

**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:**

**“ Βιβλιογραφική ανασκόπηση των μολύνσεων με είδη *Aeromonas* spp. σε ψάρια γλυκού νερού και διερεύνηση περιστατικού θνησιμότητας σε γόνο κυπρίνου (*Cyprinus carpio* L.) ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΗΤΡΙΑ**  
**Ευγενία Γουρζιώτη**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα  
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Ι. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής  
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. Α. Γκόβαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής  
Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο  
Θεσσαλίας

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2010



**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***

Thesis:

**“ Literature review of *Aeromonas* spp. infections in fresh water fish and investigation of a mortality case in carp fry (*Cyprinus carpio* L.) ”**

**POSTGRADUATE STUDENT  
Evgenia Gourzioti**

**ADVISOR COMMITTEE**

1. F. Athanassopoulou, Professor, Supervisor  
Laboratory of Fish Pathology, Ichthyology & Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
2. I. Pappas, Associate Professor, Member of advisor committee  
Laboratory of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
3. A. Govaris, Associate Professor, Member of advisor committee  
Laboratory of Hygiene of Foods of Animal Origin, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

KARDITSA 2010

*Στους γονείς μου, που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν...*

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μια ανασκόπηση που περιλαμβάνει όλες τις πληροφορίες και την διαθέσιμη τεχνογνωσία σχετικά με τις μολύνσεις με είδη *Aeromonas* spp. σε ψάρια γλυκού νερού. Σε μια περίοδο που οι ιχθυοκαλλιέργειες αναπτύσσονται ταχύτατα παγκοσμίως και ένας από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες της οικονομικής σταθερότητας τους είναι τα νοσήματα των ψαριών, η εργασία αυτή συγκεντρώνει τις σημαντικότερες πληροφορίες και γνώσεις από τα μέχρι σήμερα δημοσιευμένα άρθρα, για τις μολύνσεις και τα νοσήματα που οφείλονται στα είδη βακτηρίων *Aeromonas* spp. στα ψάρια γλυκού νερού.

Η διπλωματική εργασία χωρίζεται σε τέσσερα κεφάλαια: Το 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο είναι η 'Εισαγωγή', αναφέρεται στις υδατοκαλλιέργειες, στα κυριότερα εκτρεφόμενα είδη ψαριών γλυκού νερού και στα παθολογικά πρόβληματα στις υδατοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων. Στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο 'Παθολογικές καταστάσεις/Νοσήματα που οφείλονται σε μολύνσεις με είδη *Aeromonas* spp. σε ψάρια του γλυκού νερού', γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των ειδών *Aeromonas* spp. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση αφορά την ταξινόμηση, τα χαρακτηριστικά των ειδών *Aeromonas*, την παθογένεια τους, την επιζωοτιολογία και την παρουσία των *Aeromonas* στα ψάρια, τις κλινικές εκδηλώσεις των μολύνσεων, τις μεθόδους διάγνωσης, τους τρόπους αντιμετώπισης με λήψη θεραπευτικών και προληπτικών μέτρων και τον ρόλο τους ως παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο. Το 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο αναφέρεται στην 'δική μας έρευνα', στην διαγνωστική εργαστηριακή διερεύνηση ενός περιστατικού θνησιμότητας σε γόνου κυπρίνου, καθώς και στον καθορισμό του αιτίου της θνησιμότητας. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες, από τρεις ομάδες γόνου κυπρίνου που εμφάνισαν θνησιμότητα, από τον ιχθυογεννητικό σταθμό κυπρίνου στην Άρτα. Όλες οι εργαστηριακές εξετάσεις (μικροβιολογικές, παρασιτολογικές, βιοχημικές, ιστολογικές) πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Καρδίτσα, στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας. Στο 4<sup>ο</sup> κεφάλαιο 'Αποτελέσματα - Συμπεράσματα - Συζήτηση - Προτάσεις' περιγράφονται τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας, καθώς και τα συμπεράσματα και οι προτάσεις που στηρίζονται στα ευρήματα της μελέτης αυτής.

## ABSTRACT

The present master thesis comprises a review that includes all the informations and available knowledge in technology regarding the infections by *Aeromonas* spp. species in freshwater fish. In a period where aquaculture develops rapidly worldwide and one of the major limitation factor of economic stability are diseases of fish, this master thesis assembles the most significant informations and knowledges from articles and papers that have been published until today, referred to the infections and diseases that *Aeromonas* spp. can provoke in freshwater fish.

The present master thesis is divided into four chapters: The first chapter is the 'Introduction', that refers to aquaculture, the major cultured species of freshwater fish and the pathological problems in aquaculture of freshwater fish. The second chapter 'Pathological conditions/Diseases that *Aeromonas* spp. species provoke in freshwater fish', refers to the literature review of *Aeromonas* spp. species. The literature review refers to the taxonomy, the characteristics of *Aeromonas* species, their pathology, the epizootiology and the presence of *Aeromonas* in fish, the clinical manifestations of the infections, the diagnostic methods, the ways of confrontation with measures of treatment and prophylaxis and their role as pathogenic bacteria for human. The third chapter refers to 'our investigation', the diagnostic laboratory investigation of a mortality case in carp fry, and the determination of the cause of the mortality. For this purpose samples were collected two times from the genetic station of carp in Arta. All the laboratory techniques (microbiological, parasitological, biochemical, histological) carried out in the laboratory of Ichthyology – Ichthyopathology of the Veterinary School of the University of Thessaly, in Karditsa, for the purposes of this thesis. In the fourth chapter 'Results – Conclusions – Discussion – Suggestions' the results of our investigation are given, as well as the conclusions and suggestions based on the findings of this thesis.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια και Πρόεδρο του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την καθοδήγησή της στην διαδικασία επιλογής του θέματος, την κριτική ανάγνωση του κειμένου, τις πολύτιμες συμβουλές της και την βοήθειά της σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος καθώς και για την πολύτιμη συμβολή της ως επιβλέπουσα Καθηγήτρια της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Ιωάννη Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συνεχή καθοδήγηση και την βοήθεια του σε όλο το διάστημα συγγραφής αυτής της εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες στον κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την κριτική ανάγνωση του κειμένου.

Θερμές ευχαριστίες στην κ. Μπιτχαβά Κωνσταντίνα, κτηνίατρο (Msc, PhD), διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την βοήθειά της σε όλες τις φάσεις πραγματοποίησης της διπλωματικής εργασίας, τις συμβουλές της, τις χρήσιμες παρατηρήσεις στην διαμόρφωση του τελικού κειμένου της διπλωματικής μου διατριβής καθώς και για την ηθική συμπαράσταση σε όλο αυτό το διάστημα συγγραφής της εργασίας.

Πολλές ευχαριστίες στην κα. Τζιρώνη Ευτυχία, μεταπτυχιακή φοιτήτρια και εργαστηριακή τεχνικό του εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, για την συνεχή και πολύτιμη βοήθεια της κατά την πραγματοποίηση των εργαστηριακών εξετάσεων. Επίσης ευχαριστώ την κ. Κωστή Ευαγγελία, υπεύθυνη του ιχθυογεννητικού σταθμού στην Άρτα και τους συνεργάτες της για την άριστη συνεργασία και την βοήθεια τους στην δειγματοληψία των ιχθυδίων κυπρίνου.

Θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα την φίλη και συνάδελφο κα. Μολυμπάκη Ευγενία, κτηνίατρο για την βοήθεια και την ηθική στήριξη σε όλη την περίοδο εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στους γονείς μου, και ιδιαίτερα στην μητέρα μου που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν σε κάθε προσπάθεια που κάνω, καθώς και για όσα έχουν κάνει για μένα μέχρι σήμερα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

<b>ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ</b>	<b>1</b>
<b>ADVISORY COMMITTEE</b>	<b>2</b>
Αφιερώσεις	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	<b>6</b>
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>7</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup></u></b>	<b>11</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
<b>1.ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>	<b>11</b>
<b>ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ</b>	
<b>1.1 Σημασία των υδατοκαλλιεργειών, οι υδατοκαλλιέργειες παγκοσμίως</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Υδατοκαλλιέργειες σε Ευρώπη και Μεσόγειο</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα</b>	<b>17</b>
<b>1.4 Υδατοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων στην Ελλάδα</b>	<b>20</b>
<b>2.ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια</b>	<b>23</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup></u></b>	<b>26</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</b>	
<b>ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ - ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΜΕ ΕΙΔΗ <i>AEROMONAS</i> SPP. ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ</b>	
<b>1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>AEROMONAS</i> SPP.</b>	<b>26</b>
<b>1.1 Ταξινόμηση-Ονοματολογία</b>	<b>26</b>
<b>1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Ιδιότητες (βιοχημικές) <i>Aeromonas</i> spp.</b>	<b>31</b>

<b>2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ</b>	<b>35</b>
2.1 Μηχανισμός προσβολής	35
2.2 Πρόκληση λοίμωξης	37
2.3 Λοιμογόννοι παράγοντες	38
2.3.1 Λοιμογόννοι παράγοντες μη κινητών ειδών ( <i>A. salmonicida</i> group)	39
2.3.2 Λοιμογόννοι παράγοντες κινητών ειδών ( <i>A. hydrophila</i> group)	43
<b>3. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>45</b>
3.1 Ιστορική Αναδρομή εμφάνισης των νοσημάτων στα ψάρια γλυκού νερού που οφείλονται σε είδη <i>Aeromonas</i>	45
3.2 Παρουσία ειδών <i>Aeromonas</i> στα ψάρια γλυκού νερού	47
3.3 Παρουσία ειδών <i>Aeromonas</i> στο περιβάλλον	50
<b>4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ ΜΕ ΕΙΔΗ <i>AEROMONAS</i> SPP.</b>	<b>52</b>
4.1 Εισαγωγή	52
4.2 Συμπτώματα – Αλλοιώσεις Μολύνσεων με Κινητά Είδη <i>Aeromonas</i> ( <i>A. hydrophila</i> group)	54
4.2.1 Μόλυνσεις με <i>A. hydrophila</i>	57
4.3 Συμπτώματα–Αλλοιώσεις Μολύνσεων με μη Κινητά Είδη <i>Aeromonas salmonicida</i>	59
4.3.1 Τυπική δοθιήνωση Σολομοειδών (Salmonid Furunculosis)	59
4.3.2 Ελκωτική Νόσος στην Πέστροφα (Trout Ulcer Disease)	63
4.3.3 Ελκωτική Νόσος στο χρυσόψαρο (Goldfish Ulcer Disease)	64
4.3.4 Ερυθροδερματίτιδα του Κυπρίνου (Carp Erythrodermatitis)	65
4.3.5 Μολύνσεις με άτυπα στελέχη <i>A. salmonicida</i>	67
4.3.6 Ελκωτική νόσος στο καλκάνι (Ulcer Disease of Flounder)	69
4.3.7 Μολύνσεις άλλων ζωικών οργανισμών με είδη <i>Aeromonas</i>	69
<b>5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ</b>	<b>70</b>
5.1 Απομόνωση – Ταυτοποίηση Κλασσικές μέθοδοι απομόνωσης	70
5.2 Δειγματοληψία	71
5.3 Απομόνωση των <i>Aeromonas</i> με καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα	72
5.3.1 Καλλιέργεια τυπικών και άτυπων στελεχών <i>A. salmonicida</i>	73
5.3.2 Καλλιέργεια κινητών ειδών <i>Aeromonas</i>	75



5.4 Βιοχημικός και φαινοτυπικός καθορισμός των ειδών <i>Aeromonas</i>	77
5.5 Ιστοπαθολογικές εξετάσεις	79
5.6 Ανοσολογικές και ορολογικές τεχνικές	80
5.7 Εφαρμογή της δοκιμής στρες για την ανίχνευση αφανών φορέων	81
5.8 Αντιβιογράμμα	82
5.9 Νέες μέθοδοι απομόνωσης	85
<b>6. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ – ΕΛΕΓΧΟΣ</b>	<b>87</b>
6.1 Θεραπεία	87
6.1.1 Εισαγωγή	87
6.1.2 Χρήση Αντιβιοτικών	88
6.2 Πρόληψη	93
6.2.1 Προληπτικά μέτρα	93
6.2.2 Μείωση παραγόντων στρες	94
6.2.3 Εφαρμογή προληπτικών μέτρων στα εκκολαπτήρια	95
6.2.4 Ανάπτυξη γενετικά ανθεκτικών ψαριών μέσω γενετικής επιλογής	96
6.2.5 Εμβόλια	97
6.2.5.1 Εισαγωγή	97
6.2.5.2 Χορήγηση εμβολίων	98
6.2.5.3 Κατηγορίες εμβολίων	99
6.2.5.4 Εμβολιασμοί κατά των μολύνσεων με <i>Aeromonas</i> spp.	99
<b>7. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΕΙΔΩΝ AEROMONAS ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ</b>	<b>101</b>
7.1 Εισαγωγή	101
7.2 Παθογόνος δράση	102
7.3 Περιστατικά μόλυνσης στον άνθρωπο	104
7.4 Συμπτώματα	106
7.4.1 Γενικευμένη μόλυνση	107
7.4.2 Γαστρεντερίτιδα	108
7.4.3 Μολύνσεις τραυμάτων/κυτταρίτιδα	109
7.4.4 Εξωεντερικές μολύνσεις	110
7.5 Διάγνωση των μολύνσεων με <i>Aeromonas</i>	111
7.6 Αντιμετώπιση-Θεραπεία	113
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup></u></b>	<b>115</b>

<b>Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ</b>	
<b>1. Σκοπός της δικής μας έρευνας</b>	<b>115</b>
<b>2. Υλικά</b>	<b>115</b>
<b>2.1 Λήψη Ιστορικού</b>	<b>115</b>
<b>2.2 Δειγματοληψία</b>	<b>120</b>
<b>3. Μέθοδοι</b>	<b>121</b>
<b>3.1 Νεκροτομική εξέταση</b>	<b>121</b>
<b>3.2 Παρασιτολογική Εξέταση</b>	<b>122</b>
<b>3.2.1 Ξέσματα Δέρματος</b>	<b>122</b>
<b>3.2.2 Εξέταση βραγχίων (Νωπά παρασκευάσματα βραγχίων)</b>	<b>124</b>
<b>3.2.3 Μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων</b>	<b>125</b>
<b>3.3 Μικροβιολογική εξέταση</b>	<b>127</b>
<b>3.4 Τεστ Κινητικότητας</b>	<b>128</b>
<b>3.5 Χρώση Gram (νωπά παρασκευάσματα)</b>	<b>128</b>
<b>3.6 Βιοχημικός χαρακτηρισμός με τεστ API 20E</b>	<b>129</b>
<b>3.7 Αντιβιογράμμα</b>	<b>131</b>
<b>3.8 Ιστολογικές Εξετάσεις</b>	<b>133</b>
<b>4. Αντιμετώπιση - Θεραπεία</b>	<b>135</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup></u></b>	<b>137</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ</b>	
<b>1. Αποτελέσματα</b>	<b>137</b>
<b>2. Συμπεράσματα - Συζήτηση της διερεύνησης του περιστατικού θνησιμότητας του γόνου κυπρίνου</b>	<b>145</b>
<b>3. Έρευνες στην Ελλάδα σχετικά με την παρουσία των ειδών <i>Aeromonas</i> στα ψάρια</b>	<b>150</b>
<b>4. Προτάσεις - Συνέχιση της έρευνας.</b>	<b>151</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>156</b>
<b>1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Ξενόγλωσση)</b>	<b>156</b>
<b>2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Ελληνική)</b>	<b>185</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>186</b>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

#### ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΕΙΔΗ ΨΑΡΙΩΝ ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ

##### 1.1 Σημασία των υδατοκαλλιέργειών, οι υδατοκαλλιέργειες παγκοσμίως

Ο όρος ‘υδατοκαλλιέργειες’ αφορά στην ελεγχόμενη εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, μια δραστηριότητα η οποία ιστορικά αναφέρεται πριν από πολλούς αιώνες και εμφανίζει μια συνεχώς αυξανόμενη ανάπτυξη κατά τις τελευταίες δεκαετίες (FAO, 2008).

Οι υδατοκαλλιέργειες για πρώτη φορά, μετά την σταθερή ανάπτυξή τους τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες έφτασαν στο σημείο να συνεισφέρουν κατά 50% στην συνολική κατανάλωση ψαριών παγκοσμίως. Αυτό αντανακλά όχι μόνο την ζωτικότητα του τομέα των υδατοκαλλιέργειών αλλά και την παγκόσμια οικονομική ανάπτυξη και τις συνεχείς εξελίξεις στην επεξεργασία και εμπορία των ψαριών (FAO, 2008). Η παγκόσμια παραγωγή υδρόβιων οργανισμών (ψάρια, μαλάκια, οστρακοειδή, καρκινοειδή, πλαγκτόν, μακροφύκη) από την αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες τα τελευταία χρόνια, εμφανίζει ανοδική πορεία, φτάνοντας τους 110 εκατομμύρια τόνους το 2006 (Πίνακας 1).

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία του FAO (Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών) το 2008, η συνεισφορά των υδατοκαλλιέργειών στην κάλυψη των παγκοσμίων αναγκών σε ψάρια, μαλάκια, καρκινοειδή και άλλους υδρόβιους οργανισμούς συνεχίζει να αυξάνεται, από 3,9% του συνολικού βάρους παραγωγής το 1970 σε 36% το 2006 (FAO, 2008) (Πίνακας 2).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες αυξάνονται πιο γρήγορα από τους τομείς των άλλων προϊόντων ζωικής παραγωγής, με ένα μέσο ποσοστό αύξησης 6,9% κάθε χρόνο από το 1970 (FAO, 2008), ενώ εξελίχθηκαν στην πιο γρήγορα αναπτυσσόμενη δραστηριότητα παγκοσμίως, καθώς τα ψάρια και τα προϊόντα τους αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών για τον άνθρωπο, εδώ και αιώνες (FAO, 1996). Η παγκόσμια ζήτηση για ψάρια αυξάνεται συνεχώς, καθώς τα φυσικά αποθέματα ψαριών μειώνονται και η τεχνολογία της ιχθυοκαλλιέργειας βελτιώνεται και

αναβαθμίζεται, ενώ παγκοσμίως, η κυριότερη ομάδα ψαριών που εκτρέφεται, παραμένει αυτή των ψαριών του γλυκού νερού. Τα σολομοειδή (Salmonidae), η ιριδίζουσα πέστροφα και ο σολομός αποτελούν το 80% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ψαριών από υδατοκαλλιέργειες (Πάσχος, 2004). Τα κυπρινοειδή (Cyprinidae), τα γατόψαρα (Siluridae, Ictaluridae, Clariidae), τα χέλια (Anguillidae), οι τιλάπιες (Cichlidae), τα κεφαλοειδή (Mugilidae) και όσον αφορά τα ψάρια θαλασσινού νερού το λαβράκι (Serranidae) και η τσιπούρα (Sparidae) κατέχουν επίσης σημαντική θέση στην παραγωγή ψαριών από υδατοκαλλιέργειες (Noga, 2000).

Το 2004 η παγκόσμια συνολική παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών (συμπεριλαμβανομένων και των υδρόβιων φυτών) ήταν 59,4 εκατομμύρια τόνους και το 2006 έφτασε στους 66,7 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2004).

**Πίνακας 1.** Προβλεπόμενη παραγωγή υδατοκαλλιεργειών από το 1982 έως το 2050 (FAO, 2004).

Ομάδες ειδών	Παραγωγή 1992 (εκ. τον.)	Ποσοστό αύξησης 1986-1992 %	Εκτιμώμενη ανάπτυξη το 2010 (εκ. τον.)	Προβλεπόμενη ανάπτυξη το 2050 (εκ. τον.)
Ιχθύες γλυκού νερού	7.981	7.9	17.770	28.280
Διάδρομοι ιχθύες	1.081	7.6	2.130	3.960
Άλλοι θαλάσσιοι ιχθύες	0.356	7.2	0.910	5.100
Σύνολο ιχθύων	9.418	7.8	20.810	37.340
Καρκινοειδή γλυκού νερού	0.062	1.4	0.150	0.610
Καρκινοειδή θαλασσινού νερού	0.920	18.6	1.650	2.650
Σύνολο καρκινοειδών	0.982	16.8	1.800	3.260
Μαλάκια γλυκού νερού	0.256	-15.8	-	-
Θαλάσσια μαλάκια	3.500	6.5	9.980	15.350
Σύνολο μαλακίων	3.501	6.5	9.980	15.410
Σύνολο καλλιεργούμενων ειδών	5.390	8	14.230	49.020

Σύνολο υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής (συμπ. φυκών)	19.200			105.000
Σύνολο υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής (εξαιρ. φυκών)	13.900		33.000	56.000

Στις μέρες μας, οι στόχοι εφαρμογής των υδατοκαλλιεργειών διαμορφώθηκαν, ως εξής :

- Παραγωγή τροφίμων για τον άνθρωπο.
- Παραγωγή τροφής για τα κατοικίδια.
- Παραγωγή προϊόντων για τη βιομηχανία.
- Βελτίωση φυσικών αποθεμάτων υδρόβιων οργανισμών με τεχνητές μεθόδους.
- Παραγωγή διακοσμητικών υδρόβιων οργανισμών.
- Παραγωγή δολωμάτων για την αλιεία ιχθύων.
- Παραγωγή ιχθύων κατάλληλων για τον εμπλουτισμό φυσικών υδάτινων μαζών και την ερασιτεχνική αλιεία (Παπουτσόγλου, 1997).

Το 2006, περισσότεροι από 110 εκατομμύρια τόνοι (77%) της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών χρησιμοποιήθηκαν για άμεση κατανάλωση, ενώ 33 εκατομμύρια τόνοι χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ιχθυάλευρων και ιχθυέλαιου. Κυρίαρχη στην παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιεργειών παραμένει η Ασία, εξαιτίας κυρίως της τεράστιας παραγωγής της Κίνας (67% της παγκόσμιας παραγωγής) (FAO, 2008).

Οι υδατοκαλλιέργειες παγκοσμίως είναι ο διατροφικός κλάδος που γνωρίζει τη μεγαλύτερη ανάπτυξη και αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους και συγχρόνως οικονομικότερους τρόπους παραγωγής τροφίμων. Εξάλλου, η κατανάλωση ιχθύων διατηρεί ένα σημαντικό μερίδιο στην αγορά του κρέατος το οποίο μάλιστα αυξάνεται συνεχώς εξαιτίας των επιθυμητών διατροφικών χαρακτηριστικών του, όπως είναι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας, η χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος και η σχετικά μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (FAO, 2008).

Παρόλα όμως τα πλεονεκτήματα, δεν πρέπει η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών να γίνεται με μοναδικό σκοπό το οικονομικό όφελος, αλλά οι διαθέσιμες γνώσεις, τα κεφάλαια και η τεχνολογία να συνεργάζονται ώστε παράλληλα με την παραγωγή τροφίμων να προστατεύεται και το περιβάλλον (Παπουτσόγλου, 1997).

**Πίνακας 2.** Παγκόσμια παραγωγή από την αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες (FAO, 2008).

Παραγωγή (εκατομ. τόνοι)	2002	2003	2004	2005	2006
ΕΣΩΤΕΡΙΚΑ ΝΕΡΑ					
Αλιεία	8.7	9.0	8.9	9.7	10.1
Υδατοκαλλιέργειες	24.0	25.5	27.8	29.6	31.6
<b>Σύνολο Εσωτερικών νερών</b>	<b>32.7</b>	<b>34.4</b>	<b>36.7</b>	<b>39.3</b>	<b>41.7</b>
ΑΛΜΥΡΑ ΝΕΡΑ					
Αλιεία	84.5	81.5	85.7	84.5	81.9
Υδατοκαλλιέργειες	16.4	17.2	18.1	18.9	20.1
<b>Σύνολο Αλμυρών νερών</b>	<b>100.9</b>	<b>98.7</b>	<b>103.8</b>	<b>103.4</b>	<b>102.0</b>
ΣΥΝΟΛΟ ΑΛΙΕΙΑΣ	93.2	90.5	94.6	94.2	92.0
ΣΥΝΟΛΟ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	40.4	42.7	45.9	48.5	51.7
<b>ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ</b>	<b>133.6</b>	<b>133.2</b>	<b>140.5</b>	<b>142.7</b>	<b>143.6</b>

Σημείωση: Δεν περιλαμβάνονται τα υδρόβια φυτά.

## 1.2 Υδατοκαλλιέργειες σε Ευρώπη και Μεσόγειο

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί στον ευρωπαϊκό και ιδιαίτερα στο μεσογειακό χώρο, μεγάλο ενδιαφέρον για τις υδατοκαλλιέργειες κάθε τύπου και μορφής (FAO, 2004). Στην Ευρώπη συναντάμε τη μεγαλύτερη ποικιλία

εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών όσον αφορά τα είδη και τους τύπους εκτροφής. Οι εκτροφές αυτές αρχικά αναπτύχθηκαν στα εσωτερικά νερά ενώ τις τελευταίες δεκαετίες ακολούθησε μια θεαματική ανάπτυξη των θαλάσσιων εκτροφών σε περιορισμένο όμως αριθμό ειδών, με αιχμή κυρίως τον σολομό του ατλαντικού, την τσιπούρα και το λαβράκι (FAO, 2004).

Η ελεγχόμενη εκτροφή ψαριών στην Ευρώπη θεωρείται ότι ξεκίνησε γύρω στα 1200 μ.Χ. με ψάρια του γλυκού νερού. Το 1500 μ.Χ. αρχίζει στην Ευρώπη η εκτροφή κυπρίνου, ο οποίος εισάγεται από την Κίνα. Το 1882 εισάγεται από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής η ιριδίζουσα πέστροφα, η εκτροφή της οποίας αρχίζει ύστερα από την προσαρμογή της στις νέες συνθήκες καλλιέργειας (Φώτης, 2003). Σταδιακά, εγκαταστάθηκαν τα πρώτα εκκολαπτήρια, με σκοπό την απελευθέρωση γόνου σε ποτάμια και αργότερα, κατασκευάστηκαν εκτατικές και ημιεντατικές μονάδες εκτροφής (Πάσχος, 2004). Από το 1900 και μετά, η ανάπτυξη των βιολογικών επιστημών και της τεχνολογίας, σε συνδυασμό με την όλο και αυξανόμενη ζήτηση σε προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας, κατέστησαν τις ιχθυοκαλλιέργειες των εσωτερικών υδάτων έναν σημαντικό κοινωνικο-οικονομικό παράγοντα (Πάσχος, 2004).

Στις μέρες μας, η σχετική εξάντληση ορισμένων υπερπόντιων αλιευτικών πεδίων, η καθιέρωση των ζωνών αλιείας και της οικονομικής ζώνης των 200 μιλίων από τις περισσότερες χώρες, σε συνδυασμό με την αύξηση της αγοραστικής δύναμης των καταναλωτών των ευρωπαϊκών χωρών, αλλά και η ενίσχυση της τάσης για υγιεινή διατροφή, είναι αιτίες που ώθησαν στην ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών στην Ευρώπη (FAO, 2004). Η Ευρώπη σήμερα, συνεισφέρει στην παγκόσμια παραγωγή ψαριών από υδατοκαλλιεργειες κατά 54% όσον αφορά την παραγωγή πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*), κατά 99% όσον αφορά την παραγωγή του ευρωπαϊκού χελιού (*Anguilla anguilla*) και 68% όσον αφορά την παραγωγή του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) και της τσιπούρας (*Sparus aurata*) (Ariel & Olesen, 2002) (Γράφημα 1).

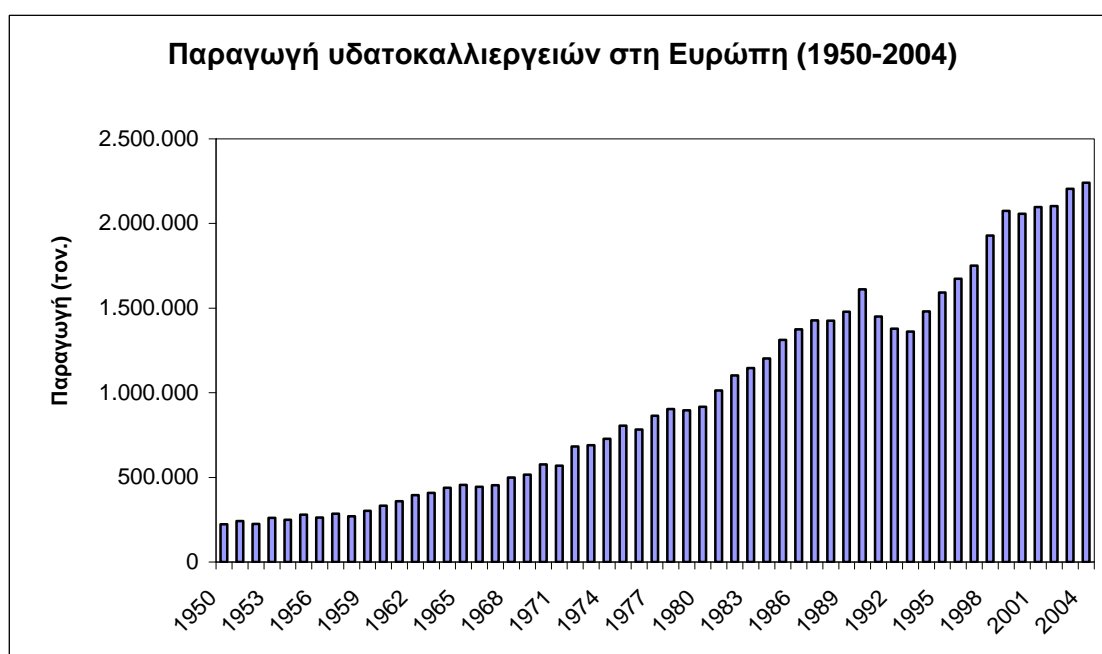
Οι υδατοκαλλιεργειες στην Μεσόγειο, τα τελευταία 25 χρόνια έχουν εξελιχθεί και αναβαθμιστεί τεχνολογικά, εξαιτίας κυρίως μιας σημαντικής ερευνητικής προσπάθειας στα πεδία της αναπαραγωγής, της καλλιέργειας του γόνου, της παραγωγής ιχθυοτροφών και της γενετικής μηχανικής (Basurco, 2001).

Η παρούσα κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών στον ευρωπαϊκό αλλά και μεσογειακό χώρο εμφανίζει δύο όψεις: αυτή που αφορά στις υδατοκαλλιεργειες των

εσωτερικών γλυκών νερών και εκείνη των υφάλμυρων και θαλάσσιων νερών. Σε ότι αφορά στην πρώτη, πρέπει να τονιστεί ότι χαρακτηρίζεται από μία αύξηση κατά την τελευταία δεκαετία της συνολικής της παραγωγής, που μπορεί να αποδοθεί:

- Στην απόδοση των μέτρων προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος.
- Στη βελτίωση των μεθόδων εκτροφής, με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής.
- Στην επιτυχή αντιμετώπιση πολλών βιολογικών προβλημάτων των εκτρεφόμενων οργανισμών (FAO, 2004).

**Γράφημα 1.** Μεταβολή της συνολικής ευρωπαϊκής παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών από το έτος 1950 έως το έτος 2004 (FAO, 2004).



Οι οργανισμοί που συνθέτουν τη συνολική παραγωγή των ευρωπαϊκών εσωτερικών-γλυκών νερών είναι κυρίως: τα σολομοειδή (*Salmo salar*), η ιριδιζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), τα κυπρινοειδή (*Cyprinus carpio*), το ευρωπαϊκό γατόψαρο (*Silurus glanis*), η τιλάπια (*Oreochromis spp.*), οι οξύρυγχοι (*Acipenser ruthenus*) και τα χέλια (*Anguilla anguilla*) (Πάσχος, 2004). Παράλληλα με τα είδη αυτά εκτρέφονται και συμμετέχουν στην παγκόσμια παραγωγή είδη, όπως το γλίνι (*Tinca tinca*), η πέρκα (*Perca fluviatilis*), τα κεφαλοειδή (*Mugil cephalus*), τα διακοσμητικά ψάρια (ornamentals) (Πάσχος, 2004).

Σύμφωνα με τις προβλέψεις του Οργανισμού Επισιτισμού και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), η παγκόσμια κατανάλωση ψαριών και θαλασσινών θα



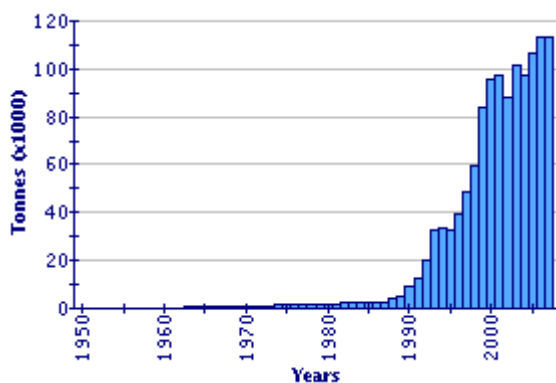
εξακολουθήσει να αυξάνεται. Σε αυτό το δεδομένο πρέπει να προστεθεί το πρόβλημα της υπεραλίευσης και των ορίων των αλιευτικών αποθεμάτων. Κατά συνέπεια, παρόλο που η αλιεία θα εξακολουθήσει να παρέχει μεγάλο μέρος των αλιευμάτων που απαιτούνται για την κάλυψη της παγκόσμιας κατανάλωσης, η αύξηση της ζήτησης δεν είναι δυνατό να καλυφθεί αποκλειστικά από άγρια ψάρια. Αυτά τα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια θα γνωρίσει μεγάλη άνθηση, κάτι που είναι βέβαιο. Ήδη το 2005, η παραγωγή του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών της διευρυμένης Ε.Ε. των 27 ανήλθε σε περίπου 1,3 εκατομμύρια τόνους ψαριών, μαλακίων και μαλακοστράκων, με κύκλο εργασιών περίπου 3,5 δισεκατομμυρίων ευρώ. Γι' αυτό και η Επιτροπή, ήδη από το 2002, εγκαινίασε την πρώτη στρατηγική για τη βιώσιμη ανάπτυξη της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας, η οποία συνεισέφερε σε μεγάλο βαθμό στη διασφάλιση της οικονομικής βιωσιμότητας, της ασφάλειας και της ποιότητας της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιεργητικής παραγωγής. Σήμερα, η πλειονότητα των μέτρων που περιέχονται στη στρατηγική του 2002 και εμπίπτουν στην αρμοδιότητα των ευρωπαϊκών δημόσιων αρχών έχουν ήδη τεθεί σε εφαρμογή. Είναι λοιπόν αναγκαίο να γίνουν νέα βήματα προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι προκλήσεις που τίθενται στην ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια. Αυτό είναι και το αντικείμενο μιας ανακοίνωσης που εγκρίθηκε στις 8 Απριλίου 2009 από την Επιτροπή και αφορά την ανανέωση της στρατηγικής για τη βιώσιμη ανάπτυξη της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας. Η υγεία και η ευζωία των ζώων πρέπει να αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της στρατηγικής για μια σύγχρονη και αποδοτική υδατοκαλλιέργεια. Αυτό είναι απαραίτητο τόσο από οικονομικής άποψης (η καλή υγεία των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών είναι απαραίτητη για βέλτιστη ανάπτυξη και ικανοποιητική παραγωγικότητα), αλλά και από εμπορικής (καλύτερη εικόνα του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας) και φυσικά από την άποψη της δημόσιας υγείας και της προστασίας του περιβάλλοντος (FAO, 2008).

### **1.3 Υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα**

Η Ελλάδα είναι μια χώρα, με μεγάλη παράδοση στην παραγωγή ιχθύων υψηλής ποιότητας. Η εντατική εκτροφή ιχθύων στην Ελλάδα είναι από τους πιο σημαντικούς τομείς της ζωικής παραγωγής με σημαντικό ποσοστό εξαγωγών της παραγόμενης ποσότητας. Αυτό αποδεικνύεται και από μαρτυρίες που βρίσκονται σε

χειρόγραφα από τον 5<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. Σήμερα, τα ελληνικά προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας αναγνωρίζονται παγκοσμίως. Οι υδατοκαλλιέργειες με ένα ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης, περίπου 10% αποτελούν έναν από τους πιο γρήγορα αναπτυσσόμενους βιομηχανικούς κλάδους στην Ελλάδα. Είκοσι χρόνια πριν, οι ιχθυοκαλλιέργειες ήταν πρακτικά ανύπαρκτες, ωστόσο από το 1981 και σαν αποτέλεσμα των καλών κλιματικών συνθηκών, των εθνικών και ευρωπαϊκών επενδύσεων στον τομέα, μαζί με την επανάσταση στην τεχνολογία των εκκολαπτηρίων και της διατροφής, οι ιχθυοκαλλιέργειες γνώρισαν “άνθιση” (Stirling report, 2004) (Γράφημα 2).

**Γράφημα 2.** Παραγωγή υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα (από το 1950) (Fao Fishery Statistic) ([http<sup>1</sup>](#)).



Οι ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν πλέον ένα από τους δυναμικότερους παραγωγικούς κλάδους της χώρας μας, ο οποίος ενσωματώνει την υψηλή τεχνογνωσία, συμβάλλει στη μείωση της υπεραλίευσης, στη μείωση των εισαγωγών ιχθυηρών, βελτιώνοντας το εμπορικό ισοζύγιο σε επίπεδο εθνικό αλλά και Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η παραγωγή ιχθύων έφτασε τους 103.000 τόνους το 2002 ή το 57% της παγκόσμιας παραγωγής αυτών των ειδών. Το 2006 η παραγωγή έφτασε περίπου τους 113.000 τόνους. Το σημερινό όμως ακριβές μέγεθος της συνολικής της παραγωγής δεν είναι γνωστό και δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί, λόγω της αναξιπιστίας των επίσημων στατιστικών και της απροθυμίας των παραγωγών να δηλώσουν την ακριβή παραγωγή (Stirling report, 2004).

Η επιτυχία αυτή των υδατοκαλλιεργειών βασίζεται κυρίως στις φυσικές συνθήκες της χώρας: ήπιο κλίμα, καθαρά νερά, περίπου 3.000 νησιά και μακριά ακτογραμμή. Σήμερα, τα πιο σημαντικά εμπορικά είδη ιχθύων που εκτρέφονται και έχουν ευρεία απήχηση και αποδοχή στην ελληνική και παγκόσμια αγορά είναι η τσιπούρα, το λαβράκι και σε μικρότερες ποσότητες η πέστροφα, το ευρωπαϊκό χέλι

και ο κυπρίνος. Τα κύρια είδη ψαριών που καλλιεργούνται στην χώρα μας, σύμφωνα με την παραγόμενη σε τόνους ποσότητα από κάθε είδος είναι:

- Τσιπούρα
- Λαβράκι
- Πέστροφα
- Χέλι
- Χιόνα
- Λυθρίνι
- Σαργός
- Τόνος
- Γλώσσα
- Κέφαλος
- Συναγρίδα

Το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν το 95% περίπου της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα, ενώ τα υπόλοιπα είδη παράγονται σε μικρότερες ποσότητες. Υπάρχει επίσης μια σημαντική παραγωγή των οστρακοειδών και δίθυρων μαλάκιων, κυρίως μύδια, μικρότερης όμως οικονομικής αξίας (Stirling report, 2004).

Η Ελληνική θαλασσοκαλλιέργεια ευρύαλων ψαριών κατέχει σήμερα ηγετική θέση στη Μεσόγειο, αντιπροσωπεύοντας το 65% περίπου της Ευρωπαϊκής και της Μεσογειακής παραγωγής ([http<sup>2</sup>](#)). Τα τρία τέταρτα της παραγωγής εξάγονται σήμερα στις Ευρωπαϊκές χώρες, κυρίως στην Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία, Τουρκία, Πορτογαλία και Αγγλία. Το υπόλοιπο της παραγωγής κατανέμεται στους Έλληνες καταναλωτές μέσα από τις αλυσίδες supermarket και τα παραδοσιακά ιχθυοπωλεία (Stirling report, 2004). Ο μέσος όρος κατανάλωσης ψαριών, τον χρόνο ανά άτομο στην Ελλάδα είναι περίπου 27 kg, τοποθετώντας την Ελλάδα στο ίδιο υψηλό επίπεδο, όπως η Ιταλία, η Δανία και ο Καναδάς ([http<sup>3</sup>](#)). Τα ψάρια, κυρίως το λαβράκι και η τσιπούρα αποτελούν τον τρίτο μεγαλύτερο αγροτικό τομέα εξαγωγών, μετά το ελαιόλαδο και τον καπνό και αντιμετωπίζεται ως στρατηγικό προϊόν από την ελληνική κυβέρνηση. Η καλλιέργεια της πέστροφας από την άλλη, ακολουθεί κυρίως τις παραδοσιακές μεθόδους των μικρών οικογενειακών επιχειρήσεων, με χαμηλό σχετικά κόστος και χαμηλή παραγωγή.

Το 2000 υπήρχαν περίπου 269 μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας διασκορπισμένες σε όλη την χώρα. Ο αριθμός των μονάδων σήμερα έχει μειωθεί κυρίως λόγω της

παύσης λειτουργίας ορισμένων, της συγχώνευσης μικρότερων εταιριών και της εδραίωσης των μεγαλύτερων εταιριών. Ο αριθμός των μονάδων έφτασε περίπου τις 167 το 2003 (Stirling report, 2004).

#### **1.4 Υδατοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων στην Ελλάδα**

Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα, εμφανίστηκαν μετά το 1956, με την ίδρυση του ιχθ/κού σταθμού του Λούρου, αλλά η ανάπτυξή τους προχώρησε μετά το 1970, με την εντατική εκτροφή της ιριδίζουσας πέστροφας. Η ετήσια παραγωγή της χώρας από υδατοκαλλιέργειες εξελίχθηκε με γρήγορους ρυθμούς, γεγονός που οφείλεται κυρίως στις θαλασσοκαλλιέργειες (συμβάλλουν στο 51% της ετήσιας παραγωγής της χώρας), αλλά και στις καλλιέργειες ψαριών του γλυκού νερού (Πάσχος, 2004). Η παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων στην Ελλάδα, για την περίοδο 1988-2000 κυμάνθηκε μεταξύ 2.638 τόνους και 3.656 τόνους με μία μέση ετήσια παραγωγή 2.832 τόνους (National Statistical Service of Greece, 2004). Η συνολική παραγωγή το 2001 έφτασε τους 3.390 τόνους και προήλθε από 128 μονάδες υδατοκαλλιέργειας εσωτερικών υδάτων (National Statistical Service of Greece, 2004). Τα κυριότερα είδη ψαριών εσωτερικών υδάτων που καλλιεργούνται στην Ελλάδα είναι η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), ο σολομός (*Salmo salar*), το χέλι (*Anguilla anguilla*), ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) και ο κέφαλος (*Mugil cephalus*) (Bobori & Economidis, 2006).

Οι ιχθυοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων έχουν μακρά ιστορία, η οποία φαίνεται να ξεκινά από την Άπω Ανατολή. Παρόμοιες αναφορές συναντάμε στην Αρχαία Αίγυπτο και Ελλάδα, το 2500 π.Χ. Στην Ευρώπη οι ιχθυοκαλλιέργειες, άρχισαν τον μεσαίωνα, στα μοναστήρια, αν και υπάρχουν αναφορές από την ρωμαϊκή εποχή. Με την πάροδο των αιώνων οι ανθρώπινες ανάγκες άλλαξαν και η τεχνολογία εξελίχθηκε. Σταδιακά εγκαταστάθηκαν τα πρώτα εκκολαπτήρια, με σκοπό την απελευθέρωση γόνου σε ποτάμια και αργότερα κατασκευάστηκαν εκτατικές και ημιεντατικές μονάδες εκτροφής. Από το 1990 και μετά, η ανάπτυξη των βιολογικών επιστημών και της τεχνολογίας, σε συνδυασμό με την όλο και αυξανόμενη ζήτηση σε προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας, κατέστησαν τις ιχθυοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων έναν σημαντικό κοινωνικό-οικονομικό παράγοντα (Πάσχος, 2004).

Στα εσωτερικά νερά εκτρέφονται πολλά είδη, με διάφορες μεθόδους, σύμφωνα με τις εμπειρίες, το επίπεδο της τεχνολογίας και τα γεωμορφολογικά

χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής. Στην χώρα μας το κυρίαρχο είδος εσωτερικών υδάτων που καλλιεργείται είναι η ιριδίζουσα πέστροφα (3.000 τόνοι/έτος), ενώ τα τελευταία 15 χρόνια, αναπτύσσεται η εκτροφή του χελιού, των στουργιονιών, των κεφαλοειδών και των διακοσμητικών ψαριών (Πάσχος, 2004).

Η ιριδίζουσα πέστροφα, εισήχθη στην Ελλάδα το 1956, με την ίδρυση του ιχθ/κού σταθμού Λούρου. Από τότε, εγκαταστάθηκαν περίπου 110-120 μονάδες (το 50% στον νομό Ιωαννίνων) και η παραγωγή σταδιακά ξεπέρασε τους 3.000 τόνους/έτος. Οι μονάδες είναι κυρίως οικογενειακού χαρακτήρα με μικρές αποδόσεις και στην πλειοψηφία τους βρίσκονται στην Δυτική Ελλάδα και ιδιαίτερα στην Ήπειρο και στην Δυτική Μακεδονία. Παράλληλα, σε πολλά ποτάμια πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία εμπλουτισμοί με γόνο, ενισχύοντας την ερασιτεχνική αλιεία (Πάσχος, 2004). Στις μέρες μας, περίπου 70% της Ελληνικής παραγωγής πέστροφας, προέρχεται από την περιοχή των Ιωαννίνων (ποταμοί Λούρος και Βοϊδομάτης). Κατά μήκος του ποταμού Λούρου μόνο, υπάρχουν 20 μονάδες πέστροφας ([http<sup>4</sup>](#)). Μονάδες πέστροφας συναντάμε, επίσης: στο Καρπενήσι, Λιβαδειά, Βόρεια Πελοπόννησο και Δυτική Μακεδονία.

Ο κυπρίνος αποτελούσε και αποτελεί μόνιμο αλιευτικό στόχο στα εσωτερικά νερά και το κυριότερο είδος στις ιχθυοκαλλιέργειες (Πάσχος, 2004). Η καλλιέργεια κυπρίνου αναπτύχθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ειδικά στις βόρειες περιοχές της χώρας (Μακεδονία, Ήπειρο, Θεσσαλία) που αποτελεί παραδοσιακό είδος διατροφής ([http<sup>4</sup>](#)). Η παραγωγή έφτασε τους 112 τόνους ετησίως το 2001 (National Statistical Service of Greece, 2004). Εκτός από τον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) που προέρχεται μάλλον από τον ευρωπαϊκό απόγονο της Κασπίας θάλασσας, στην Ελλάδα έγινε εισαγωγή άλλων τριών ειδών κυπρίνου: του χορτοφάγου κυπρίνου (*Ctenopharyngodon idella*), του ασημοκυπρίνου (*Hypophthalmichthys molitrix*), και του μαρμαροκυπρίνου (*Aristichthys nobilis*) ([http<sup>4</sup>](#)). Η καλλιέργεια κυπρίνου (12 μονάδες) ωστόσο έχει παραμείνει στάσιμη, εξαιτίας του ανταγωνισμού με άλλα είδη και της χαμηλής εμπορικής αξίας και ζήτησης. Αντίθετα υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εκτροφή του χελιού των στουργιονιών, των κεφαλοειδών και των διακοσμητικών ψαριών (Bobori & Economidis, 2006).

Η εκμετάλλευση των ιχθυοτροφείων εσωτερικών υδάτων, με εκτατική ή ημιεντατική μορφή, γίνεται κυρίως από συλλογικούς φορείς και απαιτεί συνεχή παρακολούθηση και τεχνική υποστήριξη. Συνεισφέρει στην αύξηση της παραγωγής, τη βελτίωση των συνθηκών εργασίας και την προστασία του περιβάλλοντος στις

περιοχές όπου βρίσκονται, οι οποίες έχουν ούτως ή άλλως μεγάλο οικολογικό ενδιαφέρον (Αθανασοπούλου, 2006).

## **2.ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΥΔΑΤΩΝ**

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζουν σήμερα οι ιχθυοκαλλιέργειες σε παγκόσμιο επίπεδο είναι τα νοσήματα και η παθολογία των εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών, καθώς επηρεάζουν την ανάπτυξη των ψαριών, προκαλούν μείωση της παραγωγής, αύξηση του κόστους και προβλήματα στην ευζωία των ψαριών. Η εντατικοποίηση της παραγωγής ψαριών έχει αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης μολυσματικών νοσημάτων παγκοσμίως. Τα παθολογικά περιστατικά που εμφανίζονται στις εκτροφές έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην παραγωγή, όχι μόνο εξαιτίας των μεγάλων απωλειών που επιφέρουν και των εξόδων που απαιτούνται για την θεραπεία τους, αλλά και εξαιτίας της υποβάθμισης της ποιότητας του τελικού προϊόντος (Ράγιας & Αθανασοπούλου, 2005). Τα νοσήματα αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες της οικονομικής σταθερότητας και ανάπτυξης των υδατοκαλλιέργειών, ενώ κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί των ψαριών αποτελούν κίνδυνο και για τη δημόσια υγεία.

Η εκδήλωση των νοσημάτων είναι συνήθως το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης παθογόνων παραγόντων, ψαριών και συνθηκών περιβάλλοντος. Τα ψάρια στις εντατικές καλλιέργειες επηρεάζονται συνεχώς από περιβαλλοντικές αλλαγές και πρακτικές διαχείρισης, όπως χειρισμοί, συνωστισμός, μεταφορά, κακή διατροφή, μεταβολές θερμοκρασίας, και κακή ποιότητα νερού. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν στρες και να επηρεάσουν τους μηχανισμούς ομοιόστασης των ψαριών, ευαισθητοποιώντας τα ψάρια σε ένα πλήθος παθογόνων. Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα που αφορά την υγεία των ψαριών είναι η μετάδοση των νοσημάτων από τις εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειών στους πληθυσμούς των άγριων ψαριών, κάτι που θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη από όλα τα προγράμματα ελέγχου υγείας των ψαριών ([http<sup>5</sup>](#)).

Οι απαραίτητες προϋποθέσεις για την εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων στα ψάρια είναι:

1. Η παρουσία του παθογόνου παράγοντα (ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες νερού και σε συνθήκες μεγάλης ιχθυοπυκνότητας).
2. Η έλλειψη κατάλληλων συνθηκών διαβίωσης των ψαριών, όπως η υπερβολική ποσότητα τροφής, η έλλειψη τακτικής αλλαγής διχτυών κλπ.
3. Η ευαισθησία του κάθε ψαριού που επηρεάζεται από παράγοντες στρες και ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και το είδος του ψαριού (Αθανασοπούλου, 2006).

Γενικά, από πλευράς ταξινόμησης, τα νοσήματα των ψαριών διακρίνονται ανάλογα με τα αίτια που τα προκαλούν σε:

- A) Νοσήματα από ιούς
- B) Νοσήματα από βακτήρια
- Γ) Νοσήματα από μύκητες
- Δ) Νοσήματα από παράσιτα (Πρωτόζωα, Έλμινθες, Μαλάκια, Αρθρόποδα)
- E) Νοσήματα που οφείλονται σε παράγοντες του περιβάλλοντος και της διαχείρισης
- Στ) Νοσήματα που οφείλονται σε διατροφικά σφάλματα και
- Z) Νεοπλάσματα

Τα βακτηριακά νοσήματα αποτελούν το κυριότερο πρόβλημα των εντατικών ιχθυοκαλλιεργειών στις μέρες μας, ενώ ένας μεγάλος αριθμός εργασιών και μελετών έχει δείξει ότι οι μολύνσεις με βακτήρια του είδους *Aeromonas* spp. σε ψάρια του γλυκού νερού, απασχολούν την πλειονότητα των μονάδων εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας και αποτελούν το πιο σύνηθες βακτηριακό νόσημα που μπορεί να διαγνωσθεί σε ψάρια γλυκού νερού.

Η συγκεκριμένη εργασία ασχολείται με μία κατηγορία βακτηριακών νοσημάτων, ψαριών του γλυκού νερού η οποία οφείλεται σε μία κατηγορία Gram αρνητικών βακτηρίων, τα είδη *Aeromonas* spp.

## **2.1 Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια**

Τα βακτήρια είναι σημαντικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί τόσο για τα άγρια όσο και για τα εκτρεφόμενα ψάρια και μπορούν να μολύνουν μεγάλο αριθμό ψαριών (Noga, 2000). Τα νοσήματα των ψαριών που οφείλονται σε βακτήρια, μεταδίδονται εύκολα, εμφανίζονται πολύ συχνά στις εντατικές ιχθυοκαλλιέργειες και προκαλούν μεγάλες απώλειες. Ωστόσο με μια βασική κατανόηση του τρόπου μετάδοσης των βακτηρίων και των συμπτωμάτων που προκαλούν γίνεται εύκολο να

καταπολεμηθούν. Η αποτελεσματική αντιμετώπισή τους στηρίζεται στην έγκαιρη και άμεση διάγνωση και θεραπεία ([http<sup>6</sup>](#)).

Τα παθογόνα βακτήρια μπορούν να μεταδώσουν την μόλυνση στον οργανισμό των ψαριών, εάν απορροφηθούν μέσω των βραγχίων και του εντέρου ή εισέλθουν στον οργανισμό μέσω του δέρματος, προκαλώντας συστηματική μόλυνση ([http<sup>6</sup>](#)). Οι συστηματικές μολύνσεις των ψαριών εκδηλώνονται συνήθως με σηψαιμία, αιμορραγίες και νεκρώσεις εσωτερικών οργάνων (Noga, 2000). Κάποια βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν τοπικά επιφανειακές μολύνσεις π.χ. έλκη, νέκρωση των πτερυγίων, οι οποίες αν δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα μπορεί να οδηγήσουν σε συστηματική μόλυνση ([http<sup>6</sup>](#)). Ορισμένα παθογόνα εντοπίζονται μόνο σε μολύνσεις του δέρματος, όπως τα είδη *Aeromonas*, *Flexibacter* και *Vibrio* spp., ενώ υπάρχουν βακτήρια που μπορούν να μολύνουν ψάρια θαλασσινού νερού αλλά και ψάρια γλυκού νερού (Noga, 2000).

Τα παθογόνα βακτήρια των ψαριών διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά βακτήρια. Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια που προσβάλλουν τα ψάρια ανήκουν στα Gram-αρνητικά βακτήρια (Noga, 2000).

Τα κυριότερα νοσήματα των ψαριών γλυκού νερού που συναντάμε και που οφείλονται σε κατά Gram-θετικά βακτήρια είναι:

- Βακτηριακή νεφρίτιδα των Σολομοειδών (*Renibacterium salmoninarum*). Προσβάλλονται όλα τα σολομοειδή.
- Μολύνσεις από στρεπτόκοκκους (*Streptococcus* spp.). Προσβάλλονται ψάρια του γλυκού νερού, κυρίως η πέστροφα, η τιλάπια, ο κυπρίνος αλλά και του θαλασσινού νερού (τσιπούρα).
- Μυκοβακτηρίωση (*Mycobacterium* spp.). Προσβάλλονται ψάρια του γλυκού νερού, αλλά και του θαλασσινού νερού.
- Λοίμωξη των ιχθύων από *Lactococcus garvieae*. Προσβάλλονται ψάρια του γλυκού νερού, αλλά και του θαλασσινού νερού. Η πέστροφα είναι το πιο ευαίσθητο ψάρι (Αγγελίδης, 2008).

Τα κυριότερα νοσήματα των ψαριών γλυκού νερού που συναντάμε και που οφείλονται σε κατά Gram-αρνητικά βακτήρια είναι:

- Δονακίωση (είδη *Vibrio* spp.). Είδη ψαριών που προσβάλλονται: χέλια, πέστροφες, σολομοί, κυπρίνοι αλλά και ψάρια θαλασσινού νερού όπως λαβράκια, τσιπούρες, μπακαλιάροι κλπ.



- Δοθιήνωση των Σολομοειδών (*Aeromonas salmonicida*). Προσβάλλονται όλα τα σολομοειδή.
- Ερυθροδερματίτιδα του κυπρίνου (*Aeromonas salmonicida subsp. nova*). Προσβάλλονται όλα τα κυπρινοειδή.
- Νόσος των κόκκινων πτερυγίων (*Aeromonas hydrophila*). Προσβάλλονται κυρίως η πέστροφα και ο κυπρίνος.
- Μολύνσεις που οφείλονται σε Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.). Προσβάλλονται όλα τα ψάρια του γλυκού νερού.
- Ερυθροστοματίτιδα (*Yersinia ruckeri*). Προσβάλλονται ψάρια του γλυκού νερού, κυρίως νεαρά ιχθύδια πέστροφας, αλλά και του θαλασσινού νερού.
- Βακτηριακή νόσος των βραγχίων (*Flavobacterium branchiophilum*). Προσβάλλονται κυρίως νεαρά ιχθύδια σολομοειδών.
- Στηλώδης νόσος (*Flavobacterium columnaris*). Προσβάλλονται κυρίως ψάρια του γλυκού νερού αλλά και αυτά των υφάλμυρων και θαλασσινών νερών.
- Λοίμωξη από *Edwardsiella* spp. Προσβάλλονται ψάρια του γλυκού νερού, όπως χέλια, κυπρίνοι, γατόψαρα αλλά και του θαλασσινού νερού (κέφαλος, τσιπούρα).
- Νέκρωση των πτερυγίων και της ουράς (*Flavobacterium psychrophilum*). Προσβάλλονται κυρίως νεαρά ιχθύδια σολομοειδών (Αγγελίδης, 2008).

Τα παθογόνα βακτήρια των ψαριών μπορούν επίσης να διακριθούν σε:

1. Πρωταρχικά ή υποχρεωτικά παθογόνα. Είναι παθογόνα βακτήρια που δεν αποτελούν μέρος της φυσιολογικής υδρόβιας μικροχλωρίδας και μπορούν να προκαλέσουν νόσημα σε υγιή ψάρια, όπως η *Aeromonas salmonicida*.
2. Ευκαιριακά παθογόνα. Αυτά βρίσκονται φυσιολογικά στο νερό ή στο ψάρι, και μπορούν να προκαλέσουν νόσημα όταν υπάρχουν συγκεκριμένες μόνο συνθήκες (στρες, μεγάλη ιχθυοπυκνότητα, υψηλές θερμοκρασίες νερού, υψηλή αμμωνία), όπως η *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas* και *Vibrio* ([http<sup>6</sup>](#)). Σε υδάτινο περιβάλλον που είναι πλούσιο σε οργανική ύλη, είναι δυνατόν να υπάρχουν εκατομμύρια αυτών των ευκαιριακών βακτηρίων ανά λίτρο νερού, ωστόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν αποτελούν απειλή για τα υγιή ψάρια ([http<sup>6</sup>](#)).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ - ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΟΦΕΙΛΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΜΕ ΕΙΔΗ *AEROMONAS* SPP. ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΥ ΝΕΡΟΥ

#### 1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *AEROMONAS* SPP.

##### 1.1 Ταξινόμηση-Ονοματολογία

Τα διάφορα είδη *Aeromonas*, είναι ευρέως διαδεδομένα στο υδάτινο περιβάλλον και στο έδαφος ενώ μπορούν να βρεθούν σε μολυσμένα και καθαρά νερά, σε λύματα καθώς και στο πόσιμο νερό. Αποτελούν επίσης μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας των ψαριών γλυκού νερού,  $1.5 \times 10^2 - 1.6 \times 10^5$  colony-forming units (CFU)/gr, (ειδικά τα είδη *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*) (Naviger, 2006; Trust και συν., 1974), ενώ θεωρούνται υπεύθυνα για ένα πλήθος νοσημάτων των ποικιλόθερων αλλά και ομοιόθερων οργανισμών (Rahman και συν., 2004). Μπορούν να προσβάλλουν εκτός από τα ψάρια γλυκού και αλμυρού νερού, αμφίβια, ερπετά, θηλαστικά αλλά και τον άνθρωπο (είδη: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*) προκαλώντας γαστρεντερίτιδα, διάρροια, μολύνσεις πληγών, αναπνευστικές λοιμώξεις, περιτονίτιδα, σηψαιμία (Rahman και συν., 2004). Τα είδη *Aeromonas* είναι γενικότερα γνωστά για την μεγάλη οικονομική και ιατρική τους σημασία καθώς μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες απώλειες σε πληθυσμούς ψαριών, ιδίως υδατοκαλλιεργειών γλυκού νερού (Sugita και συν., 1995).

Τα βακτήρια *Aeromonas* spp. είναι Gram αρνητικά βακτήρια, ανήκουν στο γένος *Aeromonas* όπως πρότειναν οι Kluyver & van Niel, το 1936 και στην οικογένεια Aeromonadaceae (Colwell και συν., 1986). Πρόσφατα μεταφέρθηκαν από την οικογένεια Vibrionaceae στην δική τους οικογένεια Aeromonadaceae (Ormen και συν., 2005). Μέχρι το 1984, μόνο τέσσερα είδη *Aeromonas* spp. ήταν γνωστά, τα *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, και *A. salmonicida* (Poroff, 1984). Από τότε το γένος *Aeromonas* έχει εξελιχθεί με την προσθήκη νέων ειδών και την ανακατάταξη της υπάρχουσας ταξινόμησης. Παλαιότερα το γένος *Aeromonas* τοποθετούνταν μαζί με τα *Vibrio* spp. και *Plesiomonas shigelloides* στην οικογένεια Vibrionaceae. Ωστόσο, γενετικές έρευνες που έγιναν παρείχαν αρκετές αποδείξεις ώστε να

υποστηρίζουν την τοποθέτηση των *Aeromonas* spp. σε μια δική τους οικογένεια, την Aeromonadaceae (Colwell και συν., 1986).

Στην τελευταία έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 17 υβριδικές ομάδες (HG) ή γενοτυπικά είδη και 14 φαινοτυπικά είδη *Aeromonas* περιγράφονται (Martin-Carnahan & Joseph, 2005). Από την πρώτη φορά που πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες υβριδισμού του DNA στα είδη *Aeromonas* (Popoff και συν., 1981), και την περιγραφή του γένους με τα 4 φαινοτυπικά είδη (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. salmonicida*), μέχρι σήμερα έχουν καταχωρηθεί στον Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Popoff, 1984), οι εξής 17 υβριδικές ομάδες (HG): *A. hydrophila* HG1, *A. bestiarum* HG2, *A. salmonicida* HG3, *A. caviae* HG4, *A. media* HG5, *A. eucrenophila* HG6, *A. sobria* HG7, *A. veronii* bv. *sobria* HG8, *A. jandaei* HG9, *A. veronii* bv. *veronii* HG10, unnamed HG11, *A. schubertii* HG12, unnamed HG13 (enteric group 501), *A. trota* HG14, *A. allosaccharophila* HG15, *A. encheleia* HG16 και *A. popoffii* HG17 (Huys και συν., 1997; Martinez-Murcia και συν., 1992; Altwegg και συν., 1990; Kuijper και συν., 1989; Schubert & Hegazi, 1988; Hickman-Brenner και συν., 1988; Hickman-Brenner και συν., 1987; Farmer και συν., 1986; Allen και συν., 1983;). Σύμφωνα με τους (Martin-Carnahan & Joseph, 2005; Miñana-Galbis και συν., 2004; Harf-Monteil και συν., 2004; Pidiyar και συν., 2002), άλλες 3 υβριδικές ομάδες (HG): οι *A. culicicola* (HG18), *A. simiae* (HG19) και *A. molluscorum* (HG20) έχουν προστεθεί μέχρι σήμερα.

Η κατανομή σε υβριδικές ομάδες βασίζεται στις τεχνικές του ανασυνδιασμένου DNA. Παρόλο που μεγάλο μέρος της σύγχυσης που υπάρχει γύρω από την ταξινόμηση του γένους *Aeromonas* έχει εξαφανιστεί, εξακολουθεί να επικρατεί έλλειψη ομοφωνίας μεταξύ φαινοτυπικών και γενοτυπικών χαρακτηριστικών, και μόνο ειδικές μέθοδοι μπορούν να καταλήξουν σε ακριβή ταξινόμηση (Ghenghesh και συν., 2008). Τα τελευταία χρόνια, η ταξινόμηση του γένους *Aeromonas* έχει υποστεί μεγάλες αλλαγές. Εκτεταμένες έρευνες υβριδισμού του DNA ή άλλες μοριακές τεχνικές και βελτιωμένες φαινοτυπικές μέθοδοι έχουν συμβάλλει σήμερα στην αναγνώριση των γενοτυπικών ειδών (Kozinska και συν., 2002).

**Domain:** *Bacteria* - (Haeckel, 1894; Woese και συν., 1990)

- **Kingdom:** *Bacteria* - (Cohn, 1870; Cavalier-Smith, 1983; Cavalier-Smith, 2002)
  - **Phylum:** *Proteobacteria* – (Garrity και συν., 2005)
    - **Class:** *Gammaproteobacteria* – (Garrity και συν., 2005)
      - **Order:** *Aeromonadales* – (Martin-Carnahan & Joseph, 2005)
        - **Family:** *Aeromonadaceae* – (Colwell και συν., 1986)
          - **Genus:** *Aeromonas* – (Kluyver & van Niel, 1936)

Το γένος *Aeromonas* χαρακτηρίζεται σήμερα από ένα ευρύ φάσμα φαινοτυπικών διαφορών, γι' αυτό η ταξινόμηση του γένους *Aeromonas* αλλάζει διαρκώς εξαιτίας της αναγνώρισης και ταυτοποίησης νέων ειδών (Rahman και συν., 2004), σε τέτοιο βαθμό που έχει οριστεί από τον Carnahan, (1993) σαν «θάλασσα αλλαγών». Επισημαίνεται ότι υπάρχουν ακόμη σοβαρά προβλήματα με την ταυτοποίηση των ειδών εξαιτίας της μικρής συσχέτισης μεταξύ των γενότυπων και φαινότυπων και της έλλειψης αξιόπιστων χαρακτηριστικών για την διάκριση και περιγραφή των ειδών *Aeromonas* (Sugita και συν., 1995). Προς το παρόν, το γένος *Aeromonas* περιλαμβάνει τα εξής αναγνωρισμένα είδη (Rahman και συν., 2004).

**1.Κινητά είδη *Aeromonas*:** *A. hydrophila* (subsp. *hydrophila* - subsp. *ranae*- subsp. *anaerogenes*- subsp. *proteolytica*)(syn. *A. liquefaciens*, *A. formicans*) (Stanier, 1943), *A. caviae* (syn. *A. punctata*) (Schubert, 1974; Popoff, 1984), *A. sobria* (Popoff και συν., 1981), *A. allosaccharophila* (Martinez-Murcia και συν., 1992), *A. bestiarum* (Ali και συν., 1996), *A. bivalvium* (Miñana-Galbis και συν., 2007), *A. encheleia* (Esteve και συν., 1995), *A. enteropelogenes* (syn. *A. trota*, *A. tructi*)( Schubert και συν., 1990), *A. euchrenophila* (Schubert & Hegazi, 1988), *A. ichthiosmia* (Schubert και συν., 1990), *A. jandaei* (Carnahan και συν., 1991), *A. media* (Allen και συν., 1983), *A. molluscorum* (Miñana-Galbis και συν., 2004), *A. popoffii* (Huys και συν., 1997), *A. schubertii* (Hickman-Brenner και συν., 1988), *A. simiae* (Harf-Monteil και συν., 2004), *A. veronii* (biotype *sobria* - biotype *veronii*)(Hickman-Brenner και συν., 1987), *A. culicicola* (Pidiyar και συν., 2002) ([http<sup>7</sup>](http://)). Τα είδη *Aeromonas ichthiosmia* και *Aeromonas enteropelogenes* φαίνεται να είναι συνώνυμα των *A. veronii* και *A. trota* , αντίστοιχα (Schubert και συν., 1990; Collins και συν., 1993).

**2.Μη κινητά είδη *Aeromonas*:** *A. salmonicida* - 4 subspecies (Holt και συν., 1994): *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Lehmann & Neumann, 1896), *A.*

*salmonicida* subsp. *achromogenes* (Schubert, 1967), *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (Kimura, 1969), *A. salmonicida* subsp. *smithia* (Austin και συν., 1989).

Στελέχη της *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* αποτελούν μια ομογενή ομάδα (όσον αφορά φαινοτυπικά και γενοτυπικά χαρακτηριστικά), προκαλούν την τυπική δοθιήνωση, προκαλώντας σοβαρή σηψαιμία και θνησιμότητα στα ψάρια, ενώ τα άλλα υποείδη αποτελούν τις άτυπες μορφές της νόσου, που χαρακτηρίζονται συνήθως από δερματικά έλκη με ή χωρίς σηψαιμία (Cipriano & Bullock, 2001). Εκτός από τα αναγνωρισμένα subsp. *A. salmonicida*, υπάρχει μεγάλος αριθμός στελεχών που συνθέτουν μια ετερογενή ομάδα (όσον αφορά φαινοτυπικά και γενοτυπικά χαρακτηριστικά), δεν περιλαμβάνονται στα υποείδη που έχουν ήδη περιγραφεί, και αναφέρονται σαν άτυπα στελέχη *A. salmonicida* (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Οι McCarthy & Roberts (1980) πρότειναν έναν άλλο, διαφορετικό διαχωρισμό των στελεχών *A. salmonicida* σε 3 subspecies, βασιζόμενοι στο είδος των ψαριών, από τα οποία απομονώνεται το στέλεχος και σε επιζωοτιολογικά κριτήρια. Τα 3 subspecies είναι τα *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (τυπικά στελέχη από σολομοειδή), *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (που ενσωματώνει το subsp. *masoucida*, περιλαμβάνοντας μόνο άτυπα στελέχη που απομονώνονται από σολομοειδή), και το *A. salmonicida* subsp. *nova* (άτυπα στελέχη που απομονώνονται από μη σολομοειδή ψάρια, όπως ο κυπρίνος). Αυτή η ταξινόμηση δεν έχει ωστόσο εγκριθεί από τον Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Poroff, 1984). Οι Pavan και συνεργάτες (2000) έχουν επίσης προτείνει ένα νέο μεσόφιλο υποείδος, το *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, βασιζόμενοι επάνω σε μελέτες υβριδισμού του DNA και σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, το οποίο απομονώθηκε από μολυσμένα δείγματα νερού. Συνεπώς η υπάρχουσα ταξινόμηση των ειδών *A. salmonicida* παραμένει διαφορούμενη (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Ένα μεγάλο εύρος των ειδών *Aeromonas* σχετίζεται με άρρωστα ή υγιή ψάρια, ωστόσο ορισμένα μόνο από αυτά θεωρούνται παθογόνα για τα ψάρια (Kozinska και συν., 2002). Η αναγνώριση των ειδών *Aeromonas* χρησιμοποιώντας μόνο φαινοτυπικές μεθόδους, θεωρείται μη ακριβής λόγω της σύγχυσης που επικρατεί στην ταξινόμηση του γένους (Sugita και συν., 1994). Οι τεχνικές υβριδισμού του DNA (συνήθως με χρήση ραδιοϊσοτόπων) χρησιμοποιούνται σήμερα για την ακριβή αναγνώριση σε επίπεδο γενοτυπικών ειδών, μόνο που οι τεχνικές αυτές δεν είναι διαθέσιμες σε επίπεδο ρουτίνας στα εργαστήρια ιχθυοπαθολογίας (Kozinska και συν., 2002). Γι'αυτό τα περισσότερα από αυτά τα εργαστήρια

αναγνωρίζουν τα κινητά είδη *Aeromonas* σαν μέλη του συμπλέγματος ‘*A. hydrophila*’, που περιλαμβάνει τα είδη, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*. Τα μη κινητά είδη σαν σύμπλεγμα ‘*A. salmonicida*’, σύμπλεγμα ‘*A. caviae*’ που περιλαμβάνει τα *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila* και το σύμπλεγμα ‘*A. sobria*’ που περιλαμβάνει τα είδη *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei* και *A. trota* (Janda, 2001). Η μέθοδος υβριδοποίησης με μικροπλάκα που δεν απαιτεί χρήση ραδιοϊσοτόπων για την σήμανση του DNA (Ezaki και συν., 1989) επίσης χρησιμοποιείται.

Τα τελευταία χρόνια, νέοι μέθοδοι όπως η ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων (RFLP-πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού τμήματος), έχουν αναπτυχθεί για την αναγνώριση των ήδη γνωστών ειδών *Aeromonas* (Rahman και συν., 2004) κατά την οποία το PCR-ενισχυμένο 16S rDNA γονίδιο διαχωρίζεται χρησιμοποιώντας δύο ενδονουκλεάσες (*AluI* και *MboI*) ταυτόχρονα, επιτρέποντας την ταυτοποίηση όλων των ειδών του γένους, με εξαίρεση τα *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. roloffii* και *A. encheleia*, για την διαφοροποίηση των οποίων απαιτείται επιπλέον διαχωρισμός (Figueras και συν., 2000). Με βάση την ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων των ειδών *Aeromonas*, τα διάφορα είδη *Aeromonas* διαθέτουν τον δικό τους αριθμό στελέχους (strain No.) στην τράπεζα γονιδίων (Πίνακας 3), χάρις στον οποίο διακρίνονται φυλογενετικά (Rahman και συν., 2004).

**Πίνακας 3.** Με βάση την 16S rDNA αλληλουχία γονιδίων των ειδών *Aeromonas* τα στελέχη διαθέτουν τον δικό τους (strain No.) στην τράπεζα γονιδίων (Rahman και συν., 2004).

Όνομα είδους	Strain No.	NCBI accession No.
<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	ATCC 7966 <sup>T</sup> /LMG 2844	X60404
<i>A. bestiarum</i> subsp. <i>ranae</i>	LMG 19707 <sup>T</sup>	AJ508766
<i>A. bestiarum</i>	ATCC 51108/CIP 7430 <sup>T</sup>	X60406
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	NCIMB 1102/ATCC 33658	X60405
<i>A. caviae</i>	NCIMB 13016 <sup>T</sup>	X60408
<i>A. media</i>	ATCC 33907 <sup>T</sup> /LMG 9073	X60410

<i>A. eichrenophila</i>	NCIMB 74 <sup>T</sup> /ATCC 23309	X60411
<i>A. sobria</i>	NCIMB 12065 <sup>T</sup> /ATCC 43979	X60412
<i>A. veronii</i>	ATCC 35624/CECT 4257	X60414
<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568 <sup>T</sup> /CECT 4228	X60413
<i>Aeromonas sp.</i> HG 11	ATCC 35941	X60417
<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700/LMG 9074	X60416
<i>A. trota</i>	ATCC 49657 <sup>T</sup> /CECT 4255	X60415
<i>Aeromonas sp.</i> Group 501	CDC 2478-85	U88663
<i>A. popoffii</i>	LMG 17541 <sup>T</sup> /CIP 105493	AJ224308
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 <sup>T</sup> / ATCC 51208	S39232
<i>A. encheleia</i>	LMG 317541/ATCC 51929	AJ224309
<i>A. enteropelogenes</i>	DSMZ 6394 <sup>T</sup> /ATCC 49803	X71121
<i>A. culicicola</i>	NCIMB 5147 <sup>T</sup> /CIP 107763	AF170914
<i>A. bivalvium</i>	CECT 7113/LMG 23376	DQ504429
<i>A. molluscorum</i>	CECT 5864/LMG 22214	AY532690

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

CDC: Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

CIP : Collection bacterienne de l'Institut Pasteur, Paris, France

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany

LMG: Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Ghent, Belgium

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Scotland

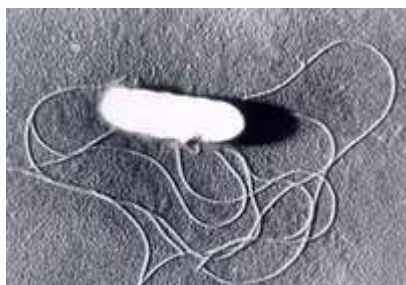
<sup>T</sup>: Type strain

## 1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Ιδιότητες (βιοχημικές) *Aeromonas spp.*

Τα βακτήρια *Aeromonas spp.* είναι Gram αρνητικά βακτήρια. Το σχήμα των κυττάρων ποικίλλει, ευθεία κύτταρα, από σχήμα ράβδου (βάκιλοι) ως στρογγυλό (κοκκοβάκιλοι), με αποστρογγυλεμένα άκρα, μέγεθος (0,3-1,0 μm-διάμετρο x 1,0-3,5 μm-μήκος). Τα κύτταρα εμφανίζονται μεμονωμένα, σε ζεύγη, με μορφή κοντών αλυσίδων ή νηματίων ([http<sup>7</sup>](http://)). Είναι προαιρετικώς αναερόβια βακτήρια, δεν σχηματίζουν σπόρια, ζυμώνουν την γλυκόζη, είναι οξειδάση/καταλάση θετικά και ανθεκτικά στον vibriostatic παράγοντα O/129 (150 μg).

Αναπτύσσονται καλά σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα όπως είναι το Trypticase Soy agar (TSA), Brain heart infusion agar (BHIA), Tryptone Soy broth (TSB), Trypticase soy blood agar (BBL), MacConkey aeromonas dextrin agar (AD), Thiosulphate citrate bile salts sucrose agar (TCBS), Nutrient agar, Nutrient broth, Columbia agar, blood agar, Coomassie Brilliant Blue agar (CBB), Rimler-Shotts agar (R-S) (Rahman και συν., 2004; Minana-Galbis και συν., 2002; Cipriano & Bullock, 2001; Shotts & Rimler, 1973). Σε άριστες συνθήκες αναπτύσσονται σε pH (ιδανικό 5.5-9.0), σε 24-48 ώρες, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 0°C έως 45°C για μερικά είδη, με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης 22°C - 35°C (Ghenghesh και συν., 2008). Συγκεκριμένα η *A. salmonicida* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία πάνω από 30°C. Στα στερεά θρεπτικά υλικά όπως το θρεπτικό άγαρ, οι αποικίες εμφανίζονται στρογγυλές, λείες, ημιδιαφανείς έως διαφανείς, συνήθως με κίτρινο κρεμμώδες χρώμα, με διάμετρο 2-3 mm (Austin & Austin, 1999). Κάποια από τα είδη των *Aeromonas* spp. (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*) προκαλούν β-αιμόλυση σε άγαρ από αίμα προβάτου, ίππου (Minana-Galbis και συν., 2002). Τα είδη αυτά παράγουν ζώνες β-αιμόλυσης γύρω από τις αποικίες σε αιματούχο άγαρ, το οποίο περιέχει 5% (v/v) απινιδωμένο αίμα προβάτου, ίππου (Janda και συν., 1984).

Φαινοτυπικά διακρίνονται δύο ομάδες στο γένος *Aeromonas*: (i) **Μη κινητά και ψυχρόφιλα** είδη (22-28 °C), (*A. salmonicida*), τα οποία είναι συγκριτικά ομόλογα φαινοτυπικά και (ii) **Κινητά και μεσόφιλα είδη** (35-37 °C) (*A. hydrophila* group), τα οποία είναι ετερόλογα (Kozinska και συν., 2002; Popoff, 1984). Τα κινητά είδη συνήθως φέρουν στα κύτταρά τους ένα μοναδικό, πολικό μαστίγιο ([http<sup>7</sup>](http://www.goldbamboo.com)) ωστόσο, μερικά είδη μπορούν να φέρουν πλάγια και περίτριχα μαστίγια (Εικόνα 1).



**Εικόνα 1.** *A. hydrophila* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (200 x 140) ([http<sup>17</sup>//www.goldbamboo.com](http://www.goldbamboo.com))

Τα κινητά και μη κινητά είδη *Aeromonas* αν και διαφέρουν φαινοτυπικά, μπορούν εύκολα να διακριθούν μεταξύ τους με βάση τις ιδιότητες τους, όπως:



ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης, κινητικότητα, παραγωγή ινδόλης, και ανάπτυξη μιας χρωστικής ‘melanin-like’ σε άγαρ τυροσίνης (Janda & Abbott, 1998). Ο αριθμός των μεσόφιλων ειδών έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία, ενώ η ταξινόμηση των ψυχρόφιλων ειδών έχει παραμένει σχετικά σταθερή με μικρές εξαιρέσεις (Ali και συν., 1996; Carnahan και συν., 1991; Hickman-Brenner και συν., 1988; Hickman-Brenner και συν., 1987; Allen και συν., 1983; Popoff και συν., 1981; Popoff και συν., 1976).

Ο διαχωρισμός μεταξύ των subspecies *A. salmonicida* γίνεται κυρίως με βάση τα τεστ κινητικότητας και παραγωγής ινδόλης (Wiklund & Dalsgaard, 1998; Popoff, 1984). Ένα άλλο χαρακτηριστικό για την διαφοροποίηση της *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* είναι η παραγωγή μιας καφέ διάχυτης χρωστικής που αναπτύσσεται στις αποικίες σε θρεπτικό άγαρ (TSA) σε 48-72 ώρες και η οποία απουσιάζει στα άλλα υποείδη (Wiklund & Dalsgaard, 1998; Millership, 1996; Austin και συν., 1989; Kimura, 1969). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Austin και συνεργάτες, (1998) η παραγωγή αυτής της καφέ χρωστικής εξαρτάται από τις συνθήκες θερμοκρασίας και δεν είναι ειδική μόνο για την *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Η έκφραση ‘άτυπες μορφές *Aeromonas salmonicida*’ αρχικά χρησιμοποιήθηκε για στελέχη βακτηρίων που ανήκουν στα είδη *A. salmonicida* αλλά εμφανίζουν βιοχημικά χαρακτηριστικά, διαφορετικά από αυτά που περιγράφονται για την *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι κυρίως: η αργή ανάπτυξη και καθυστερημένη παραγωγή χρωστικής, η αρνητική αντίδραση κυτοχρωμική οξειδάση, η παραγωγή οξέος από σακχαρόζη και η παραγωγή υδρόθειου. Γενικότερα τα άτυπα βακτηριακά στελέχη εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία στα βιοχημικά, μοριακά και λοιμογόνα χαρακτηριστικά (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Βιοχημικά τεστ (API 20E, API 20NE BioMérieux, France) που μετρούν παραμέτρους όπως: η παραγωγή οξέος από την γλυκόζη, την λακτόζη, την σακχαρόζη, την σορβιτόλη, η υδρόλυση εσκουλίνης, η παραγωγή ελαστάσης, η οξείδωση της γλυκόζης, η χρήση κιτρικών αλάτων, η μείωση νιτρικών αλάτων, η κινητικότητα, η δράση της οξειδάσης και καταλάσης, η δράση των αφυδρογονάση της αργινίνης (ADH), αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (LDC) και αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC), η παραγωγή αερίων από την D-γλυκόζη, η παραγωγή ινδόλης, η υδρόλυση ζελατίνης, η χρήση DL-γαλακτικού, η παραγωγή οξέος από σαλικίνη, η χρήση της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (Huys και συν., 1997; Austin και συν., 1998)

έχουν χρησιμοποιηθεί και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για την διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών *Aeromonas* spp. (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4.** Συνήθεις φαινοτυπικές ιδιότητες των ειδών *Aeromonas* (Rahman, 2004).

Χαρακτηριστικά	Αποτελέσματα
Gram χρώση	–
Σχήμα	Ράβδος
Κινητικότητα	
<b>Μη κινητά είδη</b> ( <i>A. salmonicida</i> )	–
<b>Κινητά είδη</b> ( <i>A. hydrophila</i> group)	+
Οξειδάση	+
Καταλάση	+
Ανάπτυξη σε 0% NaCl	+
Βακτηριοστατικός (Vibriostatic) παράγοντας 0/129	Ανθεκτικό
Υδρόλυση ζελατίνης	+
Υδρόλυση ουρίας	–
Χρήση μηλονικού	–
Μείωση νιτρικών αλάτων	+
Παραγωγή οξέος από:	
Γλυκόζη	+
Αδονιτόλη	–
D-Αρβιτόλη	–
Ντουλσιτόλη	–
D-Ξυλόζη	–
D-Γαλακτόζη	+
Γλυκερόλη	+
Μαλτόζη	+
D-Σορβιτόλη	–
Τρεχαλόζη	+
O/F τεστ (οξειδωση/μεταβολισμός της γλυκόζης)	+

## 2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

### 2.1 Μηχανισμός προσβολής

Στα ψάρια γλυκού νερού, τα είδη *Aeromonas* (όπως σχεδόν όλα τα παθογόνα βακτήρια), εισέρχονται στον οργανισμό του ξενιστή με ένα ή περισσότερους τρεις διαφορετικούς τρόπους: μέσω του δέρματος (λύσεις συνέχειας δέρματος λόγω τραυματισμών), μέσω των βραγχίων και μέσω της γαστρεντερικής οδού. Στον υγιή ιστό, τα βακτήρια μπορούν να μεταφερθούν μεσοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά. Εναλλακτικά, τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο πεπτικό επιθήλιο, με τα εξωκυτταρικά ένζυμα ή τις τοξίνες που παράγουν πριν εισέλθουν. Η μετάδοση ωστόσο μέσω της γαστρεντερικής οδού δεν έχει μελετηθεί τόσο διεξοδικά σε αντίθεση με την μετάδοση μέσω του δέρματος και των βραγχίων, παρόλο που κύτταρα *Aeromonas* μπορούν να φτάσουν και να επιβιώσουν μέσα στην κοιλότητα του εντέρου (Evelyn, 1996). Σε σύγκριση με τα τυπικά στελέχη *A. salmonicida* λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την μετάδοση και την επιβίωση άτυπων στελεχών στο νερό. Μελέτες δείχνουν πως τα βακτήρια επιβιώνουν καλύτερα στα υφάλμυρα και αλμυρά νερά από ότι στα γλυκά νερά. Ωστόσο τα δεδομένα αυτά θα πρέπει να εξεταστούν με προσοχή, καθώς βασίζονται μόνο σε αποτελέσματα *in vitro* (Cirriano, 1997).

Για την αποτροπή της μόλυνσης τα ψάρια διαθέτουν διάφορους προστατευτικούς μηχανισμούς, ώστε να εμποδίσουν την μεταφορά των παθογόνων μέσω των αρχικών φραγμών άμυνας. Τέτοιοι μηχανισμοί άμυνας είναι, η παραγωγή βλέννας από τα καλυκοειδή κύτταρα, το ακραίο όξινο μικροπεριβάλλον του εντερικού επιθηλίου, η ανανέωση των κυττάρων, η περισταλτική κίνηση, η γαστρική οξύτητα, η λυσοζύμη και η αντιβακτηριακή δράση του βλεννογόνου της επιδερμίδας. Η δερματική βλέννα αποτελεί τον αρχικό φραγμό άμυνας που τα παθογόνα θα πρέπει να διαπεράσουν για να μολύνουν τα ψάρια (Cirriano, 1997). Στο ίδιο διάστημα οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να ξεπεράσουν αυτούς τους φραγμούς άμυνας (Ringø και συν., 2004). Έτσι τα παθογόνα βακτήρια παράγουν μια σειρά λοιμογόνων παραγόντων, όπως αιμολυσίνες, κυτταροτοξίνες, εντεροτοξίνες, ενδοτοξίνες και συγκολλητίνες που μπορούν να διευκολύνουν την μεταφορά. Οι κύριοι μηχανισμοί μεταφοράς περιλαμβάνουν την αυξημένη ενδοκυττάρωση, την εξωκυτταρική διαπερατότητα λόγω επιδράσεων στο συνδετικό σύμπλεγμα και άμεση βλάβη στα εντερικά κύτταρα (Chopra και συν., 2000).

Η πηγή της μόλυνσης συνήθως παραμένει απροσδιόριστη, παρόλο που είναι γνωστό πως τα είδη *Aeromonas* μπορούν να μεταδοθούν οριζόντια ανάμεσα στους πληθυσμούς των ψαριών (McCarthy & Roberts, 1980).

Ένας σημαντικός παράγοντας που ευνοεί την οριζόντια μετάδοση του παθογόνου βακτηρίου στα ψάρια γλυκού νερού (Horne, 1928) και στο θαλάσσιο περιβάλλον (Scott, 1968; Nomura, 1993) είναι τα ψάρια που έχουν πρόσφατα μολυνθεί με *Aeromonas*. Τα ψάρια αυτά μπορούν να μεταδώσουν το παθογόνο οριζόντια, είτε με την φυσική επαφή στο νερό, είτε διασπείροντας το βακτήριο στην υδάτινη στήλη. Το βακτήριο αποβάλλεται από τα ούρα, από τα κόπρανα και από το περιεχόμενο των δοθιήνων όταν αυτοί ανοίγουν και μολύνουν το νερό. Άλλες πηγές μόλυνσης είναι: τα αντικείμενα και τα εργαλεία μολυσμένων ιχθυοτροφείων, το προσωπικό, τα πτηνά, τα παράσιτα που τρέφονται με αίμα ψαριών (βδέλλες), τα ψάρια φορείς και τα αυγά (Φώτης, 2003). Η μεταφορά ιχθυοπληθυσμών, ζωντανών ψαριών, όπως διακοσμητικά ψάρια ή αυγά ψαριών διευκολύνει την μετάδοση, ενώ μαζί με την επίδραση του στρες που επηρεάζει την ωσμωρύθμιση η νόσος μπορεί να εξελιχθεί πιο γρήγορα (Ezura και συν., 1984). Η μετάδοση μέσω των φυσικών διόδων νερού μπορεί να ενταθεί με την διαφυγή μολυσμένων ψαριών γλυκού και αλμυρού νερού από εγκαταστάσεις καλλιέργειας ή μονάδες προς το περιβάλλον με τους ελεύθερους πληθυσμούς άγριων ψαριών (Johnsen & Jensen, 1994). Η μεγάλη ιχθυοπυκνότητα και οι ευνοϊκές θερμοκρασίες νερού διευκολύνουν επίσης την μόλυνση (Johnsen & Jensen, 1994). Η μόλυνση γίνεται κυρίως με την επαφή μολυσμένων ψαριών με υγιή, μέσω της γαστρεντερικής οδού, των βραγχίων και του δέρματος (Nordmo και συν., 1998).

Σημαντικός φαίνεται να είναι και ο ρόλος των εξωπαρασίτων και των χειρισμών που προδιαθέτουν σε τραυματισμούς και αλλοιώσεις του δέρματος. Είδη *Aeromonas salmonicida* έχουν απομονωθεί από την θαλάσσια ψείρα *Lepeophtheirus salmonis* (Nese & Enger, 1993) σε θαλάσσιο περιβάλλον και από τις ψείρες *Argulus corregoni* (Shimura και συν., 1983) και *Tetrahymena pyriformis* (King & Shotts, 1988) σε περιβάλλον με γλυκά νερά. Επειδή καθένα από αυτά τα εξωπαρασίτα είναι ικανό να προκαλέσει σημαντικές αλλοιώσεις στο δέρμα και στα βράγχια, θεωρείται ότι τα μολυσμένα εξωπαρασίτα μπορούν να ενεργήσουν σαν φορείς για την μετάδοση της νόσου.

Οριζόντια μετάδοση έχει επίσης αναφερθεί σε μαλάκια τα οποία καλλιεργούνταν μαζί με ψάρια (Starliper, 2001). Εκτός από την οριζόντια μετάδοση,

οι Wooster και Bowser, (1996) απέδειξαν ότι ζωντανά κύτταρα *Aeromonas* μπορούν να διασκορπιστούν με σταγονίδια αερολύματος τουλάχιστον 104,1 cm στον αέρα. Αυτό σημαίνει ότι η αέρια μεταφορά των *Aeromonas* μπορεί να προκαλέσει προβλήματα σε συστήματα καλλιέργειας που χρησιμοποιούν αερολύματα σε εξωτερικές δεξαμενές ή ενυδρεία που βρίσκονται κοντά.

Οι Mackie και συνεργάτες, (1930) παρατήρησαν επίσης την παρουσία *Aeromonas* μέσα στις ωοθήκες και στους όρχεις μολυσμένων ψαριών, ωστόσο απέτυχαν πειραματικά να προκαλέσουν μόλυνση μέσω ωαρίων και επομένως κάθετη μετάδοση της νόσου από τους γονείς στους απογόνους. Συνεπώς, οι Mackie και συνεργάτες, (1930) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα είδη *Aeromonas* μπορούν να μολύνουν την επιφάνεια των αυγών των ψαριών και συνέστησαν αυτά τα αυγά να απολυμαίνονται ώστε να μειώσουν ή να αποτρέψουν την περαιτέρω μόλυνση (Mackie και συν., 1933). Ο McCarthy, (1977) απέδειξε ότι η κάθετη μετάδοση δεν αποτελεί μια σημαντική οδό μόλυνσης, καθώς κύτταρα *Aeromonas* από μολυσμένους γονείς είναι απίθανο να επιβιώσουν στα αυγά τους. Όμοια οι Bullock και Stuckey, (1987) δεν κατάφεραν να προκαλέσουν κάθετη μετάδοση της νόσου από μολυσμένους γονείς – ψάρια στα αυγά και στον γόνο.

## 2.2 Πρόκληση λοίμωξης

Αμέσως μετά την μόλυνση και την είσοδο των *Aeromonas* στον οργανισμό, τα βακτήρια εισβάλλουν στο αίμα των ψαριών, υπερνικούν την λευκοκυτταρική αντίσταση του αίματος και μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο πρώτο ευαίσθητο εσωτερικό όργανο που θα συναντήσουν. Εκεί πολλαπλασιάζονται γρήγορα και υπό την επίδραση των λοιμογόντων παραγόντων τους και την παραγωγή της αερολυσίνης κυτταροτοξικής εντεροτοξίνης (ACT) προκαλούν βλάβη των ιστών και γενίκευση της λοίμωξης (<http><sup>9</sup>). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται οι χαρακτηριστικές δοθιήνες που αποτελούν και την τυπική χρόνια μορφή της νόσου. Αντίθετα στην οξεία μορφή, λόγω της τοξιναιμίας, δεν προκαλούνται οι χαρακτηριστικές αλλοιώσεις, γιατί ο θάνατος επέρχεται γρήγορα (Φώτης, 2003).

Όσον αφορά την μόλυνση μέσω της γαστρεντερικής οδού, η διείσδυση των βακτηρίων στο επιθήλιο του εντέρου δίνει την ευκαιρία στα βακτήρια να εισέλθουν στο εσωτερικό του οργανισμού των ψαριών. Στην συνέχεια, μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση, αποκόλληση ακόμη και ολόκληρων εντεροκυττάρων καθώς

και διαταραχή των συνδεδετικών συμπλεγμάτων με την μονοστιβάδα του επιθηλίου (Berg, 1995). Αυτό οφείλεται κυρίως στην επίδραση των λοιμογόνων παραγόντων των βακτηρίων, όπως είναι οι εξωτοξίνες και τα δομικά συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος (Jutfelt και συν., 2006).

Τα είδη *A. hydrophila*, *A. caviae* και *A. sobria* (Motile *Aeromonas* Septicemia-MAS) θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια και μολύνουν τα ψάρια που βρίσκονται συνήθως σε ανοσοκαταστολή από την επίδραση άλλων παραγόντων. Οι μολύνσεις συμβαίνουν κυρίως κατά την διάρκεια περιβαλλοντικών αλλαγών, κατά την επίδραση παραγόντων στρες, αλλαγών θερμοκρασίας, μολύνσεων του περιβάλλοντος ή επιπλέκονται δευτερογενώς, όταν τα ψάρια έχουν ήδη μολυνθεί από κάποιον άλλο πρωταρχικό παθογόνο παράγοντα ([http](http://)<sup>9</sup>).

Η σημασία των ασυμπτωματικών μολύνσεων έχει επίσης αναγνωριστεί, καθώς αυτές οι μολύνσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην μετάδοση των νοσημάτων στα εμπορικά ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών (Hiney και συν., 1994). Πιο ευαίσθητα αποδεικνύονται τα ψάρια κατά την διάρκεια της γενετικής ωριμότητας ή κατά την διάρκεια της μετανάστευσης των σολομών από τα γλυκά στα θαλασσινά νερά.

### 2.3 Λοιμογόνοι παράγοντες

Παρόλο που τα είδη *Aeromonas* είναι γνωστά σαν παθογόνα και έχουν μελετηθεί πάνω από 100 χρόνια, οι λοιμογόνοι παράγοντες δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί (Austin & Adams, 1996). Οι μηχανισμοί μολυσματικότητας που σχετίζονται με το παθογόνο βακτήριο του γένους *Aeromonas*, απασχολούν μεγάλο μέρος των ερευνών, καθώς κλινικά συμπτώματα της νόσου μπορούν να εμφανιστούν σε ψάρια στα οποία ενοφθαλμίζονται εξωκυτταρικά προϊόντα που παράγονται κατά την ανάπτυξη των *Aeromonas* (Ellis και συν., 1981).

Η μολυσματικότητα των ειδών *Aeromonas* έχει συνδεθεί με δομικά συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος και με εξωτοξίνες που εκκρίνονται κατά την διάρκεια του βακτηριακού μεταβολισμού και έχουν σαν σκοπό να αντιμετωπίσουν τους μηχανισμούς ειδικής και μη ειδικής ανοσίας του ξενιστή. Παρόλο που φαινοτυπικά είναι δύσκολο να προβλεφθεί η μολυσματικότητα *in vitro* με βάση την παρουσία ή απουσία ενός συστατικού του βακτηρίου (Olivier, 1990) η συνεργική δράση καθενός από αυτά τα στοιχεία συνεισφέρει αθροιστικά στην εκδήλωση της νόσου *in vivo*. Η φύση των λοιμογόνων παραγόντων των *Aeromonas* (αερολυσίνη/αιμολυσίνη,

λιπάσες, πρωτεάσες, ελαστάσες, DNάσες κ.ά.) είναι πολύπλοκη και προφανώς διαφέρει μεταξύ των στελεχών.

Τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida* έχει αναφερθεί πως μοιράζονται αντιγόνα όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, ωστόσο οι εξωκυτταρικοί λοιμογόνιοι παράγοντες φαίνεται πως διαφέρουν (Austin και συν., 1998). Άτυπα στελέχη *A. salmonicida* μεταφέρουν επίσης πλασμίδια που διαφέρουν από τα πλασμίδια των τυπικών στελεχών (Austin και συν., 1998). Ωστόσο κανένας από τους αναγνωρισμένους λοιμογόνους παράγοντες της *A. salmonicida* δεν συνδέεται με ένα συγκεκριμένο πλασμίδιο.

### **2.3.1 Λοιμογόνιοι παράγοντες μη κινητόν ειδών (*A. salmonicida* group)**

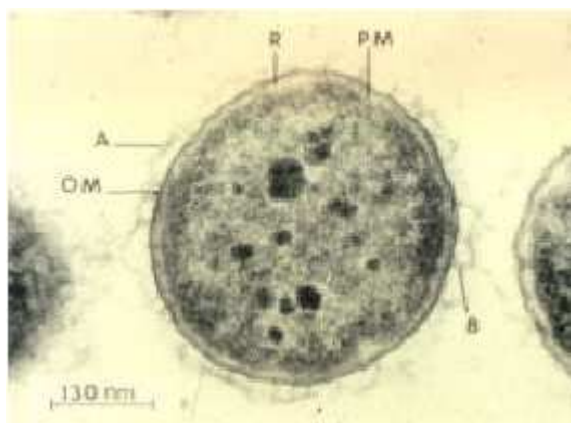
Τα τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida*, μπορούν και εκδηλώνουν την λοιμογόνο δράση τους με μια σειρά λοιμογόνων παραγόντων, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι: 1) το υδρόφοβο επιφανειακό πρωτεϊνικό στρώμα (A-layer) 2) η πολυσακχαριδική κάψα 3) η σερίνη 4) οι μεταλλοπρωτεάσες 5) μια αιμολυτική κυτταροτοξίνη και 6) η γλυκεροφωσφολιπιδική-ακυλο-τρανσφεράση της χοληστερόλης (GCAT).

#### ***A-Layer* πρωτεΐνη**

Ο Udey (1978) απέδειξε ότι τα μολυσματικά στελέχη *A. salmonicida* διατηρούσαν μια πρόσθετη στοιβάδα/στρώμα (A-layer), το οποίο συνδέονταν με την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυτταρικού τοιχώματος. Οι Evenberg και συνεργάτες, (1981) προσδιόρισαν ότι η A-layer αποτελούνταν από ένα πρόσθετο κυτταρικό πρωτεϊνικό περίβλημα (ACE) το οποίο ήταν ανοσολογικά παρόμοιο σε περιπτώσεις απομονώσεων των λοιμογόνων παραγόντων. Η A-layer αποτελείται από μια πρωτεΐνη, την A-πρωτεΐνη (VarA), η οποία είναι αδιάλυτη στο νερό, υδρόφοβη και παρόμοια με τα K88 κολλώδη τριχίδια της εντεροπαθογόνου *Escherichia coli*. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μοριακό βάρος 49 kDa, σχηματίζει μια επαναλαμβανόμενη τετράγωνη διάταξη στην επιφάνεια που περιβάλλει όλο το κύτταρο (Kay και συν., 1981) και εμφανίζεται σε τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida* (Hamilton και συν., 1981). Οι Kay και Trust, (1991) απέδειξαν επιπρόσθετα πως η τετράγωνη διάταξη προσδέεται στην επιφάνεια του κυττάρου μέσω του O-αντιγόνου στα πλάγια της αλυσίδας του βακτηριακού λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

Η πρωτεΐνη A-layer προστατεύει το παθογόνο βακτήριο από την φαγοκυττάρωση και την δράση των πρωτεασών, ενώ διευκολύνει την σύνδεση με συγκεκριμένες πορφυρίνες, ανοσοσφαιρίνες και εξωκυτταρικές πρωτεΐνες (Trust και συν., 1996) (Εικόνα 2). Επιπλέον, εμποδίζει τους βακτηριοφάγους υποδοχείς στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου και δημιουργεί ένα αδιαπέραστο φράγμα που απομονώνει την υποκείμενη εξωτερική μεμβράνη και τις συνδεδεμένες πρωτεΐνες από τις χημικές μεταβολές κατά την άμυνα του ξενιστή, περιλαμβάνοντας στοιχεία ανοσολογικής ανταπόκρισης και κυτταροτοξικών επιδράσεων του συστήματος συμπληρώματος (Kay & Trust, 1991). Οι Garduno και συνεργάτες, (2000) έδειξαν επίσης ότι στελέχη *A. salmonicida* που διαθέτουν το υδρόφοβο επιφανειακό πρωτεϊνικό στρώμα (A-layer) μπορούν να προσκολληθούν, να εισέλθουν και να επιβιώσουν αποτελεσματικά μέσα στα μακροφάγα.

Μία εξωκυτταρική A-layer έχει ανιχνευτεί επίσης σε διάφορα άτυπα στελέχη, αλλά οι μηχανισμοί παθογένειας διαφέρουν από αυτούς που έχουν περιγραφεί για τα τυπικά στελέχη *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Σε τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida* έχουν περιγραφεί για παράδειγμα, μια διαφορετική εξωκυτταρική μεταλλοπρωτεάση και ένας διαφορετικός μηχανισμός χρήσης του σιδήρου (Wiklund & Dalsgaard, 1998).



**Εικόνα 2.** Μετάδοση ενός λοιμογόνου στελέχους *Aeromonas salmonicida* σε ηλεκτρομικρογραφία. Διακρίνεται η παρουσία της A-layer (A) σε σχέση με την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη (OM), άκαμπτη μεμβράνη (rigid layer) (R), την κυτταροπλασματική μεμβράνη (PM) και τις μικρολάχνες (B) (Cipriano, 2001).

#### **Γλυκεροφωσφολιπιδική-ακυλο-τρανσφεράση της χοληστερόλης (GCAT)**

Ο ενοφθαλμισμός των ψαριών με βακτηριακές ενδοτοξίνες ή λιποπολυσακχαρίτες (LPS) στην καθαρή τους μορφή που παράγονται από στελέχη *A.*



*salmonicida* δεν προκαλεί παθογόνα αποτελέσματα (Paterson & Fryer, 1974; Wedemeyer και συν., 1969). Μέσα όμως στο στρώμα των εξωκυτταρικών προϊόντων που παράγονται από τα στελέχη *A. salmonicida*, οι λιποπολυσακχαρίτες μπορούν να ενωθούν με την γλυκεροφωσφολιπιδική-ακυλο-τρανσφεράση της χοληστερόλης (GCAT). Οι Lee και Ellis, (1990) έχουν αποδείξει ότι το σύμπλεγμα GCAT/LPS μπορεί να προκαλέσει αιμόλυση στα ερυθροκύτταρα των ψαριών, λύση στα λευκοκύτταρα ενώ είναι κυτταροτοξικό και θανατηφόρο για τον σολομό του Ατλαντικού αν ενοφθαλμιστεί σε συγκέντρωση 0.045 μg πρωτεΐνης/g Σ.Β. Αντίθετα με παλαιότερες μελέτες, φαίνεται επομένως πως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) του συμπλέγματος GCAT/LPS αποτελούν ένα σημαντικό στοιχείο στην παθογένεια των *A. salmonicida*.

Όσον αφορά τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS), αποτελούν βασικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων, ενώ αποτελούνται από τρία τμήματα: το λιπίδιο A, έναν ολιγοσακχαρίτη και το O-αντιγόνο, που εκτίθενται στην επιφάνεια των κυττάρων. Η ενδοτοξική δράση των Gram (-) βακτηρίων και των *Aeromonas* σχετίζεται με το λιπίδιο A. Οι LPS συγκεκριμένα της *A. salmonicida* παίζουν βασικό ρόλο στην συγκρότηση και διατήρηση της A-layer (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998).

### **Εξωκυτταρικοί λοιμογόνοι παράγοντες - Βακτηριακές πρωτεάσες**

Οι πρώτες μελέτες, σχετικά με τους εξωκυτταρικούς λοιμογόνους παράγοντες έδειξαν πως ως αποτέλεσμα της σηψαιμίας και της χρήσης από τα βακτήρια της γλυκόζης του αίματος των ψαριών, προκαλούνταν υπογλυκαιμία και θάνατος των ξενιστών (Field και συν., 1944). Μέχρι τότε πολύ λίγα ήταν γνωστά για την πιθανή δράση των βακτηριακών εξωτοξινών που παράγονταν από τα είδη *A. salmonicida* ώσπου ο Griffin, (1954) πρότεινε πως τα βακτήρια αυτά παρήγαγαν μια λευκοσιδίνη που προκαλούσε σοβαρή λευκοπενία, και η οποία φαινόταν ιστοπαθολογικά στις αλλοιώσεις.

Οι Fuller και συνεργάτες, (1977) απομόνωσαν ένα λευκοκυτταρολυτικό παράγοντα από τα εξωκυτταρικά προϊόντα (ECP), ο οποίος δεν ήταν μόνο κυτταροτοξικός για τα λευκοκύτταρα αλλά αύξανε συνεργικά την λοιμογόνο δράση των βακτηρίων όταν ενοφθαλμιζόνταν μαζί με ζωντανά κύτταρα. Μια πρωτεάση επίσης απομονώθηκε από τα εξωκυτταρικά προϊόντα (Shieh & MacLean, 1975) η οποία διευκόλυνε την ανάπτυξη αλλοιώσεων στα ψάρια. Οι Cirriano και συνεργάτες,

(1981) προσδιόρισαν πως τα εξωκυτταρικά προϊόντα αποτελούσαν ένα σύμπλεγμα ουσιών. Αυτές οι ουσίες ήταν ανάλογες με τον λευκοκυτταρολυτικό παράγοντα του Fuller, (1977), ήταν πρωτεολυτικές και προκαλούσαν την ανάπτυξη αλλοιώσεων ενώ άλλες είχαν κυτταροτοξικές ιδιότητες στα κύτταρα γονάδων της πέστροφας (RTG-2) ή προκαλούσαν αιμόλυση στα ερυθροκύτταρα των ψαριών.

Η παραγωγή μιας πρωτεάσης που υπέστη μετάλλαξη και έχασε την λοιμογόνο ικανότητα της, αλλά διατήρησε τις αιμολυτικές και λευκοκυτταρολυτικές τις ικανότητες, αποδεικνύει ότι οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες είναι ένα σημαντικό στοιχείο της παθογένειας των βακτηρίων (Sakai, 1985). Οι Tajima και συνεργάτες, (1984) χαρακτήρισαν μια ασταθή, αλκαλική, σερίνη πρωτεάση από τα εξωκυτταρικά προϊόντα (ECP) της *A. salmonicida* με μοριακό βάρος 71 kDa. Η πρωτεολυτική της δράση ήταν σταθερή σε pH 5-10, ωστόσο μέγιστη δράση παρατηρούνταν σε pH 9.4 και θερμοκρασία 50°C. Οι Price και συνεργάτες, (1989) έδειξαν ότι στελέχη *A. salmonicida* παρήγαγαν τουλάχιστον δύο τύπους πρωτεάσης: μια σερίνη πρωτεάση με M.B. 70 kDa (παρόμοια με αυτή που περιέγραψαν οι Tajima και συν.) η οποία είναι δραστική απέναντι στην καζεΐνη και ζελατίνη και μια άλλη με M.B. 20 kDa η οποία είναι δραστική απέναντι στην ζελατίνη αλλά όχι στην καζεΐνη. Επιπλέον μια πρωτεάση 20 kDa της *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* η οποία ήταν θανατηφόρος για τον σολομό του Ατλαντικού και τα σολομοειδή, αναγνωρίστηκε σαν μεταλλοπρωτεάση με βάση την αναστολή της από EDTA. Αυτή η 20 kDa μεταλλοπρωτεάση (AsaP1), έχει απομονωθεί από τα ECPs άτυπων στελεχών *Aeromonas* και έχει αναγνωριστεί σαν την κύρια εξωτοξίνη των άτυπων στελεχών, περιλαμβάνοντας και στελέχη της *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (Gunnlaugsdóttir & Gudmundsdóttir, 1997).

Μια μεταλλοπρωτεάση 35 kDa επίσης απομονώθηκε από την *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* με άριστη δράση σε pH 7.5, στους 40°C, δράση κατά της ζελατίνης αλλά όχι κατά της καζεΐνης (Arnesen και συν., 1995). Στελέχη *A. salmonicida* που απομονώθηκαν από κυπρινοειδή δεν παρήγαγαν ωστόσο αυτή την μεταλλοπρωτεάση (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Έχει αποδειχθεί με γενετικές μεθόδους, πως υπάρχουν άτυπα στελέχη *A. salmonicida* που παράγουν την P1 μεταλλοπρωτεάση και/η την GCAT κυτταροτοξίνη, που είναι οι κύριες εξωτοξίνες των τυπικών στελεχών, ωστόσο κάποια στελέχη δεν παράγουν κανένα από αυτά τα εξωκυτταρικά προϊόντα (Austin και συν., 1998). Ο ακριβής ρόλος των διάφορων εξωκυτταρικών προϊόντων και

λοιμογόνων παραγόντων της *A. salmonicida* που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα δεν είναι ξεκάθαρος, γι' αυτό και απαιτείται επιπλέον έρευνα, για τον ακριβή καθορισμό τους (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998).

### **Παραγωγή Σιδηροφόρων και Ρύθμιση σιδήρου**

Καθώς ο σίδηρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των βακτηρίων, τα παθογόνα βακτήρια θα πρέπει να διαθέτουν μηχανισμούς πρόσληψης σιδήρου για να ανταγωνίζονται τις πρωτεΐνες του ξενιστή που δεσμεύουν σίδηρο (όπως η τρανσφερίνη), στον ορό και στα εξωκυτταρικά υγρά του ξενιστή. Τέτοιοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την παραγωγή σιδηροφόρων και την εγκατάσταση τρανσφερίνης δεσμευτικών πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη, ικανών να δεσμεύουν σίδηρο σε συνθήκες περιορισμένου σιδήρου (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Πολλά τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida* μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες περιορισμού του σιδήρου. Ωστόσο, η παραγωγή σιδηροφόρων ανιχνεύτηκε μόνο σε τυπικά στελέχη (Hirst και συν., 1991). Οι Hirst και συνεργάτες, (1991) αναγνώρισαν επίσης 4 πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης που ρυθμίζουν τον σίδηρο (IROMPs) σε τυπικά και άτυπα στελέχη (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998). Γιαυτό έχει αναφερθεί ότι τα τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida* ρυθμίζουν την πρόσληψη σιδήρου με διαφορετικούς μηχανισμούς.

### **2.3.2 Λοιμογόνοι παράγοντες κινητών ειδών (*A. hydrophila* group)**

Στα κινητά είδη *Aeromonas* spp., όπως σε όλα τα εντεροπαθογόνα βακτήρια η παθογένεια σχετίζεται με δύο κυρίως μηχανισμούς: (i) προσκόλληση στους ιστούς και (ii) παραγωγή τοξινών. Η προσκόλληση στους ιστούς διευκολύνεται από τα S-layers, που μπορούν να βρεθούν στην *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, και *A. veronii* biotype *sobria* (Dooley & Trust, 1988). Τα S-layers υποστηρίζουν την προσκόλληση και επέκταση των βακτηρίων στον εντερικό βλεννογόνο. Νηματώδεις (τριχίδια) ή μεμβρανώδεις κατασκευές (συγκολλητίνες), με αιμοσυγκολλητική ικανότητα, βοηθούν στην προσκόλληση των κινητών ειδών *Aeromonas* (Hokama & Inagawa, 1991). Σημαντικές επίσης λόγω της παθογένειάς τους θεωρούνται οι κυτταροτοξίνες και εντεροτοξίνες (περιλαμβάνοντας αυτές με αιμολυτική δράση). Είδη *Aeromonas* μπορούν να παράγουν και άλλες εξωκυτταρικές ουσίες: πρωτεάσες, αμυλάση,

χιτινάση, λιπάση, νουκλεάση (Janda, 1991) και άλλες με άγνωστο ακόμη παθογόνο ρόλο. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός λοιμογόνου δράσης και ο ρόλος αυτών των παραγόντων δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, μέχρι σήμερα.

Η ικανότητα ενός παθογόνου να τοποθετείται, να προσκολλάται και επομένως να μολύνει ένα ευαίσθητο ξενιστή είναι το πρώτο βήμα στην εξέλιξη του νοσήματος. Συνεπώς, παράγοντες που παράγονται από τα κινητά είδη *Aeromonas*, οι οποίοι διευκολύνουν την μετάδοση, αποτελούν σημαντικά στοιχεία της λοιμογόνου ικανότητας των βακτηρίων. Οι Ascencio και συνεργάτες, (1998) έχουν δείξει ότι η *A. hydrophila*, *A. caviae*, και *A. sobria* μπορούν πραγματικά να προσκολληθούν στις κυτταρικές σειρές ψαριών που διαθέτουν βλεννογόνους υποδοχείς. Οι Trust και συνεργάτες, (1980) επίσης έδειξαν ότι στελέχη *A. hydrophila* διέθεταν χαρακτηριστικά συγκόλλησης (συγκολλητίνες) που διευκόλυναν την προσκόλληση στα ευκαριωτικά κύτταρα των ψαριών. Η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο επιπλέον φανέρωσε πως τα κινητά είδη *Aeromonas* παράγουν τριχίδια (λάχνες) που διευκολύνουν την προσκόλληση, ανεξάρτητα από την λοιμογόνο ικανότητά τους (del Corral, 1990).

Εκτός από τις συγκολλητίνες, οι Dooley και Trust, (1988) χαρακτήρισαν μια τετράγωνη πρωτεϊνική διάταξη, που αποτελούνταν από μια πρωτεΐνη των 52 kDa, από απομονώσεις *A. hydrophila*. Αυτή η S-layer πρωτεΐνη αναφέρθηκε επίσης από τους Ford και Thune, (1991) μεταξύ των κινητών ειδών *Aeromonas* που απομονώθηκαν από κλινικά ασθενή γατόψαρα. Η ύπαρξη αυτών των S-layers πρωτεϊνών διευκολύνει την διείσδυση των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών καθώς αυξάνουν την κυτταρική υδροφοβία. Η αυξημένη επιφανειακή τάση βελτιώνει την αντίσταση του βακτηρίου στην λύση και φαγοκυττάρωση των λευκοκυττάρων. Οι Byers και συνεργάτες, (1986) επίσης έδειξαν ότι η *A. hydrophila* μπορεί να παράγει σιδηροφόρα που παρέχουν αντίσταση απέναντι στην ικανότητα της τρανσφερίνης του ορού να αναστείλει την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να περιγράψουν τους μηχανισμούς μολυσματικότητας των κινητών ειδών *Aeromonas*. Ο Kou, (1973) βρήκε ότι πολλά από τα λοιμογόνα, μη λοιμογόνα και μέτρια λοιμογόνα στελέχη που μελέτησε διέθεταν αιμορραγικούς παράγοντες και θανατηφόρες τοξίνες. Οι Olivier και συνεργάτες, (1981) έδειξαν ότι η *A. hydrophila* και *A. sobria* παρήγαγαν εντεροτοξίνες, δερμονεκρωτικούς παράγοντες και αιμολυσίνες. Παρόλο που και τα δύο είδη προκαλούν αιμόλυση σε αιματούχο άγαρ στους 30°C, μόνο η *A. hydrophila*

προκαλεί αιμόλυση στους 10°C. Εντεροτοξίνες, αιμολυσίνες, πρωτεάσες, αιμοσυγκολλητίνες και ενδοτοξίνες που παράγονται από τα είδη *Aeromonas* εξακολουθούν να αποτελούν μεγάλο αντικείμενο έρευνας (Cipriano & Bullock, 2001).

Οι Allan και Stevenson, (1981) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αιμολυσίνη, όχι η πρωτεάση, ήταν ο κύριος λοιμογόνος παράγοντας της *A. hydrophila*. Τα αποτελέσματα άλλων μελετών, ωστόσο μπορεί να είναι επιφυλακτικά απέναντι σε τέτοια συμπεράσματα. Η μέτρηση της αιμολυτικής ικανότητας μόνο δεν αποτελεί καθοριστικό χαρακτηριστικό μολυσματικότητας, επειδή ακόμη και μερικά μη λοιμογόνα στελέχη (15%) *A. hydrophila* είναι αιμολυτικά. Πρόσθετες μετρήσεις έδειξαν ότι ένας συνδυασμός υψηλής αιμολυτικής και πρωτεολυτικής δράσης, που ανιχνεύτηκε στο 90% λοιμογόνων στελεχών *A. hydrophila* και στο 87,5% στελεχών *A. sobria*, μπορεί να αποτελεί καλύτερο μέτρο της ολικής λοιμογόνου ικανότητας.

Οι Rodriguez και συνεργάτες, (1992) χαρακτήρισαν επιπλέον μια μεταλλοπρωτεάση με μοριακό βάρος 38 kDa χωρίς κυτταροτοξική δράση, μια σερίνη πρωτεάση με μοριακό βάρος 22 kDa με κυτταροτοξική δράση, και μια αιμολυσίνη με μοριακό βάρος 68 kDa από την *A. hydrophila*. Κάθε ένας από αυτούς τους τρεις παράγοντες είχε θανατηφόρο δράση στην πέστροφα. Αποτελέσματα από μια πρόσφατη μοριακή ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε από τους Zhang και συνεργάτες, (2000) για να διαχωρίσει τις γενετικές διαφορές μεταξύ λοιμογόνων και μη λοιμογόνων στελεχών, επιβεβαιώνει ότι η μολυσματικότητα μεταξύ των κινητών *Aeromonas* εξαρτάται από ένα πλήθος παραγόντων. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι 22 DNA τμήματα ήταν παρόντα στα περισσότερα λοιμογόνα στελέχη και ότι αυτά τα γονίδια κωδικοποιούσαν πέντε γνωστούς λοιμογόνους παράγοντες της *A. hydrophila*, την αιμολυσίνη (hlyA), την πρωτεάση (ολιγοπεπτιδάση A), την εξωκυτταρική πρωτεΐνη (Omp), την πρωτεΐνη που ευθύνεται για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα φάρμακα και την πρωτεΐνη που προσομοιάζει την ιστόνη (HU-2).

### **3. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ**

#### **3.1 Ιστορική Αναδρομή εμφάνισης των νοσημάτων στα ψάρια γλυκού νερού που οφείλονται σε είδη *Aeromonas***

Η πρώτη αναφορά για τα είδη *Aeromonas* και η απομόνωση του βακτηρίου *A. salmonicida* (syn. *Bacillus salmonicida*, *Bacterium salmonicida*, *Bacterium trutta*)

έγινε από τους Emmerich και Weibel, (1894) σε ένα εκκολαπτήριο πέστροφας στην Βαυαρία της Γερμανίας. Από τότε που η ασθένεια πρωτοεμφανίστηκε έχει προκαλέσει σοβαρές απώλειες παγκοσμίως (USA, Καναδά, Ευρώπη, Ιαπωνία) στα εκκολαπτήρια και στις εκτροφές πάχυνσης κυρίως των σολομοειδών, ενώ διάφορες μελέτες για τα είδη *Aeromonas* και τις μολύνσεις που προκαλούν έχουν γίνει και έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία χρόνια (Αγγελίδης, 2008). Καθώς τα είδη *Aeromonas* αποτελούν μια συνεχή απειλή για τα σολομοειδή των ιχθυοκαλλιεργειών, έχουν μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλο παθογόνο παράγοντα των ψαριών ((Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998).

Ήδη από τις πρώτες επιστημονικές περιγραφές των νοσημάτων των ψαριών, ο Otte (1963) θεώρησε ότι οι σηψαιμικές μολύνσεις των ψαριών που προκαλούνται από τα κινητά είδη *Aeromonas* εμφανίζονταν συχνά σε όλη την Ευρώπη και κατά τον Μεσαίωνα. Σήμερα, αναγνωρίζεται ότι απομονώσεις βακτηρίων που τοποθετήθηκαν στα γένη *Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, *Aerobacter* και *Achromobacter* στην πραγματικότητα ανήκαν στο γένος *Aeromonas*.

Τα τελευταία χρόνια το μεγαλύτερο ποσοστό μολύνσεων από *A. salmonicida* στην Ευρώπη, εμφανίζεται στην Ιταλία (σολομοειδή), Γαλλία και Ισπανία (διάφορα είδη ψαριών). Στελέχη *A. salmonicida* δεν είχαν αναφερθεί στην Νέα Ζηλανδία ή Αυστραλία μέχρι το 1974, όταν άτυπα στελέχη *A. salmonicida* εισήχθησαν στην Αυστραλία με την μεταφορά ασθενών διακοσμητικών χρυσόψαρων (Humphrey & Ashburner, 1993; Trust και συν., 1980). Από τότε τα άτυπα στελέχη *A. salmonicida* έχουν γίνει ενδημικά, ακόμη και μεταξύ των άγριων πληθυσμών χρυσόψαρων. Ωστόσο η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* δεν έχει αναφερθεί στα ψάρια της Νέας Ζηλανδίας, Τασμανίας και Αυστραλίας. Όμοια, μόνο η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* έχει αναφερθεί σε σολομοειδή στον Καναδά (Hammel, 1995). Έως το 1993 οι μολύνσεις σολομοειδών δεν αποτελούσαν πρόβλημα στην Νότια Αμερική. Από το 1995 όμως τυπικά στελέχη του βακτηρίου άρχισαν να προκαλούν νοσηρές καταστάσεις στις εκτροφές σολομού της νότιας Χιλής όπου η παραγωγή ήταν πολύ υψηλή (Αγγελίδης, 2008).

Μια από τις πρώτες εργασίες που χρησιμοποίησαν την έκφραση «άτυπα» στελέχη *A. salmonicida* δημοσιεύτηκε το 1971 (Evelyn, 1971) παρόλο που αναφορές σε στελέχη που δεν ανήκαν στα subsp. *A. salmonicida* είχαν δημοσιευτεί νωρίτερα (Smith, 1963). Απομονώσεις άτυπων στελεχών *A. salmonicida* έχουν αναφερθεί στο βόρειο ημισφαίριο, Καναδά, βόρεια και κεντρική Ευρώπη, βόρεια Αμερική, Ιαπωνία

καθώς και στην Νότια Αυστραλία και Νότια Αφρική. Υπάρχουν επίσης λίγες αναφορές απομονώσεων από ψάρια σε περιοχές της Μεσογείου: από κοινό κυπρίνο και χρυσόψαρα στην πρώην Γιουγκοσλαβία (Wiklund & Dalsgaard, 1998; Bootsma και συν., 1977). Αναφορές δεν υπάρχουν στην νότια Αμερική, Ρωσία και βόρεια Ασία (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Γενικότερα τα περιστατικά νοσημάτων που οφείλονται στα είδη *Aeromonas* και προσβάλλουν τα ψάρια γλυκού νερού εξακολουθούν να αυξάνονται παγκοσμίως, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την παγκόσμια παραγωγή ψαριών τόσο από τις ιχθυοκαλλιέργειες όσο και από την φυσική αλιεία.

### 3.2 Παρουσία ειδών *Aeromonas* στα ψάρια γλυκού νερού

Οι μολύνσεις με τα είδη *Aeromonas* αποτελούν το πιο συχνό βακτηριακό νόσημα που μπορεί να διαγνωστεί σε καλλιεργούμενα ψάρια γλυκών νερών (Cirignano & Bullock, 2001). Από τότε που οι Emmerich και Weibel, (1894) περιέγραψαν για πρώτη φορά την *A. salmonicida* σε ένα εκκολαπτήριο πέστροφας στην Βαυαρία της Γερμανίας, (Emmerich & Weibel, 1890) επικρατούσε η άποψη ότι η *A. salmonicida* ήταν παθογόνος μόνο για τα εντατικά καλλιεργούμενα είδη σολομοειδών (Cirignano & Bullock, 2001). Πρόσφατες έρευνες, ωστόσο δείχνουν ότι λίγα μόνο είδη καλλιεργούμενων ή άγριων ψαριών σε γλυκά, υφάλμυρα ή αλμυρά νερά δεν προσβάλλονται από τα είδη *Aeromonas* (Cirignano & Bullock, 2001). Σήμερα είναι γνωστό ότι όλα τα είδη σολομού και πέστροφας είναι ευαίσθητα στην μόλυνση (Cirignano & Bullock, 2001). Επιπλέον και πολλά μη σολομοειδή ψάρια, όπως γατόψαρα και είδη τροπικών ή διακοσμητικών ψαριών μολύνονται με το βακτήριο, όπως και τα δίθυρα μαλάκια (Minana-Galbis και συν., 2002). Είδη *Aeromonas* μπορούν να βρεθούν και σε ψάρια της θάλασσας, ως αποτέλεσμα των λυμάτων των νερών ή της ροής των ποταμών στην θάλασσα (Janda & Abbott, 1998). Ο αριθμός, η ποικιλία και η κατανομή των ειδών ψαριών που είναι ευαίσθητα στην μόλυνση με είδη *Aeromonas*, εξηγούν την μεγάλη διασπορά του βακτηρίου παγκοσμίως (Cirignano & Bullock, 2001).

Αποτελούν επίσης μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας των ψαριών γλυκού νερού, ειδικά τα είδη *A. hydrophila*, *A. sobria*, και *A. salmonicida* (Naviager και συν., 2006; Trust και συν., 1974). Μπορούν να βρεθούν σε πληθυσμούς  $10^2$  CFU/gr ψυχρή περίοδο έως  $10^5$ - $10^6$  CFU/gr θερμή περίοδο, ( $1.5 \times 10^2$  –  $1.6 \times 10^5$

CFU/gr) μαζί με άλλα είδη *Enterobacteriaceae*. Θεωρούνται επίσης υπεύθυνα για ένα πλήθος νοσημάτων των ποικιλόθερμων αλλά και ομοιόθερμων οργανισμών (Rahman και συν., 2004).

Η παρουσία αυτών των βακτηρίων στα ψάρια δεν αποτελεί ένδειξη νοσήματος και συνεπώς οι παράγοντες στρες θεωρούνται αίτιο έξαρσης των νοσημάτων (Cirriano & Bullock, 2001). Οι μολύνσεις με είδη *Aeromonas* εμφανίζονται στα ψάρια συνήθως κατά την διάρκεια περιβαλλοντικών αλλαγών, αλλαγών θερμοκρασίας, μόλυνσης του περιβάλλοντος, παραγόντων που προκαλούν στρες ή επιπλέκονται δευτερογενώς σε προϋπάρχουσες μολύνσεις.

Μολύνονται κυρίως ψάρια του γλυκού νερού, που ανήκουν στις εξής κατηγορίες: οικ. Salmonidae-Σολομοειδή (Σολομός του Ατλαντικού-*Salmo salar*, Ιριδίζουσα πέστροφα-*Oncorhynchus mykiss*, Καφέ πέστροφα-*Salmo trutta*, Ποταμίσις πέστροφα-*Salvelinus fontinalis*), οικ. Cyprinidae-Κυπρινοειδή (*Cyprinus carpio*, *Tinca tinca*), οικ. Siluridae-Γατόψαρα (*Silurus glanis*, *Ictalurus punctatus*), οικ. Acipenseridae-Στουργιόνια (*Acipenser ruthenus*, *Acipenser persicus*, *Acipenser baeri*, *Acipenser gueldenstaedi*, *Acipenser naccarii*), οικ. Mugilidae-Κεφαλοειδή (*Mugil cephalus*, *Liza aurata*), Χέλια (Ευρωπαϊκό χέλι-*Anguilla Anguilla*, Αμερικάνικο χέλι-*Anguilla rostrata*, Ιαπωνέζικο χέλι-*Anguilla japonica*), Τιλάπιες (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis macrochir*, *Tilapia zillii*), Κορέγονοι, Πέρκες (*Perca fluviatilis*), Τούρνες, Διακοσμητικά ψάρια (*Carassius auratus auratus*-χρυσόψαρο), τροπικά ψάρια κ.ά. (Cirriano & Bullock, 2001).

Προσβάλλονται επίσης εκτός από τα ψάρια του γλυκού νερού και ψάρια των υφάλμυρων νερών. Οι Rahim και συνεργάτες, (1985) απομόνωσαν *A. hydrophila* από αλλοιώσεις πέντε ειδών ψαριών υφάλμυρων νερών: *Platosus anguillar*, *Lates calcarifer*, *Epinephelus megachir*, *Labeo ruhita* και *Serotherodon nilotica*.

Άτυπα στελέχη *A. salmonicida* έχουν επίσης απομονωθεί από μια ποικιλία καλλιεργούμενων και άγριων ψαριών, σολομοειδών και μη σολομοειδών, από γλυκά, υφάλμυρα νερά και αλμυρά νερά στην βόρεια, κεντρική Ευρώπη, νότια Αφρική, βόρεια Αμερική, Ιαπωνία και Αυστραλία (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Άτυπα στελέχη έχουν περιστασιακά απομονωθεί και από ψάρια χωρίς κλινικά συμπτώματα (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998). Περισσότερα από 20 είδη καλλιεργούμενων και 30 είδη άγριων ψαριών έχουν βρεθεί μολυσμένα με άτυπα στελέχη *A. salmonicida*. Αρχικά, άτυπα στελέχη *A. salmonicida* απομονώνονταν από ανάδρομα κυρίως είδη ψαριών. Τα τελευταία χρόνια όμως απομονώσεις έχουν γίνει και από είδη



ψαριών της θάλασσας, όπως καλκάνια (*Platichthys flesus*) (τάξη Pleuronectiformes), μπακαλιάροι (*Gadus morhua*) (τάξη Gadiformes), καλκάνια (*Scophthalmus maximus*), κέφαλοι (*Leuciscus cephalus*), minnows (*Phoxinus phoxinus*), wolfish (*Anarhichus lupus*), (*Hippoglossus hippoglossus*), (*Abramis brama*), (Karatas και συν., 2005) καθώς και από κατάδρομα είδη ψαριών, όπως τα χέλια (οικ. Anguillidae) (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Τυπικά στελέχη *A. salmonicida* και στελέχη *A. hydrophila* έχουν περιγραφεί και σε θαλασσινά ψάρια, όπως *Dicentrarchus Labrax*, *Scophthalmus maximus*, *Sparus aurata* (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.** Ευαίσθητα είδη ψαριών, Σολομοειδή-Μη Σολομοειδή από τα οποία έχουν απομονωθεί τυπικά και άτυπα στελέχη *A. salmonicida* (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Σολομοειδή	Μη Σολομοειδή
Atlantic salmon- <i>Salmo salar</i>	Flounder- <i>Platichthys flesus</i>
Amago salmon- <i>Oncorhynchus rhodurus</i>	Codfish- <i>Gadus morhua</i>
Brook trout- <i>Salvelinus fontinalis</i>	Halibut- <i>Hippoglossus hippoglossus</i>
Brown trout- <i>Salmo trutta m. lacustris</i>	Turbot- <i>Scophthalmus maximus</i>
Chum salmon- <i>Oncorhynchus keta</i>	Minnows- <i>Phoxinus phoxinus</i>
Coho salmon- <i>Salvelinus kisutch</i>	Wolfish- <i>Anarhichus lupus</i>
Cutthroat trout- <i>Salmo clarki</i>	Sea bass- <i>Dicentrarchus Labrax</i>
Japanese char- <i>Salvelinus leucomaenis</i>	Sea bream- <i>Sparus aurata</i>
Lake trout- <i>Salvelinus namaycush</i>	American eel- <i>Anguilla rostrata</i>
Masu salmon- <i>Oncorhynchus masou</i>	Carp- <i>Cyprinus carpio</i>
Pink salmon- <i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	European eel- <i>Anguilla Anguilla</i>
Rainbow trout- <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Catfish- <i>Silurus glanis</i>
Sea trout- <i>Salmo trutta m. trutta</i>	Sturgeon- <i>Acipenser ruthenus</i>

Τα κινητά είδη *Aeromonas* συνήθως προκαλούν νόσημα όταν τα ψάρια θερμών αλλά και ψυχρών νερών, βρίσκονται σε φάση αναπαραγωγής. Εντοπίζονται σε ψάρια γλυκών, υφάλμυρων και θαλασσινών νερών. Παρόλο που τα νοσήματα που προκαλούνται από κινητά είδη *Aeromonas* εμφανίζονται πιο έντονα σε ψάρια που αναπαράγονται σε εντατικές συνθήκες καλλιέργειας, αυτά τα βακτήρια μπορούν επίσης να επηρεάσουν τους πληθυσμούς των άγριων ψαριών. Αποτελούν επίσης στοιχεία της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας υγιών ψαριών (Trust και συν., 1974).

Τα είδη *Aeromonas* μπορούν να βρεθούν παντού στο υδάτινο περιβάλλον, στην υδάτινη στήλη και στην επιφάνεια του ιζήματος (Hazen, 1979). Μπορούν να προσαρμοστούν σε περιβάλλον με μεγάλο εύρος αγωγιμότητας, διαύγειας υδάτων, pH, αλατότητας και θερμοκρασίας (Hazen και συν., 1978a). Οι ιδανικές θερμοκρασίες ανάπτυξης εξαρτώνται από το συγκεκριμένο κάθε φορά στέλεχος, αλλά γενικότερα κυμαίνονται μεταξύ 25°C και 35°C. Συνεπώς οι περισσότερες επιζωοτίες

σε ψάρια θερμών νερών αναφέρονται την άνοιξη και αρχές καλοκαιριού (Cipriano & Bullock, 2001).

Ο αριθμός των βακτηρίων στο γλυκό νερό σχετίζεται άμεσα με την μόλυνση από τα αστικά απόβλητα και με την θερμοκρασία, και αυξάνεται κατά την διάρκεια ευτροφικών περιόδων (Janda & Abbott, 1998). Σε συνθήκες στρες, είναι πολύ πιο πιθανό μερικά στελέχη *Aeromonas* που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας, να γίνουν παθογόνα. Θεωρείται ότι οι μολύνσεις συμβαίνουν το χειμώνα, όταν τα ψάρια είναι σχετικά ανενεργά, ενώ η έξαρση της ασθένειας γίνεται την άνοιξη. Τα ψάρια ενυδρείου, τα οποία διατηρούνται σε σταθερή θερμοκρασία νερού, μπορούν να αναπτύξουν την ασθένεια σε κάθε χρονική στιγμή. Η ιριδίζουσα πέστροφα θεωρείται ότι ανήκει στα πιο ευαίσθητα είδη των σολομοειδών που μπορούν να αναπτύξουν σηψαιμία από *Aeromonas* (Cipriano & Bullock, 2001).

### 3.3 Παρουσία ειδών *Aeromonas* στο περιβάλλον

Τα είδη *Aeromonas* θεωρούνται πρωταρχικά υδρόβιοι οργανισμοί. Μπορούν να βρεθούν διασκορπισμένα στο υδάτινο περιβάλλον, σε ποτάμια, πηγές, πηγάδια, ρυάκια, λίμνες, δεξαμενές ψαριών γλυκού νερού, καθώς και στο έδαφος και στα αγροτικά προϊόντα (Janda & Abbott, 1998). Κυριαρχούν επίσης στα υφάλμυρα νερά ενώ απομονώνονται εύκολα από τις θαλάσσιες ακτές, αλλά όχι από την ανοιχτή θάλασσα. Επίσης μπορούν να βρεθούν στα απόβλητα, στα επεξεργασμένα λύματα και απόβλητα υπονόμων (Ghenghesh και συν., 2008). Ωστόσο, αυτοί οι οργανισμοί δεν επιζούν σε νερά με πολύ υψηλά αλατότητα, γεωθερμικές πηγές ή εξαιρετικά μολυσμένα ποτάμια.

Ο αριθμός των *Aeromonas* στο γλυκό νερό έχει βρεθεί πως εμφανίζει εποχιακή κατανομή, με την μέγιστη συγκέντρωση βακτηρίων να εμφανίζεται κατά την διάρκεια του καλοκαιριού, αρχές φθινοπώρου, όπου οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν την ανάπτυξη των *Aeromonas* (Burke και συν., 1984; Rippey & Cabelli, 1980). Πολλά είδη κινητών *Aeromonas* μπορούν επίσης να βρεθούν εκτός από τα ψάρια γλυκού και αλμυρού νερού, και σε αμφίβια, ερπετά, θηλαστικά αλλά και στον άνθρωπο (είδη: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*).

Γενικότερα τα είδη *Aeromonas* μπορούν να βρεθούν σε ψάρια, δείγματα νερού (γλυκό, θαλασσινό, υφάλμυρο, χλωριωμένο ή μη χλωριωμένο νερό), σε μολυσμένο και μη μολυσμένο νερό, σε λύματα, σε πόσιμο νερό (Burke και συν.,

1984; Rippey & Cabelli, 1980), σε μερικά είδη κρέατος, σε γάλα, λαχανικά, και σε παγωτό. Μπορούν να μεταδοθούν μέσω τροφίμων που έχουν μολυνθεί, όπως θαλασσινά, λαχανικά (φρέσκα ή κατεψυγμένα) ([http](http://)<sup>9</sup>).

Το υδάτινο περιβάλλον, τα ασθενή ψάρια και οι βάτραχοι καθώς και τα ψάρια που βρίσκονται σε ανάρρωση, μπορούν επίσης να αποτελέσουν αποθήκες μόλυνσης. Η *Aeromonas hydrophila* μπορεί να βρεθεί σε διάφορα είδη ψαριών, χελωνών, αλιγατόρων και φιδιών. Η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη στο νερό από τον Μάρτιο μέχρι τον Ιούνιο (Cirriano & Bullock, 2001). Άλγη και πρωτόζωα που προκαλούν αλλοιώσεις πάνω στα ψάρια, μπορούν να περιθάψουν είδη *Aeromonas* (Chang & Huang, 1981). Το πρωτόζωο *Tetrahymena pyriformis* βρέθηκε να συνυπάρχει με την *Aeromonas hydrophila*, σε συγκέντρωση  $1 \times 10^6$  κύτταρα/ml. Οι Osborne και συνεργάτες, (1989) βρήκαν υψηλές συγκεντρώσεις κινητών *Aeromonas* στο περιβάλλον, στο μέσο του καλοκαιριού, όταν η χλωροφύλλη και η θερμοκρασία του νερού ήταν υψηλές. Μια μελέτη από τον Ghenghesh και συνεργάτες, (2000) έδειξε ότι τα είδη *Aeromonas* θεωρούνται μη παθογόνα για τα ζώα, με εξαίρεση τα ψάρια, αμφίβια και ερπετά. Ωστόσο, διάφορα είδη ζώων (βοοειδή, άλογα, χοίροι, πρόβατα και γαλοπούλες) μπορούν να λειτουργήσουν σαν φορείς με την απόρριψη των περιττωμάτων τους, αν και το ποσοστό αυτό είναι πολύ μικρό (Gray, 1984).

Κρεατοσκευάσματα όμως, από αυτά τα ζώα που πωλούνται στην αγορά έχουν βρεθεί μολυσμένα με είδη *Aeromonas*. Σε κρέας πουλερικών, αίγαιο, χοιρινό και βοδινό έχουν βρεθεί τα είδη *A. hydrophila*, *A. caviae* και *A. veronii* βιότυπος *sobria*. Η μόλυνση των κρεατοσκευασμάτων με *Aeromonas* φαίνεται να είναι αποτέλεσμα των χειρισμών κατά την σφαγή και κατά την επεξεργασία των κρεάτων. Θαλασσινά, ψάρια, γαρίδες, μύδια, στρείδια και κατεψυγμένα ψάρια έχουν βρεθεί επίσης μολυσμένα, κυρίως με είδη που εμφανίζουν αιμολυτική δράση. Συγκεκριμένα στα ψάρια γλυκού νερού φαίνεται πως κυριαρχεί η *A. caviae*, ενώ στα θαλασσινά ψάρια κυριαρχεί η παρουσία του είδους *A. veroni* βιότυπος *sobria*.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες, τα είδη *Aeromonas* εντοπίζονται συχνά και στο γάλα, στο λευκό τυρί και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και στο παστεριωμένο γάλα (Khalil, 1997). Κυρίαρχα είδη και σε αυτά τα προϊόντα είναι τα: *A. hydrophila*, *A. veroni* βιότυπος *sobria* και *A. caviae* (Ghenghesh και συν., 2008). Αυτά τα ευρήματα δείχνουν πως τα κινητά είδη *Aeromonas* spp. επικρατούν κυρίως στο νωπό γάλα, και πως η παρουσία στελεχών *Aeromonas* στο παστεριωμένο γάλα και τυρί αποδεικνύουν την επιμόλυνση, ως αποτέλεσμα μη τήρησης των κανόνων

υγιεινής κατά την επεξεργασία (Hunter & Burge, 1987). Επίσης το μεγάλο ποσοστό απομονώσεων *Aeromonas* από τα παγωτά, στις αναπτυσσόμενες χώρες μπορεί να συσχετιστεί με τις κακές συνθήκες υγιεινής και την κακή ποιότητα των πρώτων υλών. Αντίθετα, σε έρευνες στις ανεπτυγμένες χώρες έχουν αναφερθεί πολύ χαμηλά ποσοστά απομονώσεων *Aeromonas* (λιγότερο από 5%) στα γαλακτομικά προϊόντα (Hunter & Burge, 1987).

Στελέχη *Aeromonas* έχουν απομονωθεί και από λαχανικά κατεψυγμένα και φρέσκα, με κυρίαρχο είδος, την *A. caviae*. Η πλειοψηφία των απομονώσεων είναι στελέχη εντεροτοξινογόνα και αιμολυτικά, και επειδή τα λαχανικά καταναλώνονται συνήθως ωμά, μπορούν να αποτελέσουν μεγάλο κίνδυνο μόλυνσης, ειδικά για άτομα σε ανοσοκαταστολή (Ghenghesh και συν., 2008). Τρόφιμα με όξινο pH, όπως οι χυμοί φρούτων μπορούν επίσης να μολυνθούν με είδη *Aeromonas*.

Απομόνωση εντεροπαθογόνων *Aeromonas* έχει γίνει και σε ακατέργαστες πηγές νερού, ειδικά στις αναπτυσσόμενες χώρες όπου η χρήση του ακατέργαστου νερού είναι συχνή και μπορεί να συμβάλλει στην μόλυνση του ανθρώπου (Ljungh & Wadstrom, 1985).

#### **4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ ΜΕ ΕΙΔΗ *AEROMONAS* SPP.**

##### **4.1 Εισαγωγή**

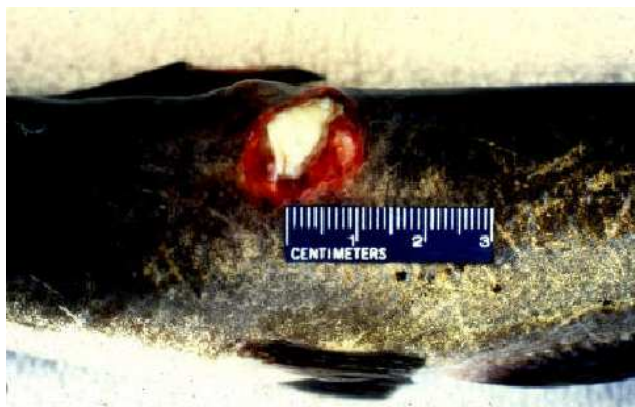
Ιστορικά, η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* θεωρείται το πιο σημαντικό παθογόνο βακτήριο των σολομοειδών γλυκού νερού, λόγω των σοβαρών οικονομικών απωλειών που προκαλεί. Η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* προκαλεί την τυπική δοθιήνωση των Σολομοειδών (Furunculosis), η οποία εκδηλώνεται με εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες, σοβαρή σηψαιμία, οίδημα, εξόφθαλμο, έλκη και υψηλή θνησιμότητα (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό δοθιήνων σε διάφορα σημεία του σώματος (χρόνια μορφή) και από σηψαιμία (οξεία μορφή) (Φώτης, 2003).

Τα άλλα υποείδη της *A. salmonicida* προκαλούν τις άτυπες μορφές της νόσου, που χαρακτηρίζονται κυρίως από δερματικά έλκη, με ή χωρίς σηψαιμία. Τα πιο γνωστά νοσήματα που σχετίζονται με τα άτυπα στελέχη *A. salmonicida* είναι η ερυθροδερματίτιδα του κυπρίνου (Carp Erythrodermatitis), η ελκωτική νόσος στην πέστροφα (Trout Ulcer Disease), η ελκωτική νόσος στο χρυσόψαρο (Goldfish Ulcer Disease), και η ελκωτική νόσος στο καλκάνι (Ulcer Disease of Flounder) *Platichthys*

*flesus*, ωστόσο τα άτυπα στελέχη φαίνεται να εμπλέκονται σε περισσότερες εξάρσεις νοσημάτων. Στα μη σολομοειδή είδη ψαριών, οι μολύνσεις με άτυπα στελέχη εκδηλώνονται συνήθως με την μορφή επιφανειακών δερματικών ελκών. Μακροσκοπικές και μικροσκοπικές μελέτες ωστόσο των ψαριών με έλκη δείχνουν πως και κάποια εσωτερικά όργανα μπορούν να προσβληθούν (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Τα κινητά είδη είδη *Aeromonas*, με τα είδη *A. hydrophila*, *A. caviae* και *A. sobria* να εμφανίζονται συχνότερα, προκαλούν στα ψάρια ένα πλήθος νοσημάτων, που είναι γνωστά και ως Σηψαιμία κινητών *Aeromonas* (Motile *Aeromonas* Septicemia-MAS), αιμορραγική σηψαιμία (Hemorrhagic Septicemia), ελκωτική νόσος (Ulcer Disease) ή νόσος των κόκκινων ελκών (Red-Sore Disease). Θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια και μολύνουν τα ψάρια κυρίως πιο θερμών νερών (>10°C), συνήθως την άνοιξη, κατά την διάρκεια επίδρασης παραγόντων που προκαλούν στρες (έλλειψη οξυγόνου, υψηλή ιχθυοπυκνότητα, αύξηση θερμοκρασίας, υποξία, αύξηση οργανικού φορτίου) και πτώση της άμυνας των ψαριών. Όταν τα ψάρια μολυνθούν εμφανίζουν συνήθως έλκη, αιμορραγική σηψαιμία, αιμορραγίες στα βράγχια, αιμορραγικά-κόκκινα πτερύγια και ουρά (tail-fin rot), εξόφθαλμο, οίδημα κ.ά. (Εικόνες 3, 4).

Το ακριβές αίτιο των νοσημάτων που προκαλούνται από τα κινητά είδη *Aeromonas* είναι περίπλοκο εξαιτίας της γενετικής, βιοχημικής και αντιγονικής ετερογένειας μεταξύ των ειδών. Συνεπώς τα κινητά είδη *Aeromonas* συχνά αναφέρονται σαν σύμπλεγμα οργανισμών που σχετίζονται με αιμορραγικές σηψαιμίες και έλκη στα ψάρια (Cirriano & Bullock, 2001).



**Εικόνα 3.** Αλλοιώσεις, έλκη που προκλήθηκαν από *Aeromonas hydrophila* στο δέρμα γατόψαρου των καναλιών (*Ictalurus punctatus*) (Cirriano, 2001).



**Εικόνα 4.** Αιμορραγίες και έλκη στο δέρμα από *Aeromonas hydrophila* σε American shad. (Cipriano, 2001).

#### **4.2 Συμπτώματα – Αλλοιώσεις Μολύνσεων με Κινητά Είδη *Aeromonas* (*A. hydrophila* group)**

Οι μολύνσεις με τα κινητά είδη *Aeromonas* αποτελούν το πιο συχνό βακτηριακό νόσημα των ψαριών γλυκού νερού (Noga, 2000). Τα είδη *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. bestiarum* και *A. veronii* θεωρούνται τα κυρίως αίτια της μόλυνσης με κινητά είδη *Aeromonas* (Motile *Aeromonas* Septicemia-MAS). Θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια και μολύνουν τα ψάρια (ιχθυοκαλλιέργειών και άγρια) κατά την διάρκεια επίδρασης συνήθως παραγόντων που προκαλούν στρες και πτώση της άμυνας των ψαριών. Τα κινητά είδη *Aeromonas* βρίσκονται παντού στο υδάτινο περιβάλλον, ενώ αποτελούν και μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας του εντέρου των ψαριών.

Η κλινική εκδήλωση των νοσημάτων που προκαλούνται από κινητά είδη *Aeromonas* εμφανίζεται συχνά στις ιχθυοκαλλιέργειες. Συνήθως η θνησιμότητα είναι χαμηλή (10% ή λιγότερο) και οι απώλειες μπορούν να εμφανιστούν μέσα σε 2 – 3 εβδομάδες. Σε αυτές τις περιπτώσεις η επίδραση παραγόντων, όπως το στρες έχουν ευαισθητοποιήσει τα ψάρια στα βακτήρια. Συνήθεις πηγές στρες είναι η κακή ποιότητα νερού, η υψηλή ιχθυοπυκνότητα και οι χειρισμοί, η μεταφορά και η κακή διατροφή.

Όσον αφορά τα συμπτώματα δεν υπάρχει κάποιο ειδικό φυσικό σύμπτωμα ή συμπεριφορά για τις μολύνσεις με κινητά είδη *Aeromonas*. Τα μολυσμένα ψάρια συχνά εμφανίζουν αλλοιώσεις στο δέρμα (εστίες με αιμορραγία και νέκρωση), μικρές



εστιακές αιμορραγίες στην βάση των πτερυγίων ή στο δέρμα, λήθαργο, αποχρωματισμό, διόγκωση κοιλιάς, θολερότητα οφθαλμών, εξόφθαλμο, αιμορραγίες στα βράγχια. Ψάρια με αιμορραγική σηψαιμία εμφανίζουν εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες. Σε εσωτερικά όργανα μπορούν να εμφανιστούν: υγρό και εξίδρωμα στην κοιλιακή κοιλότητα (ασκίτης), διογκωμένο ήπαρ και σπλήνα και διογκωμένα έντερα με παρουσία υγρού (Noga, 2000; Austin & Austin, 1999).

Τα κινητά είδη *Aeromonas* είναι ικανά να προκαλέσουν ποικίλες παθολογικές καταστάσεις που περιλαμβάνουν την οξεία, χρόνια και υποκλινική μόλυνση. Η σοβαρότητα του νοσήματος επηρεάζεται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως είναι οι λοιμογόνοι παράγοντες των βακτηρίων, το είδος και ο βαθμός του στρες σε ένα πληθυσμό ψαριών, η φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή, και ο βαθμός της γενετικής αντίστασης (Cirriano & Bullock, 2001).

Παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από μέλη του συμπλέγματος των κινητών ειδών *Aeromonas* περιλαμβάνουν τα έλκη στο δέρμα, την διάβρωση των πτερυγίων και της ουράς, την ερυθροδερματίτιδα, την αιμορραγική σηψαιμία (Cirriano & Bullock, 2001). Κινητά είδη *Aeromonas* μπορούν επίσης να απομονωθούν από δέρμα και εσωτερικά όργανα κλινικά υγιών ψαριών (Noga, 2000).



**Εικόνα 5.** Σοβαρή διάταση και συγκέντρωση υγρού στην κοιλιακή κοιλότητα χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) που προκλήθηκε από *Aeromonas hydrophila*. Διακρίνεται επίσης η όψη του δέρματος “washboard” λόγω της προεκβολής που εμφανίζουν τα λέπια από την επιφάνεια του σώματος (Cirriano, 2001).

Στην **οξεία** μορφή της νόσου, μια θανατηφόρος σηψαιμία μπορεί να συμβεί τόσο γρήγορα, που τα ψάρια πεθαίνουν πριν προλάβουν να αναπτύξουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις του νοσήματος. Τα προσβεβλημένα ψάρια μπορούν να εμφανίσουν εξόφθαλμο, ερυθρότητα του δέρματος, έλκη στο δέρμα και μια συσσώρευση υγρού στη βάση από τα λέπια (Faktorovich, 1969). Η κοιλιά μπορεί να διογκωθεί λόγω οιδήματος ενώ τα λέπια μπορούν να διογκωθούν και να προεξέχουν από το δέρμα (Εικόνα 5). Τα βράγχια εμφανίζονται αιμορραγικά συνήθως και έλκη αναπτύσσονται στο δέρμα. Οι Ogara και συνεργάτες, (1998) παρατήρησαν σοβαρές αλλοιώσεις στους οφθαλμούς και υψηλή θνησιμότητα σε πέστροφες ενός έτους ή και μεγαλύτερης ηλικίας που συνδέθηκαν με μια σοβαρή έξαρση σηψαιμίας από κινητά είδη *Aeromonas*. Αρχικά επηρεάστηκε το ένα μάτι, στην συνέχεια επεκτάθηκε στο άλλο μάτι προκαλώντας ρήξη οφθαλμού, τύφλωση και θάνατο.

Οι **χρόνιες** μολύνσεις με κινητά είδη *Aeromonas* εκδηλώνονται συνήθως με δερματικές αλλοιώσεις, έλκη με εστιακή αιμορραγία και φλεγμονή. Το δέρμα και η επιδερμίδα εμφανίζουν διαβρώσεις και ο υποκείμενος μυϊκός ιστός γίνεται νεκρωτικός (Huizinga και συν., 1979). Τα φλεγμονώδη κύτταρα συνήθως απουσιάζουν από το νεκρωτικό μυϊκό ιστό, ενώ η επιδερμίδα εμφανίζει υπερπλασία. Σε αυτό το στάδιο, η μόλυνση συνήθως έχει γίνει συστηματική και εστιακές αιμορραγίες (πετέχειες) μπορούν να εμφανιστούν στο περιτόναιο και στους μύες (Ventura & Grizzle, 1988).

**Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις.** Στην οξεία μορφή της νόσου τα ψάρια μπορεί να εμφανίσουν υπερπλασία του επιθηλίου στο πρόσθιο τμήμα του εντέρου, υπεραιμία στην λεπτή μήνιγγα του εγκεφάλου καθώς και θρόμβωση και φλεγμονή στο επιθήλιο, στην περιοχή γύρω από τον σκληρό και κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού (Fuentes & Perez, 1998). Μπορεί επίσης να υπάρχει σοβαρή φλεγμονή στα βράγχια, όπως φαίνεται από την διήθηση των λευκοκυττάρων και την διαστολή της κεντρικής φλέβας του σηραγγώδους πόρου (Grizzle & Kiryu, 1993). Οι Grizzle και Kiryu, (1993) επίσης παρατήρησαν ότι γατόψαρα με σηψαιμία από κινητά είδη *Aeromonas* εμφάνιζαν μεγεθυμένους πυρήνες στο βραγχιακό επιθήλιο και ότι υπήρχε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των αλλοιώσεων αυτών των βραγχίων και της σοβαρότητας των αλλοιώσεων του ήπατος και του παγκρέατος. Οι Rodriguez και συνεργάτες, (1993) επιπλέον παρατήρησαν μια αύξηση στη δράση της βακτηριακής ακετυλοχολινεστεράσης στον εγκεφαλικό ιστό των ετοιμοθάντων ψαριών.



Στις χρόνιες μολύνσεις, ψάρια με δερματικές αλλοιώσεις μόνο, μπορεί να εμφανίζουν αυξημένες ποσότητες λιποφουσκίνης και αιμοσιδερίνης στο ήπαρ και σπλήνα, χωρίς εστίες νέκρωσης σε άλλα εσωτερικά όργανα (Ventura & Grizzle, 1988).

Η συστηματική μόλυνση χαρακτηρίζεται από διάχυτη νέκρωση σε διάφορα εσωτερικά όργανα και την παρουσία μελανο-μακροφάγων στο αίμα (Ventura & Grizzle, 1988). Εσωτερικά, το ήπαρ και οι νεφροί αποτελούν όργανα στόχους της οξείας σηψαιμίας. Το ήπαρ εμφανίζεται συνήθως ωχρο ή με ένα πράσινο χρωματισμό με στικτές αιμορραγίες και εστίες νέκρωσης ενώ οι νεφροί μπορούν να διογκωθούν, να γίνουν εύθρυπτοι και να εμφανίσουν εστίες νέκρωσης. Αυτά τα όργανα προφανώς δέχονται την επίθεση των βακτηριακών τοξινών και χάνουν την δομική τους ακεραιότητα (Huizinga και συν., 1979). Η καρδιά και ο σπλήνας μπορούν να εμφανίσουν επίσης περιοχές νεκρωτικές. Τα ελλειψοειδή στον σπλήνα γίνονται συχνά κέντρα έντονης φαγοκυτταρικής δράσης από μακροφάγα. Οι Bach και συνεργάτες, (1978) παρατήρησαν παθολογικές αλλαγές στους σπλήνες ψαριών στα οποία έγινε έγχυση λοιμογόνου στελέχους *A. hydrophila*, ενώ ψάρια τα οποία μολύνθηκαν από το στόμα εμφάνισαν λίγες ή καθόλου αλλαγές στον σπλήνα. Έντονη φαγοκυτταρική δράση από μακροφάγα παρατηρήθηκε στον σπλήνα, ενώ τα φαγοκυτταρωμένα βακτήρια διαιρέθηκαν ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά και κατέστρεψαν το ενδοθήλιο και τα δικτυοκύτταρα των ελλειψοειδών. Το κατώτερο τμήμα του εντέρου και ο αυλός του, συχνά εμφανίζουν διόγκωση, φλεγμονή και αιμορραγία. Επιπλέον το έντερο είναι άδειο από τροφές και μπορεί να περιέχει ένα κίτρινο βλεννώδες υλικό.

#### 4.2.1 Μολύνσεις με *A. hydrophila*

Ανάμεσα στα κινητά και μεσόφιλα είδη *Aeromonas*, η *A. hydrophila* θεωρείται κυρίαρχο παθογόνο των ψαριών. Η *A. hydrophila* θεωρείται παθογόνος για ένα πλήθος ψαριών γλυκού νερού, σολομοειδή, χέλια, διακοσμητικά ψάρια, προκαλεί την τυπική νόσο των ψαριών χωμάτινων δεξαμενών (κυπρινοειδή, γατόψαρα) και περιστασιακά προσβάλλει και θαλασσινά ψάρια. Ειδικά σε ψάρια γλυκού νερού προκαλεί ένα πλήθος νοσημάτων που περιλαμβάνει τα: νέκρωση της ουράς (Tail rot), νέκρωση των πτερυγίων (Fin rot), νόσο των κόκκινων πτερυγίων (Red fin disease), επιζωοτικό ελκωτικό σύνδρομο (Epizootic ulcerative syndrome), και την Σηψαιμία κινητών *Aeromonas* (Motile *Aeromonas* Septicemia-MAS), αιμορραγική σηψαιμία

(Hemorrhagic Septicemia), ελκωτική νόσο (Ulcer Disease) ή νόσο των κόκκινων ελκών (Red-Sore Disease) (Austin & Adams, 1996).

Τα πολλά συνώνυμα του νοσήματος σχετίζονται με τις αλλοιώσεις που προκαλούνται από το βακτήριο, όπως οι αλλοιώσεις σηψαιμίας όταν τα βακτήρια ή βακτηριακές τοξίνες εισέρχονται στα εσωτερικά όργανα των ψαριών και τα έλκη στο δέρμα. Τα ψάρια μπορούν να εμφανίσουν διάφορα κλινικά συμπτώματα, από ξαφνικό θάνατο έως διαταραχές κολύμβησης, ωχρά βράγχια, οίδημα και έλκη στο δέρμα. Τα έλκη μπορούν να εμφανιστούν και στις δύο πλευρές του ψαριού και συνήθως περιβάλλονται από μια ερυθρή ζώνη. Προσβάλλονται επίσης εσωτερικά όργανα, όπως νεφροί, ήπαρ, σπλήνας, πάγκρεας. Τα συμπτώματα γενικότερα ποικίλλουν καθώς εξαρτώνται από έναν αριθμό παραγόντων, όπως: η λοιμογόνος ικανότητα του βακτηρίου, η ανοσία των ψαριών, η παρουσία παραγόντων στρες (Cirriano & Bullock, 2001).

Η νέκρωση των πτερυγίων εμφανίζεται συνήθως με ελκωτικές νεκρωτικές αλλοιώσεις στα πτερύγια (Noga, 2000). Η αιμορραγική σηψαιμία στα ψάρια γλυκού νερού χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών επιφανειακών αλλοιώσεων, που συχνά οδηγεί σε απόπτωση στα λέπια, αιμορραγίες στα βράγχια και στην εδρική περιοχή, έλκη, αποστήματα, αιμορραγίες και νεκρώσεις σε εσωτερικά όργανα (αιμοποιητικά κυρίως νεφρούς, σπλήνα), λήθαργο, εξόφθαλμο και οίδημα της κοιλιακής κοιλότητας (ύδρωπας). Τα ψάρια εμφανίζουν αιμορραγικά-κόκκινα πτερύγια και ουρά. Η θνησιμότητα είναι περιορισμένη, μπορεί όμως να διαρκέσει μεγάλο χρονικό διάστημα (εβδομάδες ή μήνες). Δευτερογενώς οι αλλοιώσεις μπορούν να επιμολυνθούν με μύκητες, όπως *Saprolegnia australis* και *Aphanomyces* spp. (Chang και συν., 2002). Η *Aeromonas hydrophila* προκαλεί επίσης μόλυνση και σε άλλα υδρόβια ζώα, όπως αμφίβια και ερπετά.

Για την *Aeromonas hydrophila* υπήρχε γενικά η άποψη ότι αποτελούσε δευτερεύων αίτιο στην νόσο των κόκκινων ελκών, ενώ πρωτεύων αιτιολογικός παράγοντας θεωρούνταν το βλεφαριδωτό πρωτόζωο *Epistylis* (Rogers, 1971). Οι Hazen και συνεργάτες, (1978) επανεξέτασαν τα αίτια της νόσου των κόκκινων ελκών και βρήκαν ότι η *A. hydrophila* βρίσκονταν στο 96% των αρχικών αλλοιώσεων των ψαριών, ενώ το *Epistylis* βρίσκονταν στο 35% αυτών των αλλοιώσεων. Αυτό αποδεικνύει ότι η *A. hydrophila* είναι πρωτεύων αιτιολογικός παράγοντας της νόσου των κόκκινων ελκών και το *Epistylis* είναι δευτερεύων παθογόνο αίτιο που προσβάλλει τις δερματικές αλλοιώσεις που προκαλούνται από τα βακτηριακά

πρωτεολυτικά ένζυμα (Cirriano & Bullock, 2001).

Όσον αφορά το επιζωοτικό ελκωτικό σύνδρομο (Epizootic ulcerative syndrome-EUS), αποτελεί ένα νόσημα των ψαριών που χαρακτηρίζεται από την παρουσία σοβαρών ανοιχτών δερματικών ελκών στο κεφάλι, στο σώμα και στην ραχιαία επιφάνεια των ψαριών. Τα ψάρια εμφανίζουν αιμορραγικές και νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, κοιλιά και θνησιμότητα. Η αιτιοπαθογένεια της νόσου είναι περίπλοκη, ενώ για μεγάλο χρονικό διάστημα ο αιτιολογικός παράγοντας του νοσήματος παρέμενε αδιευκρίνιστος (Rahman και συν., 2004). Στην αιτιοπαθογένεια της νόσου εμπλέκονται κυρίως τα είδη *A. hydrophila* και *A. sobria* καθώς και στελέχη βακτηρίων που ανήκουν στα *Vibrio* και *Plesiomonas* spp. Λόγω της αυξημένης συχνότητας της νόσου, της οικονομικής σημασίας της, των απωλειών που προκαλεί στα ψάρια και των πιθανών συνεπειών στην δημόσια υγεία, είναι πολύ σημαντικό να συνεχιστεί η έρευνα για τον ακριβή χαρακτηρισμό των αιτιολογικών παραγόντων του EUS (McGarey και συν., 1991).

### **4.3 Συμπτώματα–Αλλοιώσεις Μολύνσεων με μη Κινητά Είδη *Aeromonas salmonicida*.**

Η *A. salmonicida* αποτελεί ένα σύμπλεγμα παθογόνων βακτηρίων, τα οποία προκαλούν ένα πλήθος νοσημάτων σε διάφορα είδη ψαριών, κυρίως γλυκού νερού (Austin & Austin, 1999). Αρχικά θεωρούνταν νόσος μόνο των ψαριών γλυκού νερού αλλά με την εντατικοποίηση της εκτροφής των Σολομοειδών, εμφανίζεται και σε Σολομοειδή σε θαλάσσιο περιβάλλον, καθώς και σε άλλα είδη ψαριών υφάλμυρων και θαλασσινών νερών.

#### **4.3.1 Τυπική δοθιήνωση Σολομοειδών (Salmonid Furunculosis)**

Ιστορικά, η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* θεωρείται το πιο σημαντικό παθογόνο βακτήριο των σολομοειδών, λόγω των σοβαρών οικονομικών απωλειών που προκαλεί. Η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* προκαλεί την τυπική δοθιήνωση των Σολομοειδών (Furunculosis). Η νόσος είναι υποχρεωτικής δήλωσης και σύμφωνα με την νομοθεσία της Ε.Ε. από το 1992 ανήκει στην λίστα ΙΙΙ των νοσημάτων (Cirriano & Bullock, 2001) (Φώτης, 2003). Η δοθιήνωση αποτελεί ένα σοβαρό νόσημα που απειλεί την ανάπτυξη των σολομοειδών και κυπρινοειδών στις

ιχθυοκαλλιέργειες. Η απειλή αυτή μεγαλώνει καθώς το βακτήριο μπορεί να εντοπιστεί και σε ψάρια που είναι αφανείς ‘φορείς’, και μπορούν να μεταδώσουν το βακτήριο αλλά είναι δύσκολο να ανιχνευτούν (Austin & Austin, 1999). Προσβάλλονται ψάρια κάθε ηλικίας. Πιο ευαίσθητο είδος είναι ο σολομός του Ατλαντικού και πιο ανθεκτικό είδος φαίνεται να είναι η ιριδίζουσα πέστροφα (Noga, 2000).

Αν και η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* αποτελεί παθογόνο κυρίως των σολομοειδών, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός αναφορών μολύνσεων και σε άλλα είδη ψαριών μη σολομοειδή (κόι, χέλια, χρυσόψαρα κ.ά.). Οι μολύνσεις αυτές συμβαίνουν συνήθως κάτω από την επίδραση παραγόντων στρες (μόλυνση από παράσιτα, υποκείμενη νόσος) και δεν πρέπει να συγχέονται με τις μολύνσεις που προκαλούνται από τα άτυπα στελέχη *A. salmonicida*, οι οποίες εμφανίζονται σχεδόν σε όλα τα είδη ψαριών (Pedersen και συν., 1999).

Η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αιμορραγική σηψαιμία, όταν οι μικροοργανισμοί εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος προκαλώντας σηπτικό σοκ και οξεία θνησιμότητα σε ευαίσθητα είδη σολομοειδών. Τα συμπτώματα της αιμορραγικής σηψαιμίας ποικίλλουν από ήπια με ελάχιστες αιμορραγίες και δερματικές αλλοιώσεις μέχρι ξαφνικό θάνατο με υψηλή νοσηρότητα στις υπεροξείες περιπτώσεις. Ο τρόπος μόλυνσης, η παθολογία και ο βαθμός θνησιμότητας σχετίζονται άμεσα με την ποιότητα των περιβαλλοντικών παραμέτρων, την ηλικία και την έμφυτη ανοσοποίηση των ψαριών. Η νόσος εκδηλώνεται σε θερμοκρασία >16°C, συνήθως (20-22 °C) την άνοιξη, όταν αυξάνεται η θερμοκρασία του νερού ή σε περιόδους με ξαφνικές μεταβολές της θερμοκρασίας. Ωστόσο η δοθιήνωση μπορεί να εκδηλωθεί και σε πολύ νεαρά ιχθύδια σε θερμοκρασίες 2-4°C (Αγγελίδης, 2008). Τα ψάρια εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα σε 4 – 12 ημέρες μετά την έκθεση τους στο βακτήριο. Τα μολυσμένα ψάρια μπορούν να εμφανίσουν επιφανειακά ή βαθιά έλκη στο σώμα, εξόφθαλμο, διατεταμένο έντερο και αιμορραγίες στα πτερύγια. Η θνησιμότητα είναι συνήθως χαμηλή (<10%), αλλά μπορεί να αυξηθεί (μέχρι 30% στα ενήλικα, 50% στα ιχθύδια) κάτω από την επίδραση παραγόντων στρες, όπως χαμηλή ποιότητα νερού, υψηλή ιχθυοπυκνότητα, υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας, νιτρικών, νιτρικών αλάτων, υψηλά ποσά οργανικής ύλης κ.ά. Η νόσος εμφανίζεται συνήθως με τρεις μορφές: υπεροξεία, οξεία και χρόνια. Σε αυτές προστίθεται και η ασυμπτωματική μορφή, καθώς αφανείς φορείς που δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα είναι δυνατόν να μεταδώσουν το βακτήριο.

Οι **υπεροξειές** μολύνσεις εμφανίζονται πιο συχνά σε ιχθύδια, τα οποία αποκτούν σκούρο χρωματισμό και πεθαίνουν χωρίς να εμφανίσουν εξωτερικές αλλοιώσεις ή ενδεικτικά κλινικά συμπτώματα της νόσου (Cirriano & Bullock, 2001). Μόνο εξόφθαλμος μπορεί να παρατηρηθεί.

Οι **οξειές** μολύνσεις εμφανίζονται σε νεαρά και ενήλικα ψάρια που αποκτούν σκούρο χρωματισμό και εμφανίζουν αιμορραγίες στο δέρμα, στα βράγχια, στους μύες και στην βάση των πτερυγίων και της στοματικής κοιλότητας. Παρατηρούνται εσωτερικές αιμορραγίες στο εσωτερικό και στα όργανα της κοιλιακής κοιλότητας καθώς και στην καρδιά των μολυσμένων ψαριών. Τα ψάρια εμφανίζουν σπληνομεγαλία, ενώ στο ήπαρ παρατηρούνται αιμορραγίες ή εστιακή νέκρωση του παρεγχυματικού ιστού. Τα μολυσμένα ψάρια μπορεί να εμφανίσουν ελκωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, ακανόνιστη κολυμβητική συμπεριφορά, λήθαργο και ανορεξία (Εικόνα 6). Συνεπώς το στομάχι και το έντερο είναι συνήθως άδεια από περιεχόμενο, ενώ ο αυλός του εντέρου μπορεί να περιέχει επιθηλιακά κύτταρα σε απόπτωση, βλέννα και αίμα. Τα όργανα αναπαραγωγής είναι συνήθως αιμορραγικά και το έντερο έντονα συμφορημένο. Η θνησιμότητα συχνά είναι μεγάλη και εμφανίζεται 24-96 ώρες μετά από την μόλυνση (Scott, 1968).

Η **χρόνια** μορφή της νόσου συνήθως εμφανίζεται σε μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια που ήρθαν σε επαφή με τα είδη *Aeromonas salmonicida* κάποια στιγμή ή σε είδη τα οποία έχουν μεγαλύτερη έμφυτη αντίσταση στην μόλυνση με *Aeromonas salmonicida*. Μία ή περισσότερες αλλοιώσεις που μοιάζουν με δοθιήνες μπορούν να εμφανιστούν στο δέρμα των ψαριών, στους ραχιαίους σκελετικούς μύες συνήθως, ενώ τα έλκη που παρατηρούνται μπορούν να φτάσουν σε βάθος ως τους μύες. Οι δοθιήνες σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συγκέντρωσης των βακτηρίων στα τριχοειδή, όπου πολλαπλασιάζονται ταχύτατα καταστρέφοντας τα τοιχώματα των αγγείων (McCarthy & Roberts, 1980). Αρχικά εμφανίζονται φλεγμονώδεις εστίες στις οποίες σχηματίζονται οζίδια ή φλύκταινες για να εξελιχθούν σε δοθιήνες (Φώτης, 2003).

Είναι δυνατόν να παρατηρηθεί σκούρος χρωματισμός του δέρματος, εξόφθαλμος, τύφλωση, λήθαργος, ανορεξία, ωχρά βράγχια ή αιμορραγίες στα βράγχια, πετέχειες στην βάση των πτερυγίων και αποχρωματισμένα βράγχια. Εσωτερικά, τα χρόνια μολυσμένα ψάρια εμφανίζουν συμφόρηση σπλάχνων και περιτονίτιδα. Αιμορραγίες παρατηρούνται συνήθως στην περιοχή του πυλωρού, στο ήπαρ, σπλήνα ενώ οι νεφροί εμφανίζονται μαλακοί και εύθρυπτοι (McCarthy & Roberts, 1980). Η θνησιμότητα είναι σταθερή και χαμηλή. Η ύπαρξη δοθιήνων δεν

συναντάται πάντοτε ακόμη και κατά την χρόνια μορφή της νόσου, ενώ σε ένα πληθυσμό ψαριών είναι δυνατόν να εμφανιστούν και οξείες και χρόνιες μορφές της νόσου, ταυτόχρονα (Αγγελίδης, 2008).



**Εικόνα 6.** Έλκη βαθιά έως τον μυϊκό ιστό πέστροφας (*Salvelinus fontinalis*) που προκλήθηκαν από *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (Cipriano, 2001).

**Ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις.** Η ανάπτυξη των χαρακτηριστικών δοθινηών, δεν αποτελεί σταθερό εύρημα και σχετίζεται πιο συχνά με τις χρόνιες μολύνσεις. Οι δοθιήνες περιέχουν εξίδρωμα ιστών, νεκρούς ιστούς και μακροφάγα. Επιπλέον οι αλλοιώσεις αυτές της Δοθιήνωσης των ψαριών διαφέρουν από τον δοθιήνα που εμφανίζουν τα ομοιόθερμα σπονδυλωτά, που χαρακτηρίζεται από μια νεκρωτική μάζα πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων. Οι δερματικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν περιοχές με αιμορραγία και νέκρωση συνήθως στην βάση των πτερυγίων. Η εκφύλιση των μυϊκών ινών, η κατάτμηση των μυϊκών ινών και οι αιμορραγίες ολόκληρου του μυϊκού ιστού είναι εμφανείς μέσα στην οίδηματώδη αλλοίωση και οδηγούν σε μια ρευστοποιό νέκρωση του μυϊκού ιστού στις πιο σοβαρές αλλοιώσεις (Sakai, 1978).

Σε περιπτώσεις σηψαιμίας παρατηρούνται αιμορραγίες στους μύες και στα εσωτερικά όργανα, ήπαρ, περιτόναιο, πυλωρικά τυφλά, περισπλαχνικό λίπος, υπεραϊμία στο έντερο, πολτώδεις νεφροί, σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία (Φώτης, 2003). Αποικίες βακτηρίων μπορούν να βρεθούν σε όργανα στόχους και νεκρωτικές αλλοιώσεις. Η νέκρωση του καρδιακού ενδοθηλίου του κόλπου μπορεί να είναι η μόνη αλλοίωση σε υπεροξεία ή οξεία θνησιμότητα του γόνου (Noga, 2000).

Τα βακτήρια μπορούν επίσης να βρεθούν στο επιθήλιο των βραγχίων ή ανάμεσα στα δευτερογενή βραγχιακά νηματία (Bruno, 1986), όπου περιβάλλονται από μια μεμβράνη που είναι συνέχεια της βασικής μεμβράνης του βραγχιακού πετάλου. Ερευνητές, όπως: ο Bruno, (1986) και οι McArdle και συνεργάτες, (1986) παρατήρησαν πως η *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* μπορεί να προσβάλλει αρχικά τα βράγχια. Τα βακτήρια μπορούν επίσης να σχηματίσουν έμβολα στο βραγχιακό πέταλο, προκαλώντας περαιτέρω πολλαπλασιασμό των βραγχιακών επιθηλιακών κυττάρων και συγχώνευση των βραγχιακών νηματίων, εμποδίζοντας την κυκλοφορία του αίματος (Miyazaki & Kubota, 1975a).

#### 4.3.2 Ελκωτική Νόσος στην Πέστροφα (Trout Ulcer Disease)

Το 1934, ο Fish περιέγραψε μια ελκωτική νόσο στην πέστροφα, μεταξύ των σολομοειδών σε ένα εκκολαπτήριο στο Cortland (Νέα Υόρκη) η οποία πίστευε ότι είχε ομοιότητες, αλλά διαφοροποιούνταν από την κλινική εικόνα που παρατηρείται στην τυπική δοθιήνωση των σολομοειδών. Η νόσος εμφανίζονταν σαν εξωτερική βακτηριακή μόλυνση, χωρίς αλλοιώσεις στο ήπαρ, σπλήνα και νεφρούς, εκτός από το πίσθιο τμήμα του εντέρου που εμφανίζονταν συχνά υπεραιμικό (Snieszko, 1952).

Η εξωτερική κλινική παθολογία που παρατηρείται στις περιπτώσεις της ελκωτικής νόσου διαφέρει αρκετά από αυτή της τυπικής δοθιήνωσης των σολομοειδών. Κηλίδες πάνω στην επιδερμίδα αρχικά παχαίνουν και στην συνέχεια επεκτείνονται σχηματίζοντας λευκές 'τούφες' στην επιδερμίδα, διαμέτρου 0,5 έως 1,0 mm. Η ανάπτυξη αυτών των αλλοιώσεων συνεχίζεται μέχρι το υποκείμενο δέρμα διαβρωθεί και εμφανιστεί ένα έλκος σκούρο ερυθρού ή γκρι χρώματος. Τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται μέσα στα νεκρωτικά συγκρίματα του εκτεθειμένου υποεπιθηλιακού συνδετικού ιστού, χωρίς όμως να νεκρώνουν ή να εισχωρούν βαθιά μέσα στους μύες. Οι αλλοιώσεις επομένως παραμένουν επιφανειακές και αναπτύσσονται από έξω προς τα μέσα. Αντίθετα οι δοθιήνες της τυπικής δοθιήνωσης των σολομοειδών αναπτύσσονται από μέσα προς τα έξω και εισχωρούν βαθιά μέσα στους μύες. Έλκη παρατηρούνται επίσης στα πτερύγια, στην γνάθο ή στην στοματική κοιλότητα, όπου ο μαλακός ιστός που καλύπτει το πάνω μέρος της στοματικής κοιλότητας διαβρώνεται (Wolf, 1938).

Οι Snieszko και Friddle, (1948) αρχικά απομόνωσαν και οι Snieszko και συνεργάτες, (1950) περιέγραψαν αρχικά το βακτήριο *Hemophilus piscium* σαν το

αίτιο της ελκωτικής νόσου στην πέστροφα. Οι Paterson και συνεργάτες, (1980) αργότερα πρότειναν πως αυτό το βακτήριο ήταν στην πραγματικότητα ένα άτυπο στέλεχος της *A. salmonicida* αποδεικνύοντας με μελέτες υβριδισμού του DNA πως το *H. piscium* είχε παρόμοιες ιδιότητες με την *A. salmonicida subsp. achromogenes*. Οι Thornton και συνεργάτες, (1999) επίσης έδειξαν ότι η ομοιότητα στην SSU rRNA αλληλουχία γονιδίων μεταξύ των *H. piscium* και *A. salmonicida subsp. salmonicida* ήταν 99.6%. Αυτό επιβεβαιώνει πως το αίτιο της ελκωτικής νόσου είναι ένα άτυπο στέλεχος *A. salmonicida*, η *A. salmonicida subsp. achromogenes*.

### 4.3.3 Ελκωτική Νόσος στο χρυσόψαρο (Goldfish Ulcer Disease)

Η ελκωτική νόσος στο χρυσόψαρο περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mawdesley-Thomas (1969), που ονόμασε την κατάσταση δοθιήνωση των χρυσόψαρων επειδή στελέχη *A. salmonicida* απομονώθηκαν από αλλοιώσεις του δέρματος. Ωστόσο, ο υπεύθυνος οργανισμός σε αυτές τις μελέτες ήταν στην πραγματικότητα ένας τυπικός βιότυπος της *A. salmonicida subsp. salmonicida*. Πολλοί ερευνητές θεώρησαν αρχικά πως το αίτιο της νόσου ήταν μύκητας (oomycete), ή βακτήριο (*Flavobacterium columnarae*), ή πρωτόζωο (*Epistylis longicorpi*). Οι Elliott και Shotts, (1980) καθιέρωσαν σαν αίτιο της νόσου ένα άτυπο στέλεχος *A. salmonicida*.

Ο ρόλος των εξωπαράσιτων στην δημιουργία εισόδου για την *A. salmonicida* δεν είναι ξεκάθαρος, αν και η *A. salmonicida* προτιμά να προσκολλάται στον βλεννογόνο και σε νεκρά ή κατεστραμμένα κύτταρα του δέρματος. Η γενική κατάσταση των χρυσόψαρων ποικίλλει, τα ψάρια εμφανίζουν δερματικά έλκη ποικίλλου μεγέθους και βάθους, σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος (Cirriano & Bullock, 2001). Κάποια από τα έλκη μπορούν να μολυνθούν δευτερογενώς με *Saprolegnia* spp. (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Οι αρχικές μολύνσεις εμφανίζονται σαν λευκοί πολλαπλασιασμοί κυττάρων στο επιθήλιο των ψαριών. Αυτές οι αλλοιώσεις αναπτύσσουν περιφερικά αιμορραγίες κάτω από τα λέπια και καθώς οι αλλοιώσεις εξελίσσονται, τα λέπια στην προσβεβλημένη περιοχή αποπίπτουν, το δέρμα γίνεται νεκρωτικό και οι μυικές ίνες εκφυλίζονται. Επίσης μέσα σε 24 – 48 ώρες υπάρχει μια αξιοσημείωτη διήθηση από λευκοκύτταρα στις αλλοιώσεις. Σε αντίθεση με την τυπική δοθιήνωση των σολομοειδών, η διήθηση των λευκοκυττάρων παραμένει ορατή για μια περίοδο 21 ημερών και αποτελείται από βασεόφιλα



ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα και μακροφάγα. Δεν υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι η *A. salmonicida* φαγοκυτταρώνεται από τα λευκοκύτταρα. Τα ψάρια μπορούν να εμφανίσουν λήθαργο, ανορεξία, ανωμαλία στην κολύμβηση και πιθανά σηψαιμία (Cipriano & Bullock, 2001).

#### 4.3.4 Ερυθροδερματίτιδα του Κυπρίνου (Carp Erythrodermatitis)

Η ερυθροδερματίτιδα του κυπρίνου εμφανίζεται ως υποξεία έως χρόνια δερματική νόσος σε θερμοκρασίες από 4°C έως 30°C. Κλινικά συμπτώματα εκδηλώνονται συνήθως σε θερμοκρασία >22°C, το καλοκαίρι, ενώ στους 10-12°C η νόσος είναι ασυμπτωματική (Pol και συν., 1980). Προσβάλλονται κυπρίνοι κάθε ηλικίας (Φώτης, 2003). Αυτή η νόσος αρχικά συνδέονταν με το οίδηματικό σύνδρομο του κυπρίνου (Carp Dropsy Syndrome) μέχρι που ο Fijan, (1972) έδειξε ότι το οίδηματικό σύνδρομο του κυπρίνου περιλάμβανε δύο μολύνσεις: την ανοιξιάτικη ιαμία του κυπρίνου (*Rhabdovirus carpio*) και την ερυθροδερματίτιδα του κυπρίνου. Η νόσος σήμερα είναι γνωστό πως οφείλεται σε άτυπα στελέχη *A. salmonicida*, με κύριο αίτιο το βακτήριο *A. salmonicida* subsp. *nova* (Bootsma και συν., 1977).

Στην εκδήλωση της νόσου συμβάλλουν παράγοντες στρες, αλλά και κινητά είδη *Aeromonas*, *A. hydrophila* και *A. sobria* (Φώτης, 2003), που ανήκουν στην φυσική βακτηριακή χλωρίδα των επιφανειακών νερών. Ωστόσο και άλλα είδη βακτηρίων μπορούν να προκαλέσουν εξωτερικές αλλοιώσεις στον κυπρίνο μακροσκοπικά όμοιες με αυτές που προκαλούνται από τα άτυπα στελέχη *A. salmonicida* (Schultz, 1980). Προσβάλλονται όλα τα είδη κυπρινοειδών και είδη ενυδρείων (χρυσόψαρα) καθώς και τα χέλια. Σοβαρά προβλήματα σε εκτροφές κυπρίνου έχουν καταγραφεί στην κεντρική και ανατολική Ευρώπη. Στον ελλαδικό χώρο περιστατικά της νόσου εμφανίζονται στα μέσα του χειμώνα, αρχές άνοιξης, όταν παρατηρηθούν μεταβολές στις φυσικοχημικές παραμέτρους του νερού, έλλειψη τροφής και συνωστισμός ψαριών σε ορισμένα σημεία των δεξαμενών ή λιμναίων οικοσυστημάτων (Φώτης, 2003).

Τα ψάρια εμφανίζουν δερματικά έλκη, σε όλο το σώμα, συνήθως στην πλευρική επιφάνεια του σώματος, εκτός από το κεφάλι. Οι κλινικές ενδείξεις της νόσου γίνονται εμφανείς σαν μικρές φλεγμονώδεις αιμορραγικές περιοχές στο δέρμα και στα πτερύγια που εξελίσσονται σε λευκές διαβρώσεις που περιβάλλονται από μια στενή κόκκινη ζώνη και σκούρα χρωστική. Η έντονη αιμορραγία στο δέρμα, ιδίως

στην βάση των ζυγών πτερυγίων, ακολουθείται από νέκρωση της επιδερμίδας με έντονη διήθηση από πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα. Παρατηρείται οίδημα στο δέρμα και στα λέπια, ενώ αιμορραγίες εμφανίζονται γύρω από τις φλέβες προκαλώντας μια επίμονη φλεγμονώδη διήθηση που επεκτείνεται στην υποδερμίδα και τον υποκείμενο μυϊκό ιστό. Αιμορραγικά έλκη εμφανίζονται στο κέντρο των νεκρωτικών περιοχών (Gayer και συν., 1980). Τα έλκη που εντοπίζονται συνήθως στην ραχιαία επιφάνεια και στη βάση του ουραίου πτερυγίου μπορούν να οδηγήσουν σε διάτρηση του δέρματος και να επεκταθούν εσωτερικά ως το έντερο, ενώ αιμορραγίες μπορούν να εμφανιστούν σε εσωτερικά όργανα και μύες (Εικόνα 7). Η θνησιμότητα μπορεί να φτάσει στο 20-40% ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος, ενώ πιθανή είναι και η αυτοϊαση.

Οι κυπρίνοι μπορούν να εμφανίσουν επίσης εξόφθαλμο, σκούρο χρωματισμό δέρματος, αιμορραγία και αναιμία στα βράγχια, διόγκωση της κοιλιάς. Σε πιο προχωρημένες περιπτώσεις μπορεί να εμφανιστούν διίδρωμα μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα και οιδηματικά εσωτερικά όργανα (Fijan, 1972).

Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει την ανοιξιιάτικη ιαιμία του κυπρίνου και άλλες άτυπες βακτηριακές μολύνσεις. Νεκροτομικά παρατηρούνται τα χαρακτηριστικά έλκη στο δέρμα τα οποία συχνά διατρύπουν τα τοιχώματα της κοιλιακής κοιλότητας και ιστοπαθολογικά νεκρωτικές εστίες στα περισσότερα εσωτερικά όργανα (Φώτης, 2003). Το υπεύθυνο βακτήριο εντοπίζεται στις αλλοιώσεις μεταξύ δέρματος και επιδερμίδας, αλλά δεν μπορεί να απομονωθεί από τους νεφρούς μολυσμένων κυπρίνων (Bootsma και συν., 1977).



**Εικόνα 7.** Δερματικό έλκος σε κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) ενδεικτικό της παθολογίας στην Ερυθροδερματίτιδα του κυπρίνου που προκαλείται από την *A. salmonicida* subsp. *nova* (Bootsma, 1977).

#### 4.3.5 Μολύνσεις με άτυπα στελέχη *A. salmonicida*

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα περιστατικά μόλυνσης ψαριών γλυκού και θαλασσινού νερού από άτυπα στελέχη *A. salmonicida* αυξάνονται συνεχώς (Austin & Austin, 1999). Τα κλινικά και παθολογικά συμπτώματα των μολύνσεων με άτυπα στελέχη *A. salmonicida* μπορεί να ποικίλλουν, καθώς επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες όπως το περιβάλλον, τους λοιμογόνους παράγοντες του βακτηρίου και την αντίδραση του ξενιστή (Karatas και συν., 2005; Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998). Υψηλή θνησιμότητα που προκαλείται από άτυπα στελέχη *A. salmonicida* έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς άγριων μη σολομοειδών ψαριών και καλλιεργούμενων σολομοειδών, παρόλο που η συσχέτιση μεταξύ της θνησιμότητας στους άγριους πληθυσμούς ψαριών και στα άτυπα στελέχη *A. salmonicida* δεν μπορεί να εκτιμηθεί πάντα με ακρίβεια (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Ωστόσο ο αριθμός των δημοσιευμένων αναφορών νοσημάτων που σχετίζονται με άτυπα στελέχη έχει αυξηθεί σημαντικά κατά την τελευταία δεκαετία (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Τα περισσότερα από τα στελέχη που απομονώνονται αναγνωρίζονται σαν άτυπα *A. salmonicida* και πολύ λίγα από αυτά ανήκουν σε κάποιο από τα γνωστά είδη (subsp. *achromogenes*, subsp. *masoucida*, και subsp. *smithia*) (Holt και συν., 1994). Τα νοσήματα που προκαλούνται από τα άτυπα στελέχη αναφέρονται συνήθως σαν ελκωτική νόσος ή “άτυπη δοθιήνωση” (Snieszko και συν., 1950) σε αντίθεση με την κλασσική δοθιήνωση που προκαλείται από τα τυπικά στελέχη *Aeromonas salmonicida*. Προσβάλλονται διάφορα είδη ψαριών όπως χρυσόψαρα, κυπρίνοι, χέλια, σολομοειδή και ψάρια θάλασσας κυρίως στην Ευρώπη και Ιαπωνία.

Οι μολύνσεις με τα άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida*, στα **μη σολομοειδή** ψάρια εκδηλώνονται με την μορφή δερματικών ελκών και αλλοιώσεων συνήθως στην βάση των πτερυγίων, χωρίς γενικευμένη σηψαιμία. Τα δερματικά έλκη, αρχίζουν από μικρές αιμορραγίες στο δέρμα και εξελίσσονται σε πολλαπλές δερματικές αλλοιώσεις. Σε προχωρημένα στάδια τα βακτήρια μπορούν να βρεθούν στο αίμα και σε εσωτερικά όργανα. Τα ψάρια μπορούν να εμφανίσουν λήθαργο, ανορεξία, σκούρο χρωματισμό, αδυναμία κολύμβησης, θνησιμότητα (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998; Karatas και συν., 2005). Στην αιτιοπαθογένεια των νοσημάτων από άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida* είναι δυνατόν να εμπλέκονται και άλλα παθογόνα, όπως η *A. hydrophila*, το *Vibrio anguillarum* ή άλλα ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Εκτός από τα δερματικά έλκη, τα άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida* έχουν συνδεθεί με διαβρώσεις στο στόμα έως παραμόρφωση των σιαγόνων των μη σολομοειδών (Dalsgaard & Paulsen, 1986). Επιπλέον, τα ψάρια μπορούν να εμφανίσουν αιμορραγίες και διάβρωση των πτερυγίων, νέκρωση της ουράς, ωχρά βράγχια και αλλοιώσεις στους οφθαλμούς (Mawdesley-Thomas, 1969). Υπερπλασία ή πολλαπλασιασμός των βραγχίων που μερικές φορές περιέχουν αποικίες βακτηρίων έχουν επίσης αναφερθεί (Morrison και συν., 1984; Mawdesley-Thomas, 1969). Σε ιστολογικές μελέτες μπορούν να παρατηρηθούν παραμόρφωση στα λέπια, υπεραιμία, αιμορραγία, διήθηση με λευκοκύτταρα και παρουσία ινοβλαστικών κυττάρων, σχηματίζοντας κοκκιώδη ιστό στο δέρμα όπως και στους νεφρούς και σπλήνα. Στα μη σολομοειδή ψάρια επίσης υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για αλλοιώσεις σε εσωτερικά όργανα. Συμφορημένοι και σκούροι νεφροί, σπλήνας και βράγχια έχουν βρεθεί σε χρυσόψαρα. Επιπλέον, μεγέθυνση των ηπατοκυττάρων, εκφύλιση στους νεφρούς, συμφόρηση και σε μερικές περιπτώσεις υπερπλασία στην σπλήνα έχουν παρατηρηθεί (Mawdesley-Thomas, 1969).

Στο Αμερικάνικο, Ευρωπαϊκό και Ιαπωνέζικο χέλι, τα άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida* προκαλούν αλλοιώσεις στο δέρμα και έλκη, νέκρωση και οίδημα των ιστών στο κεφάλι. Το νόσημα στα χέλια έχει επίσης αναφερθεί σαν ελκωτική νόσος κεφαλής (head ulcer disease). Μια αρχική διήθηση από μονοπύρηνια κύτταρα συνήθως παρατηρείται στα έλκη, ενώ πολλές αλλοιώσεις εμφανίζουν εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου, συμβάλλοντας στο οίδημα των ιστών (Noga, 2000; Noga & Berkhoff, 1990).

Στα **σολομοειδή** διαφορετικά άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida* συνδέονται με διαφορετικά παθολογικά μακροσκοπικά συμπτώματα. Τα ψάρια μπορούν να εμφανίζουν λήθαργο, ανορεξία, σκούρο χρωματισμό, αδυναμία κολύμβησης, αναπνευστική δυσφορία, διαβρώσεις στα πτερύγια, αιμορραγίες και έλκη στο δέρμα και αλλοιώσεις στους μύες (Groman και συν., 1992). Ιστολογικά, διήθηση κυττάρων, αλλοιώσεις εκφύλισης στα επιθηλιακά κύτταρα και διαταραχή της δομής των ιστών έχουν παρατηρηθεί σε έλκη στην ιριδίζουσα πέστροφα (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Τα βράγχια μπορεί να είναι ωχρά με αιμορραγίες. Η εξέλιξη της νόσου μπορεί να είναι υπεροξεία, οξεία, υποκλινική ή χρόνια όπως και στην τυπική δοθιήνωση (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998). Αλλοιώσεις σε εσωτερικά όργανα σπάνια εμφανίζονται. Στα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών έχει αναφερθεί υψηλή θνησιμότητα (60%) σε κάποιες περιπτώσεις (Groman και συν.,

1992), αν και γενικότερα η θνησιμότητα παραμένει σε χαμηλά επίπεδα. Ιστοπαθολογικά, παρατηρούνται αποικίες βακτηρίων στο δέρμα, βράγχια, σπλήνα, νεφρούς, καρδιά, εγκέφαλο, ήπαρ με εστιακή νέκρωση κυττάρων (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998).

#### 4.3.6 Ελκωτική νόσος στο καλκάνι (Ulcer Disease of Flounder)

Σε καλκάνια που προσβάλλονται από άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida*, εκδηλώνοντας την ελκωτική νόσο (UDF), τα έλκη εμφανίζονται ερυθρά σκούρα, στρογγυλά και επιφανειακά (Wiklund & Bylund, 1993). Το μέγεθος των ελκών ποικίλει από μικρές αλλοιώσεις (1-2 mm) έως μεγάλες διαβρωμένες περιοχές (10-20 mm διάμετρο). Η ανάπτυξη των ελκών διακρίνεται σε 3 κυρίως στάδια: αρχικά μικρή αιμορραγία στο δέρμα που αναπτύσσεται σε μια λευκή αλλοίωση η οποία περιβάλλεται από μια κόκκινη ζώνη αιμορραγικού φλεγμονώδους ιστού. Τελικά αναπτύσσονται έλκη που διαβρώνουν το δέρμα και εκθέτουν τους υποκείμενους μύες (Wiklund & Bylund, 1993). Δυστυχώς, δεν υπάρχουν πολλές αναφορές μέχρι σήμερα, με ιστολογικές μελέτες δερματικών ελκών σε καλκάνια.

#### 4.3.7 Μολύνσεις άλλων ζωικών οργανισμών με είδη *Aeromonas*

Τα είδη *Aeromonas* μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις και επιζωοτιολογίες σε ένα πλήθος ζωικών οργανισμών.

Η *A. hydrophila* εκτός από τα ψάρια, μπορεί να προσβάλλει αμφίβια, βάτραχους, καθώς και φίδια και άλλα ερπετά (χελώνες) (Carlton & Hunt, 1978). Στους βάτραχους προκαλεί ένα νόσημα που λέγεται νόσος των κόκκινων ποδιών (red leg disease) (Carlton & Hunt, 1978). Οι βάτραχοι όταν προσβληθούν εμφανίζουν έντονες εσωτερικές αιμορραγίες στους μύες των ποδιών κυρίως που συχνά καταλήγουν στον θάνατο.

Στους βάτραχους και στα άλλα αμφίβια, οι μολύνσεις με *A. hydrophila* προκαλούν διαστολή των τριχοειδών στην κοιλιακή επιφάνεια των ποδιών και στην κοιλιά, δίνοντας τον χαρακτηριστικό κόκκινο χρωματισμό που είναι η πηγή του ονόματος του νοσήματος (red leg). Εξάρσεις σηψαιμίας από *Aeromonas* σε βάτραχους και ψάρια θερμών νερών, συνήθως συμβαίνουν την άνοιξη και σχετίζονται με αύξηση της θερμοκρασίας του νερού. Η αντίσταση στο νόσημα

μειώνεται σε αυτή την φάση, επειδή οι υδρόβιοι οργανισμοί είναι συχνά αναιμικοί και εμφανίζουν μια σημαντική μείωση στις πρωτεΐνες ορού ως αποτέλεσμα περιόδων αστίας κατά την διάρκεια του χειμώνα. Στα φίδια, οι μολύνσεις με *A. hydrophila* μπορούν να εμφανιστούν ως:

- Οξεία σηψαιμία, με λήθαργο και σπασμούς, που συνδέεται με αιμορραγίες στους πνεύμονες και στο επικάρδιο και αιμορραγική εντερίτιδα.
- Σοβαρή πνευμονία, κάποιες φορές πολύ μεταδοτική των ζώων, με υψηλή θνησιμότητα.
- Ελκωτική στοματίτιδα, με παρουσία αφρώδους εξιδρώματος στο στόμα και και δυσλειτουργία της πέψης (Carlton & Hunt, 1978).

Όσον αφορά τα θηλαστικά, τα ακόλουθα κλινικά περιστατικά έχουν παρατηρηθεί σποραδικά: σήψη στους σκύλους (Pierce και συν., 1973), πνευμονία και δερματίτιδα στα δελφίνια (Cusick & Bullock, 1973), σηψαιμία στις φώκιες, αποβολές και κυστίτιδα στις αγελάδες, διάρροια σε χοιρίδια (Janda & Abbott, (1998), σηψαιμία σε κουνέλια (Paniagua και συν., 1998).

## 5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

### 5.1 Απομόνωση – Ταυτοποίηση Κλασσικές μέθοδοι απομόνωσης

Μεγάλη σημασία θα πρέπει να δοθεί επίσης σε τρία κύρια σημεία για τον έλεγχο των μολύνσεων με *Aeromonas* spp., α) στην διάγνωση, β) στην αντιμετώπιση και γ) στην πρόληψη. Είναι σημαντικό ψάρια που έχουν μολυνθεί με *Aeromonas* να μεταφερθούν άμεσα σε ένα διαγνωστικό εργαστήριο για την απομόνωση, ταυτοποίηση και επιβεβαίωση της μόλυνσης και την πραγματοποίηση αντιβιογράμματος. Είναι πολύ πιθανό, η μόλυνση με *Aeromonas* στα ψάρια να εμφανίζεται δευτερογενώς, καθώς αρκετά βακτήρια (*Vibrio* spp., *Flexibacter* spp., κ.ά.) μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στο δέρμα των ψαριών και από τα οποία θα πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση.

Η αρχική διάγνωση των τυπικών και μη τυπικών στελεχών της *A. salmonicida* από κλινικά ασθενή ή ετοιμοθάνατα ψάρια βασίζεται αρχικά στις κλινικές ενδείξεις του νοσήματος, τον τύπο και τον αριθμό των ειδών που μολύνονται, και το κλινικό ιστορικό του νοσήματος στον πληθυσμό των ψαριών. Η διάγνωση των μολύνσεων από τα μη τυπικά στελέχη της *A. salmonicida* φαίνεται να είναι πιο δύσκολη από την

διάγνωση της τυπικής δοθιήνωσης επειδή τα κλινικά συμπτώματα διαφέρουν και οι δερματικές αλλοιώσεις συχνά επιμολύνονται με ευκαιριακά βακτήρια και μύκητες.

Όμοια η αρχική διάγνωση των κινητών ειδών *Aeromonas*, όπως η *A. hydrophila* μπορεί να βασιστεί στο είδος του ψαριού που προσβάλλεται, στο ιστορικό νοσημάτων αυτών των ψαριών, και στην παρουσία κλινικών συμπτωμάτων του νοσήματος. Ωστόσο εξαιτίας των διάφορων κλινικών συμπτωμάτων, η διάγνωση του νοσήματος για να είναι ακριβής, δεν μπορεί να βασιστεί μόνο στα κλινικά συμπτώματα και νεκροτομικά ευρήματα των ψαριών. Η οριστική διάγνωση απαιτεί απομόνωση και ταυτοποίηση του υπεύθυνου βακτηρίου (Austin & Austin, 1987).

## 5.2 Δειγματοληψία

Η λήψη δειγμάτων σε περισσότερα από ένα όργανα αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχούς απομόνωσης του βακτηρίου. Ζωντανά ή ημιθανή ψάρια, πρόσφατα μολυσμένα, που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία είναι τα καλύτερα δείγματα για απομόνωση.

Δείγματα μπορούν να ληφθούν από δερματικές αλλοιώσεις, βράγχια, δερματική βλέννα και έλκη, από το πρόσθιο τμήμα του νεφρού, το ήπαρ, καρδιά, σπλήνα, έντερο, υπό άσηπτες συνθήκες. Συγκεκριμένα στα ψάρια που εμφανίζουν έλκη, υλικό λαμβάνεται από την περιφέρεια των αλλοιώσεων. Συχνά εμφανίζονται προβλήματα επιμόλυνσης στα τρυβλία άγαρ με δείγματα από εξωτερικά όργανα και το έντερο. Δείγματα από το δέρμα και την βλέννα των βραγχίων φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστα και έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να ληφθούν χωρίς να θανατωθεί το ψάρι (Bernoth, 1997).

Για την διάγνωση ασυμπτωματικών μολύνσεων συνιστάται να λαμβάνονται δείγματα από τα βράγχια, τους νεφρούς και το έντερο. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η λήψη δειγμάτων βλέννας είναι χρήσιμη για την ανίχνευση της *A. salmonicida* από ασυμπτωματικά ψάρια, δεν απαιτεί την θανάτωση των ψαριών ενώ το παθογόνο μπορεί να ανιχνευτεί στα αρχικά στάδια της μόλυνσης επιτρέποντας άμεση εφαρμογή θεραπείας (Cipriano, 1997).

Η καλύτερη μέθοδος διάγνωσης στα ψάρια είναι μια θετική καλλιέργεια βακτηρίων από μολυσμένα όργανα ή αλλοιώσεις και επιβεβαίωση με ιστοπαθολογικές εξετάσεις των χαρακτηριστικών αλλοιώσεων. Η αναγνώριση των

βακτηριακών στελεχών στα περισσότερα ιχθυοπαθολογικά εργαστήρια, βασίζεται επίσης στην φαινοτυπική μέθοδο ταυτοποίησης και στα βιοχημικά χαρακτηριστικά.

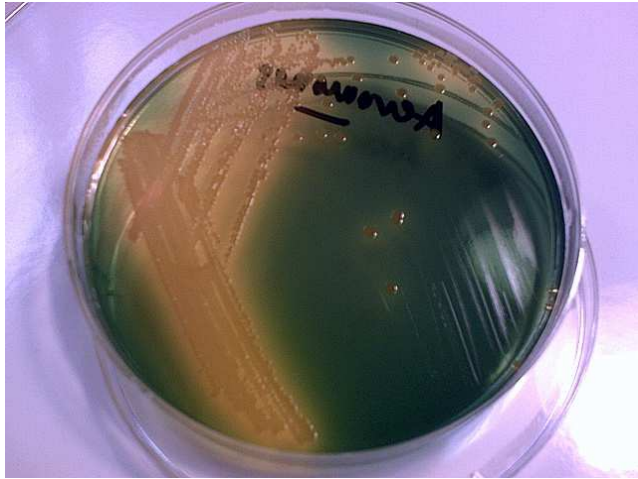
Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, οι παραδοσιακές μέθοδοι διάγνωσης, όπως είναι οι ιστολογικές εξετάσεις και η μικροβιολογική απομόνωση σε υποστρώματα με καλλιέργεια των βακτηρίων, συμπληρώνονται από τις ανοσολογικές και μοριακές τεχνικές, οι οποίες είναι πιο γρήγορες και ευαίσθητες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση της αρχικής διάγνωσης (Adams, 2004).

### 5.3 Απομόνωση των *Aeromonas* με καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα

Τα είδη *Aeromonas* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται καλά σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα όπως είναι τα: Trypticase Soy agar (TSA), Brain heart infusion agar (BHIA), Tryptone Soy broth (TSB), Trypticase soy blood agar (BBL), MacConkey aeromonas dextrin agar (AD), Thiosulphate citrate bile salts sucrose agar (TCBS), Nutrient agar, Nutrient broth, Columbia agar, blood agar, Coomassie Brilliant Blue agar (CBB), Rimler-Shotts agar (R-S) (Rahman και συν., 2004; Minana-Galbis και συν., 2002; Cipriano & Bullock, 2001; Shotts & Rimler, 1973) (Εικόνα 8).

Σε άριστες συνθήκες αναπτύσσονται σε pH (ιδανικό 5.5-9.0), σε 24-48 ώρες, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από 0°C έως 45°C για μερικά είδη, με ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης 22°C - 35°C (Ghenghesh και συν., 2008). Συγκεκριμένα η *A. salmonicida* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία πάνω από 30°C. Στα στερεά θρεπτικά υλικά όπως το θρεπτικό άγαρ TSA (χρησιμοποιείται πιο συχνά), οι αποικίες των ειδών *Aeromonas* εμφανίζονται στρογγυλές, λείες, ημιδιαφανείς έως διαφανείς, συνήθως με κίτρινο κρεμώδες χρώμα, διαμέτρου 2-3 mm (Austin & Austin, 1999), με παραγωγή ή όχι χρωστικής (Miñana-Galbis και συν., 2004). Για τις καθαρές καλλιέργειες λαμβάνεται στην συνέχεια μια καθαρή, καλοσηματισμένη αποικία η οποία επωάζεται σε TSA, 25-28°C (Chang και συν., 2002). Το μέγεθος και η μορφή των κυττάρων καθώς και η διάταξη των μαστιγίων μπορούν να καθοριστούν επίσης με την παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.





**Εικόνα 8.** Αποικίες *Aeromonas* spp. σε TCBS άγαρ (<http<sup>18</sup>//images.google.gr>)

### 5.3.1 Καλλιέργεια τυπικών και άτυπων στελεχών *A. salmonicida*

Η *A. salmonicida* απομονώνεται εύκολα σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα (TSA) ή (BHIA), σε 24-48 ώρες, στους 20-25°C. Μετά από 24 ώρες συνήθως, αναπτύσσονται οι αποικίες του βακτηρίου οι οποίες εμφανίζουν μια διάχυτη καφέ χρωστική (<http<sup>10</sup>>) καθώς η *A. salmonicida* αποδομεί την τυροζίνη και παράγει καφέ χρωστική. Τα άτυπα στελέχη της *Aeromonas salmonicida* συνήθως δεν παράγουν καφέ χρωστική. Αν δεν αναπτυχθούν αποικίες σε 96 ώρες, τα δείγματα θεωρούνται αρνητικά για *A. salmonicida*. Στην συνέχεια γίνονται ανακαλλιέργειες για να προκύψουν καθαρές αποικίες βακτηρίων.

Η ταυτοποίηση της *A. salmonicida* βασίζεται κυρίως στην ικανότητά της να παράγει μια διάχυτη καφέ χρωστική όταν αναπτύσσεται σε (TSA). Ωστόσο, η χρήση αυτού του χρωμογενούς χαρακτηριστικού για την διαφορική ταυτοποίηση θεωρείται μη αξιόπιστη. Η παραγωγή χρωστικής από την *A. salmonicida* σε μικτές καλλιέργειες φαίνεται να αναστέλεται από άλλα βακτήρια (Austin & Austin, 1987). Επιπλέον, διάφορα αχρωμογόνα στελέχη *A. salmonicida* (Paterson και συν., 1980) καθώς και ένα χρωμογόνο στέλεχος *Aeromonas hydrophila* (Ross, 1962) έχουν απομονωθεί. Το Coomassie Brilliant Blue (CBB) άγαρ που αναπτύχθηκε από τον Udey (1982), έχει σαν σκοπό να διευκολύνει αυτή την διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών *A. salmonicida*.

Τα χρωμοφόρα τυπικά στελέχη της *A. salmonicida* απομονώνονται, χρησιμοποιώντας μέσα όπως το (TSA) ή (BHIA), σαν θρεπτικά υποστρώματα. Η διαφοροποίηση του τύπου των αποικιών που αναπτύσσονται κατά την πρώτη απομόνωση μπορεί να διευκολυνθεί με την προσθήκη 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant

Blue (CBB) R-250 σε κάθε ένα από τα προηγούμενα μέσα. Σε καλλιέργεια σε CBB άγαρ, η A-layer πρωτεΐνη που είναι παρούσα στα λοιμογόνα στελέχη *A. salmonicida* θα απορροφήσει την ειδική για την πρωτεΐνη Coomassie Brilliant Blue χρωστική. Επομένως τα λοιμογόνα στελέχη *A. salmonicida* αναπτύσσουν σκούρο μπλε ως βαθύ μωβ, εύθρυπτες αποικίες σε CBB άγαρ, συνήθως μετά από 2–7 ημέρες επώασης (Cipriano & Bertolini, 1988). Για την απομόνωση των ευαίσθητων στελεχών παρατεταμένη επώαση (7–14 ημέρες), στους 20–22°C απαιτείται. Παρόλο που το CBB άγαρ διευκολύνει την ταυτοποίηση, δεν αποτελεί μέσο επιλογής και η οριστική διάγνωση θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με βιοχημικές δοκιμές, ορολογικές ή μοριακές τεχνικές (Cipriano & Bullock, 2001).

Η αρχική απομόνωση των μη τυπικών χρωμοφόρων ή μη χρωμοφόρων στελεχών της *A. salmonicida* από τις αλλοιώσεις εμφανίζει δυσκολίες. Ο McCarthy, (1977) πρότεινε πως η απομόνωση θα πρέπει να γίνεται από αρχικές και ανεπτυγμένες αλλοιώσεις χρησιμοποιώντας το ελάχιστο έξι ψάρια από κάθε επιζωοτία. Οι Elliott και Shotts, (1980) βρήκαν ότι η αρχική απομόνωση των μη τυπικών στελεχών που προκαλεί την ελκωτική νόσο στο χρυσόψαρο διευκολύνθηκε σε αιματούχο άγαρ. Επιπλέον, οι Bootsma και συνεργάτες, (1977) πρότειναν πως για την διάγνωση της ερυθροδερματίτιδας του κυπρίνου θα πρέπει να γίνεται αρχικά πειραματική μόλυνση υγιών κυπρίνων με επαφή με ασθενείς κυπρίνους, και έπειτα ενοφθαλμισμός του υλικού των αλλοιώσεων από τους πειραματικά μολυσμένους κυπρίνους σε ένα μέσο που περιέχει tryptose blood agar base (DIFCO), 10% ορό αίματος, και άσηπτες αμπικιλίνη και πολυμυξίνη Β σε τελικές συγκεντρώσεις των 50 µg/mL και 50 IU/mL, αντίστοιχα. Αυτές οι απομονώσεις των μη τυπικών στελεχών εμφανίζουν μια ιδιαίτερη προτίμηση για αίμη που είναι απαραίτητη για την έναρξη της ανάπτυξης, ειδικά όταν τα βακτήρια βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις.

Μετά την αρχική απομόνωση, οι καθαρές αποικίες των τυπικών και μη τυπικών στελεχών της *A. salmonicida* χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιωθεί ότι τα βακτήρια είναι Gram-αρνητικά, μη κινητοί ράβδοι, οξειδάση θετικοί, ζυμώνουν την γλυκόζη και διαφοροποιούνται σύμφωνα με τα βιοχημικά κριτήρια που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Η παραγωγή της καφέ υδατοδιαλυτής χρωστικής παραμένει βασικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό για την ταυτοποίηση της *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Ο Griffin, το (1953) παρατήρησε πως η ενσωμάτωση της L-φαινυλαλανίνης και L-τυροσίνης στο θρεπτικό μέσο (σε pH 6.5-6.8) αύξησε τον

χρωματισμό. Παρόλο που η παρουσία της καφέ χρωστικής μπορεί να διευκολύνει την διάγνωση, παρόμοιες χρωστικές επίσης παράγονται από άλλα είδη *Aeromonas* (Ross, 1962) και *Pseudomonas* (Hamilton-Miller, 1975).

Η διάγνωση των άτυπων στελεχών *A. salmonicida* είναι πιο δύσκολη από την διάγνωση της τυπικής δοθιήνωσης καθώς τα κλινικά και παθολογικά συμπτώματα ποικίλλουν και κάποια από τα στελέχη είναι ευαίσθητα και αναπτύσσονται αργά στην αρχική απομόνωση.

Για την αρχική απομόνωση του βακτηρίου, η καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ (BA), (TSA) ή (BHIA), στα οποία προστίθεται 15% ορός, συνιστάται. Θρεπτικά υποστρώματα, όπως TSA ή BHIA που συμπληρώνονται με Coomassie Brilliant Blue (CBB) (TSA-C ή BHIA-C) χρησιμοποιούνται συνήθως (Εικόνα 9).

Για την απομόνωση και την ανακαλλιέργεια των άτυπων στελεχών *Aeromonas salmonicida* που αναπτύσσονται αργά σε θρεπτικό μέσο, απαιτείται επίσης η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο αίματος ή ορού προβάτου (Paterson και συν., 1980). Δείγματα για τις καλλιέργειες μπορούν να ληφθούν από τις δερματικές αλλοιώσεις καθώς και από τους νεφρούς, σπλήνα και καρδιά (Groman και συν., 1992). Κατά την μικροβιολογική απομόνωση σε υποστρώματα, συνήθως δεν παράγεται καφέ χρωστική. Η επώαση για τα άτυπα στελέχη διαρκεί 5 έως 8 ημέρες σε θερμοκρασία 20-25°C. Οι αποικίες που δημιουργούν τα άτυπα στελέχη της *Aeromonas salmonicida* έχουν συνήθως 1-2 mm διάμετρο, είναι γκριζωπές και ελαφρώς διογκωμένες.



**Εικόνα 9.** Αποικίες *Aeromonas* spp. σε αιματούχο άγαρ ([http<sup>18</sup>//images.google.gr](http://images.google.gr))

### 5.3.2 Καλλιέργεια κινητών ειδών *Aeromonas*

Τα θρεπτικά υποστρώματα (TSA) και (BHIA) αποτελούν κατάλληλα μέσα για την αρχική απομόνωση των κινητών *Aeromonas* από ασθενή ψάρια. Επειδή οι μικτές βακτηριακές μολύνσεις είναι συχνές στα ψάρια, που εμφανίζουν αιμορραγική σηψαιμία, είναι συχνά δύσκολο να απομονωθούν καθαρές καλλιέργειες ενός μόνο

είδους των κινητών *Aeromonas* από τις αλλοιώσεις. Για να διευκολυνθεί η ανάκτηση των κινητών *Aeromonas* από μια αρχική απομόνωση, οι Shotts και Rimler, (1973) σχεδίασαν ένα μέσο διαφοροποίησης για την επιλεκτική απομόνωση των κινητών *Aeromonas*.

Αυτό το μέσο, ονομάστηκε R-S άγαρ, και ετοιμάζεται διαλύοντας τα ακόλουθα συστατικά γραμ. (gr.) σε απεσταγμένο νερό σε ποσότητα του 1 λίτρου: L-υδροχλωρική λυσίνη (5.0), L-υδροχλωρική ορνιθίνη (6.5), L-υδροχλωρική κυστίνη (0.3), μαλτόζη (3.5), θειοθειικό νάτριο (6.8), βρομοθυμολικό μπλε (0.03), κιτρικό αμμώνιο του σιδήρου (0.8), δεοξυχολικό νάτριο (1.0), νοβομπιοκίνη (0.005), εκχύλισμα ζύμης (3.0), χλωριούχο νάτριο (5.0), και άγαρ (13.5). Αυτό το μείγμα συνεχώς ανακινείται, ζεσταίνεται, βράζει για 1 min, σε pH 7.0. Έπειτα ψύχεται στους 45°C, διανέμεται σε αποστειρωμένα τρυβλία, και μπορεί να καταψυχθεί σε πλαστικές θήκες μέχρι να χρησιμοποιηθεί. Μετά τον ενοφθαλμισμό, το R-S άγαρ πρέπει να επωαστεί στους 37°C για 24-48 ώρες, για να εξασφαλιστεί η ιδανική διαφοροποίηση των βακτηρίων (Shotts & Rimler, 1973) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10.** Ανάπτυξη κίτρινων αποικιών που είναι χαρακτηριστικές της *Aeromonas hydrophila* μετά από καλλιέργεια σε Rimler-Shotts άγαρ (Cipriano, 2001).

Οι αποικίες των κινητών *Aeromonas* στο R-S άγαρ εμφανίζονται κίτρινες, των *Pseudomonas*, *Escherichia*, και *Enterobacter* είναι πράσινες, και αυτών της *Edwardsiella* είναι πράσινες με μαύρο κέντρο. Παρόλο που βακτήρια όπως τα *Proteus vulgaris* και *Citrobacter* spp. είναι επίσης κίτρινα σε R-S άγαρ, οι αποικίες αυτών εμφανίζουν μαύρο κέντρο. Αν και η χρήση του R-S άγαρ έχει διευκολύνει την αρχική απομόνωση των κινητών *Aeromonas*, οι κίτρινες αποικίες δεν πρέπει να

λαμβάνονται σαν βάση για οριστική διάγνωση. Η *Aeromonas salmonicida* επίσης θα παράγει κίτρινες αποικίες σε R-S άγαρ, αλλά αντίθετα με τα κινητά είδη *Aeromonas*, η ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου αναστέλλεται στους 37°C.

#### 5.4 Βιοχημικός και φαινοτυπικός καθορισμός των ειδών *Aeromonas*.

Μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης για την ταυτοποίηση των *Aeromonas*. Για τον καθορισμό των βιοχημικών χαρακτηριστικών ακολουθείται συνήθως το εξής πρωτόκολλο: Πραγματοποίηση της διαδικασίας στους 25°C με το θρεπτικό μέσο να περιέχει 1 % (w/v) NaCl. Ακολουθεί χρώση Gram, έλεγχος της κινητικότητας, του σχήματος κυττάρων, δοκιμή οξειδωσης-μεταβολισμού της γλυκόζης σε O/F βασικό μέσο (Difco) με προσθήκη 1% (w/v) γλυκόζη, δράση οξειδάσης και καταλάσης, μείωση νιτρικών αλάτων, παραγωγή ινδόλης, ευαισθησία στον βακτηριοστατικό παράγοντα O/129, χρήση κιτρικού άλατος, β-αιμόλυση σε αίμα προβάτου, παραγωγή διάχυτης καφέ χρωστικής σε TSA, έλεγχος κινητικότητας σε TSA, δοκιμή αντοχής σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αλατιού [0, 1, 3, 6 και 9% (w/v) NaCl], παραγωγή αερίων από D-γλυκόζη, κόκκινο μεθυλίου (MR) και Voges-Proskauer (VP) αντιδράσεις, δράση β-γαλακτοσιδάσης (ONPG), παραγωγή υδρόθειου από κυστεΐνη και θεικού άλατος, ανάπτυξη σε MacConkey άγαρ, ανάπτυξη σε διάφορες τιμές pH και θερμοκρασίας, παραγωγή οξέος από υδατάνθρακες, υδρόλυση αλβουτίνης, DNA, ελαστίνης, εσκουλίνης, αμύλου, ουρίας και ξανθίνης. Δράση των αφυδρογονάση της αργινίνης (ADH), αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (LDC) και αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) (Moeller's method) και υδρόλυση ζελατίνης (Miñana-Galbis και συν., 2007).

Επιπλέον, ταχεία διαγνωστικά συστήματα, βιοχημικά τεστ, όπως τα (API 20E, API 20NE BioMérieux, France και BIOLOG-GN) χρησιμοποιούνται ευρέως για την διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών *Aeromonas* spp. και πραγματοποιούνται εύκολα σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών (Austin & Austin, 1999). Αυτά τα βιοχημικά τεστ πραγματοποιούνται σε απομονωμένες αποικίες που προέρχονται από αρχικές αποικίες σε TSA ή BHIA, και μετρούν παραμέτρους όπως: η παραγωγή οξέος από την γλυκόζη, την λακτόζη, την σακχαρόζη, την σορβιτόλη, την L-αραβινόζη και D-μαννιτόλη, η υδρόλυση εσκουλίνης, η παραγωγή ελαστάσης, η οξείδωση της γλυκόζης, η χρήση κιτρικών αλάτων, η μείωση νιτρικών αλάτων, η κινητικότητα, η δράση της οξειδάσης και καταλάσης, η δράση των αφυδρογονάση

της αργινίνης (ADH), αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (LDC) και αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ODC) (Smibert & Krieg, 1994), η παραγωγή αερίων από την D-γλυκόζη, η παραγωγή ινδόλης, η υδρόλυση ζελατίνης, η χρήση DL-γαλακτικού, η παραγωγή οξέος από σαλικίνη, η χρήση της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης, Voges–Proskauer (VP) αντιδράσεις (Altwegg, 1999; Austin και συν., 1998; Huys και συν., 1997).

Όσον αφορά την διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών *Aeromonas* spp., πιο συγκεκριμένα: η *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* φαίνεται πως μεταβολίζει την γλυκόζη, όχι όμως την σουκρόζη ή λακτόζη. Εμφανίζει θετικές δοκιμές για οξειδάση, καταλάση, υδρόλυση ζελατίνης, και αποκαρβοξυλάση της λυσίνης, όχι όμως για ινδόλη. Μετά από 24 ώρες αναπτύσσονται οι αποικίες του βακτηρίου οι οποίες εμφανίζουν μια διάχυτη καφέ χρωστική σε 48-72 ώρες (<http><sup>10</sup>). Τα άτυπα στελέχη της *Aeromonas salmonicida* είναι ζελατινάση αρνητικά, ινδόλη θετικά, ενώ δεν παράγουν καφέ χρωστική. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί, ότι μερικά στελέχη *A. salmonicida* μπορεί να είναι αρνητικά σε οξειδάση του κυτοχρώματος, κάτι που είναι συνήθως ασύμβατο για αυτά τα είδη (Chapman και συν., 1991).

Φαινοτυπικά τα κινητά είδη *Aeromonas* είναι θετικά σε οξειδάση του κυτοχρώματος, μεταβολίζουν την γλυκόζη με ή χωρίς την παραγωγή αερίου και είναι ευαίσθητα στον βακτηριοστατικό (vibriostatic) παράγοντα O/129 (Cipriano & Bullock, 2001). Επίσης παράγουν οξύ από φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, τρεχαλόζη, δεξτρίνη και γλυκογόνο (Hsu και συν., 1985). Η παραγωγή οξέος από άλλους υδατάνθρακες (αραβινόζη, σαλικίνη, κυτταρίνη, σακχαρόζη και λακτόζη) ποικίλλει. Οι Shotts και συνεργάτες, (1985) επίσης βρήκαν ότι τα στελέχη της ομάδας *A. hydrophila* υδρολύουν την αλβουμίνη και καζεΐνη. Τα περισσότερα στελέχη επίσης υδρολύουν την ζελατίνη (99.9%), την αιμογλοβίνη (94.3%), και ελαστίνη (73.2%), αλλά κανένα από τα στελέχη δεν υδρολύει το κολλαγόνο. Επίσης, οι Austin και Austin, (1989) έδειξαν ότι τα είδη *A. hydrophila*, *A. sobria* και *A. caviae* επικρατούν στις απομονώσεις των κλινικών δειγμάτων που σχετίζονται με τα ψάρια. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης είναι μια κρίσιμη αντίδραση που διαφοροποιεί τα κινητά είδη *Aeromonas* από τα είδη *Pseudomonas* (Bullock, 1961). Η κινητικότητα μπορεί επίσης να καθοριστεί, ενώ η παραγωγή αερίων γίνεται εμφανής με τον σχηματισμό φυσαλίδων στο μέσο. Παρόλο που τα περισσότερα στελέχη *A. hydrophila* παράγουν αέρια κατά την διάρκεια μεταβολισμού της γλυκόζης, μερικά είδη κινητών *Aeromonas* που απομονώνονται από άρρωστα ψάρια δεν παράγουν αέρια (Cipriano & Bullock, 2001).

Τα είδη που ανήκουν στην ομάδα *A. hydrophila* διαφοροποιούνται με βάση τον μεταβολισμό της σορβιτόλης και την αφομοίωση του γαλακτικού οξέος. Η *A. eucrenophila* μπορεί να διαφοροποιηθεί από την *A. caviae* με βάση την παραγωγή αερίων από την γλυκόζη και από την *A. encheleia* με βάση την αποκαρβοξυλάση της λυσίνης και τον μεταβολισμό της αραβινόζης. Ο μεταβολισμός της σακχαρόζης επιτρέπει την διαφοροποίηση μεταξύ των *A. sobria* και *A. jandaei*. Επιπλέον η *A. jandaei* διαφοροποιείται από την *A. poroffii* με βάση την αποκαρβοξυλάση της λυσίνης. Τα αποτελέσματα του μεταβολισμού της αραβινόζης και της υδρόλυσης του αμύλου είναι αντίθετα στην *A. sobria* και *A. veronii* βιότυπος *sobria* (Minana-Galbis και συν., 2002). Τέλος τα είδη : *A. veronii* είναι θετικό στην αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, *A. schubertii* είναι μαννιτόλη-αρνητικό, *A. caviae* είναι μη αιμολυτικό, ενώ είναι δύσκολο να διαφοροποιηθεί η *A. hydrophila* από την *A. sobria*. Διάφορα πρακτικά διαγνωστικά τεστ έχουν προταθεί από τους Janda και συνεργάτες και Joseph και συνεργάτες: η υδρόλυση της εσκουλίνης, ο μεταβολισμός της αραβινόζης και σαλικίνης είναι συνήθως θετικά στην *A. hydrophila*, και συνήθως αρνητικά στην *A. sobria*.

Μπορούν να γίνουν επίσης φαινοτυπικά τεστ για τον καθορισμό των λοιμογόνων παραγόντων, όπως (αιμολυτική δράση, πρωτεολυτική δράση, λιπολυτική δράση, νουκλεολυτική δράση). Επιπλέον φαινοτυπική διαφοροποίηση των πιο γνωστών κινητών ειδών *Aeromonas* που απομονώνονται από κλινικά δείγματα μπορεί να πραγματοποιηθεί, με βάση τα κριτήρια των Carnahan και συνεργατών (1991), που τροποποιήθηκαν από τους Joseph και Carnahan (1994) και περιγράφονται στον πίνακα 7.

## 5.5 Ιστοπαθολογικές εξετάσεις

Για την πραγματοποίηση ιστοπαθολογικών εξετάσεων, υλικό λαμβάνεται από το δέρμα, μύες, βράγχια, καρδιά, έντερο, ήπαρ, νεφρούς και σπλήνα. Τα δείγματα τοποθετούνται σε φορμόλη 10%. Στη συνέχεια και μετά την αφυδάτωση, διαύγαση και εμποτισμό τους σε παραφίνη (στάδια που πραγματοποιούνται με την συσκευή της ιστοκινέτας), εγκλείονται σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους αυτούς λαμβάνονται με την βοήθεια μικροτόμου τομές ιστών πάχους 3-5 μm. Η χρώση που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο κοινού φωτισμού είναι συνήθως αυτή της αιματοξυλίνης-εωσίνης (H&E) και Giemsa. Τα παρασκευάσματα



χρωματίζονται με αιματοξυλίνη-εωσίνη και εξετάζονται στο μικροσκόπιο για εύρεση αλλοιώσεων (Karatas και συν., 2005).

Ιστοπαθολογικά μπορούν να παρατηρηθούν ελκωτική δερματίτιδα με φλεγμονώδη διήθηση από λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, αιμορραγία και εστίες νέκρωσης στην επιδερμίδα και δερμίδα (Chang και συν., 2002), αποικίες βακτηρίων στο ήπαρ και εστίες νέκρωσης με φλεγμονώδη κύτταρα στους νεφρούς και στην σπλήνα (Drury, 1980). Για την διαφορική διάγνωση και τον αποκλεισμό μολύνσεων από παράσιτα θα πρέπει να πραγματοποιείται και παρασιτολογική εξέταση (Karatas και συν., 2005).

## 5.6 Ανοσολογικές και ορολογικές τεχνικές

Οι ορολογικές και ανοσολογικές τεχνικές, όπως η ενζυμική ανοσοπροσροφητική διαδικασία (ELISA), η τεχνική ανοσοφθορισμού (IFAT) και η οροσυγκόλληση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση αντιγόνων από δείγματα νεφρού, εντέρου και βλέννας ψαριών (Hiney και συν., 1994). Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών *Aeromonas* (McCarthy & Rawle, 1975; McCarthy, 1975b), συνήθως όταν ο αριθμός των βακτηρίων στους ιστούς των ψαριών είναι πολύ χαμηλός και απαιτούνται πιο ευαίσθητες μέθοδοι (Bernoth, 1997).

Ο Sakai, το (1986) παρατήρησε πως οι ανοσολογικές τεχνικές (ELISA) ενισχυμένες με δευτερογενή και τριτογενή αντισώματα μπορούν να ανιχνεύσουν έως  $10^2$  μονάδες σχηματισμού αποικιών (cfu) *A. salmonicida*/ml. Επίσης βρήκε ότι η ELISA και η τεχνική ανοσοφθορισμού μπορούν να ανιχνεύσουν το ελάχιστο  $10^2$ - $10^3$  cfu/ml του παθογόνου, αντίστοιχα, ενώ απαιτούνται  $10^7$  cfu/ml για ανίχνευση με την τεχνική της οροσυγκόλλησης. Οι Adams και Thompson, (1990) έδειξαν επίσης ότι το όριο για την ανίχνευση της *A. salmonicida* με ένα σύνθετος ELISA τεστ ήταν περίπου  $10^3$  cfu/ml.

Η ELISA αποτελεί μια μέθοδο διάγνωσης για τον έλεγχο μεγάλου αριθμού δειγμάτων, χρησιμοποιώντας μόνο ορό αίματος σαν δείγμα, ενώ πραγματοποιείται γρήγορα (μέσα σε 1 ώρα περίπου) (Adams, 2004). Ανοσολογικές μέθοδοι, όπως η ανοσοϊστοχημεία (IHC), και η τεχνική ανοσοφθορισμού (IFAT) επιτρέπουν άμεση, ειδική ανίχνευση των παθογόνων σε δείγματα ιστών (Adams, 2004).



Οι τεχνικές οροσυγκόλλησης, τα τεστ φθορισμού αντισωμάτων (fluorescent antibody tests) (Eurell και συν., 1978), και οι τεχνικές με ανοσοένζυμα (Lewis, 1981) έχουν χρησιμοποιηθεί σε συστήματα με ομόλογα αντιγόνα/αντισώματα. Αυτές οι αναλύσεις μπορούν να ανιχνεύσουν στελέχη κινητών *Aeromonas* ενάντια στα οποία ομόλογα αντισώματα έχουν αναπτυχθεί, αλλά η ανίχνευση ετερόλογων στελεχών καθιστά την ταυτοποίηση με οροδιάγνωση μη πρακτική, καθώς τα κινητά είδη *Aeromonas* εμφανίζουν μεγάλη αντιγονική ποικιλία. Η έλλειψη ενός αποτελεσματικού πολυσθενικού αντιορού ειδικού για την *A. hydrophila* εξακολουθεί να περιορίζει την αξιόπιστη ταυτοποίηση με οροδιάγνωση αυτού του παθογόνου.

Οι Calabrez και συνεργάτες, (1993) έχουν επίσης αναπτύξει μια τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση στελεχών *A. sobria* στο νερό, στα ιζήματα και στα ψάρια. Τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται είτε για την αρχική διάγνωση σε κλινικά ασθενή ψάρια, (Calabrez και συν., 1993; Gustafson και συν., 1992), είτε για επιβεβαίωση των αρχικών απομονώσεων των ειδών *Aeromonas* (Hiney και συν., 1992).

### **5.7 Εφαρμογή της δοκιμής στρες για την ανίχνευση αφανών φορέων**

Τα ψάρια μπορούν να είναι αφανείς φορείς της *A. salmonicida* ή των άλλων ειδών *Aeromonas* ακόμη και αν η καλλιέργεια ή άλλες μέθοδοι διάγνωσης είναι αρνητικές. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το τεστ ορμονικού και θερμικού στρες, δηλαδή η δοκιμή που προκαλεί την δοθιήνωση μέσω της επίδρασης του στρες, όπως περιγράφηκε από τους Bullock και Stuckey, (1975) και τροποποιήθηκε από τον McCarthy, (1977b) έχει αποδειχθεί αξιόπιστο για την ανίχνευση της *A. salmonicida* μεταξύ ψαριών φορέων και ασυμπτωματικών ψαριών (Cirriano και συν., 1997).

Σε αυτή την διαδικασία, τα ψάρια ενοφθαλμίζονται με 20 mg οξεικής πρεδνιζολόνης/kg ψαριών και διατηρούνται για 14 ημέρες στο νερό στους 18°C. Στην συνέχεια πραγματοποιούνται οι μικροβιολογικές εξετάσεις (Bernoth, 1997). Σημαντικοί περιοριστικοί παράγοντες στην εφαρμογή της δοκιμής στρες είναι ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται και ο μεγάλος αριθμός ψαριών που θα πρέπει να θυσιαστούν για να υπάρχει στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

## 5.8 Αντιβιογράμμα

Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά ενός στελέχους που απομονώνεται, συνήθως απαιτείται για τον αποτελεσματικό έλεγχο των μολύνσεων. Το αντιβιογράμμα είναι απαραίτητο γιατί η ευρεία χρήση και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών για την θεραπεία έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, και στα είδη *Aeromonas* (Austin, 1993). Το πρόβλημα της ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά θεωρείται παγκόσμιο.

Η ανθεκτικότητα ή ευαισθησία των στελεχών *Aeromonas* σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες καθορίζεται με την πραγματοποίηση αντιβιογράμματος (NCCLS, 1999) (Jorgensen και συν., 1999). Τα αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι: αμικασίνη (30 µg), ναλιδιξικό οξύ (30 µg), αμπικιλίνη (10 µg), καρβενικιλίνη (100 µg), κεφαλοθίνη (30 µg), κεφοταξίμη (30 µg), κεφουροξίμη (30 µg), σιπροφλοξακίνη (5 µg), κλινδαμυκίνη (2 µg), χλωραμφενικόλη (30 µg), ερυθρομυκίνη (15 µg), στρεπτομυκίνη (10 µg), γενταμυκίνη (10 µg), καναμυκίνη (30 µg), νεομυκίνη (30 µg), τομπραμυκίνη (10 µg), κολιστίνη (50 µg), φλουμικίνη (30 µg), νορφλοξακίνη (10 µg), λινκομυκίνη (15 µg), οξολινικό οξύ (2 µg), νιτροφουραντοΐνη (100 µg), πενικιλίνη (10 U), πιπερακιλλίνη (100 µg), πολυμυξίνη Β (300 U), ριφαμικίνη (5 µg), τετρακυκλίνη (30 µg), οξυτετρακυκλίνη (30 µg), ενροφλοξακίνη (5µg), τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (25 µg) και τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδες (ST) (1.25 µg + 23.75 µg). Ελέγχεται επίσης και η ευαισθησία στον βακτηριοστατικό (vibriostatic) παράγοντα O/129 (150 µg; Oxoid). Οι ζώνες αναστολής που σχηματίζονται γύρω από τα δισκία των αντιβιοτικών συγκρίνονται μετά από επώαση στους 27°C για 24 ώρες, οπότε εκτιμάται η ευαισθησία στα αντιβιοτικά (Guz & Kozinska, 2004).

Γενικότερα τα στελέχη *Aeromonas* είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά: αμπικιλίνη (10 µg) (εκτός του στελέχους 431E), ερυθρομυκίνη (15 µg) και πενικιλίνη G (10 µg), ενώ δείχνουν μέτρια ευαισθησία στα αντιβιοτικά: στρεπτομυκίνη (10 µg) και είναι ευαίσθητα στα: αμικασίνη (30 µg), αμοξυκιλλίνη+κλαβουλανικό οξύ (30 µg), κεφοξιτίνη (30 µg), κεφτριαξόνη (30 µg), κεφουροξίμη (30 µg), κεφαλοθίνη (30 µg), σιπροφλοξακίνη (5 µg), κολιστίνη (50 µg), γενταμικίνη (10 µg), πολυμυξίνη Β (300 U), τετρακυκλίνη (30 µg), τομπραμυκίνη (10 µg) και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (1.25 µg+23.75 µg) (Miñana-Galbis και συν., 2007). Τα περισσότερα στελέχη είναι ανθεκτικά στις πενικιλίνες, στην σουλφαμεθοξαζόλη, τριμεθοπρίμη και στα μακρολίδια (ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη,

βανκομυκίνη) αλλά ευαίσθητα στην τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη, φλορφενικόλη, οξολινικό οξύ, νορφλοξακίνη, λινκομυκίνη, φλουμικίνη, νιτροφουραντοΐνη, στις αμινογλυκοσίδες (αμικασίνη, γενταμικίνη, τομπραμυκίνη), κεφαλοσπορίνες (κεφουροξίμη, κεφτριαξόνη, κεφαζολίνη, κεφαλεξίνη, κεφοξιτίνη, κεφαλοθίνη, κεφοταξίμη), κινολόνες (σιπροφλοξακίνη) και τριμεθοπρίμη–σουλφαμεθοξαζόλη (Awan και συν., 2009).

**Πίνακας 6.** Φαινοτυπικές διαφορές υποειδών *Aeromonas salmonicida* (Holt και συν., 1994).

<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp.				
<b>ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>	<i>salmonicida</i>	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>	<i>smithia</i>
Παραγωγή ινδόλης	-	+	+	-
Κόκκινο μεθυλίου	+	+	+	-
Voges Prokauer	-	-	+	-
Παραγωγή υδρόθειου	-	-	+	+
Αποκαρβοξυλάση της λυσίνης	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	-
Αφυδρογονάση της αργινίνης	+	+	+	[-]
Παραγωγή οξέος από D-γλυκόζη	+	+	+	[+]
Παραγωγή αερίου από D-γλυκόζη	+	-	+	[+]
Παραγωγή οξέος από L-αραβινόζη	+	-	+	-
Παραγωγή οξέος από D-γαλακτόζη	+	+	+	-
Παραγωγή οξέος από γλυκερόλη	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	[-]
Παραγωγή οξέος από μαλτόζη	+	+	+	-
Παραγωγή οξέος από D-μαννιτόλη	+	-	+	-
Παραγωγή οξέος από σακχαρόζη	-	+	+	<b>d</b>
Παραγωγή οξέος από τρεχαλόζη	+	+	+	-
Υδρόλυση εσκουλίνης	+	-	+	-

Λιπάση	+	+	+	-
ONPG	<b>d</b>	<b>d</b>	<b>d</b>	+
Καφέ χρωστική	+	-	-	-

+ = 90% ή περισσότερα στελέχη είναι θετικά, - = 90% ή περισσότερα στελέχη είναι αρνητικά, [-] = 0-10% είναι θετικά, d = 11-75% στελεχών είναι θετικά, [+] = 76-89% στελεχών είναι θετικά.

**Πίνακας 7.** Διαφοροποίηση κινητών ειδών *Aeromonas* που απομονώθηκαν από κλινικά δείγματα. Όλες οι απομονώσεις είναι Gram (-), οξειδάση θετικοί βάκιλλοι, μεταβολίζουν την γλυκόζη και είναι ανθεκτικοί στον βακτηριοστατικό παράγοντα 0/129 (Joseph & Carnahan, 1994; Carnahan και συν., 1991).

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. scubertii</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. trota</i>
Υδρόλυση εσκουλίνης	+	-	+	+	-	-	-
Αντίδραση Voges-Proskauer	+	+	+	-	<b>V</b>	+	-
Δράση πिरαζιναμιδάσης	+	-	-	+	-	-	-
Μεταβολισμός αραβινόζης	<b>V</b>	-	-	+	-	-	-
Μεταβολισμός μαννιτόλης	+	+	+	+	-	+	+
Μεταβολισμός σακχαρόζης	+	+	+	+	-	-	-
Ευαισθησία στην αμπικιλίνη	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
Ευαισθησία στην καρβενικιλίνη	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
Ευαισθησία στην κεφαλοθίνη	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
Ευαισθησία στην κολιστίνη	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>S</b>
Αποκαρβοξυλάση της λυσίνης	+	+	+	-	+	+	+
Αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης	-	-	+	-	-	-	-
Υδρόλυση αρβουτίνης	+	-	+	+	-	-	<b>V</b>

Παραγωγή ινδόλης	+	+		+	-	+	+
Παραγωγή υδρόθειου	+	+	+	-	-	+	+
Αέριο από γλυκόζη	+	+	+	-	-	+	+
Αιμόλυση (TSA με 5% αίμα προβάτου)	+	+	+	<b>V</b>	+	+	<b>V</b>

+ θετικό για >70% των απομονώσεων; - αρνητικό ή θετικό για <30% των απομονώσεων; V μεταβλητό; R ανθεκτικό; S ευαίσθητο. MIC (μία αραιώση), µg/ml.

### 5.9 Νέες μέθοδοι απομόνωσης

Την τελευταία δεκαετία, νέες μοριακές τεχνικές, όπως η ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων που πραγματοποιείται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), οι μελέτες υβριδισμού του DNA (Poroff και συν., 1981), η ανάλυση RFLP (πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού τμήματος), και ο προσδιορισμός του ποσοστού γουανίνης-κυτοσίνης (G+C) του DNA (Miñana-Galbis και συν., 2007; Figueras και συν., 2000; Borrell και συν., 1997) αρχίζουν να εφαρμόζονται στην αναγνώριση των βακτηρίων. Οι μοριακές τεχνικές παρέχουν στο σύνολό τους μια φυλογενετική προσέγγιση που διευκολύνει την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των οργανισμών σε ομάδες που σχετίζονται στενά μεταξύ τους (Coloni, 2004). Επειδή η ταξινόμηση των *Aeromonas* συνεχώς αλλάζει, η αναγνώριση και ταυτοποίηση των ειδών δεν μπορεί να στηριχτεί μόνο στις φαινοτυπικές μεθόδους διάγνωσης.

Η τεχνική PCR παρέχει ένα γρήγορο τρόπο αναγνώρισης και διαφοροποίησης βακτηριακών στελεχών, επιτρέποντας την παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA.

Η ανάλυση 16S rDNA βασίζεται στην ενίσχυση του γονιδίου του ριβοσωμικού RNA (16S rRNA), που είναι παρών σε όλα σχεδόν τα βακτήρια (Lee και συν., 2002). Η ανάλυση 16S rDNA που ανιχνεύει το χρωμοσωμικό DNA των βακτηρίων, εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους, ενώ βοηθά στον καθορισμό της φυλογενετικής σχέσης μεταξύ των ειδών του είδους. Παρέχει μια χρήσιμη εναλλακτική αναγνώριση όταν οι μέθοδοι φαινοτυπικού χαρακτηρισμού αποτύχουν και μπορεί να ανιχνεύσει μολύνσεις από βακτήρια που οι κλασσικές μέθοδοι απομόνωσης αδυνατούν. Ωστόσο

η χρησιμότητα της 16S rDNA ανάλυσης δεν έχει εκτιμηθεί πλήρως με ένα μεγάλο αριθμό απομονώσεων (Lee και συν., 2002).

Η 16S rRNA περιέχει προστατευμένες και αποκλίνουσες περιοχές. Οι προστατευμένες περιοχές επιτρέπουν τον σχεδιασμό ενός μεγάλου εύρους PCR εκκινητών που θα βρουν τον στόχο τους στα περισσότερα βακτήρια (Lee και συν., 2002). Κατά την ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων (RFLP-πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού τμήματος) το PCR-ενισχυμένο 16S rDNA γονίδιο πέπτεται χρησιμοποιώντας δύο ενδονουκλεάσες (*AluI* και *MboI*) ταυτόχρονα, επιτρέποντας την ταυτοποίηση όλων των ειδών του γένους, με εξαίρεση τα *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. rosoffii* και *A. encheleia*, για την διαφοροποίηση των οποίων απαιτείται επιπλέον διαχωρισμός (Figueras και συν., 2000).

Η εξαγωγή του DNA γίνεται με την μέθοδο των Lawson και συνεργάτες (Lawson και συν., 1989). Στην συνέχεια πραγματοποιείται η PCR και η ανάλυση της αλληλουχίας των rRNA γονιδίων (Collins και συν., 1993). Ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενισχυμένη PCR. Η αλληλουχία που εμφανίζεται παρατίθεται στην 16S rDNA αλληλουχία γονιδίων των τύπων στελεχών όλων των μελών του γένους *Aeromonas* που είναι διαθέσιμα στην GeneBank χρησιμοποιώντας ένα πρόγραμμα CLUSTAL\_X έκδοση 1.8 (Thompson και συν., 1997). Ο καθορισμός της 16S rRNA αλληλουχίας αποδεικνύει ότι τα είδη *Aeromonas* σχετίζονται στενά γενεολογικά και έχει σαν αποτέλεσμα την κατάταξη των *Aeromonas* σε ένα φυλογενετικό δέντρο. Ωστόσο, η μέθοδος αποτυγχάνει συχνά να διακρίνει στενά συσχετιζόμενα είδη (Collins και συν., 1993). Η RFLP ανάλυση που περιλαμβάνει την εξαγωγή και την κάθαρση του DNA γίνεται μόνο σε αναγνωρισμένα εργαστήρια (Pitcher και συν., 1989).

Η ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων επιβεβαιώνει ότι τα στελέχη ανήκουν σε συγκεκριμένο γένος, ενώ οι μελέτες υβριδισμού του DNA αποδεικνύουν ότι το DNA ενός στελέχους είναι παρόμοιο με τον τύπο/αναφοράς του στελέχους της αντίστοιχης υβριδικής ομάδας (HGs) (Figueras και συν., 2000; Borrell και συν., 1997). Παρόλο που η ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση των βακτηρίων, οι μελέτες υβριδισμού του DNA θεωρούνται πιο αξιόπιστες για την ταυτοποίηση στενά συσχετιζόμενων ειδών ή στελεχών βακτηρίων (Rahman και συν., 2004).

Η μέθοδος υβριδισμού με μικροπλάκα χρησιμοποιείται για την διαφοροποίηση στελεχών *Aeromonas* (Hickman-Brenner και συν., 1987). Για την

ταυτοποίηση γίνονται επίσης μελέτες υβριδισμού του DNA, οι οποίες χρησιμοποιούν συνήθως ραδιοϊσότοπα, ενώ η μέθοδος υβριδισμού με μικροπλάκα, δεν απαιτεί την χρήση ραδιοϊσότοπων και ειδικών DNA ιχνηλατών για τον χαρακτηρισμό του DNA. (Ezaki και συν., 1989). Ο προσδιορισμός του ποσοστού γουανίνης-κυτοσίνης (G+C) του DNA μπορεί να γίνει με υγρή χρωματογραφία σύμφωνα με την μέθοδο που περιέγραψαν οι Sugita και συνεργάτες (Sugita και συν., 1994).

Μια ολοκληρωμένη διάγνωση των μολύνσεων με *Aeromonas* βασίζεται επομένως στα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό, αλλά και στις μελέτες υβριδισμού του DNA, στην ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων, στην ανάλυση RFLP (πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού τμήματος), και στον προσδιορισμό του ποσοστού G+C του DNA (Miñana-Galbis και συν., 2007; Figueras και συν., 2000; Borrell και συν., 1997).

## **6. ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ – ΕΛΕΓΧΟΣ**

### **6.1 Θεραπεία**

#### **6.1.1 Εισαγωγή**

Σε υποψία μόλυνσης με *Aeromonas*, θα πρέπει αρχικά να γίνει διάγνωση και να επιβεβαιωθεί το νόσημα στα ψάρια. Η μόλυνση συνήθως σχετίζεται με το στρες, γ'αυτό και η εξάλειψη των παραγόντων στρες μπορεί να είναι αρκετή για την αντιμετώπιση της κατάστασης. Είναι σημαντικό να γίνει αντιβιογράμμα πριν την χρήση των αντιβιοτικών για να καθοριστεί ποια αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά, λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Σε περιπτώσεις που η μόλυνση επιμένει, θα πρέπει να καθοριστούν οι παράγοντες στρες που προκαλούν ανοσοκαταστολή στα ψάρια, όπως έλεγχος της ποιότητας νερού, διατροφής, υγιεινής, και σωστές πρακτικές διαχείρισης. Σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη αντιμετώπιση των καταστάσεων που συνυπάρχουν και ενισχύουν την μόλυνση με *Aeromonas*. Τέτοιες καταστάσεις είναι: η απομάκρυνση των παρασίτων, η βελτίωση των συνθηκών και της ποιότητας του νερού και η εφαρμογή συνθηκών υγιεινής. Σε περίπτωση που η μόλυνση με *Aeromonas* παραμένει σαν χρόνιο πρόβλημα, θα πρέπει να καθοριστεί ο υποκείμενος παράγοντας στρες που προκαλεί ανοσοκαταστολή στα ψάρια.

Η θεραπεία βασίζεται σε κατάλληλα αντιβιοτικά μετά από αντιβιογράμμα και αφού προηγηθεί διάγνωση από κτηνίατρο-ιχθυοπαθολόγο. Η πραγματοποίηση

αντιβιογράμματος είναι απαραίτητη, καθώς η αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών και χημικών παραγόντων εμφανίζει ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως κατάλοιπα στη σάρκα των ψαριών, ανθεκτικότητα αντοχής των βακτηριδίων και μόλυνση του υδάτινου περιβάλλοντος, λόγω διαφυγής φαρμάκων και μεταβολιτών τους στο νερό (Austin, 1993).

Η εντατικοποίηση της καλλιέργειας των ψαριών έχει οδηγήσει στην αύξηση των βακτηριακών νοσημάτων, η οποία στην συνέχεια οδήγησε στην ευρεία χρήση αντιβιοτικών για την θεραπεία και η οποία συνδέθηκε με την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Η ανθεκτικότητα αυτή μπορεί να μεταδοθεί από βακτήριο σε βακτήριο με ένα πλασμίδιο που είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη αντίστασης, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών (Sandaa & Enger, 1996). Στις ιχθυοκαλλιέργειες η ανάπτυξη αντοχής στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια σε πολλές χώρες και οφείλεται κυρίως στην μη σωστή και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών (Guz & Kozinska, 2004). Οδηγίες για ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών δεν έχουν καθοριστεί πλήρως για τα νοσήματα των ψαριών, ενώ μικρός αριθμός αντιβιοτικών έχει εγκριθεί για χρήση σε ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών που προορίζονται για τροφή του ανθρώπου (Noga, 2000).

### **6.1.2 Χρήση Αντιβιοτικών**

Οι τρεις κύριοι τρόποι χορήγησης φαρμάκων και αντιβιοτικών στα ψάρια για την θεραπεία μολύνσεων από *Aeromonas* είναι: 1) με την προσθήκη στο νερό και πραγματοποίηση λουτρών, 2) με την τροφή από το στόμα και 3) ενέσιμα με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (ειδικά σε σημαντικά διακοσμητικά ψάρια). Η χορήγηση με την προσθήκη στο νερό εφαρμόζεται συνήθως σε λουτρά με αντισηπτικά και χρησιμοποιείται κυρίως για επιφανειακές εξωτερικές αλλοιώσεις. Δεν προκαλεί τόσο στρες στα ψάρια αλλά είναι δύσκολος ο υπολογισμός των δόσεων και η λήψη τους από τα ψάρια (Noga, 2000). Υπάρχει και η τοπική θεραπεία για εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις, απαιτεί όμως αναισθησία των ψαριών και δεν εφαρμόζεται σε επίπεδο ρουτίνας.

Τα αντιβιοτικά συνήθως ενσωματώνονται στην τροφή κατά την παρασκευή τους ή επικολλούνται στην επιφάνεια των σύμπληκτων πριν την χορήγησή τους και χορηγούνται με την τροφή.



Όσον αφορά την θεραπεία, η χημειοθεραπεία με την χρήση αντιβιοτικών αποτελεί βασική μέθοδο θεραπείας των μολύνσεων με στελέχη *Aeromonas*. Εξάλλου, η δοθιήνωση των σολομοειδών ήταν το πρώτο νόσημα των ψαριών που αντιμετωπίστηκε με τα σύγχρονα φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των σουλφοναμίδων και νιτροφουρανών (Gutsell, 1948). Σήμερα, σύμφωνα με τον οργανισμό Food and Drug Administration (FDA) υπάρχουν αυστηροί περιορισμοί για την χρήση των φαρμάκων στα ζώα και στα ψάρια. Έτσι, τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά που χορηγούνται με την τροφή στα ψάρια για την αντιμετώπιση των μολύνσεων με *Aeromonas* είναι:

Η οξυτετρακυκλίνη (Terramycin®, Pfizer, Inc.) αποτελεί το φάρμακο εκλογής για την θεραπεία της σηψαιμίας από *A. salmonicida* και κινητά είδη *Aeromonas* στα ψάρια. Το φάρμακο έχει εγκριθεί για χρήση σε ψάρια λίμνης, γατόψαρα των καναλιών, και σολομοειδή. Χορηγείται στην τροφή καθημερινά, σε ποσότητα 50-80 mg/kg Σ.Β. ψαριού την ημέρα για 10 ημέρες. Είναι βακτηριοστατικό φάρμακο. Σε περίπτωση εμφάνισης ανθεκτικότητας των βακτηρίων, διακόπτεται η εφαρμογή του. Ο χρόνος αναμονής για τα ψάρια πριν διατεθούν στην κατανάλωση, είναι 21 ημέρες από το τέλος της θεραπείας. Τα αποτελέσματα της θεραπείας μπορούν να γίνουν εμφανή και τις πρώτες 2-3 ημέρες χορήγησης του φαρμάκου, ενώ είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όταν τα ψάρια μολύνονται αφού υποβληθούν σε στρες για μικρά χρονικά διαστήματα (Bullock και συν., 1974; Meyer, 1964).

Το ROMET-30® (Hoffman-LaRoche, Inc.), αποτελείται από πέντε μέρη σουλφαδιμεθοξίνη και ένα μέρος ορμεθοπρίμη, και χρησιμοποιείται επίσης για τον έλεγχο της δοθιήνωσης. Χορηγείται με την τροφή, σε δόση 50 mg/kg ψαριού την ημέρα για 10 ημέρες (Bullock και συν., 1974) ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ίδια δόση χορηγούμενο για 5 ημέρες, με ένα χρόνο αναμονής 42 ημέρες για τα σολομοειδή και μόνο 3 ημέρες για τα γατόψαρα. Ο χρόνος αναμονής είναι το χρονικό διάστημα που πρέπει να μεσολαβήσει από την τελευταία χορήγηση του φαρμάκου μέχρι να διατεθούν τα ψάρια στην αγορά για κατανάλωση. Ο χρόνος αναμονής εξαρτάται σημαντικά και από την θερμοκρασία νερού, καθώς μειώνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες νερού, λόγω της γρήγορης αποβολής των φαρμάκων από τα ψάρια.

Παρόλο που οι περισσότερες σουλφοναμίδες δεν χρησιμοποιούνται πλέον, η σουλφαμεραζίνη έχει εγκριθεί για την θεραπεία της δοθιήνωσης στην ιριδίζουσα πέστροφα, στην καφέ πέστροφα και στην ποταμίσια πέστροφα, σε δόση των 200-220

mg/kg ψαριού την ημέρα για 14 ημέρες. Η θεραπεία θα πρέπει να τελειώνει τουλάχιστον 3 εβδομάδες πριν την διάθεση των ψαριών στην αγορά για κατανάλωση. Η σουλφιζοξαζόλη (Gantrisin) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης αντί της σουλφαμεραζίνη (Snieszko, 1952).

Η φουρανάση, είναι εξαιρετικά αποτελεσματική έναντι των ειδών *Aeromonas*, εάν γίνει εμβάπτιση στα μολυσμένα ψάρια για 5-10 λεπτά σε νερό που περιέχει 1-2 mg/l φουρανάση, ή διατηρώντας τα ψάρια για μία εβδομάδα σε νερό που περιέχει 0,1 mg/l φαρμάκου. Ωστόσο, η φουρανάση μπορεί να είναι ιδιαίτερα τοξική για τα ψάρια αν δεν χρησιμοποιηθεί κατάλληλα, γι' αυτό και αποφεύγεται η εφαρμογή της (Mitchell & Plumb, 1980).

Η χλωραμφενικόλη (chloromycetin) έχει χρησιμοποιηθεί επίσης αποτελεσματικά για την θεραπεία βατράχων με νόσο των κόκκινων ποδιών με γαστρικό καθετηριασμό 3-5 mg /100 g βατράχου για 5 ημέρες, δύο φορές την ημέρα. Η χλωραμφενικόλη, όπως και η οξυτετρακυκλίνη, είναι αποτελεσματική στην θεραπεία των ψαριών όταν χορηγείται από το στόμα. Ωστόσο η χρήση της απαγορεύεται στις ιχθυοτροφές, γιατί αποτελεί το φάρμακο τελικής επιλογής σε συγκεκριμένες ασθένειες του ανθρώπου, π.χ. τυφοειδής πυρετός. Η αλόγιστη χρήση της χλωραμφενικόλης επιπλέον, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων κατά του φαρμάκου και να μειώσει την αξία του αντιβιοτικού στην ανθρώπινη ιατρική, γι' αυτό και δεν χρησιμοποιείται.

Η κεφτιοφούρη (Naxcel®, The Upjohn and Pharmacia Co.) μια κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς, ανθεκτική στην β-λακταμάση έχει αποδειχθεί επίσης *in vitro* ότι είναι αποτελεσματική έναντι των *Aeromonas* spp. σε διακοσμητικά ψάρια (Dixon & Issavoran, 1992).

Για τον έλεγχο των νοσημάτων που προκαλούνται από τα άτυπα στελέχη *A. salmonicida* λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες, φαίνεται ωστόσο πως οι μέθοδοι θεραπείας που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των νοσημάτων από τυπικά στελέχη *Aeromonas* στα ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών είναι γενικά αποτελεσματικές και για τα άτυπα στελέχη (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Οι διαδικασίες μείωσης του πληθυσμού και απολύμανσης έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για τον έλεγχο των μολύνσεων (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998).

Άλλοι αντιμικροβιακοί παράγοντες που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί στην αντιμετώπιση των μολύνσεων με *Aeromonas* είναι: το οξολινικό οξύ (5-10 mg/kg Σ.Β. ψαριού την ημέρα για 10 ημέρες) (Φώτης, 2003), η σουλφοναμίδη, η

τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, η νεομυκίνη, η νιτροφουραντοΐνη, η νιτροφουραζόνη, η σιπροφλοξακίνη (Wiklund & Dalsgaard, 1998; Groman και συν., 1992) και η καναμυκίνη. Η φλορφενικόλη έχει χρησιμοποιηθεί επίσης στην πέστροφα εναντίον της *A. salmonicida*. Πιο αναλυτικά τα αντιβιοτικά που μπορούν να χορηγηθούν στα ψάρια και οι δόσεις τους φαίνονται στον πίνακα 8.

**Πίνακας 8.** Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των μολύνσεων με *Aeromonas* και οι δόσεις τους (Noga, 2000; Alderman & Michel, 1992)

Αμινογλυκοσίδες (νεομυκίνη, καναμυκίνη): στόμα/λουτρά – 50-80 mg/kg για 10 ημέρες/20 mg/l
Τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη): στόμα/λουτρά – 50-80 mg/kg για 10 ημέρες/20 mg/l
Ενισχυμένες Σουλφοναμίδες (τριμεθοπρίμη+σουλφαδιαζίνη): στόμα – 50 mg/kg για 10 ημέρες
Κινολόνες (οξολινικό οξύ, φλουμικίνη): στόμα – 12 mg /kg για 10 ημέρες
Καναμυκίνη. Εμβάπτιση: 50-100 mg/l νερού κάθε 3 ημέρες για 3 επαναλήψεις. Τροφή: 50 mg/kg Σ.Β./την ημέρα. Ενέσιμα: 20 mg/kg Σ.Β. ip κάθε 3 ημέρες για 14 ημέρες. Σε κάποια είδη είναι τοξική αυτή η δόση και δεν χρησιμοποιείται
Υδρογλωρική οξυτετρακυκλίνη. Λουτρά: 10-50 mg/l νερού για 1 ώρα για επιφανειακές βακτηριακές μολύνσεις. Παρατεταμένη εμβάπτιση: 10-100 mg/l νερού για 1 έως 3 ημέρες. Τροφή: 55-83 mg/kg Σ.Β./την ημέρα για 10 ημέρες. Ενέσιμα: 25-50 mg/kg Σ.Β. im ή ip
Τριμεθοπρίμη-σουλφαδιαζίνη. Ενισχυμένες σουλφοναμίδες: 1 μέρος τριμεθοπρίμη και 5 μέρη σουλφαδιαζίνη. Τροφή: 30-50 mg/kg Σ.Β./την ημέρα για 10 ημέρες. Ενέσιμα: 125 mg/kg Σ.Β. ip
Ορμεθοπρίμη-σουλφαδιμεθοξίνη. Ενισχυμένες σουλφοναμίδες: 5 μέρη σουλφαδιμεθοξίνη και 1 μέρος ορμεθοπρίμη. Τροφή: 50 mg/kg Σ.Β./την ημέρα για 5 ημέρες. Χρόνος αναμονής 42 ημέρες για σολομοειδή και 3 ημέρες για γατόψαρα
Σουλφαμεραζίνη. Τροφή: 200-220 mg/kg Σ.Β./την ημέρα για 14 ημέρες. Χρόνος αναμονής 21 ημέρες
Οξολινικό οξύ. Κινολόνη αποτελεσματική σε όλα τα είδη <i>Aeromonas</i> . Λουτρά: 25 mg/l νερού για 15 λεπτά/2 φορές την ημέρα για 3 ημέρες. Παρατεταμένη εμβάπτιση: 1 mg/l νερού για 24 ώρες. Τροφή: 10 mg/kg Σ.Β./την ημέρα για 10 ημέρες σε ψάρια γλυκού νερού. Δόση έως 30 mg/kg Σ.Β σε ψάρια αλμυρού νερού
Φλουμικίνη. Φλουροκινολόνη. Κυρίως σε διακοσμητικά ψάρια ενυδρείων. Λουτρά: 50-100 mg/l νερού με pH 6.8 ως 7.2 για 3 ώρες. Αποτελεσματικό έναντι της <i>A. salmonicida</i> . Τροφή: 10 mg/kg Σ.Β./την ημέρα για 10 ημέρες. Ενέσιμα: 30 mg/kg Σ.Β. ip
Ενροφλοξακίνη. Φλουροκινολόνη. Κινολόνη δραστική έναντι της <i>A. salmonicida</i> , σε ενυδρεία συνήθως. Λουτρά: 2 mg/l νερού για 5 ημέρες. Τροφή: 10 mg/kg Σ.Β./την

ημέρα για 10 ημέρες. Ενέσιμα: 10 mg/kg Σ.Β. im ή ip κάθε 3 ημέρες

Χλωραμφενικόλη. Είναι αποτελεσματική όταν γίνεται ενέσιμα. Η χρήση της είναι απαγορευμένη σε παραγωγικά ζώα και στα ψάρια σε κάποιες χώρες, όπως και στις Η.Π.Α. Ενέσιμα: 20-50 mg/kg Σ.Β. μια φορά την εβδομάδα για 2 εβδομάδες για την ελκωτική νόσο στο χρυσόψαρο

Τέλος σε περιπτώσεις που οι μολύνσεις με είδη *Aeromonas* στα ψάρια εκδηλώνονται κυρίως με εξωτερικές δερματικές αλλοιώσεις η άμεση αντιμετώπιση με τοπικά απολυμαντικά μπορεί να επιβραδύνει την εξέλιξη της συστηματικής μόλυνσης (Cirriano, 1997). Σκευάσματα όπως το αλάτι, η φορμαλίνη και η χλωραμίνη-T χρησιμοποιούνται σε επίπεδο ρουτίνας για την θεραπεία του σολομού του Ατλαντικού και άλλων ψαριών που προσβάλλονται από εξωτερικά παράσιτα, μύκητες και βακτήρια. Σε μελέτες που έγιναν με θεραπευτικά λουτρά διάρκειας 60 min για 3 ημέρες, η φορμαλίνη (250 ppm), το αλάτι (0.5-0.9%) και η χλωραμίνη-T (15 ppm) αξιολογήθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους απέναντι σε εξωτερικές μολύνσεις που προκαλούνται από την *A. salmonicida* (Cirriano και συν., 1996b). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χλωραμίνη-T ήταν πιο αποτελεσματική απέναντι στην *A. salmonicida* σε σχέση με το αλάτι ή την φορμαλίνη, ενώ η φορμαλίνη χρησιμοποιείται και για την απολύμανση των αυγών. Λουτρά με μπλε του μεθυλενίου και υπερμαγγανικό κάλιο, διάρκειας 30 min μπορούν επίσης να πραγματοποιηθούν.

Όσον αφορά το αλάτι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές περιπτώσεις, όπως: 1) Θεραπεία *Ichthyophthirius*. Παρατεταμένη εμβάπτιση σε ενυδρεία – 2 g αλάτι/l νερού. Κάποια είδη ψαριών γλυκού νερού, όπως τα γατόψαρα είναι ευαίσθητα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιού. 2) Θεραπεία εξωπαρασίτων ψαριών γλυκού νερού, μυξοβακτηριδίασης και βακτηριακής νόσου των βραγχίων. Λουτρά – 10-30 g αλάτι/l νερού για περίπου 30 λεπτά. Σε ευαίσθητα είδη ψαριών ή εξασθενημένα ψάρια οι χαμηλότερες δόσεις και επανάληψη την επόμενη ημέρα. 3) Προληπτικά ή θεραπευτικά για εξωπαρασίτα γλυκού νερού και μυκήτων. Παρατεταμένη εμβάπτιση σε ενυδρεία – 1-5 g αλάτι/l νερού. 4) Αύξηση αλατότητας σε υφάλμυρα ή αλμυρά νερά δεξαμενών. 5) Πρόληψη θνησιμότητας που προκαλείται από στρες σε ψάρια γλυκού νερού. Παρατεταμένη εμβάπτιση. Προσθήκη 3-5 ppt (Noga, 2000).

Τελευταία αρχίζουν να εφαρμόζονται και λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), σε όλα τα είδη και όλα τα στάδια ανάπτυξης των ψαριών, και τα αυγά: 250-500 mg/l (Noga, 2000). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου κυκλοφορεί σαν

διάλυμα 3% (30 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml = 30.000 ppm) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί: 1) Θεραπεία οξείας περιβαλλοντικής υποξίας. Παρατεταμένη εμβάπτιση – 0,25 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διάλυμα/l νερού. 2) Αντιπαρασιτικό για πρωτόζωα εξωπαράσιτα. Πολλά ψάρια δεν αντέχουν αυτή την θεραπεία. Λουτρά – 10 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διάλυμα/l νερού για 10-15 λεπτά. 3) Μυκητοκτόνο για απολύμανση αυγών. Λουτρά – 0,71 έως 1,42 ml 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> διάλυμα/l νερού (250 – 500 ppm) για 15 λεπτά (Noga, 2000).

## 6.2 Πρόληψη

### 6.2.1 Προληπτικά μέτρα

Η αποτελεσματική διαχείριση των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας και των εκκολαπτηρίων καθώς και η διατήρηση των συνθηκών υγιεινής είναι ο καλύτερος τρόπος για την πρόληψη εμφάνισης μολύνσεων και επιζωοτιών από τα είδη *Aeromonas* (Pickering, 1997). Παράγοντες διαχείρισης, όπως η υγιεινή, η απολύμανση μεταφερόμενου υλικού, η διατροφή, η ποιότητα νερού και η ιχθυοπυκνότητα, είναι σημαντικοί για την υγεία και ευζωΐα των ψαριών.

Προληπτικά σε κάθε περίπτωση συνιστάται η μεταφορά ψαριών από εκκολαπτήριο σε εκκολαπτήριο να τηρεί όλους τους κανόνες υγιεινής. Για την εξάλειψη ή την μείωση των συμπτωμάτων των νοσημάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι όπως: η βελτίωση της ποιότητας του νερού (επαρκές οξυγόνο), η θεραπεία των παρασίτων (Cirriano & Bullock, 2001), η αποφυγή διαφυγής ψαριών και επαφή εκτρεφόμενων ψαριών με άγρια, η αποφυγή άσκοπης μετακίνησης προσωπικού και οχημάτων, η απαγόρευση μετακίνησης γεννητόρων ή γόνου, η χρήση UV ακτινοβολίας ή όζοντος στο νερό και η μετακίνηση γονιμοποιημένων αυγών μόνο μετά από απολύμανση.

Η απολύμανση όλων των εργαλείων και μέσων της μονάδας με τα συνήθη απολυμαντικά διαλύματα (υπερμαγγανικό κάλιο 1 gr/50 l νερού) (Φώτης, 2003), οι σωστοί χειρισμοί για την αποφυγή τραυματισμών, η τακτική μικροβιολογική παρακολούθηση και οι συστηματικοί βακτηριακοί έλεγχοι (ειδικά αρχές άνοιξης), η απομόνωση των νεοεισερχόμενων ψαριών (τουλάχιστον 20-25 ημέρες), η αποτροπή εισόδου μολυσμένων ψαριών στο ιχθυοτροφείο, η μείωση παραγόντων στρες, η χορήγηση πλήρους και ισορροπημένης διατροφής, η αποφυγή συνωστισμού, η ρύθμιση θερμοκρασίας νερού και η μείωση της ιχθυοπυκνότητας είναι μέτρα υγιεινής

που θα πρέπει να εφαρμόζονται σε όλες τις μονάδες. Οι Jarp και συνεργάτες, (1993) βρήκαν ότι η μετανάστευση των ανόδρων ψαριών στην παροχή νερού των εκκολαπτηρίων, η υψηλή ιχθυοπυκνότητα άλλων μολυσμένων σταθμών ιχθυοκαλλιέργειας και η κοινή χρήση εξοπλισμού μεταξύ των σταθμών αποτελούν τους πιο σημαντικούς κινδύνους που σχετίζονται με την πρόκληση της δοθιήνωσης (Jarp και συν., 1993).

Εναλλακτικά μέτρα αποτελούν, η χορήγηση διατροφικών συμπληρωμάτων (βιτ. C) και αντιμικροβιακών παραγόντων, η βελτίωση της αντίστασης του γόνου με ανοσοδιεγερτικά, η ανάπτυξη γενετικά ανθεκτικών ψαριών (Austin & Austin, 1999) και η χρήση προβιοτικών και πρεβιοτικών με σκοπό την αλλαγή της μικροχλωρίδας του εντέρου, αναστέλλοντας τον αποικισμό των παθογόνων μικροοργανισμών και μειώνοντας τα περιστατικά νοσημάτων (Irianto & Austin, 2002).

Επιπλέον η μεταφορά μολυσμένων ψαριών θα πρέπει να περιοριστεί, για την αποτροπή διασποράς των νοσημάτων. Η τακτική παρακολούθηση και ο εμβολιασμός αποτελούν επίσης στρατηγικές διαχείρισης στις μονάδες (Adams, 2004). Στην προσπάθεια ελέγχου των μολύνσεων με *Aeromonas* στις ιχθυοκαλλιέργειες τρία κύρια σημεία θα πρέπει να ληφθούν υπόψη: 1) Αποτροπή εισόδου φορέων *Aeromonas*. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να εφαρμοστεί το τεστ που προκαλεί την δοθιήνωση μέσω της επίδρασης του στρες, όπως περιγράφηκε από τους Bullock και Stuckey (1975). Ο εμβολιασμός επίσης αποτελεί ένα πρόσθετο μέτρο πρόληψης. 2) Πρόμηθειες ψαριών. Η πρόμηθεια νέων ψαριών θα πρέπει να γίνεται από εκκολαπτήρια που τηρούν τις σωστές συνθήκες υγιεινής. 3) Η στρατηγική ελέγχου του νοσήματος στα ψάρια. Η στενή παρακολούθηση των ψαριών μετά από μια ξαφνική αύξηση στην θερμοκρασία στην θερμοκρασία είναι πολύ σημαντική. Ταυτόχρονα, μια άμεση βακτηριολογική εξέταση για τον καθορισμό της θεραπείας μπορούν να μειώσουν τις απώλειες (Larsen & Møllergaard, 1981).

### **6.2.2 Μείωση παραγόντων στρες**

Στα συστήματα εντατικών ιχθυοκαλλιεργειών, η πρόκληση νοσημάτων από τα είδη *Aeromonas* οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στην επίδραση του στρες στα ψάρια, που μειώνει την ανοσολογική τους ανταπόκριση και προκαλεί ανοσοκαταστολή. Το στρες προκαλείται κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η κακή διαχείριση, οι χειρισμοί, η ιχθυοπυκνότητα και η κακή ποιότητα νερού. Η αύξηση

της θερμοκρασίας του νερού, η μείωση στην συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, η αύξηση της αμμωνίας και του διοξειδίου του άνθρακα, η υψηλή ιχθυοπυκνότητα προκαλούν στρες στα ψάρια και την εμφάνιση μολύνσεων από *Aeromonas*.

Η ποιότητα του νερού πρέπει να είναι άριστη και ειδικά τα επίπεδα οξυγόνου, αφού τα είδη *Aeromonas* είναι ανερόβια. Αυτό σημαίνει ότι το διαλυμένο οξυγόνο (DO) (5-7 ppm), το pH, η θερμοκρασία και η αλκαλικότητα του νερού πρέπει να είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα, ενώ η αμμωνία, τα νιτρώδη, τα νιτρικά και το διοξείδιο του άνθρακα πρέπει να διατηρούνται στο ελάχιστο. Ο έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών συμβάλλει στην εξάλειψη των παραγόντων στρες και την αποφυγή εμφάνισης νοσημάτων. Σε περίπτωση εμφάνισης της νόσου, τα ψάρια θα πρέπει να μεταφέρονται στις δεξαμενές, μόνο όταν η θερμοκρασία νερού είναι αρκετά υψηλή για να είναι ενεργά τα ψάρια και να τρέφονται φυσιολογικά (Walters & Plumb, 1980).

### **6.2.3 Εφαρμογή προληπτικών μέτρων στα εκκολαπτήρια**

Στα εκκολαπτήρια, η χρήση του όζοντος (Colberg & Lingg, 1978), το φιλτράρισμα του νερού σε συνδυασμό με την χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας (Bullock & Stuckey, 1977) στην παροχή του νερού και η εκπαίδευση του προσωπικού μπορούν να εξαλείψουν σημαντικές πηγές πιθανής μόλυνσης και να προτρέψουν την εμφάνιση του νοσήματος. Οι Colberg και Lingg, (1978) έδειξαν ότι η χρήση όζοντος μπορεί να προκαλέσει 99% θνησιμότητα των βακτηρίων, μετά από επαφή στα 60 sec κατά την διάρκεια συνεχούς ροής έκθεσης στα 0,1-1,0 mg ozone/l νερού.

Τακτικά προγράμματα ελέγχου που ανιχνεύουν την *A. salmonicida* στην παροχή νερού μπορούν να συνδυαστούν με τοπική απολύμανση ή την χρήση αντιβιοτικών που περιορίζουν ή εξαλείφουν την μόλυνση (Cirriano και συν., 1997). Επιπλέον, μόνο τα γονιμοποιημένα αυγά ή ψάρια που έχουν ταυτοποιηθεί ότι είναι ελεύθερα από μολύνσεις με *Aeromonas* θα πρέπει να μεταφέρονται μεταξύ των εγκαταστάσεων. Καλό θα ήταν επίσης να αποφεύγεται η είσοδος των ψαριών στα εκκολαπτήρια που πέρασαν πρόσφατα μια μόλυνση.

Παρτίδες με νέα αυγά από άγνωστες πηγές προέλευσης θα πρέπει να απολυμαίνονται επιφανειακά κατά την άφιξη, και να απομονώνονται, για να αποφευχθεί η μόλυνση άλλων αυγών και του εξοπλισμού των εγκαταστάσεων. Οι Wright και Snow, (1975) βρήκαν πώς τόσο η ακριφλαβίνη (500-700 mg/l για 15 min)

όσο και τα ιωδιούχα, (Betadine) (100-150 mg/l για 15 min) δρουν αποτελεσματικά στην απολύμανση των αυγών, όχι όμως και η φορμαλίνη. Η ιωδιούχος ποβιδόνη αποτελεί το απολυμαντικό επιλογής για την απολύμανση των αυγών πέστροφας και σολομού και είναι εμπορικά διαθέσιμη (Betadine, Wescodyne) περιέχοντας περίπου 1,0% ως 1,6% ενεργό ιώδιο. Οι Piper και συνεργάτες, (1982) πρότειναν πως η απολύμανση των αυγών των σολομοειδών θα πρέπει να γίνεται σε ένα διάλυμα που περιέχει 100 mg ενεργού ιωδίου/l για 10 λεπτά, σε pH 7 και θερμοκρασία 10-15°C, ωστόσο η βακτηριοστατική δράση των ιοδοφόρων μπορεί να επηρεαστεί και από την συγκέντρωση της *A. salmonicida* και τον βαθμό της οργανικής επιμόλυνσης του διαλύματος (Sako και συν., 1988). Τα αυγά θα πρέπει να ξεπλένονται αμέσως μετά την απολύμανση.

Όταν τα ψάρια διατηρούνται σε δεξαμενές, η αξία των απολυμαντικών ή αντιβιοτικών που προστίθενται θα πρέπει να επανεξετάζεται. Τα πιο συνήθη χημικά συστατικά είναι η χλωρεμφενικόλη, η οξυτετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη και ένας συνδυασμός πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης που προστίθεται στο νερό, σε δόση 10-15 mg/l. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρήση και η εφαρμογή αυτών των προφυλακτικών μέτρων πρέπει να συμφωνεί με τους τοπικούς κανονισμούς της κάθε χώρας (Cipriano & Bullock, 2001).

#### **6.2.4 Ανάπτυξη γενετικά ανθεκτικών ψαριών μέσω γενετικής επιλογής**

Προγράμματα επιλεκτικής αναπαραγωγής έχουν αναπτυχθεί στα σολομοειδή για να βελτιώσουν την αντίστασή τους στην δοθειήνωση. Είδη καφέ πέστροφας (*Salvelinus fontinalis*) στον εκκολαπτικό σταθμό ψαριών στην πολιτεία Hackettstown (NJ), στις Η.Π.Α. συλλέχτηκαν με βάση την ανάπτυξη, τον χρωματισμό και την ικανότητα να επιβιώνουν σε φυσικές επιζωοτίες δοθειήνωσης. Οι απόγονοι αυτών αξιολογούνταν συνεχώς για την επίκτητη αντίσταση στο νόσημα και η θνησιμότητα από την δοθειήνωση μειώθηκε από το 98% στο 30.8%, μετά από τέσσερις επιτυχημένες γενιές επιλογής (Naviner και συν., 2006). Οι απόγονοι που εμφάνιζαν αντίσταση αναπτύσσονταν γρηγορότερα από τα μη επιλεγμένα ψάρια, που ανταποκρίνονταν με μια αύξηση στον μέσο αριθμό αυγών η οποία ωστόσο συνοδεύονταν από μια σταδιακή μείωση της βιωσιμότητας των αυγών. Παρόλο που η καφέ πέστροφα απέκτησε αντίσταση στην δοθειήνωση, ωστόσο η γενετική επιλογή



δεν βελτίωσε την αντίσταση στην βακτηριακή νόσο των βραγχίων ή στις μολύνσεις από *Gyrodactylus* και *Chilodonella*.

Πιθανά οι πιο επιτυχημένες μελέτες γενετικής επιλογής περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ανθεκτικών στην δοθιήνωση στελεχών πέστροφας από το New York State Department of Environmental Conservation (Rome, NY). Γενεές ψαριών επιλέχθηκαν με βάση το μέγεθος, τον χρωματισμό και την παραγωγή αυγών. Η αντίσταση ελέγχθηκε σε διάφορα στελέχη με σκοπό την εξάλειψη των ευαίσθητων γενεών ψαριών (Ehlinger, 1977).

Η επίκτητη αντίσταση στην δοθιήνωση της πέστροφας είναι κοινά αποδεκτή και αυτά τα ψάρια χρησιμοποιούνται πλέον σε πολλά προγράμματα στα εκκολαπτήρια, στην Νέα Αγγλία και Μεσο-Ατλαντικές περιοχές για την ικανότητα επιβίωσης τους σε περιοχές που η δοθιήνωση είναι ενζωοτική (Cirriano & Bullock, 2001).

Λεπτομερείς γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κληρονομικότητα της θνησιμότητας μεταξύ οικογενειών του σολομού του Ατλαντικού που συμβιώνουν με μολυσμένες ομάδες ήταν υψηλή, καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως η αντίσταση στην δοθιήνωση μπορεί να βελτιωθεί αποτελεσματικά με την γενετική επιλογή (Gjedrem & Gjoen, 1995). Αυτές οι παρατηρήσεις ήταν σύμφωνες με αυτές των Bailey και συνεργατών, (1993) που επίσης απέδειξαν ότι η κληρονομία χαρακτηριστικών του σολομού του Ατλαντικού για την αντίσταση στην δοθιήνωση ήταν αποτέλεσμα επιλογής. Αντίσταση διαφορετικού βαθμού έχει επίσης σημειωθεί μεταξύ μη σολομοειδών σε απομονώσεις άτυπων στελεχών *A. salmonicida*.

## **6.2.5 Εμβόλια**

### **6.2.5.1 Εισαγωγή**

Τα πρώτα εμβόλια για την πρόληψη των βακτηριακών μολυσματικών ασθενειών στα εκτρεφόμενα ψάρια αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1970 και εισήχθησαν στις υδατοκαλλιέργειες στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Evelyn, 1997). Με την χρήση των εμβολίων, με τα οποία εξασφαλίζεται μεγάλης διάρκειας προστασίας με μία ή δύο το πολύ εφαρμογές, επιτεύχθηκε η μείωση της χρήσης των αντιβιοτικών, και συνεπώς η μείωση του κόστους παραγωγής στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών και η παραγωγή τελικών προϊόντων καλύτερης ποιότητας. Η αποτελεσματικότητα των εμβολιασμών εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως: η

μέθοδος χορήγησης των εμβολίου, η φύση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται, η χρήση έκδοχων, η δόση του εμβολίου, το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών, η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών, η θρεπτική τους κατάσταση και η θερμοκρασία του νερού (Nakanishi & Ototake, 1997).

Στην Ελλάδα, τα κύρια νοσήματα των ψαριών που εντοπίζονται στις ιχθυοκαλλιέργειες και για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια που μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη τους εκτός από την δοθιήνωση είναι: η δονακίωση, η εντερική ερυθροστοματίτιδα και η παστεριδίαση (Αθανασοπούλου, 2006).

#### **6.2.5.2 Χορήγηση εμβολίων**

Ο εμβολιασμός πρέπει να γίνεται σε υγιή ψάρια, τα οποία δεν βρίσκονται σε κατάσταση στρες και δεν υποφέρουν από νοσήματα (Varvarigos, 2003). Η χορήγηση των εμβολίων γίνεται με τρεις κυρίως τρόπους: με ένεση, με εμβάπτιση ή με χορήγηση από το στόμα. Οι μέθοδοι αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το στρες και τους χειρισμούς που υφίστανται τα ψάρια κατά τον εμβολιασμό, καθώς και ως προς τον χρόνο και την εργασία που απαιτείται για την εφαρμογή τους. Η χορήγηση από το στόμα, με αντιγόνο που ενσωματώνεται στην τροφή, θα ήταν η ιδανική μέθοδος, εμφανίζει όμως μειονεκτήματα, όπως: ο βαθμός προστασίας που επιτυγχάνεται είναι μικρός, η ενσωμάτωση του εμβολίου στην τροφή είναι ακριβή και χρειάζεται συνήθως αναμνηστική δόση. Ο εμβολιασμός με την μέθοδο της εμβάπτισης είναι πολύ χρήσιμος για μαζικούς εμβολιασμούς ψαριών και ειδικά μικρών ψαριών. Τα ψάρια βυθίζονται για 20-30 sec σε δεξαμενή που περιέχει το διαλυμένο εμβόλιο (συνήθως 1 λίτρο εμβολίου/100 κιλά ψαριών, σε νερό με αναλογία 1/10), με παροχή οξυγόνου. Ο χρόνος που διαρκεί ο εμβολιασμός είναι μικρός και μειώνει το στρες που υφίστανται τα ψάρια, ενώ το αντιγόνο εισέρχεται στα ψάρια μέσω των βραγχίων ή του δέρματος. Η ανοσία που επιτυγχάνεται με την μέθοδο αυτή είναι γενικά λιγότερο έντονη και μικρότερης διάρκειας σε σχέση με αυτή του εμβολιασμού με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Nakanishi & Ototake, 1997). Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση εξασφαλίζει την καλύτερη και μεγαλύτερη σε διάρκεια προστασία. Με την μέθοδο αυτή εξασφαλίζεται η χορήγηση της σωστής δόσης εμβολιακού αντιγόνου (συνήθως δόση 0,1-0,2 ml) σε κάθε ψάρι, ωστόσο χρησιμοποιείται μόνο σε ψάρια μεγέθους άνω των 10 γραμμαρίων. Απαιτεί μεγάλο

χρόνο εργασίας και σε συνδυασμό με τα πηκτά ελαιώδη έκδοχα μπορεί να προκαλέσει συμφύσεις αν δεν γίνει σωστή χορήγηση (Ellis, 1997).

### 6.2.5.3 Κατηγορίες εμβολίων

Σήμερα υπάρχουν πολλές κατηγορίες εμβολίων, τα οποία κατασκευάζονται με διαφορετικό τρόπο ώστε να προκαλούν στα ψάρια ανοσία κατά των παθογόνων παραγόντων: 1) Εμβόλια που αποτελούνται από ολόκληρα αδρανοποιημένα κύτταρα. Σχεδόν όλα τα διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια είναι αυτού του τύπου (Ellis, 1997). 2) Εμβόλια υπομονάδων, παρασκευάζονται από ένα τμήμα μόνο του παθογόνου μικροοργανισμού, το οποίο προκαλεί την ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας. 3) Ζωντανά ανασυνδυασμένα εμβόλια, περιλαμβάνουν μη παθογόνα γένη των παθογόνων μικροοργανισμών για τα ψάρια, που έχουν υποστεί γενετική εξασθένιση. 4) Γενετικά εμβόλια, στηρίζονται στην έγχυση πλασμιδιακού DNA των παθογόνων μικροοργανισμών μέσα στους σκελετικούς μύες των ψαριών.

### 6.2.5.4 Εμβολιασμοί κατά των μολύνσεων με *Aeromonas* spp.

Ο εμβολιασμός αποτελεί σήμερα το κύριο μέτρο πρόληψης για την δοθιήνωση των σολομοειδών. Τα πρώτα αποτελεσματικά εμβόλια εμφανίστηκαν στην αγορά λίγο μετά το 1992. Όλα τα εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια που κυκλοφορούν για την *A. salmonicida*, προέρχονται από τυπικά στελέχη *A. salmonicida* για την πρόληψη της τυπικής δοθιήνωσης στα σολομοειδή, ωστόσο παρέχουν προστασία και έναντι των άτυπων στελεχών. Υπάρχουν ενδείξεις διασταυρούμενης ανοσίας έναντι άτυπων στελεχών στον σολομό του Ατλαντικού που εμβολιάζεται με το εμβόλιο της τυπικής δοθιήνωσης (Gudmundsdóttir & Gudmundsdóttir, 1997). Η ορολογική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ στελεχών *A. salmonicida* (Paterson και συν., 1980) δείχνει πως η ανοσοποίηση των ψαριών έναντι άτυπων μορφών του παθογόνου μπορεί να συμβεί. Οι Jones και συνεργάτες, (1996) παρατήρησαν ότι ο εμβολιασμός έναντι της τυπικής δοθιήνωσης προστατεύει και έναντι άτυπων στελεχών *A. salmonicida* στα σολομοειδή και κυπρινοειδή. Από το 1992 έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης αποτελεσματικά αυτεμβόλια που περιείχαν αντιγόνα από *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* για τον εμβολιασμό σολομοειδών (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998).

Τα τελευταία χρόνια, κυκλοφορούν εμβόλια με ελαιώδη έκδοχα, υδατικά καθώς και ανασυνδυασμένα εμβόλια. Τα εμβόλια που συνήθως χρησιμοποιούνται εναντίον της δοθιήνωσης είναι ενέσιμα αντιγόνα βακτηρίων με ελαιώδη ανοσοενισχυτικά και μπορούν να πραγματοποιηθούν με εμβάπτιση (τα ψάρια βυθίζονται στο διάλυμα για 30-120 sec), με ένεση (0,1 ml) ενδοπεριτοναϊκά και με την τροφή. Συμπληρωματικοί εμβολιασμοί μπορούν επίσης να πραγματοποιηθούν (Austin & Austin, 1999). Τα εμβόλια με ελαιώδη έκδοχα που γίνονται ενδοπεριτοναϊκά φαίνεται πως παρέχουν προστασία μακράς διάρκειας και η χρήση τους προωθείται περισσότερο στις εμπορικές ιχθυοκαλλιέργειες (Ellis, 1997).

Όσον αφορά την προστασία από την *A. hydrophila* αρχικά κατασκευάστηκαν μονοδύναμα εμβόλια, παρέχοντας ικανοποιητικά επίπεδα προστασίας έναντι της μόλυνσης με ομόλογα βακτήρια. Τα ψάρια ωστόσο, δεν αποκτούσαν ανοσία στην μόλυνση με ετερόλογα στελέχη *A. hydrophila* (Post, 1966). Παρόλο που μερικά στελέχη κινητών ειδών *Aeromonas* έχουν κοινά σωματικά αντιγόνα (Lallier και συν., 1981), έχει αποδειχτεί ότι ένας μονοδύναμος αντιορός μπορεί να προκαλέσει οροσυγκόλληση σε ένα μικρό ποσοστό απομονώσεων.

Ο Schachte, (1978) επίσης βρήκε ότι η χορήγηση του εμβολίου ενέσιμα ή με εμβάπτιση ή *per os* διέγειρε διαφορετική κινητική στην παραγωγή αντισωμάτων. Οι Thune και Plumb, (1982) βρήκαν ότι ο εμβολιασμός του γόνου με εμβάπτιση, με πολυδύναμο εμβόλιο παρείχε προστασία έναντι ομόλογων βακτηρίων, αποδεικνύοντας μια άμεση ανοσολογική ανταπόκριση στο γατόψαρο των καναλιών, η οποία είναι χρήσιμη για τον έλεγχο μολύνσεων της *A. hydrophila*. Επίσης οι Thune και Plumb, (1982) απέδειξαν ότι ο ενέσιμος εμβολιασμός υπερείχε της εμβάπτισης ή της *per os* χορήγησης.

Η ανάπτυξη ανοσίας επηρεάζεται και από τις συνθήκες περιβάλλοντος. Τόσο τα υδατικά όσο και τα ελαιώδη εμβόλια παράγονται εμπορικά και μπορούν να προκαλέσουν ανοσία σε θερμοκρασίες νερού χαμηλές, όπως 2°C. Οι Eggset και συνεργάτες, (1997) παρατήρησαν πως παρόλο που η αντίδραση των αντισωμάτων στην *A. salmonicida* καθυστερούσε ή καταστέλλονταν σε αυτή την θερμοκρασία, η προστασία παρέμενε ικανοποιητική ακόμη και 18 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Έχει αποδειχθεί ότι η προστασία που παρέχεται από τα βακτήρια της *A. salmonicida* είναι καλύτερη, όταν η *A. salmonicida* χορηγείται σαν συστατικό ενός πολυδύναμου εμβολίου, που περιέχει και άλλα βακτήρια, όπως *Vibrio* spp. (Evelyn, 1997).

Επιπλέον παρά το γεγονός ότι τα εμβόλια με ελαιώδη έκδοχα παρέχουν υψηλότερη προστασία από τα υδατικά εμβόλια, τα ελαιώδη εμβόλια μπορούν να προκαλέσουν σε μεγαλύτερο βαθμό ενδοκοιλιακές συμφύσεις μεταξύ των εσωτερικών οργάνων και του κοιλιακού τοιχώματος κοντά στο σημείο της ένεσης και να μειώσουν τον ρυθμό ανάπτυξης (Midtlyng, 1994).

Εξαιτίας της αντιγονικής ποικιλότητας που υπάρχει στην ομάδα *Aeromonas* spp., πρόσθετες στρατηγικές εμβολιασμού περιλαμβάνουν την έρευνα στην ανάπτυξη πολυδύναμων εμβολίων, την ανοσοποίηση έναντι ανενεργών εξωκυτταρικών ανατοξινών, και την ανάπτυξη εμβολίων που αποτελούνται από κυτταρικά αντιγόνα και ανατοξίνες.

## **7. ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΕΙΔΩΝ *AEROMONAS* ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ**

### **7.1 Εισαγωγή**

Αν και έχουν περάσει περισσότερα από 100 χρόνια από τότε που ανακαλύφθηκαν τα είδη *Aeromonas* spp., μόλις τις τελευταίες 3 δεκαετίες, έχει αναμφίβολα αποδειχθεί ο ρόλος τους στην πρόκληση νοσημάτων στον άνθρωπο (Janda & Abbott, 1998). Τα είδη *Aeromonas* αναγνωρίζονται σήμερα σαν τα αίτια πρόκλησης ενός μεγάλου φάσματος ασθενειών στον άνθρωπο, στα ζώα, στα αμφίβια, στα ερπετά και στα ψάρια (Ghenghesh και συν., 2008). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τα είδη *Aeromonas* έχει ξεπεράσει τα όρια της ιχθυοπαθολογίας, εξαιτίας της αύξησης των νοσημάτων στον άνθρωπο, που προκαλούνται από αυτούς τους παράγοντες (Janda, 1991).

Στον άνθρωπο τα είδη *Aeromonas* spp. μπορούν να προκαλέσουν εντερικές ή εξωεντερικές μολύνσεις, έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για μολύνσεις τραυμάτων, σηψαιμία και εξάρσεις τροφογενούς γαστρεντερίτιδας. Ένα πλήθος νοσημάτων έχει συνδεθεί με τις μολύνσεις με *Aeromonas*, όπως η γαστρεντερίτιδα, οι μολύνσεις τραυμάτων, η σηψαιμία, οι μολύνσεις των πνευμόνων κ.ά. Η πλειονότητα αυτών των μολύνσεων στον άνθρωπο οφείλεται στα είδη *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veroni* biovar *sobria*, *A. jandaei*, και *A. schubertii*, τα οποία αναγνωρίζονται σήμερα σαν ανθρώπινα παθογόνα (Ghenghesh και συν., 2008; Janda & Abbott, 1998).

## 7.2 Παθογόνος δράση

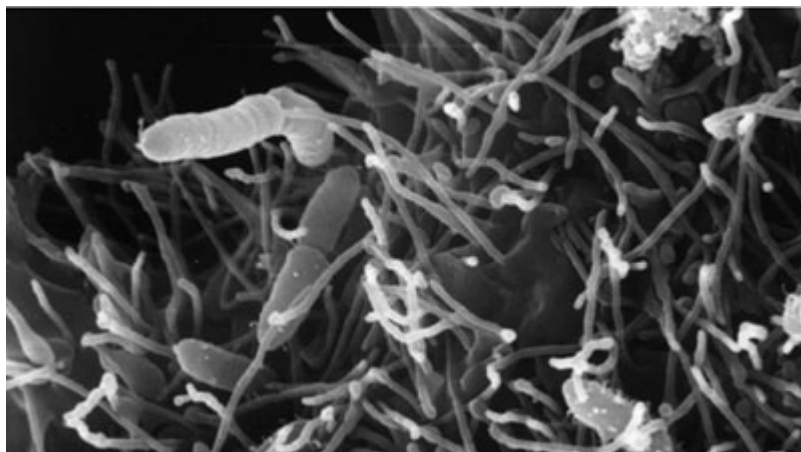
Στον άνθρωπο ένας αριθμός λοιμογόνων παραγόντων που σχετίζονται με την παθογένεια των μολύνσεων με *Aeromonas* spp. έχουν περιγραφεί. Η λοιμογόνος ικανότητα των *Aeromonas* spp. είναι πολυπαραγοντική και δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή, έως σήμερα. Τα είδη *Aeromonas* spp. έχει αναφερθεί ότι παράγουν μια ποικιλία εξωκυτταρικών προϊόντων, όπως εξωτοξίνες (αερολυσίνες/αιμολυσίνες, κυτταροτοξίνες, εντεροτοξίνες), αιμοσυγκολλητίνες, συγκολλητίνες, και διάφορα υδρολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες, λιπάσες, ελαστάσες, proteases, DNάσες) (Janda & Abbott, 1996; Watson και συν., 1985). Η αιμολυσίνη που παράγεται από ορισμένα είδη *Aeromonas* spp. (γνωστή και ως αερολυσίνη) έχει αποδειχθεί ότι έχει αιμολυτική και εντεροτοξική δράση (Ghenghesh και συν., 2008). Οι Burke και συνεργάτες, (1982) βρήκαν ότι 97% των στελεχών που παράγουν αιμολυσίνη είναι ικανά να εκκρίνουν εντεροτοξίνες. Έχει επίσης αναφερθεί μια συσχέτιση μεταξύ παραγωγής αιμολυσίνης και κυτταροτοξίνης, όπως στην *A. hydrophila* όπου λοιμογόνα στελέχη παράγουν τοξίνες που είναι κυτταροτοξικές και προκαλούν ταυτόχρονα αιμόλυση.

Ωστόσο, ο ρόλος τους στην παθογένεια των μολύνσεων απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Η εντεροπαθογόνος ιδιότητα των *Aeromonas* σχετίζεται με την παραγωγή της κυτταροτοξικής εντεροτοξίνης και της αιμολυσίνης (Cumberbatch και συν., 1979), ειδικά στα είδη *A. hydrophila*, και *A. sobria*, τα οποία είναι σημαντικά εντερικά παθογόνα (Janda, 1985). Οι Asao και συνεργάτες, (1984) υποστηρίζουν ότι η αιμολυσίνη των *Aeromonas* είναι μια κυτταροτοξική εντεροτοξίνη. Η αιμολυτική εντεροτοξίνη εμφανίζει σημαντική ομολογία με την κυτταροτοξική εντεροτοξίνη (Act), και δύο κυτταροτοξικές τοξίνες (Alt και Ast) (Chopra & Houston, 1999). Ο ρόλος της Act στην παθογένεια των μολύνσεων με *Aeromonas* καθώς και η εντεροτοξική δράση των *Aeromonas* spp. μπορεί να αξιολογηθεί πραγματοποιώντας μια ανάλυση CAMP (Ghenghesh και συν., 2008).

Στα εντερικά βακτήρια, η αιμοσυγκόλληση των ερυθροκυττάρων συνδέεται και με την ικανότητα προσκόλλησης στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Σε άλλες περιπτώσεις, οι εξωτερικές πρωτεϊνικές μεμβράνες, το O-αντιγόνο, και η κινητικότητα έχει αποδειχθεί ότι βοηθάνε στην *in vitro* προσκόλληση των *Aeromonas* spp. στα κύτταρα των ανθρώπων και ψαριών (Francki & Chang, 1994) (Εικόνα 11).

Τα αποτελέσματα από διάφορες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ της παραγωγής αιμολυσίνης, εντεροτοξίνης και περιστατικών διάρροιας (Cumberbatch και συν., 1979) στον άνθρωπο. Μερικά στελέχη έχει

αναφερθεί επίσης ότι εισβάλλουν στα επιθηλιακά κύτταρα και ότι ένας από τους κύριους λοιμογόνους παράγοντες στην γαστρεντερίτιδα είναι η αερολυσίνη (Chu & Lu, 2005).



**Εικόνα 11.** Προσκόλληση *Aeromonas hydrophila* σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο(400×225) (<http<sup>11</sup>//microbewiki.kenyon.edu>).

**Πίνακας 9.** Σημαντικά γεγονότα στην εξέλιξη των ειδών *Aeromonas* ως παθογόνα για τον άνθρωπο

Ημερομηνία	Αναφορές	Γεγονότα
1891	Sanarelli, 1891	Είδη <i>Aeromonas</i> συνδέονται με το νόσημα ‘red leg’ στον βάτραχο
1936	Kluyver, van Niel, 1936	Πρόταση του γένους <i>Aeromonas</i>
1954	Hill, Caselitz, Moody, 1954	Πρώτο περιστατικό νοσήματος στον άνθρωπο που συνδέεται με τα είδη <i>Aeromonas</i> (οξεία μεταστατική μυοσίτιδα)
1964	Rosner, 1964	Πρώτο περιστατικό διάρροιας στον άνθρωπο που συνδέεται με τα είδη <i>Aeromonas</i>
1965	Véron, 1965	Πρόταση να συμπεριληφθούν τα είδη <i>Aeromonas</i> στην οικογένεια Vibrionaceae
1968	von Graevenitz, Mensch, 1968	Πρώτη μεγάλη αναφορά μολύνσεων από <i>Aeromonas</i> που συνδέεται με εκδήλωση ποικίλων νοσημάτων

1980	von Graevenitz, 1980	Σύνδεση των <i>Aeromonas</i> με τρεις κύριους τύπους μολύνσεων (διάρροια, μολύνσεις τραυμάτων και γαστρεντερίτιδα)
1976	Popoff, Véron, 1976	Γένος <i>Aeromonas</i> γενετικά ετερόγενο σε επίπεδο ειδών
1981	Popoff, Coynault, Kiredjian, Lemelin, 1981	Το ίδιο
1986	Colwell, MacDonell, De Ley, 1986	Πρόταση για την τοποθέτηση των <i>Aeromonas</i> στην δική τους οικογένεια

### 7.3 Περιστατικά μόλυνσης στον άνθρωπο

Οι πηγές μόλυνσης για τον άνθρωπο μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: η πρώτη περιλαμβάνει το σύμπλεγμα περιβάλλον-νερό-ζώα, και η δεύτερη την λήψη μολυσμένης τροφής. Από τα είδη *Aeromonas* spp., κυρίως οι *A. hydrophila*, *A. veroni* biovar *sobria* και *A. caviae* απομονώνονται από κλινικά περιστατικά, πηγές νερού και τρόφιμα τόσο στις αναπτυσσόμενες χώρες όσο και στις ανεπτυγμένες χώρες (Janda & Abbott, 1998). Στις αναπτυσσόμενες χώρες, παθογόνα είδη *Aeromonas* εντοπίζονται συχνά στο πόσιμο νερό και σε διάφορους τύπους τροφών, ειδικά στα θαλασσινά (Ghenghesh και συν., 2008). Οι περισσότερες μελέτες σε περιστατικά γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο, σχετίζονται με την μόλυνση μέσω του νερού και των τροφών. Ο ρόλος των *Aeromonas*, και ιδιαίτερα της *A. hydrophila*, ως ανθρώπινα παθογόνα και η μετάδοσή τους έχει επανεξεταστεί τα τελευταία χρόνια, καθώς η απομόνωση υψηλά λοιμογόνων στελεχών αυξάνεται (Πίνακας 9).

Τα είδη *A. sobria* και *A. hydrophila* έχει βρεθεί ότι αποτελούν τα πιο κοινά εντερικά παθογόνα σε ανθρώπους με διάρροια (Daily και συν., 1981). Τα είδη *Aeromonas* αποτελούν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας στα ψάρια και αμφίβια, ωστόσο δεν αποτελούν μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου. Οι Araujo και συνεργάτες, (1991) έχουν αποδείξει ότι περίπου 1% υγιών ενήλικων ανθρώπων μπορούν να είναι φορείς.

Η *A. hydrophila* απομονώθηκε για πρώτη φορά από ανθρώπινα κόπρανα το 1937, από τους Miles και Halnan, (1937), ενώ συνδέθηκε για πρώτη φορά με περιστατικό σοβαρής γαστρεντερίτιδας, το 1961 στην Κολομβία (Martinez-Silva και



συν., 1961). Από τότε πολλά περιστατικά μολύνσεων και νοσημάτων από *Aeromonas* έχουν αναφερθεί παγκοσμίως. Σε μια έρευνα από τον George και συνεργάτες, (1985) φάνηκε μια μεγάλη διαφοροποίηση στους αριθμούς των *Aeromonas* που απομονώθηκαν από ανθρώπους με διάρροια ( $10^3$ – $10^{10}$  cfu/gr κοπράνων) ή ανθρώπους χωρίς διάρροια ( $10^5$ - $10^6$  cfu/g), σε διάφορες περιόδους. Αυτό δείχνει ότι συγκεκριμένα στελέχη σε υψηλές συγκεντρώσεις ( $10^9$  cfu/g) μπορούν να προκαλέσουν γαστρεντερίτιδα. Η μολυσματική δόση του οργανισμού ωστόσο, παραμένει άγνωστη.

Παρόλο που η *A. hydrophila* μπορεί να προκαλέσει σοβαρό νόσημα στον άνθρωπο, δεν υπάρχουν σοβαρές εξάρσεις του νοσήματος, έως σήμερα. Τον Μάιο του 1988, εμφανίστηκε μια μικρή έξαρση μολύνσεων με *A. hydrophila* στην Καλιφόρνια (<http><sup>9</sup>). Σε ένα άλλο περιστατικό, τον Δεκέμβριο του 2004 στην Νότια Ταϊλάνδη, μετά το φονικό τσουνάμι, περίπου 800 ασθενείς μεταφέρθηκαν σε νοσοκομεία στην Μπαγκόκ. Από αυτούς τους ασθενείς 500 περίπου, εμφάνισαν μολύνσεις με *Aeromonas* spp. στο δέρμα και στους μαλακούς ιστούς (Hiransuthikul και συν., 2005). Πρόσφατα, οι Hofer και συνεργάτες, (2006) ανέφεραν ένα περιστατικό οξείας διάρροιας, με 2.170 περιπτώσεις μόλυνσης στο (Sao Bento do Una, Pernambuco), στην Βραζιλία. Ανιχνεύτηκαν *Aeromonas* spp. στο 19,5% των 582 δειγμάτων κοπράνων που εξετάστηκαν. Άλλα εντεροπαθογόνα ανιχνεύτηκαν στο 5,3%. Παρόλο που η πηγή της μόλυνσης δεν καθορίστηκε, προτάθηκε ωστόσο πως η χρήση του ακατέργαστου πόσιμου νερού και οι κακές συνθήκες υγιεινής ήταν υπεύθυνες για την μόλυνση (Hofer και συν., 2006).

Από το 1980, περισσότερες από 2.000 ερευνητικές και πάνω από 10 βιβλιογραφικές μελέτες στις μολύνσεις με *Aeromonas* έχουν αναφερθεί και η πλειονότητα αυτών προέρχονται από αναπτυγμένες χώρες. Παρόλο που ένας μεγάλος αριθμός εξαιρετικών βιβλιογραφικών μελετών σε θέματα μικροβιολογίας, λοιμογόνων χαρακτηριστικών, και μολυσματικών νοσημάτων που συνδέονται με το γένος *Aeromonas* έχουν δημοσιευτεί από το 1990, ο μεγάλος αριθμός αλλαγών ταξινόμησης του γένους, σε συνδιασμό με τα ενδιαφέροντα περιστατικά νοσημάτων αποδεικνύει μια επανεκτίμηση του ρόλου των *Aeromonas* σαν αιτία ανθρώπινων νοσημάτων (Janda & Abbott, 1998; Janda, 1991).

Προς το παρόν, τα βακτήρια του γένους *Aeromonas* εντάσσονται στην λίστα του F.D.A. (Food and Drugs Administration) ως "Τροφιμογενείς Παθογόνοι Μικροοργανισμοί" (Foodborne Pathogen Microorganisms), (Anon., 1998a). Σύμφωνα

με τους Merino και συνεργάτες, (1995), θα πρέπει να θεωρούνται "αναδυόμενοι κίνδυνοι" στην ομάδα των τροφιμογενών νοσημάτων. Ωστόσο, αυτή η άποψη είναι μάλλον αμφιλεγόμενη. Μέχρι σήμερα, οι μολύνσεις του ανθρώπου με *Aeromonas* είναι σποραδικές με μικρή συχνότητα, και δεν είχαν φτάσει σε ένα κρίσιμο όριο όμοιο με αυτό στο οποίο έφτασαν άλλα τροφιμογενή παθογόνα, κυρίως εντεροπαθογόνα, όπως η *E. coli* ή η *Salmonella enteritidis* (Πίνακας 10).

**Πίνακας 10.** Ταξινόμηση των ειδών του γένους *Aeromonas*, σύμφωνα με την παθογένεια τους στον άνθρωπο\* (Janda & Abbott, 1998; Janda, 1991).

Πρωταρχικά παθογόνα	Δευτερεύοντα παθογόνα	Περιβαλλοντικά παθογόνα†
<i>A. hydrophila</i> (HG 1)	<i>A. veronii</i> bt <i>veronii</i> (HG 10)	<i>A. salmonicida</i> (HG 3)
<i>A. caviae</i> (HG 4)	<i>A. jandaei</i> (HG 9)	<i>A. sobria</i> (HG 7)
<i>A. veronii</i> bt <i>sobria</i> (HG 8)	<i>A. schubertii</i> (HG 12)	<i>A. media</i> (HG 5)
		<i>A. eucrenophila</i> (HG6)
		<i>A. trota</i>
		<i>A. allosaccharophila</i>
		<i>A. encheleia</i> (HG 11)
		<i>A. bestiarum</i> (HG 2)

HG = ομάδα υβριδοποίησης, bt = βιότυπος.

\* Με βάση την συχνότητα των περιστατικών παρά την ύπαρξη των νοσημάτων.

† Περιλαμβάνει δείγματα κυρίως από το νερό, ψάρια, άλλα ζώα και βιομηχανικές πηγές.

#### 7.4 Συμπτώματα

Οι μολύνσεις στον άνθρωπο από είδη *Aeromonas* συμβαίνουν συνήθως κατά την διάρκεια των θερμών περιόδων του χρόνου. Στον άνθρωπο, το βακτήριο μπορεί να μεταδοθεί μέσω της πεπτικής οδού, καθώς και με την επαφή με μολυσμένο νερό, τροφές, έδαφος και κόπρανα (<http><sup>12</sup>). Η γαστρεντερίτιδα, προκαλείται συνήθως με την κατανάλωση μολυσμένου νερού και τροφών (κυρίως ψαριών) ενώ οι μολύνσεις τραυμάτων λόγω της έκθεσης σε μολυσμένο νερό (<http><sup>10</sup>). Οι βδέλλες (είδη *Aeromonas* συμβιώνουν μαζί τους) φαίνεται να παίζουν επίσης ρόλο στην μετάδοση των *Aeromonas* στον άνθρωπο.

Από τα είδη *Aeromonas* που υπάρχουν τουλάχιστον 10 από αυτά έχουν αναγνωριστεί σε νοσήματα ανθρώπων, κυρίως μεσόφιλα κινητά είδη, με τα πιο σημαντικά είδη, όπως έχει ήδη αναφερθεί να είναι τα: *A. hydrophila*, *A. caviae* και *A. veronii* biovar *sobria*. Στον άνθρωπο τέσσερις κατηγορίες νοσημάτων είναι σήμερα γνωστές:

1. Γενικευμένη μόλυνση κατά την οποία οι οργανισμοί μεταφέρονται μέσω του αίματος (σηψαιμία) σε άτομα με ανοσοκαταστολή ή σε άτομα με κάποια σοβαρή υποκείμενη νόσο,
2. Γαστρεντερίτιδα με διάρροια,
3. Μολύνσεις τραυμάτων ή κυτταρίτιδα, που σχετίζονται με την έκθεση στο νερό ή στο χώμα,
4. Εξωεντερικές μολύνσεις όπως μηνιγγίτιδα, περιτονίτιδα, ωτίτιδα ή μολύνσεις των οφθαλμών ή της ουροποιητικής οδού.

#### 7.4.1 Γενικευμένη μόλυνση

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μολύνσεις γίνονται πιο σοβαρές σε ασθενείς που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Προσβάλλονται κυρίως ασθενείς σε ανοσοκαταστολή, και νεογέννητα κάτω των 2 χρόνων με υποκείμενες συνήθως νόσους. Οι πιο συχνές υποκείμενες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την εμφάνιση σηψαιμίας από *Aeromonas* είναι: τα κακοήθη νεοπλάσματα (40%–50%), οι ηπατοπάθειες, η κίρρωση του ήπατος (15%–30%) (Κο και συν., 1995), και ο διαβήτης (3%–5%), καθώς και τα τραύματα, οι καρδιακές παθήσεις, οι γαστρεντερικές διαταραχές, η αναιμία και τα αναπνευστικά προβλήματα. Το ποσοστό θνησιμότητας σε αυτές τις περιπτώσεις κυμαίνεται μεταξύ 25% και 50% (Janda & Abbott, 1998).

Δύο άλλες ευαίσθητες ομάδες ασθενών είναι οι ασθενείς που αναπτύσσουν σήψη και μυνέκρωση λόγω σοβαρών τραυματικών αλλοιώσεων με δυσμενή πρόγνωση και οι ασθενείς χωρίς υποκείμενη νόσο που εκτίθενται σε πηγές γλυκού νερού και αναπτύσσουν βακτηριαμία (Janda & Abbott, 1998). Έχει αποδειχθεί ότι οι μολύνσεις με *Aeromonas* αποτελούν κύριο παθογόνο αίτιο σηψαιμίας σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος με τελική κατάληξη τον θάνατο (Qu και συν., 2003). Τα κύρια κλινικά συμπτώματα σε αυτή την περίπτωση είναι πυρετός, ρίγος, κοιλιακός πόνος, διάρροια και καταπληξία.

Η *A. hydrophila* σε ανθρώπους με ανοσοκαταστολή μπορεί να προκαλέσει σηπτική αρθρίτιδα, διάρροια, έλκη στον κερατοειδή, μολύνσεις στο δέρμα και σε τραύματα, μηνιγγίτιδα και σοβαρή σηψαιμία (Davis και συν., 1978). Η σηψαιμία μπορεί να εμφανιστεί και ως αποτέλεσμα της μόλυνσης τραυμάτων ή με τα νύγματα

βδελλών, με την *A. hydrophila* να εμπλέκεται πιο συχνά σε περιπτώσεις σηψαιμίας και διαρροιών (Janda & Abbott, 1998).

#### 7.4.2 Γαστρεντερίτιδα

Η σημασία των ειδών *Aeromonas* σαν αίτιο νοσημάτων στον άνθρωπο έχει πλέον καθιερωθεί. Περιστατικά νοσημάτων με διάρροια που προκαλούνται από τα είδη *Aeromonas* εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στις αναπτυσσόμενες χώρες από ότι στις ανεπτυγμένες χώρες. Υπάρχει μια ομοφωνία μεταξύ των ερευνητών πως συγκεκριμένα στελέχη *Aeromonas* με τους κατάλληλους λοιμογόνους παράγοντες, αποτελούν εντερικά παθογόνα για τον άνθρωπο. Τρία είδη, τα *A. hydrophila*, *A. caviae* και *A. veronii* biovar *sobria* θεωρούνται κυρίως υπεύθυνα για την ανθρώπινη γαστρεντερίτιδα.

Η διάρροια που οφείλεται σε μόλυνση με *Aeromonas* κλινικά μπορεί να εκδηλωθεί με διάφορους τρόπους. Πιο συχνά εμφανίζεται η υδαρής και αυτοπεριοριζόμενη διάρροια. Ωστόσο, μερικοί ασθενείς μπορεί να εμφανίσουν πυρετό, έμετο, κοιλιακό πόνο και αιμορραγική διάρροια. Η αφυδάτωση μπορεί να συνοδεύει τα παραπάνω συμπτώματα. Αίμα στα κόπρανα που είναι ενδεικτικό δυσεντερίας και βλέννα μπορεί να βρεθούν, ενώ η διάρροια μπορεί να διαρκέσει 2-10 ημέρες (Ghenghesh και συν., 1999). Η δυσεντερία θεωρείται πιο σοβαρή και μπορεί να κρατήσει για πολλές εβδομάδες. Στα παιδιά η γαστρεντερίτιδα εμφανίζεται συνήθως σαν οξεία, σοβαρή ασθένεια ενώ στους ενήλικες εμφανίζεται σαν χρόνια διάρροια (<http><sup>10</sup>). Η διάρροια που μοιάζει με αυτήν της χολέρας και συνδέεται με μόλυνση με *Aeromonas* έχει επίσης αναφερθεί. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν μη αιμορραγική υδαρή διάρροια και αφυδάτωση. Η διάρροια μπορεί να είναι χρόνια και να διαρκέσει μήνες, ενώ μπορεί να εξελιχθεί σε σοβαρή σηψαιμική κατάσταση, ειδικά σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή.

Πρόσφατα, η εμφάνιση ενός αιμολυτικού–ουραιμικού συνδρόμου (Haemolytic Uremic Syndrome) μετά από ένα περιστατικό γαστρεντερίτιδας με *Aeromonas* έχει περιγραφεί (Janda & Abbott, 1998). Αυτό το σύνδρομο εκδηλώνεται με αιματηρή διάρροια και κοιλιακό πόνο και εμφανίζει πολλές ομοιότητες με αυτό που προκαλείται από την *E. coli* O157:H7. Οφείλεται σε μια κυτταροτοξίνη των *Aeromonas* που γενετικά και αντιγονικά διαφέρει από την κυτταροτοξίνη της *E. coli*.

Στις μέρες μας, η δυσκολία στην αναγνώριση στελεχών *Aeromonas* στα τρόφιμα αποτελεί ένα δίλημμα για την δημόσια υγεία. Αρκετές τροφιμογενείς και νοσοκομιακές λοιμώξεις που σχετίζονται με *Aeromonas* έχουν αναφερθεί, ενώ απομονώνονται συχνά από ασθενείς που εμφανίζουν την γνωστή ως “διάρροια των ταξιδιωτών” (Ghenghesh και συν., 2008).

### 7.4.3 Μολύνσεις τραυμάτων/κυτταρίτιδα

Τα είδη *Aeromonas*, ειδικά η *A. hydrophila* έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για μολύνσεις τραυμάτων σε περιβάλλον γλυκού νερού. Οι μολύνσεις μαλακών ιστών, μετά από τραύματα ειδικά στα άκρα είναι οι πιο συχνές. Οι μολύνσεις στο δέρμα από *Aeromonas* μπορεί να είναι αποτέλεσμα και επιπλοκών σε εγκαύματα ασθενών (Janda & Abbott, 1998). Οι δερματικές μολύνσεις από *Aeromonas* μπορεί να προκληθούν και από δαγκώματα ερπετών. Τα φίδια μπορούν να μολυνθούν, να μεταφέρουν το βακτήριο στο στόμα ή στο δηλητήριο τους και να το μεταδώσουν με τα δαγκώματά τους.

Αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν μολύνσεις στο δέρμα, στους μαλακούς ιστούς και την λεγόμενη κυτταρίτιδα (cellulitis), μια μόλυνση που προκαλεί φλεγμονή στον ιστό του δέρματος. Μπορούν να προκαλέσουν επίσης μυονέκρωση και έκζεμα σε ανθρώπους με ανοσοκαταστολή, ειδικά στα άκρα (<http><sup>9</sup>). Ο πιο συχνός τρόπος μόλυνσης είναι μέσω μιας ανοιχτής πληγής σε μολυσμένο νερό. Τέτοια τραύματα προκαλούνται συνήθως με δραστηριότητες στο νερό, όπως κολύμβηση, κατάδυση, ψάρεμα κ.ά. Τα ήπια συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό και ρίγος. Ασθενείς με σηπτικές μολύνσεις εμφανίζουν πόνο στην κοιλιά, ναυτία, εμετό και διάρροια.

Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι μολυσμένων τραυμάτων από *A. hydrophila* στον άνθρωπο: η κυτταρίτιδα, η μυονέκρωση και το γαγγραινώδες έκθυμα. Οι μολύνσεις τραυμάτων μπορεί να είναι επιφανειακές ή πιο βαθιές, προσβάλλοντας μύες, τένοντες, αρθρώσεις. Η κυτταρίτιδα είναι ο πιο κοινός τύπος και πρόκειται για φλεγμονή του υποδόριου ιστού. Η μυονέκρωση και το γαγγραινώδες έκθυμα εμφανίζονται πιο σπάνια, αλλά έχουν χειρότερες επιπτώσεις και πιο δυσμενή πρόγνωση. Η κυτταρίτιδα, με την σωστή θεραπεία αντιμετωπίζεται χωρίς να προκαλέσει μεγάλη βλάβη, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις μπορεί να

χρειαστεί ακρωτηριασμός ενός άκρου ή μπορεί να οδηγήσουν και στο θάνατο, αν δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα (<http><sup>12</sup>) (Εικόνες 12, 13, 14).

#### 7.4.4 Εξωεντερικές μολύνσεις

Η εμφάνιση αναπνευστικών νοσημάτων ποικίλλει, από παθολογικές καταστάσεις μαλακών ιστών (επιγλωτίτιδα), έως την εμφάνιση πνευμονίας, αποστήματα στους πνεύμονες και εμφύσημα. Η εμφάνιση πνευμονίας, λόγω μόλυνσης με *Aeromonas* έχει επίσης αναφερθεί σε πολλές χώρες, ύστερα από επαφή με το νερό, και μετά από πλημμύρες. Η συχνότητα των αναπνευστικών μολύνσεων, που εξελίσσονται σε πνευμονία και αποστήματα πνευμόνων αυξάνεται. Η πνευμονία, η αιμόπτυση και η συνακόλουθη σήψη αποτελούν ενδείξεις δυσμενούς πρόγνωσης σε αυτές τις περιπτώσεις (Janda & Abbott, 1998).

Η μηνιγγίτιδα που προκαλείται από *Aeromonas* εμφανίζεται σπάνια, όπως και οι μολύνσεις της ουροποιητικής οδού (κυστίτιδα), που εκδηλώνονται με αύξηση συχνότητας ούρησης, δυσουρία και αιματουρία. Ασθενείς μπορούν να εμφανίσουν επίσης, μολύνσεις χειρουργικών τραυμάτων, περιτονίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, κερατίτιδα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, ενδοκοιλιακά αποστήματα και μέση ωτίτιδα. Η περιτονίτιδα μπορεί να εκδηλωθεί ως: σποραδική βακτηριακή περιτονίτιδα, χρόνια περιτονίτιδα ή διάτρηση εντέρου, ενώ η θνησιμότητα μπορεί να φτάσει στο 60% (Al-Benwan και συν., 2007; Janda & Abbott, 1998)



**Εικόνα 12.** Κυτταρίτιδα σε άνθρωπο λόγω μόλυνσης με *Aeromonas hydrophila* (<http><sup>13</sup>//hmsc.oregonstate.edu)



**Εικόνες 13,14.** Μυονέκρωση και γαγγραινώδες έκθυμα λόγω μόλυνσης με *Aeromonas hydrophila* στον άνθρωπο (<http<sup>13</sup>//hmsc.oregonstate.edu>)

### 7.5 Διάγνωση των μολύνσεων με *Aeromonas*

Η απομόνωση και αναγνώριση των *Aeromonas* spp. σε επίπεδο γένους είναι απλή και απαιτεί τεχνικές που είναι διαθέσιμες στα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια για την ανίχνευση εντερικών βακτηρίων. Η απομόνωση των στελεχών γίνεται από δείγματα αίματος και καλλιέργειες κοπράνων (*Aeromonas* επιλεκτικό άγαρ με 5% αίμα προβάτου, MacConkey άγαρ, άγαρ αμπικιλίνης με αίμα προβάτου). Στα κλινικά μικροβιολογικά εργαστήρια, τα δείγματα κοπράνων χρησιμοποιούνται συνήθως για την απομόνωση των *Aeromonas*. Κόπρανα από ασθενείς με ή χωρίς διάρροια συλλέγονται σε αποστειρωμένους περιέκτες και μεταφέρονται στο εργαστήριο για επεξεργασία (μέσα σε 2 ώρες από την συλλογή). Για την απομόνωση των *Aeromonas* από τα κόπρανα, χρησιμοποιείται συνήθως επιλεκτικό μέσο με αμπικιλίνη εμπλουτισμένο με αλκαλικό πεπτονικό νερό (Ghenghesh και συν., 2008)

Πραγματοποιείται επίσης αντιβιογράμμα, χρησιμοποιώντας Mueller-Hinton άγαρ (Oxoid, UK) με την τοποθέτηση δισκίων αντιβιοτικών σύμφωνα με τις προδιαγραφές του Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). Διαφορές στην αντίσταση των *Aeromonas* στα αντιβιοτικά μπορεί να σχετίζονται με την πηγή των απομονώσεων, τον τύπο του αντιβιοτικού καθώς και την γεωγραφική περιοχή. Πρόσφατα, οι Rodriguez και συνεργάτες, (2005), στην Βενεζουέλα, ανέφεραν την απομόνωση της *A. hydrophila* από ανθρώπινο αίμα η οποία εμφάνιζε ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά: αμικασίνη, γενταμικίνη, οξακιλλίνη, πιπερακιλλίνη, αμπικιλίνη, κεφοταξίμη, λεβοφλοξακίνη και σιπροφλοξακίνη, αλλά ήταν ευαίσθητη στα: κεφοπεραζόνη, τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες, κεφαλοσπορίνες τρίτης γενεάς,

τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη και κινολόνες (Janda και συν., 1995). Κλινικές απομονώσεις της *A. hydrophila* έχουν γίνει επίσης από πολλά είδη τροφίμων (ψάρια, ιχθυοτροφές, γάλα, πουλερικά και κόκκινο κρέας) (Palumbo και συν., 1989).

Τα είδη *Aeromonas* μπορούν να αναγνωριστούν και βιοχημικά με απλά φαινοτυπικά τεστ. Τα περισσότερα από αυτά τα τεστ περιέχονται σε συνήθη και αυτοματοποιημένα μικροβιακά συστήματα αναγνώρισης, με ελάχιστες εξαιρέσεις (Vitek lacks the Voges-Proskauer test) (Janda & Abbott, 1998). Συνήθως χρησιμοποιείται το API20E τεστ (bioMerieux) για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Με αυτά τα τεστ μπορούν να ταυτοποιηθούν πάνω από το 95% των *Aeromonas* spp. σε επίπεδο γονιδιώματος (Abbott και συν., 1992). Η ταυτοποίηση των *Aeromonas* μπορεί επίσης να διευκολυνθεί δοκιμάζοντας την ανάπτυξη του οργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Η δοκιμή οξειδάσης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των *Aeromonas* spp. από μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, τα οποία είναι αρνητικά.

Διάφοροι λοιμογόνοι παράγοντες των *Aeromonas* μπορούν να ανιχνευτούν με απλές μεθόδους. Η παραγωγή αιμολυσίνης μπορεί να ελεγχθεί με την τοποθέτηση του οργανισμού σε άγαρ από αίμα προβάτου. Επίσης η εντεροτοξινογόνος δράση των *Aeromonas* spp. μπορεί να αξιολογηθεί εφαρμόζοντας την ανάλυση CAMP-αιμολυσίνη. Διαφοροποίηση των *Aeromonas* θα πρέπει να γίνεται και από άλλα εντεροβακτηρίδια, όπως τα είδη *E. coli* και *Pseudomonas*.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση των *Aeromonas* από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Η ταυτοποίηση των *Aeromonas* σε επίπεδο γονιδιώματος απαιτεί την χρήση μοριακών τεχνικών, όπως η PCR (Kingombe και συν., 1999), η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA, ο σχετικός πολυμορφισμός μήκους τμήματος και η κυτταρομετρία ροής (Janda & Abbott, 1998). Οι μοριακές τεχνικές ωστόσο, δεν είναι διαθέσιμες στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες, ή ακόμη και αν είναι διαθέσιμες δεν χρησιμοποιούνται πρακτικά σε επίπεδο ρουτίνας, στα εργαστήρια. Όταν απαιτούνται μοριακές τεχνικές, τα δείγματα θα πρέπει να στέλνονται σε εργαστήρια αναφοράς για την ταυτοποίηση.



## 7.6 Αντιμετώπιση-Θεραπεία

Καλή προσωπική υγιεινή και μέθοδοι απολύμανσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για να προληφθεί η έκθεση ανθρώπων στα παθογόνα. Αυτές οι πρακτικές περιλαμβάνουν την χρήση γαντιών κατά τον χειρισμό μολυσμένων ψαριών, την ιατρική φροντίδα σε κάθε τραυματισμό στο δέρμα, και την επίδεση ανοιχτών πληγών. Οι μολύνσεις με *Aeromonas* θα πρέπει πάντα να αναφέρονται. Αν και οι μολύνσεις από *A. hydrophila* στον άνθρωπο είναι συνήθως εστιακές, πρέπει να εφαρμόζεται η σωστή αντιβιοτική θεραπεία σε περιπτώσεις επιδείνωσης των συμπτωμάτων. Συνιστάται επίσης να γίνεται αντιβιογράμμα, για την σωστή επιλογή αντιβιοτικού στην θεραπεία.

Η αντιβιοτική θεραπεία απαιτείται να είναι άμεση για αυτούς που είναι σοβαρά άρρωστοι και για ασθενείς που έχουν αυξημένο κίνδυνο για δερματικές μολύνσεις. Η κοινή θεραπεία όλων των περιστατικών διάρροιας, περιλαμβάνει γενικότερα την αναπλήρωση υγρών με ορούς, την θεραπεία με αντιβιοτικά (όταν ενδείκνυται) και την διατροφική υποστήριξη (Ghenghesh και συν., 2008). Η οξεία διάρροια αυτοπεριορίζεται και μόνο η υποστηρικτική αγωγή ενδείκνυται. Αντιβιοτική θεραπεία εφαρμόζεται επίσης σε ασθενείς με χρόνια διάρροια, αναπνευστικά νοσήματα ή συστηματική νόσο.

Τα είδη *Aeromonas* είναι γενικά ανθεκτικά στις πενικιλίνες, στις περισσότερες κεφαλοσπορίνες και στην ερυθρομυκίνη, ενώ είναι ευαίσθητα σε ορισμένες κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη, τριμεθοπρίμη-σουλφοναμίδες και κινολόνες. Συνήθως η οξυτετρακυκλίνη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των μολύνσεων, ενώ η σιπροφλοξακίνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην Ευρώπη και Η.Π.Α., αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ανθεκτικότητας στην Ασία.

Για την θεραπεία των τραυματικών μολύνσεων εφαρμόζονται, απομάκρυνση των μολυσμένων ιστών, καθαρισμός, παροχέτευση, και αντιβιοτική θεραπεία. Μία πρόσφατη έρευνα προτείνει επίσης την χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου, για την αντιμετώπιση των δερματικών μολύνσεων με *A. hydrophila* (Mathur και συν., 1985).

Για την πρόληψη των τροφιμογενών νοσημάτων που προκαλούνται από τα είδη *Aeromonas* θα πρέπει να εφαρμόζονται καλές συνθήκες υγιεινής κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων, όπως η κατάψυξη, η συσκευασία σε κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα, φαίνονται μη αποτελεσματικές στην αναστολή πολλαπλασιασμού της *A. hydrophila*. Η επαρκής θερμική

επεξεργασία μπορεί να αδρανοποιήσει τα κινητά είδη *Aeromonas*, ωστόσο συνεχίζουν να αποτελούν ένα δημόσιο κίνδυνο, ειδικά για τους ευαίσθητους πληθυσμούς (González και συν., 2001). Έχει αποδειχθεί ότι στελέχη *A. hydrophila* μειώθηκαν σε μη ανιχνεύσιμα όρια, σε φιλέτα ψαριών που μαγειρεύτηκαν στους 70°C για 30 min (Huang και συν., 1993).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### Η ΔΙΚΗ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑ

#### 1. Σκοπός της δικής μας έρευνας

Σκοπός της δικής μας έρευνας ήταν η διαγνωστική εργαστηριακή διερεύνηση ενός περιστατικού θνησιμότητας σε γόνο κυπρίνου, καθώς και ο καθορισμός του αιτίου θνησιμότητας. Πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες, από τρεις ομάδες γόνου κυπρίνου που εμφάνισαν θνησιμότητα, από τον ιχθυογεννητικό σταθμό κυπρίνου στην Άρτα. Όλες οι εργαστηριακές εξετάσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Καρδίτσα, στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας.

#### 2. Υλικά

##### 2.1 Λήψη Ιστορικού

Η θνησιμότητα εμφανίστηκε σε γόνο κυπρίνου, ηλικίας 1-1,5 μηνών, βάρους 1gr στα τέλη Μαΐου του 2009, στον ιχθυογεννητικό σταθμό κυπρίνου στην Άρτα, κοντά στο χωριό Ψαθοτόπι.

Σύμφωνα με το ιστορικό, που αποτελεί βασικό βήμα στην προσέγγιση του περιστατικού, η θνησιμότητα εμφανίστηκε ξαφνικά στις 26 Μαΐου του 2009, αρχικά στα μικρότερης ηλικίας ιχθύδια και στην συνέχεια στα μεγαλύτερης ηλικίας. Η θνησιμότητα εμφανίστηκε συνολικά σε τρεις ομάδες ιχθυδίων κυπρίνου (Πίνακας 11).

**Πίνακας 11.** Οι τρεις ομάδες ιχθυδίων κυπρίνου της έρευνας

<b>Ομάδα Α</b>	Μικρότερης ηλικίας (1 μηνών)	Τεχνητή αναπαραγωγή	Μεγαλύτερη θνησιμότητα (75%)
<b>Ομάδα Β</b>	Μεγαλύτερης ηλικίας (1,5 μηνών)	Τεχνητή αναπαραγωγή	Μέση θνησιμότητα (45%)
<b>Ομάδα Γ</b>	Μεγαλύτερης ηλικίας (1,5 μηνών)	Φυσική αναπαραγωγή	Μικρότερη θνησιμότητα (15%)

Η τεχνητή αναπαραγωγή του γόνου πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του ιχθυογεννητικού σταθμού, σε φιάλες zugar μετά από τεχνητή γονιμοποίηση, ενώ η φυσική αναπαραγωγή πραγματοποιήθηκε στις εξωτερικές δεξαμενές του σταθμού χωρίς τεχνητή παρέμβαση, από όπου συλλέχτηκε ο γόνος. Στην συνέχεια τα ιχθύδια της κάθε ομάδας (80.000 ιχθύδια περίπου/δεξαμενή) μεταφέρθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές δεξαμενές, με βάθος νερού 1 m και χωρητικότητας 2 m<sup>3</sup> (Εικόνα 15). Παρατηρήθηκε πως στα ιχθύδια της ομάδας Α η θνησιμότητα εμφανίστηκε ταυτόχρονα με την φάση προσαρμογής στην τροφή (από rotifers σε κατάλληλη ιχθυοτροφή). Επιπλέον, για πρώτη φορά στον σταθμό έγινε μεταφορά γόνου από φυσική αναπαραγωγή (τα οποία εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα) σε δεξαμενή ανάπτυξης, ενώ δεν είχε αναφερθεί παρόμοιο πρόβλημα θνησιμότητας, στο παρελθόν στον σταθμό.



**Εικόνα 15.** Δεξαμενές ανάπτυξης των ιχθυδίων.

Η θνησιμότητα συνεχίστηκε τις επόμενες 8 ημέρες έως τις 2 Ιουνίου 2009, με μια κορύφωση της θνησιμότητας στις 30 και 31 Μαΐου. Στα ιχθύδια της ομάδας Α η απώλεια του γόνου έφτασε στο 75% περίπου (από 80.000 ιχθύδια επιβίωσαν 20.000). Στα ιχθύδια της ομάδας Β η θνησιμότητα έφτασε στο 45% περίπου (από 80.000 ιχθύδια επιβίωσαν 45.000), ενώ στα ιχθύδια της ομάδας Γ η θνησιμότητα έφτασε στο 15% περίπου (από 80.000 ιχθύδια επιβίωσαν 65.000-70.000) (Εικόνες 17-21). Τα ιχθύδια εκτός από την θνησιμότητα εμφάνισαν ανορεξία, μειωμένη δραστηριότητα, λήθαργο και σκούρο χρωματισμό δέρματος (συνήθης αντίδραση των ψαριών που

νοσούν, εμφανίζονται πιο σκούρα υπό την επίδραση στρες). Τα ασθενή ιχθύδια συγκεντρώνονταν σε ομάδες και παρέμεναν σχετικά κοντά στην επιφάνεια του νερού για περισσότερο οξυγόνο, ενώ σε κάποια, ιδιαίτερα της ομάδας Α παρατηρήθηκαν ερύθημα στα πτερύγια και αναιμικά βράγχια (Εικόνα 16). Να σημειωθεί επίσης ότι, στις 2, 3 και 4 Ιουνίου πραγματοποιήθηκαν από το προσωπικό του σταθμού, με σκοπό την μείωση των απωλειών, λουτρά με διάλυμα αλατιού (5%), διάρκειας 30 min, χωρίς όμως αποτέλεσμα.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις και καθημερινή καταγραφή των τιμών της θερμοκρασίας νερού, του pH, του οξυγόνου και της αμμωνίας. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 0,5 m, στο κέντρο των δεξαμενών (όχι ακριβώς στο σημείο εισόδου του νερού γιατί εκεί το οξυγόνο και pH είναι φυσιολογικά υψηλά). Οι τιμές του pH ήταν 7-7.5, του οξυγόνου 6 mg/l, της αμμωνίας 0.015 mg/l και των νιτρικών 0.4 mg/l. Όσον αφορά την θερμοκρασία του νερού, σημειώθηκε μια αύξηση των τελευταίων ημερών, φτάνοντας στους 25-27°C, από μια μέση θερμοκρασία 20 °C των προηγούμενων ημερών.

Με βάση την λήψη του ιστορικού, το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την λήψη δειγμάτων από τις τρεις ομάδες του γόνου κυπρίνου, για την εργαστηριακή διερεύνηση του περιστατικού.



**Εικόνα 16.** Ιχθύδια της ομάδας Α. Τα ασθενή ιχθύδια συγκεντρώνονται σε ομάδες



**Εικόνα 17.** Ιχθύδια της ομάδας Α. Διακρίνονται τα νεκρά ιχθύδια στην επιφάνεια του νερού



**Εικόνα 18.** Ιχθύδια της ομάδας Α. Διακρίνονται νεκρά ιχθύδια στα τοιχώματα της δεξαμενής





**Εικόνα 19.** Ιχθύδια της ομάδας Β. Διακρίνονται νεκρά ιχθύδια στα τοιχώματα της δεξαμενής



**Εικόνα 20.** Ιχθύδια της ομάδας Γ. Διακρίνονται κάποια νεκρά ιχθύδια που επιπλέουν



**Εικόνα 21.** Ιχθύδια της ομάδας Γ. Διακρίνονται νεκρά ιχθύδια στην επιφάνεια του νερού

## 2.2 Δειγματοληψία

Πραγματοποιήθηκαν δύο δειγματοληψίες, στις 5 Ιουνίου και στις 20 Ιουνίου του 2009. Προηγήθηκε της δειγματοληψίας μια μακροσκοπική εξέταση για αλλοιώσεις και εξωπαράσιτα. Η λήψη δειγμάτων έγινε από ασθενή και ετοιμοθάνατα ιχθύδια (25 ιχθύδια από την κάθε ομάδα). Χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά γάντια για τον χειρισμό των ιχθυδίων, ενώ λόγω του μικρού μεγέθους του γόνου, ελήφθησαν ολόκληρα ιχθύδια. Τα ιχθύδια τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες, που περιείχαν νερό κατά το 1/4 και κατά το υπόλοιπο αέρα, χωριστά για την κάθε ομάδα. Στην συνέχεια οι σακούλες τοποθετήθηκαν μαζί με πάγο σε έναν εξωτερικό περιέκτη, ισοθερμικό, ενώ ταυτόχρονα 10 ολόκληρα ιχθύδια από την κάθε ομάδα, τοποθετήθηκαν σε δοχεία με φορμόλη 10% για ιστολογικές εξετάσεις, όπου όγκος ιχθυδίου/όγκος φορμόλης : 1/5.

Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν το απόγευμα της ίδιας ημέρας, και για τις δύο δειγματοληψίες στο εργαστήριο Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Καρδίτσα, όπου πραγματοποιήθηκαν όλες οι παρασιτολογικές, μικροβιολογικές και ιστολογικές εξετάσεις.



### 3. Μέθοδοι

#### 3.1 Νεκροτομική εξέταση

Μετά την άφιξη των δειγμάτων στο εργαστήριο ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής στην Καρδίτσα, τα ιχθύδια τοποθετήθηκαν στον πάγκο του εργαστηρίου όπου σημειώθηκε η ημερομηνία και ο αριθμός της κάθε ομάδας και πραγματοποιήθηκε αρχικά μια εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας των ιχθυδίων για τυχόν αλλοιώσεις (Εικόνα 23). Στην συνέχεια, αφού απολυμάνθηκε η εξωτερική επιφάνεια των ιχθυδίων, με τη βοήθεια ενός ψαλιδιού απομακρύνθηκαν τα ουραία πτερύγια και ένα μικρό τμήμα του εντερικού σωλήνα. Σε 5 ιχθύδια από την κάθε ομάδα πραγματοποιήθηκε εξέταση των εσωτερικών οργάνων, μετά από την διενέργεια της νεκροψίας. Τα μεταλλικά εργαλεία (λαβίδες, ψαλίδια, νυστέρια) που χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια της νεκροψίας απολυμάνθηκαν με εμβάπτισή τους σε αιθανόλη 100% και πέρασμα από φλόγα Bunsen (Εικόνα 22).

Τέλος, έγινε λήψη υλικού για την πραγματοποίηση μικροβιολογικών εξετάσεων. Λόγω του μικρού μεγέθους του γόνου, 4-5 ιχθύδια από την κάθε ομάδα (μετά από αφαίρεση τμήματος του εντερικού σωλήνα), λειοτριβήθηκαν άσηπτα με γουδί μέσα σε μια κάψα, τα οποία προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί. Στην συνέχεια με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου κρίκου έγινε λήψη υλικού από την κάψα και ακολούθησε ενοφθαλμισμός, σπορά του υλικού σε θρεπτικό υπόστρωμα. Με τη βοήθεια του κρίκου έγινε διασπορά του υλικού ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια του τρυβλίου πετρί, έτσι ώστε τελικά να επιτευχθεί η απομόνωση μεμονωμένων αποικιών (Roberts, 1978).



**Εικόνα 22.** Εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των δειγμάτων



**Εικόνα 23.** Ιχθύδια της ομάδας A και B

## **3.2 Παρασιτολογική Εξέταση**

### **3.2.1 Ξέσματα Δέρματος**

Η λήψη ξεσμάτων δέρματος πραγματοποιήθηκε με το οπίσθιο τμήμα της λεπίδας χειρουργικού νυστεριού. Η λήψη ξεσμάτων δέρματος έγινε από τις περιοχές που παρουσιάζαν ερυθρότητα, κοντά στα πτερύγια όπου υπήρχαν αυξημένες πιθανότητες να παρατηρηθούν παράσιτα (Εικόνες 24, 25).

Τα δείγματα ιστού που απομακρύνθηκαν κατά τη διενέργεια του ξέσματος (συνήθως βλέννη) μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, στις οποίες είχαν τοποθετηθεί από μία σταγόνα νερού. Ακολούθησε η τοποθέτηση καλυπτρίδων και η παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο όσο το δυνατόν ταχύτερα καθώς πολλά πρωτόζωα παράσιτα εγκαταλείπουν τον ξενιστή ή πεθαίνουν σε μικρό χρονικό διάστημα αφού εγκαταλείψουν τον ξενιστή (Εικόνα 26).



**Εικόνα 24.** Τοποθέτηση των ιχθυδίων για την λήψη δειγμάτων δέρματος και βραγχίων



**Εικόνα 25.** Λήψη ξεσμάτων δέρματος



**Εικόνα 26.** Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για εξωπαράσιτα και αλλοιώσεις

### 3.2.2 Εξέταση βραγχίων (Νωπά παρασκευάσματα βραγχίων)

Αρχικά αφαιρέθηκαν τα βραγχιοκαλύμματα και αποκαλύφθηκαν έτσι τα βράγχια. Στην συνέχεια, απομακρύνθηκαν τα βράγχια και τοποθετήθηκαν πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα με μία σταγόνα νερού ετοιμάζοντας με τον τρόπο αυτό ένα νωπό παρασκεύασμα με την αφαίρεση της βλέννης των βραγχίων με τη βοήθεια ενός νυστεριού (Εικόνα 27). Σε 2 ιχθύδια από την κάθε ομάδα, η εξέταση των βραγχίων πραγματοποιήθηκε με την τοποθέτηση των βραγχιακών νηματίων πάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα (Εικόνα 28).

Σε κάθε περίπτωση ακολούθησε επικάλυψη με καλυπτρίδα και μικροσκοπική παρατήρηση για τυχόν παράσιτα. Αρχικά, διενεργήθηκε μία γρήγορη παρατήρηση με τον φακό 40X που βοήθησε στον προσανατολισμό και την προκαταρκτική αναγνώριση των περιοχών με ενδιαφέρον. Σε μεγέθυνση 40X-100X οι αλλοιώσεις αλλά και τα περισσότερα παράσιτα μπορούν να γίνουν ορατά. Παρ'όλα αυτά σε μεγέθυνση 100X, από τα μικρού μεγέθους παράσιτα, το μόνο που μπορεί να διακριθεί είναι η κινητικότητά τους ενώ οι περισσότερες δομές είναι ορατές σε μεγέθυνση 400X (Roberts, 1978).



**Εικόνα 27.** Νωπά παρασκευάσματα βραγχίων και από τις 3 ομάδες ιχθυδίων

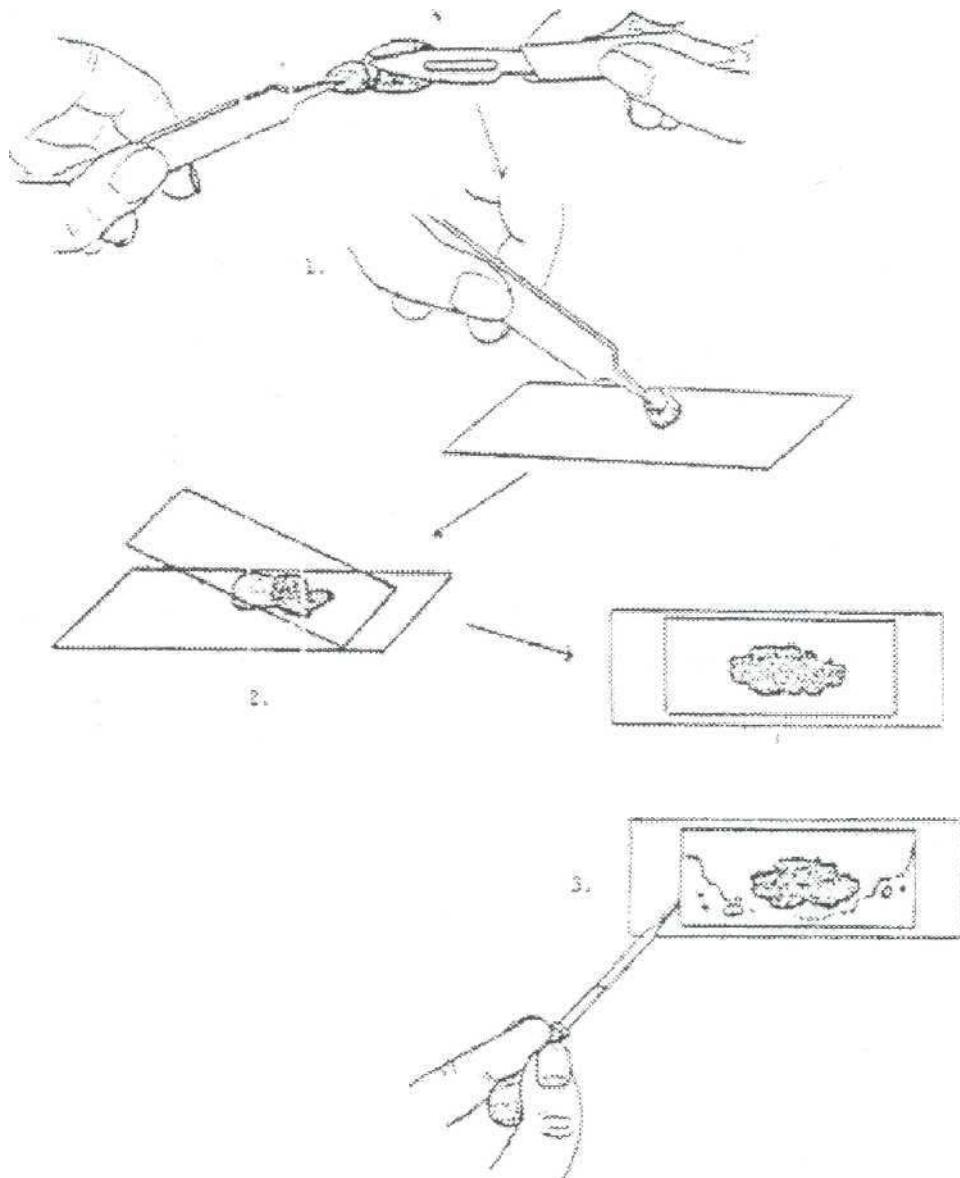


**Εικόνα 28.** Νωπό παρασκεύασμα βραγχίων ιχθυδίων της ομάδας Β

### **3.2.3 Μικροσκοπική παρατήρηση νωπών παρασκευασμάτων**

Η λεπτομερής εκτίμηση των νωπών δειγμάτων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της νεκροσκοπικής εξέτασης. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν πιο εύκολα να παρατηρηθούν και να υπολογιστούν ποσοτικά αρκετά σημαντικά ευρήματα συμπεριλαμβανομένων πολλών εξωτερικών και εσωτερικών παρασίτων. Δημιουργούνται με την τοποθέτηση μικρών τεμαχίων ιστών ή ξεσμάτων από την περιοχή της αλλοίωσης πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια αραιώνονται με σταγόνες νερού ή φυσιολογικού ορού, καλύπτονται με καλυπτρίδα και ακολουθεί μικροσκόπηση (Εικόνα 29).





**Εικόνα 29.** Διαδικασία λήψης υλικού για μικροσκοπική παρατήρηση  
([http<sup>18</sup>//images.google.gr](http://images.google.gr))

Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων πρέπει να ακολουθείται μία συγκεκριμένη μεθοδολογία. Αρχικά, διενεργείται μία γρήγορη παρατήρηση με τον φακό 40X που βοηθά στον προσανατολισμό και την προκαταρκτική αναγνώριση των περιοχών με ενδιαφέρον (Εικόνα 30). Σε μεγέθυνση 40X-100X οι αλλοιώσεις αλλά και τα περισσότερα παράσιτα θα πρέπει να είναι ορατά. Παρ'όλα αυτά σε μεγέθυνση 100X, από τα μικρού μεγέθους παράσιτα (όπως είναι το βλεφαριδοφόρο παράσιτο *Ichthyobodo*), το μόνο που μπορεί να διακριθεί είναι η κινητικότητά τους ενώ οι περισσότερες δομές είναι ορατές σε μεγέθυνση 400X (Roberts, 1978).



**Εικόνα 30.** Παρατήρηση στο μικροσκόπιο

### **3.3 Μικροβιολογική εξέταση**

Η λήψη υλικού για την πραγματοποίηση μικροβιολογικών εξετάσεων προηγήθηκε των υπολοίπων, για την ελάττωση της πιθανότητας επιμόλυνσης. Το είδος του καλλιεργητικού μέσου καθώς και οι συνθήκες επώασης ποικίλουν ανάλογα με τα βακτήρια που ενοχοποιούνται κάθε φορά.

Δεδομένου ότι σε περίπτωση σηψαιμίας τα βακτήρια συνήθως εντοπίζονται στο νεφρό, ο νεφρός αποτελεί όργανο εκλογής για τη διενέργεια μικροβιολογικών εξετάσεων. Στην περίπτωση μας όμως, λόγω του μικρού μεγέθους του γόνου, ήταν αδύνατη η λήψη υλικού από τον νεφρό, γι' αυτό 4-5 ιχθύδια από την κάθε ομάδα (μετά από αφαίρεση τμήματος του εντερικού σωλήνα), λειοτριβείθηκαν άσηπτα. Στην συνέχεια με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου κρίκου έγινε λήψη του υλικού που προέκυψε και σπορά σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό TSA, αραιώνοντας με τρεις κινήσεις, καίγοντας κάθε φορά τον κρίκο. Ακολούθησε επώαση για 24-48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (22-25°C), όπου αναπτύχθηκαν αποικίες (Εικόνα 31). Έγινε συλλογή αποικιών από κάθε δείγμα και πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες, τις επόμενες ημέρες έτσι ώστε να επιτύχουμε μεμονωμένες καθαρές αποικίες. Έπειτα από την απόκτηση καθαρών αποικιών ακολούθησαν οι διάφορες δοκιμές για την

ταυτοποίηση των μικροβίων (τεστ κινητικότητας, χρώση Gram, τεστ API 20E). Η πλήρης βιοχημική ταυτοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με το τεστ API 20E, το οποίο περιλαμβάνει 20 βιοχημικές δοκιμές. Πρόκειται για strip με υποστρώματα και το οποίο μετά την εκτέλεση της δοκιμής και τη βαθμολόγησή της επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση του μικροβίου.



**Εικόνα 31.** Εμφάνιση των αποικιών του βακτηρίου σε TSA

### 3.4 Τεστ Κινητικότητας

Το τεστ κινητικότητας πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί εάν το βακτήριο εμφάνιζε κινητικότητα. Από την καλλιέργεια του προς ταυτοποίηση βακτηρίου έγινε λήψη υλικού με αποστειρωμένη πιπέτα, το οποίο μεταφέρθηκε σε περιέκτη που περιείχε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ανακινήθηκε για να ομογενοποιηθεί. Στην συνέχεια έγινε λήψη μιας σταγόνας με την πιπέτα από τον περιέκτη και τοποθετήθηκε στη μέση μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Τοποθετήθηκε μια καλυπτρίδα στην οποία προηγουμένως εφαρμόστηκε βαζελίνη στις 4 άκρες της, επάνω από την αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολούθησε παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Roberts, 1978).

### 3.5 Χρώση Gram (νωπά παρασκευάσματα)

Για την πραγματοποίηση της Gram χρώσης, τοποθετήθηκε λίγο υλικό από την καλλιέργεια σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα νερού. Έπειτα έγινε μονιμοποίηση σε φλόγα (πλήρης εξάτμιση του νερού). Προστέθηκε *Crystal Violet*



για 3 λεπτά. Ακολούθησε ξέπλυμα με νερό και τοποθέτηση σε *Lugol* για 2 λεπτά. Ξανά ξέπλυμα με νερό και προσθήκη αλκοολικής ακετόνης (*alcohol acetone*). Πλύσιμο και τοποθέτηση διαλύματος Φουξίνης για 1 λεπτό και τέλος, ξέπλυμα και μικροσκοπική παρατήρηση, σε μεγέθυνση 40X-100X (Brenner και συν., 2005; Koneman και συν., 1992).

### 3.6 Βιοχημικός χαρακτηρισμός με τεστ API 20E

Για τον βιοχημικό χαρακτηρισμό του υπεύθυνου βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκε το τεστ (API 20E, BioMérieux, France) το οποίο περιέχει 20 αντιδράσεις ενζύμων. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- 1 Αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός
- 2 Αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό
- 3 Αποστειρωμένα μπουκαλάκια και αποστειρωμένες πιπέτες.
- 4 Βάση με αντιδραστήρια API και ζελατίνη.

#### *Διαδικασία*

1. Από την καλλιέργεια του προς ταυτοποίηση βακτηρίου έγινε λήψη υλικού με αποστειρωμένη πιπέτα, τοποθετήθηκε σε μπουκαλάκι που περιείχε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ανακινήθηκε για να ομογενοποιηθεί (μεγάλη θολερότητα).

2. Στη συνέχεια με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης πιπέτας μεταφέρθηκε το εναιώρημα σε όλες τις θήκες με τα αντιδραστήρια, μέχρι το κοίλο μέρος τους με μεγάλη προσοχή για να μη σχηματιστούν φυσαλίδες. (προηγουμένως είχε τοποθετηθεί αποσταγμένο νερό στη βάση για να υπάρχει υγρασία).

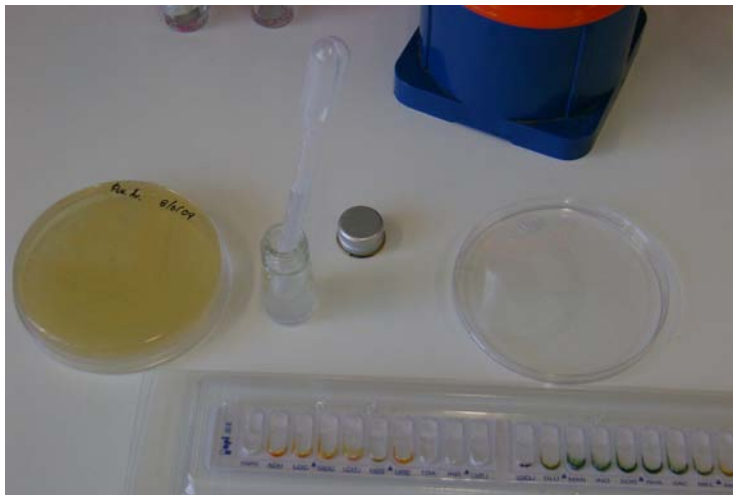
3. Σε όσα από τα αντιδραστήρια είχαν από κάτω γραμμή (H<sub>2</sub>S, ADH, LDC, URE) προστέθηκε ζελατίνη. Σε όσα είχαν κουτάκι (CIT, VD, GEL) προστέθηκε δείγμα μέχρι πάνω, έως ότου σχηματιστεί μηνίσκος. Τα υπόλοιπα έμειναν ως έχουν.

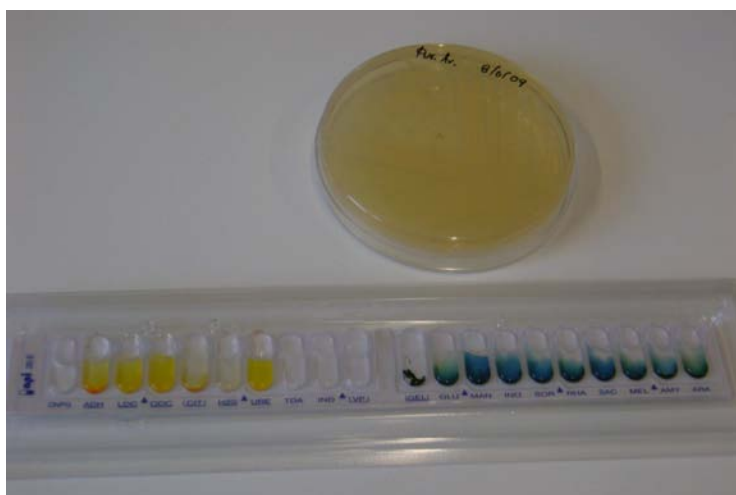
4. Κλείστηκε καλά και ακολούθησε επώαση για 24 h στους 20-22°C.

5. Στην αρχή τα σάκχαρα εμφανίζονταν μπλε (κανονικά). Μετά από 24h όμως τρία από αυτά άλλαξαν χρώμα, οπότε προχώρησε η διαδικασία, διαφορετικά θα έπρεπε να επαναληφθεί από την αρχή (Εικόνες 32, 33, 34).

6. Αφού πέρασαν 24 h, τοποθετήθηκαν ουσίες, ειδικές για το καθένα αντιδραστήριο, και ανάλογα με το χρωματισμό σημειώθηκε με τη βοήθεια μιας κλείδας εάν είναι αρνητικό (-) ή θετικό (+), συγκρίνοντας τα χρώματα των αντιδράσεων με ένα υπόδειγμα αντιδράσεων του τεστ.

7. Τέλος, προέκυψε ένας επταψήφιος αριθμός, ο οποίος και προσδιόρισε το μικροβιακό στέλεχος (Brenner και συν., 2005; Koneman και συν., 1992).





**Εικόνες 32, 33, 34.** Στάδια για την πραγματοποίηση του τεστ API 20E

### 3.7 Αντιβιογράμμα

Στην συνέχεια, για να διαπιστωθεί η ευαισθησία του βακτηρίου στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε αντιβιογράμμα. Το αντιβιογράμμα αποτελεί ένα είδος δοκιμασίας για την ταυτοποίηση των μικροβίων, καθώς δίνεται η δυνατότητα να προσδιοριστεί η ανθεκτικότητα ή η ευαισθησία του μικροβιακού στελέχους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, καθώς και το κατάλληλο αντιβιοτικό που πρέπει να χορηγηθεί για αποτελεσματική θεραπεία, αποφεύγοντας έτσι την αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών που οδηγεί στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών.

#### *Εκτέλεση αντιβιογράμματος*

1. Σε αποστειρωμένο σωλήνα δημιουργήθηκε ομογενοποιημένο εναιώρημα με δείγμα του βακτηρίου σε αρκετά υψηλό πληθυσμό, διαλύοντας σε αποσταγμένο νερό υλικό από την καθαρή αποικία. Έπειτα τοποθετήθηκε σε πετρί με θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Έμεινε για λίγα λεπτά και μετά αφαιρέθηκε η περίσσεια του διαλύματος.
2. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα διαποτισμένα χάρτινα δισκία (Biomerieux, France) τα οποία είναι εμποτισμένα με αντιβιοτικό, διαμετρικά ώστε να υπάρχει χώρος δράσης για όλα τα αντιβιοτικά (Εικόνα 35).
3. Το τρυβλίο επώαστηκε ανεστραμμένο για 24 h, στους 25-28°C και έπειτα παρατηρήθηκε ότι γύρω από τα δισκία αντιβιοτικών αναπτύχθηκαν ομόκεντροι κύκλοι, οι λεγόμενοι δακτύλιοι αναστολής (Εικόνα 36). Το αντιβιοτικό εκείνο

που σχηματίζει δακτύλιο με μεγαλύτερη διάμετρο είναι και το καταλληλότερο για χορήγηση (Roberts, 1978; Brenner και συν., 2005)

Η αντίσταση των στελεχών καθορίστηκε με βάση το μέγεθος διαμέτρου του κύκλου αναστολής γύρω από το κάθε δισκίο. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τα Gram (-) βακτήρια ήταν:

1. Τετρακυκλίνη (10μg) (TE10)
2. Τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (25μg) (SXT25)
3. Οξολινικό οξύ (2μg) (OA2)
4. Φλουμεκίνη (30μg) (UB30)

Για τα Gram (+) βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ερυθρομυκίνη (15μg) (E15)
2. Χλωραμφενικόλη (10μg) (C10)



**Εικόνα 35.** Τοποθέτηση των χάρτινων δισκίων αντιβιοτικών στο θρεπτικό υπόστρωμα (TSA)



**Εικόνα 36.** Αντιβιογράμμα. Διακρίνονται οι κύκλοι αναστολής γύρω από τα δισκία

### 3.8 Ιστολογικές Εξετάσεις

Οι ιστολογικές εξετάσεις αποτελούνται από το σύνολο των μεθόδων και διαδικασιών, με τις οποίες το ιστολογικό υλικό γίνεται κατάλληλο για μικροσκοπική μελέτη της υφής του, είτε πρόκειται για φυσιολογική ή παθολογική κατάσταση. Η τεχνική θα πρέπει να είναι τόσο επιτυχής ώστε να επιτρέπει την ακριβή διάγνωση, αλλά και να ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις λεπτών μορφολογικών ερευνών.

Ο σκοπός της ιστολογικής τεχνικής συνεπώς είναι η ετοιμασία τομών ιστών αρκετά λεπτών, ώστε να επιτρέπουν να περνά το φως και στις οποίες να διατηρείται κατά το δυνατόν η φυσική δομή των ιστικών στοιχείων, που χρωματίζονται κατάλληλα για να διακρίνονται σαφώς στη μικροσκοπική εξέταση, επιτρέποντας στον ιχθυοπαθολόγο να διακρίνει τις ειδικές αλλοιώσεις των οργάνων και να καταλήξει στη σωστή διάγνωση. Στα ψάρια υλικό συνήθως λαμβάνεται από το δέρμα, μύες, βράγχια, καρδιά, έντερο, ήπαρ, νεφρούς και σπλήνα.

Στο συγκεκριμένο περιστατικό και για τις δύο δειγματοληψίες, 10 ολόκληρα ιχθύδια από την κάθε ομάδα, (μετά από διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας) τοποθετήθηκαν σε δοχεία με φορμόλη 10% για την πραγματοποίηση των ιστολογικών εξετάσεων. Τα βασικά στάδια για την πραγματοποίηση ιστολογικών εξετάσεων είναι: η παρασκευή του ιστού, η μονιμοποίηση με φορμόλη 10%, η επεξεργασία του ιστού που περιλαμβάνει την αφυδάτωση, διαύγαση και εμποτισμό του ιστού σε κύβους παραφίνης (στάδια που πραγματοποιούνται με την συσκευή της ιστοκινέτας), η παραγωγή τομών του ιστού πάχους 5 μm περίπου με την βοήθεια μικροτόμου, η χρώση (αιματοξυλίνη-εωσίνη) που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση στο μικροσκόπιο κοινού φωτισμού και η μικροσκόπιση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για εύρεση αλλοιώσεων (Drury, 1980).

#### **Οργάνωση και λειτουργία του παθολογοανατομικού εργαστηρίου.**

Για να λειτουργήσει το εργαστήριο χρειάζεται:

α) Ειδικό εξοπλισμό: Ιστοκινέτα, συσκευή σκλήνωσης, μικροτόμους παραφίνης, υδατόλουτρα, κρυστάτης, θερμαινόμενη πλάκα, κλίβανο, ψυγείο, πλάκα κοπής ιστολογικών τομών, μαχαίρια, σετ χρώσεων ή αυτόματη συσκευή χρώσης κ.ά.

β) Αναλώσιμο υλικό: χρωστικές (αιματοξυλίνη, εωσίνη κ.ά.), οινόπνευμα διαφόρων βαθμών, ξυλόλη, παραφίνη κ.α., ακόμη μαχαίριδια μιας χρήσεως, καψάκια, καλούπια σκλήνωσης, αντικειμενοφόρες πλάκες, καλυπτρίδες, διηθητικό χαρτί, γάντια μιας χρήσης κ.ά.

### Στάδια των τεχνικών ιστολογίας

- 1 Παρασκευή
- 2 Μονιμοποίηση
- 3 Επεξεργασία του ιστού
- 4 Παραγωγή τομών
- 5 Χρώση
- 6 Μικροσκόπηση (Drury, 1980).

### **ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ**

#### 1. Παρασκευή

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την απομόνωση του οργάνου, και την απογύμνωση του από όλα τα περιττά, συνήθως λίπος, ώστε να ελεγχθεί αυτό εξωτερικά και εσωτερικά και φυσικά μακροσκοπικά, χωρίς να προκληθεί οποιαδήποτε αλλοίωση.

#### 2. Μονιμοποίηση

Για τη μικροσκοπική μελέτη της υφής του ιστοτεμαχίου πρέπει τα διάφορα συστατικά του να παραμείνουν αδιάλυτα κατά την επεξεργασία και να προστατευθούν από κάθε συρρίκνωση, διατηρώντας τα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Πρέπει επίσης να βελτιωθεί η ικανότητα χρώσης τους για να βελτιωθεί η ορατότητα τους. Η επεξεργασία, με την οποία επιτυγχάνονται όλα τα παραπάνω, λέγεται, μονιμοποίηση και πραγματοποιείται με ειδικά μονιμοποιητικά διαλύματα, όπως η φορμόλη 10%, η οποία θεωρείται το καλύτερο μονιμοποιητικό υλικό.

#### 3. Επεξεργασία του ιστού

Για να γίνει λήψη μιας λεπτής τομής με τη χρήση μικροτόμου, οι ιστοί θα πρέπει μετά τη μονιμοποίηση να διηθηθούν σε μία ουσία που θα δώσει σταθερή συνοχή. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με τον εμποτισμό του ιστού σε παραφίνη (σκήνωση).

Πριν από τη σκήνωση όμως προηγούνται δύο άλλα στάδια, η αφυδάτωση και η διαύγαση. Από τον μονιμοποιημένο ιστό πρέπει πρώτα να αφαιρεθεί το νερό. Αυτό επιτυγχάνεται με μια σειρά οινοπνευμάτων από 70% μέχρι 100%, όπου το νερό βαθμιαία αντικαθίσταται από αλκοόλη. Στη συνέχεια ο ιστός εμποτίζεται με ουσίες που καθιστούν τον ιστό πιο διαφανή. Η ουσία που χρησιμοποιείται για τη διαύγαση

είναι η ξυλόλη. Έπειτα η ξυλόλη αντικαθίσταται από παραφίνη. Η όλη επεξεργασία πραγματοποιείται σε ένα μηχάνημα που λέγεται ιστοκινέτα.

Όταν ο ιστός εμποτιστεί με παραφίνη μετατρέπεται σε κύβους παραφίνης με τη βοήθεια του μηχανήματος σκλήρωσης.

#### 4. Παραγωγή τομών

Οι κύβοι της παραφίνης με τον ιστό κόβονται στη συνέχεια με τη λεπίδα του μικροτόμου σε τομές πάχους περίπου 5  $\mu\text{m}$ . Με τη βοήθεια του υδατόλουτρου οι λεπτές αυτές τομές τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες.

#### 5. Χρώση

Οι ιστοί χρωματίζονται με διαλύματα χρωστικών που τους δίνουν διάφορες χροιές, έτσι ώστε να είναι εύκολη η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο. Ορισμένα στοιχεία (ιστικά) έχουν ειδική προτίμηση σ'ένα είδος χρωστικής και επομένως χρωματίζονται απ'αυτές εκλεκτικά ευκολότερα (χημική προτίμηση). Από όλες τις χρωστικές οι πιο συνηθισμένες είναι η αιματοξυλίνη και η εωσίνη και η Giemsa.

#### 6. Μικροσκόπηση

Μετά τη χρώση, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις ιστολογικές τομές καλύπτονται με Βάλσαμο του Καναδά ή Edelan και καλυπτρίδα, έτσι ώστε το παρασκεύασμα να είναι εντελώς έτοιμο για μικροσκοπική παρατήρηση (Druzy, 1980).

### 4. Αντιμετώπιση - Θεραπεία

Θεραπευτικά, αρχικά στις 2, 3 και 4 Ιουνίου πραγματοποιήθηκαν από το προσωπικό του σταθμού, με σκοπό την μείωση των απωλειών, λουτρά με διάλυμα αλατιού (5%), διάρκειας 30 min, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Το αλάτι σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση λουτρών στα ψάρια, γιατί αυξάνει την ειδική βαρύτητα του νερού και αλλάζει την ωσμωτική πίεση προκαλώντας τον θάνατο πολλών εξωπαρασίτων. Επιπλέον απομακρύνει την βλέννα που καλύπτει το δέρμα των ψαριών, απομακρύνοντας τους μικροοργανισμούς που είναι προσκολλημένοι σε αυτήν.

Στην συνέχεια, και εν αναμονή των αποτελεσμάτων των εργαστηρικών εξετάσεων της πρώτης δειγματοληψίας, πραγματοποιήθηκαν λουτρά με υπεροξείδιο

του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Η πρώτη εφαρμογή των λουτρών με υπεροξείδιο του υδρογόνου έγινε στις 4 Ιουνίου 2009 και τα λουτρά συνεχίστηκαν για 5 ημέρες έως τις 9 Ιουνίου, σε δοσολογία 20 ml ( $H_2O_2$ )/1m<sup>3</sup> νερού για τα μικρά ιχθύδια (ομάδα Α), και 40 ml ( $H_2O_2$ )/1m<sup>3</sup> νερού για τα μεγαλύτερα ιχθύδια (ομάδες Β και Γ). Η διάρκεια των λουτρών ήταν 20 min κάθε φορά, ενώ σε όλη την διάρκεια υπήρχε παροχή οξυγόνου και αμέσως μετά την έκθεση στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, γινόταν προσθήκη καθαρού νερού.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου κυκλοφορεί σαν διάλυμα 3% (30 mg  $H_2O_2$ /ml = 30.000 ppm.) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν απολυμαντικό, αντισηπτικό για την αντιμετώπιση εξωπαρασίτων, βακτηρίων και μυκήτων των ψαριών.

Τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν άμεσα στα λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου, ήδη από την επόμενη ημέρα τα ιχθύδια των ομάδων Γ και Β εμφάνισαν καλή ανταπόκριση και στην λήψη τροφής, ενώ οι θνησιμότητες μειώθηκαν σταδιακά. Μετά τα αποτελέσματα της πρώτης δειγματοληψίας, στις 10 και 11 Ιουνίου 2009 και εφόσον τα ιχθύδια ανταποκρίθηκαν στα λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου, θεωρήθηκε σκόπιμο να συνεχιστεί η θεραπεία με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, πραγματοποιώντας λουτρά μία φορά την εβδομάδα στην ίδια δοσολογία, για 4 εβδομάδες ακόμη μέχρι την πλήρη εξάλειψη των συμπτωμάτων και της θνησιμότητας. Κατά την πραγματοποίηση της δεύτερης δειγματοληψίας και των εργαστηριακών εξετάσεων στις 20 Ιουνίου 2009, τα συμπτώματα είχαν υποχωρήσει και η θνησιμότητα είχε εξαλειφθεί στα ιχθύδια των ομάδων Β και Γ, ενώ είχε μειωθεί στα ιχθύδια της ομάδας Α (η θνησιμότητα έφτασε στο 10% περίπου).

Να σημειωθεί επίσης ότι, η ίδια η θεραπεία μπορεί να προκαλέσει στρες στα ιχθύδια, γι' αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται κάποια προληπτικά μέτρα πριν την προσθήκη των θεραπευτικών παραγόντων στο νερό, όπως νηστεία 24 ώρες πριν, σωστός υπολογισμός δόσεων, εφαρμογή των λουτρών καλύτερα πρωινές ώρες, που η θερμοκρασία νερού είναι χαμηλότερη καθώς και πραγματοποίηση πειραματικής δοκιμής σε μικρό αριθμό ιχθυδίων. Απαραίτητη είναι και η παρακολούθηση των ιχθυδίων σε όλη την διάρκεια των λουτρών και χορήγηση οξυγόνου.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

#### 1. Αποτελέσματα

- Κατά την μακροσκοπική εξέταση των ιχθυδίων για αλλοιώσεις και εξωπαράσιτα που έγινε στην φάση της δειγματοληψίας, παρατηρήθηκαν σκούρος χρωματισμός δέρματος, ερύθημα στα πτερύγια και αναιμικά βράγχια σε ορισμένα ιχθύδια.
- Κατά την νεκροτομική εξέταση που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας και την εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας των ιχθυδίων, διαπιστώθηκαν επίσης σκούρος χρωματισμός δέρματος, ερύθημα στα πτερύγια και αναιμικά βράγχια σε ορισμένα ιχθύδια, ενώ κατά την εξέταση των εσωτερικών οργάνων δεν διαπιστώθηκαν εμφανείς αλλοιώσεις.
- Κατά την μικροσκοπική παρατήρηση των νωπών παρασκευασμάτων των βραγχιών (φακό 40X-100X) τυχαίο εύρημα αποτέλεσαν ορισμένα εξωπαράσιτα, μονογενή τρηματώδη στα βράγχια, όπως το *Dactylogyrus* spp. στα ιχθύδια της Γ ομάδας, της φυσικής αναπαραγωγής (Roberts, 1978) (Εικόνες 37, 38).

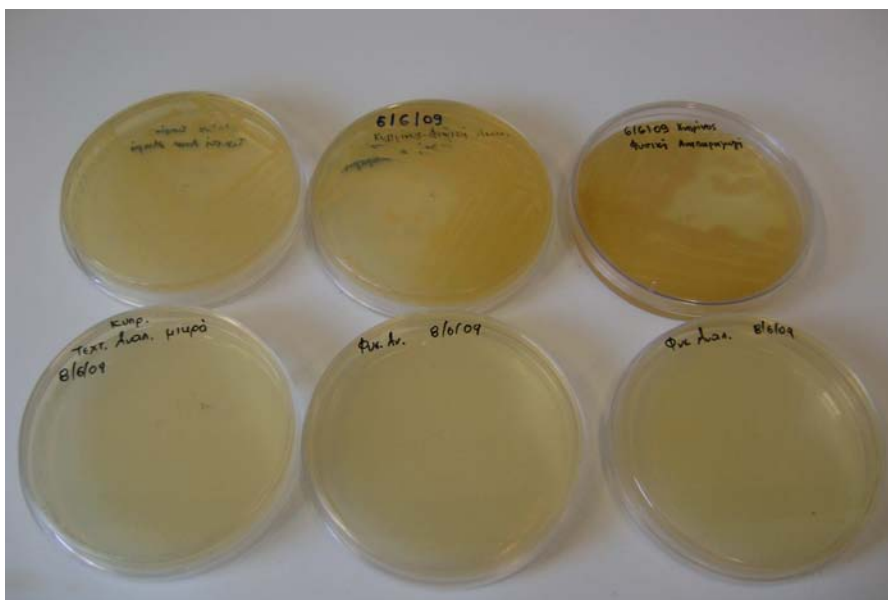


**Εικόνα 37.** Παρασκευάσματα βραγχιών. Παρουσία μονογενών τρηματωδών παρασίτων, *Dactylogyrus* spp. στα βράγχια των ιχθυδίων της Γ ομάδας (Μεγέθυνση 100X)

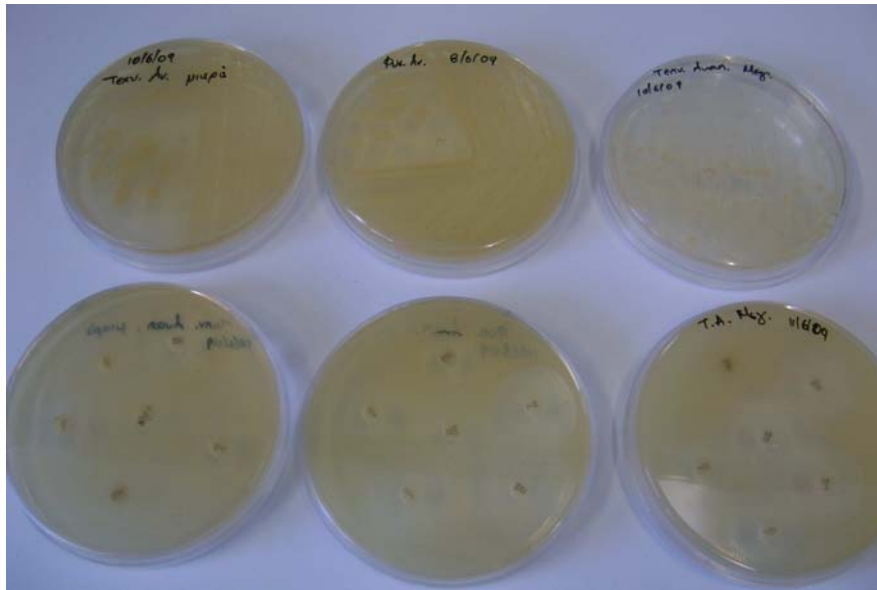


**Εικόνα 38.** Παρασκευάσματα βραγχίων, μονογενή τρηματώδη προσκολλημένα στα βράγχια (*Dactylogyrus* spp.) στα ιχθύδια της Γ (Μεγέθυνση 100X).

- Από την καλλιέργεια στο TSA, μετά την επώαση, στο θρεπτικό μέσο αναπτύχθηκαν στρόγγυλες αποικίες με φαιά χρωστική, διαμέτρου 2-5 mm. Έγινε συλλογή αποικιών από κάθε δείγμα και πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες, ώστε να επιτύχουμε μεμονωμένες καθαρές αποικίες, που θα μας βοηθήσουν στην ταυτοποίηση του μικροβιακού παράγοντα (Εικόνες 39, 41).



**Εικόνα 39.** Ανακαλλιέργειες και στις 3 ομάδες ιχθυδίων



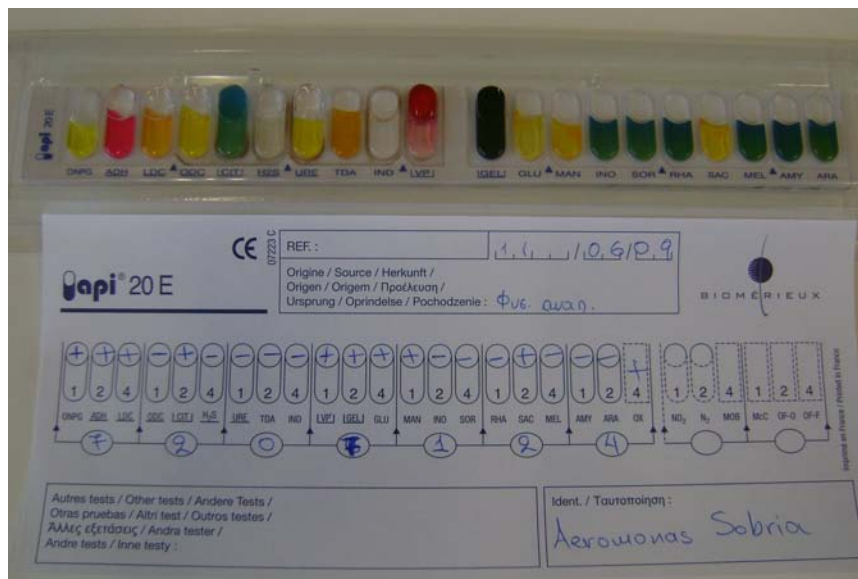
**Εικόνα 40.** Αντιβιογράμματα και στις 3 ομάδες ιχθυδίων



**Εικόνα 41.** Ανάπτυξη αποικιών στο TSA

- Κατά την πραγματοποίηση της δοκιμής κινητικότητας διαπιστώθηκε πως το βακτήριο εμφάνιζε κινητικότητα, καθώς παρατηρήθηκε η κίνηση στο μικροσκόπιο, σε μεγέθυνση 40X-100X.
- Μετά την πραγματοποίηση της χρώσης Gram παρατηρήθηκαν κύτταρα σε σχήμα ράβδου, τα οποία χρωματίστηκαν κόκκινα, άρα πρόκειται για βακτήρια Gram (-), που αποτελούν την πλειοψηφία των παθογόνων βακτηρίων στα ψάρια γλυκού νερού.

- Κατά τον βιοχημικό χαρακτηρισμό με το τεστ API 20E, στην πρώτη δειγματοληψία, στις 5 Ιουνίου 2009, ο επτανήφιος αριθμός που προέκυψε μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας ήταν ο 7 207 124, ο οποίος σύμφωνα με το Index προσδιορισμού των μικροβιακών στελεχών, προσδιόρισε σαν υπεύθυνο βακτηριακό στέλεχος το είδος *A. sobria*. Στην δεύτερη δειγματοληψία στις 20 Ιουνίου 2009, ο επτανήφιος αριθμός που προέκυψε ήταν ο 7 207 126, ο οποίος προσδιόρισε ξανά σαν υπεύθυνο βακτηριακό στέλεχος το είδος *A. sobria* (Εικόνα 42).



**Εικόνα 42.** Αποτελέσματα του τεστ API 20E

- Από τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος, διαπιστώθηκε επίσης πως η Φλουμεκίνη (1,3 cm) και το Οξολινικό οξύ (1 cm) εμφάνισαν την μεγαλύτερη διάμετρο κύκλου αναστολής και στις 3 ομάδες ιχθυδίων (Εικόνες 40, 43, 44).



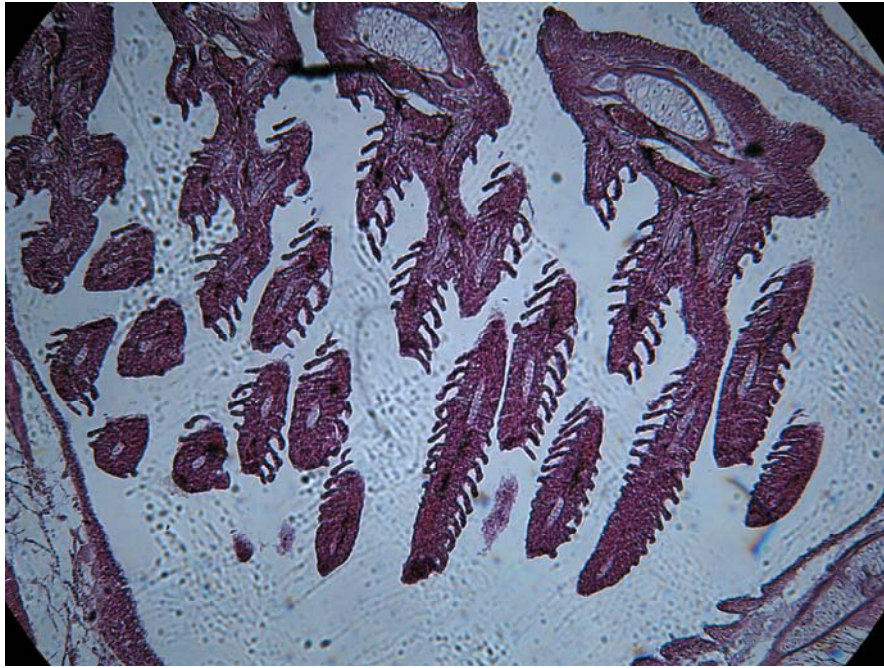
**Εικόνα 43.** Αντιβιογράμμα. Διακρίνονται οι κύκλοι αναστολής





**Εικόνα 44.** Ανάπτυξη αποικιών στο TSA και αντιβιογράμμα για τα ιχθυδία της ομάδας A

- Κατά την ιστολογική εξέταση οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 40X-100X) αφορούσαν κυρίως τα βράγχια και την καρδιά των ιχθυδίων, κυρίως της Ομάδας A (μικρότερης ηλικίας, τεχνητή αναπαραγωγή) που εμφάνισε την μεγαλύτερη θνησιμότητα. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν διαταραχή της φυσιολογικής μορφολογίας και ανατομικής δομής των βραγχίων, εστίες φλεγμονής (διήθηση από λεμφοκύτταρα) και εκφύλιση στα βράγχια, συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια. Στα ιστολογικά παρασκευάσματα της καρδιάς παρατηρήθηκαν εστίες εκφύλισης και νέκρωσης των καρδιακών μυικών ινών. Έχει αποδειχθεί πως η νέκρωση του καρδιακού ενδοθηλίου του κόλπου μπορεί να είναι η μόνη αλλοίωση σε υπεροξεία ή οξεία θνησιμότητα του γόνου (Noga, 2000) (Εικόνες 45 – 51).

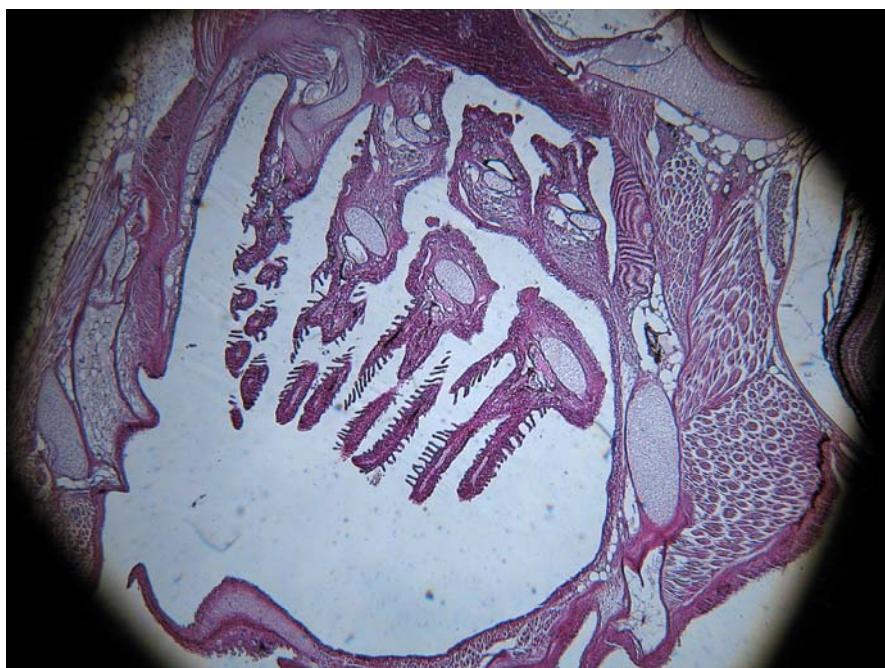


**Εικόνα 45.** Ιστολογική εικόνα φυσιολογικών βραγχίων ιχθυδίων της ομάδας Γ. (μεγέθυνση 40X)

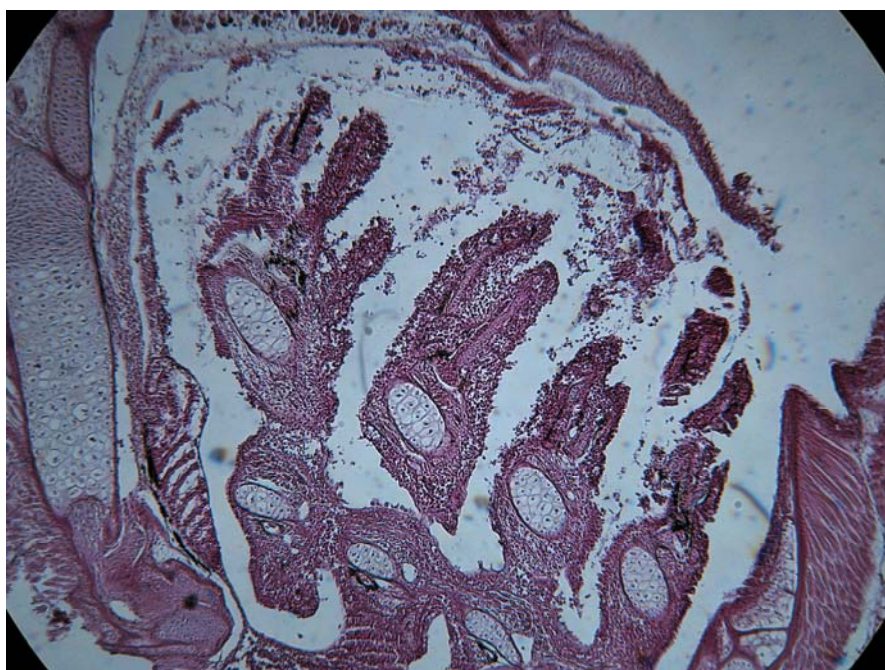


**Εικόνα 46.** Ιστολογική εικόνα βραγχίων ιχθυδίων της ομάδας Β. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων με εστίες εκφύλισης και φλεγμονής (διήθηση από λεμφοκύτταρα). (μεγέθυνση 40X)



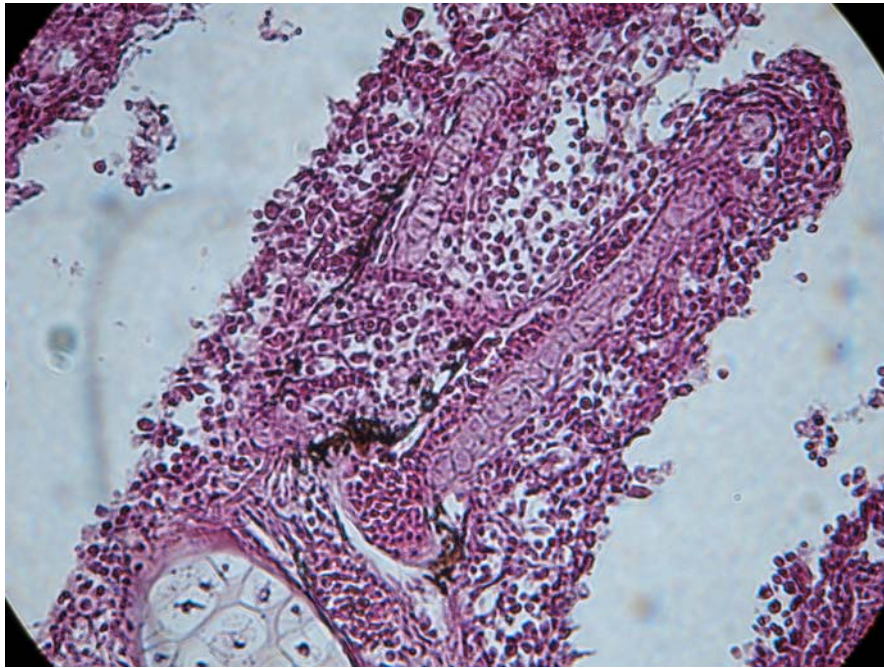


**Εικόνα 47.** Ιστολογική εικόνα βραγχίων ιχθυδίων της ομάδας Β. Συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων με εστίες εκφύλισης και φλεγμονής. (μεγέθυνση 40X)

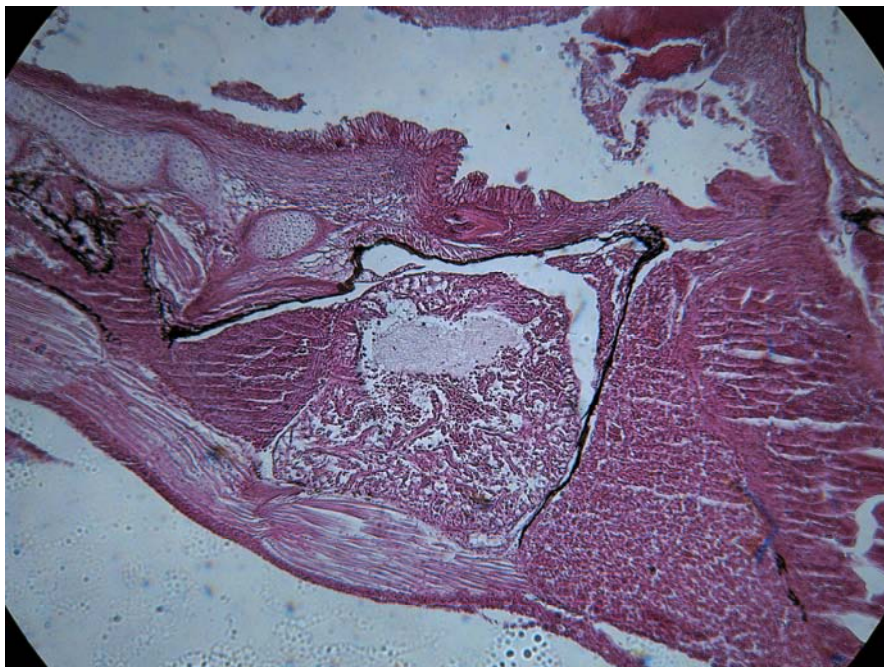


**Εικόνα 48.** Ιστολογική εικόνα βραγχίων ιχθυδίων της ομάδας Α. Απώλεια της φυσιολογικής ανατομικής δομής των βραγχίων, συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων και υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια. (μεγέθυνση 40X)



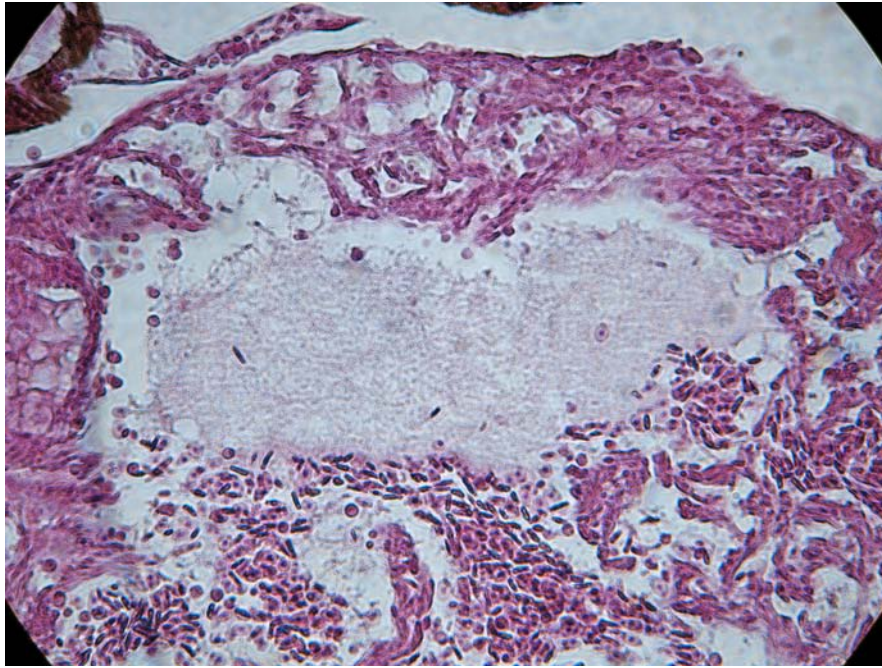


**Εικόνα 49.** Ιστολογική εικόνα βραγχίων ιχθυδίων της ομάδας Α. Διαταραχή της μορφολογίας των βραγχίων, συγκόλληση στην βάση των πρωτογενών βραγχιακών νημάτων, υπερπλασία στα δευτερογενή βραγχιακά νημάτια και φλεγμονώδη διήθηση από λεμφοκύτταρα. (μεγέθυνση 100X)



**Εικόνα 50.** Ιστολογικό παρασκεύασμα καρδιάς ιχθυδίων της ομάδας Α. Παρατηρείται εκφύλιση και νέκρωση των καρδιακών μυικών ινών. (μεγέθυνση 40X)





**Εικόνα 51.** Ιστολογικό παρασκεύασμα καρδιάς ιχθυδίων της ομάδας Α. Παρατηρούνται εκφύλιση, νέκρωση των καρδιακών μυικών ινών και αποικίες βακτηρίων στις νεκρωτικές αλλοιώσεις της κοιλίας της καρδιάς. (μεγέθυνση 100X)

- Τα αποτελέσματα της διαγνωστικής εργαστηριακής διερεύνησης του περιστατικού θνησιμότητας στον γόνο κυπρίνου, έδειξαν ότι το υπεύθυνο παθογόνο βακτήριο που απομονώθηκε ήταν η *A. sobria*. Στηριζόμενοι στα ευρήματα των εξετάσεων μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η θνησιμότητα προκλήθηκε από ένα ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο την *A. sobria*, εξαιτίας κυρίως της ανοσοκαταστολής που προήλθε από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως οι επιμολύνσεις με τα δίχτυα, η αύξηση θερμοκρασίας του νερού, η μεταφορά γόνου από την φυσική αναπαραγωγή και το στρες λόγω αλλαγής και προσαρμογής στην τροφή των ιχθυδίων της ομάδας Α.

## **2. Συμπεράσματα - Συζήτηση της διερεύνησης του περιστατικού θνησιμότητας του γόνου κυπρίνου.**

- Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των εργαστηριακών εξετάσεων, η εκδήλωση της θνησιμότητας στον γόνο κυπρίνου προκλήθηκε από ένα ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο την *A. sobria*, εξαιτίας κυρίως της ανοσοκαταστολής και του στρες που προήλθε από την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως οι επιμολύνσεις με

τα δίχτυα, η αύξηση θερμοκρασίας του νερού, η μεταφορά γόνου από την φυσική αναπαραγωγή και το στρες λόγω αλλαγής και προσαρμογής στην τροφή των ιχθυδίων της ομάδας Α.

Οι μολύνσεις γενικότερα, με είδη *Aeromonas* στα κυπρινοειδή συνδέονται με κακές συνθήκες περιβάλλοντος, όπως η μόλυνση, η υψηλή ιχθυοπυκνότητα, τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, η υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας και νιτρωδών και η αύξηση θερμοκρασίας του νερού. Το στρες λόγω χειρισμών, η μεταφορά ψαριών, η παρουσία παρασίτων (*Dactylogyrus* spp., *Gyrodactylus* spp.) και η απότομη αύξηση θερμοκρασίας του νερού (άνω των 18°C) είναι οι κύριοι παράγοντες προδιάθεσης σε επιζωοτίες που σχετίζονται με *Aeromonas* στα κυπρινοειδή (Bjarnheidur & Gudmundsdóttir, 1998). Σε συνθήκες στρες, είναι πολύ πιο πιθανό μερικά στελέχη *Aeromonas* που αποτελούν μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας, να γίνουν παθογόνα.

Επιπλέον, τα κυπρινοειδή είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί, έτσι το ανοσοποιητικό τους σύστημα επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τις αλλαγές της θερμοκρασίας (Le Morvan και συν., 1998). Η θνησιμότητα που εμφανίζεται σε αυτές τις περιπτώσεις συνήθως ποικίλλει, εξαρτάται από την πυκνότητα του πληθυσμού και τις συνθήκες νερού, ενώ οι τραυματισμοί του δέρματος επίσης ευνοούν την μόλυνση (Hoole και συν., 2001).

Τα ιχθύδια θα μπορούσαν επίσης να δράσουν σαν ασυμπτωματικοί φορείς, ειδικά της ομάδας Γ που εμφάνισαν την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, διασπείροντας τον οργανισμό στο νερό ή μεταδίδοντας τον σε άλλα ιχθύδια με την επαφή. Τα άρρωστα ή νεκρά ιχθύδια επιτείνουν το πρόβλημα. Γι' αυτό άρρωστα, ετοιμοθάνατα ή νεκρά ιχθύδια θα πρέπει να απομακρύνονται άμεσα.

Ακόμη και κλινικά υγιή ψάρια, χωρίς συμπτώματα μπορούν να είναι φορείς *Aeromonas* και να εμφανίσουν συμπτώματα κάτω από επίδραση παραγόντων στρες, όπως: η σύλληψη με δίχτυα και μεταφορά σε δεξαμενές, η ανεπαρκής διατροφή, η μη ισορροπημένη διατροφή, η αλλαγή τροφής, η υποβάθμιση της ποιότητας νερού, η παροδική αύξηση της αμμωνίας ή των νιτρωδών, η μείωση της περιεκτικότητας του νερού σε οξυγόνο, η αύξηση της ιχθυοπυκνότητας και της θερμοκρασίας, το αυξημένο οργανικό φορτίο του υδάτινου περιβάλλοντος, η περίοδος παραγωγής του γόνου. Η επίδραση όλων αυτών των παραγόντων, καταστέλλει το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, αυξάνει την ευαισθησία στα παθογόνα και επιτρέπει σε ευκαιριακά παθογόνα να αναπτυχθούν, *A. sobria* *A. hydrophila*, *Vibrio* spp.,

*Pseudomonas* spp., κ.ά. Οι Huizinga και συνεργάτες, (1979) επίσης απέδειξαν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, αύξησε τον μεταβολισμό, επιδείνωσε την συνολική γενική κατάσταση και καταπόνησε τα ψάρια. Το στρες στα ψάρια προκάλεσε αύξηση στην παραγωγή των κορτικοστεροειδών, η οποία αύξησε την ευαισθησία τους στην μόλυνση.

Τα ευκαιριακά παθογόνα βακτήρια όπως η *A. sobria* μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση θνησιμότητας και κλινικών συμπτωμάτων σε ψάρια που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή ή όταν βρεθούν σε μεγάλους αριθμούς στο νερό. Εξάλλου το νερό είναι εξαιρετικό μέσο για την μετάδοση λοιμογόνων παραγόντων, και τα νοσήματα μπορούν να εξαπλωθούν ταχύτατα στους ιχθυοπληθυσμούς (Noga, 2000). Η περίσσεια τροφής που καθιζάνει στον πυθμένα των δεξαμενών μπορεί επίσης να ευνοήσει την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Άλλες πηγές μόλυνσης είναι: τα αντικείμενα (η συσκευή μέτρησης παραμέτρων νερού μπορεί να αποτελέσει μέσο μετάδοσης των *Aeromonas* από δεξαμενή σε δεξαμενή) και τα εργαλεία μολυσμένων ιχθυοτροφείων, ο εξοπλισμός (δίχτυα, λάστιχα, κουβάδες), καθώς και το προσωπικό. Απαραίτητη σε κάθε εγκατάσταση ιχθυοκαλλιέργειας είναι η εφαρμογή μέτρων υγιεινής, η απολύμανση όλων των εργαλείων και μέσων της μονάδας με τα συνήθη απολυμαντικά διαλύματα ιωδιούχα (υπερμαγγανικό κάλιο 1 gr/50 l νερού) (Φώτης, 2003), η απολύμανση των ποδιών πριν την είσοδο και κατά την έξοδο, καθώς και η απολύμανση στο σύστημα σωληνώσεων και στα τοιχώματα δεξαμενών. Σε κάθε περίπτωση, μεγάλη σημασία θα πρέπει να δίνεται και στην εξάλειψη όλων των παραγόντων προδιάθεσης.

- Τα διάφορα είδη *Aeromonas*, είναι πρωταρχικά υδρόβιοι οργανισμοί, είναι ευρέως διαδεδομένα στο υδάτινο περιβάλλον και στο έδαφος ενώ μπορούν να βρεθούν σε μολυσμένα και καθαρά νερά, σε λύματα καθώς και στο πόσιμο νερό. Αποτελούν επίσης μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας των ψαριών γλυκού νερού,  $1,5 \times 10^2 - 1,6 \times 10^5$  (CFU)/gr (ειδικά τα είδη *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*) (Naviner και συν., 2006; Trust και συν., 1974). Τα είδη *Aeromonas* και ειδικά τα είδη *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida* έχουν επίσης την ικανότητα να επιβιώνουν σε ποικίλλες περιβαλλοντικές συνθήκες (αλατότητα, θερμοκρασία, pH, αγωγιμότητα και διαύγεια υδάτινου περιβάλλοντος), γεγονός που ευνοεί την εξάπλωση των μολύνσεων και την εμφάνιση εξάρσεων των νοσημάτων (Ghenghesh και συν., 2008).

Σύμφωνα με μελέτες (Kozinska, 2007) στον κυπρίνο ειδικά, τα κυρίαρχα μεσόφιλα είδη *Aeromonas* είναι: *A. sobria*, *A. bestiarum*, και *A. salmonicida*.

Προηγούμενες αναφορές επίσης, έχουν δείξει ότι τα στελέχη *A. sobria* μπορούν να είναι παθογόνα για τον κυπρίνο (Kozinska και συν., 2002).

Η *Aeromonas sobria* όπως έχουμε ήδη αναφέρει, είναι ένα ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο που αποτελεί μέρος της φυσιολογικής εντερικής μικροχλωρίδας των κυπρινοειδών και μπορεί να προκαλέσει την εκδήλωση νοσήματος κάτω από την επίδραση παραγόντων στρες, αλλαγής των περιβαλλοντικών συνθηκών ή εμφάνισης πρωταρχικών παθογόνων βακτηρίων ([http<sup>14</sup>](#)). Παθολογικές καταστάσεις που εμφανίζονται υπό την επίδραση στρες έχουν αναφερθεί εκτεταμένα σε ψάρια γλυκού νερού. Ο Noga, (2000) πρότεινε πως άλλος ένας παράγοντας προδιάθεσης για τις μολύνσεις με *A. sobria* είναι η υψηλή ιχθυοπυκνότητα (Doukas και συν., 1998). Στην περίπτωση μας, οι πιθανοί παράγοντες για την εκδήλωση της θνησιμότητας είναι η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, οι επιμολύνσεις με τα δίχτυα, η αύξηση θερμοκρασίας του νερού, η μεταφορά γόνου από την φυσική αναπαραγωγή και το στρες λόγω αλλαγής και προσαρμογής στην τροφή των ιχθυδίων της ομάδας A.

- Ο κοινός κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) έχει εισαχθεί στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες γλυκού νερού εδώ και πολλά χρόνια, ωστόσο η πραγματική καλλιέργεια του είδους σε τεχνητές λίμνες και εκκολαπτήρια αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια. Πρόσφατα έχουν εισαχθεί επίσης τα είδη: χορτοφάγος κυπρίνος (*Ctenopharyngodon idella*), ο ασημένιος κυπρίνος (*Hypophthalmichthys molitrix*), και ο μαρμαροκυπρίνος (*Aristichthys nobilis*) (Πάσχος, 2004). Στην Ελλάδα επίσης, λειτουργούν δύο ιχθυογενετικοί σταθμοί κυπρίνου, ο ένας στα Γιάννενα και ο άλλος στην Άρτα, όπου εντοπίστηκε το πρόβλημα με την θνησιμότητα.

Στην Ελλάδα οι κυπρίνοι αναπαράγονται φυσικά όταν η θερμοκρασία του νερού ξεπεράσει τους 18°C, την άνοιξη ([http<sup>4</sup>](#)), ενώ εμφανίζουν καλύτερη ανάπτυξη σε θερμοκρασίες νερού 20°C και αλατότητα έως 5‰. Ιδανικό pH είναι το 7-9, ενώ τα ψάρια μπορούν να επιβιώσουν και σε χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου (0,3-0,5 mg/l) ([http<sup>15</sup>](#)). Στο στάδιο της προνύμφης τρέφονται με rotifers και στην συνέχεια με κατάλληλη ιχθυοτροφή. Τα νεαρά ιχθύδια τρέφονται επίσης με ζωοπλαγκτόν. Η περίοδος ανάπτυξης του γόνου είναι 3-4 εβδομάδες και το βάρος τους τότε φτάνει το 0,5 g περίπου ([http<sup>4</sup>](#)).

Οι κυπρίνοι και ειδικά τα νεαρά ιχθύδια και ο γόνος είναι ευαίσθητα σε ένα πλήθος βακτηριακών νοσημάτων όπως οι μολύνσεις συνήθως από κινητά είδη *Aeromonas* που μπορούν να προκαλέσουν μεγάλα προβλήματα στις καλλιέργειες

κυπρίνου (Jeney Z. & Jeney G., 1995). Η εκδήλωση αυτών των νοσημάτων είναι το αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης των μικροβιακών παραγόντων, των ψαριών και του περιβάλλοντος. Τα ψάρια στις εντατικές καλλιέργειες επηρεάζονται συνεχώς από περιβαλλοντικές αλλαγές και πρακτικές διαχείρισης. Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν στρες και να επηρεάσουν τους μηχανισμούς ομοιόστασης των ψαριών, ευαισθητοποιώντας τα ψάρια σε ένα πλήθος παθογόνων παραγόντων.

Όπως συνέβει στο δικό μας περιστατικό θνησιμότητας, τα ιχθύδια τεχνητής αναπαραγωγής και μικρότερης ηλικίας εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία και θνησιμότητα από τα ιχθύδια φυσικής αναπαραγωγής. Συγκεκριμένα τα ιχθύδια της ομάδας Α, με την μικρότερη ηλικία εμφάνισαν την μεγαλύτερη θνησιμότητα, ενώ τα ιχθύδια της ομάδας Γ εμφάνισαν την μικρότερη θνησιμότητα και την καλύτερη ανταπόκριση στην θεραπευτική αγωγή.

- Θεραπευτικά πραγματοποιήθηκαν λουτρά με υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Τα ιχθύδια και των τριών ομάδων ανταποκρίθηκαν αμέσως στην θεραπεία, εμφανίζοντας μείωση της θνησιμότητας. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποδείχθηκε αποτελεσματικό και πολλά υποσχόμενο για την αντιμετώπιση παρόμοιων παθολογικών καταστάσεων. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) κυκλοφορεί σαν διάλυμα 3% ( $30 \text{ mg } H_2O_2/\text{ml} = 30.000 \text{ ppm}$ ) Χρησιμοποιείται συνήθως σαν απολυμαντικό/αντισηπτικό για τον καθαρισμό τραυμάτων στον άνθρωπο. Στις ιχθυοκαλλιέργειες χρησιμοποιείται στις θεραπείες εμβάπτισης (λουτρά) έναντι διάφορων νοσημάτων που προκαλούνται από οργανισμούς, όπως εξωτερικά παράσιτα, βακτήρια, και μύκητες σε διάφορα είδη και στάδια ανάπτυξης των ψαριών.

Όταν προστίθεται στο νερό, το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) διασπάται σε οξυγόνο και νερό, γι'αυτό και θεωρείται ασφαλές για το περιβάλλον. Η υψηλή χημική ενεργή δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, που μοιάζει αρκετά με την δράση του υπερμαγγανικού καλίου, το καθιστά ιδανικό για χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες έναντι διάφορων μικροοργανισμών και εξωπαρασίτων που προκαλούν νοσήματα στα ψάρια. Ωστόσο η υπερδοσολογία, η τοξικότητα από υπερβολική δόση, και η ανάπτυξη αντίστασης των βακτηρίων είναι κάποια από τα πιθανά προβλήματα που μπορούν να αποδοθούν σε αναποτελεσματική θεραπεία. Διαφορές στα είδη ψαριών (καθώς κάποια είδη, όπως τα γατόψαρα είναι πιο ευαίσθητα), διαφορές στο μέγεθος, στην ηλικία των ψαριών καθώς και στις παραμέτρους του νερού μπορούν να επηρεάσουν την δράση του υπεροξειδίου του

υδρογόνου και την τοξικότητα στα ψάρια και πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη (http<sup>16</sup>).

- Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη την διαδικασία της διαγνωστικής εργαστηριακής διερεύνησης του περιστατικού θνησιμότητας στον γόνο κυπρίνου, μπορούμε να προτείνουμε σε κάθε παρόμοια περίπτωση την εφαρμογή της συγκεκριμένης διαδικασίας για την εύρεση του αιτίου θνησιμότητας. Η διαδικασία περιλαμβάνει βασικά στάδια: λήψη ολοκληρωμένου ιστορικού, μακροσκοπική εξέταση, δειγματοληψία, παρασιτολογική εξέταση, βακτηριολογική και ιστολογική εξέταση, είναι εύκολο να εφαρμοστεί ακολουθώντας απλά βήματα (ακόμη και σε αυτοσχέδια εργαστήρια στις μονάδες, με τον απαραίτητο εξοπλισμό και υλικά), πραγματοποιείται σχετικά γρήγορα (ολοκλήρωση όλων των εξετάσεων μέσα σε 5 ημέρες) και συμφέρει οικονομικά καθώς η σωστή διάγνωση του αιτίου νοσηρότητας και θνησιμότητας και η σωστή αντιμετώπιση στην συνέχεια μειώνει το κόστος των απωλειών.

### **3. Έρευνες στην Ελλάδα σχετικά με την παρουσία των ειδών *Aeromonas* στα ψάρια**

Η Ελληνική εντατική παραγωγή ψαριών θα μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά, αν αντιμετωπιζόταν το πρόβλημα των παθολογικών προβλημάτων. Τα παθολογικά περιστατικά που εμφανίζονται στις εκτροφές έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην παραγωγή, όχι μόνο εξαιτίας των μεγάλων απωλειών που επιφέρουν και των εξόδων που απαιτούνται για την θεραπεία τους, αλλά και εξαιτίας της υποβάθμισης του τελικού προϊόντος. Η παρακολούθηση μονάδων εντατικής εκτροφής νέων ειδών γλυκού νερού, όπως τα *Mugil cephalus* (κέφαλος), *Acipenser gueldestaedi* (οξύρρυγχος) στην Ελλάδα, έχει δείξει ότι πολλά παθολογικά προβλήματα αφορούν λοιμώξεις από είδη *Aeromonas*, ειδικά *A. hydrophila* και *A. caviae* (Ράγιας & Αθανασοπούλου, 2005).

Οι Αθανασοπούλου, Μπιλλίνης και Πράπας, (2004) μελετώντας επίσης σημαντικά παθολογικά προβλήματα σε νέα είδη καλλιεργούμενων ψαριών, γλυκού νερού βρήκαν ότι συχνά τα στουργιόνια και τα γατόψαρα εμφάνιζαν δευτερογενείς μολύνσεις από *A. hydrophila* και *A. caviae*, ενώ και οι τιλάπιες εμφάνιζαν ευαισθησία σε μολύνσεις από *A. hydrophila*. Οι Αθανασοπούλου, Πράπας και Rodger, (1999) περιέγραψαν επίσης παθολογικές καταστάσεις καλλιεργούμενης χιόνας *P. puntazzo*

από 8 διαφορετικές φάρμες στην Ελλάδα. Τόσο στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των ψαριών όσο και στα επόμενα στάδια, οι κύριες παθολογικές καταστάσεις που εμφανίζονταν προκαλούνταν από είδη *Vibrio* spp. και *A. hydrophila* η οποία απομονώνονταν κυρίως από εσωτερικά όργανα. Οι Doukas, Athanassopoulou, Karagouni, Dotsika (1998) παρουσίασαν για πρώτη φορά ένα περιστατικό μόλυνσης από *Aeromonas hydrophila*, που περιλάμβανε αλλοιώσεις και θνησιμότητες σε λαβράκι *Dicentrarchus labrax* L., και *Puntazzo puntazzo* Cuvier.

#### 4. Προτάσεις - Συνέχιση της έρευνας.

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, ενημέρωση των καταναλωτών και που θα ασχολείται με όλες τις πλευρές της τροφικής αλυσίδας της ιχθυοκαλλιέργειας, τις δομές, την συνέχιση της έρευνας και την εξέλιξη της τεχνολογίας (Στεφανής, 2007).

Όσον αφορά τις μολύνσεις με είδη *Aeromonas* στα ψάρια, παρά τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα και έχουν περιγράψει την γενετική σχέση μεταξύ των ειδών του γένους *Aeromonas*, εξακολουθεί να υπάρχει μια έλλειψη αξιόπιστων χαρακτηριστικών για την διάκριση των υποειδών, ειδικά για τα ευαίσθητα στελέχη που αναπτύσσονται αργά και έχουν απομονωθεί τα τελευταία χρόνια (Wiklund & Dalsgaard, 1998). Βασικές ελλείψεις στις γνώσεις μας παραμένουν όχι μόνο όσον αφορά τους παράγοντες μη ειδικής άμυνας, τους λοιμογόνους παράγοντες, την επιβίωση του παθογόνου στο περιβάλλον αλλά και το ποσοστό των στελεχών στα καλλιεργούμενα ψάρια, την ταξινόμησή τους και την μετάδοσή τους. Τα είδη *Aeromonas* γίνονται όλο και πιο σημαντικά αυξάνοντας την απαίτηση για έγκυρη ταυτοποίηση αυτών των παθογόνων, καθώς και για αποτελεσματικούς τρόπους προφύλαξης και ελέγχου (Wiklund & Dalsgaard, 1998).

Ο έλεγχος της υγείας των ψαριών βοηθά στην αύξηση της ασφάλειας των προϊόντων, μειώνοντας τις συνέπειες των νοσημάτων των καλλιεργούμενων ψαριών

στους φυσικούς πληθυσμούς ψαριών και ελαχιστοποιώντας την χρήση χημικών φαρμάκων και αντιβιοτικών. Η εισαγωγή μεθόδων ελέγχου της ποιότητας, που βασίζονται στον χαρακτηρισμό/ανίχνευση των προϊόντων, και η προώθηση ανάπτυξης 'βιολογικών' προϊόντων μπορεί να οδηγήσει στην εφαρμογή τεχνολογιών φιλικών προς το περιβάλλον, καθώς και στην παραγωγή ψαριών καλής ποιότητας (<http><sup>15</sup>).

Ωστόσο στο μέλλον, περισσότερη έρευνα πρέπει να γίνει στις αναπτυσσόμενες χώρες, για τον καθορισμό των πηγών μόλυνσης, των μηχανισμών μετάδοσης, της κλινικής σημασίας, της αντίστασης στα αντιβιοτικά και των επιλογών θεραπείας των μολύνσεων με *Aeromonas* (Ghenghesh και συν., 2008).

Για να γίνει αυτό περισσότερες μελέτες θα πρέπει να βασιστούν σε μεγάλους αριθμούς στελεχών και να χρησιμοποιήσουν πιο σύγχρονες τεχνικές, μοριακές τεχνικές όπως η PCR, οι μελέτες υβριδισμού του DNA (Poroff και συν., 1981), η ανάλυση της 16S rDNA αλληλουχίας γονιδίων, η ανάλυση RFLP (πολυμορφισμός μήκους περιοριστικού τμήματος), ο προσδιορισμός του ποσοστού G+C του DNA (Borrell και συν., 1997; Wiklund & Dalsgaard, 1998), με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του ρόλου αυτών των οργανισμών.



**Πίνακας 12. Τα κυριότερα είδη *Aeromonas* spp. στα ψάρια**

Είδη <i>Aeromonas</i>	Είδος ψαριού	Όργανο-Στόχος	Αλλοιώσεις - Συμπτώματα	Βιβλιογραφ. Αναφορές
<i>A. hydrophila</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια Λαβράκι Χιόνα	Δέρμα Πτερύγια Ουραίο πτερύγιο Έντερο Βράγχια Καρδιά Εσωτερικά όργανα	Έλκη Αιμορραγική σηψαιμία Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες Ασκίτης Σπληνομεγαλία Ηπατομεγαλία Εξόφθαλμο	Martin-Carnahan & Joseph 2005, Cipriano & Bullock 2001, Ventura et al. 1988, Hazen 1979, Kozinska et al. 2002, Joseph & Carnahan 1994, Austin & Austin 1999, Noga 2000, Ράγιας & Αθανασοπούλου 2005
<i>A. caviae</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια Λαβράκι Χιόνα	Δέρμα Πτερύγια Ουραίο πτερύγιο Έντερο Βράγχια Καρδιά Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Διατεταμένο έντερο Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες Ασκίτης Σπληνομεγαλία Ηπατομεγαλία Εξόφθαλμο	Popoff 1984, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Candan et al. 1995, Cipriano & Bullock 2001, Kozinska et al. 2002, Joseph & Carnahan 1994, Austin & Austin 1999, Noga 2000, Ράγιας & Αθανασοπούλου 2005
<i>A. sobria</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια	Δέρμα Πτερύγια Ουραίο πτερύγιο Βράγχια Καρδιά Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Διατεταμένο έντερο Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες Ασκίτης	Popoff et al. 1981, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Olivier et al. 1981, Cipriano & Bullock 2001, Kozinska et al. 2002, Joseph & Carnahan 1994, Austin & Austin 1999, Noga 2000
<i>A. bestiarum</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια	Δέρμα Πτερύγια Βράγχια Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Διατεταμένο έντερο Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα	Ali et al. 1996, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Kozinska et al. 2002, Joseph & Carnahan 1994, Austin & Austin 1999, Noga 2000, Cipriano & Bullock 2001

			όργανα και μύες	
<i>A. jandaei</i>	Χέλια Σολομοειδή Κυπρινοειδή Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια	Δέρμα Πτερύγια Βράγχια Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες	Carnahan et al 1992, Martin- Carnahan & Joseph 2005, Esteve et al.1995, Austin & Austin 1999, Noga 2000
<i>A. schubertii</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια	Δέρμα Πτερύγια Βράγχια Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Διατεταμένο έντερο Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες	Martin-Carnahan & Joseph 2005, Austin & Austin 1999, Noga 2000, Cipriano & Bullock 2001
<i>A. veronii biotype sobria</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια	Δέρμα Πτερύγια Ουραίο πτερύγιο Βράγχια Καρδιά Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Διατεταμένο έντερο Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες Ασκήτης Σπληνομεγαλία Ηπατομεγαλία	Hickman-Brenner et al 1988, Joseph & Carnahan 1994, Cipriano & Bullock 2001, Austin & Austin 1999, Noga 2000, Kozinska et al. 2002
<i>A. veronii biotype veronii</i>	Σολομοειδή Κυπρινοειδή Χέλια Γατόψαρα Στουργιόνια Κέφαλος Τιλάπια	Δέρμα Πτερύγια Ουραίο πτερύγιο Βράγχια Καρδιά Εσωτερικά όργανα	Αιμορραγική σηψαιμία Διατεταμένο έντερο Έλκη Αιμορραγίες στα βράγχια Αιμορραγίες στα πτερύγια και ουρά Εσωτερικές αιμορραγίες στα όργανα και μύες Ασκήτης Σπληνομεγαλία Ηπατομεγαλία	Hickman-Brenner et al 1988, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Kozinska et al. 2002, Joseph & Carnahan 1994, Austin & Austin 1999, Cipriano & Bullock 2001
<i>A. salmonicida subsp. salmonicida</i>	Σολομοειδή Τιλάπιες Γατόψαρα Στουργιόνια	Δέρμα Πτερύγια Ουραίο πτερύγιο Βράγχια	Εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες Αιμορραγική	Holt et al. 1994, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Cipriano &

	Χέλια Κυπρινοειδή Κέφαλοι Καλκάνια Λαβράκι Διακοσμητικά ψάρια Χρυσόψαρα	Εσωτερικά όργανα Έντερο Ήπαρ Νεφροί Οφθαλμό	σηψαιμία Οίδημα, Εξόφθαλμο Έλκη ‘Δοθιήνες’ Υψηλή θνησιμότητα Δερματικές αλλοιώσεις Διατεταμένο έντερο Αιμορραγίες στα πτερύγια Σπληνομεγαλία Ηπατομεγαλία	Bullock 2001, Hammel 1995, McCarthy & Roberts 1980, Wiklund & Dalsgaard 1998
<i>A. salmonicida</i> <i>subsp.</i> <i>achromogenes</i>	Σολομοειδή Τιλάπιες Γατόψαρα Στουργιόνια Χέλια Κυπρινοειδή Κέφαλοι Καλκάνια Διακοσμητικά ψάρια	Δέρμα Πτερύγια Βράγχια Εσωτερικά όργανα Έντερο	Δερματικά έλκη με ή χωρίς σηψαιμία Εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες	Holt et al. 1994, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Wiklund & Dalsgaard 1998
<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. masoucida</i>	Σολομοειδή Τιλάπιες Γατόψαρα Στουργιόνια Χέλια Κυπρινοειδή Κέφαλοι Καλκάνια Διακοσμητικά ψάρια	Δέρμα Πτερύγια Βράγχια Εσωτερικά όργανα Έντερο	Δερματικά έλκη, με ή χωρίς σηψαιμία Εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες	Holt et al. 1994, Martin-Carnahan & Joseph 2005, Wiklund & Dalsgaard 1998, Austin & Austin 1989
<i>A. salmonicida</i> <i>subsp. smithia</i>	Σολομοειδή Τιλάπιες Γατόψαρα Στουργιόνια Χέλια Κυπρινοειδή Κέφαλοι Καλκάνια Διακοσμητικά ψάρια	Δέρμα Πτερύγια Βράγχια Εσωτερικά όργανα Έντερο	Δερματικά έλκη, με ή χωρίς σηψαιμία Εσωτερικές και εξωτερικές αιμορραγίες	Holt et al. 1994 Martin-Carnahan & Joseph 2005, Wiklund & Dalsgaard 1998, Austin & Austin 1989, Thornton et al. 1999



- Anon (1998a). U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bad Bug Book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>
- Araujo R.M., Arribas R.M., Pares R. (1991) Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *J. Appl. Bact.* 71: 182.
- Ariel E., Olesen N.J. (2002) Finfish in aquaculture and their diseases-A retrospective view on the European Community. *Bulletin Eur. Ass. Fish Pathol.* 22(2): 72-82.
- Arnesen J.A., G. Eggset, T.O. Jorgensen. (1995) Partial purification and characterization of extracellular metalloproteases from *Aeromonas salmonicida* spp. *salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 18: 283 - 295.
- Asao T., Y. Kinoshita, S. Kozaki, T. Uemura, G. Sakaguchi (1984) Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.* 46: 122-127.
- Ascencio F., Martinez-Arias W., Romero M.J., Wadstrom T. (1998) Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20: 219-229.
- Athanassopoulou F, Prapas Th., Rodger H. (1999) Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. *Journal of Fish Diseases* 22: 215-218.
- Athanassopoulou F., Billinis C., Prapas Th. (2004) Important disease conditions of newly cultured species in intensive freshwater farms in Greece: first incidence of nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Dis Aquat Org* 60: 247–252.
- Austin B. (1993) Environmental issues in the control of bacterial diseases of farmed fish. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila. *ICLARM Conference Proceedings* 31: 237-251.
- Austin B, Adams C. (1996) Fish pathogens. In: Austin B., Altwegg M., Gosling P.J., Joseph S. (eds) *The genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, Chichester pp. 197–243.
- Austin B., D.A. Austin, I. Dalsgaard, B.K. Gudmundsdóttir, S. Høie, J.M. Thornton, J.L. Larsen, B. O’Hici, R. Powell (1998) Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 50–64.

- Austin B., Austin D.A. (1999) Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. 3<sup>rd</sup> ed. Springer-Praxis Publishing, Chichester, UK. pp. 20-22, 80-81,175-179,216-226,247-255,282-287,315-317,333-337.
- Austin D.A., McIntosh D., Austin B. (1989) Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp.nov. Syst Appl. Microbiol. 11: 277-290.
- Awan M.B., Maqbool A., Bari A., Krovacek K. (2009) Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* spp. isolates from food in Abu Dhabi, United Arab Emirates. New Microbiologica 32: 17-23.
- Bach R., P.K. Chen, G.B. Chapman (1978) Changes in the spleen of channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. Journal of Fish Diseases 1: 205 - 217.
- Bailey J.K., Olivier G., Friars G.W. (1993) Inheritance of furunculosis resistance in Atlantic salmon. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada 4: 90-92.
- Basurco B. (2001) Mediterranean Aquaculture: Marine fish farming development. Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza, Spain <http://iodeweb1.vliz.be/odin/bitstream/1834/544/1/BBasurco.pdf>
- Berg R.D. (1995) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in Microbiology* 3: 149-154.
- Bernoth E.M. (1997) Diagnosis of furunculosis: The tools. In: *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research* (eds E.M. Bernoth, A.E. Ellis, P.J. Midtlyng, G. Olivier, P. Smith). Academic Press, London pp. 98–158.
- Bjarnheidur K., Gudmundsdóttir B.K, (1998) Infections by atypical strains of the bacterium *Aeromonas salmonicida*. BÚVÍSINDI ICEL. AGR. SCI. 12: 61–72.
- Bobori D.C., Economidis P.S. (2006) Freshwater fishes of Greece : Their biodiversity, fisheries and habitats. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 9(4): 407-418.
- Bootsma R., N. Fijan, J. Blommaert. (1977) Isolation and preliminary identification of the causative agent of carp erythrodermatitis. Vet. Arh. 47(6): 291-302.

- Borrell N., Acinas S.G., Figueras M.J., Martinez-Murcia A.J. (1997) Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1671– 1674.
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R. (2005) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Springer, USA, part B, 2: 557-578.
- Bruno D.W. (1986) Furunculosis in sea-reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L. colonization of the gill epithelium. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 6: 76-79.
- Bullock G.L. (1961) The identification and separation of *Aeromonas liquefaciens* from *Pseudomonas fluorescens* and related organisms occurring in diseased fish. *Journal of Applied Microbiology* 9: 587 - 590.
- Bullock G.L., H.M. Stuckey (1975) *Aeromonas salmonicida*: detection of asymptotically infected trout. *Progressive Fish-Culturist* 37: 237 – 239.
- Bullock G.L., H.M. Stuckey, D. Collis, R.L. Herman, G. Maestrone (1974) *In vitro* and *in vivo* efficacy of a potentiated sulfonamide in control of furunculosis in salmonids. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31: 75 - 82.
- Bullock G.L., P.K. Chen, H.M. Stuckey (1972) Studies of motile aeromonads isolated from diseased warmwater and coldwater fishes. In: *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, Philadelphia, Pennsylvania pp. 21.
- Bullock G.L., H.M. Stuckey (1977) Ultraviolet treatment of water for destruction of five gram-negative bacteria pathogenic to fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 1244 - 1249.
- Bullock G.L., Stuckey H.M. (1987) Studies on vertical transmission of *Aeromonas salmonicida*. *The Progressive Fish Culturist* 49: 302 – 303.
- Burke V., Robinson J., Atkinson H.M., Gracey M. (1982) Biochemical characteristics of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. *J Clin Microbiol* 15: 48-52.
- Burke V., J. Robinson, M. Gracey, D. Peterson, K. Partridge (1984) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 361-366.
- Byers B.R., D. Liles, P.E. Byers, J.E.L. Arceneaux (1986) A new siderophore in *Aeromonas hydrophila*: Possible relationship to virulence. *NATO*

Advanced Research Workshop on Iron, Siderophores, and Plant Diseases, Wye, Kent (UK) 117: 227- 232.

- Calabrez M.C.T., P. Lintermans, J.H. Vosjan (1993) The polymerase chain reaction [PCR] technique as a specific and sensitive detection method for *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas sobria* in natural ecosystems (water, sediment, and fish). International Council for the Exploration of the Seas. Marine Science Symposia. Copenhagen 201: 189 – 190.
- Carlton W.W., Hunt R.D. (1978) Bacterial diseases. In: Pathology of Laboratory Animals (eds.) Benirschke K., Garner F.M., Jontes T.C., New York pp. 1373.
- Carnahan A.M., S. Behram, S.W. Joseph (1991) Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. Journal of Clinical Microbiology 29: 2843 – 2849.
- Carnahan A.M. (1993) *Aeromonas* taxonomy: a sea of change. Med. Microb. Lett. 2: 206.
- Carnahan A., Fanning G.R., Joseph S.W. (1991) *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol 29: 560–564.
- Cavalier-Smith T. (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev.* 73: 203-266.
- Chang M.C., T.C. Huang (1981) Effects of the predation of *Tetrahymena pyriformis* on the population of *Aeromonas hydrophila*. National Science Council Mon. 9: 552 - 556.
- Chang P.H., Wu T.P., Chung H.Y., Chien C.Y. (2002) *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia australis* isolated from Ayu, *Plecoglossus altivelis* with ulcerative skin disease in Taiwan. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 22(6): 393-398.
- Chapman P.F., R.C. Cipriano, J.D. Teska (1991) Isolation and phenotypic characterization of an oxidase-negative *Aeromonas salmonicida* causing furunculosis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Journal of Wildlife Diseases 27: 61 – 67.
- Chopra A.K., Houston C.W. (1999) Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. Microbes Infect 1: 1129-37.



- Chopra A.K., Xu X.J., Ribardo D., Gonzalez M., Kuhl K., Peterson J.W., Houston C.W. (2000) The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect Immun.* 68: 2808–2818.
- Chu W.H, Lu C.P. (2005) Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 28: 437–441.
- Cipriano R.C., J. Bertolini (1988) Selection for virulence in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* using Coomassie brilliant blue agae. *Journal of Wildlife Diseases* 24: 676 – 678.
- Cipriano R.C., B.R. Griffin, B.C. Lidgerding. (1981) *Aeromonas salmonicida*: relationship between extracellular growth products and isolate virulence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 1322 - 1326.
- Cipriano R.C., Ford L.A., Starliper C.E., Teska J.D., Nelson J.T., Jensen B.N. (1996b) Control of external *Aeromonas salmonicida*: topical disinfection of salmonids with Chloramine-T. *J. Aquat. An. Hlth.* 8: 52-57.
- Cipriano R.C., L.A. Ford, D.R. Smith, J.H. Schachte, C.J. Petrie (1997) Differences in detection of *Aeromonas salmonicida* in covertly infected salmonid fishes by the stress-inducible furunculosis test and culture-based assays. *Journal of Aquatic Animal Health* 9: 108-113.
- Cipriano R.C. (1997) Strategies for management of Furunculosis in Atlantic salmon effected by non-lethal detection of *Aeromonas salmonicida*: a review. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 17(6) :215-218.
- Cipriano R.C., Bullock G.L. (2001) *Aeromonas hydrophila* and motile Aeromonad septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet* 68: 1-33.
- Cipriano R.C., Bullock G.L. (2001) Furunculosis and other Diseases caused by *Aeromonas salmonicida*. *Fish Disease Leaflet* 66: 1-33.
- (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute (2006) Performance standard for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard. 9th ed. M2-A9 v, no. 1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Colberg P.J., AJ. Lingg (1978) Effect of ozonation on microbial fish pathogens, ammonia, nitrate, nitrite and biological oxygen demand in simulated reuse hatchery water. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35: 1290 - 1296.

- Collins M.D., Martinez-Murcia A.J., Cai J. (1993) *Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA analysis. *Int J Syst Bacteriol* 43(4): 855–856.
- Colorni A. (2004) Diseases of Mediterranean fish species: Problems, research and prospects. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 24(1): 25-27.
- Colwell R.R., MacDonell M.T., O'Brien M., De Ley J. (1986) Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int. J Syst. Bacteriol.* 36: 473-477.
- Cumberbatch N., M.J. Gurwith, C. Langston, R.B. Sack, J.L. Brunton (1979) Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect. Immun.* 23: 829-837.
- Cusick P.K., Bullock B.C. (1973) Ulcerative stomatitis and pneumonia associated with *Aeromonas hydrophila* infection in the bottle-nosed dolphin. *J.A.V.M.A.* 163: 578.
- Daily O.P., S.W. Joseph, J.C. Coolbaugh, R.I. Walker, B.R. Merre, D.M. Rollins, R.J. Seidler, R.R. Colwell, C.R. Lissner (1981) Association of *Aeromonas sobria* with human infection. *J. Clin. Microbiol.* 13: 769-777.
- Dalsgaard I., Paulsen H. (1986) Atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from diseased sand-eels, *Ammodytes lanceus* (Cuvier) and *Hyperoplus lanceolatus* (Lesauvege). *J Fish Dis* 9: 361-364.
- Davis W.A., J.G. Kane, V.F. Garagusi (1978) Human *Aeromonas* infections: a review of the literature and a case report of endocarditis. *Journal of Medicine* 57: 267 - 277.
- Del Corral F., E.B. Shotts, J. Brown (1990) Adherence, haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. *Journal of Fish Diseases* 13: 255 - 268.
- Dixon B.A., Issavoran G.S. (1992) The activity of ceftiofur sodium for *Aeromonas* spp. isolated from ornamental fish. *J. Wildl. Dis.* 28(3): 453-456.
- Dooley J.S., T.J. Trust (1988) Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* strains virulent for fish: identification of a surface array protein. *Journal of Bacteriology* 17: 499-506.

- Doukas V., Athanassopoulou F., Karagouni E., Dotsika E. (1998) *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. *Journal of Fish Diseases* 21(4): 317-320.
- Drury R.A., Wallington E.A. (eds) (1980) Carleton's histological techniques, 5th edn. Oxford University Press, Oxford.
- Eggset G., H. Mikkelsen, J.E.A. Killie (1997) Immunocompetence and duration of immunity against *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 247 - 260.
- Ehlinger, N.F. (1977) Selective breeding of trout for resistance to furunculosis. *New York Fish and Game Journal* 24: 25 - 36.
- Elliott D., E.B. Shotts (1980a) Aetiology of an ulcerative disease in goldfish *Carassius auratus* (L.): microbiological examination of diseased fish from seven locations. *Journal of Fish Diseases* 3: 133 - 143.
- Ellis A.E., T.S. Hastings, A.L.S. Munro (1981) The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular products in the pathology of furunculosis. *Journal of Fish Diseases* 4: 41 - 51.
- Ellis A.E. (1997) Immunization with bacterial antigens: furunculosis. In: Gudding R., Lillehaug A., Midtlyng P.J., Brown F. (eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger 473: 107 - 116.
- Emmerich R., Weibel E. (1890) Über eine durch Bakterien verursachte Infektionskrankheit der Forellen. *Allg. Fisch. Ztg.* 15: 85 - 92.
- Esteve C., Gutiérrez M.C., Ventosa A. (1995) *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 462.
- Eurell T.E., D.H. Lewis, L.C. Grumbles (1978) Comparison of selected diagnostic tests for the detection of motile *Aeromonas* septicemia in fish. *American Journal of Veterinary Research* 39: 1384 - 1386.
- Evelyn T.R.T. (1997) A historical review of fish vaccinology. In: Gudding R., Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (eds.), *Fish Vaccinology*, Dev. Biol. Stand. Basel. Switzerland Karger Publishers pp. 1-12.
- Evelyn T.P.T. (1971) An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the sablefish

(*Anoplopoma fimbria*), and from two species of cultured Pacific salmon. J Fish Res Bd Can 28: 1629-1634.

- Evelyn T. (1996) Infection and disease. In: *The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment* (ed. By G.K. Iwama & T. Nakanishi). Academic Press, San Diego, CA, USA pp. 339-366.
- Evenberg D., R. Bootsma, B. Lugtenberg. (1981) Detection, purification and characterization of a major cell envelope protein, related to virulence, of autoagglutinating *Aeromonas salmonicida* strains. Society for General Microbiology 8: 253-254.
- Ezaki T., Hashimoto Y., Yabuuchi E. (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 224-229.
- Ezura Y., H. Yamamoto, M. Yoshimizu, K. Tajima, H. Sannohe, K. Ikeda, H. Sako, T. Hara, T. Kimura (1984) An outbreak of furunculosis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at the beginning of marine pen culture. Fish Pathology: 19: 75 – 80.
- Faktorovich K.A. (1969) Histological changes in the liver, kidneys, skin and brain of fish sick with red rot. In: Infectious diseases of fish and their control. Division of Fisheries Research, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife. Washington D.C. Translated from the Russian by R.M. Howland. pp. 83-101.
- FAO (2004) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Sofia.
- FAO (1996) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Farming fish: The Aquaculture Boom, World Resources Institute Fact sheet Undated. Washington, *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Rome, pp.11.
- FAO (2008) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Rome. Fisheries Department Databases and Statistics: <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>
- Farmer J.J., Hickman-Brenner F.W., Fanning G.R., Arduino M.J., Brenner D.J. (1986) Analysis of *Aeromonas* and *Plesiomonas* by DNA-DNA hybridization

- and phenotype. In 1st International Workshop Aeromonas Plesiomonas 1986. Abstract P-1. Manchester, UK pp. 49
- Field J.B., L.L. Gee, C.A. Elvehjem, C. Juday. (1944) The blood picture in furunculosis induced by *Bacterium salmonicida* in fish. Arch. Biochem 3: 277 - 284.
  - Figueras M.J., Soler L., Chacon M.R., Guarro J., Martinez-Murcia A.J. (2000) Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA-RFLP analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 2069– 2073.
  - Fijan N.N. (1972) Infectious dropsy of carp, a disease complex. In L.E. Mawdesley-Thomas (ed.) Symposia of the Zoological Society of London. Academic Press, New York pp. 39-51.
  - Fish F.F. (1934) Ulcer disease of trout. Transactions of the American Fisheries Society 64: 252 -258.
  - Ford L.A., R.L. Thune (1991) S-layer positive motile aeromonads isolated from channel catfish. Journal of Wildlife Diseases 27: 557 - 561.
  - Francki K.T., Chang B.J. (1994) Variable expression of O antigen and the role of lipopolysaccharide as an adhesion in *Aeromonas sobria*. FEMS Microbiol Lett 122: 97-102.
  - Fuentes R.J.M., H.J.A. Perez (1998) Isolation of *Aeromonas hydrophila* in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinaria Mexico 29: 117 - 119.
  - Fuller D.W., K.S. Pilcker, J.L. Fryer. (1977) A leukocytolytic factor isolated from cultures of *Aeromonas salmonicida*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34: 1118 - 1125.
  - Garduno R.A., A.R. Moore, G. Olivier, A.L. Lizama, E. Garduno, W.W. Kay. (2000) Host cell invasion and intracellular residence by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. Canadian Journal of Microbiology 46: 660-668.
  - Garrity G.M. (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria. 2<sup>nd</sup> ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
  - Gayer E.K., L.Bekesi, G.Csaba. (1980) Some aspects of the histopathology of carp erythrodermatitis (CE). In W. Ahne (ed.) Fish diseases. Third COPRAQ-Session. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 127-136.

- George W.L., Nakata M.M., Thompson J., White M.L. (1985) *Aeromonas*-related diarrhoea in adults. *Arch Intern Med* 145: 2207–2211.
- Ghenghesh K.S., Bara F., Bukris B., El-Surmani A., Abeid S.S. (1999) Characterization of virulence factors of *Aeromonas* isolated from children with and without diarrhoea in Tripoli, Libya. *J Diarrhoeal Dis Res* 17: 75-80.
- Ghenghesh K.S., Ahmed S.F., El-Khalek R.A., Al-Gendy A., Klena J. (2008) *Aeromonas*-Associated Infections in Developing Countries. *Review Article. J Infect Developing Countries* 2(2): 81-98.
- Ghenghesh K.S., Tawil A., Elghul M.T., Elkot R., Abeid S.S., Mohamed S.O. (2000) Incidence of *Aeromonas* in meats and livestock in Libya (Abstract). 5th IEA Eastern Mediterranean Regional Scientific Meeting, Bahrain.
- Gjedrem T., H.M. Gjoen (1995) Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., furunculosis, BKD and cold water vibriosis. *Aquaculture Research* 26: 129 - 134.
- González C.J., Santos J.A., García-López M.L., González N., Otero A. (2001) Mesophilic *Aeromonas* in Wild and Aquacultured Freshwater Fish. *Journal of Food Protection* 64(5): 687-691.
- Gray S.J. (1984) *Aeromonas hydrophila* in livestock: incidence, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility. *J. Hyg.* 92: 365.
- Griffin P.J. (1954) The nature of bacteria pathogenic to fish. *Transaction of the American Fisheries Society* 83: 241 - 253.
- Griffin P.J. (1953) Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. *Journal of Bacteriology* 65: 652 – 659.
- Grizzle J.M., Y. Kiryu. (1993) Histopathology of gill, liver and pancreas and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. *Journal of Aquatic Animal Health* 5: 36 – 50.
- Groman D., Ttveedie D., Shaw D. (1992) Experiences with atypical furunculosis in Newfoundland: an overview. *Bull Aquacul Assoc Can* 1: 36-39.
- Gudmundsdóttir B.K., S. Gudmundsdóttir (1997) Evaluation of cross protection by vaccines against atypical and typical furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* 20: 343–350.

- Gustafson C.E., C.J. Thomas, T.J. Trust (1992) Detection of *Aeromonas salmonicida* from fish by using polymerase chain reaction amplification of the virulence surface array protein gene. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3816 -3825.
- Gutsell J.S. (1948) The value of certain drugs, especially sulfa drugs, in the treatment of furunculosis in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Transactions of the American Fisheries Society* 75: 186 - 199.
- Guz L., Kozinska A. (2004) Antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* isolated from farmed carp (*Cyprinus carpio* L.) *Bull Vet Inst Pulawy* 48: 391-395.
- Hamilton-Miller J.M.T. (1975) Possible misidentification of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *British Veterinary Journal* 131: 663 - 664.
- Hamilton RC., H. Kalnins, N.R. Ackland, L.D. Ashburner. (1981) An extra layer in the surface layers of an atypical *Aeromonas salmonicida* isolated from Australian goldfish. *Journal of General Microbiology* 122: 363 - 366.
- Hammel K.L. (1995) An overview of furunculosis in Atlantic Canada. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 95: 8 – 11.
- Harf-Monteil C., Le Flèche A., Riegel P., Prévost G., Bermond D., Grimont P. A. D., Monteil H. (2004). *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 481–485.
- Hazen T.C. (1979) Ecology of *Aeromonas hydrophila* in a South Carolina cooling reservoir. *Microbial Ecology* 5: 179 - 195.
- Hazen T.C., C.B. Fliermans, R.P. Hirsch, G.W. Esch (1978a) Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the USA. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 36: 731 - 738.
- Hazen T.C., M.L. Raker, G.W. Esch, C.B. Fliermans (1978b) Ultrastructure of red sore lesions on largemouth bass (*Micropterus salmoides*): association of the ciliate *Epistylis* sp. And the bacterium *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Protozoology* 25: 351 - 355.
- Hickman-Brenner F.W., Fanning G.R., Arduino M.J., Brenner D.J., Farmer, J.J. (1988) *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 1561–1564.

- Hickman-Brenner F.W., Macdonald K.L., Steigerwalt A.G., Fanning G.R., Brenner D.J, Farmer J.J. (1987) *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 900–906.
- Hiney M., M.T. Dawson, D.M. Heery, P.R. Smith, F. Gannon, R. Powell (1992) DNA probe for *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1039 - 1042.
- Hiney M.P., J.J. Kilmartin, P.R. Smith (1994) Detection of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon with asymptomatic furunculosis infections. *Dis. aquat. Org.* 19: 161-167.
- Hiransuthikul N., Tantisiriwat W., Lertutsahakul K., Vibhagool A., Boonma P. (2005) Skin and soft-tissue infections among tsunami survivors in southern Thailand. *Clin Infect Dis* 41: 93-96.
- Hirst I.D., T.S. Hastings, A.E. Ellis. (1991) Siderophore production by *Aeromonas salmonicida*. *Journal of General Microbiology* 137: 1185 – 1192.
- Hofer E., Falavina dos Reis C.M., Theophilo G.N.D., Cavalcanti V.O., Lima N.V., Henriques M.F.C.M. (2006) *Aeromonas* associated with acute diarrhoea outbreak in Sao Bento do Una, Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 217-220.
- Hokama A., Inagawa M. (1991) Purification and characterization of *Aeromonas sobria pili*, a possible colonization factor. *Infect. Immun.* 59: 3478.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9<sup>th</sup> ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. pp. 787.
- Hoole D., Bucke D., Burgess P., Wellby I. (2001) Diseases of Carp and other Cyprinid Fishes. Blackwell Science Ltd. UK. pp. 53-54.
- Horne J.H. (1928) Furunculosis in trout and the importance of carriers in the spread of the disease. *Journal of Hygiene* 28: 67 – 78.
- Hsu T.C., E.B. Shotts, W.D. Waltman (1985) Action of *Aeromonas hydrophila* complex on carbohydrate substrates. *Fish Pathology* 20: 23 - 35.



- Huang Y.W., C.K. Leung, M.A. Harrison, K.W. Gates (1993) Fate of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* on catfish fillets cooked in a microwave oven. *Journal of Food Science (USA)* 58: 519 - 521.
- Huizinga H.W., G.W. Esch, T.C. Hazen (1979) Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). *Journal of Fish Diseases* 2: 263 - 277.
- Humphrey J.D., Ashburner L.D. (1993) Spread of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* after importation of infected goldfish, *Carrasius auratus*, into Australia. *Australian Veterinary Journal* 70: 453 – 454.
- Hunter P.R., Burge S.H. (1987) Isolation of *Aeromonas* from ice cream. *Lett Appl Microbiol* 4: 45-46.
- Huys G., Kampfer P., Altwegg M., Kersters I., Lamb A., Coopman R., Luthy-Hottenstein J., Vancanneyt M., Janssen P., Kersters K. (1997) *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 1165–1171.
- Irianto A., Austin B. (2002) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 25: 333-342.
- Janda J.M. (2001) *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In *Molecular Medical Microbiology*. Sussman M. (ed.). Academic Press. San Diego, USA pp. 1237–1270.
- Janda J.M., Abbott S.L., Morris J.G. (1995) *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and *Edwardsiella*. In: Blaser M.J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant R.L. (eds.) *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, pp. 905–917.
- Janda J.M., Duffey P.S. (1988) Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev Infect Dis* 10: 980–997.
- Janda J.M. (1991) Recent advances in the study of taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microb. Rev.* 4: 397.



- Jutfelt F., Olsen R.E., Glette J., Ringo E., Sundell K., (2006) Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 29: 255-262.
- Karatas S., Candan A., Demircan D. (2005) Atypical *Aeromonas* infection in cultured sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) in the Black sea. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh* 57(4): 255-263.
- Kay W.W., T.J. Trust. (1991) Form and functions of the regular surface array (S-layer) of *Aeromonas salmonicida*. *Experientia* 47: 412 – 414.
- Kay W.W., J.T. Bulkley, E.E. Ishiguro, B.M. Phipps, J.D.L. Monette, T.J. Trust. (1981) Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Bacteriology* 147: 1077 - 1084.
- Khalil N.G. (1997) Incidence of *Aeromonas hydrophila* group in raw milk and some dairy products in Assiut City. *Assiut Vet. Med. J.* 37: 100.
- Kimura T. (1969) A new subspecies of *Aeromonas salmonicida* as an etiological agent of furunculosis on 'sakuramasu' (*Oncorhynchus masou*) and pink salmon (*O. gorbuscha*) rearing for maturity. Part 1. On the morphological and physiological properties. *Fish Pathol* 3: 34-44.
- Kimura T. (1969) A new subspecies of *Aeromonas salmonicida* as an etiological agent of furunculosis on "Sakuramasu" (*Oncorhynchus masou*) and Pink Salmon (*O. gorbuscha*) rearing for maturity. Part 2. On the serological properties. *Fish Pathology (Tokyo)* 3: 45-52.
- King, C.H., E.B. Shotts. (1988) Enhancement of *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas salmonicida* through ingestion by the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *FEMS Microbiology Letters* 51: 95 – 100.
- Kingombe C.I.B., Huys G., Tonolla M., Albert M.J., Swings J., Peduzzi R. (1999) PCR detection, characterization and distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5293–5302.
- Kluyver A.J., van Niel C. B. (1936) Prospects for a Natural System of Classification of Bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 94(2): 369-403.

- Ko W.C., Yu K.W., Liu C.Y., Huang C.T., Leu H.S., Chuang Y.C. (1996) Increasing antibiotic resistance in clinical isolates of *Aeromonas* strains in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1260–1262.
- Ko W.C., Chuang Y.C. (1995) *Aeromonas* bacteremia: review of 59 episodes. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1298-1304.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C, Winn J.R. (1992) Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. JP Lippincott, Philadelphia pp. 267-272.
- Kou G.H. (1973) Studies on the fish pathogen *Aeromonas liquefaaiens* II. The connections between pathogenic properties and the activities of toxic substances. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan* 2: 42 - 46.
- Kozinska A., Figueras M.J., Charon M.R., Soler L. (2002) Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Applied Microbiology* 93: 1034-1041.
- Kozinska A. (2007) Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. *Journal of Fish Diseases* 30: 293-301.
- Kuijper E.J., Steigerwalt A.G., Schoenmakers B.S.C.I.M., Peeters M.F., Zanen H.C., Brenner D.J. (1989) Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 132–138.
- Lallier R., D. Leblanc, K.R. Mittal, G. Olivier (1981) Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 42: 56 - 60.
- Larsen J.L., Mellergaard S. (1981) Microbiological and hygienic problems in marine aquaculture: Furunculosis and Vibriosis in rainbow trout. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathologists* 1: 29-32.
- Lawson P.A., S.E. Gharbia, H.N. Shah, D.R. Clark (1989) Recognition of *Fusobacterium nucleatum* subgroups Fn-1, Fn-2 and Fn-3 by ribosomal RNA gene restriction patterns. *FEMS Microbiol. Lett.* 65: 4146.

- Le Morvan C., Troutaud D., Deschaux P. (1998) Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. *Journal of Experimental Biology* 201: 165-168.
- Lee C., Cho J.C., Lee S.H., Lee D.G., Kim S.J. (2002) Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J. Appl. Microbiol.* 93: 976–985.
- Lee K.K., A.E. Ellis. (1990) Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolyisin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *Journal of Bacteriology* 172: 5382 - 5393.
- Lehmann K.B., Neumann R. (1896) *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*, 1st ed., J.F. Lehmann, München.
- Lewis D.H. (1981) Immunoenzyme microscopy for differentiating among systemic bacterial pathogens of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 463 - 466.
- Ljungh A., Wadstrom T. (1985) *Aeromonas* and *Plesiomonas* as possible causes of diarrhoea. *Infection* 13: 169-173.
- Mackie T.J., Arkwright J.A., Pryce-Tannatt T.E., Mottram J.C., Johnston W.D., Menzies. M. (1930) *Furunculosis Committee interim report*. H.M. Stationery Office, Edinburgh. pp. 65.
- Martin-Carnahan A., Joseph S.W. (2005) Genus I *Aeromonas* Stanier 1943. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, New York 2: 556-578.
- Martinez-Murcia A.J., Esteve C., Garay E., Collins M.D. (1992) *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters* 91: 199–206.
- Martinez-Silva R., Guzmán-Urrego M., Caselitz F.H. (1961) On the problem of the significance of *Aeromonas* strains in enteritis in infants. *Z Tropenmed Parasitol* 12: 445.
- Mathur M.N., Patrick W.G., Unsworth I.P., Bennett F.M. (1995) Cellulitis owing to *Aeromonas hydrophila*: treatment with hyperbaric oxygen. *Aust NZ J Surg* 65: 367–369.

- Mawdesley-Thomas L.E. (1969) Furunculosis in the goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Biology* 1: 19 - 23.
- McArdle J.F., Dooley-Martyn C., McKiernan F. (1986) Histological examination of the gills as a method of detecting asymptomatic carriers of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, (*Salmo salar*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 6: 80-82.
- McCarthy D.H., Roberts R.J. (1980) Furunculosis of fish-the present state of our knowledge. In: Droop M.R., Jannasch H.W. (eds). *Advances in aquatic microbiology*, Academic Press, London (2) pp. 293-341.
- McCarthy D.H. (1975b) Detection of *Aeromonas salmonicida* antigen in diseased fish tissue. *Journal of General Microbiology* 88: 384 - 386.
- McCarthy D.H. (1977b) Some ecological aspects of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Aquatic Microbiology* 6: 299 - 324.
- McCarthy D.H., C.T. Rawle (1975) The rapid serological diagnosis of fish furunculosis caused by rough and smooth strains of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of General Microbiology* 86: 185 - 187.
- McGarey D.J., Milanesi L., Foley D.P., Reyers B.J., Frye L.C., Lim D.V. (1991) The role of motile aeromonads in the fish disease, ulcerative disease syndrome (UDS). *Experientia Rev.* 47: 441-444.
- Merino S., Rubires X., Knochel S., Tomàs J.M. (1995) Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. Food Microb.* 28: 157.
- Meyer, F.P. (1964) Field treatments of *Aeromonas liquefaciens* infections in golden shiners. *Progressive Fish-Culturist* 26: 33 - 35.
- Midtlyng P.J. (1994) Growth of Atlantic salmon after intraperitoneal injection of oil-adjuvanted furunculosis vaccines. *International Symposium on Aquatic Animal Health*, Seattle, WA (USA). Univ. Of California, School Of Veterinary Medicine: Davis, Ca (USA).
- Miles A., Halnan E.T. (1937) A new species of microorganisms causing black rot in eggs. *J Hyg (Camb)* 37: 79.
- Millership S.E. (1996) Identification. In: Austin B., Altwegg M., Gosling P.J., Joseph SW. (ed). *The genus Aeromonas* . John Wiley and Sons, New York pp. 85-108.

- Miñana-Galbis D., Farfán M., Fusté M.C., Lorén J. G. (2004) *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2073–2078.
- Miñana-Galbis D., Farfán M., Fusté M.C., Lorén, J.G. (2007) *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 582-587.
- Minana-Galbis D., Farfan M., Lorén J.G., Fusté M.C. (2002) Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 93: 420–430.
- Mitchell A.J., J.A. Plumb (1980) Toxicity and efficacy of furanace on channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) infected experimentally with *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* 3: 93 - 99.
- Mittal K.R., G. Lalonde, D. Leblanc, G. Olivier, R. Lallier (1980) *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout: relation between virulence and surface M characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 1501 - 1503.
- Miyazaki T., Kubota S.S. (1975a) Histopathological studies on the furunculosis of the Amago II. Perbranchial infection. *Fish Pathology* 9: 203 – 212.
- Morrison C.M., Cornick J.W., Shum G., Zwicker B. (1984) Histopathology of atypical *Aeromonas salmonicida* infection in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *J Fish Dis* 7: 477-494.
- Nakanishi T., Ototake M. (1997) Antigen uptake and immune responses after immersion vaccination. In: Gudding R., Lillehaug A, Midtlyng PJ, Brown F (eds.), *Developments in Biological Standardization* Basel Karger pp. 59-68.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved Standard M-31-T National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- National Statistical Service of Greece (2004) Aquaculture production for 2001. National Statistical Service of Greece, Primary Sector Statistics, Athens.
- Naviner M., Giraud E., Le Bris H., Armand F., Mangion C., Ganiere J.P. (2006) Seasonal variability of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), with a particular attention to *Aeromonas* spp. As

- candidate indicator of antimicrobial resistance. *Revue Méd. Vét.* 157(12): 599-604.
- Noga EJ. (2000) *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Blackwell Publishing, 1<sup>st</sup> ed., Iowa. pp.4-5,11-15,139-146,254-256,272-295.
  - Noga E.J., Berkhoff H.A. (1990) Pathological and microbiological features of *Aeromonas salmonicida* infection in the American eel (*Anguilla rostrata*). *Fish Pathol* 25: 122-132.
  - Nomura T. (1993) The epidemiological study of furunculosis in salmon propagation. *Scientific Reports of the Hokaido Salmon Hatchery (Japan)* 47: 1 – 99.
  - Nordmo R., A. Ramstad, J.M.H. Riseth (1998) Induction of experimental furunculosis in heterogeneous test populations of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by use of a cohabitation method. *Aquaculture* 162: 11 – 21.
  - Ogara W.O., P.G. Mbutia, H.F.A. Kaburia, H. Sorum, D.K. Kagunya, D.I. Nduthu, D. Colquhoun (1998) Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) mortality in Kenya. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 18: 7 – 9.
  - Olivier G., R. Lallier, S. Lariviere (1981) A toxigenic profile of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* isolated from fish. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 230 - 232.
  - Olivier G. (1990) Virulence of *Aeromonas salmonicida*: lack of relationship with phenotypic characteristics. *Journal of Aquatic Animal Health* 2: 119 - 127.
  - Ormen O., Pereinar G., Lassen J., Figueras M.J. (2005) Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas spp.* *Acta Patologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 113: 203-210.
  - Osborne J.A., Fensch G.E., Charba J.F. (1989) The abundance of *Aeromonas hydrophila* L. at Lake Harney on the St. Johns River with respect to red sore disease in striped mullet (*Mugil cephalus* L.). *Florida Scientist* 52: 171 - 176.
  - Palumbo S.A., Bencivengo M.M., Corral F., Williams A.C., Buchanan R.L., Del Corral F. (1989) Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 854 - 859.



- Paniagua C., Arguello-Villares J.L., Arias M.A., Herreros M. (1998) *Aeromonas hydrophila* associated with a severe outbreak of infection in farmed rabbits. *Zentr. Hyg. Umweltmed.* 201: 423.
- Paterson W.D., J.L. Fryer (1974) Immune response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31: 1751 –1755.
- Paterson W.D., Douey D., Desautels D. (1980) Relationships between selected strains of typical and atypical *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, and *Hemophilus piscium*. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 588 - 598.
- Pavan ME., Abbott SL., Zorzóculos J., Janda JM. (2000) *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp.nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1119-1124.
- Pedersen K., Garcia J.A., Larsen J.L. (1999) *Aeromonas salmonicida* a potential pathogen in modern eel (*Anguilla anguilla*) farming? *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19(3): 127-129.
- Persing D.H., T.F. Smith, F.C. Tenover, T.J. (1993) *Diagnostic molecular microbiology*, White (ed.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 641.
- Pickering A.D. (1997) Husbandry and stress. In: *Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research* (eds E.M. Bernoth, A.E. Ellis, P.J. Midtlyng, G. Olivier, P. Smith). Academic Press, London pp. 178–202.
- Pidiyar V., Kaznowski A., Narayan N.B., Patole M., Shouche, Y.S. (2002) *Aeromonas culicicola* sp. nov., from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1723–1728.
- Pierce R.L., Dalys C.A., Gates C.E., Wohlgemuth K., Brookings V.M. (1973) *Aeromonas* septicemia in a dog. *J.A.V.M.A.* 162: 469.

- Piper R.G., I.B. McElwain, L.E. Orme, J.P. McCraren, L.G. Fowler, J.R. Leonard (1982) Fish Hatchery Management. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington DC. pp.517.
- Pitcher D.G., Saunders N.A., Owen R.J. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8: 151–156.
- Pol J.M.A., R.Bootsma, J.M. Berg-Blommaert (1980) Pathogenesis of carp erythrodermatitis (CE): role of bacterial endo- and exotoxin. In W. Ahne (ed.) Fish diseases. Third COPRAQ-Session. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 120 – 125.
- Popoff M. (1984) Genus III: *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg N.R., Holt J.G. (eds). Williams & Wilkins. Baltimore, London pp. 545–548.
- Popoff M.Y., Coynault C., Kiredjian M., Lemelin, M. (1981) Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Current Microbiology* 5: 109–114.
- Popoff M., Véron M. (1976) A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*–*Aeromonas punctata* group. *J Gen Microbiol* 94: 11–22.
- Post G. (1966) Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to antigens of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 23: 1487 - 1494.
- Price N.C., L. Stevens, D. Duncan, M. Snodgrass. (1989) Proteases secreted by strains of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 12: 223 - 232.
- Qu F., Cui E.B., Xia G.M., He J.Y., Hong W., Li B., Mao Y.L. (2003) The clinical features and prognosis of *Aeromonas* septicaemia in hepatic cirrhosis: a report of 50 cases. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42: 840-842.
- Rahim Z., K.M.S. Aziz, M.I. Huq, H. Saeed (1985) Isolation of *Aeromonas hydrophila* from the wounds of five species of brackish water fish of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Zoology (Bangladesh)* 13: 37 - 42.
- Rahman M.M., Somsiri T., Tajima K., Ezura Y. (2004) Distribution of *Aeromonas spp.* Emphasizing on a Newly Identified Species *Aeromonas sp.* T8 Isolated from Fish and Aquatic Animals in Southeast Asia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(2): 258-268.

- Ringø E., F. Jutfelt, P. Kanapathippillai, Y. Bakken, K. Sundell, J. Glette, T.M. Mayhew, R. Myklebust, R.E. Olsen (2004) Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Cell Tissue Res. 318: 305–311.
- Rippey, S.R., Cabelli V.J. (1980) Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in limnetic environments: relationship of the organism to trophic state. Microb. Ecol. 6: 454.
- Roberts R.J. (1978) Fish Pathology, New York, Macmillan Publishing Co.Inc. pp.317.
- Rodriguez L.A., A.E. Ellis, T.P. Nieto (1992) Purification and characterisation of an extracellular metalloprotease, serine protease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32: all are lethal for fish. Microbial Pathogenesis 13: 17 - 24.
- Rodriguez L.A., A.E. Ellis, T.P. Nieto (1993) Effects of the acetylcholinesterase toxin of *Aeromonas hydrophila* on the central nervous system of fish. Microbial Pathogenesis 14: 411-415.
- Rodríguez C.N., Campos R., Pastran B., Jimenez I., Garcia A., Meijomil P., Rodríguez-Morales A.J. (2005) Sepsis due to extended-spectrum b-lactamase-producing *Aeromonas hydrophila* in a pediatric patient with diarrhoea and pneumonia. Clin Infect Dis 41: 421-422.
- Rogers W.A. (1971) Disease in fish due to the protozoan *Epistylis* (Ciliata: *Peritrichia*) in the southeastern U.S. Proceedings of the Southeastern Association of Game and Fish Commissions 25: 493 - 496.
- Rosner R. (1964) *Aeromonas hydrophila* as the etiologic agent in a case of severe gastroenteritis. Am J Clin Pathol 42: 402–404.
- Ross A.J. (1962) Isolation of a pigment-producing strain of *Aeromonas liquefaciens* from silver salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Journal of Bacteriology 84: 590 – 591.
- Sakai D.K. (1986) Electrostatic mechanism of survival of virulent *Aeromonas salmonicida* strains in river water. Applied and Environmental Microbiology 51: 1343 – 1349.
- Sakai D.K. (1985) Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. Infection and Immunity 48: 146 - 152.

- Sakai D.K. (1978) Colliquative activity of purified protease for muscular tissue in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Scientific Reports of the Hokaido Salmon Hatchery 33: 55 –73.
- Sako H., N. Ishida, Y. Maeno, M. Sorimachi (1988) Bactericidal activities of five disinfectants on *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. Fish Pathology 23: 219 – 229.
- Sandaa R.A., O. Enger (1996) High frequency transfer of a broad host range plasmid present in an atypical strain of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms* 24: 71–75.
- Schubert R.H.W. (1974) Genus II: *Aeromonas* Kluver and Van Niel 1936. In: R.E. Buchanan, N.E. Gibbons (eds), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore pp. 345–348.
- Schubert R.H.W., Hegazi M. (1988) *Aeromonas eucrenophila* species nova and *Aeromonas caviae*, a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten und Hygiene* 268(1): 34–39.
- Schubert R.H.W. (1967) The taxonomy and nomenclature of the genus *Aeromonas*. Part II. Suggestions on the taxonomy and nomenclature of the anaerogenic aeromonads. *International Journal of Systematic Bacteriology* 17: 273-279.
- Schubert R.H.W., Hegazi M., Wahlig W. (1990) *Aeromonas enteropelogenes* species nova. *Hyg Med* 15: 471–472.
- Schubert R.H.W., Hegazi M., Wahlig W. (1990) *Aeromonas ichthiosmia* species nova. *Hyg Med* 15: 477–479.
- Schultz D. (1980) Erythrodermatitis of carp: studies of the mode of infection. In W. Ahne (ed.) *Fish diseases*. Third COPRAQ-Session. Springer-verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 137 – 144
- Scott M. (1968) The pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* in sea and brackish waters. *Journal of General Microbiology* 50: 321 - 327.
- Shieh H.S., J.R. MacLean. (1975) Purification and properties of an extracellular protease of *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis. *International Journal of Biochemistry* 6: 653 - 656.

- Shimura S., K. Innoue, M. Kudo, S. Egusa. (1983) Studies on effects of parasitism of *Argulus correioni* (Crustacea: Branchiura) on furunculosis of *Oncorhynchus masou* (Salmonidae). *Fish Pathology* 18: 37 – 40.
- Shotts E.B., T.C. Hsu, W.D. Waltman (1985) Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathology* 20: 37 - 44.
- Shotts E.B., Rimler R. (1973) Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Applied Microbiology* 26: 550 - 553.
- Smibert R.M., Krieg N.R. (1994) Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, DC: American Society for Microbiology pp. 607–655.
- Smith W. (1963) The classification of 'Bacterium salmonicida'. *J Gen Microbiol* 33: 263-274.
- Snieszko S.F. (1952) Ulcer disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*): its economic importance, diagnosis, treatment and prevention. *Progressive Fish Culturist* 14: 43 - 49.
- Snieszko S.F., Friddle S.B. (1948) A contribution to the etiology of ulcer disease of trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 78: 56 - 63.
- Snieszko S.F., Griffin P.J., Friddle S.B. (1950) A new bacterium (*Hemophilus piscium* n. sp.) from ulcer disease of trout. *Journal of Bacteriology* 59: 699 - 710.
- Stanier R.Y. (1943) A note on the taxonomy of *Proteus hydrophilus*. *Journal of Bacteriology* 46: 213-214.
- Starliper C.E. (2001) The effect of depuration on transmission of *Aeromonas salmonicida* between the bivalve *Amplema plicata* and Arctic char. *Journal of Aquatic Animal Health* 13: 56– 62.
- Stirling Institute of Aquaculture (2004) Study of the market for aquaculture produced lubina y dorada species. Report to the European Commission, DG Fisheries.
- Sugita H., Nakamura T., Tanaka K., Deguchi Y. (1994) Identification of *Aeromonas* Species Isolated from Freshwater Fish with the Microplate Hybridization Method Applied and Environmental Microbiology 60(8): 3036-3038.

- Sugita H., Tanaka K., Yoshinami M., Deguchi Y. (1995) Distribution of *Aeromonas* Species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11): 4128-4130.
- Tajima K., T. Takahashi, Y. Ezura, T. Kimura. (1984) Enzymatic properties of the purified extracellular protease of *Aeromonas salmonicida* , Ar-4 (EFDL) *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50: 145 - 150.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
- Thornton J.M., D.A. Austin, B. Austin, R. Powell (1999) Small subunit rRNA gene sequences of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* and *Hemophilus piscium* reveal pronounced similarities to *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms* 35: 155 –158.
- Thune R.L., J.A. Plumb (1982) Effect of delivery method and antigen preparation on the production of antibodies against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Progressive Fish-Culturist* 44: 53 - 54.
- Trust T.J., Khouri A.G., Austen R.A., Ashburner. L.D. (1980) First isolation in Australia of atypical *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiology Letters* 9: 39 – 42.
- Trust T.J., Bull L.M., Currie B.R., Buckley J.T. (1974) Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 36: 1174 - 1179.
- Trust T.J., B. Noonan, S. Chu, P. Lutwyche, E. Umelo (1996) A molecular approach to understanding the pathogenesis of *Aeromonas salmonicida*: relevance to vaccine development. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 269–276.
- Udey L.R. (1982) A differential medium for distinguishing Alr+ from Alr- phenotypes in *Aeromonas salmonicida*. In: *Proceedings of the 13th Annual Conference and Workshop and 7th Eastern Fish Health Workshop*. Intl Assoc. for Aquat. Animal Med., Balhmore, Maryland pp. 41.

- Udey L.R. (1978) An additional cell wall layer associated with virulence of the fish pathogen, *Aeromonas salmonicida*. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology 78 (Abstract B-66).
- Varvarigos P. (2003) Practical considerations of vaccination strategies. Cited 28/09/2006. Available from World Wide Web: <http://www.vetcare.gr>
- Ventura M.T., J.M. Grizzle (1988) Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Diseases 11: 397 – 407.
- Von Graevenitz A., Mensch A.H. (1968) The genus *Aeromonas* in human bacteriology: report of 30 cases and review of the literature. N Engl J Med 278: 245–249.
- Walters G.R., J.A. Plumb (1980) Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. Journal of Fish Biology 17: 177 - 185.
- Watson I.M., J.O. Robinson, V. Burke, M. Gracey (1985) Invasiveness of *Aeromonas* spp. in relation to biotype, virulence factors, and clinical features. J. Clin. Microbiol. 22:48-51.
- Wedemeyer G., A J. Ross, L. Smith. (1969) Some metabolic effects of bacterial endotoxins in salmonid fishes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 26: 115 - 122.
- Wichardt U.P. (1983b) Atypical *Aeromonas salmonicida*-infection in sea-trout (*Salmo trutta* L.) II. Influence of water-temperature and stocking density on the infection rate. Laxforskningsinst Meddelande 7: 1-14.
- Wiklund T., Dalsgaard I. (1998) Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic organisms* 32: 49-69
- Wiklund T., Bylund G. (1993) Skin ulcer disease of flounder *Platichthys flesus* in the northern Baltic Sea. Dis. Aquat. Org. 17: 165-174.
- Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
- Wolf L.E. (1938) Observations on ulcer disease of trout. Transactions of the American Fisheries Society 68: 136 - 151.

- Wooster G.A., P.R. Bowser. (1996) The aerobiological pathway of a fish pathogen: survival and dissemination of *Aeromonas salmonicida* in aerosols and its implications in fish health management. *Journal of the World Aquaculture Society* 27: 7 - 14.
- Wright L.D., J.R. Snow (1975) The effect of six chemicals for disinfection of largemouth bass eggs. *Progressive Fish-Culturist* 37: 213 - 217
- Zhang Y.L., C.T. Ong, K.Y. Leung (2000) Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* 146: 999 – 1009.
  
- (http<sup>1</sup>) [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_greece](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_greece)
- (http<sup>2</sup>) [http://www.gsrt.gr/default.asp?V\\_ITEM\\_ID=2037](http://www.gsrt.gr/default.asp?V_ITEM_ID=2037)  
Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, Άρθρο του Νέγκα Ι.
- (http<sup>3</sup>) <http://www.kerasma.gr/pages.asp?pageid=34&langid=2>
- (http<sup>4</sup>) <http://www.fao.org/docrep/field/003/S5865E/S5865E02.HTM>. Fisheries and Aquaculture Department. Present status of freshwater fish farming in Greece, and potential for development.
- (http<sup>5</sup>) <http://www.mass.gov/czm/wpfshlth.htm>
- (http<sup>6</sup>) <http://www.fishdoc.co.uk/disease/bacterial.htm> Bacterial infections and diseases : common and difficult problems to deal with.
- (http<sup>7</sup>) [http://zipcodezoo.com/Bacteria/A/Aeromonas\\_jandaei/](http://zipcodezoo.com/Bacteria/A/Aeromonas_jandaei/)
- (http<sup>8</sup>) <http://www.bacterio.cict.fr/a/aeromonas.html>
- (http<sup>9</sup>) [http://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas\\_hydrophila](http://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas_hydrophila)
- (http<sup>10</sup>) [http://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas\\_salmonicida](http://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas_salmonicida)
- (http<sup>11</sup>) [microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aeromonas](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aeromonas)
- (http<sup>12</sup>) <http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgsp/msds-ftss/msds6e.html>. Health Canada, Material Safety Data Sheet – Infectious Substance, February 3th, 2004.
- (http<sup>13</sup>) <http://hmsc.oregonstate.edu/classes/MB492/hydrophilahayes/>
- (http<sup>14</sup>) <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/170414.htm>
- (http<sup>15</sup>) [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus\\_carpio/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/en)  
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS



- ([http<sup>16</sup>](http://www.thefishsite.com/articles/613/use-of-hydrogen-peroxide-in-finfish-aquaculture)) <http://www.thefishsite.com/articles/613/use-of-hydrogen-peroxide-in-finfish-aquaculture>. Use of Hydrogen Peroxide in Finfish Aquaculture
- ([http<sup>17</sup>](http://www.goldbamboo.com/images/content/4964-200px)) [www.goldbamboo.com/images/content/4964-200px](http://www.goldbamboo.com/images/content/4964-200px)
- ([http<sup>18</sup>](http://images.google.gr)) <http://images.google.gr>

### **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Ελληνική)**

- Αγγελίδης Π. 2008. Νοσήματα Ιχθύων που οφείλονται σε βακτήρια. Διδακτικές Σημειώσεις. Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών. Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών. Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ.
- Αθανασοπούλου Φ. (2006) Νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα. Διδακτικές Σημειώσεις του μαθήματος της Ιχθυοπαθολογίας για τους φοιτητές του 7<sup>ου</sup> εξαμήνου. Παν/κές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Παπουτσόγλου Σ. (1997) Εισαγωγή στις Υδατοκαλλιέργειες. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.
- Πάσχος Ι. (2004) Ιχθυοκαλλιέργειες Εσωτερικών Υδάτων. Β' Έκδοση, Εκδόσεις Θεοδωρίδη. Ιωάννινα. pp.1,2,5,7,8,66,67,91,92.
- Ράγιας Β., Αθανασοπούλου Φ. (2005) Χαρακτηριστικά εκτροφής και παθολογικά προβλήματα νέων ειδών εκτρεφόμενων ψαριών γλυκού νερού στην Ελλάδα. Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας 56(1): 40-45.
- Στεφανής Ι. (2007) Ιχθυοκαλλιέργεια: η πρόκληση του μέλλοντος. Ομιλία στην Επιτροπή Αλιείας του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου ΕΒΕΑ. Αλιευτικά Νέα. 312: 37-38.
- Φώτης Γ. (2003) Εκτροφή και Παθολογία ιχθύων. Τόμος Α', Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη. pp.306-313.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Στα ψάρια χρησιμοποιούνται κυρίως τα εξής θρεπτικά υποστρώματα:

1. **TSA**: (κίτρινο χρώμα) για ψάρια γλυκού νερού.
2. **TSA + NaCl**: (κίτρινο χρώμα) για ψάρια θαλασσινού νερού.
3. **TCBS**: (πράσινο χρώμα, γιατί περιέχει χολή). Ειδικό υπόστρωμα για ανίχνευση δονακίωσης ή Vibrio
4. **Αιματούχο Άγαρ**: ( κόκκινο χρώμα, γιατί περιέχει αίμα). Ειδικό υπόστρωμα για Pasteurella.
5. **CHYTOPHAGA**: Χρησιμοποιείται για ανίχνευση μυξοβακτηρίων.

Η καλλιέργεια πραγματοποιείται δύσκολα. Η χρήση του είναι σπάνια.

Σε κάθε ένα από τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα υπόστρωμα υπάρχουν στη συσκευασία του οι οδηγίες για την παρασκευή του.

### ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ - ΕΩΣΙΝΗ

(για ιστολογικές τομές)

<b>ΟΥΣΙΑ</b>	<b>ΧΡΟΝΟΣ</b>
ΕΥΛΟΛΗ	3 MIN
ΕΥΛΟΛΗ	3 MIN
ΑΠΟΛΥΤΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	2 MIN
ΑΠΟΛΥΤΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	2 MIN
ΑΛΚΟΟΛΗ 96	1 MIN
ΑΛΚΟΟΛΗ 96	1 MIN
ΑΛΚΟΟΛΗ 70	1 MIN
ΝΕΡΟ ΒΡΥΣΗΣ	1 MIN
ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗ	5-15 MIN
ΝΕΡΟ ΒΡΥΣΗΣ	5 MIN
ΟΞΙΝΗ ΑΛΚΟΟΛΗ 1%	1-3 DIPS
ΝΕΡΟ ΒΡΥΣΗΣ	5 MIN
ΕΩΣΙΝΗ	10 MIN
ΝΕΡΟ ΒΡΥΣΗΣ	1-2 DIPS
ΑΛΚΟΟΛΗ 70	1-2 DIPS
ΑΛΚΟΟΛΗ 96	1-2 DIPS
ΑΛΚΟΟΛΗ 96	1-2 DIPS
ΑΠΟΛΥΤΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	2 MIN
ΑΠΟΛΥΤΗ ΑΛΚΟΟΛΗ	2 MIN
ΕΥΛΟΛΗ	2 MIN
ΕΥΛΟΛΗ	5 MIN

(Τροποποιημένη μέθοδος, Αθανασοπούλου 2000)

**ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΜΠΟΥΤΙΣΜΟΥ ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΙΣΤΩΝ ΣΕ ΠΑΡΑΦΙΝΗ**

*(MANUAL για χειροκίνητη Ιστοκινέτα)*

1.	Ξέπλυμα μονιμοποιημένων ιστών σε νερό βρύσης επί	30´
2.	Αλκοόλη 70°	60´
3.	Αλκοόλη 70° (προαιρετικά)	60´
4.	Αλκοόλη 95°	60´
5.	Αλκοόλη 95°	(βράδυ)-120´
6.	Αλκοόλη 95° (προαιρετικά)	60´
7.	Αλκοόλη 100°	60´
8.	Αλκοόλη 100°	120´
9.	Αλκοόλη 100°	180´
10.	Ξυλόλη	30´ - 60´
11.	Ξυλόλη	120´
12.	Υγρή παραφίνη	120´
13.	Υγρή παραφίνη	(βράδυ)-120´

(Roberts,1989)