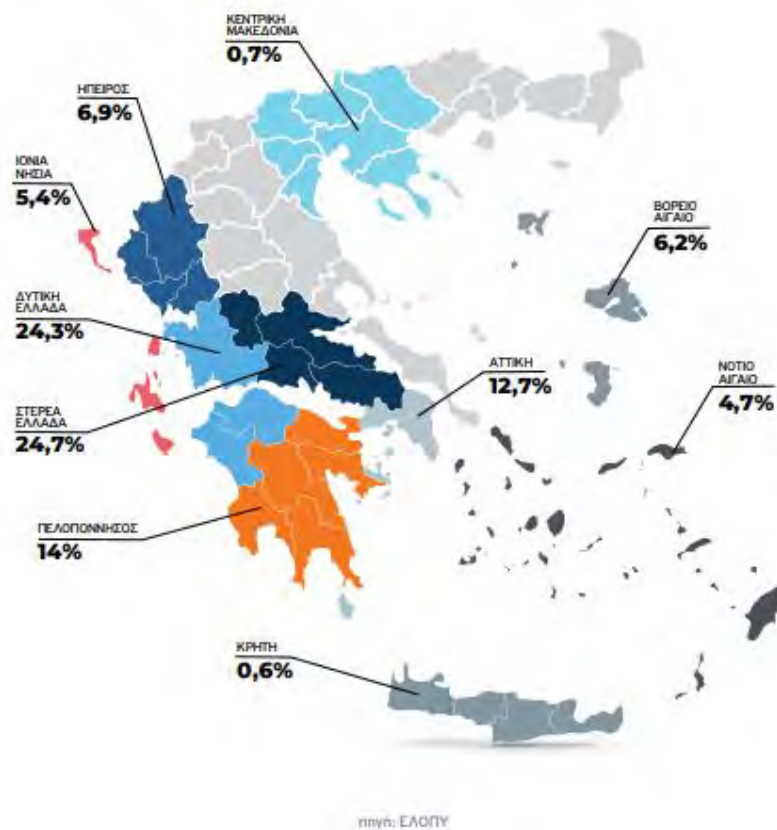
Η ανάπτυξη τόσο της αλιείας, όσο και των υδατοκαλλιεργειών, ως κλάδοι της ελληνικής οικονομίας ταχέως αναπτυσσόμενοι, εδράζονται στη γεωμορφολογική ιδιαιτερότητα της Ελλάδας, η οποία παρέχει τη δυνατότητα επιχειρηματικών δραστηριοτήτων με τη μορφή μονάδων υδατοκαλλιέργειας, αλλά και την ανάπτυξη παράκτιας αλιείας. Η Ελλάδα έχει τη μεγαλύτερη ακτογραμμή της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με συνολικό μήκος 15.000 χιλιόμετρα, ενώ το 19-20% της συνολικής έκτασης της χώρας είναι νησιωτικό, τα περισσότερα και μεγαλύτερα αστικά κέντρα είναι παράκτια συγκεντρώνοντας το 90% του πληθυσμού κατά μήκος της ακτογραμμής, διαθέτει πάνω από 40 λίμνες που καλύπτουν το 0,5% της συνολικής έκτασης της χώρας (Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Αλιείας Και Θάλασσας 2014 - 2020).

Σχήμα 1.1. Παραγωγή αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα.



Με βάση την ετήσια έκθεση του ΕΛΟΠΥ (2021), παραθέτονται τα στοιχεία όπου: το 2019 η συνολική παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανήλθε στους 151.372 τόνους αξίας 589,05 εκατ. ευρώ, παρουσιάζοντας αύξηση 3,9% ως προς τον όγκο και οριακή μείωση 0,2% ως προς την αξία παραγωγής σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Το 61% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια και το 39% από την αλιεία.

Ο κλάδος δημιουργεί 12.000 θέσεις άμεσης και έμμεσης εργασίας, κυρίως σε παράκτιες ή απομακρυσμένες περιοχές, εικόνα 1.1.



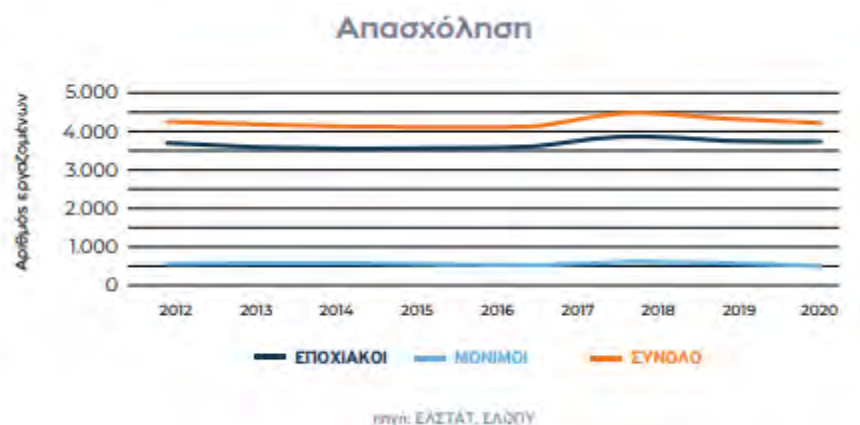
Εικόνα 1.1. Κατανομή θέσεων εργασίας ιχθυοκαλλιέργειας ανά περιφέρεια.

Στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας, στην Ελλάδα καταγράφεται ένα από τα υψηλότερα ποσοστά απασχόλησης επί του συνόλου των απασχολούμενων στην Ε.Ε. Στο γενικό σύνολο (μόνιμο και έκτακτο προσωπικό), ο αριθμός των εργαζομένων ανήλθε το 2019 σε 4.160 άτομα. Σε σχέση με το 2018, παρουσιάζεται μείωση 3% (4.287 εργαζόμενοι) που οφείλεται κυρίως στην περιορισμένη πρόσληψη έκτακτου προσωπικού λόγω της υγειονομικής κρίσης συνεπεία της COVID-19 πανδημίας. Εκτιμάται ότι, η θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια (ψάρια και μύδια) δημιουργεί το 84% των άμεσων θέσεων απασχόλησης, η καλλιέργεια σε υφάλμυρα νερά το 6%, ενώ η καλλιέργεια εσωτερικών υδάτων το 10%. Υπολογίζοντας δε και τις έμμεσες θέσεις απασχόλησης που δημιουργούνται από τις συνοδευτικές – υποστηρικτικές υπηρεσίες του κλάδου (παρασκευαστήρια ιχθυοτροφών, εξοπλισμός, ιχθυοκιβώτια, μεταφορές, κλπ), τότε εκτιμάται ότι συνολικά άμεσα και έμμεσα περίπου 12.000 εργαζόμενοι διαφόρων ειδικοτήτων απασχολούνται (επιστημονικό, τεχνικό και εργατικό προσωπικό), πίνακας 1.1, σχήμα 1.2.

Πίνακας 1.1. Θέσεις εργασίας στην υδατοκαλλιέργεια.



Σχήμα 1.2. Κατανομή προσωπικού απασχολούμενου στις υδατοκαλλιέργειες.



Τα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας και τα μύδια, αποτελούν τα κύρια είδη εκτροφής αντιπροσωπεύοντας το 84% και το 16% αντίστοιχα της συνολικής παραγωγής.

Το 2020 η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 117.000 τόνους αξίας 546,26 εκατ. ευρώ, παρουσιάζοντας μείωση 2,9% ως προς τον όγκο και οριακή αύξηση 0,1% ως προς την αξία πωλήσεων σε σχέση με το προηγούμενο έτος.

Οι εξαγωγές ελληνικής τσιπούρας και λαβρακιού το 2020 ανήλθαν σε 91.841 τόνους, παρουσιάζοντας αύξηση 5,6% σε σχέση με το προηγούμενο έτος, κατατάσσοντας την ιχθυοκαλλιέργεια στον πρώτο εξαγωγικό κλάδο ζωικής παραγωγής της χώρας.

Το 2021 εκτιμάται πως η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού θα ανακάμψει και θα επανέλθει στα επίπεδα προ της υγειονομικής κρίσης, δηλαδή στους 120.000 τόνους. Ειδικότερα για την υδατοκαλλιέργεια στην Ε.Ε., η ετήσια έκθεση του ΕΛΟΠΥ (2021), αναφέρει ότι:

Το 2019 παρήχθησαν στην Ε.Ε. 1,141 εκατ. τόνοι προϊόντων αξίας 3,24 δισ. ευρώ.

Η κατανάλωση αλιευτικών προϊόντων στην Ε.Ε. καλύπτεται κατά 23,5% από την εγχώρια παραγωγή και κατά 76,5 από εισαγωγές από τρίτες χώρες.

Τα όστρακα (604.333 τόνοι) και τα ψάρια (535.788 τόνοι) αποτελούν το 53% και το 46,9% της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε.

Η Ελλάδα κατατάσσεται στην 3η θέση ως προς την αξία και στην 4η θέση ως προς τον όγκο παραγωγής υδατοκαλλιέργειας την Ε.Ε.-27 το 2019.

Η Ελλάδα αντιπροσωπεύει το 61% της παραγωγής τσιπούρας και λαβρακιού στην Ε.Ε. το 2020.

Τέλος, αναφορικά με την υδατοκαλλιέργεια σε διεθνές επίπεδο, η ετήσια έκθεση του ΕΛΟΠΥ (2021), αναφέρει ότι:

Το 2019 η προσφορά αλιευτικών προϊόντων ανήλθε σε 213,69 εκατ. τόνους αξίας 291,69 δισ. ευρώ.

Η υδατοκαλλιέργεια παρέχει ήδη περισσότερα αλιευτικά προϊόντα (56%) στην ανθρωπότητα από ότι η ελεύθερη αλιεία (44%).

Η συνολική παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας ανήλθε το 2019 στους 120,9 εκατ. τόνους αξίας 219,69 δισ. ευρώ.

Στην Ασία παράγεται σχεδόν το 92% του όγκου των παραγόμενων προϊόντων υδατοκαλλιέργειας (105,07 εκατ. τόνοι).

Τα ψάρια υδατοκαλλιέργειας αποτέλεσαν το 2019 σχεδόν το 47,4% της παγκόσμιας παραγωγής (68,43 εκατ. τόνοι).

Η μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια το 2020 ανήλθε σε 465.644 τόνους (253.621 τόνοι τσιπούρας, 212.023 τόνοι λαβρακιού), παρουσιάζοντας μείωση -2,5% σε σχέση με το 2019.

Η Ελλάδα βρίσκεται στις δύο πρώτες χώρες παραγωγής ψαριών μεσογειακής υδατοκαλλιέργειας, αντιπροσωπεύοντας το 25% της παραγωγής τους διεθνώς.

1.2.2 Καλλιεργούμενα θαλάσσια είδη στην Ελλάδα. Στατιστικά στοιχεία ΕΛΟΠΥ 2021

Στην Ελλάδα εκτρέφονται θαλάσσιοι μεσογειακοί ιχθύες, κυρίως τσιπούρα και λαβράκι και σε ένα μικρότερο ποσοστό άλλα μεσογειακά είδη («νέα είδη») (π.χ. φαγκρί, μυτάκι, κρانيός, συναγρίδα, κ.ά).

Η εκτροφή ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας είναι μια παραγωγική διαδικασία που αντιγράφει τους μηχανισμούς της φύσης. Διαρκεί περίπου 16-18 μήνες έως ότου το ψάρι φτάσει το επιθυμητό εμπορικό μέγεθος των 400g και απαιτεί επιστημονική κατάρτιση και εξειδικευμένη τεχνογνωσία.

Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια γνώρισε ραγδαία ανάπτυξη τη δεκαετία του '80 με τη χρήση πλωτών ιχθυοκλωβών, μιας μεθόδου που χρησιμοποιούνταν ευρέως στη Νορβηγία για την εκτροφή σολομού. Το 1985 υπήρχαν 12 μονάδες με συνολική παραγωγή περίπου 100 τόνους, ενώ σήμερα υπάρχουν 280 μονάδες με παραγωγή που ξεπερνάει τους 110.000 τόνους (πίνακας 1.2.).

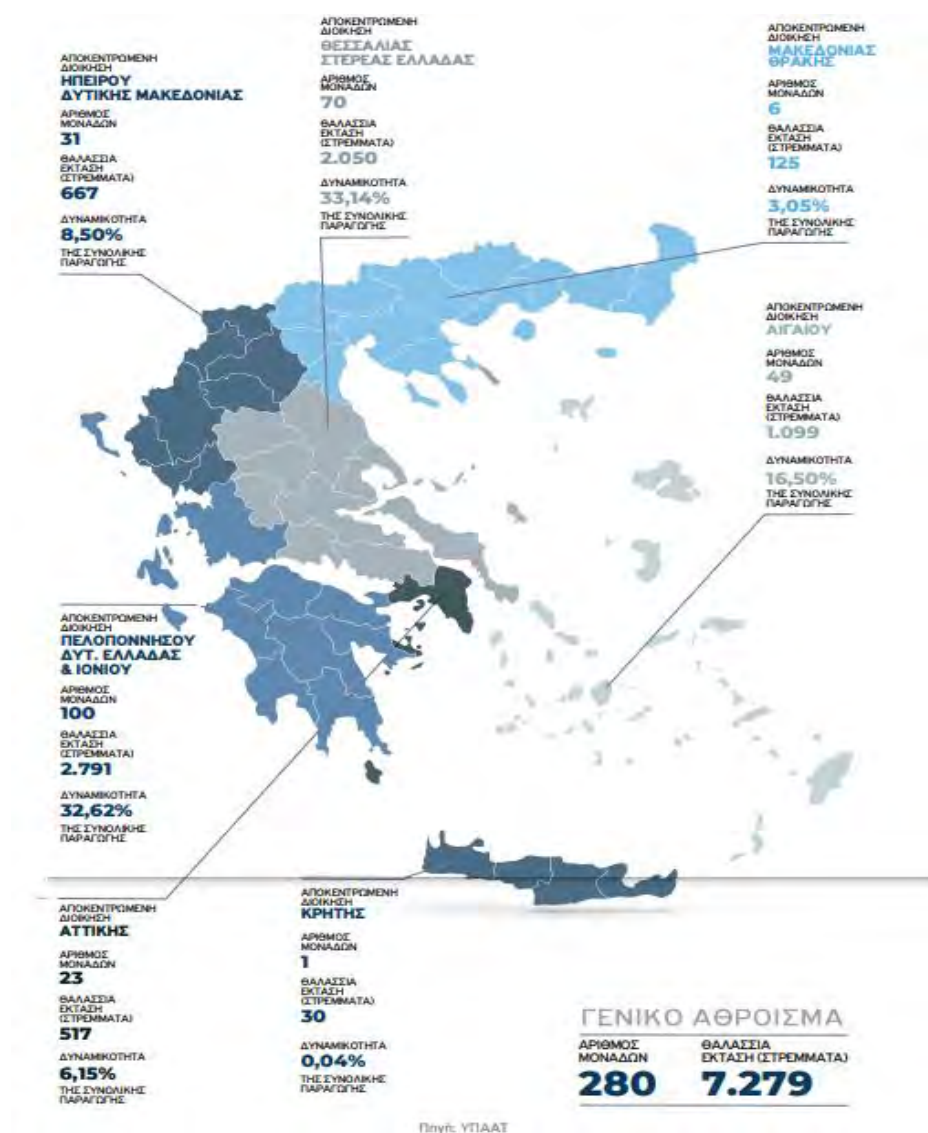
Πίνακας 1.2. Παραγωγή υδατοκαλλιέργειας το 2019 στην Ελλάδα.(ΕΛΟΠΥ 2021)

	ΑΡΙΘΜ. ΜΟΝΑΔΩΝ	ΟΓΚΟΣ (ΤΟΝΟΙ)	ΑΞΙΑ (ΕΚ. ΕΥΡΩ)
Α. ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΝΕΡΑ (ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΣΕ ΧΕΡΣΙΑΙΕΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ)			
Πέστροφα	61	1.900	6,27 €
Κυπρίνος	7	7	0,02 €
Σολομός	2	2	0,02 €
Χέλια	3	146	1,22 €
Γαρίδοκαλλιέργειες	1	0	0,00 €
Λοιπά είδη (κέφαλοι, τίλιapia κλπ)	13	242	1,61 €
ΣΥΝΟΛΟ Α	87	2.298	9,13 €
Β. ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΝΕΡΑ (ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΣΕ ΠΛΩΤΕΣ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ)			
Τσιπούρα & λαβράκι	280	120.500	570,36 €
Λοιπά μεσογειακά είδη		4.940	
Οστρακοκαλλιέργειες (κυρίως μύδια)	460	23.634	9,56 €
ΣΥΝΟΛΟ Β	740	149.074	579,92 €
ΣΥΝΟΛΟ Α+Β	827	151.372	589,05 €
Γ. ΛΙΜΝΟΘΑΛΑΣΣΕΙΣ (ΕΚΜΕΤΑΛΛΕΥΣΗ ΚΥΡΙΩΣ ΑΠΟ ΑΛΙΕΥΤΙΚΟΥΣ ΣΥΛΛΟΓΟΥΣ)			
Ευρύαλα είδη (τσιπούρα, λαβράκι, κέφαλοι κλπ)	72	660	1,98 €
ΣΥΝΟΛΟ Γ	72	660	1,98 €
Δ. ΙΧΘΥΟΓΕΝΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΑΘΜΟΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΙΧΘΥΩΝ (Θ.Μ.Ι.)			
	Αριθμ. Σταθμών	Παραγ. εκ. ιχθύδια	αξία (εκ. ευρώ)
Τσιπούρα & λαβράκι	24	411,4	86,3 €
Λοιπά είδη Θ.Μ.Ι.		21,5	
ΣΥΝΟΛΟ Δ	24	432,9	86,3 €

Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΕΛΟΠΥ

Αναλυτικότερα και σύμφωνα με την κατηγορία εκτροφής υπάρχουν, (εικόνα 1.2, ΕΛΟΠΥ 2021):

- 280 μονάδες θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας όπου εκτρέφονται κυρίως τσιπούρα και λαβράκι.
- 460 μονάδες οστρακοκαλλιέργειας.
- 87 μονάδες εσωτερικών υδάτων όπου εκτρέφονται πέστροφες, κυπρίνοι, χέλια κλπ.
- 72 εκμεταλλεύσεις σε υφάλμυρα νερά.
- 24 ιχθυογεννητικοί σταθμοί μεσογειακών ιχθύων (τσιπούρας, λαβρακιού και λοιπών μεσογειακών ειδών).



Εικόνα 1.2. Γεωγραφική κατανομή των εκμεταλλεύσεων θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας (ΕΛΟΠΥ 2021).

Η εκτροφή ψαριών σε θαλάσσια και εσωτερικά ύδατα, ανήλθε το 2019 συνολικά σε 127.738 τόνους αξίας 553,42 εκατ. ευρώ (δεν περιλαμβάνονται οι εκμεταλλεύσεις σε λιμνοθάλασσες), αντιπροσωπεύοντας το 84% του όγκου και το 98% της αξίας της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας της χώρας.

Η παραγωγή οστρακοειδών, ανήλθε το 2019 στους 23.634 τόνους αξίας 9,56 εκατ. ευρώ και αντιπροσωπεύει το 16% του όγκου και μόλις το 2% της συνολικής ελληνικής παραγωγής. Από τους 127.738 τόνους εκτρεφόμενων ψαριών το 98,2% προέρχεται από τη θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια και μόλις το 1,8% από την ιχθυοκαλλιέργεια εσωτερικών υδάτων.

Συγκεκριμένα, το 2020 τα ψάρια κατατάχθηκαν στην 3η θέση ως προς την αξία εξαγωγών, μετά τα φρούτα/λαχανικά και τα γαλακτοκομικά και στην 10η θέση ως προς τον όγκο των εξαγωγών αγροτικών προϊόντων. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση της ΕΛΣΤΑΤ και του ΥΠΑΑΤ για την κατηγορία «ψάρια και παρασκευάσματα αυτών», το 2020: Ο συνολικός όγκος των εξαγωγών ανήλθε σε 147.925 τόνους αξίας 728,39 εκατ. ευρώ, εκ των οποίων το 62% του όγκου και της αξίας ήταν εξαγωγές ελληνικής τσιπούρας και λαβρακιού ιχθυοτροφείου (91.841 τόνοι αξίας 456.357 εκατ. ευρώ). Ο συνολικός όγκος εισαγωγών ανήλθε σε 96.944 τόνους αξίας 422.234 εκατ. ευρώ εκ των οποίων το 37% (του όγκου) προήλθε από χώρες της Ε.Ε. και το 43% από τρίτες χώρες. Η καθαρή συμμετοχή αυτής της κατηγορίας στο ΑΕΠ το 2020 ήταν 306.152 εκατ. ευρώ, αντιπροσωπεύοντας το 10,17% της αξίας του συνόλου των αγροτικών εξαγωγών της χώρας.

Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια μεσογειακών ιχθύων αποτελεί εδώ και 40 χρόνια την πιο σημαντική δραστηριότητα υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα. Το 2020 αντιπροσώπευσε το 83,8% του όγκου και το 97% της αξίας της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας της χώρας.

Τα κύρια είδη που εκτρέφονται είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελώντας περίπου το 96% των πωλήσεων, ενώ σε πολύ μικρότερες ποσότητες, περίπου 4%, εκτρέφονται όλα τα υπόλοιπα μεσογειακά είδη, όπως το φαγκρί (*Pagrus major*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), ο κρانيός (*Argyrosomus regius*), το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) η συναγρίδα (*Dentex dentex*), κ.ά. Από το 1981 που δημιουργήθηκαν οι πρώτες πειραματικές μονάδες, ο κλάδος έφτασε να κατέχει την 1η θέση σε ευρωπαϊκό επίπεδο και τη 2η θέση σε διεθνές, στην εκτροφή μεσογειακών ιχθύων. Η παραγωγή κυμαίνεται μεταξύ 110.000- 120.000 τόνων ετησίως, συμβάλλοντας στην κοινωνική και οικονομική ανάπτυξη των τοπικών

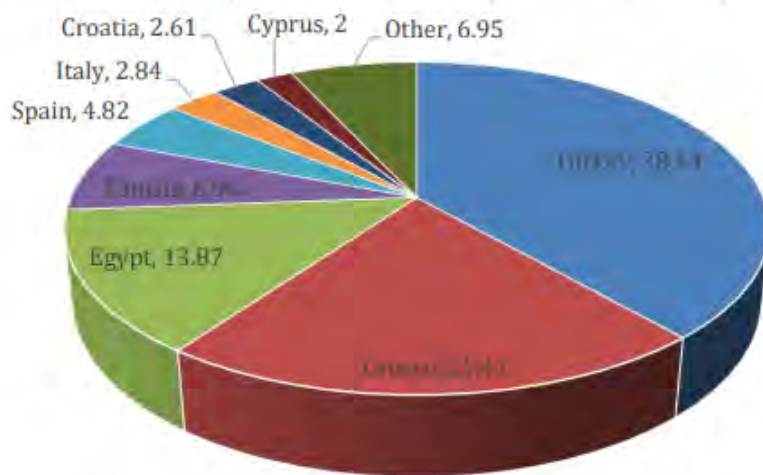
κοινωνιών και στην προσφορά τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα (σχήμα 1.3).

Σχήμα 1.3. Κύρια είδη ιχθυοκαλλιέργειας.



Πίνακας 1.3. Κατάταξη των δέκα κυριότερων χωρών της Μεσογείου στην παραγωγή τσιπούρας το 2019.

Country	Production (Tonnes)	Share of global production (%)	Estimated ¹ production by numbers (millions)
Turkey	99,730	38.54	50 - 399
Greece	55,452	21.43	28 - 222
Egypt	35,880	13.87	18 - 144
Tunisia	18,017	6.96	9 - 72
Spain	12,475	4.82	6 - 50
Italy	7,350	2.84	4 - 29
Croatia	6,750	2.61	3 - 27
Cyprus	5,168	2	3 - 21
Israel	2,950	1.14	1 - 12
Albania	2,450	0.95	1 - 10



Πηγή: Food Business, 2021

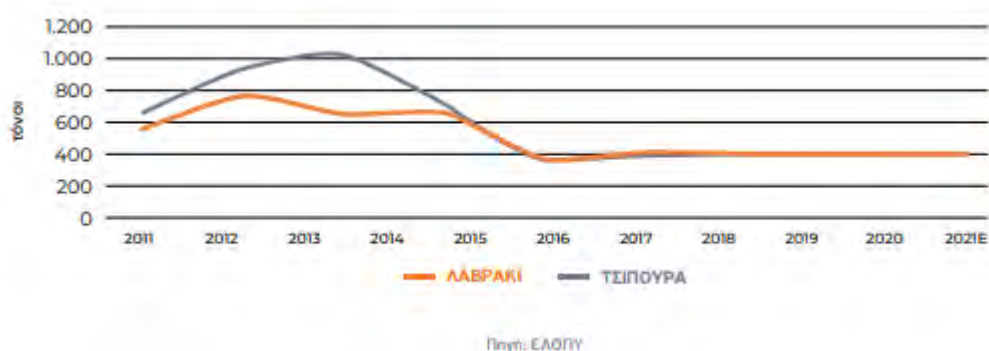
Πίνακας 1.4. Κατάταξη των χωρών της ΕΕ στην παραγωγή τσιπούρας.

Country	Production (Tonnes)	Share of EU production (%)	Estimated ² production by numbers (millions)
Greece	55,452	59.22	28 - 222
Spain	12,475	13.32	6 - 50
Italy	7,350	7.85	4 - 29
Croatia	6,750	7.21	3 - 27
Cyprus	5,168	5.52	3 - 21
France	2,344	2.5	1 - 9
Portugal	2,316	2.47	1 - 9
Malta	1,783	1.9	1 - 7

Πηγή: Food Business, 2021

Στο πλαίσιο της στρατηγικής Farm to Fork, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή στοχεύει στην αύξηση της παραγωγής τροφίμων που προέρχονται από τη βιολογική υδατοκαλλιέργεια. Στην Ελλάδα υπάρχουν 2 πιστοποιημένες μονάδες που ανήκουν σε 2 εταιρείες ιχθυοκαλλιέργειας που παράγουν αθροιστικά 400 τόνους τσιπούρας και άλλους 400 τόνους λαβρακιού. Και το 2020 η παραγωγή βιολογικής ιχθυοκαλλιέργειας διατηρήθηκε στους 800 τόνους, αντιπροσωπεύοντας μόλις το 0,7% της συνολικής παραγωγής αυτών των δύο ειδών, σχήμα 1.4.

Σχήμα 1.4. Παραγωγή βιολογικής τσιπούρας και λαβρακιού.



Στα πλαίσια παραγωγής λοιπών μεσογειακών ειδών θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας, τα τελευταία χρόνια γίνεται μια σημαντική προσπάθεια διαφοροποίησης των εκτρεφόμενων ειδών στα οποία συμπεριλαμβάνονται ο κρانيός (*Argyrosomus regius*), το φαγκρί (*Pagrus major*), το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) και το μυτάκι (*Diplodus*

puntazzo). Το 2020 παρήχθησαν συνολικά 5.100 τόνοι «νέων ειδών», παρουσιάζοντας αύξηση 19% σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Τα νέα είδη αντιπροσωπεύουν μόλις το 4% του όγκου παραγωγής θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας και η παραγωγή τους αυξάνεται διαρκώς λόγω της αυξανόμενης ζήτησής τους στην εγχώρια και στις ευρωπαϊκές αγορές, αλλά και λόγω της διαρκούς βελτίωσης της τεχνογνωσίας εκτροφής αυτών των ειδών, (σχήμα 1.5).

Σχήμα 1.5. Παραγωγή νέων ειδών.



1.3 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΚΤΡΟΦΗΣ

1.3.1 Ταξινόμηση, κατάταξη, βιολογία της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα, ονομασθείσα από τον Carolus Linnaeus (1758) *Sparus aurata*, και από τον Houttuyn (1782) *Sparus auratus*, ανήκει στο γένος *Sparus* της οικογένειας των *Sparidae*, σχήμα 1.6 (Lablack, et al., 2022). Είναι ένα ή και το πρώτο από τα θαλάσσια είδη των ιχθύων της Μεσογείου στα οποία έχει εφαρμοσθεί επιτυχώς εντατική ελεγχόμενη μαζική εκτροφή. Η έναρξη της εκτροφής ανάγεται στις αρχές της δεκαετίας του 1980, οπότε και ξεκίνησε από την Ιταλία, τη Γαλλία και την Ισπανία.

Η τσιπούρα είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος ιχθύος, με προτίμηση σε αλατότητα υδάτων 40 ppt (25-40) και σπανιότατα σε αλατότητα <15 ppt, με ελάχιστη ανεκτή τιμή διαλυμένου οξυγόνου τα 4mg/L (βέλτιστη τα 8mg/L), σε θερμοκρασία 14-28°C και βέλτιστη ανάπτυξη στους 25°-26°C (Χώτος & Ρογδάκης, 1992; Kibenge, 2022). Η τσιπούρα διαβιεί σε παράκτιες περιοχές της υποτροπικής ζώνης (βενθοπελαγικό είδος), σε λιβάδια ποσειδωνίας και προτιμά αμμόδεις ή φυκώδεις πυθμένες, σε βάθη από 5-30m τα νεαρά άτομα και έως 150m τα ενήλικα. Η παρουσία της τσιπούρας θεωρείται

περιορισμένη στη Μαύρη θάλασσα και διαφοροποιείται ο αριθμός της στις νότιες ακτές των Βρετανικών νησιών, καθώς και στις δυτικές ακτές της Ευρώπης, της Β. Αφρικής (κόλπος της Γουινέας) και στις ακτές των Καναρίων νήσων.

Είναι σαρκοφάγο και αρπακτικό ψάρι και τρέφεται κυρίως με τα ασπόνδυλα του πυθμένα (Νεοφύτου, 2007). Το βάρος της τσιπούρας κυμαίνεται συνήθως από 400-600gr, που όμως υπάρχουν αναφορές κατά τις οποίες το μέγιστο βάρος έχει βρεθεί να είναι 16-18 kgr. Το μήκος της είναι $\approx$ 60-70 cm και ζει 10-15 έτη.

Αναπαράγεται τους χειμερινούς μήνες στην ανοικτή θάλασσα προς την οποία μεταναστεύει αφήνοντας τις λιμνοθάλασσες. Κατά την περίοδο της αναπαραγωγής, οι ενήλικες τσιπούρες συγκροτούν αγέλες που απαριθμούν πολλές εκατοντάδες.

Η τσιπούρα αποτελεί το εμπορικότερο είδος των λιμνοθαλασσών με τη μεγαλύτερη αξία. Το εμπορεύσιμο μέγεθος των 250-350gr αποκτάται συνήθως το δεύτερο έτος της ζωής του (Χώτος & Ρογδάκης, 1992; Hossain, 2010).

1.3.2 Ταξινόμηση της *Sparus aurata* (Russel et al., 2014; Schoch, et al., 2020).

Η συστηματική κατάταξη της *Sparus aurata* έχει ως εξής (Russel et al., 2014; Schoch, et al., 2020)

Συστηματική κατάταξη:

Βασίλειο: Ζώα (Animalia)

Φύλο: Χορδωτά (Chordata)

Υποφύλο: Σπονδυλωτά (Vertebrata)

Υπερκλάση: Γναθοστόματα (Gnathostomata)

Κλάση: Οστεϊχθύες (Osteichthyes)

Υποκλάση: Ακτινοπτερύγιοι (Actinopterygii)

Μεσοκλάση: Τελεόστεοι (Teleostei)

Υπερτάξη: Ακανθοπτερύγιοι (Acanthopterygii)

Τάξη: Περκόμορφοι (Perciformes)

Οικογένεια: Σπαρίδες (Sparidae)

Γένος: *Sparus*

1.3.3 Μορφολογία και βιολογικά χαρακτηριστικά

Η τσιπούρα έχει σώμα επίμηκες, πεπλατυσμένο και πλευρικά πιεσμένο με κυρτή ράχη και κοντό ρύγχος (Kibenge, 2022; Fishbase 2023).

Έχει μικρά μάτια και χονδρά χείλη. Στις δύο σιαγόνες του στόματός της φέρει 4-6 κυρτούς και μυτερούς κυνόδοντες και πίσω από αυτούς φέρει 2-4 σειρές με πιο στρογγυλεμένα δόντια, τα οποία προϋφίσταται της ηλικίας γίνονται τραπεζίτες. Το ραχιαίο και εδρικό πτερύγιο αποτελούνται από μαλακές και σκληρές ακτίνες. Φέρει κτενοειδή λέπια και τα λέπια της πλευρικής γραμμής αριθμούνται σε 73-85 τα οποία φθάνουν μέχρι τη βάση του ουραίου πτερυγίου (Abbate, et al., 2012; Talijančić, et al., 2019; Geladakis, 2023). Το χρώμα της είναι γκρι-ασημί, με σκουρόχρωμη πλάτη, ενώ οι πλευρές και η κοιλιά είναι πιο ανοιχτόχρωμες. Στην αρχή της πλευρικής γραμμής φέρει μια μεγάλη μαύρη κηλίδα, η οποία εκτείνεται μέχρι το πάνω τμήμα του βραγχιοκαλύμματος και υπογραμμίζεται από μία κόκκινη περιοχή. Κατά μήκος του

μετώπου φέρει μια χρυσή καμπυλοειδή ταινία (σχήματος V), που στα ενήλικα άτομα πλαισιώνεται από δύο σκούρες ζώνες. Κατά μήκος του ραχιαίου περυγίου εμφανίζει μια επιμήκης μαύρη γραμμή και στο ουραίο περύγιο μαύρη παρυφή, (εικόνα 1.3) (Νεοφύτου, 2007).



Εικόνα 1.3. Η τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Πηγή: Werner—Histoire naturelle des poissons, Public Domain

Η περίοδος αναπαραγωγής της τσιπούρας είναι από τον Οκτώβριο έως το Δεκέμβριο. Είναι είδος που παρουσιάζει πρωτανδρικό ερμαφροδιτισμό. Μέχρι το τέλος του δεύτερου έτους, όλος ο πληθυσμός (άτομα < 330mm και έως 200gr) λειτουργεί ως ένα σύνολο αρσενικών ατόμων. Στο τέλος του δεύτερου έτους και στην αρχή του τρίτου, λαμβάνει χώρα σεξουαλική αναστροφή και αρχίζουν να εμφανίζονται θηλυκά άτομα (Chaoui, et al., 2006). Οι τσιπούρες μεγαλύτερες των πέντε ετών (> 500mm και >600-700gr) εμφανίζονται όλες θηλυκού γένους (Χώτος & Ρογδάκης, 1992; Πνευματικάτου, 2000). Γενετικά ώριμα, σύμφωνα με τα στοιχεία της UNESCO (1986), θεωρούνται τα αρσενικά άτομα 1-2 ετών (μήκους 20-30cm) και τα θηλυκά 2 -3 ετών (μήκους 33-40cm).

1.3.4 Νοσήματα της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και αιτιολογικοί παράγοντες

Τα εκτρεφόμενα είδη ψαριών και οι καλλιεργούμενοι υδρόβιοι οργανισμοί είναι οι περισσότερο προσβαλλόμενοι από νοσήματα, λόγω του περιορισμένου χώρου και της πυκνότητας διαβιούντων ατόμων σε αυτόν. Αυτές οι συνθήκες συνέβαλαν στη δυνατότητα μελέτης των νοσημάτων, σε αντίθεση με τους οργανισμούς που διαβιούν σε ελεύθερα νερά.

Τα νοσήματα των ψαριών, αναλόγως του αιτιολογικού παράγοντα που τα προκαλεί, διακρίνονται σε:

- νοσήματα που οφείλονται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες
- νοσήματα οφειλόμενα σε ιούς
- νοσήματα οφειλόμενα σε βακτήρια
- νοσήματα οφειλόμενα σε μύκητες
- νοσήματα οφειλόμενα σε παράσιτα και
- νοσήματα οφειλόμενα σε σφάλματα διατροφής.

Τα σημαντικότερα νοσήματα της τσιπούρας είναι: η παρασίτωση από πρωτόζωα παράσιτα με σημαντικότερη περίπτωση την παρασίτωση από το μονογενές *Sparicotyle chrysophrii*, η φωτοβακτηριδίαση (Pasteurellosis) που προκαλείται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, η επιθυλιοκύστη που προκαλείται από χλαμμύδια που αναπαράγονται ενδοκυτταρικά, ο ιός της λεμφοκύστης (lymphocystis) που οφείλεται σε ομάδα ιών που προκαλούν δερματικές αλλοιώσεις, η παρασίτωση από Μυξόζωα (με χαρακτηριστικό παράδειγμα το είδος *Polysporoplasma spar*), καθώς και η εμφάνιση Red Spot χωρίς να έχει ταυτοποιηθεί κάποιο υπαίτιο βακτήριο.

1.3.4.1 Η φωτοβακτηριδίαση

Η φωτοβακτηριδίαση είναι μια βακτηριακή σηψαιμία που προκαλείται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (πρώην *Pasteurella piscicida*) (Romalde, 2002). Αν και η ασθένεια αυτή περιγράφηκε για πρώτη φορά σε άγριους πληθυσμούς λευκής πέρκας (white perch- *Morone americana*) και στο ραβδωτό λαβράκι (striped bass-*Morone saxatilis*), σήμερα οι φυσικοί ξενιστές του παθογόνου είναι μια μεγάλη ποικιλία θαλάσσιων ψαριών. Το νόσημα έχει μεγάλο οικονομικό αντίκτυπο τόσο στην Ιαπωνία, όπου προσβάλλει κυρίως τις καλλιέργειες μαγιάτικου (yellowtail amberjack-*Seriola lalandi*), όσο και στην περιοχή της Μεσογείου, λόγω των απωλειών που προκαλεί στις φάρμες τσιπούρας και λαβρακιού. Αυτός ο

μικροοργανισμός χρησιμεύει ως τέλειο μοντέλο για τη μελέτη ενός βακτηριακού παθογόνου των ψαριών, είτε σε εφαρμοσμένο επίπεδο, για την επίλυση ή τον μετριασμό των υψηλών οικονομικών απωλειών των ιχθυοκαλλιεργητών, είτε σε βασικό επίπεδο, για την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Romalde, 2002; Andreoni & Magnani, 2014; Eissa, et al., 2018; Varvarigos, 2022).

Οι προσπάθειες των ερευνητών έχουν επικεντρωθεί στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του παθογόνου μικροοργανισμού και των φυσικών ξενιστών του με στόχο την ανάπτυξη αποτελεσματικών στρατηγικών εμβολιασμού και διαγνωστικών εργαλείων για τον έλεγχο της νόσου. Οι κλασικές (συμβατικές) μέθοδοι ανάπτυξης εμβολίων δεν έχουν αποδώσει μέχρι στιγμής ικανοποιητικά αποτελέσματα και η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA) έχει εφαρμοστεί για τον εντοπισμό νέων υποψήφιων αντιγόνων προς την κατεύθυνση ανάπτυξης υπομονάδων εμβολίων (Barnes, et al., 2005; Andreoni, et al., 2013; Pham, et al., 2021; Teixeira, et al., 2023). Επιπλέον, οι μοριακές μέθοδοι αποτελούν βελτίωση σε σχέση με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές για την ταυτοποίηση του *P. damsela* subsp. *piscicida* και τη διάγνωση της νόσου. Η πλήρης αλληλούχηση και η ανάλυση του γονιδιώματος του παθογόνου θα παράσχει πληροφορίες για το ίδιο το παθογόνο θέτοντας τις βάσεις για την ανάπτυξη εμβολίων και διαγνωστικών μεθόδων (Andreoni & Magnani, 2014; Teixeira, et al., 2023).

Το βακτήριο προκαλεί σηψαιμία με συμπτωματολογία παρόμοια με των υπόλοιπων γνωστών σηψαιμικών νόσων. Η νόσος απαντάται σε υπεροξεία, οξεία και χρόνια μορφή. Στην οξεία μορφή της νόσου που είναι και η συνηθέστερη, ο σκούρος χρωματισμός, η ανορεξία, η διόγκωση της κοιλιακής κοιλότητας και η εμφάνιση θνησιμοτήτων είναι συνήθη συμπτώματα, σε σύγκριση με την υπεροξεία μορφή που παρατηρούνται αιφνίδιες θνησιμότητες χωρίς άλλα συμπτώματα. Η κλινική εικόνα των ψαριών περιλαμβάνει εστιακές νεκρώσεις των βραγχίων, διόγκωση και σκούρο χρωματισμό του σπλήνα καθώς και υπεραιμία του ήπατος. Τα μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια ή τα ψάρια που επιβιώνουν της οξείας μορφής της νόσου μπορεί να εμφανίζουν για μεγάλη περίοδο μια χαμηλή θνησιμότητα (χρόνια μορφή), και παρατηρείται η δημιουργία λευκωπών οζιδίων σε σπλήνα και νεφρούς.

1.3.4.2 Παρασίτωση από *Sparicotyle chrysophrii*

Το παράσιτο *Sparicotyle chrysophrii* (*Monogenea: Polyopisthocotyle*) προσβάλλει την τσιπούρα, προκαλώντας υψηλή θνησιμότητα (61,5%) σε ψάρια που εκτρέφονται σε ιχθυοκλωβούς. Πιστεύεται ότι τα άγρια ψάρια, κυρίως τα σπαρίδια που συγκεντρώνονται γύρω από τους κλωβούς ιχθυοκαλλιέργειας, μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενή μόλυνσης για τα ψάρια στους κλωβούς (Stella, et al., 2011; Farjallah, et al., 2023)

Τα βραγχιακά τόξα της τσιπούρας (*Sparus aurata*), αλλά και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) προσβάλλονται από μονογενή τρηματώδη παράσιτα. Τα μονογενή τρηματώδη παράσιτα ευνοούνται από τις ιδανικές συνθήκες που επικρατούν στη Μεσόγειο σε εντατικές καλλιέργειες. Το συχνότερο παρατηρούμενο πρόβλημα αποτελεί η προσβολή της τσιπούρας (*Sparus aurata*) από τα μονογενή παράσιτα *Furnestinia echeneis* και το *Microcotyle chrisophrii*, ενώ το λαυράκι (*Dicentrarchus labrax*) προσβάλλεται συχνότερα από το μονογενή παράσιτο *Diplectanum aegyans*. Τα μονογενή τρηματώδη παράσιτα είναι παθογόνοι οργανισμοί οι οποίοι παρασιτούν στα βράγχια των ψαριών, τα οποία χρησιμοποιούν σαν ξενιστές τους. Ο βιολογικός κύκλος των μονογενών τρηματωδών σχετίζεται με τη θερμοκρασία του νερού και με τη χρονική διάρκεια (ένα έως δύο μήνες). Κατά τους χειμερινούς και φθινοπωρινούς μήνες, σε συνδυασμό με κακές συνθήκες υγιεινής, παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των παρασίτων. Το κλινικό σύμπτωμα που εμφανίζουν τα ψάρια που έχουν προσβληθεί από μονογενή τρηματώδη παράσιτα περιλαμβάνουν τον ερεθισμό των βραγχίων που οδηγεί σε αντίδραση του οργανισμού του προσβληθέντος ψαριού με υπερπλασία του επιθηλίου και παραγωγή βλέννης. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση παρασίτων, προκαλεί αναπνευστικά συμπτώματα όπως, η συρροή των ψαριών στα πιο οξυγονωμένα μέρη των κλωβών και στην επιφάνεια, καθώς και διάταση των βραγχιοκαλυμμάτων που οδηγεί σε ασφυξία. Ως μέτρο πρόληψης της παρασίτωσης σε κλωβούς γίνεται με τακτική εξέταση των ψαριών για τυχόν αύξηση των κρουσμάτων τους, καθώς και με χορήγηση προληπτικής θεραπείας. Στην Ελλάδα, ως μέτρο αντιμετώπισης των εξωπαρασιτώσεων χρησιμοποιούταν φορμόλη σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, ως εμβάπτιση άμεσα στο νερό. Τα τελευταία χρόνια, με εμβάπτιση των οργανισμών, χρησιμοποιούνται αντιπαρασιτικά σκευάσματα.

1.4 ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ΣΤΟ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΟ ΕΙΔΟΣ *Sparus aurata*

1.4.1 Ταξινόμηση και μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και subsp. *damsela*

Το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (προηγούμενη ονομασία *Pasteurella piscicida* (Gauthier et al., 1995; Jansen and Surgalla, 1968) προκαλεί ασθένεια με σοβαρές επιπτώσεις απωλειών στα ψάρια εκτροφής στην Ευρώπη, όπως τα είδη *Pagrus pagrus*, *Pagrus major*, *Dicentrarchus labrax*, *Argyrosomus regius* και *Solea spp.* (Eissa, et al., 2018; Varvarigos, 2022;).

Τα υποείδη του *Photobacterium damsela*, *damsela* (Ph.d.d.) και *piscicida* (Ph.d.p) ανήκουν στην ομάδα των θερμοανθεκτικών βακτηρίων του γένους *Photobacterium* και είναι γενοτυπικά ομοιογενή, με βάση μελέτες αλληλούχησης της rRNA υποομάδας και με DNA:DNA υβριδισμό (Romalde, 2002;). Το παθογόνο υποείδος *piscicida* (Ph.d.p.) εμφανίζει φαινοτυπική και οροτυπική ομοιογένεια και είναι το μόνο μη μαστιγοφόρο μέλος του γένους.

Η τεχνική Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) μπορεί να βοηθήσει στην περαιτέρω ταξινόμηση του υποείδους *piscicida* (Kvitt et al., 2002).

Οι χώρες της λεκάνης της Μεσογείου των οποίων οι ιχθυοκαλλιέργειες πλήττονται οικονομικά από τις ασθένειες των εκτρεφόμενων ψαριών είναι η Ελλάδα, Γαλλία, Ιταλία, Μάλτα, Πορτογαλία και η Τουρκία (Korun and Timur, 2005). Χαρακτηριστικά παραδείγματα κλινικής εικόνας τσιπούρας που πάσχει από την οξεία μορφή της νόσου (που είναι και η συνηθέστερη), παρατηρούνται στις εικόνες 1.4 και 1.5.



Εικόνα 1.4. Κλινική εικόνα συμπτωμάτων Pasteurellosis στην τσιπούρα (a. δερματικές βλάβες στα πλευρά, b. σπληνομεγαλία).Πηγή: Varvarigos, 2022.



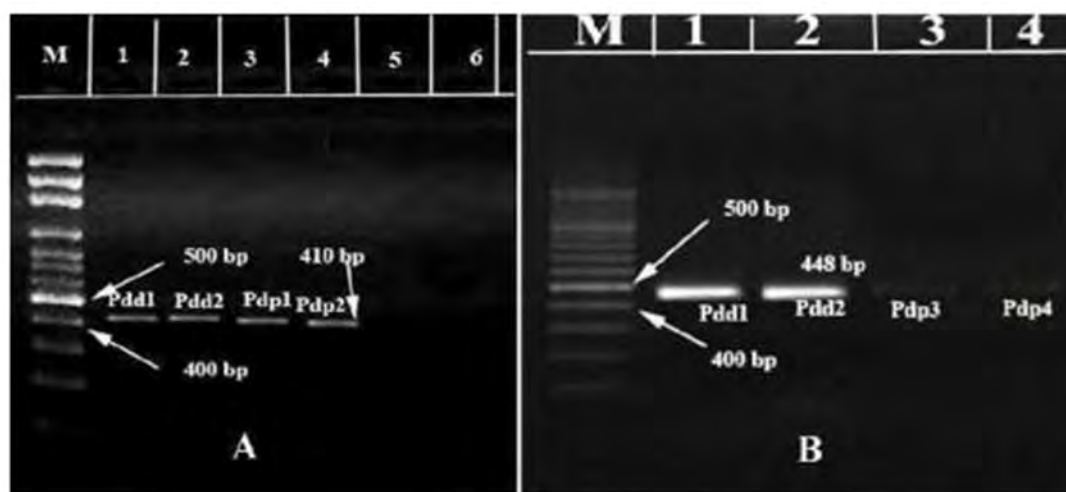
Εικόνα 1.5. Νεκροτομικά ευρήματα τσιπούρας με Pasteurellosis
Πηγή: Προσωπικό αρχείο.

1.4.1.1 Διαγνωστική προσέγγιση

Εκτός από το ιστορικό, τα κλινικά συμπτώματα και τα ευρήματα της νεκροψίας που επιβεβαιώνουν τις ιστικές αλλοιώσεις στα όργανα-στόχους (π.χ. βράγχια, νεφροί, σπλήνα), μπορεί να χρησιμοποιηθούν πρόσθετες διαγνωστικές μέθοδοι: μικροσκοπική εξέταση παρασκευάσματος με τη μέθοδο Giemsa ή με τη μέθοδο χρώσης Gram ή με τη χρήση εντυπώματος του σπλήνα μέσω μικροσκόπησης ή τα επιχρίσματα αίματος (χαρακτηριστικά για βακτηριαίμια). Στην συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει απομόνωση και ταυτοποίηση (Varvarigos, 2022).

Η ταχεία τεχνική fluorescent antibody (FA), ειδική για το Ph.d.p., έχει δοκιμαστεί για την πρόωμη ανίχνευση του παθογόνου σε ιχθυοκαλλιέργειες πριν και μετά την εμφάνιση κρουσμάτων σε ψάρια (Mancuso et al., 2013). Η τεχνική είναι ένα χρήσιμο εργαλείο ανίχνευσης παθογόνου σε ασυμπτωματικά ψάρια (Caruso et al., 2003).

Η ανίχνευση των δύο διαφορετικών υποειδών του βακτηρίου *Photobacterium damsela* γίνεται με βάση τα μορφολογικά και βιοχημικά τους χαρακτηριστικά, πίνακας 1.5 και με μοριακή ανάλυση εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6. Μοριακός διαχωρισμός μεταξύ των υποειδών του *Photobacterium damsela* (subsp. *damsela* και subsp. *piscicida*) Πηγή: Eissa, et al., 2018

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορούνται σε gel αгарόζης για τα διαφορετικά υποείδη του *Photobacterium damsela*:

M, δείκτης μοριακού βάρους 100 bp. Μοριακός οδηγός

(Pdd1) και (Pdd2) *P. damsela* subsp. *damsela* στελέχη

(Pdp1) και (Pdp2) *P. damsela* subsp. *piscicida* στελέχη.

(A) Το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης, αντιστοιχεί στα 410 bp εσωτερικά θραύσματα του γονιδίου του καψικού πολυσακχαρίτη. (B) Το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης, αντιστοιχεί στο 448 bp εσωτερικά θραύσματα του γονιδίου μερικής ουρεάσης.

Η μοριακή τεχνική της PCR είναι η γρήγορη και επιβεβαιωτική διάγνωση για την παρουσία του *P. damsela*.

Πίνακας 1.5. Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των δύο υποειδών του *Photobacterium damsela*. Πηγή: Eissa, et al., 2018

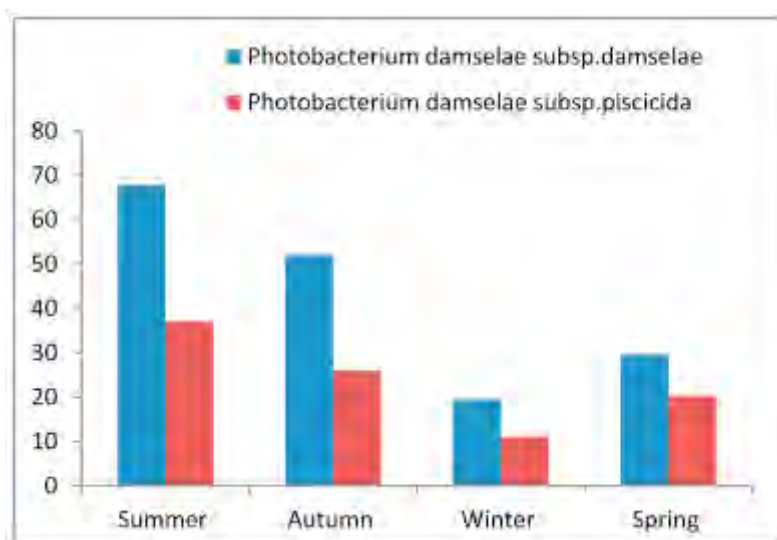
Test of API20E	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (PhDp)	<i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> (PhDd)
Gram staining	(-ve) short bipolar rods	(-ve) short bacilli
TCBS	No growth	Pin point green colonies
Sheep blood agar with 3% NaCl	Small grayish non hemolytic colonies	Small colonies with β-hemolytic activity
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
B-Galactosidase production (OPNG)	-	-
Arginine dihydrolase production (ADH)	+	+
Lysine decarboxylase production (LDC)	-	-
Ornithine decarboxylase production (ODC)	±	-
Citrate utilization (CIT)	+	-

H ₂ S production (H ₂ S)	-	-
Urease production (URE)	-	+
Tryptophane deaminase production (TDA)	-	-
Indol production (IND)	-	-
Acetoin production (VP)	+	+
Gelatinase production (GEL)	-	-
Acid from glucose (GLU)	+	+
Acid from mannitol (MAN)	±	-
Acid from inositol (INO)	-	-
Acid from Sorbitol (SOR)	-	-
Acid from Rhaminase (RHA)	+	-
Acid from sucrose (SAC)	-	-
Acid from melibiose (MEL)	+	-
Acid from amygdalin (AMY)	+	-
Acid from arabinose (ARA)	+	-

Το *Photobacterium damsela* και τα υποείδη του *subsp. piscicida* και *subsp. damsela* σχετίζονται με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, καθώς ο υψηλότερος επιπολασμός της μόλυνσης είναι κατά τη θερινή περίοδο και ο χαμηλότερος κατά τη χειμερινή περίοδο.

Η συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των δύο υποειδών του *Photobacterium damsela* στη μελέτη των Eissa, et al., 2018 δείχνει ότι συνολικά το *subsp. piscicida* ήταν 25.24%, ενώ το *subsp. damsela* ήταν 45.04%. Η εποχική συχνότητα και στα δύο υποείδη ήταν υψηλότερη το καλοκαίρι και μικρότερη τον χειμώνα, διάγραμμα 1.1.

Διάγραμμα 1.1. Εποχική συχνότητα εμφάνισης στα *subsp. piscicida* και *subsp. damsela*. Πηγή: Eissa, et al., 2018



1.4.1.2 Διάγνωση νοσήματος από το *Photobacterium damsela subsp. piscicida*

Η ταχεία διάγνωση των κρουσμάτων φωτοβακτηρίωσης των ψαριών είναι απαραίτητη για τη σωστή διαχείριση και τον αποτελεσματικό έλεγχο στην υδατοκαλλιέργεια (Andreoni & Magnani, 2014; Varvarigos, 2022).

Σύμφωνα με το Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture, πρέπει να ακολουθούνται τα εξής βήματα αναφορικά με τις τεχνικές και τις αναλυτικές μεθόδους διάγνωσης του νοσήματος από βακτηριακά παθογόνα και της ταυτοποίησης του βακτηριακού παράγοντα (Le Breton, 2020).

Αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση του παθογόνου βακτηρίου:

- ✓ Υποκαλλιέργεια και απομόνωση στελεχών σε τεχνητά μέσα
- ✓ Δοκιμασία ευαισθησίας *in vitro* σε αντιμικροβιακές ουσίες/αντιβιοτικά
- ✓ Ανίχνευση του αντιγόνου με δοκιμές συγκόλλησης ορού
- ✓ Ταυτοποίηση στελέχους με βιοχημικές δοκιμές/διεργασίες
- ✓ Ταυτοποίηση στελέχους με φασματομετρία μάζας και υπέρυθη ακτινοβολία
- ✓ Ανίχνευση βακτηριακών νουκλεϊκών οξέων με μοριακές μεθόδους
- ✓ Αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος και τυποποίηση του βακτηρίου.

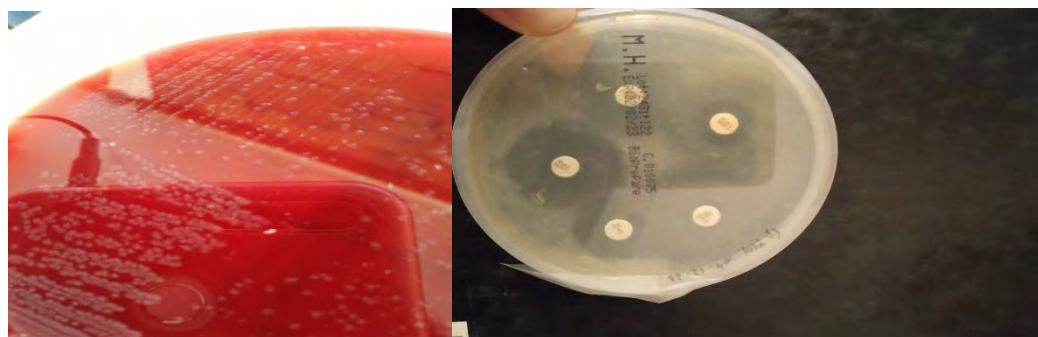
Η διάγνωση της νόσου γίνεται συνήθως με τη χρήση τυποποιημένων ταυτοποιητικών συστημάτων μικροβιακών παραγόντων αφού έχει προηγηθεί το στάδιο της

καλλιέργειας του παθογόνου και της απομόνωσης του ως μονοκαλλιέργεια, εικόνα 1.7.

Μετά την απομόνωση και την ταυτοποίηση του μικροβιακού παράγοντα, ακολουθεί η εκτέλεση του αντίστοιχου αντιβιογράμματος για την χορήγηση κατάλληλης θεραπευτικής αντιμετώπισης, εικόνα 1.8.



Εικόνα 1.7. Τεχνική ταυτοποίησης *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* με Biomerieux API 20E micro-tube test strip (biochemical profile 2005004 identifying *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. The typical score obtained on API 20E for Ph.d.p.) Πηγή: Varvarigos, 2022



Εικόνα 1.8. Καλλιέργεια της *P. damsela* sbsp. *piscicida* σε: (α) αιματούχο άγαρ, (β) αντιβιογράμμα σε Mueller Hinton . Πηγή: Προσωπικό αρχείο

Η βιοχημική και ορολογική επιβεβαίωση είναι επίσης απαραίτητη για τον χαρακτηρισμό του βακτηρίου και τη διάκριση μεταξύ των δύο στενά συνδεδεμένων υποειδών, *piscicida* και *damsela* του *P. damsela*. Το μικροσκοπικό σύστημα AIP20E χρησιμοποιείται συνήθως για την πιθανή ταυτοποίηση του *P. damsela* subsp. *piscicida*. Αν και το *P. damsela* εμφανίζει γενικά έναν μοναδικό κωδικό 2005004 για το *piscicida* και 2015004 για το υποείδος *damsela*, ορισμένα στελέχη παρουσιάζουν

παρεκκλίνουσες αντιδράσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε παραπλανητικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, η διαφοροποίηση του υποείδους *P. damsela* subsp. *damsela* μπορεί να επιτευχθεί όταν λαμβάνονται τρία ή περισσότερα θετικά αποτελέσματα στις δοκιμασίες παραγωγής αποκαρβοξυλάσης της λυσίνης (LDC), κινητικότητας, αναγωγής νιτρικών σε νιτρώδη, παραγωγής αερίου από γλυκόζη, ανάπτυξης θειοθειικών κιτρικών χολικών αλάτων-σακχαρόζης (TCBS-1) και ουρεάσης, διότι όλες αυτές οι δοκιμασίες δίνουν αρνητικά αποτελέσματα για όλα τα στελέχη *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Έχουν επίσης αναπτυχθεί και κυκλοφορήσει στο εμπόριο ορολογικές μέθοδοι, όπως η συγκόλληση ή η ELISA.

Εμπορικά κιτ δοκιμασιών συγκόλλησης σε αντικειμενοφόρο πλάκα και λατέξ (Mono-Pr by Bionor AS), χρησιμοποιώντας ειδικό αντιγόνο με πολυκλωνικά αντισώματα, μπορούν να επιβεβαιώσουν την ταυτοποίηση του βακτηρίου που απομονώθηκε σε καλλιέργεια (Romalde et al., 1995). Δεν παρατηρείται διασταυρούμενη αντίδραση με άλλες ομάδες βακτηρίων. Παρά ταύτα, προκειμένου να εντοπιστούν μικρές οροτυπικές διαφορές μεταξύ στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, προτιμάται η χρήση μονοκλωνικών αντί των πολυκλωνικών αντισωμάτων (MAbs) (Bakopoulos et al., 1997). Με αυτόν τον τρόπο βρέθηκαν αντιγονικές διαφορές μεταξύ ιαπωνικών και Ευρωπαϊκών στελεχών.

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται μοριακές τεχνικές για τον ακριβή χαρακτηρισμό και ειδική ταυτοποίηση του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, πίνακας 1.6 (Andreoni & Magnani, 2014).

Η μερική αλληλούχηση του γονιδιώματος διαφόρων στελεχών *P. damsela* subsp. *piscicida* έχει αναφερθεί στο παρελθόν και πρόσφατα ένα προσχέδιο της πλήρους αλληλούχησης του γονιδιώματος του στελέχους *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 έχει κατατεθεί στις δημόσιες βάσεις δεδομένων (GeneBank accession number PRJNA168653. Οι πληροφορίες αυτές, σε συνδυασμό με την συγκριτική ανάλυση της αλληλούχησης του γονιδιώματος διαφορετικών στελεχών των *P. damsela* subsp. *piscicida* και *P. damsela* subsp. *damsela* θα παράσχουν περαιτέρω πληροφορίες που θα θέσουν τις βάσεις για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων και διαγνωστικών εργαλείων για τον αιτιολογικό παράγοντα της φωτοβακτηρίωσης των ψαριών.

Πίνακας 1.6. Μέθοδοι άμεσου προσδιορισμού του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Πηγή: Andreoni & Magnani, 2014

Assay	Target	Additional culture step	Specificity	Availability on the market	References
PCR-based detection method	<i>16S</i> gene	—	<i>P. damsela</i>		Osorio et al.
Multiplex PCR assay	<i>16S</i> gene <i>ureC</i> gene	—	<i>P. damsela</i> subspecies		Osorio et al.
Multiplex PCR assay	<i>Pbp-1A</i> gene <i>ureC</i> gene internal amplification control	—	<i>P. damsela</i> subspecies	<i>Photobacterium damsela</i> -PCR detection Kit by Diatheva	Amagliani et al.
PCR technique and plating method	<i>cps</i> gene	TCBS-1 agar	<i>P. damsela</i> subspecies		Rajan et al.
Enzyme immunoassay	Polyclonal antibodies against <i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	—	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ^a	Aquaeria-Pp kit by BIONOR	Romalde et al.
PCR-RFLP method	GenBank AY191120, AY191121 sequences	—	<i>P. damsela</i> , restriction analysis for subspecies identification		Zappulli et al.

^aCross reactions with *P. damsela* subsp. *damsela* and *P. histaminum*.

Φασματομετρία μάζας: Τα υποείδη *damsela* και *piscicida* του *Photobacterium damsela* έχουν σημαντική επιζωοτιολογική σημασία και παρουσιάζουν διαφορές στη μολυσματικότητα του παθογόνου βακτηρίου. Η ανάλυση MALDI-TOF Mass Spectra μπορεί να προσδιορίσει σωστά το είδος και να διακρίνει τα υποείδη (Perez-Sancho et al., 2016) με βάση πέντε διαφορετικές κορυφές (m/z 4183 και 8367 για το subsp. *damsela* και 4197, 8397 και 8856 για το subsp. *piscicida*) χρησιμοποιώντας γενετικό αλγόριθμο (λογισμικό ClinProTools). Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να ενσωματωθεί στη ροή εργασίας των εργαστηρίων που διαθέτουν εργαλεία MALDI για την ταυτοποίηση βακτηρίων.

Δοκιμή ευαισθησίας in vitro : Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος in vitro για την αξιολόγηση της ευαισθησίας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι η μέθοδος διάχυσης δίσκων (CLSI, 2011- Puttaswamy et al., 2018). Παρόλο που τα απομονωμένα στελέχη του Ph.d.p. μπορεί να διακρίνονται μεταξύ τους ανάλογα με την αντιμικροβιακή τους ευαισθησία και μάλιστα να παρέχουν ενδείξεις για τη γεωγραφική τους προέλευση (Bakopoulos et al., 1995- Thyssen and Olivier, 2001), είναι προφανές στην καθημερινή πρακτική ότι το προφίλ ευαισθησίας τους μεταβάλλεται δυναμικά, ανάλογα με το βαθμό έκθεσης του βακτηρίου σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά/χημειοθεραπευτικά στο

πεδίο (Smith, 2008). Για παράδειγμα, η τακτική χρήση ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε μια γεωργική εκμετάλλευση το καθιστά αναποτελεσματικό μετά από περίπου 3-4 κύκλους θεραπείας.

Με τη δοκιμή διάχυσης δίσκων σε πλάκες άγαρ TSA ή MH (αντιβιογράμμο), το παθογόνο τις περισσότερες φορές έχει βρεθεί ευαίσθητο στην οξυτετρακυκλίνη, τη φλουμεκίνη, το οξολινικό οξύ, τη φλορφενικόλη και τις σουλφοναμίδες (τριμεθοπρίμη+σουλφαδιαζίνη) και συχνά ανθεκτικό στην αμπικιλλίνη, την αμοξικιλλίνη, ερυθρομυκίνη. Ενίοτε, ωστόσο, η αμοξικιλλίνη παρουσιάζει δραστηριότητα, πίνακας 1.7 (Lattos, et al., 2022).

Πίνακας 1.7. Κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ευαισθησίας και αντοχής του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Πηγή: Lattos et al., 2022

STRAIN	Cephalosporin			Penicillins		Aminoglycosides		Macrolide	Sulfonamide	Phenicol
	CTX	AMP	AX	S	GM	E	SXT	FFC		
120	S	S	S	S	S	S	S	S		S
214	S	S	S	S	S	S	S	S		S
222	S	S	S	S	S	S	S	S		S
228	S	S	S	R	S	S	S	R		S
354	S	R	S	S	S	S	S	S		S
355	S	S	S	S	S	S	S	S		S
367	S	S	S	S	S	S	S	S		S
371	S	S	S	S	S	S	S	S		S
399	S	S	S	S	S	S	S	S		S
400	R	S	S	I	S	S	S	S		S
405	S	S	S	S	S	S	S	S		S
406	S	S	S	S	S	S	S	S		S
407	S	R	S	I	S	S	S	S		S
415	S	S	S	S	S	S	S	S		S
417	S	S	S	S	S	S	I	S		S

STRAIN	SPECIES	Fluoroquinolones		Tetracycline	Aminocoumarin	Quinolones		Antimycobacterials	
		CIP	ENR	TE	NV	NA	RD	O/129	Nitrofurantoin (F)
120	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
214	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
222	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
228	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	I	I	S	S	S	S
354	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
355	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
367	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
371	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
399	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
400	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
405	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
406	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
407	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	I	S	S	S	R
415	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S
417	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	S	S	S	S	S	S	S	S

Ιστοπαθολογικά ευρήματα νεκρωσίας : Για την ιστοπαθολογική διερεύνηση, δείγματα ήπατος, νεφρών και σπλήνα των μολυσμένων ψαριών συλλέγονται και μονιμοποιούνται με φορμόλη 10% για 48 ώρες στους 4°C. Τα μονιμοποιημένα όργανα αφού πλυθούν με τρεχούμενο νερό για 6-12 ώρες, αφυδατώνονται μέσω αύξουσας (ανιούσας) σειράς αιθυλικής αλκοόλης (70,80,90% και δύο αλλαγές σε 100%) και εμβαπτίζονται σε δύο αλλαγές ξυλόλης (1/4-3/4 ώρες για κάθε αλλαγή). Τέλος, οι μονιμοποιημένοι ιστοί εγκλείονται σε κύβους παραφίνης με την συσκευή της

ιστοκινέτας (σε θερμοκρασία τήξης 56°C). Τα τμήματα τεμαχίζονται σε τομές ιστού πάχους 5 mm με την βοήθεια μικροτόμου, χρωματίζονται με αιματοξυλίνη-εωσίνη και ακολουθεί η μικροσκοπία στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για την εύρεση αλλοιώσεων (Eissa, et al., 2018).

Στην οξεία μορφή της προσβολής από το *P. damsela* subsp. *piscicida*, το ήπαρ των προσβεβλημένων ψαριών παρουσιάζει συμφόρηση των αιμοφόρων αγγείων, νέκρωση του ηπατικού ιστού, σοβαρή εκφύλιση και εστιακή λευκοκυτταρική διήθηση. Οι νεφροί παρουσιάζουν συμφόρηση των αιμοφόρων αγγείων, νέκρωση των νεφρικών σωληναρίων και υπερπλασία των μελανομακροφάγων κέντρων. Ο σπλήνας εμφανίζει εστιακές νεκρώσεις και φλεγμονώδη διήθηση του παρεγχύματος, συμφόρηση, αιμορραγία και ήπια υπερπλασία των μελανομακροφάγων κέντρων. Στην χρόνια μορφή της νόσου, χαρακτηριστική είναι η παρουσία εστιακών/πολυεστιακών σαφώς περιγεγραμμένων φαιών κοκκιωμάτων που αποτελούν χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση στην παρουσία των βακτηρίων, μέσα στο παρέγχυμα του σπλήνα και του νεφρού (ψευδοφυματίωση) (Romalde, 2002; Eissa, et al., 2018).

1.4.1.3 Μηχανισμός προσβολής, πρόκληση λοίμωξης

Έχουν περιγραφεί διαφορές στην ευαισθησία της ασθένειας με βάση την ηλικία των ψαριών. Οι προνύμφες και τα νεαρά άτομα είναι πιο ευαίσθητα στη φωτοβακτηρίωση και η οξεία μόλυνση προκαλεί 90-100% θνησιμότητα στις νεαρές τσιπούρες, ενώ τα ψάρια >50gr βάρους είναι πιο ανθεκτικά λόγω της αποτελεσματικότερης φαγοκυττάρωσης και θανάτωσης των βακτηρίων από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Τα βακτήρια που αποικίζουν διάφορους ιστούς και στο εσωτερικό των φαγοκυττάρων προκαλούν χρόνιες και οξείες μορφές φωτοβακτηρίωσης. Στην οξεία μορφή της, υπάρχει πολυεστιακή νέκρωση στο ήπαρ, τον σπλήνα και τους νεφρούς και τα βακτήρια συσσωρεύονται ελεύθερα στα φαγοκύτταρα, τα τριχοειδή αγγεία και τους διάμεσους χώρους. Οι χρόνιες βλάβες στα εσωτερικά όργανα χαρακτηρίζονται από την παρουσία λευκών φυματίων (κοκκιώματα με νέκρωση- tubercles) διαμέτρου περίπου 0,3-0,5 mm (Andreoni & Magnani, 2014).

Η προσκόλληση και οι διεισδυτικές ικανότητες είναι απαραίτητες στο πρώτο στάδιο της λοίμωξης (Romalde, 2002). Το *P. damsela* subsp. *piscicida* έχει αναφερθεί ότι είναι ασθενώς ή μέτρια προσκολλητικό και διεισδυτικό σε διάφορες κυτταρικές σειρές ψαριών, αλλά έχει δείξει υψηλή ικανότητα πρόσδεσης στο έντερο των ψαριών. Η προσκόλληση φαίνεται να διαμεσολαβείται από έναν υποδοχέα πρωτεΐνης ή

γλυκοπρωτεΐνης της βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας και η εισχώρηση των βακτηρίων πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από μικροϊνίδια ακτίνης, με τον κυτταρικό μεταβολισμό να διαδραματίζει ενεργό ρόλο (Andreoni & Magnani, 2014). Ωστόσο, η ακριβής φύση του μηχανισμού που είναι υπεύθυνος για την προσκόλληση και την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή και τους παράγοντες βακτηριαμίας που συμβάλλουν στην εισβολή των μη φαγοκυτταρικών κυττάρων των ψαριών παραμένει ακόμη άγνωστη (Acosta, et al., 2009).

Έχουν περιγραφεί διάφοροι μηχανισμοί λοιμογόνου δράσης του *P. damsela* subsp. *piscicida*. Το πολυσακχαριδικό υλικό της κάψας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του βακτηρίου, προσδίδοντας αντοχή στη θανάτωση από ορό και αυξάνοντας τη θνησιμότητα των ψαριών. Επιπλέον, η ενδοκυτταρική επιβίωση του παθογόνου είναι πιθανό να παρέχει προστασία έναντι ειδικής και μη ειδικής ανοσίας του ξενιστή και εξωγενών αντιμικροβιακών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών. Τα εξωκυτταρικά προϊόντα με φωσφολιπάση, κυτταροτοξική και αιμολυτική δράση μπορεί να ευθύνονται για τη βλάβη των μολυσμένων κυττάρων, την συνακόλουθη απελευθέρωση των μικροοργανισμών και την εισβολή σε παρακείμενα κύτταρα. Ειδικότερα, ένας βασικός παράγοντας παθογένειας του *P. damsela* subsp. *piscicida* είναι μια εξωτοξίνη, η πλασμιδιακά κωδικοποιημένη πρωτεΐνη που προκαλεί απόπτωση 56 kDa (AIP56), η οποία εκκρίνεται σε αφθονία από τα ιογόνα στελέχη και είναι υπεύθυνη για την αποπτωτική δράση έναντι των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων του ψαριού κατά την οξεία φωτοβακτηρίωση του. Η τοξίνη AIP56 είναι μια μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου που δρα διασπώντας τον NF-κΒ p-65, με την καταλυτική δραστηριότητα να εντοπίζεται στη N-τελική περιοχή και τη C-τελική περιοχή να εμπλέκεται στη δέσμευση και την εισχώρηση στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων (Silva, et al., 2013). Το AIP56 επάγει την ενεργοποίηση των κασπασών 8, 9 και 3, την απώλεια του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, την απελευθέρωση κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα και την υπερπαραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species), γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση τόσο της εξωγενούς όσο και της ενδογενούς αποπτωτικής οδού (Costa-Ramos, et al., 2011). Μέσω της ενεργοποίησης της διαδικασίας κυτταρικού θανάτου στην οποία συμμετέχουν τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, το παθογόνο είναι σε θέση να ανατρέψει την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή και να παράγει λοιμώδη νόσο.

Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός μολυσματικότητας του *P. damsela* subsp. *piscicida* είναι η απόκτηση σιδήρου από τον ξενιστή του με τη χρήση σιδηροδεσμευτικών σιδηροφόρων υψηλής συγγένειας (high-affinity iron-binding siderophores), μορίων που δεσμεύουν σίδηρο με χαμηλό μοριακό βάρος και αλληλεπιδρούν με υποδοχείς της βακτηριακής μεμβράνης για τη μεταφορά σιδήρου στο βακτήριο (Andreoni & Magnani, 2014). Επιπλέον, το *P. damsela* subsp. *piscicida* είναι σε θέση να αποκτήσει σίδηρο από την αίμη και την αιμοσφαιρίνη ως μοναδικές *in vitro* πηγές σιδήρου, οπότε αυξάνεται η μολυσματικότητα του. Η πρόσληψη αίμης από το βακτήριο περιλαμβάνει ένα σύστημα TonB [TonB-dependent transporters (TBDTs)] για τη μεταφορά αίμης στο κυτταρόπλασμα και ένα σύστημα κασέτας δέσμησης ATP [ATP-binding cassette (ABC) system] για την προώθησή της διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Andreoni & Magnani, 2014).

Λίγα είναι γνωστά για την ανοσολογική απόκριση των ψαριών στο βακτήριο και τους παράγοντες που ευθύνονται για την αποτυχία της προστασίας από το *P. damsela* subsp. *piscicida*. Έχει επιχειρηθεί μια μεταγραφομική (transcriptomic) προσέγγιση για τη διαλεύκανση των πρώιμων ανοσολογικών αποκρίσεων της νεαρής τσιπούρας στη μόλυνση από το *P. damsela* subsp. *piscicida*. Η ταχεία αναγνώριση του παθογόνου αποδεικνύεται από την ανοδική ρύθμιση λεκτινών, πεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση, χημειοκινών και υποδοχέων χημειοκινών, καθώς και πρωτεϊνών του σιδήρου και του μεταβολισμού της αίμης ως απάντηση κατά βακτηρίων που εξαρτώνται από το σίδηρο. Ωστόσο, αυτός ο μηχανισμός άμυνας μπορεί να είναι είτε ευεργετικός, είτε καταστροφικός για τον ξενιστή (Andreoni & Magnani, 2014). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η ρύθμιση γονιδίων με εξαιρετικά εξειδικευμένες κατασταλτικές λειτουργίες που υποδηλώνουν μια ενεργή καταστολή της ανοσίας, η οποία μπορεί να προκληθεί από τον ξενιστή για τη μείωση των ιστικών βλαβών ή από το παθογόνο για την αποφυγή της αντίδρασης του ξενιστή (Pellizzari, et al., 2013).

1.4.1.4 Πρόληψη και θεραπεία από το *P. damsela* subsp. *piscicida*

Τα αντιβιοτικά αποτέλεσαν την πρώτη γραμμή άμυνας στις ιχθυοκαλλιέργειες για τον έλεγχο των κρουσμάτων φωτοβακτηρίωσης, αλλά μετά από λίγα μόνο χρόνια το παθογόνο απέκτησε ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά. Έχουν καταγραφεί διάφορα R πλασμίδια στο *P. damsela* subsp. *piscicida* που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας έναντι καναμυκίνης, (kanamycin), σουλφοναμίδης (sulphonamide), τετρακυκλίνης (tetracycline), αμπικιλλίνης (ampicillin), χλωραμφενικόλης

(chloramphenicol), φλορφενικόλης (florfenicol) και ερυθρομυκίνης (erythromycin) (Andreoni & Magnani, 2014). Επίσης, βρέθηκαν διαφορές στη γεωγραφική κατανομή των R πλασμιδίων στο *P. damsela* subsp. *piscicida* που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε δείγματα από την Ιαπωνία και τις ΗΠΑ (Kim, et al., 2008; Andreoni & Magnani, 2014). Επιπλέον, ο ενδοκυττάριος παρασιτισμός του *P. damsela* subsp. *piscicida* εντός των μακροφάγων υπονομεύει την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας (Andreoni & Magnani, 2014).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ανωτέρω ζητήματα, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων για την πρόληψη της φωτοβακτηρίωσης και τη μείωση της χρήσης αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες, με οφέλη σε βιολογικό και περιβαλλοντικό επίπεδο (Håstein, et al., 2005; Andreoni & Magnani, 2014). Τα κλασικά εμβόλια για το *P. damsela* subsp. *piscicida* βασίζονται σε αδρανοποιημένα προϊόντα που περιέχουν κυτταρικά (βακτήρια που έχουν θανατωθεί με θερμότητα ή φορμόλη) και διαλυτά αντιγόνα (LPS και ριβοσωμικά σκευάσματα) για ενέσιμη χορήγηση ή επιφανειακή επαφή με το δέρμα και φαίνεται ότι δεν είναι αποτελεσματικά στην προστασία από τη φωτοβακτηρίωση, πίνακας 10. Οι βακτηρίνες που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη OMP 97 kDa και την πρωτεΐνη ECP 52 kDa, που εμπλέκονται στο μηχανισμό με τον οποίο το βακτήριο εισέρχεται στον ξενιστή, αναφέρεται ότι είναι αποτελεσματικές όταν χορηγούνται με εμβάπτιση προκαλώντας μια ισχυρή απόκριση με αντισώματα στα βράγχια και τους βλεννογόνους και έτσι μπορεί να εμποδίσει την είσοδο και τον αποικισμό του παθογόνου. Ωστόσο, το μόνο εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο είναι ένα παρασκεύασμα βακτηριδίου εμπλουτισμένο με ECP, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες, με αποτελέσματα που κυμαίνονται από καλά στην Ισπανία, την Τουρκία και την Ελλάδα, έως φτωχά στην Ιταλία (Andreoni & Magnani, 2014). Το συνιστώμενο πρωτόκολλο εμβολιασμού αποτελείται από δύο εμβαπτίσεις (bath immersions) σε μηνιαία διαστήματα, ξεκινώντας από το στάδιο της προνύμφης όταν το ψάρι είναι 50 mgr και έναν αναμνηστικό εμβολιασμό από του στόματος όταν το ψάρι φτάσει τα 2 gr σωματικού βάρους (Andreoni & Magnani, 2014).

Η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA και οι βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις έχουν μέχρι στιγμής χρησιμοποιηθεί σε πολύ περιορισμένο βαθμό για την ανάπτυξη βακτηριακών εμβολίων για τα ψάρια και δεν υπάρχουν ακόμη αποτελεσματικά προληπτικά μέτρα κατά της φωτοβακτηρίωσης (παστερέλλωσης) των ψαριών. Έχουν

υπάρξει μελέτες σχετικά με την ανάπτυξη υπομονάδων εμβολίων (subunit vaccines) στο ψάρι *Rachycentron canadum* (cobia) από απομόνωση του *P. damsela* subsp. *piscicida* στην Ταϊβάν (Ho, et al., 2011). Η ανοσοπρωτεομική (Immunoproteomics) χρησιμοποιώντας την τεχνική western blotting σε πρωτεΐνες που αναλύονται με 2DE και LC-MS/MS για την απομόνωση ανοσοδραστικών πρωτεϊνών, εφαρμόστηκε για τον εντοπισμό αντιγόνων του *P. damsela* subsp. *piscicida*, τα οποία στην συνέχεια κλωνοποιήθηκαν και παρήχθησαν ως ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες. Ειδικότερα, τρία αντιγόνα αποδείχθηκε ότι προκαλούν προστατευτικό αποτέλεσμα στα cobia και ως εκ τούτου, αναφέρθηκαν ως δυνητικά υποψήφια εμβόλια κατά του παθογόνου. Ωστόσο, η προστασία αυτών των υποψηφίων εμβολίων δεν έχει διερευνηθεί σε άλλα είδη ψαριών, όπου το *P. damsela* subsp. *piscicida* προκαλεί σοβαρή ασθένεια, με υψηλή θνησιμότητα, καθώς και έναντι άλλων απομονωμένων ειδών του *P. damsela* subsp. *piscicida* (Ho, et al., 2011). Επιπλέον, έχουν μελετηθεί συνδυασμοί αντιγόνων, αποδεικνύοντας ότι τα εμβόλια με δισθενή υπομονάδα μπορεί να επιτύχουν καλύτερη αποτελεσματικότητα από τα μονοδύναμα ή τριθενή αντιγόνα (Ho, et al., 2014).

Οι Andreoni & Magnani (2014) εφάρμοσαν μια βιοτεχνολογική προσέγγιση για τον σχεδιασμό εμβολίου κατά της παστερελλίωσης των ψαριών. Οι νέες γονιδιωματικές αλληλουχίες του *P. damsela* subsp. *piscicida* αποτέλεσαν την αφετηρία για βιοπληροφορική ανάλυση με στόχο τον εντοπισμό νέων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην επιφάνεια του βακτηρίου. Η βασική αρχή για την επιλογή μιας πρωτεΐνης του βακτηρίου ως υποψήφιας για εμβόλιο είναι ο κυτταρικός εντοπισμός της.

1.5 ΤΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ *Sparicotyle chrysophrii* ΚΑΙ Η ΝΟΣΟΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΕΙ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ *Sparus aurata*

1.5.1 Εισαγωγή. Παράσιτα

Η κλιματική αλλαγή προβλέπεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στον παρασιτισμό και τις ασθένειες στα οικοσυστήματα γλυκού νερού και στα θαλάσσια οικοσυστήματα, με συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία, την κοινωνία και την οικονομία (CIHEAM, 2020; Mladineo, et al., 2023). Ωστόσο, τα περισσότερα μεμονωμένα ψάρια σε άγριους ή καλλιεργούμενους πληθυσμούς έχουν μολυνθεί από ένα ή περισσότερα παράσιτα. Η

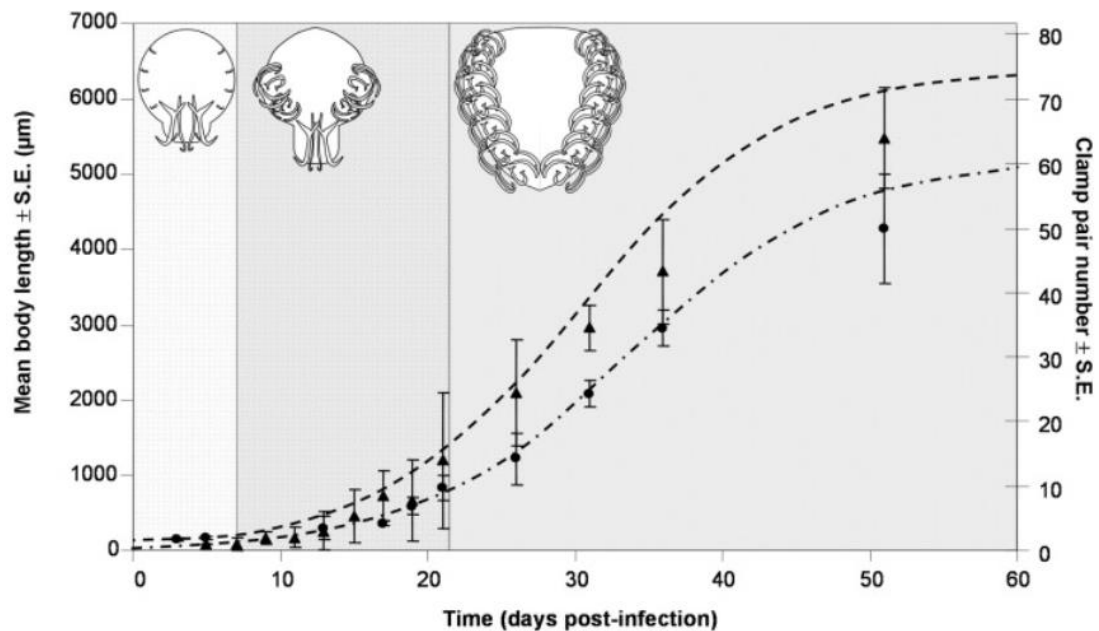
υπερθέρμανση του πλανήτη επηρεάζει την κατανομή των παρασίτων έμμεσα και άμεσα, μέσω επιδράσεων στην ηλικία, το μέγεθος, τη διατροφή, την αφθονία των ψαριών και τον ανεξάρτητο αριθμό ενός παρασίτου μέσα στο ψάρι, (Mladineo, et al., 2023; Scott, 2023). Η διαθεσιμότητα του ξενιστή και το περιβάλλον μετάδοσης (που συνήθως ανιχνεύεται από τις αβιοτικές συνθήκες), καθώς και η εξειδίκευση του τύπου μόλυνσης έχουν σημαντικές επιδράσεις στον πλούτο των ειδών και την σχετική αφθονία στις κοινότητες των παρασίτων (Singh and Mishra, 2013; Mladineo, et al., 2023; Scott, 2023).

Τα παράσιτα αποτελούν μια σημαντική ομάδα παθογόνων που προκαλούν μολύνσεις και ασθένειες των ψαριών, τόσο στο γλυκό νερό όσο και στο θαλάσσιο περιβάλλον (Reed, et al., 2003). Με το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την υδατοκαλλιέργεια, οι παρασιτικές προσβολές αποτελούν απειλή για τη διαχείριση της υγείας των ψαριών και την παραγωγή υδρόβιων καλλιεργειών σε όλο τον κόσμο. Συνεπώς, είναι ένας βασικός τομέας στον οποίο πρέπει να δοθεί η δέουσα προσοχή από τους επιστήμονες για τη βιώσιμη παραγωγή υδατοκαλλιέργειας (Chandra, 2006).

Το *Sparicotyle chrysophrii* Van Beneden & Hesse, 1863 είναι ένα μικροκοτυλίδες (Monogenea, Polyopisthocotylea) που μολύνει τα βράγχια της τσιπούρας *Sparus aurata* στην περιοχή της Μεσογείου και προκαλεί τη λεγόμενη σπαρικοτυλίωση (sparicotylosis) (Repullés-Albelda, et al., 2011; Mladineo, et al., 2021; Mladineo, et al., 2023; Scott, 2023). Αυτό το είδος προκαλεί σοβαρές επιζωοτικές επιδημίες σε ιχθυοκαλλιέργειες που έχουν μεγάλο αριθμό *Sparus aurata*, λόγω επαναλοίμωξης του ξενιστή (Mladineo, et al., 2023). Τέτοιες επιζωοτικές επιδημίες έχουν αναφερθεί κυρίως στην Ισπανία και την Ελλάδα συχνά κατά τους θερινούς και εαρινούς μήνες, ωστόσο τελευταίες μελέτες αναφέρουν υψηλότερο επιπολασμό κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Repullés-Albelda, et al., 2011; Jun, 2015; Mladineo, et al., 2021; Mladineo, et al., 2023).

Οι Repullés-Albelda, et al., 2011 μελέτησαν τη μεταγεννητική ανάπτυξη του *S. chrysophrii*, που προσβάλλει την τσιπούρα (*Sparus aurata*) και έκαναν σύγκριση με άλλα είδη των *Microcotylidae* και των *Heteraxinidae*, καθώς και ανάλυση των αλλαγών στην προσκόλληση και του ρυθμού ανάπτυξης. Η καμπύλη ανάπτυξης του *S. chrysophrii* φαίνεται να είναι σιγμοειδής με 3 περιόδους ανάπτυξης (αργή-γρήγορη-χαμηλή), (γράφημα 1.1).

Γράφημα 1.1. Ο κύκλος ζωής και ανάπτυξης του *Sparicotyle chrysophrii*. Πηγή: Repullés-Albelda, et al., 2011



Ο κύκλος ζωής του *Sparicotyle chrysophrii* διαρκεί 26-30 ημέρες στους 20°C από την εκκόλαψη έως την ωρίμανση του, (Mladineo, et al., 2023). Κατά την οντογενετική φάση της ανάπτυξης βρέθηκαν τρεις ρυθμοί ανάπτυξης, αργός-γρήγορος-χαμηλός. Οι ρυθμοί αυτοί σχετίζονται με την εγκατάσταση, την ωρίμανση και την αναπαραγωγή. Κοινός χρόνος απώλειας άγκιστρου (γάντζου) και ωρίμανσης υπάρχει στα μικροκοτυλιδή (microcotylids) και στα ετεραξινίδια (heteraxinids). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, οι επιπτώσεις στα βράγχια αλλάζουν καθώς αλλάζουν οι μηχανισμοί προσκόλλησης τους σε αυτά (Repullés-Albelda, et al., 2011).

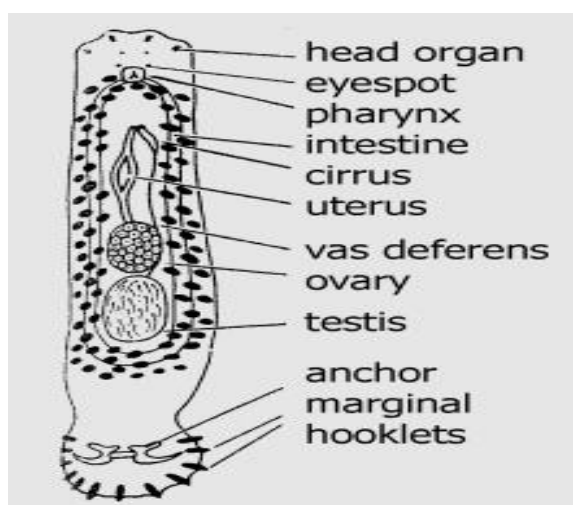
1.5.2 Μονογενή παράσιτα στα ψάρια

Τα μονογενή είναι μια ομάδα παρασίτων που βρίσκονται συνήθως στα βράγχια, το δέρμα ή τα περύγια των ψαριών και κατώτερων υδρόβιων ασπόνδυλων (Rani & Upadhyay, 2019). Υπάρχουν περισσότερες από 100 οικογένειες μονογενών, ενώ έχουν

περιγραφεί περίπου 5.000 είδη μονογενών που απαντώνται σε ψάρια του γλυκού και αλμυρού νερού παγκοσμίως και σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών νερού.

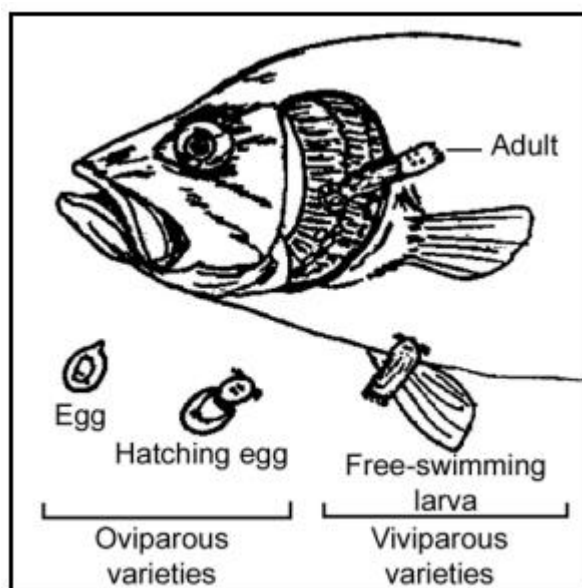
Τα περισσότερα μονογενή παράσιτα είναι περιπλανώμενα, κινούμενα ελεύθερα στην επιφάνεια του σώματος του ψαριού και τρέφονται με βλέννα και επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος και των βράγχων, ωστόσο, μερικά ενήλικα μονογενή παραμένουν μόνιμα προσκολλημένα σε ένα μόνο σημείο του ξενιστή. Ορισμένα είδη μονογενών βρέθηκαν να εισβάλλουν στην πρωκτική κοιλότητα, στον ουρητήρα, στην κοιλότητα του σώματος και στο αιμο-αγγειακό σύστημα.

Η τάξη *Monogenea* είναι μια ομάδα εκτοπαρασιτικών σκουληκιών που απαντώνται τόσο σε ψάρια εκτροφής όσο και σε άγρια ψάρια και προκαλούν ιδιαίτερα αυξημένη θνησιμότητα. Είναι γνωστό ότι μετά την εκκόλαψη τους τα παράσιτα αναζητούν ψάρι ξενιστή και τα ψάρια που βρίσκονται σε συνθήκες αιχμαλωσίας και συνωστισμού αποτελούν τους κατάλληλους ξενιστές, εικόνα 1.9 (Chaudhary, et al., 2013)



Εικόνα 1.9. Δομή ενός ενήλικου μονογενούς. Πηγή: BrainKart.com

Τα μονογενή διαθέτουν μια σειρά από άγκιστρα που τους επιτρέπουν να προσκολλώνται ενώ τρέφονται. Τα περισσότερα είδη απαιτούν μόνο έναν ξενιστή για να ολοκληρώσουν τον κύκλο ζωής τους, ενώ ορισμένα ενήλικα μονογενή παραμένουν μόνιμα προσκολλημένα σε ένα μόνο σημείο του ξενιστή, (εικόνα 1.10) (Reed, et al., 2003).



Εικόνα 1.10. Ο άμεσος κύκλος ζωής των μονογενών. Πηγή: Reed, et al., 2003

Το *Dactylogyrus* είναι συνήθως προσκολλημένο στα βράγχια των ψαριών του γλυκού νερού. Αναπαράγεται με την ωοτοκία, και τα ωά είναι συχνά ανθεκτικά στη χημική επεξεργασία. Για την καταπολέμηση τους η συνιστώμενη θεραπεία είναι 1 δόση την εβδομάδα για αρκετό χρονικό διάστημα 3-4 με παρασιτοκτόνα όπως φορμόλη ή υπερμαγγανικό κάλιο (Reed, et al., 2003).

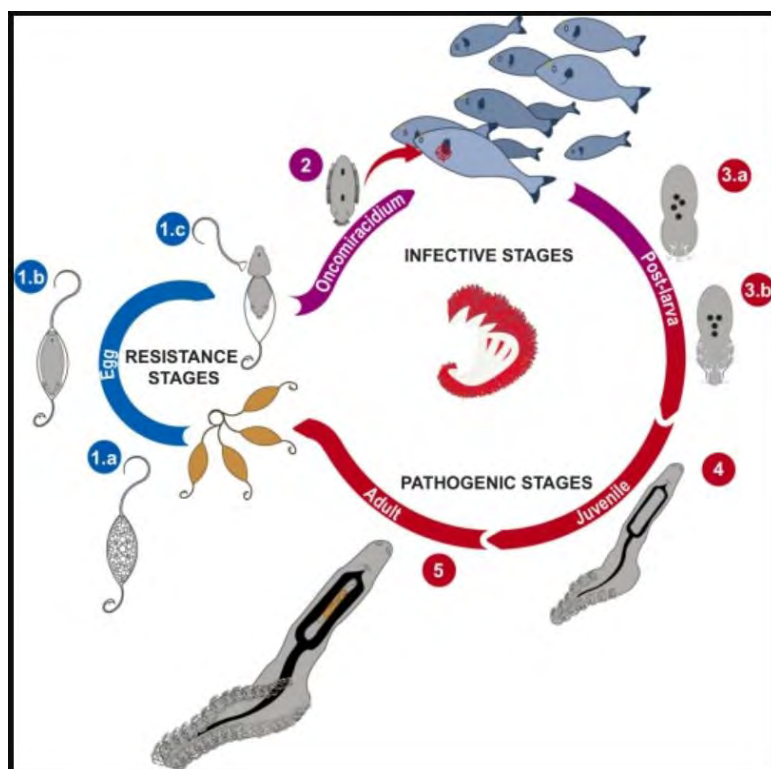
Το *Gyrodactylus* βρίσκεται συνήθως στο δέρμα και στα πτερύγια των ψαριών του γλυκού νερού και παράγει ζωντανά μικρά, οπότε μια θεραπεία μπορεί να είναι επαρκής για τον έλεγχο της μόλυνσης (Reed, et al., 2003).

Η *Benedeniella* είναι ένα μεγάλου μεγέθους μονογενές, που μπορεί να προκαλέσει χρόνια προβλήματα στα θαλάσσια συστήματα και είναι δύσκολο να εξαλειφθεί άπαξ και αποικίσει ένα σύστημα (Reed, et al., 2003).

Τα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν δείκτες νοσηρότητας και θνησιμότητας ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας που προσβάλλονται από τα μονογενή δείχνουν ότι ο αυξημένος αριθμός παρασίτων σχετίζεται με τον συνωστισμό, την ανεπαρκή υγιεινή και την υποβάθμιση της ποιότητας του νερού. Παρόλο που τα μονογενή βρίσκονται συνήθως σε άγρια ψάρια, σπάνια αποτελούν άμεση αιτία ασθένειας ή θανάτου σε πληθυσμούς ψαριών που ζουν ελεύθερα (Reed, et al., 2003; Mladineo, et al., 2023). Ο επιπολασμός του παρασίτου στην *Sparus aurata* είναι 60% και η θνησιμότητα 90% (Jun, 2015; Mladineo, et al., 2021).

1.5.3 Ταξινόμηση και φυλογένεση του παράσιτου *Sparicotyle chrysophrii*

Οι πρώτες λεπτομερείς μελέτες σχετικά με την ανάπτυξη των ειδών *Microcotylidae* χρονολογούνται από τη δεκαετία του 1940 (*Microcotyle spinicirrus*, *Microcotyle donavini*) και τη δεκαετία του 1950 (*Microcotyle gotoi*). Ο Euzet ανέφερε περιγραφές των πρώτων μετα-λαρβικών σταδίων του *S. chrysophrii* (το οποίο ονομάστηκε εκεί ως *Microcotyle chrysophrii*), εικόνα 1.11. Αργότερα, δημοσιεύθηκαν διάφορες μελέτες σχετικά με τα *Microcotyle sebastis*, *Microcotyle hiatulae*, *Polylabroides multispinosus*, *Bivagina tai*) (Repullés-Albelda, et al., 2011).



Εικόνα 1.11. Ο κύκλος ζωής του παρασίτου *Sparicotyle chrysophrii*. Πηγή: Riera-Ferrer, et al., 2023

Το ερμαφρόδιτο είδος *Sparicotyle chrysophrii*, ανήκει στο τάξον των Πολυοπισθοκοτύλεων (*Polyoripisthocotylea*), το οποίο αποτελεί μία υπόταξη της τάξης

Monogenea. (van Beneden & Hesse, 1863). Οι οργανισμοί του τάξον αυτού, στο πίσω μέρος του σώματος τους, που καλείται «οπισθάγκιστρο» (opisthaptor), έχουν τοποθετημένα, εκτός από το σκληροποιημένο άγκιστρο, ειδικά βεντουζοειδή εξαρτήματα και βοηθητικούς σφιγκτήρες πρόσδεσης στο σώμα του ξενιστή. Το είδος *S. chrysophrii* ανήκει επίσης στο μονοειδές γένος *Sparicotyle*. Το γένος αυτό χαρακτηρίζεται από διπλή σειρά spines στον γεννητικό κόλπο, 4 κατακόρυφες μέσες spines με διπλά αγκιστρωμένα άκρα, σπερματικό κυστίδιο συγχωνευμένο με το οπίσθιο τμήμα του κόλπου, και ένα μονό αιδοίο. Το γένος είναι αντιπροσωπευτικό της υποοικογένειας *Atrasterinae*, η οποία συγκαταλέγεται εντός της οικογένειας των *Microcotylidae*, η οποία περιέχει μεγάλη ποικιλία ειδών με κοσμοπολιτική εξάπλωση. Η οικογένεια παραμένει πολυφυλετική, με εξαιρέσεις τα τάξα των υποοικογενειών *Prostatomicrocotylinae* και *Atrasterinae*. Η μοριακή φυλογενετική της οικογένειας δεν έχει πετύχει ακόμη αποτελέσματα υψηλής ανάλυσης, ωστόσο το αρχείο των διαθέσιμων μοριακών δεδομένων εμπλουτίζεται συνεχώς (GenBank). Για την επίτευξη μεγαλύτερης φυλογενετικής ακρίβειας, τόσο σε επίπεδο υποοικογενειών όσο και σε ευρύτερες γεωγραφικές περιοχές, απαιτείται πιο εκτενής δειγματοληπτική προσπάθεια, εφαρμογή γενετικών αναλύσεων πολλαπλών γενετικών τόπων (multilocus genetic analyses).

Φυλογενετικές αναλύσεις με βάση μορφολογικά και μοριακά γενετικά δεδομένα έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις παρασιτολογικές μελέτες. Αν και η αξία της μορφολογικής ανάλυσης παραμένει μεγάλη και αδιαμφισβήτητη, η σημαντικότητα της μοριακής ανάλυσης τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σε βαρύτητα για τη φυλογενετική, καθώς συνιστά μία πιο γρήγορη, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδο, χάρη στην πρόοδο των τεχνικών αλληλούχησης (Jun, 2015). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει συστηματικά βέλτιστη μέθοδος για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου και ο συνδυασμός μεθόδων επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα (Jun, 2015). Οι φυλογενετικές αναλύσεις του *Sparicotyle chrysophrii*, βασίζονται στην αλληλούχηση του 28S rRNA του παρασίτου, σχήμα 1.7 (Sequence identity (%) means 'Identity of the 28S rRNA sequence. Available in GenBank) (Jun, 2015). Η έρευνα για την φυλογενετική ανάλυση του *S. Chrysophrii* συνιστά την πρώτη συμβολή στη μελέτη της πληθυσμιακής γενετικής ποικιλότητας του *S. Chrysophrii*, με βάση τους μοριακούς δείκτες του ριβοσωμικού RNA (rRNA) που αντιστοιχεί στη

μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα (28S) και του γονιδίου της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI).

Ταξινόμηση του παρασίτου *Sparicotyle chrysophrii* (Schoch, et al., 2020).

Κυτταρικοί οργανισμοί

Eukaryota

Opisthokonta

Metazoa

Eumetazoa

Bilateria

Protostomia

Spiralia

Lophotrochozoa

Platyhelminthes

Monogenea

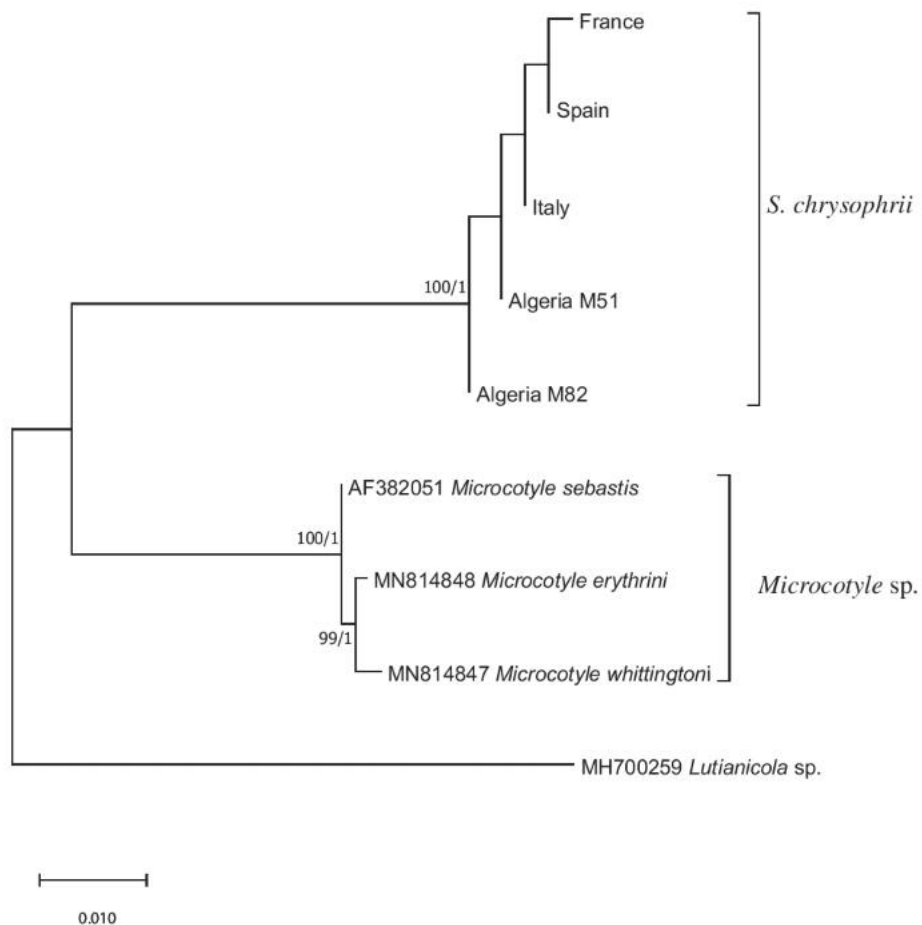
Polyopisthocotylea

Mazocraeidea

Microcotylidae

Sparicotyle

Σχήμα 1.7. Φυλογενετικό δέντρο των μονογενών παρασίτων βάσει της 28S rRNA αλληλούχησης. Πηγή (Jun, 2015)



1.5.4 Επιδημιολογία. Διάγνωση

Η αναφερόμενη γεωγραφική εξάπλωση του παρασίτου, είτε από τη φύση είτε από εκτρεφόμενα ψάρια, περιορίζεται στις λεκάνες της Μεσογείου και στην Ερυθρά Θάλασσα (Mladineo, et al., 2023).

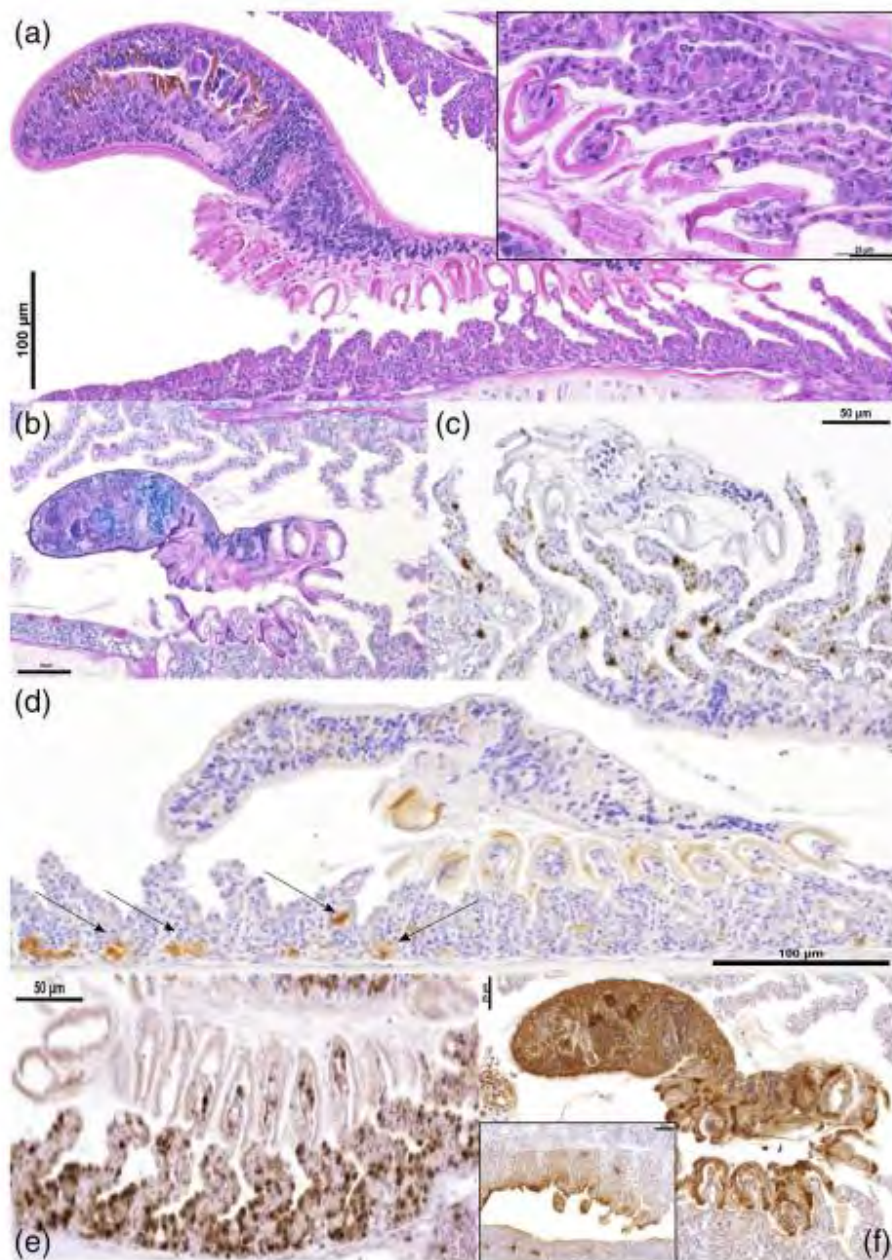
Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η θερμοκρασία υδάτων, η αλατότητα, το pH, η φωτοπερίοδος, επιδρούν στην εξάπλωση, πολλαπλασιασμό και μετάδοση του παρασίτου, ιδιαίτερα κατά το στάδιο της προνύμφης, πίνακες 1.8, 1.9 (Villar-Torres, et al., 2018). Αυτές όλες οι αβιοτικές παράμετροι συμβάλλουν στον σχεδιασμό της

διαχείρισης και της θεραπείας της νόσου, αλλά θα πρέπει ιδανικά να λαμβάνονται υπ' όψιν κατά τον σχεδιασμό μελλοντικών εγκαταστάσεων ιχθυοκαλλιέργειας.

Τα κύρια κλινικά συμπτώματα που εμφανίζουν τα προσβληθέντα ψάρια από το παράσιτο *S. chrysophrii* είναι λήθαργος, αναιμία, προοδευτική εξασθένηση, νέκρωση και θάνατος (Stella, et al., 2023).

Οι διαγνωστικές μέθοδοι ανίχνευσης του παρασίτου *S. chrysophrii* περιλαμβάνουν μικροσκόπηση, Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), PCR and sequencing (Jun, 2015).

Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα έχουν περιγραφεί ως εστιακές φλεγμονώδεις αλλοιώσεις σε ήπιες λοιμώξεις ή γενικευμένη υπερπλασία, συμφόρηση, αυξημένος αριθμός βλεννογόνων κυττάρων, υπερτροφία, εικόνα 1.12 (Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pelliter, 2009; Mladineo, 2023).



Εικόνα 1.12. In situ ιστολογικές, ανοσολογικές και ιστοχημικές τομές (5 μm πάχους) του *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea, Microcotylidae) που έχει προσκολληθεί στα νημάτια των βράγχων της *Sparus aurata*. Πηγή: Mladineo, 2023

(a) Χρώση Haematoxylin και eosin (b) χρήση PAS-Alcian blue, (c) Θετική χρώση ηωσινόφιλων κοκκιοκυττάρων (καφέ) με χρήση μονοκλωνικού Ab G7, (d) Θετική χρώση για IgM+ κύτταρα, (e) Θετική χρώση για PCNA- proliferative cell nuclear

antigen), (f) Θετική χρώση για κύτταρα του παρασίτου που εκφράζουν iNOS nitric oxide synthase enzyme.

Πίνακας 1.8. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη του *Sparicotyle chrysophrii*. Πηγή: Villar-Torres, et al., 2018

Environmental factor	Factor level	Incubation period (h)	Hatching period (h)	Hatching peak ^a (h)	Hatching success (%)
		Mean $\pm$ SD (Range)			
Temperature ($\pm$ 0.1 °C)	10	995.5 $\pm$ 23.6 (948–1044) ^b	96 ^b	988 ^b	7.3 ^c
	14	253.4 $\pm$ 17.3 (212–332)	120	248	91.0
	18	178.1 $\pm$ 14.8 (148–256)	108	176	93.3
	22	143.1 $\pm$ 22.5 (116–200)	84	124	93.7
	26	128.0 $\pm$ 12.0 (116–172)	56	124	77.3
	30	148.8 $\pm$ 20.8 (124–184)	60	148	6.0
pH ($\pm$ 0.1)	7.0	150.0 $\pm$ 9.0 (144–176)	32	144/148	56.0
	7.9	143.1 $\pm$ 22.5 (116–200)	84	124	93.7
Light regime (light:darkness)	12:12	147.4 $\pm$ 25.6 (120–200)	80	124	93.0
	0:24	125.1 $\pm$ 11.3 (112–232)	120	124	89.3
	24:0	141.4 $\pm$ 23.4 (108–268)	160	140	88.0
Salinity(ppt)-Temperature ($\pm$ 0.1 °C)	27–18	191.7 $\pm$ 13.6 (152–220)	68	196	89.3
	36–18	169.6 $\pm$ 15.3 (140–268)	128	168	85.3
	37–18	172.7 $\pm$ 18.2 (140–228)	88	172	64.7
	38–18	179.5 $\pm$ 12.7 (168–220)	52	168	80.7
	47–18	218.7 $\pm$ 11.5 (180–244)	64	220	74.6
	27–22	141.8 $\pm$ 11.5 (120–168)	148	148	85.3
	36–22	129.2 $\pm$ 9.3 (108–156)	48	124	74.7
	37–22	138.3 $\pm$ 16.3 (124–196)	72	128	82.0
	38–22	135.0 $\pm$ 16.7 (124–228)	104	128	69.0
	47–22	182.2 $\pm$ 12.7 (148–204)	56	176	64.7

Πίνακας 1.9. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη μακροβιότητα των προνυμφών του *Sparicotyle chrysophrii*. Πηγή: Villar-Torres, et al., 2018

Environmental factor	Factor level	N ^a	Survival period (h)	Swimming ratio (%)
			Mean ± SD (Range)	Mean ± SD (Range)
Temperature (± 0.1 °C)	10	44 ^b	33.5 ± 28.0 (4–104) ^b	72.6 ± 22.6 (12.5–96.2) ^b
	14	273	20.5 ± 17.7 (0–100)	61.9 ± 24.5 (0–94.7)
	18	280	17.3 ± 13.9 (0–72)	61.4 ± 25.4 (0–93.8)
	22	281	12.9 ± 9.0 (0–52)	53.7 ± 26.3 (0–92.3)
	26	232	9.5 ± 7.1 (0–32)	43.9 ± 24.9 (0–85.7)
	30	20	3.6 ± 2.2 (0–8)	18.8 ± 10.3 (0–25.0)
pH (± 0.1)	7.0	168	7.7 ± 7.0 (0–40)	37.6 ± 22.9 (0–90.0)
	7.9	281	12.9 ± 9.0 (0–52)	53.7 ± 26.3 (0–92.3)
Light regime (light:darkness)	12:12	281	12.9 ± 8.7 (0–52)	54.5 ± 23.5 (0–88.9)
	0:24	268	12.8 ± 9.3 (0–48)	57.1 ± 23.1 (0–90.0)
	24:0	249	12.4 ± 7.5 (0–40)	52.9 ± 24.7 (0–92.3)
Salinity(ppt)-Temperature (± 0.1 °C)	27–18	134	12.9 ± 8.5 (0–36)	57.7 ± 22.2 (0–88.9)
	36–18	128	15.8 ± 8.7 (4–40)	62.6 ± 20.0 (12.5–90.0)
	37–18	98	31.6 ± 19.1 (4–84)	77.3 ± 21.2 (12.5–95.2)
	38–18	122	26.1 ± 12.4 (4–56)	76.5 ± 16.6 (12.5–92.9)
	47–18	155	13.4 ± 9.5 (0–44)	55.9 ± 28.2 (0–90.9)
	27–22	128	13.3 ± 14.1 (0–76)	48.5 ± 33.3 (0–90.9)
	36–22	112	13.4 ± 6.5 (4–48)	61.0 ± 17.0 (12.5–91.7)
	37–22	123	13.9 ± 7.0 (4–32)	61.6 ± 20.0 (25.0–87.5)
	38–22	103	13.7 ± 10.6 (4–44)	51.9 ± 25.5 (25.0–90.9)
	47–22	97	15.6 ± 13.8 (0–44)	53.3 ± 31.5 (0–90.9)

1.5.5 Πρόληψη και διαχείριση

Το *Sparicotyle chrysophrii* θεωρείται το πιο επιβλαβές παράσιτο των ψαριών στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Η θεραπεία της παρασίτωσης από *Sparicotyle chrysophrii* (sparicotylosis) βασίζεται σε συχνές επιθεωρήσεις στα βράγχια που συσχετίζονται με την εποχιακή αύξηση της θερμοκρασίας του θαλασσινού νερού, την εφαρμογή λειτουργικών ζωοτροφών και θεραπείες με λουτρά φορμόλης (CH₂O) [διάλυμα φορμαλδεϋδης 37% κατά μάζα] όπου επιτρέπεται, υπερμαγγανικού καλίου (KMnO₄) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Ενώ η φορμόλη πιστεύεται ότι θα απαγορευτεί στην Ευρώπη, άλλα συνθετικά ανθελμινθικά, όπως η πραζικουαντέλη (praziquantel) και η ιβερμεκτίνη (ivermectin), είναι επιρρεπή στην πρόκληση ανθεκτικότητας στα παράσιτα (Mladineo, et al., 2021). Οι Mladineo, et al., 2021 μελέτησαν την αντιπαρασιτική επίδραση 14 συνθετικών ενώσεων, ως εναλλακτικές θεραπείες στην σπαρικοτυλίωση, πίνακας 1.10.

Πίνακας 1.10. Τα χημικά χαρακτηριστικά των 14 μελετημένων ενώσεων για θεραπεία της *Sparus aurata* από το *Sparicotyle chrysophrii* (συγκεντρώσεις 10 mM concentration by Sigma-Aldrich). Πηγή: Mladineo, et al., 2021

Compound	M _r	Solubility (mg) in 50 mL DMSO	Solubility (μL) in 50 mL DMSO	Origin	Scaled-Down Range (mM)
Bithionate sodium	356.05	178.03		Synthetic	0.001–0.01
Bitoscanate	192.26	96.13		Synthetic	1–5
Camphor (1R)	152.24	76.12		Natural	0.3–2
Cedrol	222.37	111.19	110.08	Natural	0.05–1
(+)-trans-Chrysanthemic acid	168.23	84.12	76.47	Natural	0.1–1
Coumarin	146.14	73.07		Synthetic	0.2–2.5
Curcumin	368.38	184.19		Natural	0.1–1
Diallyl sulphide	114.21	n/a	64.38	Synthetic	0.5–5
N,N-diethyl-M-toluamide	191.27	95.64	95.83	Synthetic	0.1–1
Eucalyptol	154.25	n/a	83.61	Natural	1–10
Garlicin 80%	146.27	n/a	90.7	Natural	0.1–1
4-Hexylresorcinol	194.27	97.14		Synthetic	0.05–1
Monocrotaline	325.36	162.68		Synthetic	0.1–1
Pyrethrins 50%	350	350	406.98	Natural	1–10

Στα αρχικά στάδια λοίμωξης από *S. chrysophrii*, δίαιτα ψαριών με 200 mg CA/kg για 60 ημέρες μπορεί να μειώσει θεαματικά τη μολυσματικότητα του παρασίτου (Rigos et al. 2013). Μελέτη των Rigos et al. (2016) έδειξε τη θεραπευτική δράση σε ψάρια *Sparus aurata* που είχαν μολυνθεί από το *S. chrysophrii*, μίγματος caprylic acid (200 mg/kg ψαριού), organic iron (0.2%) and mannan oligosaccharide (0.4%) (Mladineo, et al., 2021).

Οι εμβapiτίσεις με φορμόλη αποτελούν αναμφισβήτητα το πιο κοινό θεραπευτικό μέσο κατά παρασιτώσεων ιδιαίτερα στην εκτρεφόμενη τσιπούρα. Ωστόσο, οι θεραπείες με φορμόλη έχουν κατηγορηθεί για παρενέργειες που σχετίζονται με κατάλοιπα στο τελικό προϊόν, αλλά κυρίως με ρύπανση στο περιβάλλον, αλλοιώνοντας σημαντικά την αντίληψη των καταναλωτών και πολλών περιβαλλοντολογικών ομάδων. Επίσης, η εφαρμογή εμβapiτίσεων με τη χρήση αντιμικροβιακών στους κλωβούς, αποτελεί διαδικασία που χαρακτηρίζεται από σοβαρές πρακτικές δυσκολίες, όπως αναγκαιότητα χρήσης σάκων κάλυψης διχτύων, ιδιαίτερα εργώδεις συνθήκες και εξάρτηση από

καιρικές συνθήκες. Ιδανικά, η αντιμετώπιση της ασθένειας μέσω χορήγησης φαρμακούχας τροφής θα πρόσδιδε πολλαπλά οφέλη περιορίζοντας σημαντικά τα προβλήματα που συνδέονται με την εφαρμογή εμβαπτίσεων. Επομένως, η ανεύρεση ενός θεραπευτικού αντιπαρασιτικού σχήματος που θα εφαρμόζεται μέσω της τροφής και θα μπορούσε να υποκαταστήσει τη χρήση της φορμόλης, αποτελεί ζωτικής σημασίας προτεραιότητα για τη βιομηχανία των υδατοκαλλιέργειών (Fioravanti, et al., 2020).

Η πραζικουαντέλη (PZQ) είναι ένα ευρέος φάσματος ανθελμινθικό φάρμακο το οποίο είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό έναντι μονογενών παρασίτων και θεωρείται δίκαια μία από τα πιο υποσχόμενες αντιπαρασιτικές ουσίες για μελλοντική χρήση σε εγχώριο και διεθνές επίπεδο, καθώς μέσω της διατροφικής χορήγησης της καταπολεμούνται με μεγάλη επιτυχία εκτός από τα μονογενή και τα διγενή παράσιτα ψαριών. Η PZQ δεν αποτελεί ωστόσο εγγεγραμμένη για κτηνιατρική χρήση ουσία μέχρι σήμερα, αλλά μπορεί να συνταγογραφηθεί για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες με την “off label” χορήγηση και επιβαλλόμενο χρόνο αποδρομής από τους βρώσιμους ιστούς (500 βαθμοί-μέρες) (Fioravanti, et al., 2020).

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Σκοπός της δικής μας έρευνας

Σκοπός της έρευνάς μας ήταν η μελέτη και η διερεύνηση της παρουσίας του βακτηρίου *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και του παρασίτου *Sparicotyle chrysophrii* στη διάρκεια ενός έτους σε 2 μονάδες εκτροφής στην περιοχή του Αστακού. Πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές εργαστηριακές εξετάσεις, απομόνωση και ταυτοποίηση των δύο αυτών παθογόνων αιτιών, ανάλογα με την εποχή του έτους και καταγραφή της προκαλούμενης θνησιμότητας. Όλες οι διαγνωστικές εργαστηριακές εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο ιχθυοπαθολογίας στο υποκατάστημα του Αστακού της εταιρείας AVRAMAR Α.Ε και ακολούθως οι διαδικασίες ταυτοποίησης στο τμήμα Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών του Κτηνιατρικού Κέντρου Αθηνών. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση της εποχιακής εμφάνισης και του ποσοστού θνησιμότητας που προκαλούν αυτά τα δύο αίτια, που επηρεάζουν σημαντικά την εκτροφή και βιωσιμότητα της τσιπούρας στις μονάδες Ιχθυοκαλλιέργειας με μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις.

2.1.2 Δειγματοληψίες - Περιοχή δειγματοληψίας

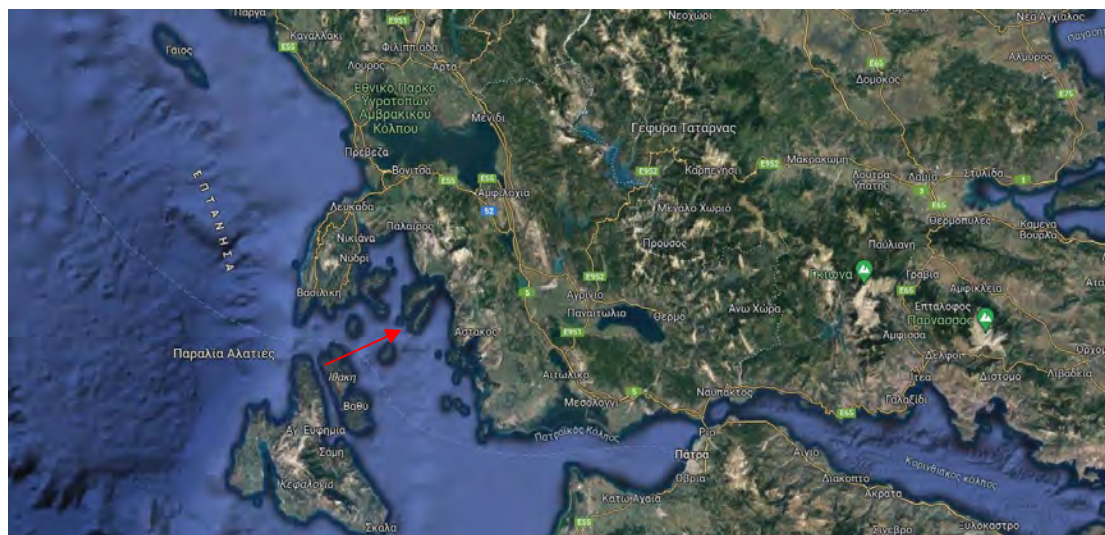
Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στην περιοχή του Αστακού, στο Ιόνιο πέλαγος σε δύο γειτονικές μονάδες εκτροφής (Εικόνες 2.1, 2.2) της Περιφεριακής Ενότητας Αιτωλοακαρνανίας. Οι περιοχές αυτές θεωρήθηκαν αντιπροσωπευτικές εξαιτίας του μεγάλου αριθμού ιχθυοκαλλιεργητικών μονάδων εκτροφής που έχουν αναπτυχθεί και της σημαντικής δραστηριότητας στον τομέα της εντατικής καλλιέργειας υδρόβιων ειδών στην Περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας.

Πιο συγκεκριμένα, στην Περιφεριακή Ενότητα Αιτωλοακαρνανίας λειτουργούν 28 μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 9% του συνόλου των μονάδων που λειτουργούν σε εθνικό επίπεδο. Η παραγωγή των μεσογειακών ειδών στην περιοχή του Αστακού, καταλαμβάνει μεγάλο μέρος όχι μόνο της εθνικής (25%) αλλά και της ευρωπαϊκής παραγωγής (12,5%), με τα προϊόντα που προέρχονται από

την Π.Ε. Αιτωλοακαρνανίας να είναι παγκοσμίως αναγνωρισμένα για την ποιότητά τους.



Εικόνα 2.1. Περιοχές δειγματοληψιών. Μονάδες Εκτροφής



Εικόνα 2.2. Περιοχή Αστακού. Περιοχή δειγματοληψιών (κόκκινο βέλος).

2.1.2.1 Δειγματοληψίες

Έπειτα από την πρώτη ετήσια εισαγωγή γόνου τσιπούρας στις Μονάδες εκτροφής που μελετήθηκαν, ακολούθησαν επισκέψεις καθ'όλη τη διάρκεια του έτους για την εκτίμηση των ιχθυοπληθυσμών, καθώς και τη λεπτομερή καταγραφή της εποχιακής εμφάνισης και των θνησιμοτήτων που εμφάνισαν οι τσιπούρες από οποιαδήποτε παθολογικό αίτιο.

Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν αφορούν κλωβούς εκτροφής τσιπούρας Σωματικού Βάρους από 10 έως 600gr στις δύο Μονάδες εκτροφής, στις περιπτώσεις εμφάνισης θνησιμότητας, και ταυτοποίησης αυτής από το βακτήριο *P. damsela* subsp. *piscicida* και το παράσιτο *S. Chrysophrii*.

Η διαγνωστική και μακροσκοπική εξέταση των ψαριών, όπως και η καταγραφή και η ανάλυση δεδομένων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ιχθυοπαθολογίας στον Αστακό την ίδια μέρα με τη συλλογή των δειγμάτων. Συγχρόνως πραγματοποιήθηκε και η προεργασία για την ταυτοποίηση των νοσημάτων, με τις τεχνικές της ιστοπαθολογίας και της ανάλυσης PCR. Στις περιπτώσεις με μολύνσεις από το βακτήριο *P. damsela* subsp. *piscicida*, πραγματοποιήθηκε και πλήρης βακτηριολογική εξέταση.

Η συλλογή δειγμάτων αφορά νωχελικά ιχθύδια (τουλάχιστον 10 ιχθύδια από κάθε κλωβό εκτροφής) και την μεταφορά τους σε πλαστικές σακούλες με ¼ θαλασσινό νερό και το υπόλοιπο αέρα χωριστά για κάθε κλωβό εκτροφής. Η μεταφορά στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε με τις σακούλες σε πάγο μέσα σε ισοθερμικό εξωτερικό περιέκτη. Επίσης, προετοιμάστηκαν τα δείγματα από ιστούς των ιχθυδίων για ιστολογικές εξετάσεις, με την αναλογία όγκου ιστού/ φορμόλης :1/5., καθώς και εγκλεισμό ιστών των δειγμάτων σε RNAlater για την ανάλυση PCR (όγκος ιστού/ RNAlater 1:10).

Η καταγραφή των θνησιμοτήτων καθώς και η αιτία από την οποία προκλήθηκε για κάθε κλωβό εκτροφής ξεχωριστά, καταχωρήθηκε στο πρόγραμμα καταγραφής της παραγωγικής διαδικασίας της εταιρείας AVRAMAR.

2.1.3 Μακροσκοπική και Μικροσκοπική εξέταση (εξέταση νωπών επιχρισμάτων και επιχρισμάτων μετά από χρώση Gram)

Μετά την άφιξη των δειγμάτων στο ιχθυοπαθολογικό εργαστήριο του Αστακού ακολούθησε η καταγραφή των στοιχείων κάθε δείγματος, όπως η ημερομηνία εξέτασης, η Μονάδα Εκτροφής που ανήκει, η ονομασία και η παρτίδα του κλωβού εκτροφής, καθώς και το Μέσο Σωματικό Βάρος του κλωβού εκτροφής. Ακολούθησε η μακροσκοπική παρατήρηση και η νεκροτομική εξέταση για τα δείγματα κάθε κλωβού εκτροφής ξεχωριστά στον πάγκο του εργαστηρίου. Μετά τη διενέργεια της νεκροψίας πραγματοποιήθηκε η εξέταση των εσωτερικών οργάνων, αφού πρώτα απολυμάνθηκαν τα εργαλεία (μεταλλικές λαβίδες, ψαλίδια, νυστέρια) με εμβάπτιση σε αιθανόλη 100% και εφαρμογή φλόγας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι μικροβιολογικές εξετάσεις, όπου με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου έγινε λήψη υλικού από τους νεφρούς των δειγμάτων και διασπορά του υλικού σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου petri με θρεπτικό υπόστρωμα, με σκοπό να επιτευχθεί η απομόνωση μεμονωμένων αποικιών (Roberts, 1978). Ακολούθησε μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων οργάνων, με την τοποθέτηση μικρών τεμαχίων ιστών ή ξεσμάτων από την περιοχή της αλλοίωσης πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες και παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε χρώση Gram, σε νωπά επιχρίσματα από σπλήνα και νεφρό για την μικροσκοπική παρατήρηση των δίπολων βακίλων του βακτηρίου *P. damsela* subsp. *piscicida*.

2.1.4 Βακτηριολογική εξέταση (βιοχημική ταυτοποίηση)

Στις βακτηριακές νόσους που προκαλούν σηψαιμία, όπως το *P. damsela* subsp. *piscicida* το όργανο που προτιμάται για την πραγματοποίηση μικροβιολογικών αναλύσεων είναι ο νεφρός. Έτσι, με τη βοήθεια του αποστειρωμένου κρίκου, έγινε λήψη από τους νεφρούς στα ύποπτα δείγματα και σπορά σε υπόστρωμα με θρεπτικό υλικό Blood agar, TSA+2% NaCl & Miller Hinton agar. Έπειτα από επώαση στον επωαστικό θάλαμο για 24-72 ώρες σε θερμοκρασία 23°C αναπτύχθηκαν αποικίες. Για την απομόνωση αποικιών και την ανάπτυξη καθαρών καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιιεργειες από κάθε τρυβλίο, και ακολούθησε η ταυτοποίηση των βακτηρίων (χρώση κατά Gram, test κινητικότητας, API 20E).

2.1.4.1 Χρώση Gram

Τοποθέτηση λίγου υλικού από καλλιέργεια ή ιστό-όργανο σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα νερού. Μονιμοποίηση με φλόγα του παρασκευάσματος.

- Crystal violet για 1 min
- Ξέπλυμα με νερό και προσθήκη Iodine για 1min
- Ξέπλυμα με νερό και προσθήκη Alcohol acetone
- Ξέπλυμα και προσθήκη διαλύματος Safranin για 1min

Μικροσκοπική παρατήρηση (μεγέθυνση 100X) (Brenner et al., 2005; Koneman et al., 1992)

2.1.4.2 Τεστ κινητικότητας

Υλικό από την καθαρή αποικία του βακτηρίου μεταφέρεται σε περιέκτη με απεσταγμένο νερό, ομογενοποιείται, και μια σταγόνα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα που την καλύπτουμε με καλυπτρίδα, αφού πρώτα της έχουμε προσθέσει βαζελίνη στις 4 άκρες της. Μικροσκοπική παρατήρηση (Roberts, 1978).

2.1.4.3 Test API 20E

Το test API 20E (εικόνα 2.3) περιέχει 20 αντιδράσεις ενζύμων και χρησιμοποιείται για την βιοχημική ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών. Πρόκειται για strip με υποστρώματα και το οποίο μετά την εκτέλεση της δοκιμής και τη βαθμολόγησή της, επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση του βακτηρίου.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Λήψη υλικού με αποστειρωμένη πιπέτα, τοποθέτηση σε περιέκτη με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ομογενοποίηση.
- Μεταφορά του εναιωρήματος σε όλες τις θήκες των αντιδραστηρίων, κάτω από τις οποίες παρέχεται υγρασία με απεσταγμένο νερό.
- Στα αντιδραστήρια που είναι σημασμένα με γραμμή (H₂S, ADH, LDC, URE) προστίθεται ζελατίνη, σε αυτά που έχουν κουτάκι (CIT, VD, GEL) προστέθηκε δείγμα μέχρι τον σχηματισμό μηνίσκου, ενώ τα υπόλοιπα μένουν μέχρι το κοίλο μέρος τους γεμάτα.

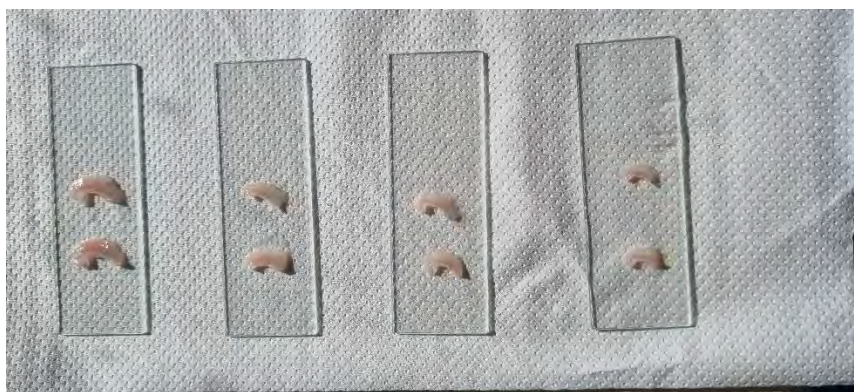
- Κλείσιμο με το καπάκι της και τοποθέτηση στο επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες στους 23C.
- Με την πάροδο 24h τοποθετήθηκαν οι ειδικές ουσίες για το κάθε αντιδραστήριο, και ακολούθως σημειώθηκε θετικά (+) ή αρνητικά (-) ανάλογα με το χρωματισμό τους, με τη βοήθεια μιας κλείδας.
- Έτσι προκύπτει ο επταψήφιος αριθμός του μικροβιακού στελέχους που το προσδιορίζει (Brenner et al., 2005).



Εικόνα 2.3. Πραγματοποίηση του τεστ API 20E. Προσωπικό αρχείο

2.1.5 Παρασιτολογική εξέταση

Για την αναγνώριση του παρασίτου *Sparicotyle chrysophrii* στα βράγχια της τσιπούρας αρχικά αφαιρέθηκαν τα βραγχιοκαλύμματα και στη συνέχεια απομονώθηκε κάθε βραγχιακό τόξο επάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Με τη βοήθεια ενός νυστεριού για την αφαίρεση της βλέννας των βραγχίων, και με την προσθήκη μιας σταγόνας νερού στην αντικειμενοφόρο πλάκα προετοιμάστηκαν τα νωπά παρασκευάσματα βραγχίων για την μικροσκοπική παρατήρηση (εικόνα 2.4)



Εικόνα 2.4 : Νωπά παρασκευάσματα βραγχίων τσιπούρας προς προετοιμασία για μικροσκοπία. Προσωπικό αρχείο

Η παρασιτολογική εξέταση των ιχθύων πραγματοποιήθηκε σε νωπά και μονιμοποιημένα παρασκευάσματα σύμφωνα με τις μεθόδους, που έχουν περιγράψει οι Roberts (1989) και Athanassopoulou (1990). Η ταυτοποίηση των παρασίτων έγινε αμέσως μετά την ανεύρεσή τους, με την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων και σε συνδυασμό με τα μονιμοποιηθέντα παρασκευάσματα με βάση τις κλείδες των Yamaguti (1963), Athanassopoulou (1990).

2.1.6 Ιστοπαθολογική εξέταση

Με τις ιστολογικές εξετάσεις εξετάζεται η εσωτερική μορφολογία, και συγκεκριμένα η μικροσκοπική ανατομική του ιστολογικού υλικού για την διάκριση ιστικών αλλοιώσεων.

Στη δική μας έρευνα χρησιμοποιήσαμε 10 ιχθύδια από τις δειγματοληψίες μας, που τοποθετήθηκαν σε δοχεία με φορμόλη 10% για τις ιστολογικές μας εξετάσεις. Τα βήματα που ακολουθούμε είναι τα παρακάτω:

- Μονιμοποίηση του ιστού με 10% φορμόλη
- Επεξεργασία του ιστού με την βοήθεια ιστοκινέτας (αφυδάτωση, διαύγαση, και εμποτισμός σε παραφίνη)
- Παραγωγή τομών ιστού πάχους 5μm με την μικροτόμο

- Χρώση (αιματοξυλίνη – εωσίνη)
- Μικροσκόπηση (Drury, 1980)

2.1.7 Μοριακή ταυτοποίηση-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την επιβεβαίωση του νοσήματος της φωτοβακτηριδίασης όσο και για τον έλεγχο φορέων του νοσήματος μεταξύ φαινομενικά υγιών δειγμάτων. Επιπλέον, έχουν δημοσιευθεί αρκετές προσπάθειες για την επιλογή κατάλληλων εκκινητών PCR για διάκριση μεταξύ των στενά συγγενών υποειδών *Photobacterium damsela* subspecies, *Ph.d.p.* και *Ph.d.d.*.

Για το σκοπό αυτό, τυποποιημένα, εύχρηστα, εμπορικά kit qPCR είναι διαθέσιμα από διάφορες εταιρείες. Τα εμπορικά kit PCR έχουν σχεδιαστεί για την in vitro ποσοτική ανίχνευση γονιδιωμάτων *Ph.d.p* ώστε να καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αυτών και ταυτόχρονα να είναι ειδικά για το γονιδίωμα του βακτηρίου- στόχου. Οι εκκινητές και οι φθοριούχες αλληλουχίες ανιχνευτών σε αυτά τα kit διαθέτουν διπλώματα ευρεσιτεχνίας και έχει δημοσιευθεί ότι έχουν 100% ομολογία με μεγάλο εύρος αλληλουχιών *Ph.d.p.* που βασίζονται σε αναλύσεις βιοπληροφορικής. Τα PCR kit παρέχουν πρότυπες καμπύλες αριθμού αντιγράφων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων ενίσχυσης και εσωτερικά πρότυπα εκχύλισης (DNA ή RNA) για την ποιότητα της εκχύλισης νουκλεϊκού οξέος (NA) προκειμένου να εξαλειφθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Μετά από λύση του ιστού, η διαδικασία εκχύλισης του DNA πραγματοποιείται με τα σχετικά αντιδραστήρια που διατίθενται στο εμπόριο και που διαθέτουν οδηγίες που εφαρμόζονται βήμα- βήμα.

Στην δική μας έρευνα για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το Kit (Genesig DNA/RNA Extraction Kit).

Παράδειγμα θερμικών κύκλων που έχουν προγραμματιστεί σε θερμικό κυκλοποιητή PCR σύμφωνα με εμπορικό qPCR kit ενίσχυσης για *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida*, με προτεινόμενους 50 θερμικούς κύκλους:

Ενεργοποίηση πολυμεράσης	Αποδιάταξη	Υβριδισμός - Επιμήκυνση - Συλλογή δεδομένων
95°C	95°C	60°C
2 min	10 sec	60 sec
	50 cycles	

Παράδειγμα μίγματος αντιδραστηρίων και περιεκτικότητα σε κάθε μικροκυβέτα

Mastermix 10 μl	
Primer/probe mix 1 μl	
RNAse/DNAse free water 4 μl	
Reaction mix volume 15 μl	
DNA template (sample NA extract) 5 μl	
Final volume 20 μl	

Οι αλληλουχίες των εκκινητών είναι αποκλειστικές και δεν αλληλοκαλύπτονται. Ωστόσο, κάθε εργαστήριο μπορεί να επιλέξει να αναπτύξει το δικό του πρωτόκολλο για την ανίχνευση *Ph.d.p.*, παρά να χρησιμοποιήσει τα εμπορικά kit. Οι Carraro *et al.* (2018) σχεδίασαν μια υψηλής ευαισθησίας real-time PCR για ακρίβεια ανίχνευσης και ποσοτικοποίηση του *P. damsela* subsp. *piscicida* και του *P. damsela* subsp. *damsela*. Αυτή, δοκιμάστηκε τόσο για την ακρίβεια όσο και για την ευαισθησία της σε δείγματα που δημιουργήθηκαν στο εργαστήριο όσο και σε πειραματικούς μολυσμένους ιστούς από Τσιπούρες.

Αυτή η ανάλυση στοχεύει την ενίσχυση μέρους της αλληλουχίας του γονιδίου *bamB* χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές PhPisc.B (For και Rev). Δύο απλοί πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων στην περιοχή στόχο του αμπλικονίου καθορίζουν δύο διακριτές καμπύλες διάστασης qPCR, έτσι η ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης (διάστασης) μπορεί να διακρίνει μεταξύ του *Ph.d.p.* -*Ph.d.d.* (Osorio *et al.*, 2000).

Εκκινητές	
Ολιγονουκλεοτίδια	Κατεύθυνση 5' - 3'
PhPisc B (For)	TGCTGGTGGTGTATTCTGGG
PhPisc B (Rev)	AACAGGTGTCGCATCAACGT

Αυτή η ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας οποιαδήποτε όργανο με βάση το χρώμα που υποστηρίζει την ανάλυση καμπύλης αποδιάταξης. Ακολουθεί ένα παράδειγμα χρησιμοποιώντας το Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) στο σύστημα LightCycler 480 (Roche)

Μίγμα αντιδραστηρίων

Παράγοντας	Τελική συγκέντρωση/ Όγκος
PhPisc B (For)	10 uM
PhPisc B (Rev)	10 uM
Platinum SYBR Green Super-Mix-UDG	1X
DNA template	2.5
Water (molecular grade)	To 10 µl
Total volume	10 µl

Θερμικό προφίλ

UDG επώση	Ενεργοποίηση πολυμεράσης	Αποδιάταξη	Υβριδισμός/ επιμήκυνση	Αποδιάταξη
50°C	95°	95°	60°	From 40°C to 95°C
2 min	2 min	10 sec	60 sec	at 4.4°C/s
		45 cycles		

Τα στελέχη *Ph.d.p.* θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από τη θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) 83.3–84°C, ενώ τα *Ph.d.d.* θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από τη θερμοκρασία αποδιάταξης T_m 84.3–84.9°C καθιστώντας τα δύο υποείδη διακριτά.

Για την σωστή ταυτοποίηση του βακτηρίου και ακόμα περισσότερο όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε τα υποείδη του γένους *Photobacterium*, είναι απαραίτητη η χρήση μοριακών μεθόδων. Για τον διαχωρισμό των υποειδών έχει αναπτυχθεί μια multiplex PCR. Στην δική μας έρευνα, χρησιμοποιήθηκε το *Photobacterium damsela* qPCR Test Kit (YouSeq, United Kingdom).

2.1.8 Αντιβιόγραμμα

Το αντιβιόγραμμα, δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της ανθεκτικότητας ή της ευαισθησίας του μικροβιακού στελέχους που εξετάζουμε σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής μας επιτρέπει να εφαρμόσουμε την κατάλληλη και αποτελεσματική θεραπεία αποφεύγοντας την δημιουργία ανθεκτικών στελεχών, αλλά και την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Δημιουργούμε ομογενοποιημένο υλικό από δείγμα του βακτηρίου που καλλιεργήσαμε και αποσταγμένο νερό σε αποστειρωμένο σωλήνα.
- Τοποθετούμε το διάλυμα σε τρυβλίο petri με υπόστρωμα Blood agar & Mueller Hinton, αφαιρώντας μετά από λίγη ώρα την περίσσεια του εναυωρήματος.

- Έπειτα τα διαποτισμένα χάρτινα δισκία (Biomerieux, France) με αντιβιοτικό τοποθετούνται διαμετρικά ώστε να υπάρχει χώρος δράσης.
- Ακολουθεί επώαση στους 25C για 24h στον επωαστικό θάλαμο.
- Παρατήρηση των ομόκεντρων κύκλων που αναπτύσσονται (δακτύλιοι αναστολής). Ο μεγαλύτερος δακτύλιος αναστολής μας δείχνει και το αντιβιοτικό που είναι καταλληλότερο για χορήγηση (Roberts, 1978; Brenner et al., 2005)

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για το Gram (-) *P. damsela* subsp. *piscicida*, είναι η οξυτετρακυκλίνη (OTC,30μg), η Σουλφοναμίδες-Τριμεθοπρίμη (SXT,25μg), το Οξολινικό οξύ (OA,2μg), η φλουμεκίνη (UB,30μg), και η φλορφενικόλη (FFC,30μg).

2.1.9 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα για τη στατιστική ανάλυση αξιολογήθηκαν ως προς την κανονική κατανομή με το τεστ κανονικότητας Shapiro-Wilk και την ομοιογένεια της διακύμανσης με τα τεστ Levene και Bartlett. Η μηδενική υπόθεση της μη ύπαρξης σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων των δειγμάτων, αξιολογήθηκε με τα παραμετρικά one way ANOVA και Student's t-test, όταν τα δεδομένα πληρούσαν την υπόθεση της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διακύμανσης, και με το Welch unequal variances t-test, όταν παραβιαζόταν η υπόθεση της ομοσκεδαστικότητας (Krishnamoorthy, K.; Mathew, T.; Ramachandran, G; 2007). Η μηδενική υπόθεση της μη ύπαρξης σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαμέσων των δειγμάτων αξιολογήθηκε με τις μη παραμετρικές δοκιμές Kruskal Wallis και Mann-Whitney U όταν παραβιάστηκε η υπόθεση της κανονικότητας και με το Mood's median test όταν παραβιαζόταν περαιτέρω η υπόθεση της ομοσκεδαστικότητας (Gerstman, B.B; 2014). Τα post hoc test που χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω συγκρίσεις περιλάμβαναν την παραμετρική δοκιμή Games-Howell Post-Hoc Test και το μη παραμετρικό Dwass-Steel-Critchlow-Fligner pairwise comparisons (Hollenbeck, J. R., & Wright, P. M. 2017). Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του Jamovi Version 2.4.11 (The jamovi project (2021), σε επίπεδο α 0,05

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1.1 Μακροσκοπική και Μικροσκοπική εξέταση

Κατά τη διάρκεια των επισκέψεων στις Μονάδες εκτροφής που μελετήθηκαν παρατηρήθηκαν ιχθύδια με ανορεξία, λήθαργο, σκούρο χρωματισμό του δέρματος που εντοπίζονταν επιφανειακά στους κλωβούς εκτροφής τσιπούρας που πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία. Στη νεκροτομική εξέταση στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, μακροσκοπικά στην εξωτερική επιφάνεια των ιχθυδίων παρατηρήθηκαν επίσης σκούρος χρωματισμός δέρματος, ήπιες αιμορραγίες στα βραγχιακά επικαλύμματα και στην βάση των περυγίων, αναιμικά βράγχια. Στην εξέταση των εσωτερικών οργάνων διαπιστώθηκαν ιστικές αλλοιώσεις σε σπλήνα (διόγκωση) νεφρούς και ήπαρ.(εικόνα 3.1, Α και Β).

Στην υπεροξεία μορφή παρατηρούνται μόνο αιφνίδιοι θάνατοι χωρίς κανένα άλλο σύμπτωμα. Στην οξεία μορφή παρατηρούνται αποχρωματισμός ή σκούρος χρωματισμός και ανορεξία και διόγκωση της κοιλιακής κοιλότητας και φυσικά θνησιμότητα. Στην χρόνια ή υποξεία μορφή παρατηρείται μία συνεχής χαμηλή θνησιμότητα και συνήθως παρατηρείται σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα ή σε ψάρια που επιβίωσαν της οξείας μορφής της νόσου.

Στην οξεία μορφή παρατηρούνται αλλοιώσεις σε ήπαρ και νεφρούς, διόγκωση της σπλήνας και των νεφρών, μικροερυθήματα και πετέχειες σε όργανα και ιστούς και κάποιες φορές άσπρα οζίδια στη σπλήνα, 1-2mm. Αυτά τα οζίδια χαρακτηρίζουν τη χρόνια μορφή της νόσου.

A)



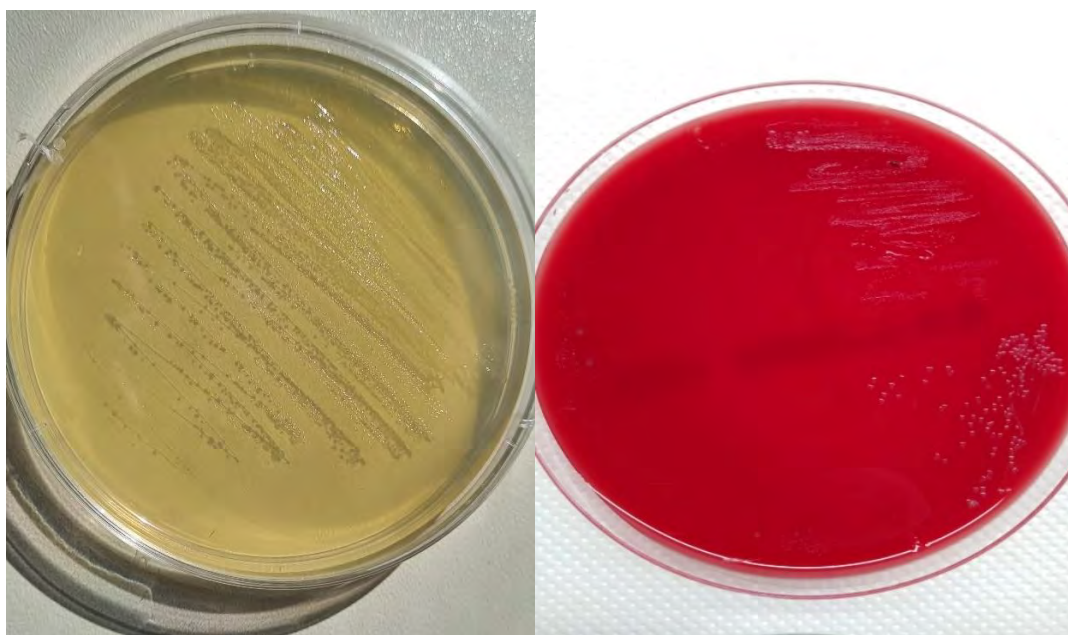
B)



Εικόνα 3.1: Νεκροτομική εξέταση τσιπούρας A) με εμφανή σκουρόχρωμη απόχρωση δέρματος και B) χαρακτηριστική διόγκωση σπλήνα με παρουσία λευκών οζιδίων στο παρέγχυμα. Προσωπικό αρχείο.

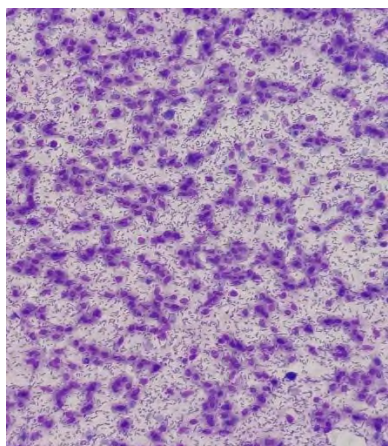
3.1.2 Βακτηριολογική εξέταση

Το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* - το Ph.d.p. είναι ένα αλόφιλο Gram-αρνητικό βακτήριο που εμφανίζεται ως μη κινητή ράβδος διαστάσεων 0,5 x 1,5 μm με διπολική χρώση. Συνήθως, τα βακτηριακά κύτταρα μικραίνουν με την ηλικία και αποκτούν ελλειψοειδές σχήμα. Παρατηρώντας καθαρές καλλιέργειες μακροσκοπικά από Ph.d.p. αποικίες σε TSA έχουν χαρακτηριστική μορφολογία. Μπορεί να έχουν διάμετρο έως 0,5 mm, είναι υπόλευκες (ημιδιαφανή με ακανόνιστα περιθώρια, σαν δροσοσταλίδες, αν παρατηρηθεί υπό την ελαφριά μεγέθυνση του στερεοσκοπίου), κάπως παχύρρευστες και προσκολλόνται καλά στο υπόστρωμα.

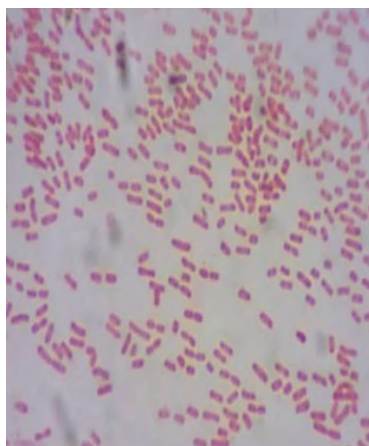


Εικόνα 3.2 : Καλλιέργειες *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* σε τρυβλίο petri με υποστρώματα TSA και Blood agar. Προσωπικό αρχείο.

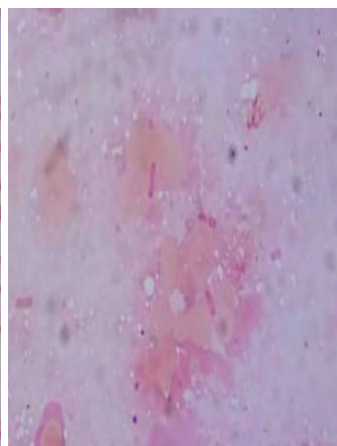
A)



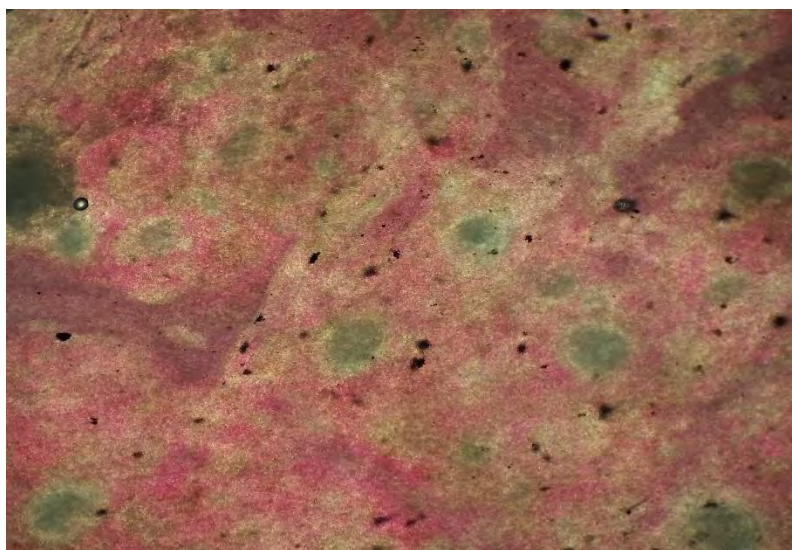
B)



Γ)



Εικόνα 3.3: Χρώσεις από *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* : A) Giemsa σε ιστό σπλήνας με μόλυνση , B) Χρώση Gram από καλλιέργεια, Γ) Διπολική χρώση σε ιστό σπλήνα με μόλυνση. Προσωπικό αρχείο.



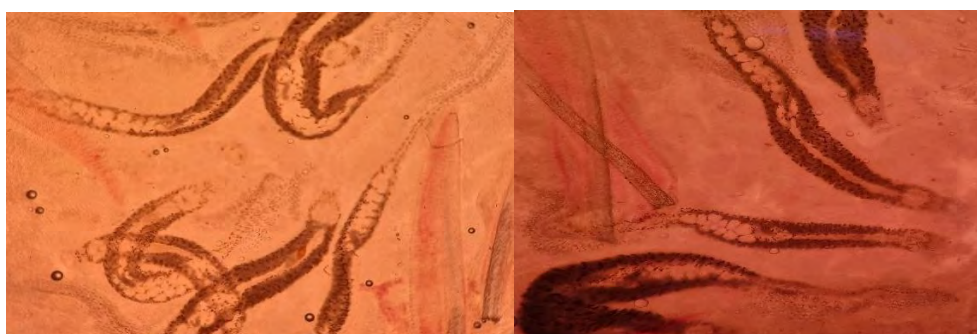
Εικόνα 3.4 : Νωπό παρασκεύασμα σπλήνα με μόλυνση από *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* . Προσωπικό αρχείο

Η ταυτοποίηση του παθογόνου γίνεται αρχικά με βάση τυπικές βιοχημικές δοκιμές. Παρότι όμως το βακτήριο Phdp δεν περιλαμβάνεται στο ευρετήριο κωδικών του

συστήματος ταυτοποίησης API-20E (Biomerieux, France), αυτό το σύστημα μπορεί να είναι χρήσιμο για μια γρήγορη ταυτοποίηση αφού όλα τα στελέχη εμφανίζουν ένα συγκεκριμένο αριθμητικό προφίλ (2005004). (Romalde, 2002).

3.1.3 Παρασιτολογική εξέταση

Τα αποτελέσματα των παρασιτολογικών εξετάσεων αφορούν τον αριθμό παρασίτωσης από το *Sparicotyle chrysophrii* τόσο σε περιστατικά αυξημένων θνησιμοτήτων όσο και σε επίπεδο ελέγχου ρουτίνας στο εργαστήριο. Στη μικροσκοπική εξέταση νωπών παρασκευασμάτων βραγχιών (φακός 10X) παρατηρούμε τις παρακάτω εικόνες (εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Έντονη παρουσία *Sparicotyle chrysophrii* στα βράγχια τσιπούρας. Προσωπικό αρχείο.

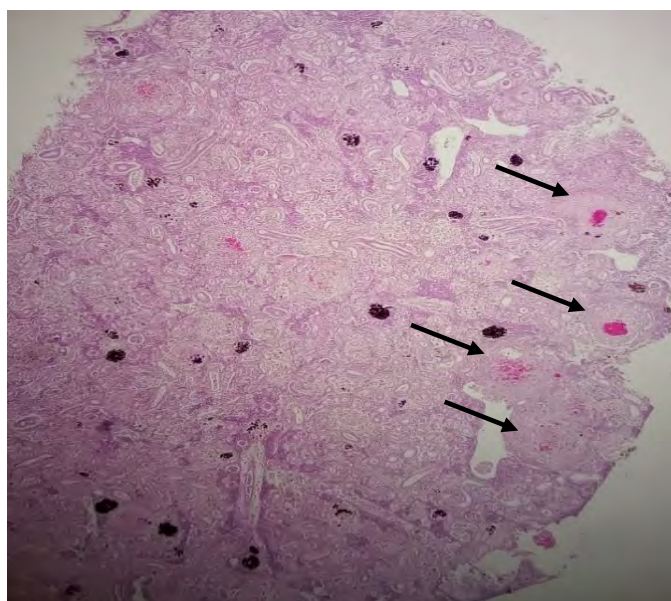
3.1.4 Ιστοπαθολογική εξέταση

Ιστοπαθολογικά, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις εντός των εσωτερικών οργάνων. Κατά την οξεία μορφή παρατηρήθηκαν νεκρώσεις στον σπλήνα και στους νεφρούς, διήθηση από ερυθροκύτταρα και βακτήρια εντός των αιμοφόρων αγγείων και φλεγμονώδης

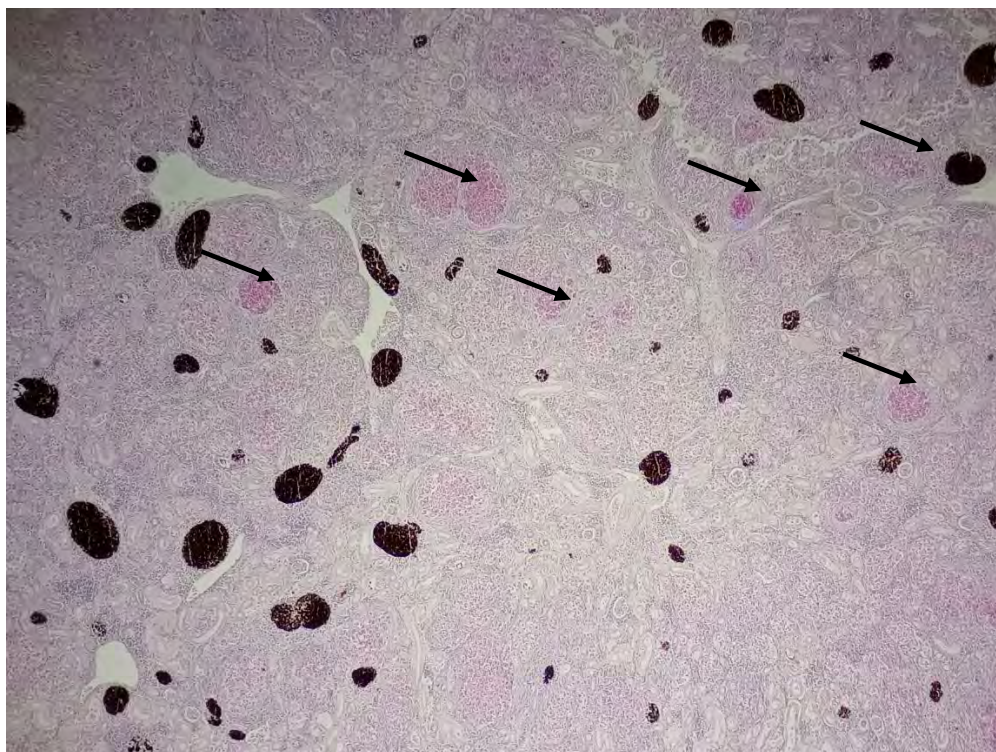
διήθηση (φαγοκύτταρα με παρουσία βακτηρίων). Σπλήνας με συμφόρηση και παρουσία αυξημένου αριθμού μελανομακροφάγων κέντρων εντός του παρεγχύματος.

Κατά την χρόνια μορφή της νόσου, παρατηρήθηκαν εστιακά/πολυεστιακά σαφώς περιγεγραμμένα κοκκιώματα, χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση στην παρουσία των βακτηρίων, μέσα στο παρέγχυμα του σπλήνα και του νεφρού. Τα χαρακτηριστικά κοκκιώματα αποτελούνταν από βακτήρια, επιθηλιοειδή κύτταρα, μακροφάγα σε διάφορα εκφυλιστικά στάδια και περιβάλλονταν από ινώδη συνδετικό ιστό.

Κατά την ιστοπαθολογική εξέταση των βραγχίων, όπου υπήρχε παρουσία του *S. chrysophrii* οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν (μεγέθυνση 4X-40X) αφορούσαν κυρίως την διαταραχή της φυσιολογικής μορφολογίας και ανατομικής δομής των βραγχίων. Παρατηρήθηκαν υπερπλασία και συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπεραιμία των βραγχίων, υπερτροφία και υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων. Επίσης παρατηρήθηκαν εστιακά νεκρώσεις και αιμορραγίες των πρωτογενών και δευτερογενών νηματίων.



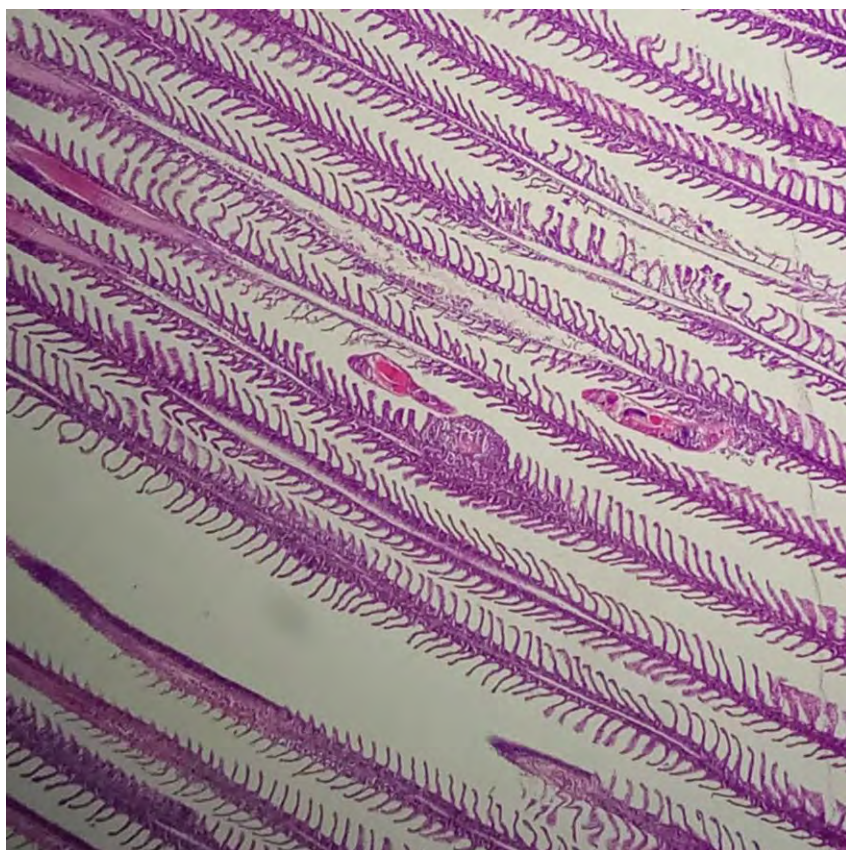
Εικόνα 3.6: Περιγεγραμμένα κοκκιώματα, χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση στην παρουσία των βακτηρίων, μέσα στο παρέγχυμα του νεφρού (μεγέθυνση 4x). Προσωπικό αρχείο.



Εικόνα 3.7: Περιγεγραμμένα κοκκιώματα, χρόνια φλεγμονώδης αντίδραση στην παρουσία των βακτηρίων, μέσα στο παρέγχυμα του νεφρού (μεγέθυνση 40x). Προσωπικό αρχείο.



Εικόνα 3.8: *S. chrysophrii* ανάμεσα στα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια, χρώση αιματοξυλίνη-εωσίνη (μεγέθυνση 10x). Προσωπικό αρχείο.



Εικόνα 3.9 : *S. chrysophrii* ανάμεσα στα πρωτογενή βραγχιακά νημάτια, υπερπλασία & συγκόλληση των δευτερογενών βραγχιακών, χρώση αιματοξυλίνη–εωσίνη (μεγέθυνση 4x). Προσωπικό αρχείο.

3.1.5 Μοριακή ταυτοποίηση- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης (PCR), επιβεβαίωσαν ότι το υπεύθυνο παθογόνο αίτιο στις περιπτώσεις των ψαριών με τα συμπτώματα και τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις, ήταν το βακτήριο *P. damsela* subsp. *piscicida*.

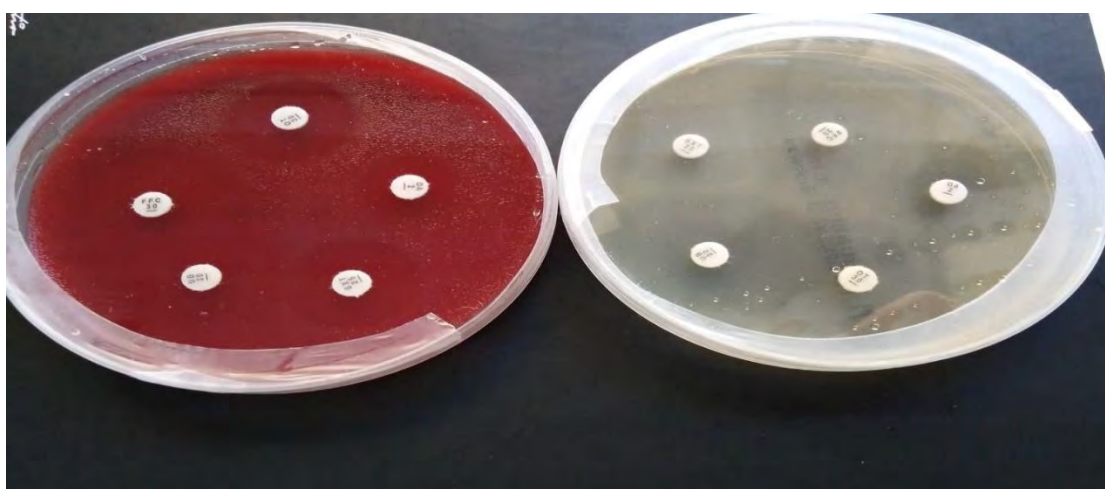
Όλα τα δείγματα που ήταν θετικά με βάση τις μικροσκοπικές και μικροβιολογικές εξετάσεις, ήταν επίσης θετικά με βάση τις μοριακές εξετάσεις.

3.1.6 Αντιβιογράμμα

Η ευαισθησία του απομονωμένου στελέχους *Photobacterium damsela* subs. *piscicida* στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήσαμε προσδιορίστηκε μέσω της μεθόδου διάχυσης δίσκου. Η διάμετρος της ζώνης περιορισμού καταγράφηκε, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (εικόνα 3.10) και λαμβάνοντας υπ'όψιν και το κόστος θεραπείας σε μεγάλη βιομάζα αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν παρασκευάσματα με δραστική ουσία την οξυτετρακυκλίνη και τη Σουλφοναμίδη-Τριμεθοπρίμη.

Πίνακας 3.1. Μέτρηση διαμέτρου ζώνης περιορισμού. Προσωπικό αρχείο.

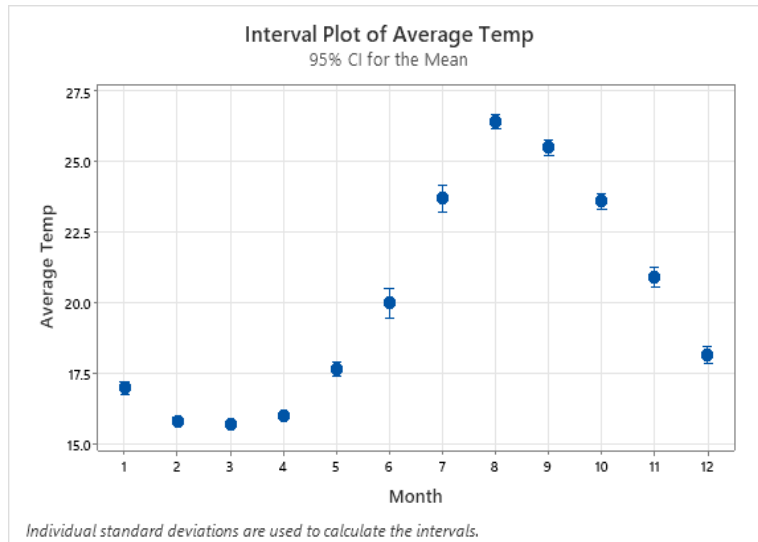
Αντιβιοτικό	Διάμετρος ζώνης περιορισμού (cm)
Φλορφενικόλη	3,5
Οξυτετρακυκλίνη	2,7
Φλουμεκίνη	2,3
Σουλφοναμίδη-Τριμεθοπρίμη	2,6
Οξολινικό οξύ	1,3



Εικόνα 3.10 : Αντιβιογράμματα σε σε τρυβλίο petri με υπόστρωμα Blood agar & Mueller. Προσωπικό αρχείο.

3.1.7 Στατιστική ανάλυση

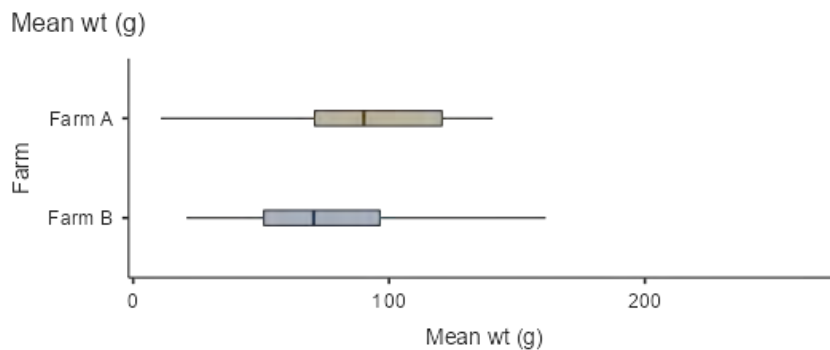
3.1.7.1 Μέση μηνιαία θερμοκρασία των Μονάδων εκτροφής



Γράφημα 3.1. Γράφημα διαστήματος της μηνιαίας θερμοκρασίας στην περιοχή μελέτης. Οι κουκίδες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο και οι μπάρες το διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI).

Η διακύμανση της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας για ένα έτος στις μονάδες εκτροφής που εξετάσαμε παρουσιάζονται στο γράφημα 3.1. Η μικρότερη μέση θερμοκρασία καταγράφεται τον Μάρτιο (15,7°C) και η υψηλότερη τον Αύγουστο (26,4°C), με την μέση ετήσια τιμή να βρίσκεται στους 20,05°C . Μεγαλύτερες μεταβολές μέσης θερμοκρασίας παρουσιάζονται τις περιόδους Ιουνίου- Ιουλίου (άνοδος μέσης θερμοκρασίας 3,6°C) και του Νοεμβρίου-Δεκεμβρίου (πτώση μέσης θερμοκρασίας 2,7°C).

3.1.7.2 Σύγκριση Μέσου Βάρους Ιχθυοπληθυσμών στις μονάδες εκτροφής που μελετήθηκαν



Θηκόγραμμα 3.1 : Συγκριτικό θηκόγραμμα (boxplot) της διακύμανσης του βάρους των ατόμων σε κάθε περιοχή μελέτης (τα κουτιά αντιπροσωπεύουν το 50% των δεδομένων, οι κάθετες γραμμές εκατέρωθεν το ανώτερο και κατώτερο 25% των δεδομένων και οι οριζόντιες μαύρες γραμμές τη διάμεσο).

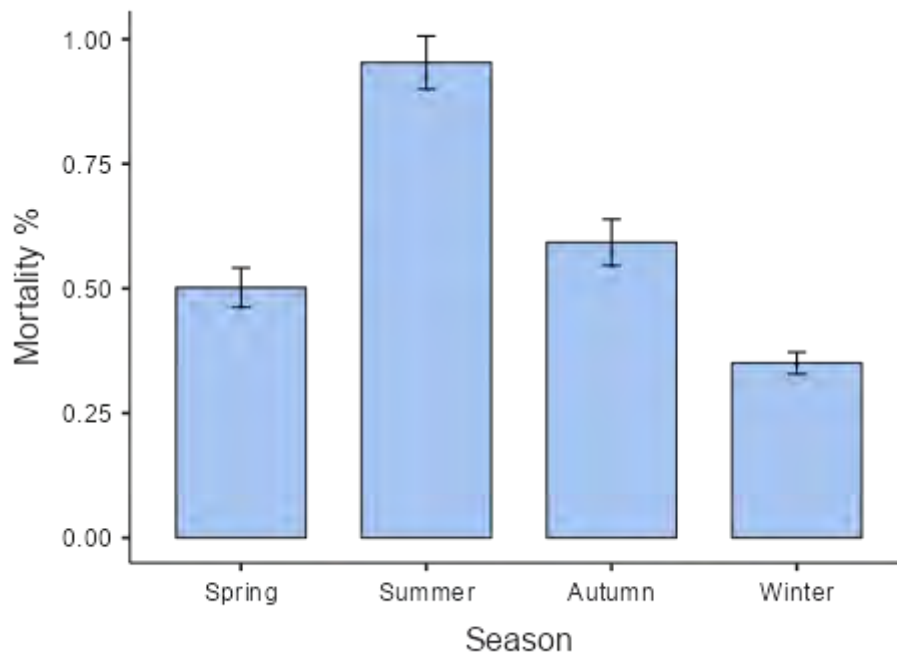
Independent Samples T-Test

		Statistic	p
Mean wt (g)	Mann-Whitney U	2840.00	0.035

Note. $H_a: \mu_{\text{Farm A}} \neq \mu_{\text{Farm B}}$

Η σύγκριση του Μέσου Βάρους αφορά μόνο τους ιχθυοπληθυσμούς τσιπούρας, όπου είναι και το αντικείμενο μελέτης των παθογόνων και των θνησιμοτήτων που σχετίζονται μ' αυτά, και μόνο για ένα ημερολογιακό έτος. Τα δεδομένα αφορούν ψάρια που η εισαγωγή τους στις μονάδες εκτροφής πραγματοποιήθηκε αρχές του έτους 2021, με καταγραφή θνησιμοτήτων από τα 20γρ και καθ' όλη την παραγωγική διαδικασία μέχρι τέλους του έτους. Τα αποτελέσματά μας αφορούν ψάρια και των δύο μονάδων με τα Μέσα Βάρη να αφορούν κυρίως μεγέθη μικρότερα από 100γρ, όπου και παρατηρούνται και τα περισσότερα περιστατικά θνησιμοτήτων.

3.1.7.3 Σύγκριση του ποσοστού θνησιμότητας ανά εποχή



Ραβδόγραμμα 3.1: Συγκριτικό ραβδόγραμμα του ποσοστού της εποχιακής ολικής θνησιμότητας (οι μπάρες συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα).

Εξετάζοντας τα αίτια θνησιμοτήτων συγκεντρωτικά ανά εποχή παρατηρούμε ότι τα αυξημένα περιστατικά θνησιμοτήτων καταγράφονται τους καλοκαιρινούς και τους φθινοπωρινούς μήνες.

One-Way ANOVA (Welch's)

	F	df1	df2	p
Mortality %	39.86	3	473.47	< .001

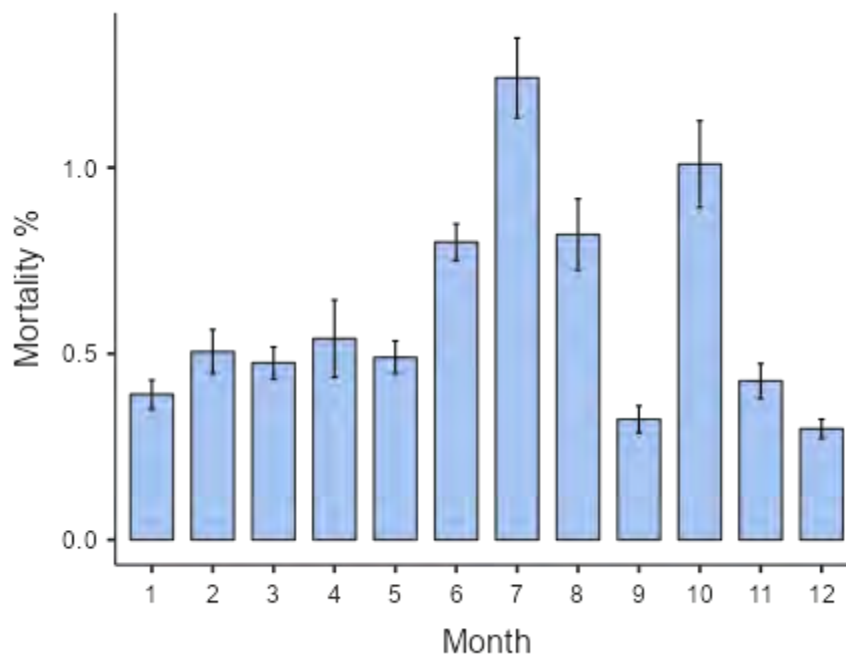
Post Hoc Tests

Games-Howell Post-Hoc Test – Mortality %

		Spring	Summer	Autumn	Winter
Spring	Mean difference	—	-0.45 ***	-0.09	0.15 **
	p-value	—	< .001	0.448	0.005
Summer	Mean difference		—	0.36 ***	0.60 ***
	p-value		—	< .001	< .001
Autumn	Mean difference			—	0.24 ***
	p-value			—	< .001
Winter	Mean difference				—
	p-value				—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

3.1.7.4 Σύγκριση ποσοστού θνησιμοτήτων ανά μήνα



Ραβδόγραμμα 3.2 :Συγκριτικό ραβδόγραμμα του ποσοστού της μηνιαίας ολικής θνησιμότητας (οι μπάρες συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα).

Από τις δύο εποχές (καλοκαίρι και φθινόπωρο) που εμφανίζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμοτήτων ξεχωρίζουν οι μήνες Ιούλιος (Mean = 1,24) και Οκτώβριος (Mean= 1.01) με ποσοστά θνησιμοτήτων να καταγράφονται πάνω από 1%.

One-Way ANOVA (Welch's)

	F	df1	df2	p
Mortality %	17.36	11	267.31	< .001

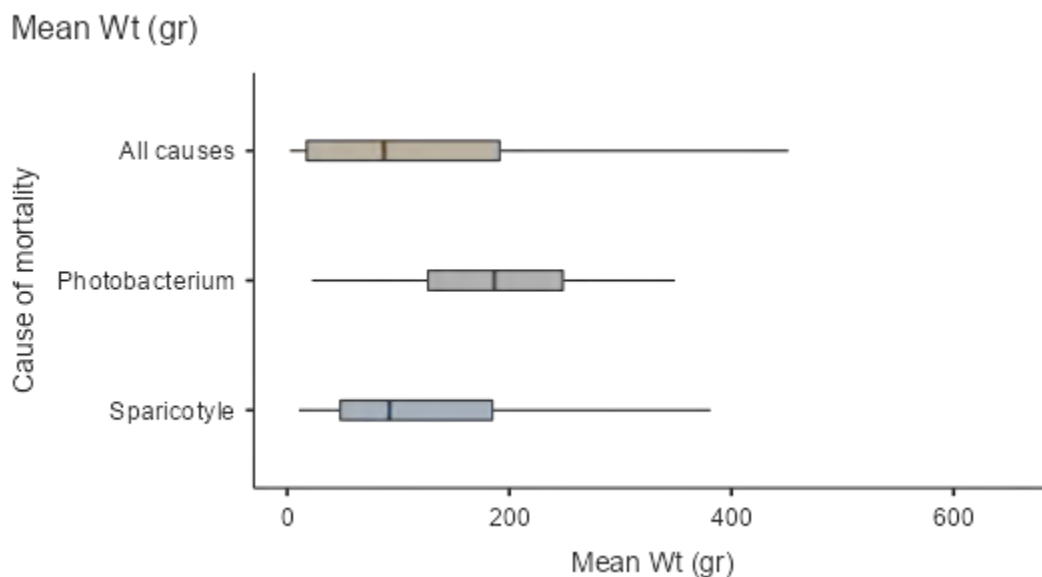
Post Hoc Tests

Games-Howell Post-Hoc Test – Mortality %

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Mean difference	—	-0.11	-0.08	-0.15	-0.10	-0.41***	-0.85***	-0.43**	0.07	-0.62***	-0.04	0.09
	p-value	—	0.892	0.942	0.968	0.864	< .001	< .001	0.003	0.979	< .001	1.000	0.682
2	Mean difference		—	0.03	-0.04	0.02	-0.29*	-0.74***	-0.31	0.18	-0.50**	0.08	0.21
	p-value		—	1.000	1.000	1.000	0.015	< .001	0.196	0.303	0.009	0.996	0.100
3	Mean difference			—	-0.07	-0.01	-0.32***	-0.77***	-0.34	0.15	-0.53**	0.05	0.18*
	p-value			—	1.000	1.000	< .001	< .001	0.055	0.234	0.002	1.000	0.031
4	Mean difference				—	0.05	-0.26	-0.70***	-0.28	0.22	-0.47	0.11	0.24
	p-value				—	1.000	0.517	< .001	0.707	0.710	0.117	0.997	0.515
5	Mean difference					—	-0.31***	-0.75***	-0.33	0.17	-0.52**	0.06	0.19*
	p-value					—	< .001	< .001	0.085	0.151	0.003	0.998	0.017
6	Mean difference						—	-0.44*	-0.02	0.48***	-0.21	0.37***	0.50***
	p-value						—	0.013	1.000	< .001	0.884	< .001	< .001
7	Mean difference							—	0.42	0.92***	0.23	0.81***	0.94***
	p-value							—	0.138	< .001	0.948	< .001	< .001
8	Mean difference								—	0.50***	-0.19	0.39*	0.52***
	p-value								—	< .001	0.984	0.015	< .001
9	Mean difference									—	-0.69***	-0.10	0.03
	p-value									—	< .001	0.842	1.000
10	Mean difference										—	0.58***	0.71***
	p-value										—	< .001	< .001
11	Mean difference											—	0.13
	p-value											—	0.399
12	Mean difference												—
	p-value												—

Note. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001

3.1.7.5 Θνησιμότητες ανά Μέσο βάρος σε σχέση το αίτιο θνησιμότητας



Θηκόγραμμα 3.2 : Συγκριτικό θηκόγραμμα (boxplot) της διακύμανσης του βάρους των ατόμων σε σχέση με την αιτία θνησιμότητας (τα κουτιά αντιπροσωπεύουν το 50% των δεδομένων, οι κάθετες γραμμές εκατέρωθεν το ανώτερο και κατώτερο 25% των δεδομένων και οι οριζόντιες μαύρες γραμμές τη διάμεσο).

Τα αίτια θνησιμότητας διαχωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, θνησιμότητα από: Α) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Β) *Sparicotyle chrysophrii* και Γ) οποιοδήποτε άλλο αίτιο θνησιμότητας που καταγράφηκε είτε από παθογόνο είτε καταγραφές θνησιμοτήτων από διάφορους χειρισμούς που υπόκεινται οι κλωβοί εκτροφής στη διάρκεια του έτους (all causes). Από την καταγραφή των αποτελεσμάτων, παρατηρείται ότι ψάρια με μικρότερο Μέσο Βάρος (<210g) εμφανίζουν υψηλότερη θνησιμότητα από τα παθογόνα *Sparicotyle chrysophrii* και *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Το αίτιο all causes παρατηρείται περισσότερο διάστημα κατά τη παραγωγική διαδικασία.

One-Way ANOVA (Non-parametric)

Kruskal-Wallis

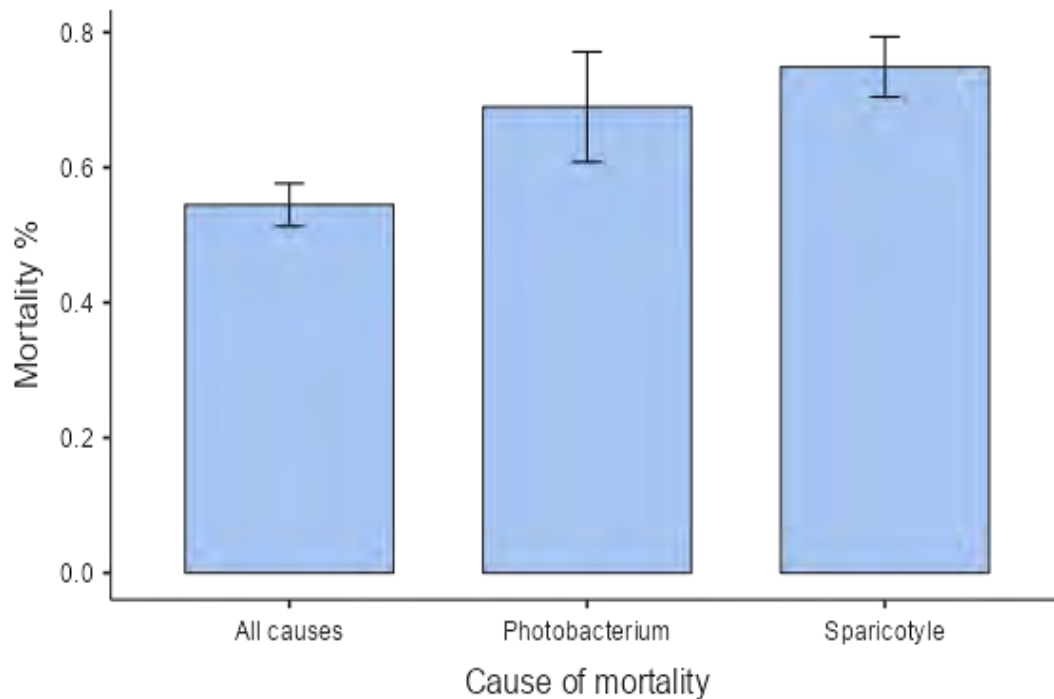
	χ^2	df	p
Mean Wt (gr)	81.65	2	<.001

Dwass-Steel-Critchlow-Fligner pairwise comparisons

Pairwise comparisons - Mean Wt (gr)

		W	p
All causes	Photobacterium	11.19	<.001
All causes	Sparicotyle	6.19	<.001
Photobacterium	Sparicotyle	-10.47	<.001

3.1.7.6 Σύγκριση ποσοστού θνησιμότητας ανά αίτιο



Ραβδόγραμμα 3.3 : Συγκριτικό ραβδόγραμμα του ποσοστού θνησιμότητας σε σχέση με το αίτιο θνησιμότητας (οι μπάρες συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα).

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα και των δύο μονάδων εκτροφής παρατηρείται πως το μεγαλύτερο ποσοστό καταγραφής θνησιμοτήτων, και συνεπώς το μεγαλύτερο πρόβλημα στην εκτροφή τσιπούρας, οφείλεται στο αίτιο *Sparicotyle chrysophrii*. Ακολουθεί το αίτιο *Photobacterium damsela piscicida* και το all causes.

Descriptives

								Shapiro-Wilk	
	Cause of mortality	N	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	W	p
Mortality %	All causes	403	0.54	0.39	0.64	0.02	8.48	0.55	<.001
	Photobacterium	137	0.69	0.43	0.95	0.02	7.23	0.60	<.001
	Sparicotyle	472	0.75	0.43	0.97	0.01	7.40	0.69	<.001

One-Way ANOVA (υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αιτιών all causes και *Sparicotyle chrysophrii*)

One-Way ANOVA (Welch's)

	F	df1	df2	p
Mortality %	7.36	2	356.09	<.001

Post Hoc Tests

Games-Howell Post-Hoc Test – Mortality %

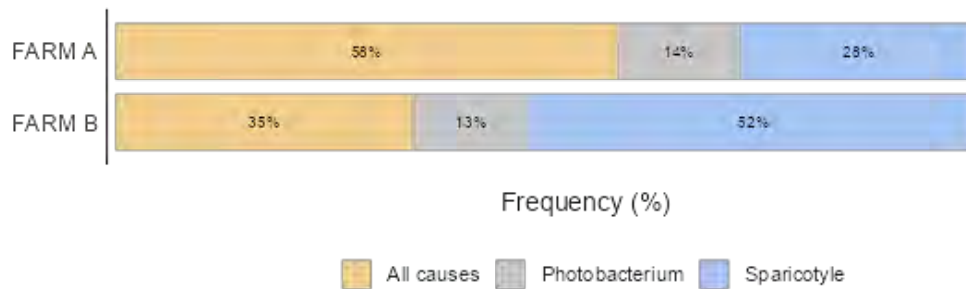
		All causes	Photobacterium	Sparicotyle	
All causes	Mean difference	—	-0.14	-0.20	***
	p-value	—	0.225	<.001	
Photobacterium	Mean difference	—	—	-0.06	
	p-value	—	—	0.799	

Games-Howell Post-Hoc Test – Mortality %

	All causes	Photobacterium	Sparicotyle
Sparicotyle	Mean difference	—	—
	p-value	—	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

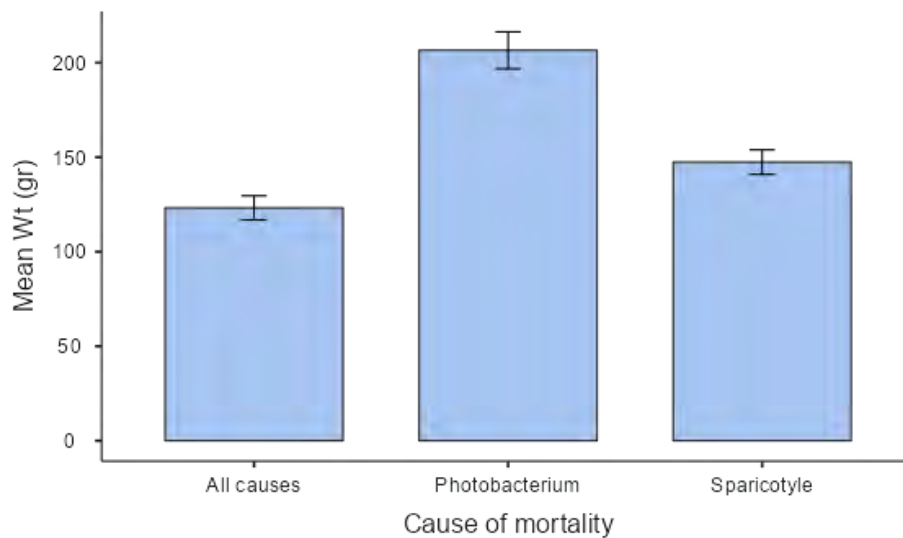
Cause of mortality



Ραβδόγραμμα 3.4 :Συγκριτικό στοιβαγμένο ραβδόγραμμα του ποσοστού θνησιμότητας από κάθε αίτιο μεταξύ των περιοχών μελέτης.

Στη σύγκριση των Μονάδων εκτροφής, σχετικά με το ποσοστό της εμφάνισης του αιτίου θνησιμότητας, παρατηρείται μεγαλύτερο ποσοστό για το αίτιο *Sparicotylae chrysophrii* σε σχέση με το *Photobacterium damsela piscicida* και στις δύο περιχές μελέτης. Στην Pharm B το αίτιο *Sparicotyle chrysophrii* ξεπερνά το 50%. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι το αίτιο *Photobacterium damsela subsp. piscicida* εμφανίζεται σχεδόν με το ίδιο ποσοστό στις δύο μονάδες εκτροφής.

3.1.7.7 Σύγκριση Μέσου Βάρους ψαριών ανά αίτιο θνησιμότητας



Ραβδόγραμμα 3.5 : Συγκριτικό ραβδόγραμμα του μέσου βάρους των ατόμων που εμφάνισαν θνησιμότητα σε σχέση με το αίτιο θνησιμότητας (οι μπάρες συμβολίζουν το τυπικό σφάλμα).

Τα ψάρια μεγαλύτερου Μέσου Βάρους εμφανίζουν καταγραφές θνησιμοτήτων από *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (206.57g) ενώ οι καταγραφές θνησιμοτήτων από *Sparicotyle chrysophrii* (147.40g) περιορίζονται σε μικρότερα ψάρια, όπως και από το αίτιο all causes (123,18g) που περιλαμβάνει καταγραφές θνησιμοτήτων και από χειρισμούς φαρμακευτικών λουτρών.

Descriptives

								Shapiro-Wilk	
	Cause of mortality	N	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	W	p
Mean Wt (gr)	All causes	403	123.18	87.14	128.44	2.66	653.74	0.83	<.001
	Photobacterium	137	206.57	186.22	114.24	22.40	567.29	0.87	<.001

Descriptives

Cause of mortality	N	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk	
							W	p
Sparicotyle	472	147.40	92.11	140.75	10.59	655.11	0.79	<.001

One-Way ANOVA (Welch's)

	F	df1	df2	p
Mean Wt (gr)	25.50	2	406.54	<.001

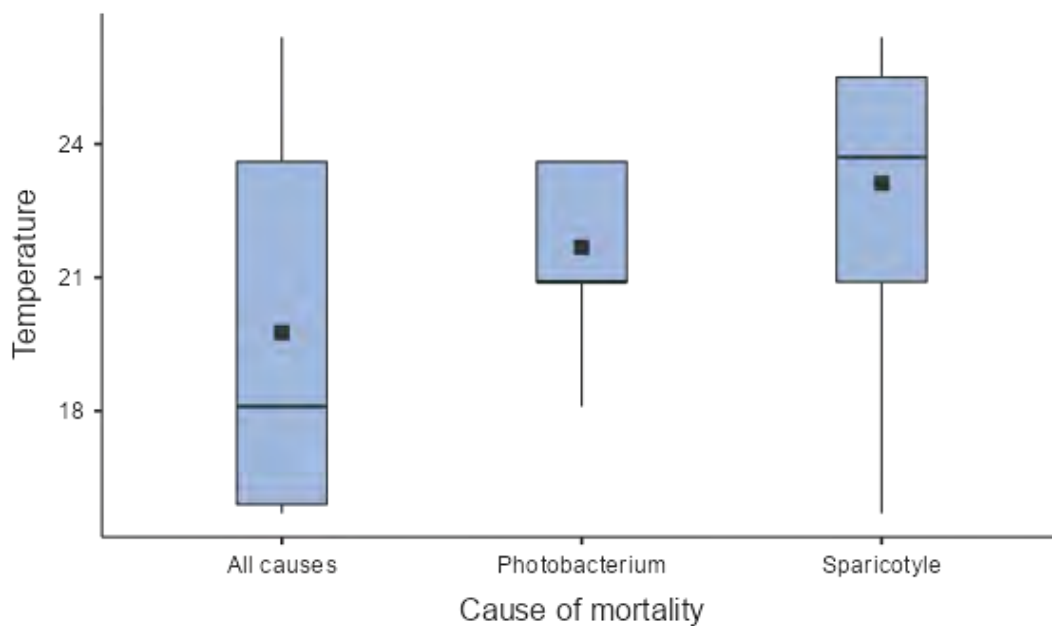
Post Hoc Tests

Games-Howell Post-Hoc Test – Mean Wt (gr)

		All causes	Photobacterium	Sparicotyle
All causes	Mean difference	—	-83.40 ***	-24.22 *
	p-value	—	<.001	0.022
Photobacterium	Mean difference	—	—	59.17 ***
	p-value	—	—	<.001
Sparicotyle	Mean difference	—	—	—
	p-value	—	—	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

3.1.7.8 Θερμοκρασία που εμφανίζεται το αίτιο θνησιμότητας



Θηκόγραμμα 3.3 : Συγκριτικό θηκόγραμμα (boxplot) της επικρατούσας θερμοκρασίας σε σχέση με το αίτιο θνησιμότητας (τα κουτιά αντιπροσωπεύουν το 50% των δεδομένων, οι κάθετες γραμμές εκατέρωθεν το ανώτερο και κατώτερο 25% των δεδομένων, τα μαύρα τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή, οι οριζόντιες μαύρες γραμμές τη διάμεσο).

Η θερμοκρασία φαίνεται να είναι ο ευαίσθητος παράγοντας που θέτει τα όρια για την έξαρση νοσημάτων από το *Photobacteria damsela* subsp. *piscicida* (21-23,5°C), καθώς παρατηρούμε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών για καταγραφές θνησιμοτήτων από *Sparicotyle chrysophrii* (21-25°C), που εμφανίζεται στη μεγαλύτερη περίοδο της παραγωγικής διαδικασίας.

One-Way ANOVA (Non-parametric)

Kruskal-Wallis

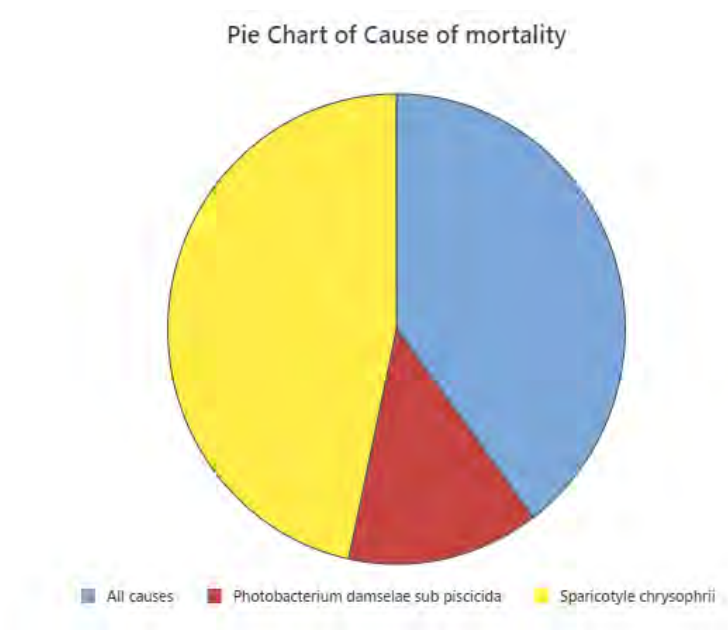
	χ^2	df	p
Temperature	198.32	2	<.001

Dwass-Steel-Critchlow-Fligner pairwise comparisons

Pairwise comparisons - Temperature

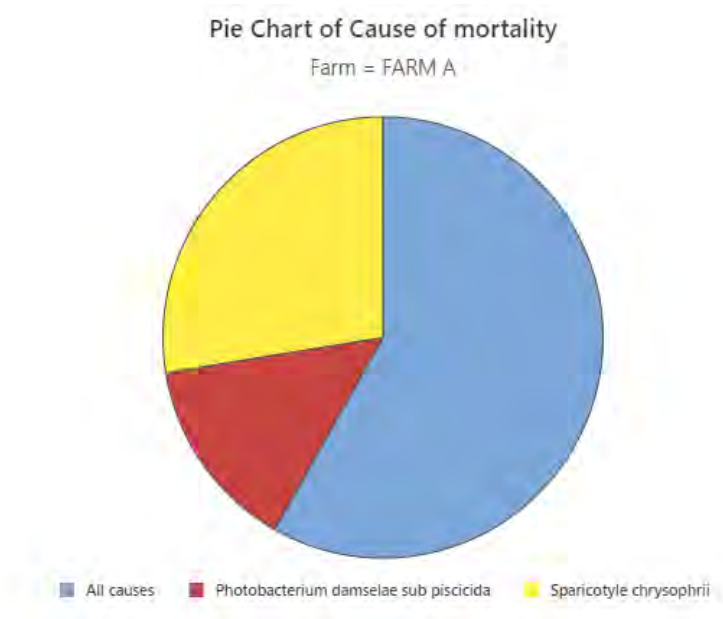
		W	p
All causes	Photobacterium	8.92	< .001
All causes	Sparicotyle	18.72	< .001
Photobacterium	Sparicotyle	9.97	< .001

3.1.7.9 Διαγράμματα πίττας ανά αίτιο θνησιμότητας για τις μονάδες μελέτης

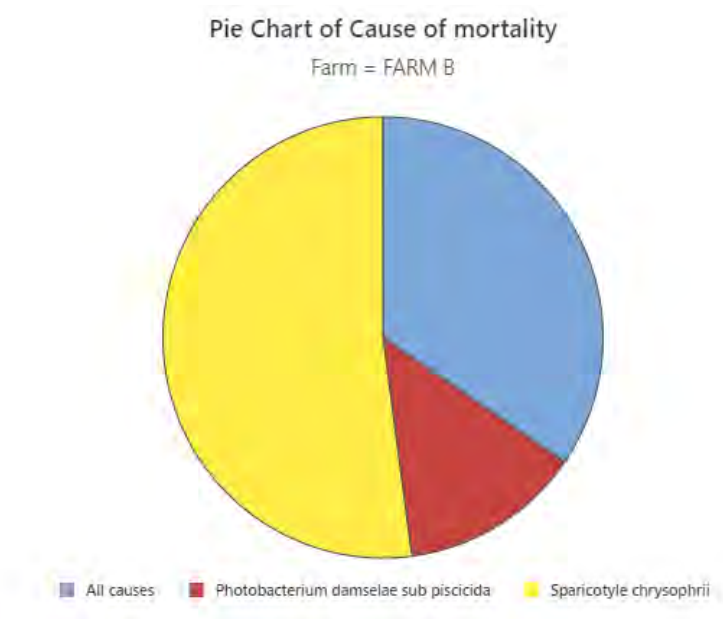


Διάγραμμα πίττας 3.1 : Διάγραμμα πίτας του αιτίου θνησιμότητας για το σύνολο των θνησιμοτήτων των δύο Μονάδων.

Η παρασίτωση από *Sparicotyle chrysophrii* εμφανίζεται ως το επικρατέστερο αίτιο θνησιμότητας (47%) σύμφωνα με τις καταγραφές της παραγωγικής διαδικασίας καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και στις δύο μονάδες έρευνας. Ακολουθεί το αίτιο all causes (40%) που περιλαμβάνει τους χειρισμούς των κλωβών εκτροφής κατά την παραγωγική διαδικασία αλλά και οποιοδήποτε άλλο παθογόνο παράγοντα που προκαλεί θνησιμότητες και έχει καταγραφεί ως αίτιο θνησιμότητας (επιθηλιοκύστη, καταιγίδα, χειρισμοί). Τέλος, σημαντικό μέρος της συνολικής θνησιμότητας καταλαμβάνει και η νόσηση από *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (13%), δεδομένου της μικρής χρονικά περιόδου που εμφανίζεται στο σύνολο της παραγωγικής διαδικασίας.



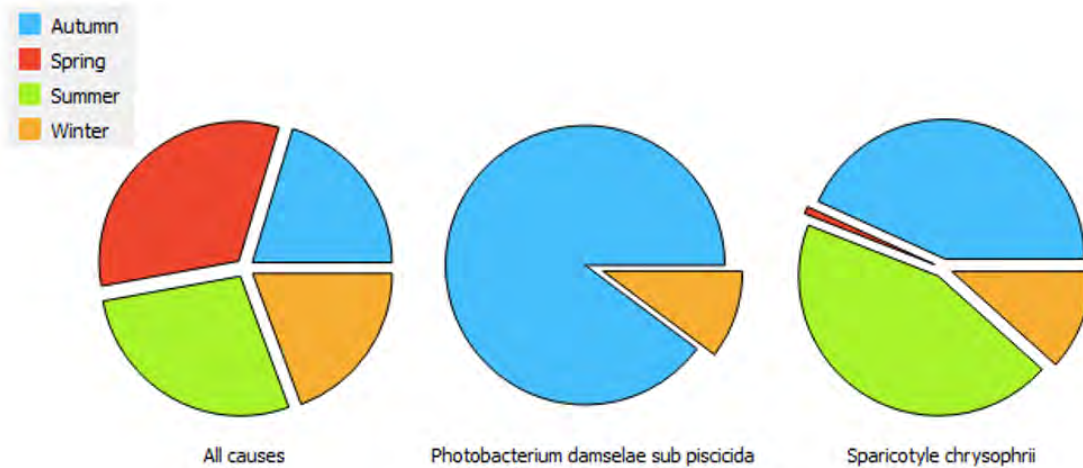
Διάγραμμα πίττας 3.2 : Διάγραμμα πίττας του αιτίου θνησιμότητας για τις θνησιμότητες της μονάδας εκτροφής Α.



Διάγραμμα πίττας 3.3 : Διάγραμμα πίττας του αιτίου θνησιμότητας για τις θνησιμότητες της μονάδας εκτροφής Β.

Το αίτιο all causes φαίνεται να είναι η συχνότερη καταγραφή θνησιμότητας για την Farm A σε σχέση με την Farm B που η παρασίτωση από *Sparicotyle chrysophrii* αναφέρεται σε πάνω από 50% των καταγραφών. Η εμφάνιση θνησιμότητας από

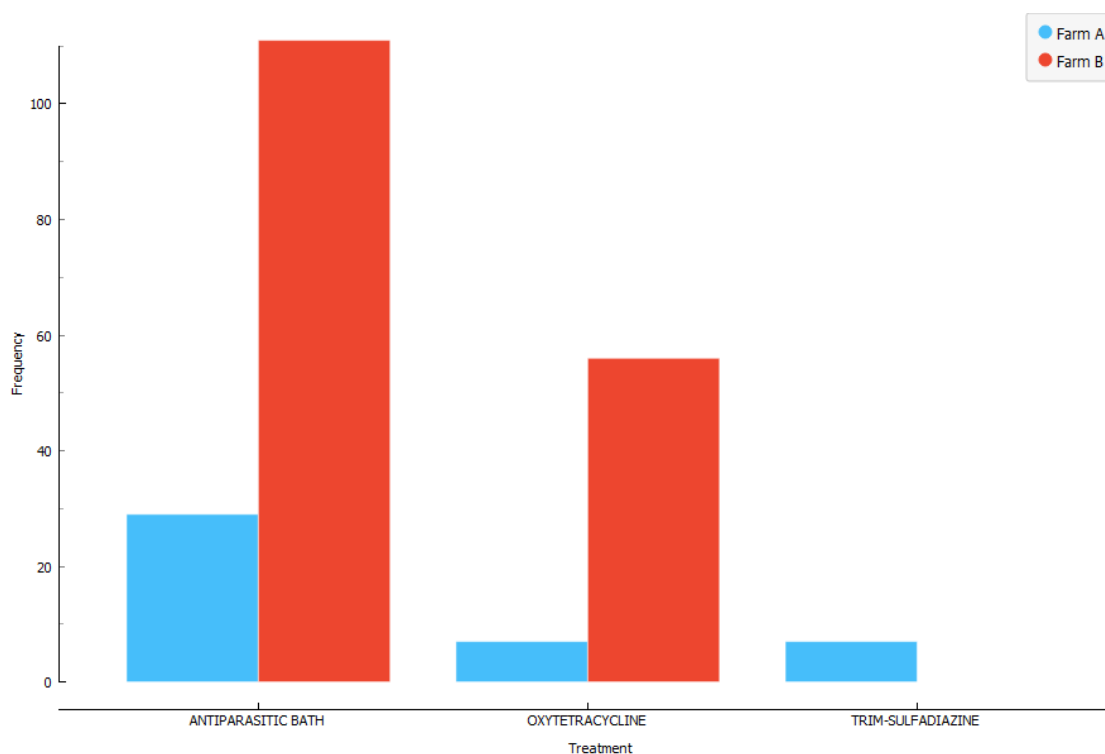
Photobacterium damsela piscicida εμφανίζεται και στις δύο μονάδες με την ίδια ένταση.



Διάγραμμα πίτας 3.4 : Διαγράμματα πίτας του εποχιακού αριθμού των συνολικών θνησιμοτήτων ανάλογα με το αίτιο θνησιμότητας και στις δύο μονάδες μελέτης συνολικά.

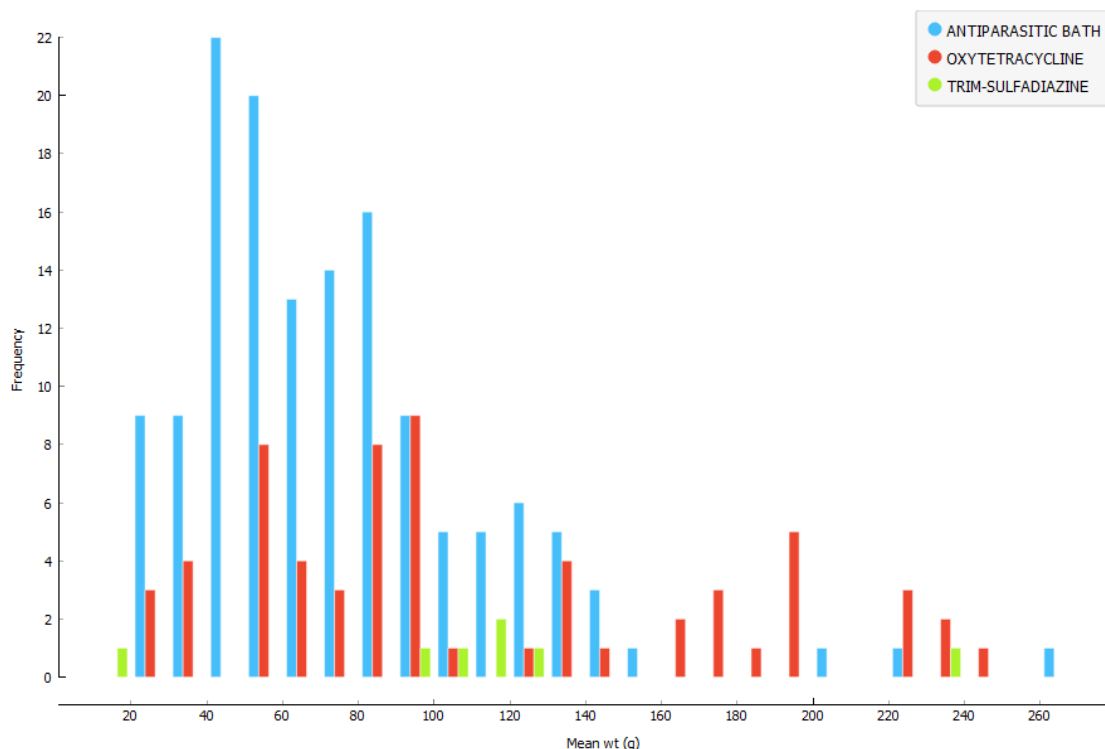
Τους φθινοπωρινούς μήνες καταγράφεται η μεγαλύτερη θνησιμότητα από *Photobacterium damsela piscicida*, με ταυτόχρονη σημαντική παρουσία την παρασίτωση από *Sparicotyle chrysophrii* στις καταγραφές θνησιμοτήτων. Τους καλοκαιρινούς μήνες η παρασίτωση από *Sparicotyle chrysophrii* είναι το κύριο αίτιο θνησιμότητας, ενώ την άνοιξη οι καταγραφές θνησιμοτήτων περιορίζονται στο αίτιο all causes, το οποίο σχεδόν ισομοιράζεται σε όλη τη διάρκεια του χρόνου.

3.1.7.10 Ραβδογράμματα θεραπειών που εφαρμόστηκαν στις μονάδες μελέτης



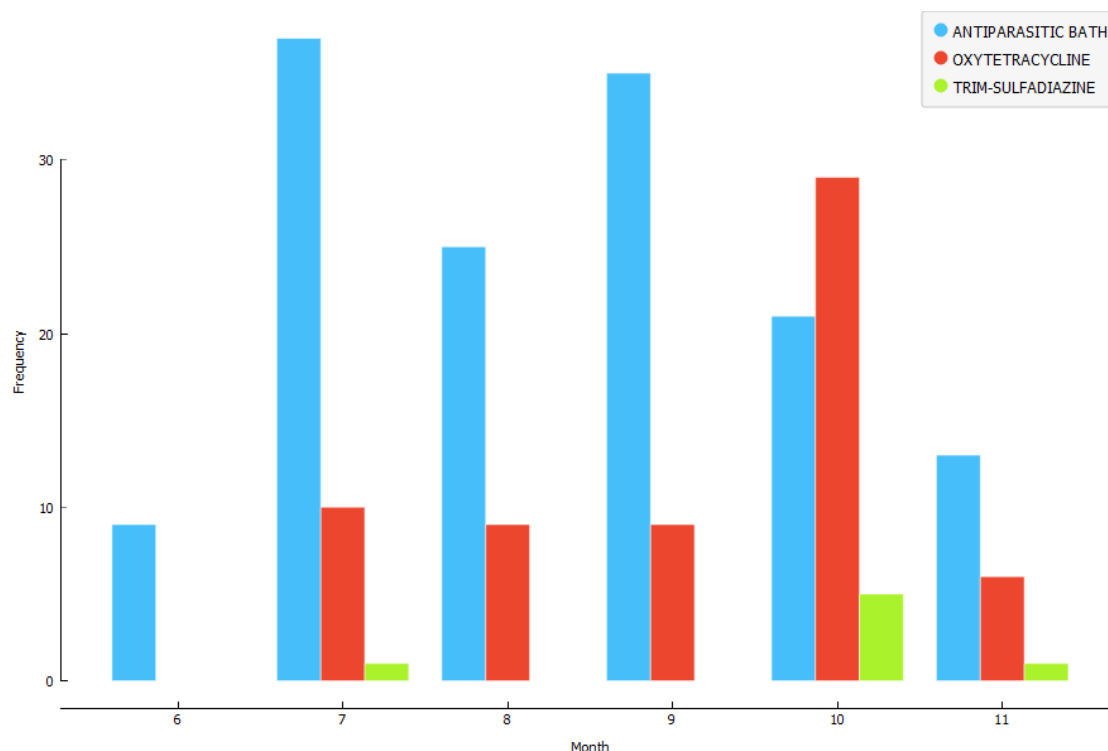
Ραβδόγραμμα 3.6 : Συγκριτικό ραβδόγραμμα του αριθμού των θεραπευτικών αγωγών για κάθε νοσογόνο παράγοντα ανά περιοχή μελέτης.

Η θεραπεία που εμφανίζεται συχνότερα και στις δύο μονάδες μελέτης είναι η εφαρμογή αντιπαρασιτικών λουτρών. Η συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης θεραπείας εμφανίζεται πολύ πιο έντονα στην Farm B, όπως άλλωστε και αυτής με οξυτετρακυκλίνη κυρίως λόγω της διαφοράς του όγκου βιομάζας που φιλοξενεί κάθε μονάδα εκτροφής. Στη Farm A παρατηρούμε σχεδόν την ίδια συχνότητα εφαρμογής θεραπείας οξυτετρακυκλίνης με τριμεθοπρίμη-σουλφαδιαζίνη, ενώ στην Farm B εφαρμόζεται μόνο η θεραπεία με οξυτετρακυκλίνη.



Ραβδόγραμμα 3.7 : Συγκριτικό ραβδόγραμμα του αριθμού των θεραπευτικών αγωγών σε σχέση με το μέσο βάρος των ατόμων.

Μεγάλη συχνότητα στην εμφάνιση αντιπαρασιτικών λουτρών εμφανίζεται σε ιχθυοκλωβούς με ψάρια Μέσου Βάρους (20-100γρ) σε σχέση με την εφαρμογή θεραπείας με οξυτετρακυκλίνη που παρατηρείται σε ένα μεγαλύτερο εύρος Μέσου Βάρους ψαριών (25-250γρ). Επιπλέον, η προτίμηση στη χρήση οξυτετρακυκλίνης σε σχέση με την τριμεθοπρίμη – σουλφαναμίδη μπορεί να προέρχεται από τα αποτελέσματα αντιβιογραμμάτων, αλλά και από την ταυτόχρονη παρουσία άλλων παθογόνων που επιδρά καλύτερα σ' αυτά η οξυτετρακυκλίνη.



Ραβδόγραμμα 3.8 : Συγκριτικό ραβδόγραμμα του αριθμού των θεραπευτικών αγωγών σε σχέση με τον μήνα εφαρμογής τους.

Η χρήση αντιπαρασιτικών λουτρών καταγράφεται με υψηλή ένταση περισσότερους μήνες μέσα στο χρόνο (Ιούλιο έως Οκτώβριο) σε σύγκριση με την εφαρμογή θεραπειών με οξυτετρακυκλίνη όπου καταγράφεται με υψηλή ένταση μόνο τον μήνα Οκτώβριο.

Descriptives

								Shapiro-Wilk	
								W	p
Treatment	N	Mean	Median	SD	Minimum	Maximum			
Me an wt (g)									
OXYTETRACYCLINE	63	111.14	90.56	62.49	22.47	240.64	0.91	<.001	
ANTIPARASITIC BATH	140	75.23	69.17	39.11	20.86	263.67	0.88	<.001	
TRIM-SULFADIAZINE	7	114.31	112.77	67.10	10.86	238.37	0.89	0.292	

One-Way ANOVA

One-Way ANOVA (Welch's)

	F	df1	df2	p
Mean wt (g)	9.31	2	15.34	0.002

Post Hoc Tests

Games-Howell Post-Hoc Test – Mean wt (g)

		OXYTETRACYC LINE	ANTIPARA SITIC BATH	TRIM- SULFADIA ZINE
OXYTETRACY CLINE	Mean differe nce	—	35.91 ***	-3.17
	p- value	—	< .001	0.992
ANTIPARASIT IC BATH	Mean differe nce	—	—	-39.08
	p- value	—	—	0.342
TRIM- SULFADIAZIN E	Mean differe nce	—	—	—
	p- value	—	—	—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, ***
 $p < .001$

4.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη, αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια καταγραφής και σύγκρισης των αποτελεσμάτων που αφορούν την εποχιακή εμφάνιση και την θνησιμότητα που προκαλούνται από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το παράσιτο *Sparicotyle chrysophrii* στο εκτρεφόμενο είδος *Sparus aurata* σε δύο μονάδες εκτροφής της περιοχής του Αστακού, σε συνθήκες πραγματικής παραγωγικής διαδικασίας.

Τα βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν κυρίως από την στατιστιστική επεξεργασία των δεδομένων του προγράμματος της παραγωγής παρατίθενται παρακάτω:

- Στη συχνότητα εμφάνισης αιτίου θνησιμότητας και στις δύο μονάδες εκτροφής, διακρίνεται πως το *Sparicotyle chrysophrii* (47%), στην διάρκεια ενός έτους, προκαλεί συγκεντρωτικά υψηλότερη θνησιμότητα σε σχέση με το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (13%), και τα άλλα αίτια (40%). All causes (Mean=0.54), *Photobacterium* (Mean=0.69), *Sparicotyle* (Mean=0.75).
- Τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στην διάρκεια ενός παραγωγικού έτους και στις δύο μονάδες εκτροφής καταγράφονται το Καλοκαίρι & το Φθινόπωρο, από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο.
- Εμφανίζονται δύο εξάρσεις στο ποσοστό θνησιμότητας, τον Ιούλιο (Mean=1.24%) & τον Οκτώβριο (Mean=1.01%), γεγονός που καταδεικνύει τους δύο κρίσιμους μήνες του χρόνου για την τσιπούρα, με το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμοτήτων.
- Σχετικά με την μέση μηνιαία θερμοκρασία, το αίτιο all causes εμφανίζεται και τις τέσσερις εποχές (Mean=19,76°C). Το *Photobacterium* εμφανίζεται κυρίως το Φθινόπωρο (90%), (Mean=21,68°C), ενώ το *Sparicotyle* το Καλοκαίρι (44%) και το Φθινόπωρο (43%) (Mean=23,11°C).

- Στην FARM B (Mean=0.73), εμφανίστηκε στατιστικά σημαντικό υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με την FARM A (Mean=0.42), γεγονός που οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος και την μεγαλύτερη βιομάζα ψαριών τσιπούρας στην FARM B.
- Στην FARM B, το ποσοστό θνησιμότητας που καταγράφηκε από το *Sparicotyle chrysophrii* (52%) ήταν υψηλότερο, σε σχέση με την FARM A ποσοστό θνησιμότητας από *Sparicotyle chrysophrii* (28%). Το ποσοστό θνησιμότητας από το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* παρουσιάζεται παρόμοιο, με FARM B (13%) και FARM A (14%).
- Συγκρίνοντας το M.B. των ψαριών που καταγράφηκε στα αίτια: all causes (123.18g), *Photobacterium* (206.57g) και *Sparicotyle* (147.40g), προκύπτει πως από το *Photobacterium* προσβάλλονται τσιπούρες μεγαλύτερου Μέσου Βάρους.
- Όσο μεγαλώνει το Μέσο Βάρος (>150g), μειώνεται το ποσοστό θνησιμότητας και μειώνονται και οι θεραπείες, καθώς τα ψάρια λόγω της ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματός τους, μπορούν να ανταπεξέρχονται πιο αποτελεσματικά έναντι των παθογόνων αιτιών.
- Στις τσιπούρες με χαμηλό Μέσο Βάρος (<150g), δεν έχει αναπτυχθεί επαρκής ανοσία, τα ψάρια είναι πιο ευαίσθητα στην προσβολή από παθογόνα αίτια για αυτό και γίνονται περισσότερες θεραπείες.
- Στην FARM B καταγράφηκαν περισσότερες θεραπείες και για τα δύο αίτια *Photobacterium* και *Sparicotyle*, καθώς (Mean=0.73), εμφανίστηκε στατιστικά σημαντικό υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με την FARM A (Mean=0.42).

- Το *Photobacterium*, προκαλεί οξεία υψηλή θνησιμότητα σε σχέση με το *Sparicotyle*, που προκαλεί χρόνια μέτρια θνησιμότητα.
- Από τις θεραπείες, συχνότερη είναι η εφαρμογή των αντιπαρασιτικών λουτρών και στις δύο μονάδες εκτροφής. Τα αντιπαρασιτικά λουτρά, όπως και η θεραπεία με οξυτετρακυκλίνη εφαρμόζονται συχνότερα στην Farm B, κυρίως λόγω της διαφοράς του όγκου βιομάζας που φιλοξενεί κάθε μονάδα εκτροφής.
- Στην Farm A παρατηρούμε σχεδόν την ίδια συχνότητα εφαρμογής θεραπείας οξυτετρακυκλίνης με τριμεθοπρίμη-σουλφαδιαζίνη, ενώ στην Farm B εφαρμόζεται μόνο η θεραπεία με οξυτετρακυκλίνη (θεραπευτική αντιμετώπιση και της επιθηλιοκύστης).
- Τα αντιπαρασιτικά λουτρά πραγματοποιούνται σε τσιπούρες M.B. (20-100g) σε σχέση με την εφαρμογή θεραπείας με οξυτετρακυκλίνη που παρατηρείται σε ένα μεγαλύτερο εύρος M.B. ψαριών (25-250g).
- Η προτίμηση στη χρήση οξυτετρακυκλίνης σε σχέση με την τριμεθοπρίμη – σουλφαναμίδη βασίζεται στα αποτελέσματα αντιβιογραμμάτων, αλλά και στην ταυτόχρονη παρουσία άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, που επιδρά καλύτερα σε αυτά η οξυτετρακυκλίνη.
- Η χρήση αντιπαρασιτικών λουτρών καταγράφεται με υψηλή ένταση περισσότερους μήνες μέσα στο χρόνο, από Ιούλιο έως Οκτώβριο λόγω της αυξημένης παρουσίας του *Sparicotyle chrysophrii* αυτή την περίοδο, σε σύγκριση με την εφαρμογή θεραπειών με οξυτετρακυκλίνη όπου καταγράφεται με υψηλή ένταση μόνο τον μήνα Οκτώβριο (αυξημένη παρουσία του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*).
- Τα αντιπαρασιτικά λουτρά πραγματοποιούνται σε χρονική περίοδο 4 μηνών, σε σταθερές ποσότητες, ενώ οι θεραπείες με αντιβίωση χορηγούνται σε υψηλές

ποσότητες με κορύφωση ενός μήνα, όταν εμφανίζονται οι εξάρσεις της νόσου από το *Photobacterium*.

- Σωστή διαχείριση & άμεση θεραπευτική αντιμετώπιση, μειώνει το ποσοστό θνησιμότητας άμεσα, από το *Sparicotyle chrysophrii* και από το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η βιομηχανία των ιχθυοκαλλιεργειών αποτελεί μία από τους βασικότερες της Ελληνικής οικονομίας, με σημαντικές προοπτικές περαιτέρω ισχυροποίησης ακολουθώντας τη γενικότερη διεθνή τάση.

Ο τομέας της ιχθυοκαλλιέργειας στην ΕΕ το 2020 παρήγαγε περίπου 552.625 τόνους εκτρεφόμενων ψαριών, μεταξύ των οποίων τσιπούρα, *Sparus aurata* 93.131 τόνους και λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* 81.369 τόνους (Mladineo, et al., 2023).

Η ταχύτητα ανάπτυξής της σε παγκόσμια κλίμακα είναι αξιοσημείωτη καθώς αποτελεί ένα από τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους παραγωγικούς κλάδους. Η εντατική χρήση θαλάσσιων κλωβών έχει αναμφίβολα συνδυαστεί με την επιταχυνόμενη αύξηση της παραγωγής εκτρεφόμενων ψαριών στην περιοχή της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, με παραγωγή περίπου στους 117.000 τόνους το 2019 (FAO, 2022).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς τομείς της ζωικής παραγωγής με σημαντικό ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας. Ωστόσο, τα νοσήματα και η παθολογία των εκτρεφόμενων ψαριών, αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών.

Τα κρούσματα ασθενειών, όπως και στην δική μας μελέτη που αφορά την προσβολή της τσιπούρας από το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και το *Sparicotyle chrysophrii*, θεωρούνται σημαντική απειλή για τον τομέα της υδατοκαλλιέργειας σε

παγκόσμιο επίπεδο. Επιπλέον, η κλιματική αλλαγή τείνει να αυξήσει τις επιδημίες μολυσματικών ασθενειών τόσο στους άγριους όσο και στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς ψαριών, με αρνητικές επιπτώσεις στο κόστος των μονάδων υδατοκαλλιέργειας.

Εκτός από την θερμοκρασία του νερού, η καταπόνηση στα ψάρια μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την εκδήλωση της ασθένειας. Νερά με υψηλό οργανικό φορτίο, κανιβαλισμός, ανεπαρκής διατροφή, μεγάλες αλλαγές στην θερμοκρασία, υψηλή ιχθυοπυκνότητα, μεταφορές και χειρισμοί αποτελούν φυσικοχημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες οι οποίοι ενισχύουν την εκδήλωση της ασθένειας. Τέτοιοι παράγοντες καταπόνησης είναι συνήθεις στα συστήματα υδατοκαλλιέργειών και έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες έρευνες από τους Roberts (2001), Toranzo et al. (2005), Modu et al. (2012) και Mladineo, et al., (2023).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, κατά την μακροσκοπική και μικροσκοπική εξέταση των ιχθύων τσιπούρας, τα ψάρια εμφάνισαν κοινή συμπτωματολογία.

Στην προσβολή από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, οι τσιπούρες εμφάνισαν κλινική εικόνα που χαρακτηριζόταν από: ανορεξία, καχεξία, λήθαργο, σκούρο χρωματισμό, διόγκωση της κοιλιακής κοιλότητας, υψηλή ξαφνική θνησιμότητα, διόγκωση και σκούρο χρωματισμό του σπλήνα, λευκά οζίδια σε σπλήνα και νεφρό και υπεραιμία του ήπατος, παρόμοια συμπτώματα με αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά από προηγούμενους ερευνητές, Bakopoulos et al. (1997), Romalde (2002), Andreoni & Magnani (2014), Eissa et al. (2018), Varvarigos (2022) για την νόσο στα ψάρια.

Στην προσβολή από το μονογενές τρηματώδες παράσιτο *Sparicotyle chrysophrii*, οι τσιπούρες εμφάνισαν κλινική εικόνα που χαρακτηριζόταν από: ερεθισμό των βραγχίων, αναιμία και εστιακές νεκρώσεις στα βράγχια, υπερπλασία του επιθηλίου, παραγωγή βλέννης και διάταση των βραγχιοκαλυμμάτων, παρόμοια συμπτώματα με αυτά που έχουν ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά από προηγούμενους ερευνητές, Sitjà-Bobadilla et al. (2010), Stella et al. (2011), Fioravanti et al. (2020), Farjallah et al. (2023), Stella et al. (2023) και Mladineo et al. (2023).

Τα αποτελέσματα της μακροσκοπικής και μικροσκοπικής εξέτασης των ψαριών, επιβεβαιώθηκαν μετά από βακτηριολογική, παρασιτολογική, ιστοπαθολογική και μοριακή ταυτοποίηση.

4.2.1 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πρώτη και σημαντική προσπάθεια επιδημιολογικής διερεύνησης της παρουσίας του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια, στην διάρκεια ενός έτους.

Η εντατικοποίηση της παραγωγής συχνά συνοδεύεται από μεγάλες ιχθυοφορτίσεις δημιουργώντας έτσι ιδανικές συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση διαφόρων παθογόνων, σύμφωνα με τον Pérez-Sánchez και συνεργάτες (2018). Η κλιματική αλλαγή επηρεάζει αρνητικά τις αντιδράσεις της φυσιολογίας και της ανοσολογίας σε καλλιεργούμενα είδη μετατρέποντάς τα σε πιο ευπαθή και διευκολύνοντας τη μετάδοση των παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας του θαλάσσιου περιβάλλοντος θα τείνει να οδηγήσει σε εξάρσεις νοσημάτων με υψηλότερη συχνότητα με συνέπεια και την αυξημένη εμφάνιση κρουσμάτων θνησιμότητας στην ιχθυοκαλλιέργεια (Rosa, et al., 2012).

Η προσβολή από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* αποτελεί ένα από τα πιο δύσκολα ζητήματα για τις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες εξαιτίας την υψηλής θνησιμότητας που προκαλεί (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016). Η μόλυνση συνήθως εμφανίζεται σε θερμοκρασίας επάνω από 20°C, αν και έχουν αναφερθεί και κρούσματα σε εκτρεφόμενα είδη σε θερμοκρασίες 18–19°C (Korun & Timur, 2005). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η προσβολή από το βακτήριο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* εμφανίζεται κυρίως το Φθινόπωρο (90%), (Mean=21,68°C), προκαλώντας θνησιμότητα που ανέρχεται στο 13%, στη διάρκεια ενός έτους. Τα εύρηματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Eissa και συνεργάτες (2018), όπου η εποχική εμφάνιση και θνησιμότητα εντοπίζονται κυρίως το Καλοκαίρι και το Φθινόπωρο. Ωστόσο, το ποσοστό θνησιμότητας των αποτελεσμάτων μας (13%), διαφέρει από τα αποτελέσματα των Eissa και συνεργάτες (2018), όπου το ποσοστό θνησιμότητας για το subsp. *piscicida* ήταν (25.24%). Η διαφορά αυτή οφείλεται κυρίως

στο γεγονός της άμεσης θεραπευτικής αντιμετώπισης στην δική μας περίπτωση μελέτης, με αποτέλεσμα να περιορίζεται έγκαιρα η εξέλιξη της νόσου και να μειώνεται η θνησιμότητα.

Όσον αφορά την θεραπευτική αντιμετώπιση του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, η χρήση αντιβιοτικών εξακολουθεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, παρά τον κίνδυνο από την αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών, για τη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά μεταξύ των βακτηρίων (Zhou, et al., 2020). Εναλλακτικά, η ανάπτυξη εμβολίων τα τελευταία χρόνια και η βελτιστοποίηση των πρακτικών διαχείρισης έχει οδηγήσει σε μεγάλη μείωση της χρήσης αντιβιοτικών (Czaplewski, et al., 2016; Lulijwa, et al., 2020).

Από τα στελέχη που απομονώθηκαν σε αυτή τη μελέτη, η πλειονότητα ήταν ευαίσθητη στα περισσότερα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην ελληνική βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας, τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη), σουλφοναμίδες (σουλφοναμίδη-τριμεθοπρίμη) και κινολόνες (φλορφενικόλη, φλουμεκίνη). Σε προηγούμενη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Lattos και συνεργάτες (2022), το ένα τρίτο των στελεχών που δοκιμάστηκαν εμφάνισαν κάποιο βαθμό αντοχής σε στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδες, αμπικιλίνη, και νοβοβοκίνη. Σύμφωνα με τους Thyssen και Ollevier (2001), οι οποίοι μελέτησαν την *in vitro* αντιμικροβιακή ευαισθησία των στελεχών *Phdp* που απομονώθηκαν από διαφορετικές χώρες, η διαφορά στη διαθεσιμότητα φαρμάκων από κάθε χώρα αντιστοιχεί σε αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά.

Στην δική μας μελέτη, η προτίμηση στη χρήση οξυτετρακυκλίνης σε σχέση με την τριμεθοπρίμη – σουλφοναμίδη βασίζεται στα αποτελέσματα αντιβιογραμμάτων, αλλά και στην ταυτόχρονη παρουσία άλλων παθογόνων μικροοργανισμών, που επιδρά καλύτερα σε αυτά η οξυτετρακυκλίνη, όπως η επιθηλιοκύστη.

Η κατανομή και η εμφάνιση του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, στην ελληνική υδατοκαλλιέργεια υποδηλώνει τη σημασία του ως παθογόνο αίτιο και την ανάγκη εφαρμογής αποτελεσματικότερων μέτρων για την καταπολέμησή του. Η συστηματική επιτήρηση στα πρώτα στάδια ηλικίας των ψαριών και η δειγματοληψία ρουτίνας, σε συνδυασμό με τη χρήση εμβολίων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν

στρατηγική για την πρόληψη των ανεπιθύμητων φαινομένων που απειλούν τη βιωσιμότητα του κλάδου.

4.2.2 *Sparicotyle chrysophrii*

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια πρώτη και σημαντική προσπάθεια επιδημιολογικής διερεύνησης της παρουσίας του *Sparicotyle chrysophrii* στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια, στην διάρκεια ενός έτους.

Ακολουθώντας την εντατικοποίηση της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας τα τελευταία χρόνια, το *Sparicotyle chrysophrii* (van Beneden and Hesse, 1863; Microcotylidae, Monogenea) έγινε ένα από τα πιο συχνά εμφανιζόμενα παθογόνα εξωπαράσιτα της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata* L.). Εμφανίζει έναν αξιοσημείωτο αριθμό ξενιστών, με μετάδοση μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων πληθυσμών Sparidae, σε εκτεταμένες γεωγραφικές περιοχές. Παρόλο που η παρουσία του παρασίτου *S. chrysophrii* ελέγχεται στα συστήματα εκτροφής της Μεσογείου, υπάρχει μια γενικευμένη έλλειψη διαθέσιμων επιδημιολογικών δεδομένων. Λαμβάνοντας υπόψιν πως πρόκειται για ένα παράσιτο, του οποίου ο πολλαπλασιασμός αναμένεται να αυξηθεί με την παγκόσμια αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος, επιδημιολογικές μελέτες που σχετίζονται με την εποχική εμφάνιση και την θνησιμότητα που προκαλεί, θεωρούνται σημαντικές για την θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια (Mladineo, et al., 2023).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας, το ποσοστό θνησιμότητας και στις δύο μονάδες εκτροφής, από το *Sparicotyle chrysophrii* (47%), στην διάρκεια ενός έτους, προκαλεί συγκεντρωτικά υψηλότερη θνησιμότητα σε σχέση με το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (13%), & τα άλλα αίτια (40%). Προηγούμενες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από τους Stella και συνεργάτες (2011), Farjallah και συνεργάτες (2023) βρέθηκε πως το *Sparicotyle chrysophrii* προκαλεί επίσης υψηλή θνησιμότητα (61,5%) σε ψάρια που εκτρέφονται σε ιχθυοκλωβούς. Πιστεύεται ότι τα άγρια ψάρια, κυρίως τα Sparidae που συγκεντρώνονται γύρω από τους κλωβούς ιχθυοκαλλιέργειας, μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενή μόλυνσης για τα ψάρια στους κλωβούς (Stella, et al., 2011; Farjallah, et al., 2023). Σύμφωνα με τους Muniesa και συνεργάτες (2019) και

τον Mladineo και συνεργάτες (2023) η θνησιμότητα που μπορεί να προκληθεί στην εκτρεφόμενη τσιπούρα στους κλωβούς θάλασσας μπορεί να φτάσει στο 30%.

Σε προηγούμενες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει βρεθεί πως σε περιοχές της Μεσογείου, όπως στην Αδριατική, ο επιπολασμός είναι μεταξύ 0% έως 70% μέσα στο έτος (υψηλότερος σε περιόδους με υψηλότερες θερμοκρασίες) (Mladineo & Maršić-Lučić, 2007). Στην Αίγυπτο ο επιπολασμός κυμαίνεται από 27.2% το Νοέμβριο έως 80% τον Μάρτιο, με παρατηρούμενα υψηλότερα ποσοστά την άνοιξη και το καλοκαίρι (Mladineo, et al., 2021). Στην Κορσική ο επιπολασμός κυμαίνεται από 20% έως 80% μέσα στο έτος (Mladineo, et al., 2021). Η έρευνά μας έδειξε, πως τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στην διάρκεια ενός παραγωγικού έτους και στις δύο μονάδες εκτροφής καταγράφονται το Καλοκαίρι & το Φθινόπωρο, από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο.

Εμφανίζονται 2 μέγιστα στο ποσοστό θνησιμότητας, τον Ιούλιο (Mean=1.24) & τον Οκτώβριο (Mean=1.01), γεγονός που καταδεικνύει τους δύο κρίσιμους μήνες του χρόνου για την τσιπούρα, με το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμοτήτων. Σχετικά με την μέση μηνιαία θερμοκρασία και την εποχική εμφάνιση, το *Sparicotyle chrysophrii* εμφανίζεται κυρίως το Καλοκαίρι (44%) και το Φθινόπωρο (43%) (Mean=23,11°C). Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας, συμφωνούν με προηγούμενη έρευνα από τους Mladineo και συνεργάτες (2023), όπου θερμοκρασίες νερού 22-26°C, ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του παρασίτου. Αντίθετα, φαίνεται πως υψηλές θερμοκρασίες (30°C), δεν ευνοούν τον βιολογικό κύκλο του παρασίτου. Στην εκτρεφόμενη τσιπούρα στην Μεσόγειο, το *Sparicotyle chrysophrii* εμφανίζεται εποχιακά κυρίως το Καλοκαίρι και το Φθινόπωρο (Mladineo, et al., 2023). Μια εξαίρεση αναφέρθηκε στην Νότια Κορσική, όπου το *S. chrysophrii* καταγράφηκε σε τρεις μονάδες εκτροφής στην διάρκεια ενάμιση έτους, όπου το υψηλότερο ποσοστό εμφάνισης και θνησιμότητας εμφανίστηκε τον χειμώνα, σύμφωνα με τους Antonelli και συνεργάτες (2010). Η θερμοκρασία του νερού, τον χειμώνα είναι χαμηλή, γεγονός που επηρεάζει τον μεταβολισμό της τσιπούρας με αποτέλεσμα να συνυπάρχουν παθολογικές καταστάσεις όπως το χειμερινό σύνδρομο, που προκαλεί γενικευμένη ανοσοκαταστολή τους χειμερινούς μήνες, ευνοώντας την παρουσία του *S. chrysophrii* (Gallardo, et al., 2003).

Στην δική μας έρευνα, συγκρίνοντας το Μέσο Βάρος των ψαριών που καταγράφηκε στα αίτια: *Photobacterium* (206.57g) και *Sparicotyle* (147.40g), προκύπτει πως από το *Photobacterium* προσβάλλονται τσιπούρες μεγαλύτερου Μέσου Βάρους και από το *Sparicotyle* τσιπούρες μικρότερου Μέσου Βάρους. Όσο μεγαλώνει το Μέσο Βάρος (>150g), μειώνεται το ποσοστό θνησιμότητας και μειώνονται και οι θεραπείες, καθώς τα ψάρια λόγω της ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματός τους, μπορούν να ανταπεξέρχονται έναντι των παθογόνων αιτιών. Στις τσιπούρες με χαμηλό Μέσο Βάρος <150gr, δεν έχει αναπτυχθεί επαρκής ανοσία, τα ψάρια είναι πιο ευαίσθητα στην προσβολή από παθογόνα αίτια για αυτό και γίνονται περισσότερες θεραπείες.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν, με προηγούμενες πειραματικές μελέτες, όπου στα μικρότερου μεγέθους ψάρια *Sparus aurata* (30 g) ο επιπολασμός βρέθηκε σε ποσοστό έως 100%, και με μεγαλύτερου μεγέθους (150 g) 96.6% (Mladineo, et al., 2021). Μελέτες επίσης αναφέρουν ότι στα μεγαλύτερα ψάρια, το ρεύμα του νερού που διέρχεται από τα βράγχια έχει ως αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η εγκατάσταση του *S. chrysophrii* (Stija-Bobadilla & Alvarez-Pelliter, 2009).

Στα εκτρεφόμενα ψάρια, τα μικρότερα (<20 cm) φέρουν μεγαλύτερο παρασιτικό φορτίο ως προς την μέση ένταση, ενώ σε μεγαλύτερα μεγέθη (>30 cm) παρατηρείται υψηλότερος επιπολασμός. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι το παράσιτο *Furnestinia echeneis* στην τσιπούρα παρουσιάζει το ίδιο μοτίβο κατανομής με το *S. chrysophrii* (Antonelli, et al., 2010). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορετικούς λόγους, είτε σε ένα πιο ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό σύστημα στα ηλικιωμένα ψάρια που απορρίπτουν σημαντικό αριθμό παρασίτων, τα οποία ωστόσο, συσσωματώνονται σε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του ξενιστή (3-4 χρόνια), ή/και στην ικανότητα παρασίτου να κατοικεί σε μεγαλύτερη επιφάνεια βραγχίων (Emre, et al., 2015). Ανεξάρτητα από την αιτία, μια καλά σχεδιασμένη μελέτη της κατανομής του *S. chrysophrii* σε σχέση με το μέγεθος/ηλικιακή κατηγορία του ξενιστή σε τουλάχιστον δύο κύκλους παραγωγής θα πρέπει να είναι χρήσιμη στον σχεδιασμό των θεραπειών ή άλλων προγραμμάτων παρέμβασης στις μονάδες εκτροφής.

Από τις θεραπείες, συχνότερη είναι η εφαρμογή των αντιπαρασιτικών λουτρών και στις δύο μονάδες εκτροφής.

Τα αντιπαρασιτικά λουτρά πραγματοποιούνται σε τσιπούρες M.B. (20-100g) σε σχέση με την εφαρμογή θεραπείας με οξυτετρακυκλίνη που παρατηρείται σε ένα μεγαλύτερο εύρος M.B. ψαριών (25-250g). Η χρήση αντιπαρασιτικών λουτρών καταγράφεται με υψηλή ένταση περισσότερους μήνες μέσα στο χρόνο, από Ιούλιο έως Οκτώβριο λόγω της αυξημένης παρουσίας του *Sparicotyle chrysophrii* αυτή την περίοδο, σε σύγκριση με την εφαρμογή θεραπειών με οξυτετρακυκλίνη όπου καταγράφεται με υψηλή ένταση μόνο τον μήνα Οκτώβριο (αυξημένη παρουσία του *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*). Τα αντιπαρασιτικά λουτρά πραγματοποιούνται σε χρονική περίοδο 4 μηνών, σε σταθερές ποσότητες, ενώ οι θεραπείες με αντιβίωση χορηγούνται σε υψηλές ποσότητες με κορύφωση ενός μήνα, όταν εμφανίζονται οι εξάρσεις της νόσου από το *Photobacterium*.

Τα επιδημιολογικά δεδομένα από την έρευνά μας, δείχνουν επίσης ότι ο αυξημένος αριθμός παρασίτων σχετίζεται με τον συνωστισμό, την ανεπαρκή υγιεινή και την υποβάθμιση της ποιότητας του νερού. Παρόλο που τα μονογενή βρίσκονται συνήθως σε άγρια ψάρια, σπάνια αποτελούν άμεση αιτία ασθένειας ή θανάτου σε πληθυσμούς ψαριών που ζουν ελεύθερα (Reed, et al., 2003; Mladineo, et al., 2023). (Jun, 2015; Mladineo, et al., 2021).

Η εκτροφή ιχθύων σε κλωβούς επιτρέπει φυσικά μεγαλύτερες βιομάζες αυτών, αλλά παράλληλα συμβάλλει και στην αυξανόμενη διασπορά ασθενειών. Η υποβαθμισμένη υγιεινή, σε συνδυασμό με αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοούν την εμφάνιση σοβαρών παρασιτικών ασθενειών που μπορεί να αποδειχτούν ολέθριες για τα εκτρεφόμενα ψάρια. Τέτοιου βαθμού θνησιμότητες μπορούν να ξεπεράσουν περιστασιακά το 60-70%, με σημαντικές συνέπειες στην τελική παραγωγή του συγκεκριμένου είδους. Ενδεικτικά, οι παρασιτώσεις στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) από το μονογενές *Sparicotyle chrysophrii* αποτελούν σήμερα και το σημαντικότερο πρόβλημα στην εκτροφή του είδους στη Μεσόγειο ((Fioravanti, et al., 2020; Stella, et al., 2023).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού, το pH, η φωτοπερίοδος, και η αλατότητα είναι κρίσιμες παράμετροι για τον πολλαπλασιασμό των μονογενών εν γένει, και ιδιαίτερα κατά τα προνυμφικά τους στάδια (Modu, et al., 2012).

Ενώ η γνώση των βέλτιστων ορίων για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των παρασίτων είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό στρατηγικών διαχείρισης και θεραπείας ασθενειών στην εγκατάσταση, ιδανικά, η εποχιακή ταλάντωση αβιοτικών παραγόντων θα πρέπει να λαμβάνεται επίσης υπόψη κατά τον σχεδιασμό μελλοντικών περιοχών θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας.

Λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της παραγωγής βιομάζας και την επέκταση των χώρων υδατοκαλλιέργειας στην περιοχή τα τελευταία χρόνια, τα επιδημιολογικά δεδομένα της χώρας πρέπει να επικαιροποιηθούν, και η παρακολούθηση να πραγματοποιείται στους επόμενους κύκλους παραγωγής για την αποτελεσματικότερη διαχείριση της νόσου.

Η εφαρμογή των αποτελεσμάτων της εργασίας θα μειώσει το κόστος παραγωγής εξαιτίας της ελαχιστοποίησης των θνησιμοτήτων, αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ψαριών, μείωση του κόστους θεραπειών και βελτίωση των περιβαλλοντικών συνθηκών.

4.3 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ - ΣΥΝΕΧΙΣΗ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Για την βιώσιμη ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών είναι απαραίτητη η καλύτερη διαθέσιμη τεχνογνωσία ως προς την βιολογία, την τεχνολογία, τις περιβαλλοντικές παραμέτρους και την διαχείριση καθώς και η μετατροπή αυτής της γνώσης σε υλικό, εργαλεία και ικανότητα για την επίτευξη των καλύτερων αποδόσεων.

Οι ιχθυοκαλλιέργειες μπορούν να αναπτυχθούν και να συνεισφέρουν στην παγκόσμια οικονομία εάν υπάρξει ένα βοηθητικό πλαίσιο για τη δραστηριότητα αυτή, το οποίο θα περιλαμβάνει κανονισμούς, διεθνοποίηση, συνέχιση της έρευνας και εξέλιξη της τεχνολογίας.

Ο έλεγχος της υγείας των ψαριών βοηθά στην αύξηση της ασφάλειας των προϊόντων, μειώνοντας τις συνέπειες των νοσημάτων στα εκτρεφόμενα ψάρια και ελαχιστοποιώντας την χρήση χημικών φαρμάκων και αντιβιοτικών.

Σε συνέχεια της δικής μας έρευνας, η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την εμφάνιση παθογόνων και το ποσοστό θνησιμότητας για κάθε παθογόνο που μπορεί να εμφανιστεί στην τσιπούρα σε μια μονάδα εκτροφής είναι αναγκαία για την βελτιστοποίηση των παραγωγικών διαδικασιών .

Στο μέλλον, περισσότερη έρευνα πρέπει να γίνει για τον καθορισμό των πηγών μόλυνσης, των μηχανισμών μετάδοσης και λοιμογόνου δύναμης, της κλινικής σημασίας, της αντίστασης στα αντιβιοτικά, των νέων επιλογών θεραπείας και την ανάπτυξη εμβολιακών σκευασμάτων.

Απαραίτητη επίσης κρίνεται μελλοντικά, η διεξοδική έρευνα σχετικά με την παθολογία των νέων ειδών που μπαίνουν στις μονάδες εκτροφής. Με αυτό τον τρόπο θα προσδιοριστούν οι παθογόνοι παράγοντες του κάθε είδους, διευκολύνοντας κάθε προσπάθεια εκτροφής τους.

Τέλος, η αξία των υπάρχοντων δεδομένων παραμένει στη δυνατότητα χρήσης τους ως βασικών πληροφοριών για τη δημιουργία πιο ισχυρών επιδημιολογικών μοντέλων, προβλέψεων για την κλιματική αλλαγή στο πλαίσιο της παρασίτωσης ή πιο δομημένων προσπαθειών δειγματοληψίας, προσφέροντας ευκαιρίες για νέες ερευνητικές κατευθύνσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνόγλωσση

1. Καφάτος, Α., Χασαπίδου, Μ., και συν. (2001). Πίνακες Σύνθεσης Ελληνικών Τροφίμων. ΥΠΕΤ/ΕΠΕΤ II.
2. Νεοφύτου, Χ. (2007). Βιολογία Υδρόβιων Σπονδυλωτών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, σελ. 16-17.
3. Πνευματικάτου, Α., Μπάτζιος, Χ., Κάτος, Α., Φώτης, Γ. (2000). "Οικονομετρική Διερεύνηση των Συναρτήσεων Παραγωγής και Κόστους στον Κλάδο των Θαλάσσιων Ιχθυοκαλλιέργειών στην Ελλάδα". Πρακτικά 6ου Πανελλήνιου Συνεδρίου Αγροτικής Οικονομίας με θέμα «Αναζητώντας το Αύριο της Ελληνικής Γεωργίας», σελ. 508-521, ΕΤ.ΑΓΡ.Ο., Εκδόσεις «Σταμούλης», Θεσσαλονίκη.
4. Στεργίου, Κ., Τσίκληρας, Α. (2015). Αλιευτική βιολογία και αλιεία. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. ISBN978-960-603-235-6.
5. Τζουβάρα – Καραγιάννη, Ε. (2000). Σύσταση, χημική ανάλυση και προδιαγραφές βασικών τροφίμων. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
6. Τριχοπούλου, Α. (2004). ΠΙΝΑΚΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΦΑΓΗΤΩΝ. Εκδότης, ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε. ISBN13, 9789603942849.
7. Χώτος, Γ., και Ρογδάκης, Ι. (1992). "ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΥΡΥΑΛΩΝ ΨΑΡΙΩΝ". Λαβράκι-Τσιπούρα. Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις ΙΩΝ, Σελ.446. ISBN 960-405-364-7.

Ξενόγλωσση

1. Abbate, F., Guerrero, M.C., Montalbano, G., Ciriaco, E., Germanà, A. (2012). Morphology of the tongue dorsal surface of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Microsc Res Tech*, 75(12):1666-71. doi: 10.1002/jemt.22114.
2. Abdelhamid, A.S., Brown, T.J., Brainard, J.S., Biswas, P., Thorpe, G.C., Moore, H.J., et al. (2018). Omega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*, 7(7):CD003177.

3. Abdollahi, M., Wu, H., Undeland, I. (2021). Impact of Processing Technology on Macro- and Micronutrient Profile of Protein-Enriched Products from Fish Backbones. *Foods*, 10(5):950.
4. Acosta, A., Vivas, J., Padilla, D., et al. (2009). "Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L," *Journal of Fish Diseases*, 32(6): 535–541.
5. Alvheim, A.R., Kjellekvold, M., Strand, E., Sanden, M., Wiech, M. (2020). Mesopelagic Species and Their Potential Contribution to Food and Feed Security-A Case Study from Norway. *Foods*, 9(3):344.
6. Anderson, J.L., Asche, F., Garlock, T., Chu, J. (2017). Aquaculture: Its role in the future of food. *Front. Econ. Glob*, 17:159–173.
7. Andreoni, F., Boiani, R., Serafini, G., Amagliani, G., Dominici, S., Riccioni, G., et al. (2013). Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate. *Vaccine*, 31(5):820-6.
8. Andreoni, F., Magnani, M. (2014). Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *J Immunol Res*, 2014:793817. doi: 10.1155/2014/793817.
9. Angelidis P, Giagnissi M, Vatsos I, Bithava K, Teliousis K, Solomakos N, Athanassopoulou F (2008). Aquaculture bacterial bank in Greece - methodology and first results. *Scientific Annals of the Danube Delta Institute, Tulcea – Romania*, 14: 5- 8.
10. Antonelli L, Quilichini Y, Marchand B (2010). *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and Hesse 1863) (Monogenea: Polyopisthocotylea) parasite of cultured gilthead sea bream *Sparus aurata* (Linnaeus 1758) (Pisces: Teleostei) from Corsica: ecological and morphological study. *Parasitol Res.*, 107:389-398.
11. Assefa, A., Abunna, F. (2018). Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Vet. Med. Int*, 2018:5432497.
12. Athanassopoulou F. (1990). A study of the Myxosporean infections of *R. rutilus* L. with special reference to *Myxidium rhodei* Leger, 1905 in the renal tissue. Ph.D. Thesis, University of Stirling, Stirling. pp. 153-186.

13. Bakopoulos V., Adams A., Richards R.H. (1995). Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *Journal of Fish Diseases*, 18:1–7.
14. Bakopoulos, V., Adams, A., Richards, R.H. (1997). Serological relationship of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates (the causative agent of fish pasteurellosis) determined by Western blot analysis using six monoclonal antibodies. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28: 69-72.
15. Bakopoulos V., Peric Z., Rodger H., Adams A., Richards R.H. (1997). First report of fish pasteurellosis from Malta. *Journal of Aquatic and Animal Health*, 9:26–33.
16. Barnes, A.C., dos Santos, N.M., Ellis, A.E. (2005). Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Dev Biol (Basel)*, 121:75-84.
17. Bellassoued, K., Hamza, A., van Pelt, J., Elfeki, A. (2013). Seasonal variation of *Sarpa salpa* fish toxicity, as related to phytoplankton consumption, accumulation of heavy metals, lipids peroxidation level in fish tissues and toxicity upon mice. *Environ Monit Assess*, 185(2):1137-50.
18. Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D.G.J. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ. Int.*, 86: 140–149.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>.
19. Boente-Juncal, A., Raposo-García, S., Vale, C., Louzao, M.C., Otero, P., Botana, L.M. (2020). In Vivo Evaluation of the Chronic Oral Toxicity of the Marine Toxin Palytoxin. *Toxins (Basel)*, 12(8):489.
20. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, USA, part B, 2: 557-578.
21. Carraro R., Dalla Rovere G., Ferraresso S., Carraro L., Franch R., Toffan A., Pascoli F., Paternello T., Bargelloni L. (2018). Development of a real-time PCR

- assay for rapid detection and quantification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish tissues. *Journal of Fish Diseases*, 41, 247-254.
22. Caruso, G., Mancuso, M., Crisafi, E. (2003). Combined fluorescent antibody assay and viability staining for the assessment of the physiological states of *Escherichia coli* in seawaters. *Journal of Applied Microbiology*, 95:225-233.
 23. Chandra, K.J. (2006). Fish Parasitological Studies in Bangladesh: A Review. *Journal of Agricultural and Rural Development*, 4: 1810-1860.
 24. Chaudhary, A., Verma, C., Shobhna, Varma, M. and Singh, H. S. (2013). A review of Monogenean diversity in India: Pathogens of fish diseases. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1: 151-168.
 25. Chaoui, L., Kara, M.H., Faure, E., Quignard, J.P. (2006). Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Scientia Marina*, 70(3). DOI: 10.3989/scimar.
 26. Costa-Ramos, C., do Vale, A., Ludovico, P., dos Santos, N.M.S., Silva, M.T. (2011). The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1): 173–181.
 27. Czaplewski, L.; Bax, R.; Clokie, M.; Dawson, M.; Fairhead, H.; Fischetti, V.A.; Foster, S.; Gilmore, B.F.; Hancock, R.E.W.; Harper, D.; et al (2016). Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. *Lancet Infect. Dis.*, 16: 239–251. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00466-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00466-1).
 28. Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Morínigo MA, Balebona M (2003). Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *Journal of Fish Diseases* 26: 305–308.
 29. Drury R.A., Wallington E.A. (eds) (1980). Carleton's histological techniques, 5th edn. Oxford University Press, Oxford.
 30. Duell, P.B. (2023). Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. *J Am Coll Cardiol*, 81(2):153-155.
 31. Eissa, I.A.M., Derwa, H.I., Ismail, M., El-Lamie, M., Dessouki, A.A., Elsheshtawy, H., Bayoumy, E.M. (2018). Molecular and phenotypic

- characterization of *Photobacterium damsela* among some marine fishes in Lake Temsah. *Microb Pathog*, 114:315-322. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.006.
32. Elagizi, A., Lavie, C.J., O'Keefe, E., Marshall, K., O'Keefe, J.H., Milani, R.V. (2021). An Update on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Health. *Nutrients*, 13(1):204.
 33. Emre Y, Emre N, Aydogdu A, Buselic I, Smales LR, Mladineo I (2015). Population dynamics of two diplectanid species (Monogenea) parasitising sparid hosts (Sparidae). *Parasitol Res.*, 114:1079-1086.
 34. European Commission (2013). The Economic benefits of the NATURA 2000 Network. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 76 p. doi:10.2779/41957.
 35. Farjallah, S., Amor, N., Garippa, G., Montero, F.E., Villora-Montero, M., Mohamed, O.B., Paolo Merella, P. (2023). Genetic variation of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) from the gilthead sea bream *Sparus aurata* (Teleostei: Sparidae) in the Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, 122:157–165.
 36. Fioravanti, M.L., Mladineo, I., Palenzuela, O., Beraldo, P., Massimo, M., Gustinelli, A., Sitjà-Bobadilla, A. (2020). Fish farmer's guide to combating parasitic infections in European sea bass and gilthead sea bream aquaculture. A series of ParaFishControl guides to combating fish parasite infections in aquaculture. Guide 4. Edited by SitjàBobadilla, A. & Bello-Gómez, E. e-NIPO: 833-20-104-5, 2020, 29 pp.
 37. Frostegård, J. (2013). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med*, 11: 117. doi: 10.1186/1741-7015-11-117.
 38. Gallardo MÁ, Sala-Rabanal M, Ibarz A, et al (2003). Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 223:15-27.
 39. Gantioler, S., Rayment, M., Bassi, S., Kettunen, M., McConville, A., Landgrebe, R., et al. (2010). Costs and Socio-Economic Benefits associated with the NATURA 2000 Network. Final report to the European Commission,

- DG Environment on Contract ENV.B.2/SER/2008/0038. Institute for European Environmental Policy / GHK / Ecologic, Brussels. 181 p.
40. Gauthier, G., Gauthier, M., Christen, R. (1995). Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations Free. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4). doi.org/10.1099/00207713-45-4-755.
 41. Geladakis, G., Batargias, C., Somarakis, S., Koumoundouros, G. (2023). Stock Discrimination of Gilthead Seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) through the Examination of Otolith Morphology and Genetic Structure. *Fishes*, 8(6):291. <https://doi.org/10.3390/fishes8060291>.
 42. Gerstman, B.B. Basic biostatistics; Jones & Bartlett Learning, LLC, 2014; ISBN 1284025470.
 43. Guijarro, C., Cosín-Sales, J. (2021). LDL cholesterol and atherosclerosis: The evidence. *Clin Investig Arterioscler*, 33(1):25-32.
 44. Hashish, E., Merwad, A., Elgaml, S., Amer, A., Kamal, H., Elsadek, A., et al. (2018). *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: epidemiology, pathophysiology and management; a review. *Vet Q*, 38:35–46. doi:10.1080/01652176.2018.1447171.
 45. Håstein, T., Gudding, R., Evensen, Ø. (2005). Bacterial vaccines for fish: an update of the current situation worldwide. *Developments in Biologicals*, 121: 55–74.
 46. Hollenbeck, J. R., & Wright, P. M. (2017). Harking, sharking, and tharking: Making the case for post hoc analysis of scientific data. *Journal of Management*, 43(1), 5-18.
 47. Ho, L-P., Lin, J.H-Y., Liu, H-C., Chen, H-E., Chen, T-Y., Yang, H-L. (2011). Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against *Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30(1): 412–419.
 48. Ho, L-P., Chang, C-J., Liu, H-C., Yang, H-L., Lin, J. H-Y. (2014). Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium*

- damselae ssp. piscicida infections in cobia, *Rachycentron canadum* L. *Journal of Fish Diseases*, 37(1): 51–62.
49. Hossain, M.Y. (2010). Morphometric relationships of length-weight and length-length of four cyprinid small indigenous fish species from the Padma River (NW Bangladesh). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 10:131-134.
 50. Hu, Y., Hu, F.B., Manson, J.E. (2019). Marine Omega-3 Supplementation and Cardiovascular Disease: An Updated Meta-Analysis of 13 Randomized Controlled Trials Involving 127 477 Participants. *J Am Heart Assoc*, 8(19): e013543.
 51. The jamovi project (2021). jamovi. (Version 2.2) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.
 52. Jansen, W.A., and Surgalla, M.J. (1968). Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch. (*Roccus americanus*). *J Bacteriol*, 96(5):1606-10.
 53. Jun, J.W. (2015). Isolation and identification of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) from gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in the Mediterranean Sea, Greece. *African Journal of Microbiology Research* 9(32):1917-1920.
 54. Kibenge, F.S.B. (2022). Chapter 1 - Descriptions of major farmed aquatic animal species. *Aquaculture Pathophysiology, Volume I. Finfish Diseases*, Pages 1-44. Academic Press.
 55. Kim, M-J., Hirano, I., Kurokawa, K., et al. (2008). Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates collected in Japan and the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2): 606–611, 2008.
 56. Korun, J., Timur, G. (2005). The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*, 57(3):197-206.
 57. Korun, J.; Timur, G. The first pasteurellosis case in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at low marine water temperatures in Turkey (2005). *Isr. J. Aquac. Bamidgeh*, 57: 197–206. <https://doi.org/10.46989/001c.20408>.

58. Krishnamoorthy, K.; Mathew, T.; Ramachandran, G. Upper limits for exceedance probabilities under the one-way random effects model. *Ann. Occup. Hyg.* 2007, 51, 397–406.
59. Kvitt, H., Ucko, M., Colorni, A., Batargias, C., Zlotkin, A., Knibb W. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Detection by direct amplification of 16S rRNA gene sequences and genotypic variation as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Diseases of Aquatic Organisms*, 48:187-195.
60. Lablack, L., Rima, M., Georgieva, S., Marzoug, D., Kostadinova, A. (2022). Novel molecular data for monogenean parasites of sparid fishes in the Mediterranean and a molecular phylogeny of the Microcotylidae Taschenberg, 1879. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 2,2022, 100069. DOI: 10.1016.
61. Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., et al. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 7: 471–496.
62. Lampsas, S., Xenou, M., Oikonomou, E., Pantelidis, P., Lysandrou, A., Sarantos, S., et al. (2023). Lipoprotein(a) in Atherosclerotic Diseases: From Pathophysiology to Diagnosis and Treatment. *Molecules*, 28(3):969.
63. Lattos, A., Giantsis, I.A., Tsavea, E., Kolygas, M., Athanassopoulou, F., Bitchava, K. (2022). Virulence Genes and In Vitro Antibiotic Profile of *Photobacterium damsela* Strains, Isolated from Fish Reared in Greek Aquaculture Facilities. *Animals*, 12, 3133. <https://doi.org/10.3390/ani12223133>.
64. Le Breton, A. (2020). Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture OPTIONS méditerranéennes SERIES B: Studies and Research Laboratory requirements for bacterial diseases. *Options Méditerranéennes*, B, no. 75.
65. Lopes, T.O.M., Passos, L.S., Vieira, L.V., Pinto, E., Dorr, F., Scherer, R., et al. (2020). Metals, arsenic, pesticides, and microcystins in tilapia (*Oreochromis niloticus*) from aquaculture parks in Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int*, 27(16):20187-20200.

66. Lulijwa, R.; Rupia, E.J.; Alfaro, A.C. (2020). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: A review of the top 15 major producers. *Rev. Aquac.*, 12: 640–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12344>.
67. Mladineo, I., Željka Trumbić, Z., Trumbić, Z., Ormad-García, A., Oswaldo Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., Manuguerra, S., et al. (2021). In Vitro Testing of Alternative Synthetic and Natural Antiparasitic Compounds against the Monogenean *Sparicotyle chrysophrii*. *Pathogens*, 10(8):980.
68. Mladineo, I., Volpatti, D., Beraldo, P., Rigos, G., Katharios, P., Padros, F. (2023). Monogenean *Sparicotyle chrysophrii*: The major pathogen of the Mediterranean gilthead seabream aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1–22. doi: 10.1111/raq.12839.
69. Modu BM, Saiful M, Kartini M, Kasim Z, Hassan M, Shaharom- Harrison FM. (2012). Effects of water quality and monogenean parasite in the gills of freshwater at fish, *Hemibagrus nemurus* Valenciennes 1840. *Curr Res J Biol Sci.*, 4:242-246.
70. Muniesa A, Basurco B, Aguilera C, et al. (2019). Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transb Emer Dis.*, 67:1089-1100.
71. Núñez-Díaz, J.A.; Fumanal, M.; Do Vale, A.; Fernández-Díaz, C.; Moriñigo, M.Á.; Balebona, M.C. (2018). Transcription of IVIAT and virulence genes in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infecting solea senegalensis. *Microorganisms*, 6:67. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030067>.
72. Osorio C.R., Toranzo A.E., Romalde J.L., Barja J.L. (2000). Multiplex PCR assay for ureC and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40: 177-183.

73. Ouimet, M., Barrett, T.J., Fisher, E.A. (2019). HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*, 124(10):1505-1518.
74. Pellizzari, C., Krasnov, A., Afanasyev, S., et al. (2013). High mortality of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from photobacteriosis is associated with alternative macrophage activation and anti-inflammatory response: results of gene expression profiling of early responses in the head kidney. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(5): 1269–1278.
75. Pérez-Sancho, M., Vela, I., Awad, A.M., Kostrzewa, M., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F. (2016). Differentiation of *Photobacterium damsela* subspecies using Matrix-Assisted LaserDesorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in fish isolates. *Aquaculture*, 464:159-164.
76. Pérez-Sánchez, T.; Mora-Sánchez, B.; Balcázar, J.L. (2018). Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. *Trends Microbiol.*, 26: 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.05.002>.
77. Pham, T.H., Rao, S., Cheng, T.C., Wang, P.C., Chen, S.C. (2021). The moonlighting protein fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a potential vaccine candidate against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in Asian sea bass (*Lateolabrax niloticus*). *Dev Comp Immunol*, 124:104187. doi: 10.1016/j.dci.2021.104187.
78. Puttaswamy, S., Kishore Gupta, S., Regunath, H., Smith, L.P., Sengupta S. (2018). A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. *Archives of Clinical Microbiology*, 9:83.
79. Rani, K., and Upadhyay, S.K. (2019). An introduction of monogenean parasites of fishes: Taxonomy and parasitocoenosis. In book: *Parasitology Taxonomy Bioecology* Chapter: 4 Publisher: WAPP, India.
80. Reed, P., Floyd, R. F. and Petty, D. (2003). *Monogenean Parasites of Fish*. FA28.
81. Repullés-Albelda, A., Raga, J., Montero, F.E. (2011). Post-larval development of the microcotylid monogenean *Sparicotyle chrysophrii* (Van Beneden and

- Hesse, 1863): comparison with species of Microcotylidae and Heteraxinidae. *Parasitol Int*, 60(4):512-20.
82. Riccardi, G., Giosuè, A., Calabrese, I., Vaccaro, O. (2022). Dietary recommendations for prevention of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 118(5):1188-1204.
 83. Roberts R.J. (1978) *Fish Pathology*, New York, Macmillan Publishing Co.Inc. pp.317.
 84. Roberts RJ (1989). *Fish pathology*. Bailliere, Tindall, London. pp. 467.
 85. Roberts RJ (2001). *Fish Pathology*. 3rd Edition. W.B. Saunders publishing. pp 199.
 86. Romalde, J.L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol*, 5(1):3-9. doi: 10.1007/s10123-002-0051-6.
 87. Rosa, R.; Marques, A.; Nunes, M.L. (2012). Impact of climate change in Mediterranean aquaculture. *Rev. Aquac.*, 4: 163–177. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01071.x>.
 88. Schoch, C.L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hottot, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., et al. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* (Oxford). doi: 10.1093/database/baaa062.
 89. Scott, M.E(2023). Helminth-host-environment interactions: Looking down from the tip of the iceberg. *Journal of Helminthology*, 97. Published online by Cambridge University Press.
 90. Silva, D.S., Pereira, L.M., Moreira, A.R., et al. (2013). The apoptogenic toxin AIP56 is a metalloprotease A-B toxin that cleaves NF- κ B P65. *PLoS Pathogens*, 9(2). Article ID e1003128.
 91. Singh, K. and Mishra, A. (2013). A comparative study on seasonal distribution of the helminthparasites communities of some catfishes. *International Journal of Pharma and Biological Science*, 4: 19-30.

92. Sitjà-Bobadilla A, de Felipe MC and AlvarezPellitero P (2006). In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261.
93. Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pelliter, P. (2009). Experimental transmission of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) to gilthead seabream (*Sparus aurata*) and histopathology of the infection. *Folia Parasitologica*, 56(2):143-151.
94. Sitjà-Bobadilla A, Redondo J, Àlvarez-Pellitero P. (2010). Occurrence of *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Polyopisthocotylea) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) from different mariculture systems in Spain. *Aquacult Res.*, 41:939-944.
95. Snjezana Zrncic (2020). Diagnostic Manual fro the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture. Options Méditerranéennes, Series B: Studies and Research, no. 75.
96. Stella, E., Pastres, R., Pasetto, D., Kolega, M., Mejdandžić, D., Čolak, S., et al. (2011). A stratified compartmental model for the transmission of *Sparicotyle chrysophrii* (Platyhelminthes: Monogenea) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fish farms. *Parasitol Int*, 60(4):512-20.
97. Stella, E., Pastres, R., Pasetto, D., Kolega, M., Mejdandžić, D., Čolak, S., et al. (2023). A stratified compartmental model for the transmission of *Sparicotyle chrysophrii* (Platyhelminthes: Monogenea) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fish farms. *Royal Society Open Science*, 10(5). doi.org/10.1098/rsos.221377.
98. Talijančić, I., Šegvić-Bubić, T., Žužul, I., Džoić, T., Maršić-Lučić, J., Grubišić, L. (2019). Morphological and ecophysiological adaptations of wild gilthead seabream *Sparus aurata* associated with tuna farms. *Aquaculture Environment Interactions*, 11:97-110.
99. Thyssen, A; Ollevier, F. (2001). In vitro antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. *Aquaculture*, 200: 259–269.

100. Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Journal of Aquaculture*, 246: 37–61.
101. TEEB. (2010). *The Economics of Ecosystems and Biodiversity. Ecological and Economic Foundations*. Pushpam Kumar (editor). Earthscan, London and Washington.
102. Teixeira, A., Loureiro, I., Lisboa, J., Oliveira, P.N., Azevedo, J.E., Dos Santos, N.M.S., do Vale, A. (2023). Characterization and Vaccine Potential of Outer Membrane Vesicles from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int J Mol Sci*, 24(6):5138.
103. Varvarigos, P. (2022). 10. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. In : Zrnčić S. (ed.). *Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture*. Zaragoza: CIHEAM, 2020. p. 83-96 (Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches; n. 75).
104. Villar-Torres, M., Montero, F.E., Raga, J.A. et al. (2018). Come rain or come shine: environmental effects on the infective stages of *Sparicotyle chrysophrii*, a key pathogen in Mediterranean aquaculture. *Parasites Vectors*, 11, 558. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3139-3>.
105. Watanabe, Y., Tatsuno, I. (2020). Prevention of Cardiovascular Events with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Mechanism Involved. *J Atheroscler Thromb*, 27(3):183-198.
106. Woo PTK, Bruno DW, Lim LHS (2003). *Diseases and Disorders Of Finfish In Cage Culture*. Cabi publishing. pp 138.
107. Yamaguti S. (1963). *Systema Helminthum* Vol. I-II. Interscience Publishers, New York.
108. Zhou, S.-Y.-D.; Zhu, D.; Giles, M.; Daniell, T.; Neilson, R.; Yang, X.-R. (2020). Does reduced usage of antibiotics in livestock production mitigate the spread of antibiotic resistance in soil, earthworm guts, and the phyllosphere? *Environ. Int.*, 136: 105359, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105359>.

Ιστοσελίδες διαδικτύου

- European Parliament, 2022
- FAO statistics, 2022
- FAO (2022). Fishery and aquaculture statistics. Global aquaculture production 1950-2020.
- FAO Fisheries and Aquaculture Division. Rome (2022)
- International Organization for Standardization, 1947
- <http://www.who.int/en/>
- FEAP. (2020). European Aquaculture Production Report.
- www.megaron.gr/15-16-apriliou-2022-sunedrio-ichthuokalliergeias-2022
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation; FAO: Rome, Italy, 2022. doi:[10.4060/ca9229en](https://doi.org/10.4060/ca9229en)
- FAO. 2022. Blue Transformation - Roadmap 2022–2030: A vision for FAO’s work on aquatic food systems. Rome
- FAO, 2018. Sustainable food systems: concept and framework. Brief. Rome, 8 pp. <https://www.fao.org/3/ca2079en/CA2079EN.pdf>
- FAO. 2020a. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in action. Rome, 224 pp. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en>
- <https://www.msc.org/>
- <https://www.msc.org/what-we-are-doing/our-approach/what-is-sustainable-fishing>
- <http://www.fao.org/infoods>
- <http://nutrition.med.uoc.gr/GreekTables>
- <https://www.foodunfolded.com/article/sustainable-fisheries-the-msc-label>
- <https://www.diaitologia.gr/diatrofiki-axia-psariou>
- <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15305952>.
- <https://www.cdc.gov/healthypets/pets/fish.html>
- <https://iacuc.wsu.edu/zoonoses-associated-with-fish>

