

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ, ΕΥΠΑΘΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΝΟΔΑ ΣΕ ΕΥΡΥΑΛΑ ΕΙΔΗ
ΨΑΡΙΩΝ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Β. ΜΠΙΤΧΑΒΑ

Πτυχιούχος Κτηνιατρικής Σχολής Π.Θ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας &
Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ, ΕΥΠΑΘΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΙΟΥ NODA ΣΕ ΕΥΡΥΑΛΑ ΕΙΔΗ
ΨΑΡΙΩΝ ΕΚΤΡΕΦΟΜΕΝΑ ΥΠΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ Β. ΜΠΙΤΧΑΒΑ

Πτυχιούχος Κτηνιατρικής Σχολής Π.Θ.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας &
Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρδίτσα 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 11244/1
Ημερ. Εισ.: 28-01-2013
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
639.3
ΜΠ

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Noda-ιοί που προσβάλλουν τα ψάρια (κλάση οστεοϊχθείς) ανήκουν στην οικογένεια *Nodaviridae* και στο γένος *Betanodavirus* (Carstens και συν., 2000). Η περιγραφή της μορφολογίας του πρώτου Betanoda-ιού που απομονώθηκε από ψάρια και η ταυτοποίησή του ως αιτιολογικού παράγοντα της νόσου της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας (VER) έγινε από τους Yoshikoshi & Inoue (1990). Το σωματίδιο των Betanoda-ιών είναι σφαιρικό, με διάμετρο 25-34 nm και αποτελείται από το καψίδιο και το γένωμα.

Οι Noda-ιοί των ψαριών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις γενότυπους, σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της μεταβλητής περιοχής (T4 περιοχή) του RNA2 γενωμικού τμήματος. Στα ψάρια της Μεσογείου έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα δύο από τους γενότυπους αυτούς, ο RGNNV και ο BFNNV (Thierry και συν., 2004) με πιο συχνό τον πρώτο.

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια είναι μία σημαντική νόσος των λαρβών, αλλά και ψαριών μεγαλύτερου μεγέθους. Τα περισσότερα ψάρια προσβάλλονται στο στάδιο της προνύμφης ή σε νεαρά στάδια ανάπτυξης, οπότε οι απώλειες είναι συνήθως πολύ μεγάλες. Γενικά, τα κλινικά συμπτώματα συσχετίζονται με τις αλλοιώσεις στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή, δηλαδή παρατηρούνται κινητικές ανωμαλίες, απώλεια ελέγχου της νηκτικής κύστης, δυσκολία στην όραση και σκούρος χρωματισμός του δέρματος.

Η νόσος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στις αρχές του Ιουλίου του 1995 (Le Breton και συν., 1997) στο λαβράκι. Έκτοτε έχει αναφερθεί και από άλλους Έλληνες ερευνητές αφού αποτελεί μια σημαντική νόσο που προκαλεί κάθε χρόνο μεγάλες απώλειες στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες.

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη της παθογένειας, της ευπάθειας και της παθολογίας του Noda-ιού σε ευρύαλα είδη ψαριών εκτρεφόμενα υπό διαφορετικές συνθήκες αλατότητας.

Η διατριβή χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος περιέχει τη βιβλιογραφική ανασκόπηση και το δεύτερο μέρος αφορά στη δική μας έρευνα και απαρτίζεται από τρία κεφάλαια τα: “Υλικά και Μέθοδοι”, “Αποτελέσματα” και “Συζήτηση”.

Στο πρώτο μέρος γίνεται ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας και διαιρείται σε τρία κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται η κατάσταση των υδατοκαλλιεργειών σε παγκόσμιο, ευρωπαϊκό και ελληνικό επίπεδο. Στο δεύτερο περιγράφεται η ταξινόμηση, η μορφολογία, η δομή και η σύσταση του ιού καθώς και οι φυσικοχημικές ιδιότητές του, η φυλογενετική συγγένεια μεταξύ των ειδών της οικογένειας *Nodavirinae* και η ορολογική συγγένεια των γενοτύπων των Betanodavirion. Στο τρίτο κεφάλαιο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση της νόσου της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας. Ειδικότερα περιγράφεται η παθογένεια της νόσου, τα κλινικά συμπτώματα, οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται, η επιζωοτιολογία, οι τρόποι διάγνωσης και πρόληψης του ιού και τέλος περιγράφονται οι μέθοδοι πειραματικής μόλυνσης ψαριών με Noda-ιούς που υπάρχουν μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία.

Στο δεύτερο μέρος στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”, περιγράφεται το πειραματικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση ενός προκαταρκτικού και δύο κυρίως πειραμάτων, τα υλικά και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση του ιού και τα στατιστικά πακέτα που χρησιμοποιήθηκαν για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στο κεφάλαιο “Αποτελέσματα” περιγράφονται τα ευρήματα της κλινικής εξέτασης των ψαριών των δύο πειραμάτων κατά την οποία στο πρώτο πείραμα διαπιστώθηκε ότι τα λαβράκια που εκτρέφονταν σε γλυκό νερό εκδήλωσαν πιο έντονα συμπτώματα και υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας, σε σχέση με τα λαβράκια που εκτρέφονταν σε ενυδρεία με νερό ενδιάμεσης ή πλήρους αλατότητας. Επίσης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα

της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR), με την οποία έγινε η τιτλοποίηση του ιού στους οφθαλμούς των ψαριών όλων των ενυδρείων, καθώς και η συσχέτιση των τίτλων του ιού με τις ημέρες μετά από τον ενοφθαλμισμό των ψαριών. Ακόμα, αναφέρονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι δείγματα αρνητικά με τη μέθοδο αυτή, ήταν θετικά όταν ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της real-time PCR. Επιπλέον περιγράφεται η ανάλυση πρωτοδιάταξης των γενωμάτων του ιού που απομονώθηκαν από τους οφθαλμούς των ψαριών και τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής μελέτης του πρώτου και δευτέρου πειράματος σε συνάρτηση με τις ημέρες μετά την έναρξη των πειραμάτων.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

- Παρότι τα λαβράκια στο ενυδρείο του γλυκού νερού είχαν μικρότερους τίτλους ιού από τα λαβράκια στα ενυδρεία με ενδιάμεση ή πλήρη αλατότητα, οι θνησιμότητες στα ψάρια αυτά ήταν μεγαλύτερες.
- Το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας που παρατηρήθηκε στα λαβράκια του γλυκού νερού είναι πιθανό να οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών αυτών να αντιμετωπίσει τον ιό. Η διαταραχή αυτή προκλήθηκε από το οσμωτικό στρες στο οποίο υποβάλλονται τα ψάρια όταν μεταφέρονται στο γλυκό νερό.
- Η προσβολή του ΚΝΣ και ιδιαίτερα της υπόφυσης από τον ίδιο τον ιό, είναι πιθανό να οδήγησε στη διαταραχή της ομοιοστασίας του οργανισμού των ψαριών σε επίπεδο ορμονών. Αποτέλεσμα της ορμονικής διαταραχής ήταν η πρόκληση προβλημάτων στην οσμωρύθμιση των ψαριών. Τα ψάρια αυτά ήταν πιο επιρρεπή σε οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση και κατ' επέκταση στη μόλυνση από το Noda-ιό.

- Πρέπει να δοθεί μεγάλη σημασία στην αποφυγή των στρεσσογόνων καταστάσεων σε διαχειριστικό επίπεδο στις μονάδες διότι η σημασία της πρόκλησης στρες κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με τον Noda- ιό αποδείχθηκε κατά την παρούσα διατριβή.
- Η μέθοδος της real-time PCR είναι μια πολύ αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του ιού στους ιστούς των ψαριών. Δίνει τη δυνατότητα να συσχετισθούν τα συμπτώματα, η παθολογοανατομική εικόνα και οι θνησιμότητες στα ψάρια με την εξέλιξη των τίτλων του ιού κατά τη διάρκεια της νόσου, σε συντομότερο χρονικό διάστημα απ' ό,τι η κλασική μέθοδος απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες.
- Στα λαβράκια του πρώτου πειράματος παρατηρήθηκε αντιστοιχία μεταξύ της ημέρας που παρατηρήθηκαν οι υψηλότεροι τίτλοι του ιού στους ιστούς τους και της ημέρας που παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων.
- Οι τσιπούρες στο πρώτο πείραμα δεν εκδήλωσαν συμπτώματα μετά από μόλυνση με δύο διαφορετικές δόσεις του ιού.
- Η μόλυνση επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της real-time PCR και οι τίτλοι του ιού στους οφθαλμούς τους ήταν μικρότεροι από εκείνους του λαβρακιού παρό,τι η μολύνουσα δόση στις τσιπούρες ήταν ίδια και μεγαλύτερη από αυτή στα λαβράκια.
- Οι τίτλοι του ιού στις τσιπούρες είχαν την ίδια εξέλιξη από απόψεως χρόνου όπως και εκείνοι των λαβρακιών.
- Ο ιός μεταδόθηκε σε υγιή λαβράκια μετά από βρώση οφθαλμών των ασυμπτωματικά μολυσμένων τσιπούρων του πρώτου πειράματος.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας & Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μ. Παπαναστασοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια, Μέλος Συμβουλευτικής
Επιτροπής
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων, Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Ι. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Μ. Παπαναστασοπούλου, Επίκουρος Καθηγήτρια	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Ι. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Π. Αγγελίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής	Κτηνιατρική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
Η. Κραμποβίτης Καθηγητής	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σπ. Κλαουδάτος, Καθηγητής	Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Π. Πανταζής, Λέκτορας	Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**STUDY OF THE PATHOGENESIS, PATHOLOGY AND
SUSCEPTIBILITY OF DIFFERENT EURYHALINE FISH
SPECIES TO NODA VIRUS, RAISED UNDER
DIFFERENT SALINITY CONDITIONS.**

KONSTANTINA V. BITCHAVA

Veterinarian

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY**

Work carried out at the Laboratory of Fish Diseases and
Aquaculture of the Faculty of Veterinary Medicine of the University
of Thessaly

Karditsa Greece 2009

ABSTRACT

Nodaviruses that affect fish species belong to the family *Nodaviridae* and the genus *Betanodavirus* (Carstens *et al.*, 2000). The description of the morphology of the first Betanodavirus that was isolated from fish and its identification as the aetiological factor of viral encephalopathy and retinopathy was made by Yoshikoshi & Inoue (1990). The particle of the virus is round with a diameter of 25-34 nm and is consisted by the capsid and the genome.

Fish Nodaviruses are categorised into four genotypes, according to the phylogenetic analysis that was based on the sequencing of the nucleotides of the T4 region of the RNA2 genomic part. From the Mediterranean fish until today, two genotypes have been isolated, RGNNV and BFNNV (Thiery *et al.*, 2004) with the first being more frequent.

Viral encephalopathy and retinopathy (VER) is a very important disease of larvae and juvenile fish. In these stages, fish are more sensitive to the virus and the losses are greater than in older fish. Generally, the clinical signs are caused by the lesions of the brain and the retina, thus developing kinetic dysfunctions, loss of the control of the swim bladder, difficulties in the vision and dark colouring of the skin.

In Greece the disease was first reported in 1995 in the beginning of July (Le Breton *et al.*, 1997) in sea bass. Since then the disease has been reported by other scientists due to the fact that it causes great losses in the fish farms every year.

The present thesis concerns the study of the pathogenesis, pathology and susceptibility of different euryhaline fish species to Noda virus, raised under different salinity conditions.

The thesis is divided into two Parts. In the first Part the literature is described and in the second Part there are three Chapters, Material & Methods, Results and Discussion.

In the first part the relevant literature is reviewed and this part is divided into three chapters. In chapter A, the world, european and greek aquaculture situation is described. In chapter B, the taxonomy, the morphology and the structure of the virus is described, as well as the physicochemical properties, the phylogenetic relevance between the species of the family Nodavirinae. In chapter C, the literature of the disease that the virus causes, is reviewed. In this chapter the pathogenesis, the clinical signs, the pathological findings, the epizootiology, the diagnosis and the preventions of the disease, are described, as well as the experimental transmissions of the virus in fish in the existing literature.

In the second Part, in the chapter Material and Methods, the protocol used in each experiment and the laboratory techniques used for the detection of the virus are described. The statistical packages used for the statistical analysis of the results are also described.

In the Results, the findings of the clinical signs of the two experiments are discussed. It was found that sea bass raised in fresh water developed more severe clinical signs and the total mortality of the fish was greater than that of the sea bass raised in the other two salinities. Moreover in this chapter, the results of real-time PCR are described and the titer of the virus in the eyes of the fish is calculated according to the day after the inoculation of the virus. The results of the cell culture inoculation are described according to which some positive samples to real-time PCR, were found negative to cell culture. Also in this chapter, the sequencing of the genome of the virus after its isolation from the fish of the two experiments is described, as well as the pathological findings and the lesions that the virus caused in the fish tissues according to the day after the inoculation of the virus.

From the findings of the present study the following conclusions can be drawn:

- Although the titer of the virus in sea bass raised in fresh water was lower than that of sea bass raised in the other two salinities, the mortality of the fish was greater.
- The greater percentage of mortality that was observed in the sea bass that were moved to fresh water is due to the decreased ability of the immunity system of these fish against the virus. This could be caused by the osmotic stress that fish undergo trying to adapt to fresh water.
- The lesions caused to the nervous system and especially the pituitary, by the virus, can have caused dysfunction in the harmonic balance which would disturb the osmoregulation and made the fish more vulnerable to pathogens such as Noda virus.
- Real-time PCR proved to be a very reliable and sensitive method for the qualitative and quantitative identification of the virus in fish tissues. It gives us the benefit to correlate the clinical signs, the pathological findings and the mortality, with the development of the titer of the virus in the fish tissues.
- Sea bream did not develop clinical signs with neither of the two doses of the virus inoculated.
- The transmission of the virus to sea bream was confirmed by real-time PCR and the titer of the virus in the eyes of sea bream were lower than that of sea bass, although the doses inoculated in sea bass were the same or lower.
- The titer of the virus in sea bream evolved in the same way as in sea bass concerning time.
- The virus was transmitted to healthy sea bass by eating the eyes of the asymptomatic sea bream of the first experiment.



ADVISORY COMMITTEE

F. Athanassopoulou, Professor, Supervisor
Laboratory of Fish Pathology, Ichthyology & Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Thessaly

M. Papanastassopoulou, Assistant Professor, Member of advisory committee
Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle
University of Thessaloniki

I. Pappas, Associate Professor, Member of advisory committee
Laboratory of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

EXAMINATION BOARD

Professor F. Athanassopoulou	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Assistant Professor M. Papanastassopoulou	Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Associate Professor I. Pappas	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Associate Professor P. Aggelidis	Faculty of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki
Professor E. Krambovitis	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly
Professor Sp. Klaoudatos	Faculty of Agriculture Ichthyology & Aquatic Environment, University of Thessaly
Lecturer P. Pantazis	Faculty of Veterinary Medicine, University of Thessaly

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ – ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
ADVISORY COMMITTEE – EXAMINATION BOARD.....	12
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	13
Πρόλογος – Σκοποί της παρούσας διατριβής	20
Ευχαριστίες	23

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	27
1.1. ΟΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΧΑΡΤΗ.....	28
1.1.1. Ένας κλάδος αυξανόμενης σημασίας.....	28
1.1.2. Η συνολική ποσότητα ψαριών από την αλιεία.....	28
1.1.3. Η παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες.....	29
1.2. ΟΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ	31
1.2.1. Προκλήσεις.....	32
1.2.2. Στρατηγική για περαιτέρω ανάπτυξη.....	33
1.2.3. Αειφόρος αλιεία.....	36
1.2.4. Υδατοκαλλιέργειες.....	36
1.2.5. Συνολική παραγωγή.....	38
1.3. Η παρούσα κατάσταση των υδατοκαλλιέργειών στην Ελλάδα.....	39
1.3.1. Καλλιεργούμενα είδη ψαριών στην Ελλάδα.....	41

1.3.2.	Πρακτικές/συστήματα καλλιέργειας.....	44
1.3.3.	Παραγωγή υδατοκαλλιεργειών.....	44
1.3.4.	Αγορά και εμπόριο	45
1.3.5.	Συνεισφορά στην οικονομία.....	46
1.4.	Παθολογικά προβλήματα στις υδατοκαλλιέργειες.....	46
2.	ΟΙ NODA-ΙΟΙ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ (ΙΟΙ ΤΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ).....	48
2.1.	Ταξινόμηση-Ονοματολογία.....	48
2.2.	Μορφολογία, δομή και σύσταση των Betanoda-ιών.....	52
2.3.	Πολλαπλασιασμός των ιών του γένους <i>Betanodavirus</i>	54
2.4.	Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	55
2.5.	Φυλογενετική συγγένεια μεταξύ των ειδών της οικογένειας <i>Nodavirinae</i>	55
2.6.	Ορολογική συγγένεια των γενοτύπων των Betanoda-ιών.....	56
3.	Η ΙΟΓΕΝΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ (VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY, VER).....	56
3.1.	Ιστορική αναδρομή της εμφάνισης της νόσου.....	57
3.2.	Παθογένεια.....	63
3.3.	Κλινικά συμπτώματα.....	65
3.3.1.	Υποκλινική λοίμωξη από τον ιό Noda.....	68
3.4.	Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις.....	69
3.5.	Επιζωοτιολογία.....	71
3.5.1.	Οριζόντια μετάδοση.....	71
3.5.2.	Κάθετη μετάδοση.....	72
3.5.3.	Μετάδοση μεταξύ ειδών.....	73

3.6.	Διάγνωση.....	75
3.6.1.	Κλινική διάγνωση.....	75
3.6.2.	Εργαστηριακή διάγνωση.....	75
3.6.2.1.	Κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης ιού.....	75
	<u>Ανίχνευση ιικών αντιγόνων.....</u>	76
	<u>Απομόνωση ιού.....</u>	76
	<u>Ανεύρεση των ιικών σωματιδίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο..</u>	78
3.6.2.2.	Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης ιού.....	78
	<u>RT-PCR.....</u>	78
	<u>Ένθετη RT-PCR.....</u>	79
	<u>Real-time PCR.....</u>	79
3.6.2.3.	Ανίχνευση αντισωμάτων.....	81
3.7.	Πρόληψη.....	82
3.8.	Μέθοδοι πειραματικής μόλυνσης ψαριών με Noda-ιούς.....	84
	<u>Πειραματικές μολύνσεις σε κοκάλι και στήρα μαλαμπάρ.....</u>	84
	<u>Πειραματικές μολύνσεις σε λαβράκι.....</u>	85
	<u>Πειραματικές μολύνσεις σε τσιπούρα.....</u>	86
	<u>Πειραματικές μολύνσεις σε ψάρια στα οποία δεν έχει παρατηρηθεί φυσική μόλυνση.....</u>	87
3.9.	Η εμφάνιση της νόσου στην Ελλάδα.....	87

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΚΗΣ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	93
I.	<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</u>	94
1.	ΥΛΙΚΑ.....	94

1.1.	Πειραματικές εγκαταστάσεις.....	94
1.2.	Πειραματικός πληθυσμός.....	95
1.3.	Υλικά για τη μόλυνση των ψαριών-πειραματόζων.....	96
	A. Πρώτο πείραμα.....	96
	B. Δεύτερο πείραμα.....	96
1.4.	Παθολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για ιχθυοπαθολογικό έλεγχο των ψαριών.....	97
	A. Παθολογικά υλικά από τα ψάρια του ιχθυογεννητικού σταθμού...	97
	B. Παθολογικά υλικά από τα ψάρια του πρώτου πειράματος	97
	Γ. Παθολογικά υλικά από τα ψάρια του δεύτερου πειράματος.....	97
1.5.	Κύτταρα και θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση του Noda-ιού.....	97
1.6.	Υλικά για την εκχύλιση του ιικού RNA από δείγματα ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού και ψαριών πρώτου & δεύτερου πειράματος.....	98
1.7.	Φωτομέτρηση εκχυλισμένων δειγμάτων.....	99
1.8.	Εκκινητές για την εφαρμογή της κλασικής PCR σε παθολογικά υλικά από ψάρια του ιχθυογεννητικού σταθμού.....	99
1.9.	Εκκινητές για την εφαρμογή της real-time PCR σε παθολογικά υλικά από ψάρια του πρώτου και δεύτερου πειράματος.....	99
1.10.	Ιός αναφοράς για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης στη real-time PCR.....	100
1.11.	Υλικά για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.....	100
1.12.	Υλικά για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της κλασικής PCR και της real-time PCR (Sequencing).....	101

2.	ΜΕΘΟΔΟΙ.....	101
2.1.	Ιχθυοπαθολογικός έλεγχος των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού.....	101
2.2.	Ρύθμιση αλατότητας και θερμοκρασίας στα πειραματικά ενυδρεία.....	102
	A. Πειραματικά ενυδρεία πρώτου πειράματος.....	102
	B. Πειραματικά ενυδρεία δευτέρου πειράματος.....	103
2.3.	Προκαταρκτικό πείραμα για τον καθορισμό της δόσης του ιού με την οποία θα ενοφθαλμιζονταν τα ψάρια του πρώτου πειράματος.....	104
2.4.	Πρωτόκολλο ενοφθαλμισμού ψαριών.....	105
	A. Ενοφθαλμισμός ψαριών πρώτου πειράματος.....	105
	B. Μόλυνση ψαριών δευτέρου πειράματος.....	105
2.5.	Κλινική εξέταση ψαριών πρώτου και δευτέρου πειράματος.....	106
2.6.	Πρωτόκολλο δειγματοληψίας παθολογικών υλικών από τα ψάρια-πειραματόζωα.....	106
	A. Δειγματοληψίες από τα ψάρια του πρώτου πειράματος.....	106
	B. Δειγματοληψίες από τα ψάρια του δευτέρου πειράματος.....	107
2.7.	Ιστοπαθολογική εξέταση ψαριών πρώτου και δευτέρου πειράματος.....	107
2.8.	Καλλιέργεια των κυττάρων SSN-1.....	108
2.9.	Κατεργασία των παθολογικών υλικών για απομόνωση του ιού....	110
2.10.	Απομόνωση του ιού από τα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος.....	110
2.11.	Τιτλοποίηση του Noda-ιού σε πλάκες των 96 φρεατίων.....	111

2.12.	Εκχύλιση του ιικού RNA για την εφαρμογή της κλασικής PCR και της real-time PCR.....	113
2.13.	Αντίστροφη μεταγραφή (RT) - Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).....	114
2.14.	Κλασική PCR για την ανίχνευση του ιού στα ψάρια του ιχθυογεννητικού σταθμού.....	114
	Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης.....	115
2.15.	Ποσοτική real-time PCR για την ανίχνευση του ιού στα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος.....	116
A.	Αντιδραστήρια για την εφαρμογή της real-time PCR.....	116
B.	Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης.....	117
Γ.	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης (καμπύλη αναφοράς).....	118
2.16.	Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της κλασικής PCR και της real time PCR.....	121
2.17.	Καθαρισμός των προϊόντων της real-time PCR για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing).....	122
2.18.	Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	122
II.	<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	123
1.	ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ	123
1.1.	Ιχθυοπαθολογικός έλεγχος των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού.....	123
1.2.	Κλινική εξέταση των λαβρακιών του προκαταρκτικού πειράματος	123
1.3.	Κλινική εξέταση των ψαριών του πρώτου πειράματος.....	125
1.4.	Κλινική εξέταση των λαβρακιών του δευτέρου πειράματος.....	143
2.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	144

2.1.	Μοριακές εξετάσεις.....	144
2.1.1.	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	144
2.1.2.	Έλεγχος των ψαριών του πρώτου και του δευτέρου πειράματος με Real-time PCR.....	145
A.	Φωτομέτρηση εκχυλισμένων δειγμάτων.....	145
B.	Τιτλοποίηση των δειγμάτων παθολογικού υλικού (οφθαλμοί) από τα ψάρια του πρώτου πειράματος	145
Γ.	Τιτλοποίηση των δειγμάτων παθολογικού υλικού (οφθαλμοί) από τα ψάρια του δευτέρου πειράματος.....	151
2.2.	Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της real-time PCR (Sequencing).....	153
2.3.	Απομόνωση του ιού από τα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος με ενοφθαλμισμό των κυττάρων SSN-1.....	154
2.4.	Ιστοπαθολογική εξέταση.....	160
2.4.1.	Ιστοπαθολογική μελέτη των ψαριών του πρώτου πειράματος.....	160
	<u>Λαβράκια</u>	160
	<u>Τσιπούρες</u>	166
2.4.2.	Ιστοπαθολογική μελέτη των ψαριών του δευτέρου πειράματος....	168
III.	<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	172
	ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	176
	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ.....	185
	<i>Ανίχνευση του Noda-ιού με real-time PCR</i>	185
	<i>Απομόνωση του Noda-ιού σε κύτταρα SSN-1</i>	192
	<i>Ιστοπαθολογικές εξετάσεις</i>	194
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	198

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ	200
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	221

Πρόλογος – Σκοποί της παρούσας διατριβής

Τα τελευταία χρόνια διαπιστώθηκε ραγδαία επέκταση των υδατοκαλλιεργειών σε ολόκληρο τον κόσμο. Η εκτροφή ψαριών κατέστη ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφίμων στον κόσμο ([http¹](#)), ενώ και στην Ε.Ε. η αλιεία και οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν σημαντικές οικονομικές δραστηριότητες.

Στην Ελλάδα, παρότι η καλλιέργεια υδάτινων οργανισμών είναι γνωστή από τα χρόνια της αρχαιότητας, τα κυρίως καλλιεργούμενα ψάρια σήμερα δηλαδή το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax* L.) και η τσιπούρα (*Sparus aurata* L.), καλλιεργούνται μόλις από το 1980. Η αυξανόμενη ζήτηση στην αγορά για τα είδη αυτά αλλά και οι ευνοϊκές συνθήκες που υπάρχουν στη χώρα, όσον αφορά στο κλίμα και στην εκτεταμένη ακτογραμμή, έκαναν την Ελλάδα χώρα επιλογής για την ανάπτυξη της βιομηχανίας αυτής και έτσι σήμερα είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα λαβρακιών και τσιπούρων στον κόσμο.

Σε όλα όμως τα συστήματα υδατοκαλλιεργειών η αύξηση της παραγωγής ψαριών παρεμποδίζεται από την παρουσία παθογόνων παραγόντων, όπως είναι τα βακτήρια, οι ιοί και τα παράσιτα. Οι περισσότεροι από τους παράγοντες αυτούς συνήθως βρίσκονται στο περιβάλλον εκτροφής των ψαριών και εκδηλώνουν την παθογόνο δράση τους λόγω των εντατικών συνθηκών εκτροφής.

Οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις που παρατηρούνται στα ψάρια, εξαιτίας της προσβολής τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, έχουν σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο λόγω των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας (βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις), των αρνητικών επιδράσεων στην ανάπτυξη (παρασιτώσεις) ή της

μειωμένης εμπορευσιμότητας των ψαριών, εξαιτίας της κακής εξωτερικής τους εμφάνισης.

Στη Μεσόγειο έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα δύο ιοί από τα εκτρεφόμενα ψάρια, ο ιός της λεμφοκύστης και ο Noda-ιός (Αθανασοπούλου, 2005). Ο ιός της λεμφοκύστης δεν προκαλεί σημαντικά προβλήματα σε αντίθεση με τον Noda-ιό, ο οποίος προκαλεί την ιογενή εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (VER), η οποία είναι μία σημαντική νόσος των λαρβών, αλλά και ψαριών μεγαλύτερου μεγέθους. Παρατηρείται σε ολόκληρο σχεδόν τον κόσμο, εκτός της Αφρικής και μέχρι σήμερα η νόσος έχει αναφερθεί σε περισσότερα από 30 είδη ψαριών (Munday και συν., 2002).

Η νόσος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στις αρχές του Ιουλίου του 1995. Χαρακτηριστικό της είναι η προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού και η πρόκληση μαζικών θνησιμοτήτων σε λάρβες και ιχθύδια ψαριών.

Παρότι η νόσος παρατηρείται στα ψάρια του θαλασσινού νερού, έχουν αναφερθεί και δύο περιστατικά φυσικής λοίμωξης σε ψάρια γλυκού νερού στην Αυστραλία (Munday και συν., 2002). Επίσης, το καλοκαίρι του 2000 η νόσος παρατηρήθηκε στην περιοχή της Ηπείρου σε ψάρια που εκτρέφονταν σε γλυκό νερό από τους Athanassorouli και συνεργάτες. Η συγκεκριμένη μονάδα ήταν μικτής εκτροφής διάφορων ειδών ψαριών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονταν λαβράκια και οξύρυγχοι (*Acipenser gueldenstaedi* L.) (Athanassorouli και συν., 2003).

Όσον αφορά στην τσιπούρα, οι Castric και συνεργάτες (2001) αναφέρουν ότι είναι ασυμπτωματικός φορέας της νόσου, ενώ το 2007 οι Bitchava και συνεργάτες ανέφεραν την πρώτη ανίχνευση του ιού σε τσιπούρες με νευρικά συμπτώματα, από μικτή εκτροφή τσιπούρας-λαβρακιού στην περιοχή του ανατολικού Αιγαίου.

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη του ιού στα μεσογειακά καλλιεργούμενα είδη τσιπούρα και λαβράκι και αποσκοπεί:

- Στην εκτίμηση της κατάστασης της νόσου αυτής στο ευρύαλο είδος λαβράκι όταν αυτό εκτρέφεται υπό διαφορετικές συνθήκες αλατότητας.
- Στη μελέτη της εκδήλωσης της νόσου στην τσιπούρα μετά από μόλυνση των ιχθυδίων με δύο διαφορετικές δόσεις του ιού.
- Στη μετάδοση του ιού από ασυμπτωματικά μολυσμένες τσιπούρες σε λαβράκια, μετά από βρώση των οφθαλμών τσιπούρας από τα υγιή λαβράκια, φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στις εντατικές εκτροφές των ψαριών.
- Στη μελέτη των ιστοπαθολογικών τομών των νοσούντων και φαινομενικά υγιών ψαριών και τη συσχέτιση των αλλοιώσεων με την ημέρα μετά τη μόλυνση των ψαριών.
- Στην ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) και την πιλοποίηση του ιού στα δείγματα από τους ιστούς των ψαριών.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ερευνητική εργασία που περιγράφεται διήρκησε από την άνοιξη του 2006 έως το φθινόπωρο του 2008 και η συγγραφή της διατριβής έγινε κατά έτη 2008 και 2009.

Το σύνολο των πειραμάτων και των διαγνωστικών μεθόδων που περιγράφονται στη διατριβή πραγματοποιήθηκαν Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε με υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών υποτροφιών εσωτερικού που διήρκησε 3 έτη.

Ευχαριστίες

Θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στην κ. Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η οποία μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω αυτή τη διατριβή και την επέβλεψε, υποστηρίζοντας και καθοδηγώντας με καθ' όλη τη διάρκειά της με τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές της. Η συμβολή της ήταν καθοριστική στην επιλογή του θέματος και η βοήθειά της συνεχής και καταλυτική καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης την κ. Μαρία Παπαναστασοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για τη συμβολή της ως μέλος της τριμελούς επιτροπής και τις πολύτιμες συμβουλές της όσον αφορά στην Ιολογία. Επίσης, την ευχαριστώ για την υπομονή που επέδειξε κατά τη συγγραφή της διατριβής και τις καθοριστικές διορθώσεις της στο κείμενο.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Παππά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβολή του ως μέλος της τριμελούς επιτροπής και για τη βοήθειά του στο εργαστηριακό μέρος της διατριβής. Η συμβολή του ήταν καθοριστική για τη διενέργεια των μοριακών τεχνικών και τον ευχαριστώ ιδιαίτερα που μου μετέφερε τις γνώσεις του και την εμπειρία του για την ανάπτυξη της real-time PCR.

Ευχαριστίες επίσης απευθύνω:

Στον Dr. Giuseppe Bono, διευθυντή του εργαστηρίου αναφοράς για τον Noda-
iό, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπαιδευτώ υπό την επίβλεψή του στις κυτταροκαλλιέργειες και τις μοριακές τεχνικές, στο εργαστήριο Ιολογίας του Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie και μου προμήθευσε την κυτταρική σειρά για την απομόνωση του ιού.

Στην κ. Ευτυχία Ξυλούρη-Φραγκιαδάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών, που μου μετάδωσε τις γνώσεις της πάνω στις

εργαστηριακές τεχνικές της ιολογίας, κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο Ιολογίας του Τομέα Ζωικής Παραγωγής της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών.

Στον κ. Καραμάνη, Λέκτορα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τη βοήθεια του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στον κ. Σ. Πανόπουλο, υπεύθυνο παραγωγής των ιχθυοκαλλιεργειών Σελόντα, για την προσφορά των πειραματικών ιχθυδίων και για τις συμβουλές του όσον αφορά στη διενέργεια του δευτέρου πειράματος.

Στην παιδική μου φίλη και φιλόλογο κ. Βασιλική Παπαστεφάνου, κάτοχο μεταπτυχιακού διπλώματος στην Νέα Ελληνική Φιλολογία, για την φιλολογική επιμέλεια του κειμένου.

Στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ηλία Τσαντήλα και τη διδάκτορα Ε. Γκολομάζου για τη βοήθεια τους στη μόλυνση των ψαριών με τον ιό.

Στην κ. Ε. Τζιρώνη, φίλη και τεχνικό του Εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, για τη βοήθειά της στην παρασκευή μέρους των δειγμάτων για ιστοπαθολογική εξέταση.

Στον κ. Σάββα Μαυρίδη, υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας για τις συμβουλές του πάνω στις μοριακές τεχνικές.

Στην κ. Σ. Βαγιάνου, πρώην τεχνικό του Εργαστηρίου Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, για την παρασκευή μέρους των δειγμάτων για ιστοπαθολογική εξέταση.

Ένα απέραντο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους. Τους γονείς μου Βασίλη και Κατερίνα, που στέκονται δίπλα μου με όλη τους την αγάπη σε κάθε βήμα της ζωής μου. Τις αδερφές μου Δήμητρα και Αμαλία, που με καλομαθαίνουν μέχρι και σήμερα γιατί είμαι πάντα η μικρή τους αδερφή. Την Αμαλία οφείλω να την ευχαριστήσω διπλά γιατί με έβγαλε από κάποια "μαθηματικά αδιέξοδα" κατά τη συγγραφή των αποτελεσμάτων. Τα ανιψάκια μου Φοίβη, Γιάννη και Έκτορα, που με γεμίζουν ελπίδα και θάρρος με κάθε τους χαμόγελο. Τις φίλες και φίλους μου, που υπάρχουν για να γεμίζουν τη ζωή μου με όμορφες καθημερινές στιγμές. Τέλος

ευχαριστώ τον άνθρωπο που είναι εκεί και με στηρίζει από τη στιγμή που ξυπνάω μέχρι αργά το βράδυ όταν πέφτω για ύπνο, το σύντροφό μου Δημήτρη. Τον ευχαριστώ που υπάρχει, που είναι σε όλα δίπλα μου.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Ο όρος υδατοκαλλιέργειες αφορά στην εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται τα ψάρια, τα μαλάκια, τα καρκινοειδή και τα υδρόβια φυτά στο υδάτινο περιβάλλον (<http>¹).

Οι υδατοκαλλιέργειες (Κλαουδάτος, 2003) διακρίνονται σε:

- καλλιέργειες ή εκτροφές γλυκών, θαλασσινών ή υφάλμυρων νερών, ανάλογα με το υδάτινο περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιούνται,
- χερσαίες, θαλάσσιες, ποτάμιες και λοιπές καλλιέργειες ή εκτροφές, ανάλογα με το χώρο όπου τοποθετούνται οι εγκαταστάσεις,
- καλλιέργειες φυκών, κεφαλόποδων, γαρίδων, οστρακοειδών και ιχθύων, ανάλογα με το είδος του υδρόβιου οργανισμού,
- ανοικτές, κλειστές και ημίκλειστες καλλιέργειες ή εκτροφές, ανάλογα με το σύστημα κυκλοφορίας νερού και
- εκτατικές, ημιεντατικές και εντατικές εκτροφές, ανάλογα με τη διάθεση ή μη τροφής στους εκτρεφόμενους οργανισμούς.

Στο γενικότερο πλαίσιο των υδατοκαλλιεργειών εντάσσονται και οι ιχθυοκαλλιέργειες, που αφορούν στην ελεγχόμενη εκτροφή ψαριών (Πάσχος, 2004). Η πρώτη ελεγχόμενη εκτροφή ψαριών φαίνεται να ξεκινά στην Άπω Ανατολή, γύρω στο 500 π.Χ. και πραγματοποιείται σε γλυκά ύδατα. Αργότερα, γύρω στο 2500 μ.Χ., συναντάμε παρόμοιες αναφορές σε Αρχαία Αίγυπτο και Ελλάδα. Λεπτομέρειες για τους τρόπους εκτροφής περιλαμβάνονται σε γραπτά κείμενα του 1243 και του 1639 μ.Χ. (Πάσχος, 2004).

1.1. ΟΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΧΑΡΤΗ

1.1.1. Ένας κλάδος αυξανόμενης σημασίας

Τα τελευταία χρόνια διαπιστώθηκε ραγδαία επέκταση των υδατοκαλλιεργειών σε ολόκληρο τον κόσμο. Πιο συγκεκριμένα, η εκτροφή ψαριών κατέστη ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος τομέας παραγωγής τροφίμων στον κόσμο (<http>¹).

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Επισιτισμού του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (FAO) συγκεντρώνει στοιχεία και στατιστικές από κάθε χώρα και κάθε δύο χρόνια εκδίδει έναν οδηγό για την κατάσταση της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών παγκοσμίως. Ο τελευταίος οδηγός εκδόθηκε το 2006 και αναφέρεται στην παγκόσμια παραγωγή μέχρι το έτος 2004.

Σύμφωνα με τα στοιχεία του προαναφερθέντος οδηγού, η αλιεία και οι υδατοκαλλιέργειες παρείχαν το 2004 106 εκατομμύρια τόνους ψαριών ως τρόφιμο σε ολόκληρο τον κόσμο, με κατά κεφαλήν κατανάλωση 16,6 kg. Η εν λόγω κατανάλωση είναι η υψηλότερη που έχει παρατηρηθεί ποτέ. Στο σύνολο αυτό, οι υδατοκαλλιέργειες αφορούν στο 43% του συνολικού όγκου. Από το 1992, η κατά κεφαλήν κατανάλωση έχει μια μέτρια αύξηση, του ύψους του 0,4% κάθε χρόνο, εξαιρουμένης της Κίνας. Συνολικά, τα ψάρια ως τροφή παρείχαν σε περισσότερους από 2,6 δισεκατομμύρια ανθρώπους τουλάχιστον το 20% του μέσου, κατά κεφαλήν, όρου κατανάλωσης ζωικών πρωτεϊνών. Το ποσοστό των πρωτεϊνών από ψάρια, στο σύνολο των ζωικών πρωτεϊνών που καταναλώθηκαν, αυξήθηκε από 14,9% το 1992 σε 16,0% το 1996, στη συνέχεια παρέμεινε στο ίδιο περίπου ποσοστό μέχρι το 2001 (15,9%), αλλά το 2003 παρατηρήθηκε μια μικρή κάμψη (15,5%).

1.1.2. Η συνολική ποσότητα ψαριών από την αλιεία

Η συνολική ποσότητα ψαριών από την αλιεία το 2004 έφτασε τους 95 εκατομμύρια τόνους με μια αύξηση 5% σε σχέση με το 2003 και η συνολική αλιευτική παραγωγή για ανθρώπινη κατανάλωση έφθασε τους 90,5 τόνους (FAO, 2004).

Οι υδατοκαλλιέργειες βοήθησαν στην αύξηση της κατά κεφαλήν κατανάλωσης

ψαριών από το 2000 και μετά, σε σχέση με την παροχή ψαριών μέσω της αλιείας.

Από το 1974 υπάρχει μια συνεχιζόμενη μείωση του ποσοστού των φυσικών αποθεμάτων ψαριών από περίπου 10% στα μέσα του 1970, σε περίπου 25% στις αρχές του 2000. Η μείωση αυτή δημιουργείται από την αύξηση του ποσοστού των υπερεκμεταλλευμένων και μειωμένων αποθεμάτων. Το ποσοστό των φυσικών αποθεμάτων, στο οποίο γίνεται εκμετάλλευση στο μέγιστο ή σε περισσότερο από το μέγιστο αποδεκτό όριο, ποικίλει σε μεγάλο βαθμό ανάλογα με την αλιευτική περιοχή. Οι πληροφορίες που υπάρχουν συνεχίζουν να επιβεβαιώνουν ότι, ανεξάρτητα από τις τοπικές διαφορές, η παγκόσμια δυνατότητα για αλίευση έχει φτάσει στο μέγιστό της και χρειάζεται να ληφθούν αυστηρά μέτρα για να ανακάμψουν τα μειωμένα αποθέματα και να αποτραπεί η μείωση αυτών που βρίσκονται στο μέγιστο όριο εκμετάλλευσής τους (FAO, 2004).

1.1.3. Η παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες

Η συνεισφορά των υδατοκαλλιεργειών στην παγκόσμια παραγωγή ψαριών, καρκινοειδών, μαλακίων και άλλων υδάτινων οργανισμών, συνεχίζει να αυξάνεται από 3,9 % της συνολικής σε βάρος παραγωγής το 1970, σε 27,1% το 2000 και 32,4% το 2004. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι υδατοκαλλιέργειες συνεχίζουν να αναπτύσσονται πιο γρήγορα από οποιονδήποτε άλλο τομέα παραγωγής ζωικών τροφίμων στον κόσμο (FAO, 2006).

Προκαταρκτικοί υπολογισμοί για το 2005, σε κάποιες κύριες παραγωγούς χώρες δείχνουν ότι η συνολική παραγωγή έφθασε τους 142 εκατομμύρια τόνους, ενώ η συνολική ποσότητα για ανθρώπινη κατανάλωση, σε σύγκριση με την παραγωγή του 2004, αυξήθηκε πάνω από 1 εκατομμύριο τόνους και έφθασε τους 107 εκατομμύρια τόνους. Το τελευταίο αποτελεί ρεκόρ υψηλής παραγωγής. Εντούτοις, η παγκόσμια κατά κεφαλήν κατανάλωση παρέμεινε η ίδια λόγω της αύξησης του πληθυσμού της γης. Παρόλο που μειώθηκε η αλιευτική παραγωγή για ανθρώπινη κατανάλωση, η παραγωγή αλιευμάτων από υδατοκαλλιέργειες αυξήθηκε, οπότε

αντισταθμίστηκε η μείωση της αλιευτικής παραγωγής και τελικά αυξήθηκε και η συνολική παραγωγή.

Ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών συνεχίζει να αναπτύσσεται πιο γρήγορα από όλους τους άλλους τομείς παραγωγής ζωικού προϊόντος για ανθρώπινη κατανάλωση, με μέση ετήσια αύξηση της τάξης του 8,8% από το 1970 και μετά. Αντίθετα, η αύξηση της παραγωγής της αλιείας ήταν μόνο 1,2%, ενώ η αύξηση στις χερσαίες μονάδες παραγωγής κρέατος ήταν 2,8%. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις ότι το ποσοστό της αύξησης έφθασε στο μέγιστο, αν και για ορισμένες περιοχές και ορισμένα είδη ψαριών θα συνεχιστεί ο ίδιος ρυθμός αύξησης.

Αντίθετα με την χερσαία παραγωγή, στην οποία ο όγκος της παγκόσμιας παραγωγής βασίζεται σε περιορισμένο αριθμό ζώων και φυτών, το 2004 αναφέρθηκαν πάνω από 240 διαφορετικά είδη καλλιεργούμενων υδάτινων οργανισμών και φυτών. Σε σχέση με το 2002, ο αριθμός αυτός ήταν αυξημένος κατά 20 είδη (FAO, 2006).

Οι εξελίξεις κατά τη διάρκεια των ετών 2006 και 2007, επιβεβαίωσαν την τάση που ήδη είχε παρατηρηθεί στα τέλη της δεκαετίας του 1990, ότι δηλαδή η παραγωγή που αποφέρει η αλιεία είναι στάσιμη, ενώ οι υδατοκαλλιέργειες εξελίσσονται. Το γεγονός αυτό προκαλεί ανησυχία για την επιβίωση των παραδοσιακών ψαράδων και των φυσικών οικοσυστημάτων.

Κατά τη διάρκεια των τριών τελευταίων δεκαετιών το ποσοστό των ψαράδων και των καλλιεργητών και της δραστηριότητάς τους, αυξήθηκε πιο γρήγορα από την ποσοστιαία αύξηση του πληθυσμού της γης και πιο γρήγορα από την ενασχόληση με την παραδοσιακή γεωργία. Το 2004 ο αριθμός των ατόμων που είχαν εισόδημα από τον πρωτογενή τομέα της αλιείας και των υδατοκαλλιεργειών έφθασε περίπου τα 41 εκατομμύρια.

Από οικονομική άποψη, η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών το 2004 ήταν 45,5 εκατομμύρια τόνοι, αξίας 63,3 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Η Κίνα είναι υπεύθυνη για το 70% της παγκόσμιας παραγωγής, που οικονομικά αντιστοιχεί σε

περισσότερο από το μισό της αξίας της. Σε όλες τις περιοχές της γης παρατηρήθηκε αύξηση στην παραγωγή από το 2002 μέχρι το 2004. Οι υδατοκαλλιέργειες σε γλυκά νερά παρέμειναν κυρίαρχες στο χώρο, με ποσοστό 56,6% στην ποσότητα και 50,1% στην αξία της παραγωγής. Η παραγωγή σε θαλάσσια ύδατα συνεισφέρει στο 36% της παραγωγής σε ποσότητα και στο 36,6% στη συνολική αξία.

Από απόψεως εμπορίου και εξαγωγών, το συνολικό εμπόριο ψαριών και των παραπροϊόντων τους έφθασε τα 71,5 δισεκατομμύρια δολάρια το 2004, παρουσιάζοντας μια αύξηση 23% σε σχέση με το 2000. Προκαταρκτικές μελέτες για το 2005 δείχνουν ότι θα υπάρξει περαιτέρω αύξηση στην αξία των ψαριών ως εξαγωγικού προϊόντος. Οι εξαγωγές ψαριών και των παραπροϊόντων τους αυξήθηκαν κατά 17,3% την περίοδο 2000–2004. Όλα αυτά υποδεικνύουν ότι τα ψάρια είναι ένα από τα σημαντικότερα είδη τροφίμων που διακινούνται παγκοσμίως (FAO, 2006).

1.2. ΟΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) οι υδατοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν τρεις κύριες δραστηριότητες:

- την εκτροφή θαλάσσιων ψαριών,
- την εκτροφή θαλάσσιων οστρακόδερμων και
- την εκτροφή ψαριών σε γλυκό νερό.

Η αλιεία και οι υδατοκαλλιέργειες αποτελούν σημαντικές οικονομικές δραστηριότητες στην Ε.Ε. Παρόλο που η συμμετοχή του αλιευτικού κλάδου στο ακαθάριστο εθνικό προϊόν των κρατών μελών είναι συνήθως μικρότερη του 1%, ο κλάδος αυτός αποτελεί σημαντικό τομέα απασχόλησης σε περιοχές, όπου συχνά υπάρχουν ελάχιστες εναλλακτικές λύσεις. Επιπλέον, συμβάλλει στον ανεφοδιασμό της αγοράς της Ε.Ε. –μιας από τις μεγαλύτερες του κόσμου (<http>²)- με αλιευτικά προϊόντα.

Σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες υπάρχει μακρά παράδοση εκτροφής ψαριών και οστρακόδερμων γεγονός που εύκολα εξηγεί την ποικιλομορφία που παρουσιάζει ο κλάδος των κοινοτικών υδατοκαλλιεργειών, που περιλαμβάνει από μικροεπιχειρήσεις μέχρι βιομηχανικού τύπου πολυεθνικές επιχειρήσεις.

Τέσσερα είδη κυριαρχούν στην παραγωγή της Ε.Ε.: η πέστροφα, ο σολομός, τα μύδια και τα στρείδια. Λόγω της μεγαλύτερης εμπειρίας που αποκτήθηκε, όσον αφορά στις ανάγκες των εκτρεφόμενων ψαριών και της προόδου της τεχνολογίας, οι υδατοκαλλιεργητές στρέφουν την προσοχή τους σε νέα είδη, όπως είναι τα λαβράκια, οι συναγρίδες και τα καλκάνια ([http²](http://)).

Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ε.Ε. διαδραματίζουν ρόλο παρόμοιο με εκείνον της αλιείας. Συγκεκριμένα, εφοδιάζοντας την αγορά με ψάρια και οστρακόδερμα βοηθούν στην αποκατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις εισαγωγές και τις εξαγωγές των αλιευτικών προϊόντων. Επιπλέον, οι καταναλωτές ωφελούνται από την ποικιλία των προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών, τα οποία συμπληρώνουν εκείνα που διατίθενται από την αλιεία. Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών στη διευρυμένη Ε.Ε. παράγει συνολικά 1,3 εκατομμύρια τόνους αλιευτικών προϊόντων κάθε χρόνο, αξίας περίπου 3 δισεκατομμυρίων ευρώ. Αυτό το ποσό αντιστοιχεί περίπου στο ένα τρίτο της συνολικής αξίας της αλιευτικής παραγωγής της Ε.Ε. και στο ένα πέμπτο του όγκου της. Σε ορισμένα κράτη μέλη η αξία των προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών είναι μεγαλύτερη από εκείνη των προϊόντων της αλιείας. Σε άλλα, οι υδατοκαλλιέργειες αντιπροσωπεύουν σημαντικό μέρος της συνολικής τους παραγωγής.

Με παραγωγή άνω των 7 εκατομμυρίων τόνων ψαριών από την αλιεία και την υδατοκαλλιέργεια το 2003, η Ε.Ε. αποτελεί τη δεύτερη μεγαλύτερη αλιευτική δύναμη στον κόσμο μετά την Κίνα ([http²](http://)).

1.2.1. Προκλήσεις

Παρά τη ραγδαία ανάπτυξή τους κατά τα πρόσφατα έτη, οι υδατοκαλλιέργειες αντιμετωπίζουν ορισμένα προβλήματα. Η παραγωγή τροφίμων αποτελεί μια

αυξανόμενα ανταγωνιστική αγορά. Η κατάσταση αυτή επηρεάζεται αρνητικά από τη διακύμανση της ζήτησης, πρόβλημα που αντιμετωπίζει και η γεωργία. Επιπλέον, η αγορά προϊόντων υδατοκαλλιεργειών έχει κορεσθεί για ορισμένα είδη, με αποτέλεσμα χαμηλότερες τιμές και συνεπώς μικρότερα κέρδη για τους παραγωγούς. Τα τεχνικά προβλήματα και ο κίνδυνος ασθενειών καθιστούν τις επιχειρήσεις περισσότερο "ευαίσθητες" ([http¹](#)).

1.2.2. Στρατηγική για περαιτέρω ανάπτυξη

Το 2002 η Ευρωπαϊκή Επιτροπή κοινοποίησε μια στρατηγική για την ανάπτυξη του τομέα των υδατοκαλλιεργειών. Η στρατηγική της Επιτροπής βασίζεται σε τρεις στόχους:

1. Στη δημιουργία ασφαλούς απασχόλησης, ιδίως στις περιοχές που εξαρτώνται από την αλιεία. Στόχος είναι η δημιουργία 8.000 έως 10.000 ισοδυνάμων πλήρους απασχόλησης στο διάστημα 2003-2008.
2. Στην παροχή ασφαλών και καλής ποιότητας αλιευτικών προϊόντων και στην προαγωγή του επιπέδου υγείας και διαβίωσης των ζώων.
3. Στο σεβασμό προς το περιβάλλον. Προτάσεις για την επίτευξη αυτού του σκοπού είναι η μείωση του αντίκτυπου των αποβλήτων, η αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλούν τα ξένα είδη που εισέρχονται σε ένα οικοσύστημα και οι γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί, η πρόληψη της ρύπανσης και η διεξαγωγή μελετών περιβαλλοντικών επιπτώσεων ([http¹](#)).

Οι θέσεις απασχόλησης που δημιουργούνται από την αλιεία είναι ποικίλες. Στο συγκεκριμένο κλάδο απασχολούνται με πλήρη ή μερική απασχόληση περίπου 190.000 ψαράδες. Παρότι όμως ο αριθμός των παραδοσιακών ψαράδων της Ε.Ε. μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, δημιουργούνται περισσότερες θέσεις εργασίας στον τομέα της παραγωγής (μεταποίηση, συσκευασία, μεταφορά, εμπορεία) αλλά και στον τομέα της παροχής υπηρεσιών (ναυπηγεία, κατασκευή αλιευτικών εργαλείων, ανεφοδιασμός και συντήρηση).



Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι τόνοι ζώντος βάρους των αλιευμάτων που παράχθηκαν από την αλιεία μέχρι το 2006.

Πίνακας 1. Η παραγωγή της αλιείας σε τόνους ζώντος βάρους των αλιευμάτων που παράχθηκαν μέχρι το 2006 (Πηγή :Eurostat).

ΕΕ/Χώρες	1990	1995	2000	2005	2006*
ΕΥ-27 ¹	*	8.054.070	6.794.180	5.632.045	*
ΕΥ-25 ²	*	8.034.291	6.779.810	5.620.543	*
ΕΥ-15 ³	6.250.260	7.237.012	6.150.037	5.056.326	*
Βέλγιο	41.470	35.631	29.807	24.569	22.519
Βουλγαρία	49.254	8.012	6.998	5.433	7.545
Δημ. Τσεχίας	*	3.929	4.654	4.242	4.646
Δανία	1.475.716	1.998.908	1.534.074	910.650	867.844
Γερμανία	326.316	238.829	205.249	285.667	279.040
Εσθονία	131.178	132.030	113.159	99.581	86.902
Ιρλανδία	215.485	389.646	276.237	262.482	210.670
Ελλάδα	132.381	151.717	99.344	92.026	96.707
Ισπανία	1.126.318	1.178.941	1.069.868	768.267	710.897
Γαλλία	689.662	675.134	703.439	595.275	582.846
Ιταλία	371.873	396.797	302.155	298.459	312.047
Κύπρος	2.584	9.320	67.482	1.880	2.098
Λετονία	162.827	149.194	136.403	150.618	140.389
Λιθουανία	137.598	57.368	78.989	139.785	153.111

Λουξεμβούργο	0	0	0	0	0
Ουγγαρία	16.234	7.314	7.101	7.609	*
Μάλτα	787	4.635	1.074	1.336	1.348
Κάτω Χώρες	404.816	438.110	495.774	549.208	433.235
Αυστρία	533	404	439	370	*
Πολωνία	448.292	429.372	217.686	156.246	*
Πορτογαλία	324.776	263.871	191.118	211.767	229.094
Ρουμανία	92.784	49.275	7.372	6.068	6.664
Σλοβενία	*	2.167	1.856	1.227	1.133
Σλοβακία	*	1.950	1.368	1.693	1.718
Φιλανδία	123.024	154.529	156.422	131.737	146.045
Σουηδία	250.985	404.591	338.540	256.356	269.255
Ηνωμένο Βασίλειο	766.904	909.904	747.570	669.493	615.780
Ισλανδία	1.521.877	1.624.100	1.999.980	1.661.139	1.344.516
Νορβηγία	1.603.073	2.524.355	2.699.535	2.392.528	2.245.222
ΕΕΑ⁴	*	12.202.526	11.493.695	9.685.711	*
Κροατία	*	16.268	21.068	34.683	*
Πρώην Γιουγκ. Δημ. Μακεδονίας	*	208	208	246	*
Τουρκία	379.093	633.971	503.355	426.496	*
Παγκόσμια	85.469.034	93.352.040	96.684.034	93.813.943	*

¹ EU-27: Η Ευρωπαϊκή ένωση των 27 χωρών

² EU-25: Η Ευρωπαϊκή ένωση των 25 χωρών

³ EU-15: Η Ευρωπαϊκή ένωση των 15 χωρών

⁴ ΕΕΑ: European Economic Area

♦ Προσωρινά στοιχεία

* Κατά τα έτη αυτά δεν συμπεριλαμβάνονται για ορισμένες χώρες τα αλιεύματα εσωτερικών υδάτων.

1.2.3. Αειφόρος αλιεία

Ο ευρωπαϊκός αλιευτικός κλάδος αντιμετωπίζει τα ίδια προβλήματα που συναντά σήμερα ο κλάδος αυτός σε ολόκληρο σχεδόν τον κόσμο. Η υπεραλίευση, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των αποθεμάτων, των προϊόντων αλίευσης και των εισοδημάτων, αποτελεί τη μεγαλύτερη απειλή για το μέλλον των ιχθυαποθεμάτων και του ίδιου του αλιευτικού κλάδου ([http¹](#)).

1.2.4. Υδατοκαλλιέργειες

Το 2005 η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών στην Ε.Ε. ανήλθε σε περίπου 1,3 εκατομμύρια τόνους ψαριών και οστρακοειδών ([http²](#)). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η παραγωγή σε τόνους ζώντος βάρους όλων των προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών, των χωρών της Ε.Ε. μέχρι το 2006.

Πίνακας 2. Η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών σε τόνους ζώντος βάρους όλων των προϊόντων των υδατοκαλλιεργειών μέχρι το 2006 (Πηγή :Eurostat).

Ε.Ε./Χώρες	1990	1995	2000	2005	2006
EU-27 ¹	*	1.183.643	1.401.751	1.272.455	*
EU-25 ²	*	1.159.198	1.388.370	1.262.026	*
EU-15 ³	944.224	1.099.732	1.311.976	1.182.633	*
Βέλγιο	675	846	1.871	1.200	*
Βουλγαρία	7.849	4.615	3.654	3.145	3.257

Δημ. Τσεχίας	*	18.679	19.475	20.455	20.431
Δανία	41.946	44.730	43.609	39.012	27.906
Γερμανία	64.435	64.096	65.891	44.685	37.681
Εσθονία	936	315	225	555	703
Ιρλανδία	26.673	27.366	51.247	60.050	53.122
Ελλάδα	9.523	32.644	95.418	106.208	113.174
Ισπανία	203.766	223.965	312.171	221.927	294.891
Γαλλία	256.653	280.786	266.802	258.480	*
Ιταλία	153.744	214.725	216.525	180.943	*
Κύπρος	125	452	1.878	2.333	3.607
Λετονία	2.235	525	325	542	566
Λιθουανία	4.666	1.714	1.996	2.013	2.225
Λουξεμβούργο	-----	-----	-----	-----	-----
Ουγγαρία	17.600	9.360	12.886	13.661	14.686
Μάλτα	3	904	1.746	736	7.165
Κάτω Χώρες	100.997	83.938	75.339	68.175	40.750
Αυστρία	3.126	2.918	2.847	2.420	2.506
Πολωνία	26.400	25.111	35.795	36.607	35.867
Πορτογαλία	4.968	4.981	7.537	6.485	6.781
Ρουμανία	34.950	19.830	9.727	7.284	9.108
Σλοβενία	*	789	1.181	1.536	1.367
Σλοβακία	*	1.617	887	955	1.263

Φιλανδία	18.550	17.345	15.400	14.355	12.891
Σουηδία	9.124	7.554	4.834	5.880	7.549
Ηνωμένο Βασίλειο	50.044	93.838	152.485	172.813	171.849
Ισλανδία	2.829	3.485	3.623	8.256	*
Νορβηγία	150.583	277.615	491.329	656.636	708.803
ΕΕΑ⁴	*	1.464.743	1.896.703	1.937.347	*
Κροατία	*	4.007	6.674	13.782	*
Πρώην Γιουγκ. Δημ. Μακεδονίας	*	1.297	1.626	868	*
Τουρκία	5.782	21.607	79.031	119.177	*
Παγκόσμια	16.827.507	31.195.904	45.660.666	62.959.046	*

¹ EU-27: Η Ευρωπαϊκή ένωση των 27 χωρών

² EU-25: Η Ευρωπαϊκή ένωση των 25 χωρών

³ EU-15: Η Ευρωπαϊκή ένωση των 15 χωρών

⁴ ΕΕΑ: European Economic Area

* Κατά τα έτη αυτά δεν συμπεριλαμβάνονται τα αλιεύματα εσωτερικών υδάτων.

1.2.5. Συνολική παραγωγή

Συμπερασματικά λοιπόν, η συνολική παραγωγή της παγκόσμιας αλιείας εξακολουθεί να αυξάνεται σταθερά, ενώ η διευρυμένη Ευρωπαϊκή Ένωση παράγει περίπου το 5% του συνόλου αυτού, γεγονός που την καθιστά τη δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγό στον κόσμο, μετά την Κίνα. Παρόλο που η παραγωγή της ΕΕ-15 αυξήθηκε κατά 10% με την ένταξη των 10 νέων κρατών μελών, η συνολική παραγωγή της Ευρωπαϊκής Ένωσης παρουσίασε ελαφρά μείωση σε σχέση με τα προηγούμενα έτη (<http>³). Στο εσωτερικό της Ε.Ε. οι μεγαλύτεροι παραγωγοί, ως

προς τον όγκο, παραμένουν η Δανία και η Ισπανία. Έτσι, η συνολική παραγωγή στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2003 (EU-25) ανήλθε στους 7.293.101 τόνους, ενώ η παγκόσμια παραγωγή στους 144.873.030 τόνους.

Οι υδατοκαλλιέργειες διαδραματίζουν σημαντικό κοινωνικο-οικονομικό ρόλο σε αρκετές ευρωπαϊκές περιφέρειες και οι προοπτικές του κλάδου εξακολουθούν να είναι εξαιρετικά ευσίωνες. Η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών είναι της τάξης των 1,4 εκατομμυρίων τόνων, ενώ η αξία της προσεγγίζει τα 2,8 δισεκατομμύρια ευρώ, αντιπροσωπεύοντας το 2,5% περίπου της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών ως προς τον όγκο και το 4,6% ως προς την αξία. Η Ε.Ε. έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή στον κόσμο σε ορισμένα είδη, όπως η πέστροφα, το λαβράκι, η τσιπούρα, το χέλι, το καρκάνι και τα μύδια. Οι υδατοκαλλιέργειες αντιπροσωπεύουν το 19% περίπου του συνολικού όγκου της αλιευτικής παραγωγής της Ε.Ε. και το 30% της αξίας της (<http>³).

1.3. Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Παρό,τι η καλλιέργεια υδάτινων οργανισμών είναι γνωστή στην Ελλάδα από τα χρόνια της αρχαιότητας, τα κυρίως καλλιεργούμενα ψάρια σήμερα, δηλαδή το λαβράκι και η τσιπούρα, καλλιεργούνται μόλις από το 1980. Η αυξανόμενη ζήτηση στην αγορά για τα είδη αυτά, αλλά και οι ευνοϊκές συνθήκες που υπάρχουν στη χώρα, όσον αφορά στο κλίμα και στην εκτεταμένη ακτογραμμή, έκαναν την Ελλάδα χώρα επιλογής για την ανάπτυξη της βιομηχανίας αυτής και έτσι είναι σήμερα η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα των ειδών αυτών στον κόσμο.

Η μεγάλη σημασία της αλιείας για την Ελλάδα καθορίζεται όχι τόσο από τη συμμετοχή της στο Ακαθάριστο Γεωργικό Προϊόν (~ 2%), αλλά κυρίως από τα 17.000 χιλιόμετρα των ελληνικών ακτών. Είναι ένας κλάδος με βαθιά παράδοση, αλλά και μεγάλη δυναμική. Συνδέεται με τις γενικότερες οικονομικές, πολιτικές και ανθρωπογεωγραφικές ανάγκες της χώρας, καθώς και με την αυξανόμενη τα τελευταία χρόνια ανάγκη για ποιοτική διατροφή. Η ισορροπία ανάμεσα στις ανάγκες

αυτές και τους περιορισμούς που αφορούν στους αλιευτικούς πόρους αποτελεί το αντικείμενο της αλιευτικής πολιτικής, ελληνικής και ευρωπαϊκής. Με τόσα προβλήματα όσα και δυνατότητες, η ελληνική αλιεία στηρίζει το μέλλον της πρώτα στους ανθρώπους της και στη συνέχεια στην πολιτική αυτή (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων⁴).

Η αλιεία ως κλάδος οικονομικής δραστηριότητας εντάσσεται στον πρωτογενή τομέα και περιλαμβάνει τις παρακάτω τρεις επιμέρους δραστηριότητες:

- τη θαλάσσια συλλεκτική αλιεία, κύρια δραστηριότητα του τομέα τόσο από άποψη παραγωγής όσο και απασχόλησης,
- τις υδατοκαλλιέργειες και την αλιεία εσωτερικών υδάτων και
- τη μεταποίηση και εμπορία αλιευτικών προϊόντων.

Σήμερα οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα περιλαμβάνουν κυρίως την παραγωγή του ευρωπαϊκού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*, european seabass, Linnaeus, 1758) και της τσιπούρας (*Sparus aurata*, gilthead seabream, Linnaeus, 1758). Η παραγωγή συμπληρώνεται από είδη του γλυκού νερού, όπως η πέστροφα (*Onchorynchus mykiss* Walbaum, 1792), το χέλι (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758) και ο κυτρίνος (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) (Federation of European Aquaculture Producers, FEAP). Επίσης υπάρχει και σημαντική παραγωγή οστράκων, κυρίως μυδιών. Πριν από είκοσι χρόνια η καλλιέργεια λαβρακιού και τσιπούρας ήταν πρακτικά ανύπαρκτη, όμως από το 1981 και μετά οι καλές κλιματικές συνθήκες, η πληθώρα παράκτιων προστατευμένων περιοχών, οι ευρωπαϊκές και οι εθνικές επενδύσεις και οι καινοτομίες στα εκκολαπτήρια και στην τεχνολογία των τροφών οδήγησαν σε εικοσαπλάσια αύξηση του τομέα μέσα σε 10 χρόνια, από το 1990 μέχρι το 2000. Η παραγωγή έφθασε συνολικά τους 103.000 τόνους μέχρι το 2002 (Stirling Report, 2004) που ισοδυναμεί στο 57% της παγκόσμιας παραγωγής αυτών των ειδών. Το 2000 υπήρχαν 269 μονάδες στην Ελλάδα, οι οποίες παρείχαν εργασία σε περίπου 10.000 εργαζόμενους άμεσα ή έμμεσα σε άλλες σχετιζόμενες βιομηχανίες. Η ραγδαία αυτή αύξηση της παραγωγής προκάλεσε μείωση στις τιμές του λαβρακιού

και της τσιπούρας, οι οποίες από 15,57 ευρώ/κιλό το 1989, έφθασαν περίπου στα 4,50 ευρώ/κιλό το 2000 και σε λιγότερο από 4,00 ευρώ/κιλό το 2002-2003 (Stirling Report, 2004). Η μείωση στις τιμές οφείλεται εν μέρει στην αύξηση του παρεχόμενου προϊόντος, στο μεγάλο αριθμό μονάδων και την κακή μεταξύ τους συνεργασία αλλά και στην ανεπάρκεια νομοθεσίας και πολιτικής τιμολόγησης. Αποτέλεσμα της αυξημένης πίεσης στον τομέα είναι η μείωση του αριθμού των μονάδων, που από 269 έφτασαν τις 167 το 2002 ([http²](#)).

Προσπάθειες για διεύρυνση του προϊόντος έχουν αποφέρει φτωχά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η παραγωγή φαγκριού (*Pagrus major* Temminck & Schlegel 1843), χιόνας (*Diplodus puntazzo* Cetti 1777), συναγρίδας (*Dentex dentex* Linnaeus 1758), σαργού (*Diplodus sargus* Cetti 1777), common pandora (*Pangelus erythrinus* Linnaeus, 1758) και γλώσσας (*Solea solea* Linnaeus, 1758) είναι μικρότερη από το 5% της ελληνικής παραγωγής (FEAP, 2002).

Περίπου το 80% του προϊόντος των ελληνικών υδατοκαλλιεργειών εξάγεται κυρίως στην Ιταλία και την Ισπανία. Οι εξαγωγές των καλλιεργούμενων λαβρακιών και τσιπούρας είναι ο τρίτος σημαντικότερος γεωργικός εξαγωγικός τομέας μετά το ελαιόλαδο και τον καπνό και αντιμετωπίζεται ως στρατηγικό προϊόν από την ελληνική κυβέρνηση. Το κόστος παραγωγής στην Ελλάδα είναι ανάμεσα στα χαμηλότερα της Ευρώπης.

1.3.1. Καλλιεργούμενα είδη ψαριών στην Ελλάδα

Τα κύρια είδη ψαριών που καλλιεργούνται σήμερα στη χώρα μας φαίνονται παρακάτω. Η κατάταξη είναι σύμφωνη με την παραγόμενη σε τόνους ποσότητα από κάθε είδος.

- Τσιπούρα
- Λαβράκι
- Πέστροφα

- Χέλι
- Χιόνα
- Λυθρίνι
- Σαργός
- Τόνος (*Thynnus thynnus thynnus* Linnaeus, 1758)
- Γλώσσα
- Κέφαλος (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758)
- Συναγρίδα

Τα δύο πρώτα είδη κατέχουν το 95% της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα, ενώ τα υπόλοιπα παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Η μικρή παραγωγή του κέφαλου σε λιμνοθάλασσες, κυρίως στη δυτική Ελλάδα, στοχεύει κυρίως στην παραγωγή του αυγοτάραχου. Επίσης, υπάρχει σημαντική παραγωγή δίθυρων οστρακοειδών, κυρίως μυδιών και στρειδιών, η οποία το 1999 ανήλθε στους 21.000 τόνους (Υπουργείο Γεωργικής Ανάπτυξης και Τροφίμων). Από οικονομικής πλευράς, η αξία των οστρακοειδών ήταν μικρότερη του 3% της συνολικής παραγωγής των υδατοκαλλιεργειών του συγκεκριμένου έτους.

Η μεγαλύτερη παραγωγή λαβρακιού και τσιπούρας στην Ελλάδα πραγματοποιείται σε θαλάσσιους κλωβούς και σε μεγάλες, τετράγωνες ή στρογγυλές, επιπλέουσες δομές από τις οποίες κρέμονται δίχτυα δημιουργώντας μια κοιλότητα. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει τάση για μεγάλους κυκλικούς κλωβούς με διάμετρο περίπου 120 μέτρα, που περιέχουν 250-300 τόνους ψαριών. Η αυξητική περίοδος των ψαριών διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία του νερού, ενώ για να φθάσει το ψάρι σε εμπορεύσιμο μέγεθος χρειάζονται 12-24 μήνες. Άλλα παραγωγικά συστήματα περιλαμβάνουν τα παραδοσιακά raceways, που χρησιμοποιούνται στην πεστροφοκαλλιέργεια κι εφαρμόζουν εκτροπή υδάτων από μικρούς ποταμούς στη βόρεια και κεντρική Ελλάδα, καθώς και δεξαμενές ανακύκλωσης, που χρησιμοποιούνται για την

καλλιέργεια χελιών και τιλάπιας. Σε μερικές περιοχές της Ελλάδας ορισμένες μονάδες εκτροφής χρησιμοποιούν ακόμα το εκτατικό σύστημα παραγωγής σε λιμνοθάλασσες, όπου άγριος γόνος συλλέγεται και αναπτύσσεται σε ετήσιους κύκλους. Το εκτατικό σύστημα παραγωγής χρησιμοποιείται κυρίως για καλλιέργεια κέφαλου, παρόλο που συλλέγονται και καλλιεργούνται μαζί και άλλα είδη.

Το 2000 υπήρχαν 269 επιχειρήσεις υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα κατανεμημένες σε ολόκληρη την επικράτεια. Ο αριθμός αυτός έχει μειωθεί σήμερα είτε λόγω παύσης της λειτουργίας ορισμένων, είτε λόγω συγχωνεύσεων και εξαγοράς τους από μεγάλες εταιρείες. Οι μονάδες ήταν περίπου 167 το 2003 και η γεωγραφική τους κατανομή φαίνεται στη συνέχεια (Stirling Report, 2004):

- Οι μονάδες θαλασσοκαλλιέργειας χωροταξικά εντοπίζονται κυρίως στον Ευβοϊκό, στις θαλάσσιες περιοχές των Νομών Αργολίδας, Αιτωλ/νίας και Δωδεκανήσου, στη θαλάσσια περιοχή της Ηπείρου, καθώς και σε άλλες νησιώτικες περιοχές του Αιγαίου.
- Η παραγωγή ψαριών γλυκών υδάτων παρουσιάζει μικρή αύξηση τα τελευταία χρόνια. Η πεστροφοκαλλιέργεια (105 μονάδες με παραγωγή 2.800 τόνους το 1997), που είναι και το βασικότερο είδος εκτροφής ψαριών γλυκών υδάτων, παρουσιάζει ανοδική πορεία και η παραγωγή από 2.300 τόνους το 1993, σταθεροποιήθηκε στους 2.800 τόνους το 1999. Οι μονάδες είναι κυρίως οικογενειακού χαρακτήρα με μικρές αποδόσεις και στην πλειοψηφία τους βρίσκονται στην Δυτική Ελλάδα (όπου υπάρχουν και μεγαλύτερες βροχοπτώσεις) και ιδιαίτερα στην Ήπειρο και τη Δυτική Μακεδονία σε ορεινές περιοχές (Αθανασοπούλου, 2005).
- Οι μονάδες χελοκαλλιέργειας, μετά την επίλυση σειράς τεχνικών προβλημάτων, και λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς στην εξασφάλιση της πρώτης ύλης (γόνος), παρουσιάζουν τάσεις αύξησης της παραγωγής τους, η οποία εντούτοις παραμένει χαμηλή. Συγκεκριμένα, η παραγωγή από 145 τόνους το 1993, αυξήθηκε στους 350 τόνους (Αθανασοπούλου, 2005).

- Η καλλιέργεια κυπρίνων, κέφαλων, οξύρυγχου και λοιπών ειδών ψαριών του γλυκού νερού έχει μικρές δυνατότητες ανάπτυξης.
- Η εκμετάλλευση των ιχθυοτροφείων εσωτερικών υδάτων, με εκτατική ή ημιεντατική μορφή, γίνεται ως επί το πλείστον από συλλογικούς φορείς και απαιτεί συνεχή παρακολούθηση και τεχνική υποστήριξη (συνεχής βελτίωση των συνθηκών διαχείρισης με εγγειοβελτιωτικά-υδραυλικά έργα). 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. Σήμερα στη χώρα λειτουργούν 72 εκμεταλλεύσεις λιμνοθαλασσών, έκτασης 450.000 στρεμμάτων με συνολική παραγωγή 1.300 τόνων, και 20 εκμεταλλεύσεις λιμνών-ποταμών, παραγωγής 1.280 τόνων (Αθανασοπούλου, 2005).

1.3.2. Πρακτικές/συστήματα καλλιέργειας

Παρόλο που υπάρχουν κάποιες μορφές εκτατικής ή ημιεντατικής εκτροφής σε λίμνες στην Ελλάδα, η μεγάλη πλειοψηφία της παραγωγής προέρχεται από μονάδες που χρησιμοποιούν κλωβούς. Στις τελευταίες, τα ψάρια εκτρέφονται σε μέτριες πυκνότητες των 10-15 kg ανά κυβικό μέτρο και τρέφονται καθημερινά, σύμφωνα με προκαθορισμένο πρόγραμμα διατροφής. Το 2000 οι περισσότερες επιχειρήσεις (104 επιχειρήσεις) παρήγαν λιγότερους από 500 τόνους, 35 παρήγαν από 500 έως 1000 τόνους, 27 πάνω από 1000 τόνους και μόνο 4 επιχειρήσεις ξεπέρασαν τους 5000 τόνους. Από αυτές το 99% χρησιμοποιούσε κλωβούς για ανάπτυξη και λιγότερες από το 1% χρησιμοποιούσε λιμνοθάλασσες (FAO, 2006).

1.3.3. Παραγωγή υδατοκαλλιεργειών

Η παραγωγή των υδατοκαλλιεργειών δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί κυρίως λόγω της αναξιοπιστίας των επίσημων στατιστικών και της απροθυμίας των παραγωγών να δηλώσουν την ακριβή παραγωγή. Η αξία των προϊόντων της

βιομηχανίας υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα ανερχόταν περίπου στα 307 εκατομμύρια ευρώ το 2002 (FAO Fishery statistics), αν και για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω η αξία αυτή υπολογίζεται ότι είναι μόλις το 60% της πραγματικής.

Στην Ελλάδα το 2004 τα πρώτα σε παραγωγή 5 είδη υδατοκαλλιεργειών ήταν (FAO Fishery statistics):

- τσιπούρα (37.394 τόνοι)
- μύδι μεσογείου (28.781 τόνοι)
- λαβράκι (25.691 τόνοι)
- πέστροφα ιριδίζουσα (2.060 τόνοι)
- χέλι (557 τόνοι)

1.3.4. Αγορά και εμπόριο

Τα προϊόντα των ελληνικών υδατοκαλλιεργειών προορίζονται κυρίως για εξαγωγή. Εκτιμάται ότι το 2002 η Ιταλία και η Ισπανία απορρόφησαν τους 47.000 από τους 70.000 τόνους λαβρακιού και τσιπούρας που εξήχθηκαν από τη χώρα μας (Stirling Report, 2004).

Οι εναπομένουσες ποσότητες διοχετεύτηκαν στους Έλληνες καταναλωτές, κυρίως μέσω αλυσίδων σούπερ μάρκετ και ιχθυοπωλείων. Να σημειώσουμε εδώ ότι ο εγχώριος γόνος των ψαριών αυτών δεν είναι επαρκής, με αποτέλεσμα η Ελλάδα να εισάγει μεγάλες ποσότητες γόνου. Έτσι, περίπου 20 εκατομμύρια γόνου εισήχθησαν το 2002 από την Ιταλία και τη Γαλλία.

Η κατά κεφαλήν κατανάλωση ψαριών στην Ελλάδα είναι 25 kg το χρόνο και από αυτά τα 2,1 kg αντιστοιχούν σε τσιπούρες και λαβράκια. Αυτό σημαίνει ότι οι υδατοκαλλιέργειες συμβάλλουν μόνο στο 10% της κατανάλωσης ψαριών από τους Έλληνες (FAO, 2006).

1.3.5. Συνεισφορά στην οικονομία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πάνω από το 80% της ελληνικής παραγωγής ιχθυοκαλλιεργειών εξάγεται κυρίως σε Ιταλία και Ισπανία. Οι μονάδες της χώρας μας συγκρινόμενες με εκείνες άλλων χωρών είναι μεγάλες, με παραγωγή που φθάνει κατά μέσο όρο, τους 300 τόνους η καθεμία το χρόνο.

Ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών συμβάλλει σημαντικά στην αποκέντρωση της οικονομίας αφού προσφέρει εργασία σε περίπου 10.000 άμεσα και έμμεσα εργαζόμενους σε άλλες σχετιζόμενες βιομηχανίες, συνήθως σε απομακρυσμένες αγροτικές περιοχές όπου υπάρχουν ελάχιστες άλλες εργασιακές ευκαιρίες (Stirling Report, 2004).

1.4. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Σε όλα τα συστήματα υδατοκαλλιεργειών η αύξηση της παραγωγής ψαριών παρεμποδίζεται από την παρουσία παθογόνων παραγόντων, όπως είναι τα βακτήρια, οι ιοί και τα παράσιτα. Οι περισσότεροι από τους παράγοντες αυτούς συνήθως βρίσκονται στο περιβάλλον εκτροφής των ψαριών και εκδηλώνουν την παθογόνο δράση τους λόγω των εντατικών συνθηκών εκτροφής.

Οι διάφορες παθολογικές καταστάσεις που παρατηρούνται στα ψάρια, εξαιτίας της προσβολής τους από παθογόνους μικροοργανισμούς, έχουν σημαντικό οικονομικό αντίκτυπο λόγω των υψηλών ποσοστών θνησιμότητας (βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις), των αρνητικών επιδράσεων στην ανάπτυξη (παρασιτώσεις) ή της μειωμένης εμπορευσιμότητας των ψαριών, εξαιτίας της κακής εξωτερικής τους εμφάνισης.

Τα συνεχώς αυξανόμενα παθολογικά προβλήματα που εμφανίστηκαν τα τελευταία χρόνια στις θαλασσοκαλλιέργειες της Μεσογείου επιδρούν αρνητικά στη διαχείριση της εκτροφής, λόγω του μεγάλου κόστους των θεραπειών και της μείωσης του κέρδους από τις απώλειες των ψαριών, αλλά και λόγω της χαμηλής ποιότητας

του τελικού προϊόντος. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ο κίνδυνος κάποιων παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών για τη δημόσια υγεία.

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 διχτύων, οι άτεχνοι χειρισμοί τους κλπ.
3. Η ευαισθησία του ατόμου που επηρεάζεται από στρεσσογόνους παράγοντες κι ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και το είδος του ψαριού.

Στην Ελλάδα, τα κυριότερα νοσήματα που παρουσιάζονται στα ευρύαλα είδη ψαριών είναι:

A) Νοσήματα που οφείλονται σε ιούς:

1. Λεμφοκύστη
2. Ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια

B) Νοσήματα που οφείλονται σε χλαμύδιες και ρικέτσιες:

1. Επιθηλιοκύστη
2. Νέκρωση Νευρικού Συστήματος (Nervous necrosis due to Rickettsia – like organisms)

Γ) Νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια:

1. Δονακίωση
2. Παστεριδίωση
3. Μυξοβακτηριδίωση

Δ) Νοσήματα που οφείλονται στα παράσιτα:

1. Πρωτοζωώσεις
2. Μονογενείς Τρηματώσεις
3. Καρκινοειδώσεις

Ε) Νοσήματα που οφείλονται σε διατροφικά σφάλματα:

1. Συστηματική Κοκκιωμάτωση
2. Χειμερινό Σύνδρομο

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή ασχολείται με τον ιό Noda που προκαλεί την ιογενή νευρική νέκρωση ή αλλιώς ιογενή εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια των ψαριών.

2. ΟΙ NODA-ΙΟΙ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ (ΙΟΙ ΤΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ)

2.1. Ταξινόμηση-Ονοματολογία

Οι Noda-ιοί που προσβάλλουν τα ψάρια (κλάση οστεοϊχθείς) ανήκουν στην οικογένεια *Nodaviridae* και στο γένος *Betanodavirus* (Carstens και συν., 2000). Στην ίδια οικογένεια περιλαμβάνεται και το γένος *Alphanodavirus*, στο οποίο ταξινομούνται οι Noda-ιοί που προσβάλλουν κυρίως έντομα (Schneemann και Marshall, 1998). Ο πρώτος ιός της οικογένειας αυτής (*Nodamura virus*, γένος *Alphanodavirus*) απομονώθηκε κοντά στο χωριό Nodamura (σημερινό Nodashi) της Ιαπωνίας και γι' αυτό η οικογένεια ονομάστηκε *Nodaviridae*.

Η περιγραφή της μορφολογίας του πρώτου Betanoda-ιού που απομονώθηκε από ψάρια και η ταυτοποίησή του ως αιτιολογικού παράγοντα της νόσου της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας έγινε από τους Yoshikoshi και Inoue (1990). Ο υπεύθυνος ιός στην αρχή θεωρήθηκε Picorna-ιός (Glazebrook και συν., 1990· Bloch και συν., 1991· Breuil και συν., 1991) και αργότερα ταξινομήθηκε ως μέλος της οικογένειας των *Nodaviridae* (Mori και συν., 1992· Comps και συν., 1994· Munday και συν., 1994· Nishizawa και συν., 1994).

Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), στο γένος *Betanodavirus* κατατάσσονται επισήμως 7 ιοί και επιπλέον υπάρχουν και εννέα προσωρινά μέλη (Nishizawa, 2002).

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα είδη των Noda-ιών που κατατάσσονται στο γένος *Betanodavirus*.

Πίνακας 3. Είδη Noda-ιών που κατατάσσονται στο γένος *Betanodavirus*.

Όνομα ιού	Κωδικός καταγραφής στο NCBI	Συντομογραφία ιού
<i>Barfin flounder nervous necrosis virus</i> ¹	[D38635] RNA2	(BFNNV)
<i>Barfin flounder nervous necrosis virus</i> ¹	[AB046377] RNA2	
<i>Redspotted grouper nervous necrosis virus</i> ¹	[D38636] RNA2	(RGNNV)
<i>Striped jack nervous necrosis virus</i> ¹	[AB025018] RNA1	(SJNNV)
<i>Striped jack nervous necrosis virus</i> ¹	[D30814] RNA2	
<i>Tiger puffer nervous necrosis virus</i> ¹	[D38637] RNA2	(TPNNV)
<i>Dicentrarchus labrax encephalitis virus</i> ²		(DIEV)
✖ DIEV, δεν έχει δοθεί ονομασία απομόνωσης	[U39876] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-1	[AJ277803] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-2	[AJ277804] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-3	[AJ277805] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-4	[AJ277806] RNA2	

✖ DIEV, απομόνωση DI-5	[AJ277807] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-6	[AJ277808] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-7	[AJ277809] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση DI-8	[AJ277810] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση GR/02	[AF175509] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση GR12	[AF175510] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση PT08	[AF175511] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση ML01	[AF175512] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση IT23	[AF175513] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση IT19	[AF175514] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση IT24	[AF175517] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση SP20	[AF175515] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση SG14	[AF175516] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση TH07	[AF175518] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση JP06	[AF175519] RNA2	
✖ DIEV, απομόνωση JP1	[AF175520] RNA2	
✖ DIEV, δεν έχει δοθεί ονομασία απομόνωσης	[Y08700] RNA2	
Japanese flounder nervous necrosis virus ²		(JFNNV)
✖ JFNNV, απομόνωση JF-HI93	[D38527] RNA2	
<i>Lates calcarifer</i> encephalitis virus ²		(LcEV)
Malabar grouper nervous		(MGNNV)

necrosis virus ²		
<i>Atlantic halibut nodavirus</i> ²		(AHNV)
✦ AHNV, απομόνωση AH95NorA	[AJ245641] RNA2	
Halibut nervous necrosis virus ²		(HNNV)
✦ HNNV, απομόνωση AH99NorA	[AJ401165] RNA1	
✦ HNNV, δεν έχει δοθεί ονομασία απομόνωσης	[AF160473] RNA2	
Dragon grouper nervous necrosis virus ²		(DGNNV)
✦ DGNNV, δεν έχει δοθεί ονομασία απομόνωσης	[AF245004] RNA2	
Grouper nervous necrosis virus ²		(GNNV)
Seabass nervous necrosis virus ²		(SBNNV)
<i>Umbrina cirrosa nodavirus</i> ²		(UCNV)
✦ UCNV, απομόνωση Uc-1	[AJ277811] RNA2	

NCBI: National Center for Biotechnology Information

1 Επίσημα μέλη των Betanoda-ίων

2 Προσωρινά μέλη των Betanoda-ίων

Απομονώσεις ειδών

Η ονοματολογία των ειδών του γένους *Betanodavirus* προέρχεται από το κοινό όνομα του είδους των ψαριών από τα οποία απομονώνονται, σε συνδυασμό με το συνθετικό NNV (Nervous Necrosis Virus) ή το NV (Nodavirus). Για παράδειγμα ο

ιός SBNNV (Sea Bass Nervous Necrosis Virus) ονομάστηκε έτσι γιατί απομονώθηκε από το λαβράκι (sea bass), ενώ ο ιός που απομονώθηκε από το atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) ονομάστηκε AHNV (Atlantic Halibut Nodayirus). Επίσης για την ονοματολογία χρησιμοποιείται μερικές φορές το επιστημονικό όνομα του ψαριού, σε συνδυασμό με το συνθετικό EV (Encephalitis Virus), όπως DIEV (Dicentrarchus labrax Encephalitis Virus, ιός της εγκεφαλίτιδας του λαβρακιού) ή LcDV (Lates calcarifer Encephalitis Virus, ιός της εγκεφαλίτιδας του ασιατικού λαβρακιού).

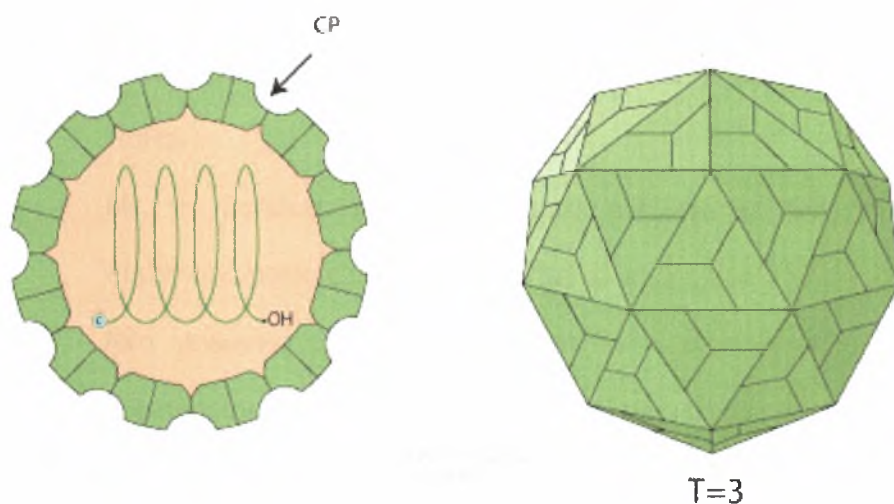
2.2. Μορφολογία, δομή και σύσταση των Betanoda-ιών

Το σωματίδιο των Betanoda-ιών είναι σφαιρικό, με διάμετρο 25-34 nm και αποτελείται από το καψίδιο και το γένωμα (Εικόνα 1). Ορισμένοι συγγραφείς αναφέρουν ότι, κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, διαπίστωσαν την ύπαρξη πυκνωτικού πυρήνα, διαμέτρου 13-21nm, που περιβάλλεται από μια διαυγή περιοχή διαμέτρου περίπου 5nm. Τα ιικά σωματίδια συνδέονται με τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου ή είναι ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα και ορατά ως παρακρυσταλλικές περιοχές (Glazebrook και συν., 1990· Breuil και συν., 1991· Bloch και συν., 1991· Boonyaratpalin και συν., 1996· Grotmol και συν., 1997).

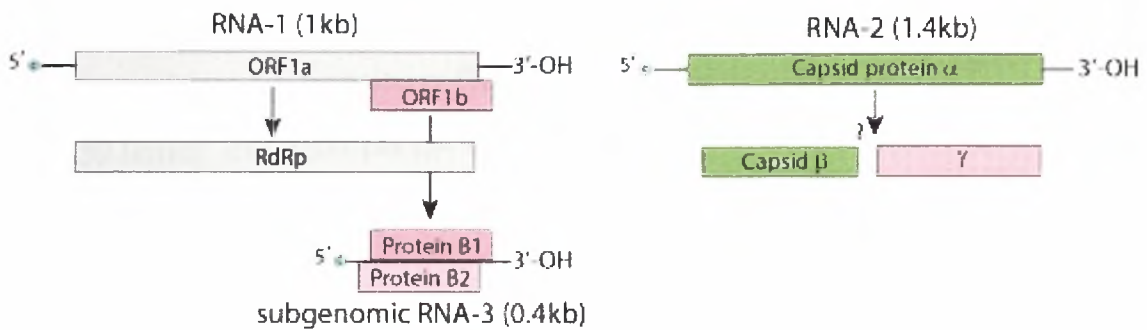
Το καψίδιο είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας, αποτελείται από 32 καψομερίδια και συγκροτείται από μία πρωτεΐνη, την CP (coat protein) ή α πρωτεΐνη (<http>⁶). Το γένωμα (Σχήμα 1) είναι θετικής πολικότητας, γραμμικό μονόκλωνο RNA, μήκους 4.500 ζευγών βάσεων (base pairs, bp). Το 5'-άκρο του φέρει καλύπτρα, ενώ στο 3'-άκρο δεν υπάρχει πολυ-A ουρά (Mori και συν., 1992· Nagai και Nishizawa 1999· Takizawa και συν., 2008· Chen και συν., 2009). Το γένωμα χωρίζεται σε δύο ανισομεγέθη γενωμικά τμήματα, το RNA1 (3.100 bp) και το RNA2 (1.400 bp). Το RNA1 κωδικοποιεί μία μη δομική πρωτεΐνη (ένζυμο), την RNA πολυμεράση, εξαρτημένη από RNA (RdRp, ~100 kDa), γνωστή και ως πρωτεΐνη A. Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την αντιτύπωση του ιικού γενώματος. Το RNA2 γενωμικό

τμήμα κωδικοποιεί την πρόδρομη καψιδική πρωτεΐνη CPp (42 kDa) (Toffolo και συν., 2007). Επιπλέον, στο RNA2 τμήμα διακρίνεται μία συντηρημένη και μία μεταβλητή περιοχή (T4 περιοχή). Η ειδικότητα του ξενιστή κάθε Betanoda-ιού καθορίζεται από τη μεταβλητή αυτή περιοχή (Ito και συν., 2008). Κατά τη διάρκεια της αντιτύπωσης του γενώματος των Betanoda-ιών στα κύτταρα του ξενιστή, διαπιστώθηκε ότι από το 3'-άκρο του RNA1 συντίθεται ένα υπογενωμικό RNA, το RNA3. Το RNA3 φέρει δύο υποθετικά ORFs (ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, Open Reading Frames), που κωδικοποιούν δύο μη δομικές πρωτεΐνες, τις B1 (111 aa) και B2 (75 aa).

Όπως διαπιστώθηκε από μελέτες που έγιναν σε ενοφθαλμισμένες κυτταροκαλλιέργειες, η δράση των πρωτεϊνών αυτών είναι καθοριστική για την εξάπλωση της μόλυνσης. Συγκεκριμένα η B1, που εκφράζεται κατά τα αρχικά στάδια του πολλαπλασιασμού των ιών στα κύτταρα κυτταροκαλλιεργειών, τα προστατεύει από νέκρωση, αυξάνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής τους, ενώ η B2 πρωτεΐνη δρα ως ανταγωνιστής του μηχανισμού παρεμβολής του κυτταρικού RNA στον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA (Iwamoto και συν., 2005* Chen και συν., 2009)



Εικόνα 1. Το σωματίδιο των Noda-ιών (πηγή: <http>⁶).



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση του γενώματος των Betanodavirus (πηγή: <http>⁶).

2.3. Πολλαπλασιασμός των ιών του γένους *Betanodavirus*

Οι Betanoda-ιοί πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Το ιικό RNA λειτουργεί ως γένωμα, αλλά και ως αγγελιαφόρο RNA (mRNA, βιβλιογραφία <http>⁵ και <http>⁶). Κατά τον πολλαπλασιασμό τους συμβαίνουν, με την παρακάτω σειρά, τα εξής:

1. Ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο του ξενιστή, με άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό.
2. Απεκδύεται πλήρως και απελευθερώνει το ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα.
3. Το γενωμικό τμήμα RNA-1 μεταγράφεται για να παραχθεί η πρωτεΐνη-ένζυμο RdRp.
4. Με τη βοήθεια του ιικού αυτού ενζύμου συντίθενται, στη συνέχεια, συμπληρωματικές μονόκλωνες RNA αλυσίδες αρνητικής πολικότητας.
5. Νέα γενωμικά θετικής πολικότητας RNA συντίθενται από τις παραπάνω συμπληρωματικές RNA αλυσίδες, καθώς και υπογενωμικό RNA3.
6. Από τη μεταγραφή του RNA2 παράγεται η πρόδρομη καψιδική πρωτεΐνη CPp, η οποία στη συνέχεια διασπάται για να παραχθεί η ώριμη CP πρωτεΐνη.
7. Ακολουθεί η συγκρότηση των δομικών συστατικών και η ωρίμανση των απόγονων ιικών σωματιδίων στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου.
8. Τέλος, τα απόγονα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο προκαλώντας την αποσύνθεσή του.

2.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Σε συνθήκες εργαστηρίου οι Betanoda-ιοί είναι ανθεκτικοί στη θέρμανση (56 °C επί 30 λεπτά), στο όξινο pH (2– 9) και επίσης όταν διατηρούνται στους 20 °C. Τέλος, διατηρούν τη μολυσματικότητα τους όταν απομονώνονται με τη βοήθεια χλωροφορμίου ([http⁶](#)).

Η πυκνότητα άνωσης σε χλωριούχο κέσιο (CsCl) των ιικών σωματιδίων του ιού SJNNV δεν έχει περιγραφεί, αλλά αυτή του DIEV είναι περίπου 1,31–1,36 g/cm³ ([http⁶](#)).

2.5. Φυλογενετική συγγένεια μεταξύ των ειδών της οικογένειας *Nodavirinae*

Οι Noda-ιοί των ψαριών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις γενότυπους, σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της μεταβλητής περιοχής (T4 περιοχή) του RNA2 γενωμικού τμήματος. Οι γενότυποι ονομάζονται SJNNV (Striped jack NNV), TPNNV (Tiger puffer NNV), RGNNV (Red grouper NNV) και BFNNV (Barfin flounder NNV) (Nishizawa και συν., 1997). Οι γενότυποι SJNNV και TPNNV ονομάστηκαν έτσι γιατί οι ιοί που κατατάσσονται σε αυτούς έχουν απομονωθεί από το κοκάλι (Striped jack, *Pseudocaranx dentex*, Bloch & Schneider) και το είδος Tiger puffer (*Takifugu rubripes*, Temmick & Schegel), αντίστοιχα. Ο γενότυπος RGNNV πήρε το όνομά του από το ψάρι Red spotted grouper (*Epinephelus akaara*, Temmick & Schegel) και τα στελέχη του έχουν απομονωθεί από μια πληθώρα θερμόφιλων ειδών ψαριών (Skliris και συν., 2001). Οι ιοί Noda των ψυχρόφιλων ειδών ψαριών κατανεμήθηκαν στο γενότυπο BFNNV, ο οποίος ονομάστηκε έτσι από το είδος Barfin flounder (*Verasper moseri*, Jordan & Gilbert). Πρόσφατα, προτάθηκε και ένας 5^{ος} γενότυπος, ο TNV (Turbot nodavirus) (Toffolo και συν., 2007).

Μεταξύ των προαναφερθέντων 4 γενοτύπων, η ομοιότητα στο RNA2 τμήμα τους κυμαίνεται από 76% έως 82%, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και από 81% έως 88%, σε επίπεδο αμινοξέων (Nishizawa και συν. 1995). Παρόμοια επίπεδα

ομοιότητας παρατηρούνται και στο RNA1 τμήμα (Nishizawa και συν. 1995, Nagai και συν. 1999). Αντίθετα, η ομοιότητα στα αντίστοιχα τμήματα μεταξύ των Alphanoda- και Betanoda-ιών είναι πολύ μικρή (29%, σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και 11% ή και μικρότερη, σε επίπεδο αμινοξέων) (Nishizawa και συν. 1995).

2.6. Ορολογική συγγένεια των γενοτύπων των Betanoda-ιών

Από μελέτες που έγιναν για να διερευνηθεί η ορολογική συγγένεια των Betanoda-ιών που ανήκουν στους προαναφερθέντες 4 γενοτύπους διαπιστώθηκε ότι διακρίνονται 3 κύριοι ορότυποι, οι A, B και C. Ο ορότυπος A αντιστοιχεί στον γενότυπο SJNNV, ο ορότυπος B περιλαμβάνει στελέχη που ανήκουν στον γενότυπο TPNNV και ο ορότυπος C περιλαμβάνει αμφότερους τους γενότυπους BFNNV και RGNNV. Η ορολογική συγγένεια μεταξύ των γενοτύπων BFNNV και RGNNV φαίνεται ότι οφείλεται στη μεγάλη ομοιότητα που παρατηρείται στις αλληλουχίες του RNA2 γενωμικού τμήματός τους (Mori και συν., 2003).

3. Η ΙΟΓΕΝΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ

(VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY, VER)

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (VER) είναι μία σημαντική νόσος των λαρβών, αλλά και ψαριών μεγαλύτερου μεγέθους. Παρατηρείται σε ολόκληρο σχεδόν τον κόσμο, εκτός της Αφρικής (Munday και συν., 2002). Αναφέρεται, επίσης, και ως Ιογενής Νευρική Νέκρωση (Viral Nervous necrosis, VNN) (Yoshikoshi και Inoue, 1990), Εγκεφαλομελίτιδα (Bloch και συν., 1991) και Κενοτοπιώδης Εγκεφαλοπάθεια και Αμφιβληστροειδοπάθεια (Vacuolating Encephalopathy and Retinopathy, VER) (Munday και συν., 1992* OIE, 2000). Χαρακτηριστικό της νόσου είναι η προσβολή του ΚΝΣ και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού. Μέχρι σήμερα η νόσος έχει αναφερθεί σε περισσότερα από 30 είδη ψαριών.

3.1. Ιστορική αναδρομή της εμφάνισης της νόσου

Η πρώτη συνοπτική περιγραφή των αλλοιώσεων της νόσου, πριν ακόμα καθοριστεί ο αιτιολογικός παράγοντας, δόθηκε το 1987 από τους Glazebrook και Campbell. Το επόμενο έτος (1988) παρουσιάστηκε μια πιο λεπτομερής περιγραφή από τον Callinan και την ίδια χρονιά οι Bellance και Galet de Saint Aurin (1988) ανέφεραν ίδια παθολογική κατάσταση σε ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus) στην Καραϊβική.

Το 1988, επίσης, αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στη Μαρτινίκα μαζικές θνησιμότητες σε λαβράκι της Μεσογείου, σχετιζόμενες με εγκεφαλίτιδα και παρουσία ιικών σωματιδίων στα νευρικά κύτταρα (Bellance και Gallet de Saint-Aurin) και στη συνέχεια, το 1991 επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ιού Noda στη Γαλλία από τους Breuil και συνεργάτες (1991). Τα επόμενα 5 χρόνια αναφέρθηκαν αντίστοιχες περιπτώσεις παρόμοιας νόσου, ιογενούς αιτιολογίας, σε εκκολαπτόμενες προνύμφες και νεαρά διαφορετικών ειδών θαλάσσιων ψαριών. Συγκεκριμένα, το νόσημα παρατηρήθηκε σε ασιατικό λαβράκι (*Lates calcarifer*, Bloch) (Glazebrook και συν., 1990; Renault και συν., 1991), σε ιαπωνικό ψάρι παπαγάλο (Yoshikoshi και Inoue, 1990), σε turbot (*Scophthalmus maximus* L..) (Bloch και συν., 1991), σε redspotted grouper (Mori και συν., 1991), σε κοκάλι (Mori και συν., 1992), σε japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temmick & Schegel) (Nguyen και συν., 1994), σε halibut (Grotmol και συν., 1995) και σε στήρα μαλαμπάρ (*Epinephelus malabaricus*, Bloch & Schneider) (Boonyaratpalin και συν., 1996). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις το κυρίαρχο εύρημα, κατά την ιστολογική εξέταση των μολυσμένων ψαριών, ήταν η παρουσία κενοτοπίων στα νευρικά κύτταρα, τον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα είδη θαλάσσιων ψαριών που προσβάλλονται από την ιογενή εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια, καθώς και η γεωγραφική κατανομή των κλινικών περιστατικών της νόσου.

Πίνακας 4. Είδη ψαριών στα οποία παρατηρήθηκε η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια και γεωγραφική κατανομή των κλινικών περιστατικών της νόσου.

Είδος ψαριού	Χώρα/Περιοχή	Βιβλιογραφία
<p>Τάξη Anguilliformes</p> <p>Οικογένεια Anguillidae</p> <p>Ευρωπαϊκό χέλι, <i>Anguilla anguilla</i> (L.)</p>	Ταϊβάν ¹	[1] Chi και συν., 2001
<p>Τάξη Gadiformes</p> <p>Οικογένεια Gadidae</p> <p>Μπακαλιάρος, <i>Gadus morhua</i> (L.)</p>	Ηνωμένο Βασίλειο ² , Καναδάς ³	[2] Starkey και συν., 2001 [3] Johnson και συν., 2001
<p>Τάξη Perciformes</p> <p>Οικογένεια Centropomatidae</p> <p>Barramundi/Ασιατικό λαβράκι, <i>Lates calcarifer</i></p>	Ταϊβάν ¹ , Αυστραλία ⁴ , Κίνα ⁵ , Ινδονησία ⁵ , Ισραήλ ⁵ , Μαλαισία ⁶ , Φιλιπίνες ⁶ , Σιγκαπούρη ⁷ , Ταϊτή ⁸ , Ταϊλάνδη ⁹	[1] Chi και συν., 2001 [4] Glazebrook και Campbell, 1987 [5] Munday και συν., 2002 [6] Awang, 1987 [7] Chang και συν., 1997 [8] Renault και συν., 1991 [9] Glazebrook και συν., 1990
Ιαπωνικό λαβράκι, <i>Lateolabrax japonicus</i> (Cuvier)	Ιαπωνία ¹⁰	[10] Jung και συν., 1996
<p>Οικογένεια Percichthyidae</p> <p>Ευρωπαϊκό λαβράκι, <i>Dicentrarchus labrax</i></p>	Καριβική ¹¹ , Γαλλία ¹² , Ελλάδα ¹³ , Ιταλία ¹⁴ , Μάλτα ¹⁵ , Πορτογαλία ¹⁵ , Ισπανία ¹⁵	[11] Bellance και Gallet de Saint-Aurin, 1988 [12] Breuil και συν., 1991 [13] Le Breton και συν., 1997 [14] Bono και συν., 1999 [15] Skliris και συν., 2001
<p>Οικογένεια Serranidae</p> <p>Red spotted grouper, <i>Epinephelus akaara</i></p>	Ιαπωνία ¹⁶ , Ταϊβάν ¹⁷	[16] Mori και συν., 1991 [17] Chi και συν., 1997
Yellow grouper <i>E. awoara</i> , (Temminck & Schlegel)	Ταϊβάν ¹⁸	[18] Lai και συν., 2001
Orange-spotted grouper <i>E. coioides</i> (Hamilton)	Κίνα ¹⁹ , Φιλιπίνες ²⁰	[19] Lin και συν., 2001 [20] Maeno, 2002

Blackspotted grouper <i>E. fuscogutatus</i> (Temminck & Schlegel)	Ταϊβάν ¹⁸	[18] Lai και συν., 2001
Dragon grouper <i>E. lanceolatus</i> (Bloch)	Κίνα ¹⁹	[19] Lin και συν., 2001
Στήρα μαλαμπάρ, <i>E. malabaricus</i>	Ταϊλάνδη ²¹	[21] Danayadol και συν., 1995
Dusky grouper <i>E. marginatus</i> (Lowe)	Μεσόγειος ⁵	[5] Munday και συν., 2002
Kelp grouper <i>E. moara</i> (Bleeker)	Ιαπωνία ²²	[22] Nakai και συν., 1994
Sevenband grouper <i>E. septemfasciatus</i> (Thunberg)	Ιαπωνία ²³ , Κορέα ²⁴	[23] Fukuda και συν., 1996 [24] Sohn και Park, 1998
Greasy grouper <i>E. tauvina</i> (Forsskal)	Μαλαισία ²⁵ , Φιλιπίνες ²⁵ , Singapore ²⁶	[25] Bondad-Reantaso και συν., 2000 [26] Chua και συν., 1995
Humpback grouper <i>Chromileptes altivelis</i> (Valenciennes)	Ινδονησία ²⁷	[27] Zafran και συν., 2000
<u>Οικογένεια Latridae</u> Striped trumpeter <i>Latris lineata</i> (Forster)	Αυστραλία ⁵	[5] Munday και συν., 2002
<u>Οικογένεια Carangidae</u> Κοκάλι, <i>Pseudocaranx dentex</i>	Ιαπωνία ²⁸	[28] Mori και συν., 1992
Μαγιάπικο, <i>Seriola dumerili</i> (Risso)	Ιαπωνία ²⁹	[29] Muroga, 1995
Ρομπανο <i>Trachinotus blochii</i> (Lacepede)	Ταϊβάν ¹	[1] Chi και συν., 2001
<u>Οικογένεια Sparidae</u>	Ιταλία ³⁰	[30] Dalla Valle και συν.,

Τσιπούρα, <i>Sparus aurata</i> (L.)		2000
Οικογένεια Sciaenidae Red drum <i>Sciaenops ocellatus</i> (L.)	Κορέα ³¹	[31] Oh και συν., 2001
Μυλοκόπι, <i>Umbrina cirrosa</i> (L.)	Ιταλία ¹⁴ , Γαλλία ³² ,	[14] Βονο και συν., 1999 [32] Comps και συν., 1996
White seabass <i>Atractoscion nobilis</i> (Ayres)	Η.Π.Α. ³³	[33] Curtis και συν., 2001
Οικογένεια Oplegnathidae Ιαπωνικό ψάρι παπαγάλος/Japanese parrotfish <i>Oplegnathus fasciatus</i>	Ιαπωνία ³⁴	[34] Yoshikoshi και Inoue, 1990
Rock porgy <i>O. punctatus</i> (Temminck & Schlegel)	Ιαπωνία ²⁸	[28] Mori και συν., 1992
Οικογένεια Eleotridae Sleepy cod <i>Oxyleotris lineolatus</i> (Steindachner)	Αυστραλία ⁵	[5] Munday και συν., 2002
Οικογένεια Rachycentridae Cobia <i>Rachycentron canadum</i> (L.)	Ταϊβάν ¹	[1] Chi και συν., 2001
Τάξη Pleuronectiformes Οικογένεια Pleuronectidae Barfin flounder <i>Verasper moseri</i>	Ιαπωνία ²⁹	[29] Muroga, 1995
Winter flounder <i>Pleuronectes americanus</i> (Walbaum)	Καναδάς ³⁵	[35] Barker και συν., 2002
Halibut <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Νορβηγία ³⁶ , Ηνωμένο Βασίλειο ³⁷	[36] Grotmol και συν., 1995

		[37] Starkey και συν., 2000
Οικογένεια <i>Bothidae</i> Japanese flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	Ιαπωνία ³⁸	[38] Nguyen και συν., 1994
Turbot, <i>Scophthalmus maximus</i>	Νορβηγία ³⁹	[39] Bloch και συν., 1991
Οικογένεια <i>Soleidae</i> Γλώσσα, <i>Solea solea</i> (L.)	Ηνωμένο Βασίλειο ²	[2] Starkey και συν., 2001
Οικογένεια <i>Lutjanidae</i> Firespot snapper, <i>Lutjanus erythropterus</i> Bloch	Ταϊβάν ⁴⁰	[40] Chi και συν., 2003
Οικογένεια <i>Siluridae</i> Κινέζικο γατόψαρο, <i>Parasilurus asotus</i> (L.)	Ταϊβάν ⁴⁰	[40] Chi και συν., 2003
Τάξη <i>Tetraodontiformes</i> Οικογένεια <i>Triodontidae</i> Tiger puffer, <i>Takifugu rubripes</i>	Ιαπωνία ²¹	[21] Danayadol και συν., 1995

Από τον πίνακα 4 είναι εμφανές ότι έως τώρα η νόσος έχει παρατηρηθεί σε όλες τις ηπείρους, εξαιρουμένης της Αφρικής. Σημειωτέον, ότι τα περισσότερα περιστατικά έχουν αναφερθεί σε περιοχές στις οποίες ανθίζει η εντατική εκτροφή των ψαριών σε θαλασσινούς κλωβούς. Επίσης, είναι εμφανές ότι, ανάμεσα στα ψάρια που προσβάλλονται, μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζουν τα λαβράκια, τα είδη του γένους *Epinephelus* και τα πλατύψαρα.

Παρότι η νόσος παρατηρείται στα ψάρια του θαλασσινού νερού, έχουν αναφερθεί και δύο περιστατικά φυσικής λοίμωξης σε ψάρια γλυκού νερού στην Αυστραλία. Συγκεκριμένα, οι Munday και συνεργάτες (2002) αναφέρουν την ύπαρξη των τυπικών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και την ανεύρεση σωματιδίων του *Noda-*

ιού στον εγκέφαλο αυστραλιανού γατόψαρου (*Tandanus tandanus*, Mitchell), που ζούσε σε γλυκό νερό γύρω από κλωβούς στους οποίους εκτρεφόταν ασιατικό λαβράκι. Επίσης, οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν κλινικό περιστατικό σε sleepy cod (*Oxyeleotris lineolatus*) κατά το οποίο απομονώθηκε Noda-ιός. Το περίεργο είναι ότι ο ιός αυτός είχε 95,7% ομολογία με τον ιό LcEV, που προσβάλλει το ασιατικό λαβράκι, αλλά το *Oxyeleotris lineolatus* δεν συμβίωσε με λαβράκι.

Το 2004, οι Gomez και συνεργάτες έλεγξαν, με PCR και ένθετη PCR (nested-PCR), 30 είδη υγιών καλλιεργούμενων και άγριων ψαριών, τα οποία συνέλεξαν από δύο απομακρυσμένες περιοχές της Ιαπωνίας. Από τα είδη αυτά, στα 27 ανιχνεύτηκε ιός Noda και από αυτά τα 21 δεν έχουν αναφερθεί ξανά ως ευαίσθητα στον ιό (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Εικοσιένα είδη ψαριών που αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τους Gomez και συνεργάτες (2004) ως ευαίσθητα στον Noda-ιό.

Black rockfish, <i>Sebastes inermis</i> (Cuvier)
Black scraper, <i>Thamnaconus modestus</i> (Günther)
Devil stinger, <i>Inimicus japonicus</i> (Cuvier)
Flathead grey mullet, <i>Mugil cephalus cephalus</i> (L.)
Freckled porcupine fish, <i>Diodon holocanthus</i> (L.)
Heavenly damselfish, <i>Pomacentrus coelestis</i> (Jordan & Starks)
Japanese bullhead shark, <i>Heterodontus japonicus</i> (MacLay & Macleay)
Japanese jack mackerel, <i>Trachurus japonicus</i> (Temminck & Schlegel)
Japanese scad, <i>Decapterus maruadsi</i> (Temminck & Schlegel)
Luna lionfish, <i>Pterois lunulata</i> (Temminck & Schlegel)
Marbled rockfish, <i>Sebastiscus marmoratus</i> (Cuvier)
Marbled sole, <i>Pleuronectes yokohamae</i> (Günther)

Moorish idol, <i>Zanclus cornutus</i> (L.)
Oblong rockfish, <i>S. oblongus</i> (Günther)
Panther puffer, <i>Takifugu pardalis</i> (Temminck & Schlegel)
Red sea bream, <i>Pagrus major</i> (Temminck & Schlegel)
Schlegel's black rockfish, <i>S. schlegeli</i> (Hilgendorf)
Spotbelly rockfish, <i>S. pachycephalus</i> (Temminck & Schlegel)
Striped catfish eel, <i>Plotosus lineatus</i> (Thunberg)
Stripey fish, <i>Microcanthus strigatus</i> (Cuvier)
Threadsail filefish, <i>Stephanolepis cirrhifer</i> (Temminck & Schlegel)

Πρέπει να τονιστεί ότι, από τα είδη που παρουσιάζονται στον πίνακα 5, ο κέφαλος υπάρχει και στην Ελλάδα, ενώ τα japanese jack mackerel και red seabream είναι συγγενή με το σαυρίδι και το φαγκρί, αντίστοιχα. Επιπλέον, το είδος *Decapterus maruadsi* και το japanese jack mackerel είναι πελαγικά και μεταναστευτικά και έτσι είναι πιθανόν, εφόσον είναι μολυσμένα, να μεταδώσουν τον ιό σε ψάρια που διαβιούν σε γεωγραφικά απομακρυσμένες περιοχές. Η υπόθεση αυτή είχε ήδη εκφραστεί από τους Curtis και συνεργάτες (2001) και Chi και συνεργάτες (2003).

Οι ιοί που απομονώθηκαν από τα προαναφερθέντα 27 είδη ψαριών ανήκαν στον γενότυπο RGNNV και όπως ήταν αναμενόμενο όλα τα ψάρια ήταν θερμόφιλα (Nishizawa και συν., 1997· Iwamoto και συν., 1999· Chi και συν., 2003).

3.2. Παθογένεια

Μέχρι σήμερα έχουν γίνει αρκετές μελέτες που αφορούν στον εντοπισμό της πύλης εισόδου του ιού στον οργανισμό και στον τρόπο εξάπλωσής του στο ΚΝΣ του ψαριού. Το 1996, οι Nguyen και συνεργάτες ανίχνευσαν τον ιό τόσο στο ΚΝΣ όσο και σε εκφυλισμένα κύτταρα της επιδερμίδας του δέρματος προσβεβλημένων ψαριών.

Έτσι γεννήθηκε το ερώτημα αν το δέρμα αποτέλεσε το σημείο εισόδου του ιού στον οργανισμό ή αν ο εντοπισμός του ιού στο δέρμα ήταν επακόλουθο συστηματικής λοίμωξης. Στη συνέχεια, αρκετοί συγγραφείς εντόπισαν τον ιό στο οσφρητικό επιθήλιο ή στους οσφρητικούς λοβούς του εγκεφάλου (Grotmol και συν., 1999· Mladineo, 2003· Johansen και συν., 2004). Ο εντοπισμός του ιού στους οσφρητικούς λοβούς του εγκεφάλου δείχνει ότι πιθανόν αυτός εισέρχεται από τη ρινική κοιλότητα (Le Breton και συν., 1997). Τέλος, ο Grotmol (1999) ανίχνευσε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, θετικά στον ιό κύτταρα στο επιθήλιο του δέρματος, των εντέρων και των βραγχίων, ενώ η Mladineo (2003) με την ίδια τεχνική, παρατήρησε θετικά στον ιό κύτταρα σε φλέβα του ήπατος. Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι προς το παρόν τίποτε δεν είναι επιβεβαιωμένο σχετικά με την πύλη εισόδου του ιού και γι' αυτό η έρευνα συνεχίζεται.

Σχετικά με τον τρόπο εξάπλωσης του παθογόνου παράγοντα στο ΚΝΣ, θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με τρεις κυρίως τρόπους: α) με τοπική εξάπλωση μέσω των γειτονικών ιστών, β) με εξάπλωση μέσω των νεύρων και γ) αιματογενώς (Nathanson και Tyler, 1997). Η εγκατάσταση του ιού στους ιστούς είναι πολύ γρήγορη και θα πρέπει καθημερινά να λαμβάνονται δείγματα από όλους τους ιστούς, έτσι ώστε να αποκαλυφθούν διαφορές στην παρουσία του ιού σε αυτούς και να καθοριστεί με τον τρόπο αυτό η πορεία του διάμεσου των ιστών. Στις περισσότερες δειγματοληψίες από νοσούντα ψάρια, διαπιστώνεται προσβολή του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού (Peducasse και συν., 1999· Husgaro και συν., 2001). Διαδοχικές μελέτες σε κοκάλι και σε atlantic halibut, έδειξαν ότι ο εγκέφαλος προσβάλλεται νωρίτερα από τον αμφιβληστροειδή (Nguen και συν., 1996· Grotmol και συν., 1999). Τα πρώτα κύτταρα στα οποία ανιχνεύεται ο ιός εντοπίζονται στο ουραίο και το κρανιακό στέλεχος του νωτιαίου μυελού. Τα τμήματα αυτά του ΚΝΣ περιέχουν πυρήνες του πνευμονογαστρικού νεύρου και πιθανώς ο ιός να μεταφέρεται κατά μήκος του νεύρου αυτού από το έντερο στον εγκέφαλο. Ως γνωστόν, ο αμφιβληστροειδής συνδέεται με τον εγκέφαλο μέσω του οπτικού νεύρου

και κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η εξάπλωση του ιού μέσω των νεύρων στον αμφιβληστροειδή. Οι Johansen και συνεργάτες (2003) και Grove και συνεργάτες (2003) διαπίστωσαν ότι ο οπτικός λοβός του εγκεφάλου και οι εσωτερικές στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς, είναι τα σημεία στα οποία η προσβολή είναι εντονότερη, πιθανόν επειδή η μεταξύ τους επαφή, μέσω του οπτικού νεύρου, είναι πιο στενή.

Κατά τη διάρκεια της εξάπλωσης του ιού στο ΚΝΣ αυτός μεταδίδεται και στα αντίστοιχα γάγγλια μέσω των νεύρων που τα συνδέουν με τον εγκεφαλο και τον νωτιαίο μυελό. Οι Grotmol και συνεργάτες (1999), εντόπισαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε προνύμφη του atlantic halibut, ανοσοθετικά κύτταρα σε ένα γάγγλιο δίπλα από την ωτική κάψα. Πάντως, οι μελέτες που έχουν γίνει στα διάφορα είδη ψαριών δεν είναι αρκετές για να αποδειχθεί η εξάπλωση του ιού στα διάφορα όργανα, μέσω των νεύρων.

Οι ενδοπεριτοναϊκές μολύνσεις ψαριών που έχουν γίνει σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα έχουν αποδείξει την ικανότητα του ιού να μεταφέρεται από την περιτοναϊκή κοιλότητα στον εγκεφαλο και τον οφθαλμό.

3.3. Κλινικά συμπτώματα

Τα περισσότερα ψάρια προσβάλλονται στο στάδιο της προνύμφης ή σε νεαρά στάδια ανάπτυξης, οπότε οι απώλειες είναι συνήθως πολύ μεγάλες. Τα τελευταία, όμως, χρόνια αναφέρθηκαν σημαντικές απώλειες και σε μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια (εμπορικό μέγεθος), ειδικά σε λαβράκι (Le Breton και συν., 1997), σε είδη του γένους *Epinephelus* (Fukuda και συν., 1996) και στο atlantic halibut (Aspehaug και συν., 1999). Στην περίπτωση του λαβρακιού και των ειδών του γένους *Epinephelus*, φαίνεται ότι, στα μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια, υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στις υψηλές θερμοκρασίες του νερού και στην εμφάνιση της νόσου (Le Breton και συν., 1997· Tanaka και συν., 1998)

Γενικά, τα κλινικά συμπτώματα συσχετίζονται με τις αλλοιώσεις στον εγκεφαλο και τον αμφιβληστροειδή, δηλαδή παρατηρούνται κινητικές ανωμαλίες,

απώλεια ελέγχου της νηκτικής κύστης, δυσκολία στην όραση και σκούρος χρωματισμός δέρματος. Τα περισσότερα είδη ψαριών εμφανίζουν ανώμαλη κολύμβηση, όπως σπειροειδή κολύμβηση και απότομη προς τα εμπρός κίνηση σαν να εκτοξεύονται. Τα πλατύψαρα, όμως, τείνουν να κολυμπούν κυκλικά και να μένουν ακίνητα με την κοιλιακή χώρα προς τα επάνω (Glazebrook και συν., 1990^{*} Yoshikoshi και Inoue, 1990^{*} Bloch και συν., 1991^{*} Breuil και συν., 1991^{*} Mori και συν., 1991^{*} Mori και συν., 1992^{*} Grotmol και συν., 1997). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι στα λαβράκια παρατηρείται κάθετη στάση με το κεφάλι ή το ουραίο πτερύγιο κάτω από την επιφάνεια του νερού (Bono και συν., 1999).

Στο ασιατικό και το ευρωπαϊκό λαβράκι, όπως και στο κοκάλι, έχει αναφερθεί διόγκωση της νηκτικής κύστης (Breuil και συν., 1991^{*} Mori και συν., 1992). Οι προνύμφες του ασιατικού λαβρακιού και του atlantic halibut γίνονται πιο ωχρές (Glazebrook και συν., 1990^{*} Grotmol και συν., 1997), ενώ οι προνύμφες των ειδών του γένους *Epinephelus* καθώς και τα νεαρά του λαβρακιού, του atlantic halibut και του turbot γίνονται πιο σκούρα. Κάποια ψάρια αδυνατίζουν εξαιτίας της ανορεξίας, αλλά το κυριότερο σύμπτωμα είναι οι μαζικοί θάνατοι, ειδικά στις προνύμφες (Munday και Nakai, 1997).

Ενδιαφέρουσες διαφορές, όσον αφορά στην εμφάνιση της νόσου και στο ποσοστό θανάτων, φαίνονται στον πίνακα 6. Υπάρχουν σημαντικές εναλλαγές στην ηλικία κατά την οποία πρωτοεμφανίζεται η νόσος και στην περίοδο κατά την οποία λαμβάνει χώρα η θνησιμότητα. Γενικότερα, όσο νωρίτερα εμφανίζονται τα συμπτώματα, τόσο μεγαλύτερα είναι και τα ποσοστά θνησιμότητας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, θνησιμότητα σε ψάρια μεγάλου μεγέθους έχει παρατηρηθεί στο ευρωπαϊκό λαβράκι (Le Breton και συν. 1997) και στα είδη του γένους *Epinephelus* (Fukuda και συν., 1996), αλλά ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις η θνησιμότητα ήταν μεγαλύτερη όταν προσβάλλονταν νεαρά ψάρια.

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας σε προνύμφες και νεαρά ψάρια (πηγή: ΟΙΕ, 2000).

Είδος ψαριού	Πρώιμη εμφάνιση της νόσου	Συνήθης εμφάνιση της νόσου	Ώσιμη εμφάνιση της νόσου	Σύνηθες ποσοστό θνησιμότητας	Υψηλό ποσοστό θνησιμότητας
Ασιατικό λαβράκι, <i>Lates calcarifer</i>	9 ημέρες ME	15-18 ημέρες ME	≥24 ημέρες ME	50-100%/ μήνα	100% σε ψάρια μικρότερα του ενός μηνός
Λαβράκι, <i>Dicentrarchus labrax</i>	10 ημέρες ME	25-40 ημέρες ME	≥12 μηνών, (400-580 g MB)	10%/ μήνα	-
Ιαπωνικό ψάρι παπαγάλος, <i>Oplegnathus fasciatus</i>	6-25 mm OM	-	<40 mm OM	-	έως 100%
<i>Epinephelus akaara</i>	14 ημέρες ME (7-8 mm OM)	9-10 mm OM	<40 mm OM	80%	έως 100%
Στήρα μαλαμπάρ, <i>Epinephelus malabaricus</i>	-	20-50 mm OM	-	50-80%	-
Κοκάλι, <i>Pseudocaranx</i>	1 ημέρες ME	1-4 ημέρες ME	<20 ημέρες ME (8 mm)	100%	-

<i>dentex</i>			OM)		
<i>Scophthalmus</i>	<21 ημέρες	-	50-100 mg MB	-	έως 100%
<i>maximus</i>	ME				

ME: μετά την εκκόλαψη, MB: μέσο βάρος ψαριού, OM: ολικό μήκος ψαριού

3.3.1. Υποκλινική λοίμωξη από τον ιό Noda

Παρό,τι τα ασυμπτωματικά μολυσμένα ψάρια θεωρούνται οι πιο πιθανοί φορείς μετάδοσης του ιού, ελάχιστα στοιχεία είναι γνωστά για την παθογένεια της νόσου στα ψάρια αυτά και τον αντίκτυπό της στην υγεία τους. Μέχρι σήμερα, η κατανομή του ιού στους ιστούς των ασυμπτωματικών φορέων της νόσου έχει μελετηθεί μόνο από τους Arimoto και συνεργάτες (1992) και τους Nguyen και συνεργάτες (1996). Συγκεκριμένα, οι Arimoto και συνεργάτες (1992), εντόπισαν τον ιό σε γονιμοποιημένα αυγά και σε ωοθήκες γεννητόρων κοκαλιού, με τη μέθοδο της έμμεσης ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Εντούτοις, από τους όρχεις και τον εγκέφαλο των γεννητόρων αυτών δεν απομόνωσαν τον ιό. Όσον αφορά στους Nguyen και συνεργάτες (1996), αυτοί εξέτασαν ενήλικα κοκάλια με ανοσοφθορισμό και ανίχνευσαν τον ιό στις γονάδες, το έντερο, τον στόμαχο, τον νεφρό και το ήπαρ, όχι όμως και στο ΚΝΣ.

Πέραν των φυσικών περιστατικών και οι πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετά είδη ψαριών είναι ευαίσθητα στον ιό, χωρίς όμως να εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα (Glazebrook, 1995· Skliris και Richards, 1999). Στα ψάρια αυτά, η συγκέντρωση του ιού συχνά είναι χαμηλή, οπότε για την ανίχνευσή του απαιτείται η χρήση ευαίσθητων μεθόδων, όπως είναι η ένθετη RT-PCR (nested RT-PCR) και η πραγματικού χρόνου PCR (real time PCR). Επομένως, είναι πιθανόν μια πληθώρα άγριων πληθυσμών ψαριών να είναι ασυμπτωματικοί φορείς της νόσου και έτσι να αποτελούν βασική πηγή μόλυνσης των εκτρεφόμενων ψαριών.

3.4. Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις

Οι όροι εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια καθορίζουν την παρουσία μη φλεγμονωδών αλλοιώσεων στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή, αντίστοιχα. Παρότι κατά τη διάρκεια των εξάρσεων της νόσου σπάνια παρατηρείται φλεγμονή του εγκεφάλου, συχνά χρησιμοποιείται ο λανθασμένος όρος «εγκεφαλίτιδα». Αντίθετα, παρατηρείται συχνά σοβαρή φλεγμονή των οφθαλμών, με μεγάλο αριθμό λευκοκυττάρων, όμως ο σωστός όρος «αμφιβληστροειδίτιδα» χρησιμοποιείται σπάνια (ΟΙΕ, 2003).

Σε όλα τα είδη των ψαριών τα ιστοπαθολογικά ευρήματα χαρακτηρίζονται από κενотоποίηση και κυτταρική νέκρωση του ΚΝΣ. Γενικά, το πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου είναι πιο έντονα προσβεβλημένο από το οπίσθιο και το νωτιαίο μυελό. Σε μια λεπτομερή περιγραφή της παθολογοανατομικής εικόνας της νόσου σε προνύμφες και νεαρά ψάρια του atlantic halibut, οι Grotmol και συνεργάτες (1997), αναφέρουν ότι εντονότερα προσβεβλημένος ήταν ο οπτικός λοβός και υπήρχε κενотоπίωση των νευρώνων των κεφαλικών γαγγλίων του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και των νωτιαίων γαγγλίων. Σε αντίθεση, οι Le Breton και συνεργάτες (1997) αναφέρουν ότι, σε νοσούντα ενήλικα ευρωπαϊκά λαβράκια, ο οπτικός λοβός σπάνια ήταν προσβεβλημένος. Αλλοιώσεις στα νωτιαία γάγγλια έχουν επίσης περιγραφεί και στο ιαπωνικό ψάρι παπαγάλος (Yoshikoshi και Inoue, 1990). Μάλιστα, στις προνύμφες η προσβολή ήταν εντονότερη από ότι στα νεαρά ψάρια. Η πιο χαρακτηριστική αλλοίωση ήταν η παρουσία κενотоπίων στη φαιά ουσία του εγκεφάλου. Τα κενотоπία φαίνεται ότι ήταν ενδοκυτταροπλασματικά, αν και η ακριβής τους θέση δεν ήταν πάντα προσδιορίσιμη. Γενικά, στα μικρότερης ηλικίας ψάρια οι αλλοιώσεις είναι πιο έντονες, ενώ στα μεγαλύτερης ηλικίας οι αλλοιώσεις είναι λιγότερο εκτεταμένες και εντοπίζονται συνήθως στον αμφιβληστροειδή (Munday και συν., 2002).

Άλλες αλλοιώσεις στο ΚΝΣ είναι η πύκνωση, η συρρίκνωση και η βασηοφιλία των μολυσμένων κυττάρων, η εστιακή πύκνωση και η καρυορρηξία των πυρήνων

των νευρικών κυττάρων (Yoshikoshi και Inoue, 1990), η κοκκίωση του νευροπιλήματος και η παρουσία διηθήσεων από μονοπύρηνια κύτταρα (Grotmol και συν., 1995). Στα αιμοφόρα αγγεία του εγκεφάλου έχει παρατηρηθεί παρουσία εωσινοφιλικού και PAS (Periodic Acid-Schiff) θετικού υλικού στο τοίχωμα αυτών (Munday και συν., 1992), καθώς και οίδημα του ενδοθηλίου (Le Breton και συν., 1997). Στα εγκεφαλικά κύτταρα έχουν ανεβρεθεί βασεόφιλα ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα, διαμέτρου περίπου 1μm στο ιαπωνικό ψάρι παπαγάλος (Yoshikoshi και Inoue, 1990) και στο ασιατικό λαβράκι (Glazebrook και συν., 1990), διαμέτρου 2-5 μm στο ευρωπαϊκό λαβράκι (Breuil και συν., 1991) και απροσδιόριστου μεγέθους στη στήρα μαλαμπάρ (Boonyaratpalin και συν., 1996). Σε επίμονα μολυσμένα, αλλά ασυμπτωματικά νεαρά του atlantic halibut, βρέθηκαν, διασκορπισμένα στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή, εστιακά συσσωματώματα κυττάρων τύπου μακροφάγων, που περιείχαν ιικά σωματίδια (Nilsen και συν., 2001).

Στον αμφιβληστροειδή έχει περιγραφεί κενοτοπίωση σε όλα τα είδη ψαριών στα οποία αυτός εξετάστηκε. Εντούτοις, στην περίπτωση του ιαπωνικού ψαριού παπαγάλος (Yoshikoshi και Inoue, 1990) και του turbot (Bloch και συν., 1991) δεν υπάρχουν περιγραφές για κάτι τέτοιο. Η κενοτοπίωση αφορά στα κυτταρικά συστατικά του αμφιβληστροειδούς, ειδικά στις διπολικές και γαγγλιωνικές πυρηνικές στοιβάδες (Munday και συν., 1992), μολονότι μπορεί να βρεθούν μικρά κενοτόπια και στη στοιβάδα των ραβδίων και των κωνίων (Grotmol και συν., 1995).

Ελαφριά ενδοκαρδίτιδα, καθώς και εκφύλιση και νέκρωση των βραγχιακών στηρικτικών κυττάρων σε μολυσμένα atlantic halibut έχουν περιγραφεί από τους Grotmol και συνεργάτες (1997a). Οι ίδιοι συγγραφείς σε άλλη εργασία τους (1997b) διαπίστωσαν την παρουσία του ιού στο επικάρδιο και στο ενδοκάρδιο μολυσμένων atlantic halibut, με ηλεκτρονική μικροσκόπηση και με ανοσοϊστοχημεία. Αλλοιώσεις περικαρδίτιδας και μυοκαρδίτιδας διαπιστώνονται συχνά σε εκτρεφόμενα atlantic halibut, μέσου βάρους 10-50 γρ. (Johansen, 2004).

3.5. Επιζωοτιολογία

3.5.1. Οριζόντια μετάδοση

Μελέτες που έχουν γίνει σε περιπτώσεις φυσικών αλλά και πειραματικών μολύνσεων έχουν δείξει ότι ο ιός μεταδίδεται πολύ εύκολα από ένα είδος μολυσμένων ψαριών σε άλλα ευαίσθητα στη νόσο είδη (Mori και συν., 1991* Munday και συν., 2002). Πρόσφατα, πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην οριζόντια μετάδοση του ιού κατά τη διάρκεια υποκλινικής λοίμωξης. Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί η περίπτωση μετάδοσης του ιού από ασυμπτωματικά μολυσμένες τσιπούρες σε λαβράκια τα οποία συμβίωναν με αυτές (Castric και συν., 2001). Άλλο παράδειγμα είναι η εκδήλωση κλινικής λοίμωξης σε λαβράκια στην Ελλάδα, 8 μήνες μετά τη μεταφορά τους σε γλυκό νερό (Athanasopoulou και συν., 2003). Στην περίπτωση αυτή πιστεύεται ότι τα λαβράκια είχαν υποστεί ασυμπτωματική λοίμωξη, όταν βρίσκονταν στο πρώτο στάδιο ανάπτυξής τους στο θαλασσινό νερό, η οποία ενεργοποιήθηκε εξαιτίας του stress που υπέστησαν τα ψάρια λόγω συνυπαρχόντων υψηλών επιπέδων CO₂. Τέλος, στην Ταϊβάν παρατηρήθηκε προσβολή ιχθύων γλυκού νερού, συμπεριλαμβανομένου και του ευρωπαϊκού χελιού, λόγω εισόδου ασυμπτωματικά μολυσμένων θαλάσσιων ασιατικών λαβρακιών. Η υψηλή θερμοκρασία των γλυκών υδάτων πιστεύεται ότι ήταν ο παράγοντας ενεργοποίησης της νόσου (Chi και συν., 2003).

Πρόσφατα η νόσος αναφέρθηκε και σε ψάρια του γλυκού νερού, αλλά ως πηγή μόλυνσής τους θεωρήθηκε το θαλάσσιο περιβάλλον (Hegde και συν., 2003). Συγκεκριμένα, από νοσοούν ψάρι guppy (*Poecilia reticulata*, Peters, 1859) που ζούσε σε ενυδρείο, απομονώθηκε ιός Noda ο οποίος όμως, όπως αποδείχθηκε, είχε μεγάλη γενετική συγγένεια με τον ιό Noda που προσβάλλει το greasy grouper. Να σημειωθεί ότι το ψάρι αυτό ζει στη θάλασσα.

Η μετάδοση από ασθενή σε υγιή ψάρια επηρεάζεται από την ιχθυοπυκνότητα (Arimoto και συν., 1993), τη λοιμογόνο δύναμη του ιικού στελέχους και τη θερμοκρασία του νερού (Tanaka και συν., 1998). Η ανθεκτικότητα του ιού σε



περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα σε τιμές pH 2-9 (Frerichs και συν., 1996) ή σε θαλασσινό νερό 15 °C για περισσότερο από ένα χρόνο (Frerichs και συν., 2000), αυξάνει την πιθανότητα μετάδοσής του από ψάρι σε ψάρι.

Οριζόντια μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει και μέσω μολυσμένων τροφών αφού, σε μια μολυσμένη εκτροφή, διαπιστώθηκε η ύπαρξή του σε ζωντανό δόλωμα (Chi και συν., 2000). Μετάδοση του ιού μπορεί να γίνει και μέσω μολυσμένου νερού το οποίο προέρχεται από γειτονικές μολυσμένες εκτροφές.

3.5.2. Κάθετη μετάδοση

Ήδη από το 1992 οι Arimoto και συνεργάτες (1992) και οι Mushiake και συνεργάτες ανίχνευσαν τον ιό με ELISA και RT-PCR στα γεννητικά προϊόντα, δηλαδή αυγά και σπέρμα γεννητόρων κοκαλιού. Σε πείραμα που έγινε αργότερα σε λαβράκι, καταδείχθηκε ότι οι μολυσμένοι γεννήτορες μπορεί να μεταδώσουν τον ιό στις προνύμφες μέσω των γονιμοποιημένων αυγών, όμως δεν διευκρινίστηκε αν ο ιός μεταδόθηκε από το εσωτερικό ή το εξωτερικό περιβάλλον των αυγών (Breuil και συν., 2002). Πάντως η απολύμανση της επιφάνειας των γονιμοποιημένων αυγών με όζον έχει δείξει ότι αποτρέπει τη μετάδοση του ιού σε προνύμφες του atlantic halibut (Grotmol και Totland, 2000).

Κάθετη μετάδοση του ιού διαπιστώθηκε και σε κοκάλι. Κατόπιν αυτού αποφασίστηκε η λήψη κατάλληλων μέτρων για τον έλεγχο της νόσου στις προνύμφες. Τα μέτρα πρόληψης αφορούσαν: (α) στην εξέταση των γεννητόρων με PCR και στην καταστροφή όσων ήταν μολυσμένοι με τον ιό και (β) στην απολύμανση των γονιμοποιημένων αυγών με όζον (Mori και συν., 1998· Mushiake και συν., 1994). Επίσης, έχει αναφερθεί μετάδοση του ιού μέσω των ωοθηκών σε λαβράκι, στο οποίο η νόσος συνήθως δεν παρατηρείται πριν από την 30^η ημέρα μετά την εκκόλαψη.

Το 2006 οι Azad και συνεργάτες, εντόπισαν με ανοσοϊστοχημική μέθοδο αντιγόνα του ιού τόσο στο συνδετικό ιστό των ωοθηκών ασιατικού λαβρακιού, όσο και σε αυγά και προνύμφες του ίδιου είδους. Η ανίχνευση του ιού στα αυγά και τις

προνύμφες έγινε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από την ημέρα 1 έως την 42^η ημέρα μετά την εκκόλαψη τους.

Η επιλογή γεννητόρων ελεύθερων από τον ιό, με τη βοήθεια της ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων σε αυτούς ή/και της RT-PCR για την ανίχνευση του ιού στα αυγά και το σπέρμα τους, μείωσε τα περιστατικά της νόσου στο λαβράκι, το κοκάλι και το barfin flounder (Arimoto και συν., 1992· Mushiake και συν., 1994· Breuil και Romestand, 1999· Breuil και συν., 2000· Watanabe και συν., 2000). Οι Breuil και συνεργάτες (2002) συνέκριναν τις μεθόδους ELISA, RT-PCR και ένθετη RT-PCR ως προς την ευαισθησία τους στην ανίχνευση του Noda-ιού σε ωοθήκες από πειραματικά μολυσμένους γεννήτορες λαβρακιού και διαπίστωσαν ότι καλύτερη μέθοδος ήταν η ένθετη RT-PCR. Επειδή η συγκέντρωση του ιού πιθανόν να είναι πολύ μικρή στα αυγά, το σπέρμα και τις γονάδες, που σημαίνει ότι δεν μπορεί να ανιχνευτεί με τις προαναφερθείσες μεθόδους, οι Dalla Vale και συνεργάτες (2005) προτείνουν να χρησιμοποιείται η real-time PCR, η οποία ως μέθοδος είναι πολύ πιο ευαίσθητη. Οι γεννήτορες που είναι μολυσμένοι με τον Noda-ιό συνήθως δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα κι έτσι ο χρόνος μόλυνσής τους δεν είναι γνωστός. Η μόλυνση μπορεί να γίνει κατά το στάδιο της προνύμφης ή σε μεγαλύτερη ηλικία. Είναι σημαντικό το ότι ο ιός μπορεί να μην εντοπίζεται πάντα στο αναπαραγωγικό σύστημα, αλλά να βρεθεί εκεί μετά από την επίδραση κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, όπως είναι η χρήση του ίδιου γεννήτορα σε πολλές και συνεχόμενες ωοτοκίες (Munday και συν., 2002).

3.5.3. Μετάδοση μεταξύ ειδών

Το γεγονός ότι ο ιός μεταδίδεται μεταξύ διαφορετικών ειδών ψαριών είναι σημαντικό για τη διαχείριση ιχθυοκαλλιεργειών στην ανοιχτή θάλασσα. Οι Munday και συνεργάτες (2002), αναφέρουν ότι όταν η θερμοκρασία είναι ευνοϊκή, ο ιός δεν έχει ειδικότητα σε συγκεκριμένο είδος ψαριού. Η σημασία της θερμοκρασίας στη διασταυρούμενη μόλυνση μεταξύ των ειδών είναι εμφανής και από το γεγονός ότι δεν

παρατηρήθηκε λοίμωξη σε ψάρια ψυχρών υδάτων, όταν αυτά μολύνθηκαν με Noda-
ιό ψαριών θερμών υδάτων και αντίστροφα (Totland και συν., 1999).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν είδη Noda-ιών τα οποία προσβάλλουν συγκεκριμένα
είδη ψαριών, όπως ο ιός SJNNV που προσβάλλει το κοκάλι (striped jack) και το red
seabream (Nishizawa και συν., 1997), ο ιός TPNNV που προσβάλλει αποκλειστικά το
tiger puffer ή ο ιός SGNNV, μέλος του γενότυπου RGNNV, που προσβάλλει μόνο το
sevenband grouper. Οι Iwamoto και συνεργάτες (2004), για να διαπιστώσουν ποιοι
παράγοντες των ιών SJNNV και SGNNV εμπλέκονται στον έλεγχο της ειδικότητας
του ξενιστή, χρησιμοποίησαν γενετική μηχανική και παρασκεύασαν 2 νέους ιούς,
τους SJNNVRNA1-SGNNVRNA2 και SJNNVRNA2-SGNNVRNA1. Διαπίστωσαν,
λοιπόν, ότι και για τους δύο ιούς, η ειδικότητα του ξενιστή καθορίζεται από το RNA 2
γενωμικό τους τμήμα και/ή την αντίστοιχη καψιδική πρωτεΐνη που αυτά
κωδικοποιούν.

Από διάφορες περιοχές της Γαλλίας έχουν απομονωθεί δύο διαφορετικά
στελέχη Noda-ιού από λαβράκι, τα οποία εμφανίζουν διαφορετική παθογόνο δράση
σε προνύμφες λαβρακιού διαφορετικών ημερών (Thierry και συν., 1999a; Breuil και
συν., 2001). Τα στελέχη αυτά ανήκουν στον γενότυπο RGNNV, που προσβάλλει
ψάρια θερμών υδάτων. Όμως, το 2004 αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Thierry
και συνεργάτες η απομόνωση ενός στελέχους από λαβράκι, το οποίο ανήκει στο
γενότυπο BFNNV και ο οποίος, προσβάλλει ψάρια ψυχρών υδάτων. Η απομόνωση
έγινε κατά τη διάρκεια εμφάνισης της νόσου σε λαβράκια που διαβιούσαν σε
θαλασσινό νερό χαμηλής θερμοκρασίας (15 °C).

Τέλος, ένα είδος Noda-ιού που προκαλεί οξεία λοίμωξη σε κάποιο είδος
ψαριού μπορεί να προκαλέσει ασυμπτωματική λοίμωξη σε άλλα είδη ψαριών. Αυτό
αποδείχτηκε στην τσιπούρα όταν, από μονάδα στην οποία υπήρξε εκδήλωση της
νόσου σε λαβράκια που συμβιούσαν με φαινομενικώς υγιείς τσιπούρες, συνελέγησαν
δείγματα από τις τσιπούρες και ενοφθαλμίστηκαν σε υγιή λαβράκια της ίδιας
μονάδας. Στη συνέχεια τα λαβράκια αυτά νόσησαν. Αντίθετα, όταν τα δείγματα

ενοφθαλμίστηκαν σε τσιπούρες, αυτές δεν νόσησαν, αλλά μπορούσαν να μεταδώσουν τον ιό σε λαβράκια με τα οποία συμβίωναν (Castric και συν., 2001).

Παθογόνοι για τα ψάρια Noda-ιοί έχουν ενοφθαλμιστεί σε ποντίκια BALB/c, αλλά τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά (Banu και Nakai, 2004). Έτσι, ο κίνδυνος της μετάδοσης του ιού σε θηλαστικά θεωρείται χαμηλός.

3.6. Διάγνωση

3.6.1. Κλινική διάγνωση

Η κλινική διάγνωση της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας στηρίζεται στα συμπτώματα (κεφάλαιο 2.3.), την εποχική εμφάνιση της νόσου (καλοκαίρι και φθινόπωρο, όταν η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται) και στις παθολογοανατομικές αλλοιώσεις. Οι κύριες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις, όπως φαίνεται και στο κεφάλαιο 2.4., είναι η ύπαρξη κενотоπιών στον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό και/ή τον αμφιβληστροειδή, καθώς και η παρουσία ιικών σωματιδίων σε εγκέφαλο και αμφιβληστροειδή. Εντούτοις, για την επιβεβαίωση του νοσογόνου παράγοντα είναι απαραίτητο να ακολουθήσει εργαστηριακή διάγνωση (ΟΙΕ, 2003).

3.6.2. Εργαστηριακή διάγνωση

Η εργαστηριακή διάγνωση στηρίζεται στην ανίχνευση του ιού με κλασικές ή μοριακές μεθόδους και στην ανίχνευση των ειδικών κατά των Noda-ιών αντισωμάτων.

3.6.2.1. Κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης ιού

Οι κλασικές μέθοδοι ανίχνευσης του ιού περιλαμβάνουν (α) την ανίχνευση των ιικών αντιγόνων με ανοσοφθορισμό (IFAT), ανοσοϊστοχημεία ή ELISA, (β) την απομόνωση αυτού κατόπιν ενοφθαλμισμού παθολογικών υλικών σε

κυτταροκαλλιέργειες και (γ) την ανεύρεση των ιικών σωματιδίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ΟΙΕ, 2003).

Ανίχνευση ιικών αντιγόνων

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού (indirect fluorescent antibody test, IFAT) εφαρμόζεται συνήθως σε τομές ιστών οι οποίοι διατηρήθηκαν στην κατάψυξη ή σε τομές στις οποίες έχει γίνει πρώτα αποπαραφίνωση (Grotmol και συν., 1999· Iwamoto και συν., 1999). Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι ο πολυκλωνικός αντί-NNV ορός (συνήθως αντι- SJNNV), που χρησιμοποιείται ως αντίσωμα, μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα στελέχη των Betanoda-ιών. Η μέθοδος μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί σε εντυπώματα εγκεφάλου, αποτελώντας έτσι μια γρήγορη και οικονομική διαγνωστική μέθοδο (Bono και συν., 1999a). Η τεχνική της ELISA είναι πιο ευαίσθητη από τον IFAT, διότι μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές ποσότητες ιού. Γι' αυτό το λόγο είναι κατάλληλη για γρήγορο έλεγχο πολλών δειγμάτων. Το μειονέκτημα της, όμως, είναι ότι μέχρι σήμερα η ειδικότητά της ποικίλει και έτσι έχει αντικατασταθεί κυρίως από μοριακές τεχνικές (Munday και συν., 2002).

Απομόνωση ιού

Οι πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες που προέρχονται από κύτταρα θηλαστικών ή ψαριών δεν είναι κατάλληλες για την απομόνωση των περισσότερων Betanoda-ιών (Delsert και συν., 1997). Σήμερα όμως υπάρχει η κυτταρική σειρά SSN-1, που προέρχεται από το ψάρι του γλυκού νερού Striped Snakehead (*Channa striatus*) (Frerichs και συν., 1996) και είναι κατάλληλη για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό αρκετών Betanoda-ιών που ανήκουν στους τέσσερις κύριους γενότυπους (Iwamoto και συν., 1999). Στα κύτταρα της σειράς αυτής η κυτταροπαθογόνος δράση του ιού, όπως περιγράφηκε αρχικά από τους Frerichs και συνεργάτες (1996), ξεκινά με την παρουσία περιοχών με κυκλικά και κοκκιώδη κύτταρα, οι οποίες στη συνέχεια εξαπλώνονται και τελικά επέρχεται εκφύλιση των

μολυσμένων κυττάρων. Το πρόβλημα, όμως, είναι ότι η σειρά SSN-1 παρουσιάζει δύο μειονεκτήματα. Πρώτον, ο πολλαπλασιασμός των ιών σε αυτή είναι θερμοεξαρτώμενος (διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης ιού για κάθε γενότυπο) και γι' αυτό χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις όπου η απομόνωση ιού γίνεται για ερευνητικούς σκοπούς, παρά για διάγνωση ρουτίνας· δεύτερον, είναι διαρκώς μολυσμένη με ένα ρετροϊό τύπου C (Iwamoto και συν., 1999). Το τελευταίο μπορεί να είναι και πλεονέκτημα διότι η ευαισθησία της σε ιούς του θαλασσινού νερού μπορεί να οφείλεται στην παρουσία αυτού του ρετροϊού.

Από το Διεθνές Γραφείο Επιζωοτιών (ΔΓΕ, ΟΙΕ) προτείνεται και η χρήση της κυτταρικής σειράς E-11, η οποία είναι κλώνος της SSN-1, και είναι κατάλληλη τόσο για ποιοτική, όσο και για ποσοτική ανάλυση (ΟΙΕ, 2003). Όμως και αυτή είναι μολυσμένη με τον ρετροϊό τύπου C (Iwamoto και συν., 2000). Το πλεονέκτημα των σειρών SSN-1 και E-11 είναι ότι στηρίζουν την παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Noda-ιών (10^9 - 10^{10} TCID₅₀/ml θρεπτικού υποστρώματος). Πάντως συνεχίζονται οι έρευνες για την ανεύρεση μια σειράς κατάλληλης για τον πολλαπλασιασμό όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού στελεχών Betapoda-ιών η οποία δεν θα είναι μολυσμένη με ρετροϊό.

Εκτός των παραπάνω κυτταρικών σειρών υπάρχουν και άλλες, οι οποίες όμως επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό μικρού αριθμού Betapoda-ιών (1-6 είδη ιών). Ειδικότερα, η κυτταρική σειρά GF, που έχει παρασκευαστεί από ιστό πτερυγίου του orange spotted grouper, είναι ευαίσθητη σε μόλυνση μόνο με τον αντίστοιχο ιό GNNV (Chi και συν., 1999). Μια άλλη κυτταρική σειρά που προέρχεται από ιστό εγκεφάλου του yellow grouper, η GB, είναι ευαίσθητη στη μόλυνση μόνο από τον ιό YGNNV (Lai και συν., 2001). Η σειρά SF δημιουργήθηκε από ιστούς λαρβών ασιατικού λαβρακιού και είναι ευαίσθητη σε έξι διαφορετικά είδη ιών, μεταξύ των οποίων και στον ιό GNV (Chang και συν., 2001). Τέλος, υπάρχουν οι κυτταρικές σειρές TV-1 και η TF που προέρχονται από το ουραίο πτερύγιο του ψαριού turbot. Η πρώτη αποτελείται από ινοβλάστες, ενώ η δεύτερη από επιθηλιακά κύτταρα. Μελέτες που αφορούν στην

ευαισθησία τους στη μόλυνση από στέλεχος που ανήκει στο είδος RGNNV κατέδειξαν ότι μόνο η TF ήταν ευαίσθητη (Aranguren και συν., 2002).

Ανεύρεση των ιικών σωματιδίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Τα κύτταρα που περιέχουν ιικά σωματίδια συνήθως είναι οι νευρώνες, τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα και η μικρογλοία (Yoshikoshi και Inoue 1990, Bloch και συν. 1991, Grotmol και συν. 1997). Οι Grotmol και συνεργάτες (1997) έχουν επίσης παρατηρήσει ιικά σωματίδια στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα βραγχιακά στηρικτικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα που είναι προσκολλημένα στο ενδοκάρδιο, στα καρδιακά μυοκύτταρα και σε κύτταρα του επικαρδίου στο atlantic halibut.

Η μέθοδος αυτή είναι πολύ αξιόπιστη, όμως για την εφαρμογή της απαιτείται κατάλληλος εξοπλισμός και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό. Γι' αυτό χρησιμοποιείται σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

3.6.2.2. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης ιού

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του ιού περιλαμβάνουν (α) την RT-PCR, (β) την ένθετη RT-PCR και (γ) την real-time PCR.

RT-PCR

Τα περισσότερα στελέχη των Betanoda-ιών μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο της RT-PCR, με τη χρήση ενός ζεύγους εκκινητών που σχεδιάστηκε για να ενισχύει την T4 μεταβλητή περιοχή (427 bp) του RNA2 γενωμικού τμήματος του ιού SJNNV (Nishizawa και συν., 1994, Nishizawa και συν., 1997). Αυτό το ζεύγος εκκινητών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση σχεδόν όλων των γενοτύπων του ιού, με εξαίρεση την ανίχνευση του ιού DIEV που προσβάλλει το λαβράκι του Ατλαντικού. Για τον ιό αυτό χρησιμοποιείται άλλο ζεύγος εκκινητών (Thierry και συν., 1999).

Ένθετη RT-PCR

Η ένθετη RT-PCR εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1999 από τους Thiery και συνεργάτες για την ανίχνευση των Betanoda-ιών. Η μέθοδος αυτή είναι 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από την κλασική RT-PCR και ικανή να εντοπίσει μια υποκλινική λοίμωξη ή και ασυμπτωματικούς φορείς της νόσου, με χρήση, ως παθολογικού υλικού, αίματος, σπέρματος, ωοθηκικού ή νευρικού ιστού (Dalla Valle και συν., 2000).

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της RT-PCR και της ένθετης RT-PCR, σε συνδυασμό ή όχι με προηγούμενη ανάπτυξη του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, έχουν αποδειχτεί σημαντικά εργαλεία για τη διάγνωση των Betanoda-ιών (Nishizawa και συν., 1994· Dalla Valle και συν., 2000· Iwamoto και συν., 2001). Τα πρωτόκολλα αυτά έχουν βελτιώσει κατά πολύ την ευαισθησία της PCR και έχουν οδηγήσει σε καλύτερο έλεγχο της νόσου, μέσω της ανεύρεσης και εκκρίωσης του ιού από τους προσβεβλημένους γεννήτορες. Παρόλα αυτά, παραμένουν ακόμα αρκετά χρονοβόρες και επιρρεπείς σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα, λόγω της πιθανής επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων στα στάδια μετά την ενίσχυση του DNA, όπως κατά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και τη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (Dalla Valle και συν., 2005). Επίσης, εφόσον η ένθετη RT-PCR είναι μία μη ποσοτική μέθοδος, ο ακριβής αριθμός των αντιγράφων του ιού στα δείγματα δεν μπορεί να καθοριστεί. Η παράμετρος όμως αυτή είναι μεγάλης σημασίας για τον έλεγχο της νόσου και μέχρι τώρα επιτυγχανόταν με δύσκολες και χρονοβόρες μεθόδους, κάτι που κατέδειξε την αναγκαιότητα της ανάπτυξης μιας γρήγορης και ευαίσθητης βιομοριακής μεθόδου, η οποία θα μπορεί να ποσοτικοποιεί τον ιό στα δείγματα των ιστών. Η μέθοδος αυτή είναι η real-time PCR.

Real-time PCR

Το 2005 οι Dalla Valle και συνεργάτες, περιγράφουν την ανάπτυξη της real-time PCR που αποσκοπούσε στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των

γενωμικών τμημάτων RNA1 και RNA2 των Betanoda-ιών σε βιολογικά δείγματα, με χρήση της χρωστικής SYBR Green I. Στην ίδια εργασία, γίνεται και σύγκριση της ευαισθησίας της μεθόδου με τη συμβατική RT-PCR, που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της νόσου. Η τεχνική τέθηκε τελικά σε ισχύ για την ποσοτικοποίηση του ιικού RNA από εγκεφάλους ψαριών που είχαν μολυνθεί πειραματικά με τον ιό.

Παρόλο που η χρωστική SYBR Green I μπορεί να προσκολληθεί σε οποιαδήποτε διπλή έλικα DNA, συμπεριλαμβανομένων των διμερών εκκινητών και των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης, η ειδικότητα του προϊόντος του πολλαπλασιασμού μπορεί να ελεγχθεί από τις καμπύλες τήξης. Έτσι, εκμηδενίζεται η ανάγκη ελέγχου του προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, μειώνεται ο χρόνος ανάλυσης και επιτρέπεται η ανάλυση πολλών δειγμάτων παράλληλα, σε ένα σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (Mackay και συν., 2002). Οι Dalla Valle και συνεργάτες (2005) έδειξαν ότι, σύμφωνα με την καμπύλη τήξης, τα διμερή των εκκινητών και τα ψευδώς θετικά προϊόντα δεν εμφανίζονται όταν στο δείγμα υπάρχει ο ιός. Σε απουσία του ιού παράγουν έναν χαμηλό φθορισμό ο οποίος όμως αναγνωρίζεται εύκολα με την καμπύλη τήξης, αφού έχει θερμοκρασία τήξης μικρότερη κατά 10°C (Dalla Valle και συν., 2005).

Η ευαισθησία της real-time PCR, ως προς την ικανότητα ανίχνευσης των τμημάτων RNA1 και RNA2, συγκρίθηκε και με εκείνες της RT-PCR και της μεθόδου απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες. Η real-time PCR μπορούσε να ανιχνεύσει το RNA δύο στελεχών του ιού, των 475/98 και 530/00, ακόμη και όταν η συγκέντρωση αυτών στο εναιώρημα ήταν πολύ μικρή, δηλαδή 10^{-7} και 10^{-5} , αντίστοιχα. Αντίθετα, τόσο η RT-PCR όσο και η απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες ανίχνευαν τα παραπάνω δύο στελέχη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (10^{-6} και 10^{-4} αντίστοιχα). Έτσι, η ευαισθησία της real-time PCR, συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες δύο μεθόδους, ήταν 10 φορές μεγαλύτερη (Dalla Valle και συν., 2005). Επίσης, οι Grove και συνεργάτες (2006) έδειξαν ότι η real-time PCR ήταν 4 φορές πιο ευαίσθητη από την RT-PCR. Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι, λόγω της μεγάλης

ευαισθησίας της, η real-time PCR είναι ικανή να εντοπίσει υποκλινικές λοιμώξεις, αλλά και να χρησιμεύσει στον εντοπισμό του ιού σε γεννήτορες, έτσι ώστε να προληφθεί η κάθετη μετάδοσή του.

Πρέπει να τονιστεί, όμως, ότι με τη real-time PCR είναι δυνατόν να εντοπιστεί και να ποσοτικοποιηθεί μόνο η παρουσία του γενώματος του ιού και δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η παθογόνος δράση του. Αυτό δείχνει ότι οι τεχνικές της PCR δεν θα αντικαταστήσουν ποτέ την απομόνωση του ιού μέσω της καλλιέργειάς του σε κύτταρα και ότι και οι δύο τεχνικές πρέπει να χρησιμοποιούνται η καθεμία για τα πλεονεκτήματά της.

3.6.2.3. Ανίχνευση αντισωμάτων

Για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά των Betanoda-ιών σε μολυσμένα ψάρια χρησιμοποιείται κυρίως η ELISA. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά από τους Arimoto και συνεργάτες (1992) και Mushiake και συνεργάτες (1992) για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ιού SJNNV που προσβάλλει το κοκάλι. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν ως αντιγόνο πλήρη ιικά σωματίδια, κάτι που καθιστά τη μέθοδο δύσκολη, ακριβή και χρονοβόρα. Συγκρίνοντας την RT-PCR με τη συγκεκριμένη ELISA, ως εργαλεία διάγνωσης του νοσήματος, οι Nishizawa και συνεργάτες (1994) απέδειξαν ότι η δεύτερη ήταν λιγότερο ευαίσθητη. Το 2001 οι Huang και συνεργάτες ανέπτυξαν μια ταχεία ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων στο πλάσμα του αίματος και τα εκκρίματα του σώματος των ψαριών. Στην ταχεία ELISA, αντί για πλήρη ιικά σωματίδια, χρησιμοποίησαν ανασυνδυασμένη καψιδική πρωτεΐνη (Sideris, 1997). Στην περίπτωση αυτή η μέθοδος της ELISA σε σύγκριση με την RT-PCR, ήταν πιο φθηνή και γρήγορη, ώστε να χρησιμοποιείται σε επίπεδο μονάδας, αλλά και πάλι λιγότερο ευαίσθητη (Huang και συν., 2001). Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι τα αντισώματα άρχισαν να ανιχνεύονται μετά την 6^η ημέρα από τη μόλυνση και μάλιστα όχι σε όλα τα ψάρια που νόσησαν. Άρα η ELISA δεν είναι ικανή να εντοπίσει τα αρχικά στάδια μόλυνσης.

Επειδή οι πληροφορίες που υπάρχουν για την ανοσολογική αντίδραση των ψαριών κατά των Noda-ιών είναι ανεπαρκείς, η ανίχνευση των αντισωμάτων που παράγονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης δεν χρησιμοποιείται ως μέθοδος ρουτίνας για τον έλεγχο των πληθυσμών των ψαριών (ΟΙΕ, 2003).

3.7. Πρόληψη

Η έλλειψη γνώσεων σχετικών με την επιδημιολογία και την παθογένεια των Noda-ιών δυσκολεύει τα μέτρα ελέγχου και οι απώλειες συνεχίζονται σε σταθερή βάση (Munday και συν., 2002). Το πρώτο βήμα στην αντιμετώπιση μιας μεταδιδόμενης ασθένειας είναι η ανίχνευση και η ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό να υπάρχουν αξιόπιστες διαγνωστικές μέθοδοι.

Οι οξείες λοιμώξεις είναι σχετικά εύκολο να διαγνωστούν, αφού τα κλινικά συμπτώματα είναι προφανή. Η ανίχνευση των ασυμπτωματικών όμως ψαριών, είναι πολύ πιο δύσκολη και για το λόγο αυτό είναι επιθυμητή η παρακολούθηση των ψαριών κατά τις κρίσιμες ηλικίες ανάπτυξης. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στα ψάρια νεαρής ηλικίας παρατηρείται υψηλός ρυθμός θνησιμότητας, ακόμα και σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει κάποιος παθολογικός παράγοντας. Παρότι, λοιπόν, η εμφάνιση των θνησιμοτήτων μπορεί να είναι φυσιολογική και αναμενόμενη, δεν πρέπει το γεγονός αυτό να μένει αδιερεύνητο, διότι μπορεί να υποκρύπτει την παρουσία της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας.

Τα συνήθη μέτρα πρόληψης αφορούν στην αποφυγή εισόδου της νόσου σε μια εκτροφή. Ο πιο απλός τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι ο ιολογικός έλεγχος των ψαριών που θα εισαχθούν στην εκτροφή συνήθως με RT-PCR. Τα μειονέκτημα της εν λόγω μεθόδου είναι ότι δεν έχει μεγάλη ευαισθησία και είναι πιθανόν πολλά θετικά ψάρια να μη διαγνωσθούν. Γι' αυτό είναι προτιμότερη η χρήση της ένθετης RT-PCR. Στα εκκολαπτήρια πρέπει να είναι υποχρεωτικός ο έλεγχος των γεννητόρων (του γεννητικού τους υλικού) για παρουσία ιού στις γονάδες και ειδικών

αντι-Nodavirus αντισωμάτων. Όσα ψάρια βρίσκονται μολυσμένα πρέπει να θανατώνονται (Munday και συν., 2002). Ως ένα πρόσθετο μέτρο ελέγχου στα εκκολαπτήρια μπορεί να εφαρμοστεί το πλύσιμο των αυγών σε θαλασσινό νερό με προσθήκη όζοντος σε τελική συγκέντρωση 0,2 μg/ml για το κοκάλι (Arimoto και συν., 1996) και 4μg/ml για το atlantic halibut (Grotmol και Totland, 2000). Πολύ σημαντικό μέτρο ελέγχου είναι και η μείωση των στρεσογόνων παραγόντων στα συστήματα ιχθυοκαλλιέργειών. Σε αυτό περιλαμβάνεται και η περιορισμένη ωτοκία των γεννητόρων, δηλαδή η χρήση κάθε γεννήτορα όχι περισσότερο από 7-10 φορές. Τέλος, καλά αποτελέσματα έχει δώσει και η μείωση της πυκνότητας των προνυμφών σε κάθε δεξαμενή (Munday και Nakai, 1997).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει προσπάθειες πρόληψης της νόσου μέσω εμβολιασμών. Ειδικότερα, οι Husgaro και συνεργάτες (2001) και Tanaka και συνεργάτες (2001) χρησιμοποίησαν εμβόλιο που περιείχε ανασυνδυασμένη καψιδική πρωτεΐνη του ιού, η οποία εκφράστηκε σε *Escherichia coli*. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επιβίωση των εμβολιασμένων ψαριών και παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων. Οι Lu και συνεργάτες (2003), χρησιμοποίησαν την ίδια πρωτεΐνη για την παραγωγή εμβολίου που περιείχε σωματίδια VLPs (virus-like particles). Τα σωματίδια αυτά έχουν μεγάλη ομοιότητα, από απόψεως δομής, με τα ιικά σωματίδια και θα μπορούσαν να ενεργοποιήσουν την παραγωγή αντισωμάτων στον οργανισμό των ψαριών, ενώ δεν προκαλούν μόλυνση αφού δεν περιέχουν συστατικά που σχετίζονται με τη λοιμογόνο δύναμη του ιού.

Οι Coeurdacier και συνεργάτες (2003) παρασκεύασαν 4 συνθετικά πεπτίδια, με βάση τους ανοσογόνους επίτοπους της καψιδικής πρωτεΐνης του Noda-ιού που προσβάλλει το λαβράκι, για να μελετήσουν την πιθανή παραγωγή αντισωμάτων μετά από την χορήγησή τους στο ψάρι αυτό. Διαπίστωσαν όμως ότι η παραγωγή αντισωμάτων ήταν πολύ μικρή σε σύγκριση με εκείνη που παρατηρείται μετά από χορήγηση του πλήρους ιού. Άρα τα πεπτίδια αυτά δεν είναι ικανά να προστατεύσουν τα ψάρια. Το 2002 οι Yuasa και συνεργάτες χρησιμοποίησαν ανασυνδυασμένη

καψιδική πρωτεΐνη στελεχών των γενότυπων RGNNV και SJNNV για να προκαλέσουν την παραγωγή αντισωμάτων. Η μελέτη έδειξε ότι είναι δυνατόν να παραχθούν αντισώματα και να μειωθούν με τον τρόπο αυτό οι θνησιμότητες, σε περίπτωση επικείμενης μόλυνσης των ψαριών. Τέλος οι Kai και Chi (2006) εμβάπτισαν προνύμφες του είδους *E. coioides* σε αδρανοποιημένο ιό και ως αποτέλεσμα είχαν την αύξηση της επιβίωσης των λαρβών.

Τα περισσότερα είδη ψαριών που προσβάλλονται από τον ιό Noda είναι πιο ευαίσθητα σε στάδια όπου δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Στην περίπτωση αυτή, όμως, η χορήγηση εμβολίου για την πρόληψη της νόσου δεν είναι αποτελεσματική. Επομένως η στρατηγική του εμβολιασμού θα μπορούσε να είναι χρήσιμη μόνο σε είδη ψαριών που μολύνονται σε μεγαλύτερη ηλικία ή και για να μειωθεί η πιθανότητα της μόλυνσης σε γεννήτορες πριν την ωοτοκία (Somerset και συν., 2005).

3.8. Μέθοδοι πειραματικής μόλυνσης ψαριών με Noda-ιούς

Πειραματικές μολύνσεις σε κοκάλι και στήρα μαλαμπάρ

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια έχει μελετηθεί σε πειραματικό στάδιο με τη χρήση διαφορετικών μοντέλων μόλυνσης. Οι Arimoto και συνεργάτες (1993) εμβάπτισαν προνύμφες κοκαλιού, red sea bream, yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel) και goldstriped amberjack (*Seriola lalandi*, Valenciennes) σε θαλασσινό νερό που περιείχε είτε ομογενοποιημένο ιστό από νοσούντα κοκάλια είτε καθαρό ιό του τύπου SJNNV. Σκοπός του πειράματος ήταν: (α) να επιβεβαιώσουν ότι η νόσος που είχε παρατηρηθεί στα κοκάλια, με τους ιστούς των οποίων μόλυναν τις προνύμφες, είχε προκληθεί από τον ιό Noda, (β) να επιβεβαιώσουν ότι ο ιός μεταδίδεται οριζόντια και (γ) να εξετάσουν την πιθανότητα μόλυνσης και άλλων θαλάσσιων ειδών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι: (α) ο αιτιολογικός παράγοντας της προηγούμενης μόλυνσης των κοκαλιών ήταν ο Noda-

ιός, (β) ο ιός μεταδίδεται οριζόντια και (γ) τα είδη που εξετάστηκαν, εκτός του κοκαλιού, δεν είναι ευαίσθητα στη μόλυνση από τον ιό που προσβάλλει το κοκάλι.

Οι Nguyen και συνεργάτες (1996), εμβάπτισαν προνύμφες κοκαλιού σε διάλυμα νερού που περιείχε ομογενοποιημένο μολυσμένο ιστό. Διαπίστωσαν ότι η κενотоπίωση του νευρικού συστήματος ξεκίνησε πρώτα από το νωτιαίο μυελό στο ύψος που βρίσκεται η νηκτική κύστη του ψαριού. Τα κενотоπία στη συνέχεια εμφανίστηκαν στον εγκέφαλο και τελικά στον αμφιβληστροειδή. Επίσης, παρατήρησαν υπερπλασία του επιθηλίου του δέρματος που σχετίζεται με την παρουσία ιικού αντιγόνου.

Οι Boonyaratpalin και συνεργάτες (1996), με σκοπό να καθορίσουν τον αιτιολογικό παράγοντα νόσου με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας που παρουσιαζόταν για μεγάλο διάστημα σε νεαρά στήρας μαλαμπάρ, ενοφθάμισαν, με την ενδοπεριτοναϊκή οδό, παθολογικό υλικό από νοσούντα ψάρια, σε ιχθύδια στήρας μαλαμπάρ. Βάσει των αποτελεσμάτων του ενοφθαλμισμού, οι συγγραφείς εντόπισαν την παρουσία ιικών σωματιδίων στους ιστούς των ψαριών και μελέτησαν την παθογένεια της νόσου στο είδος αυτό.

Πειραματικές μολύνσεις σε λαβράκι

Τέσσερις πειραματικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε λαβράκι μέχρι σήμερα. Η πρώτη μελέτη έγινε το 1997 από τους Thiery και συνεργάτες. Σε αυτήν μολύνθηκαν ενδομυϊκά ψάρια μεγέθους 3 γρ. και εμφάνισαν συνολική θνησιμότητα 28%. Τα ψάρια βρίσκονταν σε δεξαμενή με νερό αλατότητας 35‰. Στη δεύτερη πειραματική μελέτη τα ψάρια ήταν διαφορετικών ηλικιών και μολύνθηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους, δηλαδή ενδομυϊκά, ενδοπεριτοναϊκά και μέσω συμβίωσης υγιών ψαριών με ψάρια που είχαν μολυνθεί με τους δύο πρώτους τρόπους (Skliaris και Richards, 1999). Η τρίτη πειραματική μελέτη έγινε από τους Peducasse και συνεργάτες (1999) και τα ψάρια μολύνθηκαν με πέντε διαφορετικούς τρόπους. Σκοπός του δευτέρου και του τρίτου πειράματος ήταν: (α) να αποδειχθεί ότι υπάρχει

συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας των ψαριών και της έντασης της λοίμωξης και (β) να μελετηθεί η παθογένεια της νόσου βάσει των διαφορετικών μεθόδων μόλυνσης και βάσει των διαφορετικών θερμοκρασιών στις οποίες διατηρήθηκαν τα ψάρια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι: (α) όσο μικρότερης ηλικίας είναι τα ψάρια τόσο μεγαλύτερα είναι τα ποσοστά θνησιμότητας, (β) τα ποσοστά θνησιμότητας αυξάνονται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του νερού και (γ) η ενδομυϊκή μόλυνση προκαλεί οξεία λοίμωξη με μεγάλη θνησιμότητα, ενώ η ενδοπεριτοναϊκή και η από του στόματος μόλυνση, καθώς και η μόλυνση με εμβάπτιση και μέσω συμβίωσης προκαλεί υποξεία λοίμωξη (Peducasse και συν., 1999' Thierry και συν., 1997).

Η τέταρτη μελέτη έγινε από τους Breuil και συνεργάτες (2002) σε γεννήτορες λαβρακιού με σκοπό: (α) να αποδειχθεί πειραματικά η κάθετη μετάδοση του ιού στους απογόνους τους και (β) να διαπιστωθεί ποια από τις τρεις μεθόδους (ELISA, RT-PCR, ένθετη RT-PCR) που χρησιμοποίησαν για την ανίχνευση του Noda-ιού είναι η πιο ευαίσθητη. Οι γεννήτορες ενοφθαλμίστηκαν ενδομυϊκά με ζωντανό στέλεχος του ιού και κατά τον ιολογικό έλεγχο που ακολούθησε, αποδείχθηκε ότι τόσο αυτοί όσο και οι προνύμφες τους ήταν μολυσμένοι. Επίσης, αποδείχτηκε ότι η ένθετη RT-PCR είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος για τον εντοπισμό του ιού σε γεννήτορες, εφόσον ήταν πιο ευαίσθητη από την κλασική RT-PCR και την ELISA.

Πειραματικές μολύνσεις σε τσιπούρα

Στην τσιπούρα έχουν πραγματοποιηθεί δύο πειραματικές μελέτες μέχρι σήμερα και γενικά είναι ένα είδος στο οποίο η διερεύνηση της παθογένειας του ιού είναι ακόμη σε αρχικά στάδια. Οι Castric και συνεργάτες (2001) αναφέρουν ότι η τσιπούρα είναι ασυμπτωματικός φορέας της νόσου, αλλά το στέλεχος που απομονώθηκε από τις φαινομενικά υγιείς τσιπούρες που εξέτασαν ήταν πολύ παθογόνο για το λαβράκι. Οι Aranguren και συνεργάτες (2002) ενοφθάλμισαν ενδομυϊκά τσιπούρες μέσου βάρους 0,7, 2 και 4 γραμμαρίων με το στέλεχος 475-9/99, που είχε απομονωθεί από κλινικά νοσούν λαβράκι. Επίσης, ενοφθάλμισαν

ενδοπεριτοναϊκά με το ίδιο στέλεχος τσιπούρες 0,7 γρ. και τέλος μόλυναν τσιπούρες 0,7 γρ. με τη μέθοδο της εμφύσησης. Κλινικά συμπτώματα δεν παρατηρήθηκαν με καμία από τις τρεις μεθόδους, όμως με την ενδομυϊκή έγχυση παρατηρήθηκαν θνησιμότητες, οι οποίες μειώνονταν όσο αυξανόταν το μέγεθος των ενοφθαλμισμένων λαρβών τσιπούρας.

Πειραματικές μολύνσεις σε ψάρια στα οποία δεν έχει παρατηρηθεί φυσική μόλυνση

Η τιλάπια, *Oreochromis mossambicus* (Peters) είναι είδος που χρησιμοποιείται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες γλυκού και θαλασσινού νερού. Εντούτοις, η σχετική βιβλιογραφία που αφορά στις ιογενείς λοιμώξεις του είδους αυτού είναι περιορισμένη. Για το λόγο αυτό, και δεδομένου ότι η τιλάπια πολλές φορές εκτρέφεται δίπλα από κλωβούς με λαβράκια, οι Skliris και Richards (1999) μόλυναν ενδοπεριτοναϊκά τιλάπιες 5-8 γρ. Δεν παρατηρήθηκαν θνησιμότητες μέχρι το τέλος του πειραματισμού, που διάρκεσε 12 μέρες, όμως υπήρχαν ιστολογικά ευρήματα συμβατά με μόλυνση από Noda-ιό και θετική αντίδραση στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση. Τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν ισχυρή ένδειξη ότι η τιλάπια μπορεί να αποτελεί ασυμπτωματικό φορέα του ιού. Σε κάθε περίπτωση και για οποιοδήποτε συμπέρασμα απαιτείται περαιτέρω μελέτη.

3.9. Η εμφάνιση της νόσου στην Ελλάδα

Η νόσος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα στις αρχές του Ιουλίου του 1995 και διάρκεσε μέχρι το τέλος Οκτωβρίου του ίδιου έτους. Συγκεκριμένα, σε τρεις περιοχές της χώρας (A1, A2, A3) παρουσιάστηκαν θνησιμότητες, με παρόμοια συμπτώματα σε αρκετές μονάδες με λαβράκια που εκτρέφονταν σε κλωβούς στη θάλασσα. Δείγματα συνελέγησαν από μια μονάδα της περιοχής A1 και από δύο μονάδες της περιοχής A2. Στη μονάδα της περιοχής A1, η νόσος εμφανίστηκε σε

ψάρια μέσου βάρους 10-30 γρ. και 350-450 γρ. Στην περιοχή A2, στη μία μονάδα τα ψάρια είχαν μέσο βάρος 400-580 γρ. και στην άλλη 10-45 γρ (Le Breton και συν., 1997).

Στην A1 περιοχή, στα ψάρια που είχαν μέσο βάρος 10-30 γρ., οι θάνατοι ξεκίνησαν την πρώτη εβδομάδα του Ιουλίου. Στα ψάρια μέσου βάρους 350-450 γρ., οι θάνατοι ξεκίνησαν δύο εβδομάδες μετά. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 27 °C όταν εμφανίστηκε η νόσος και χρειάστηκε να μειωθεί στους 23 °C δύο μήνες μετά, για να σταματήσουν οι θνησιμότητες. Στην A2 περιοχή, οι θνησιμότητες ξεκίνησαν το Σεπτέμβριο, όταν η θερμοκρασία του νερού ήταν 25°C. Η συνολική θνησιμότητα στην περιοχή A1 ήταν 60% για τα ψάρια μέσου βάρους 10-30 γρ., ενώ δεν καταγράφηκε η συνολική θνησιμότητα για τα ψάρια μέσου βάρους 350-450 γρ. Στην περιοχή A2, η συνολική θνησιμότητα ήταν 15% για τα ψάρια μέσου βάρους 10-45 γρ. και 11% για τα ψάρια μέσου βάρους 400-580 γρ. (Le Breton και συν., 1997).

Και στις δύο περιοχές τα πρώτα συμπτώματα ήταν μείωση της κατανάλωσης τροφής, ληθαργική συμπεριφορά και ανώμαλη κολύμβηση. Τα ψάρια γύριζαν γύρω από ένα νοητό κάθετο άξονα (στροβιλισμός) και κολυμπούσαν τότε στην επιφάνεια του νερού και τότε στον πάτο της δεξαμενής. Τα θνησιγενή ψάρια συγκεντρώνονταν στην επιφάνεια του νερού, με την κοιλιακή χώρα προς τα πάνω και μια ελαφριά κλίση του κορμού. Σε περίπτωση που ενοχλούνταν, τα θνησιγενή ψάρια εμφάνιζαν υπερδιέγερση. Επίσης κάποια ψάρια έμεναν ακίνητα στον πάτο της δεξαμενής, με την κοιλιακή χώρα προς τα πάνω. Αργότερα τα ψάρια εμφάνιζαν σκούρο χρωματισμό, θολερότητα του κερατοειδούς και σε κάποιες περιπτώσεις και αμφοτερόπλευρη εξοφθαλμία. Στα ψάρια μεγαλύτερου μεγέθους, τα περισσότερα συμπτώματα ήταν παρόμοια με εκείνα των λαρβών και των μικρών ψαριών, υπήρχε όμως μια τάση να εμφανίζουν κυρίως συμπτώματα που σχετίζονταν με τους οφθαλμούς. Επίσης τα ψάρια μεγαλύτερου μέσου βάρους εμφάνιζαν σε εντονότερο βαθμό νέκρωση του δέρματος της άνω γνάθου και άλλων περιοχών της κεφαλής, ειδικά στις περιπτώσεις που η νόσος εμφανίστηκε σε ψάρια που ζούσαν σε νερό

χαμηλότερης θερμοκρασίας. Όταν η θερμοκρασία του νερού ήταν υψηλότερη, τα νευρικά συμπτώματα επικρατούσαν των υπολοίπων. Πάντως στην περίπτωση της A1 περιοχής, όπου η θερμοκρασία του νερού ήταν υψηλότερη, η νόσος ήταν πιο οξείας μορφής και, όπως επισημάνθηκε παραπάνω, η θνησιμότητα μεγαλύτερη (Le Breton και συν., 1997).

Στα ψάρια των μονάδων αυτών, αφού έγιναν εξετάσεις για να αποκλειστεί η ύπαρξη βακτηριακών και παρασιτικών παθογόνων παραγόντων, έγιναν και εξετάσεις για να εντοπιστεί ο ιός Noda, που θεωρήθηκε ως αίτιο της νόσου βάσει της κλινικής εικόνας. Η νόσος διαγνώστηκε ιστολογικά σε τομές που βάφτηκαν με δύο διαφορετικές χρώσεις. Με τη χρώση Pollak, διαπιστώθηκε η ύπαρξη των χαρακτηριστικών κενотоπίων στον εγκέφαλο και τους οφθαλμούς των ψαριών, ενώ με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, που εφαρμόστηκε στους ίδιους ιστούς των ψαριών, παρατηρήθηκε θετική αντίδραση.

Το επόμενο κρούσμα της νόσου παρατηρήθηκε το καλοκαίρι του 2000 από τους Athanassorouli και συνεργάτες στην περιοχή της Ηπείρου, σε ψάρια που εκτρέφονταν σε γλυκό νερό. Η συγκεκριμένη μονάδα ήταν μικτής εκτροφής διαφόρων ειδών ψαριών, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονταν λαβράκια και οξύρυγχοι (*Acipenser gueldenstaedi* L.). Τα λαβράκια ήταν μέσου βάρους 50-80 γρ., παρουσίασαν συμπτώματα όταν η θερμοκρασία του νερού έφτασε τους 25-28 °C και εκτρέφονταν με δύο διαφορετικά συστήματα κυκλοφορίας νερού. Το πρώτο σύστημα ήταν κλειστό, δηλαδή το νερό ήταν ανακυκλούμενο, και σε αυτή την περίπτωση η θνησιμότητα έφτασε το 30% του συνολικού πληθυσμού. Τα συμπτώματα ήταν τα χαρακτηριστικά της νόσου, όπως έχουν περιγραφεί στο κεφάλαιο 2.3. Το δεύτερο σύστημα ήταν ανοιχτό, δηλαδή το νερό ήταν τρεχούμενο. Στην περίπτωση αυτή, η συνολική θνησιμότητα ήταν μικρότερη του 5% και τα ψάρια δεν είχαν εμφανή συμπτώματα. Η διάγνωση της νόσου έγινε με βάση τα συμπτώματα, την ανάλυση των παθολογικών δειγμάτων με τη μέθοδο της RT-PCR και την παρατήρηση των

κενοτοπίων στον οφθαλμό και τον εγκέφαλο των νοσούντων ψαριών σε οπτικό μικροσκόπιο (Athanasopoulou και συν., 2003).

Οι ίδιοι συγγραφείς (2004) ανίχνευσαν τον ιό και σε νοσούντες οξύρυγχους της ανωτέρω μονάδας μικτής εκτροφής. Οι οξύρυγχοι είχαν μέσο βάρος >500 γρ., εμφάνιζαν ανορεξία, βρίσκονταν να επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού ακίνητοι με την κοιλιά προς τα πάνω και παρουσίαζαν υπερδιέγερση σε έντονο ερέθισμα. Ο πληθυσμός ήταν προσβεβλημένος σε ποσοστό 20%. Εξετάστηκαν οι ιστοί των οξύρυγχων με τη μέθοδο της RT-PCR και ανιχνεύτηκε ένα προϊόν μήκους 426 bp. Επίσης, έγιναν ιστολογικές τομές σε οφθαλμούς και εγκέφαλο και τα χαρακτηριστικά κενोटόπια διαπιστώθηκαν στον εγκέφαλο των οξύρυγχων, όχι όμως και στους οφθαλμούς.

Το 2007 οι Bitchava και συνεργάτες ανέφεραν την πρώτη ανίχνευση του ιού σε τσιπούρες με νευρικά συμπτώματα, από μικτή εκτροφή τσιπούρας-λαβρακιού στην περιοχή του ανατολικού Αιγαίου. Τα ψάρια είχαν μέσο βάρος 50-80 γρ. και εκτρέφονταν σε κλωβούς δίπλα σε λαβράκια, τα οποία είχαν εμφανίσει τη νόσο ένα χρόνο πριν. Τα νευρικά συμπτώματα ξεκίνησαν στα τέλη του Αυγούστου, όταν η θερμοκρασία του νερού είχε φτάσει τους 28 °C και διήρκεσαν περίπου δύο μήνες. Η συνολική θνησιμότητα, στο διάστημα αυτό, ήταν 19%. Η διάγνωση βασίστηκε στην απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες (SSN-1), στην εξέταση ιστολογικών τομών και στην ανίχνευση του ιού με κλασική RT-PCR και ένθετη RT-PCR. Ως παθολογικά υλικά για τη διάγνωση χρησιμοποιήθηκαν οι οφθαλμοί, ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός ασθενών τσιπούρων. Κατά την παρατήρηση των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε η παρουσία κενोटπίων στους οφθαλμούς, τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό των ψαριών. Όταν τα δείγματα ελέγχθηκαν με την RT-PCR ήταν αρνητικά, όμως με την ένθετη PCR ανιχνεύτηκε ένα προϊόν 255 bp τόσο στους εγκεφάλους των ψαριών, όσο και στο υπερκείμενο υγρό των κυτταροκαλλιεργειών, οι οποίες είχαν εμφανίσει κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα.

Τέλος, οι Bitchava και συνεργάτες (εργασία προς δημοσίευση) διενέργησαν επιδημιολογική έρευνα σε λαβράκια από μονάδες της Ηπείρου, με σκοπό να εντοπίσουν το ποσοστό των ψαριών που ήταν μολυσμένα από τον ιό. Η κλινική εικόνα των ψαριών αυτών κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, ήταν φυσιολογική. Τα δείγματα ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της real time PCR. Τα ψάρια βρέθηκαν μολυσμένα με τον ιό σε ποσοστό περίπου 80%. Οι τίτλοι του ιού στα δείγματα κυμαίνονταν από 10^3 μέχρι $10^{4.5}$.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΚΗΣ ΜΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σκοπός της έρευνάς μας ήταν να μελετηθεί η παθογένεια, η ευπάθεια και η παθολογία του ιού Noda σε ευρύαλα είδη ψαριών που εκτρέφονταν σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν δύο πειραματισμοί, οι οποίοι πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το πρώτο πείραμα ξεκίνησε το Μάιο του 2006. Στόχος του πειράματος ήταν ο έλεγχος της ευαισθησίας των ψαριών στη μόλυνση από Noda-ιό, σε συνάρτηση με την αλατότητα (0‰, 18‰, 30‰, 33‰) του νερού που διαβιούσαν. Ως πειραματόζωα επιλέχθηκαν το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), το οποίο θεωρείται ως το πιο ευαίσθητο είδος ψαριού στη Μεσόγειο, και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) που θεωρείται ασυμπτωματικός φορέας του ιού. Τα ψάρια ενοφθαλμίστηκαν ενδομυϊκά με διαφορετικές δόσεις του Noda-ιού (30 μl και 50 μl) και μελετήθηκαν οι διαφορές που αφορούσαν στην εκδήλωση της νόσου από πλευράς παθογένειας, συμπτωμάτων, παθολογοανατομικών αλλοιώσεων και θνησιμότητας.

Το δεύτερο πείραμα ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2007, με στόχο να διαπιστωθεί αν οι τσιπούρες, οι οποίες κατά το πρώτο πείραμα δεν εμφάνισαν κλινικά συμπτώματα (ασυμπτωματικοί φορείς), ήταν δυνατόν να μεταδώσουν τη νόσο σε λαβράκια μετά από χορήγηση σε αυτά οφθαλμών μολυσμένων τσιπούρων. Οι οφθαλμοί επιλέχθηκαν διότι οι ιχθυοκαλλιεργητές μικτών μονάδων λαβρακιού-τσιπούρας έχουν παρατηρήσει ότι τα λαβράκια κανιβαλίζουν και τρώνε νεκρά ψάρια, ξεκινώντας πρώτα από τους οφθαλμούς.

Και στους δύο πειραματισμούς ως μοριακή μέθοδος ανίχνευσης του Noda-ιού χρησιμοποιήθηκε η real-time PCR.

I. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. Πειραματικές εγκαταστάσεις

Τα ενυδρεία στα οποία έγιναν οι πειραματισμοί ήταν γυάλινα, χωρητικότητας 180 λίτρων. Η κυκλοφορία του νερού γινόταν μέσω ατομικού, κλειστού κυκλώματος, έτσι ώστε να αποφευχθεί η εξάπλωση της μόλυνσης μέσω του νερού και επιπλέον να ελεγχθεί πλήρως η περιεκτικότητά του σε άλατα. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ύδρευσης, αποχλωριωμένο και για την επίτευξη τεχνητής αλατότητας προστέθηκαν άλατα εμπορίου. Η θερμοκρασία του διατηρούνταν σταθερή στα επιθυμητά επίπεδα με τη βοήθεια θερμοαντιστάσεων. Η οξυγόνωσή του γινόταν με αεραντλίες, ατομικές για κάθε ενυδρείο.

Αρχικά τα ενυδρεία παρέμειναν για πέντε μήνες γεμάτα με νερό αλατότητας 22‰, χωρίς την παρουσία ψαριών, ώστε να επιτευχθεί η ισορροπία στο βιολογικό φίλτρο με την παραγωγή των μικροοργανισμών *Nitrosomonas* sp. και *Nitrobacter* sp. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι απαραίτητοι για την αποτελεσματική λειτουργία του κλειστού κυκλώματος κυκλοφορίας του νερού στα ενυδρεία, μετά την προσθήκη των ψαριών. Σε όλο το διάστημα αυτό γίνονταν προσθήκη αμμωνίας σε τακτά χρονικά διαστήματα και καθημερινές δειγματοληψίες νερού, για να διαπιστωθεί η ικανότητα διάσπασης της αμμωνίας από τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, τα τζάμια των ενυδρείων καλύφθηκαν με μαύρο υλικό για να μειωθεί το stress των ψαριών, όταν θα μεταφέρονταν σε αυτά.



Εικόνα 2. Πειραματικές εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Ιχθυολογίας - Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το επόμενο στάδιο ήταν η μεταφορά στις 19-4-2006 της απαραίτητης ποσότητας ψαριών στις πειραματικές δεξαμενές από έναν ιχθυογεννητικό σταθμό της περιοχής της Χαλκίδας. Η αλατότητα του νερού στον ιχθυογεννητικό σταθμό ήταν 22‰ και η ίδια αλατότητα υπήρχε σε όλες τις πειραματικές δεξαμενές. Επιπρόσθετα, η θερμοκρασία του νερού στις εγκαταστάσεις του ιχθυογεννητικού σταθμού ήταν 22°C και στην ίδια θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε και το νερό στις εγκαταστάσεις των πειραματισμών. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος γίνονταν καθημερινά δειγματοληψίες νερού από τις δεξαμενές και μέτρηση της θερμοκρασίας, του pH, της αλατότητας, της αμμωνίας και του οξυγόνου.

1.2. Πειραματικός πληθυσμός

Ως πειραματικό υλικό στα δύο πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 960 λαβράκια μέσου βάρους 1,7 γρ. και 390 τσιπούρες μέσου βάρους 1,5 γρ. (Εικόνα 3). Τα ψάρια, όπως προαναφέρθηκε, ήταν εγκλιματισμένα σε νερό ενδιάμεσης αλατότητας (22‰) και θερμοκρασίας 22°C. Οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν και στις πειραματικές δεξαμενές για διάστημα 7 ημερών, ώστε να αποφευχθεί το στρεσάρισμα των

πειραματόζων λόγω της αλλαγής περιβάλλοντος. Επιπλέον, τα ψάρια έμειναν χωρίς τροφή για μία ημέρα, μετά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο.

Στη συνέχεια, τους χορηγούνταν δύο φορές την ημέρα τροφή εμπορίου κατάλληλης περιεκτικότητας σε διατροφικά στοιχεία για κάθε είδος ψαριού. Με βάση το στάδιο ανάπτυξης των ψαριών, το ποσοστό της τροφής που τους χορηγούνταν καθημερινά, σε σχέση με τη βιομάζα τους, ήταν 3%.



Εικόνα 3. Πειραματικό ενυδρείο που περιέχει τσιπούρες.

1.3. Υλικά για τη μόλυνση των ψαριών-πειραματόζων

A. Πρώτο πείραμα

Για τον ενοφθαλισμό των λαβρακιών και των τσιπούρων του πρώτου πειράματος χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος του Noda-ιού που ανήκε στο γενότυπο RGNNV και προήλθε από το εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του Υπουργείου Γεωργίας. Είχε απομονωθεί από προηγούμενη εκδήλωση της νόσου σε μονάδα λαβρακιών και ο τίτλος του ήταν 10^7 TCID₅₀/ml.

B. Δεύτερο πείραμα

Για τη μόλυνση των λαβρακιών του δεύτερου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν οι οφθαλμοί από μολυσμένες (ασυμπτωματικά) τσιπούρες του πρώτου πειράματος.

1.4. Παθολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για ιχθυοπαθολογικό έλεγχο των ψαριών

A. Παθολογικά υλικά από τα ψάρια του ιχθυογεννητικού σταθμού

Ως παθολογικά υλικά για τον ιχθυοπαθολογικό έλεγχο των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού (αρχικός πληθυσμός ψαριών) χρησιμοποιήθηκαν ο εγκέφαλος και οι οφθαλμοί, για μοριακές εξετάσεις (ανίχνευση του Noda-ιού) και ολόκληρα ψάρια για μικροβιολογικό και παρασιτολογικό έλεγχο, με τις κατάλληλες για κάθε παθογόνο μεθόδους.

B. Παθολογικά υλικά από τα ψάρια του πρώτου πειράματος

Από τα ενυδρεία με τους μάρτυρες και από τα ενυδρεία με τα μολυσμένα ψάρια συλλέγονταν από θνησιγενή και ζωντανά ψάρια παθολογικά υλικά για ιστολογική εξέταση, απομόνωση και μοριακή ανίχνευση του ιού. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για ιστολογική εξέταση ήταν τα κεφάλια των ψαριών σε επιμήκεις τομές και το υπόλοιπο σώμα τους σε εγκάρσιες τομές. Για την απομόνωση του ιού με ενοφθαλμισμό κυτταροκαλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκαν οι εγκέφαλοι των ψαριών, ενώ για την ανίχνευση αυτού με μοριακή μέθοδο ως παθολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε ο ένας οφθαλμός.

Γ. Παθολογικά υλικά από τα ψάρια του δευτέρου πειράματος

Στο πείραμα αυτό, για τις ιστολογικές εξετάσεις, την απομόνωση και τη μοριακή ανίχνευση του ιού χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια όπως στο πρώτο πείραμα παθολογικά υλικά.

1.5. Κύτταρα και θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση του Noda-ιού

Για την απομόνωση του ιού από τα παθολογικά δείγματα που προέρχονταν από τα ψάρια και των δύο πειραματισμών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά SSN-1, η οποία προέρχεται από το ψάρι Striped Snakehead (*Channa striatus*) (Frerichs

και συν., 1996* Iwamoto και συν., 1999). Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα MEM (Modified Eagles Medium, M2414), στο οποίο προστίθενταν 10% (v/v) ορός εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum, FCS), 100 IU/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης, 5 µg/ml amphotericin B και 1% (v/v) L-γλουταμίνη (L-Glutamine). Όλα τα προϊόντα ήταν της εταιρείας Sigma (UK).

Για τη συντήρηση των ήδη ανεπτυγμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το προαναφερθέν υπόστρωμα στο οποίο όμως προστίθενταν μόνο 2% FCS. Το ίδιο υπόστρωμα χρησίμευσε και ως υγρό κατεργασίας των παθολογικών υλικών, αλλά στην περίπτωση αυτή ενισχυόταν με 1/10 διαλύματος αντιβιοτικών (100 IU/ml πενικιλίνης και 100 µg/ml στρεπτομυκίνης) και επιπλέον δεν περιείχε FCS.

1.6. Υλικά για την εκχύλιση του ιικού RNA από δείγματα ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού και ψαριών πρώτου και δευτέρου πειράματος

Τόσο κατά τον αρχικό έλεγχο των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού για τυχόν προσβολή τους από τον Noda-ιό, όσο και κατά τον έλεγχο των ψαριών του πρώτου και δευτέρου πειράματος, ως υλικό για την εκχύλιση του ιικού RNA χρησιμοποιήθηκε ο ένας οφθαλμός. Η εκχύλιση και στις δύο περιπτώσεις επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήρια τα ακόλουθα: TRIZOL LS (Invitrogen, USA), χλωροφόρμιο (J.T. Baker, Netherlands), διάλυμα ισοπροπανόλης (2-προπανόλη, Scharlau Chemie SA, Spain), παγωμένη αιθανόλη 70% (Haniwell, Riedel-de Haën, Germany) και 50 µl H₂O κατεργασμένο με DEPC (Sigma, Germany).

Το διάλυμα Trizol LS αποτελούνταν από φαινόλη σε κορεσμένο διάλυμα 38% (Haniwell, Riedel-de Haën, Germany), θειοκυανική γουανιδίνη 0,8 M (Sigma, Germany), θειοκυανικό αμμώνιο 0,4 M (Riedel-de Haen, Germany), οξικό νάτριο 0,1 M pH 5 (Sigma, Germany), γλυκερόλη (Scharlau Chemie S.A., Spain) και νερό.

Το διάλυμα αιθανόλης 70% παρασκευαζόταν με την προσθήκη 30 ml δις-απεσταγμένου νερού σε 70 ml απόλυτης αιθανόλης.

1.7. Φωτομέτρηση εκχυλισμένων δειγμάτων

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων, για να καθοριστεί η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων, πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Hitachi U-1900 Spectrophotometer (Japan).

1.8. Εκκινητές για την εφαρμογή της κλασικής PCR σε παθολογικά υλικά από ψάρια του ιχθυογεννητικού σταθμού

Ως εκκινητές για την ανίχνευση του Noda-ιού χρησιμοποιήθηκαν οι R3 (5'-CGA-GTC-AAC-ACG-GGT-GAA-GA-3') και F2 (5'-CGT-GTC-AGT-CAT-GTG-TCG-CT-3'). Οι εκκινητές αυτοί, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, πολλαπλασιάζουν μία περιοχή 427 βάσεων (νουκλεοτίδια 604-1030) του γονιδίου της καψιδικής πρωτεΐνης του ιού SJNNV, αλλά και όλων των γενότυπων, η οποία περιέχει και τη μεταβλητή T4 περιοχή (Nishizawa και συν., 1997). Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Invitrogen (UK).

1.9 Εκκινητές για την εφαρμογή της real-time PCR σε παθολογικά υλικά από ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR αναφέρονταν στη βιβλιογραφία (Dalla Valle και συν., 2005) και ήταν ειδικοί στο να πολλαπλασιάζουν εξελικτικά συντηρημένες γονιδιακές περιοχές διαφόρων στελεχών του ιού. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν και δύο επιπλέον εκκινητές που ανίχνευαν το γονίδιο 18S rRNA του λαβρακιού, έτσι ώστε να ελέγχεται η ποιότητα και η ποσότητα του RNA των παθολογικών δειγμάτων. Η σύνθεση των εκκινητών έγινε από την εταιρεία Invitrogen (UK). Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών και η περιοχή του γενώματος που πολλαπλασιάζουν.

Πίνακας 5. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη real-time PCR για την ανίχνευση του Noda-ιού και του γονιδίου 18S rRNA του λαβρακιού.

Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Ανοδικός / καθοδικός	Θέση των νουκλεοτιδίων (5' → 3')	Αριθμός καταχώρησης στο NCBI
Q-RdRP-1	5'- GTGTCCGGAGAGG TTAAGGATG-3'	Ανοδικός	589 - 610	AF319555
Q-RdRP-2	5'- CTTGAATTGATCAA CGGTGAACA-3'	Καθοδικός	861 - 839	AF319555
Q-18S1	5'- TCGAATGTCTGCC CTATCAACT-3'	Ανοδικός	317 - 338	AF308735
Q-18S2	5'- AGACTTGCCCTCC AATGGATC-3'	Καθοδικός	580 - 560	AF308735

1.10. Ιός αναφοράς για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης στη real-time PCR

Ο ιός αναφοράς προήλθε από το Ευρωπαϊκό Εργαστήριο αναφοράς για τον Noda-ιό (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Lab. Ittiiovirologia, Legnaro, Italy). Ήταν το στέλεχος 378/V03 (ευγενική χορηγία του Dr. Bovo) με τίτλο $10^{8.5}$ TCID₅₀/ml.

1.11. Υλικά για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση των προϊόντων της κλασικής PCR και της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η παρασκευή της πηκτής έγινε με τη χρήση υψηλής καθαρότητας αγαρόζης (Ultra Pure Agarose, Gibco BRL, Scotland), με τελική συγκέντρωση 1,8% σε διάλυμα 1XTAE (40 mM Tris, 20 mM Acetic acid και 1 mM EDTA, pH 8,3) Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1XTAE (Invitrogen, UK).

Το βρωμιούχο αιθίδιο που προστίθενταν στη ρευστή αγαρόζη χρησιμοποιούνταν ως διάλυμα 1% και παρασκευαζόταν με την προσθήκη 1 gr βρωμιούχου αιθιδίου σε 100 ml δις-απεσταγμένο H₂O. Το διάλυμα διατηρείτο σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4°C.

1.12. Υλικά για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της real-time PCR (Sequencing)

Για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της real-time PCR χρησιμοποιήθηκε το kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, USA). Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε στην εταιρεία Larko (UK) με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή (DNA Analyzer ABI Prism 3730XL). Τα ακατέργαστα δεδομένα αναλύονταν με το λογισμικό γενετικής ανάλυσης Applied Biosystems Sequencing Analysis Software v5.3.1. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των προϊόντων προσδιορίστηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Q-RdRP-1 και Q-RdRP-2.

Τα δείγματα από τα οποία προήλθε το DNA, του οποίου η αλληλουχία προσδιορίστηκε, ήταν τέσσερα. Το πρώτο δείγμα προήλθε από τον ιό με τον οποίο ενοφθαλμίστηκαν τα ψάρια του πρώτου πειράματος. Το δεύτερο από τον οφθαλμό λαβρακιού του πρώτου πειράματος, το τρίτο από τσιπούρα του πρώτου πειράματος και το τέταρτο από λαβράκι του δευτέρου πειράματος το οποίο τράφηκε με οφθαλμό τσιπούρας.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ιχθυοπαθολογικός έλεγχος των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού

Από τον ιχθυογεννητικό σταθμό συνελέγησαν τυχαία 30 ψάρια. Στη συνέχεια, με τα δείγματα που αναφέρονται στο κεφάλαιο 1.4., διενεργήθηκαν παρασιτολογικές, βακτηριολογικές και ιολογικές εξετάσεις για να αποκλειστεί η ύπαρξη οποιουδήποτε παθογόνου παράγοντα, συμπεριλαμβανομένου και του Noda-ιού (Athanassoroulou, 1990), παρότι σύμφωνα με το ιστορικό του σταθμού δεν υπήρξε ποτέ περιστατικό λοίμωξης από τον ιό αυτό. Η ανίχνευση του Noda-ιού στην περίπτωση αυτή έγινε με τη μέθοδο της κλασικής PCR (κεφάλαια 2.13 και 2.14).

+

2.2. Ρύθμιση αλατότητας και θερμοκρασίας στα πειραματικά ενυδρεία

A. Πειραματικά ενυδρεία πρώτου πειράματος

Μία εβδομάδα μετά τη μεταφορά τους στις πειραματικές δεξαμενές (26-4-2006), τα λαβράκια μοιράστηκαν σε έξι ενυδρεία (100 λαβράκια/ενυδρείο) και οι τσιπούρες σε τέσσερα (85 τσιπούρες/ενυδρείο). Ένας αριθμός ψαριών και από τα δύο είδη διατηρήθηκε ως απόθεμα σε μια δεξαμενή. Μετά την τοποθέτηση των ψαριών στα ενυδρεία έγιναν σταδιακές αλλαγές στην αλατότητα του νερού, έτσι ώστε να επιτευχθούν οι επιλεγμένες αλατότητες για τη διενέργεια του πειράματος. Η αλλαγή στις αλατότητες του νερού όλων των ενυδρείων, πραγματοποιήθηκε μέχρι τις 3 Μαΐου. Για τα λαβράκια που προορίζονταν να διαβιώσουν σε νερό αλατότητας 0‰ η σταδιακή μεταβολή της αλατότητας από 22‰ σε 0‰ δεν έγινε στο ενυδρείο, αλλά μέσα στην πειραματική δεξαμενή, για να μη διαταραχθεί το βιολογικό φίλτρο του ενυδρείου εξαιτίας της μεγάλης αλλαγής στην αλατότητα του νερού. Όλα τα ενυδρεία βρίσκονταν στον ίδιο χώρο κι επικρατούσαν οι ίδιες συνθήκες φωτισμού και αερισμού.

Η θερμοκρασία του νερού σε όλα τα ενυδρεία διατηρήθηκε στους 22°C μέχρι και τις 10 Μαΐου, οπότε άρχισε η σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία αυξανόταν περίπου έναν βαθμό την ημέρα και τελικά σταθεροποιήθηκε στους 27°C, όπου και παρέμεινε σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ρύθμιση της θερμοκρασίας έγινε με τη βοήθεια θερμικών αντιστάσεων.

Στον πίνακα 6 φαίνονται οι σχετικές αλλαγές που έγιναν στην αλατότητα και τη θερμοκρασία στα πειραματικά ενυδρεία, καθώς και ο πληθυσμός και το είδος των ψαριών που υπήρχε σε αυτά. Τα ενυδρεία αναφέρονται κατά ζεύγη. Κάθε ζεύγος αποτελείται από το ενυδρείο στο οποίο επιτεύχθηκε συγκεκριμένη αλατότητα και το αντίστοιχο ενυδρείο μάρτυρα.

Πίνακας 6. Αλατότητα, θερμοκρασία, αριθμός και είδος ψαριών στα πειραματικά ενυδρεία την ημέρα που ξεκίνησε το πρώτο πείραμα.

Ενυδρείο	Είδος ψαριού και αριθμός / ενυδρείο	Ημερομηνία	Αλατότητα	Θερμοκρασία
Αρχικός πληθυσμός	820 λαβράκια 390 τσιπούρες	19/4/2006	22‰	22°C
Θ1 και Θ2*	100 λαβράκια	31/5/2006	18‰	27°C
Θ3 και Θ4	100 λαβράκια	31/5/2006	33‰	27°C
Γ1 και Γ2	100 λαβράκια	31/5/2006	0‰	27°C
Τ1 και Τ4	85 τσιπούρες	31/5/2006	30‰	27°C
Τ2 και Τ5	85 τσιπούρες	31/5/2006	30‰	27°C

* Τα ενυδρεία που είναι υπογραμμισμένα είναι τα ενυδρεία των οποίων τα ψάρια μολύνθηκαν πειραματικά με τον ιό.

Όπως διαπιστώνεται από τον πίνακα, για τη διενέργεια του πειραματισμού με το ευρύαλο είδος λαβράκι, επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικές αλατότητες (0‰, 18‰, 33‰), ενώ για την τσιπούρα επιλέχθηκε νερό αλατότητας (30‰).

B. Πειραματικά ενυδρεία δευτέρου πειράματος

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 4 ενυδρεία, τα Θ6, Θ7, Θ8 και Θ9, ίδιας χωρητικότητας και προδιαγραφών όπως στο πρώτο πείραμα. Η αλατότητα του νερού στο ενυδρείο Θ6 και Θ8 ρυθμίστηκε στο 0‰ και στο ενυδρείο Θ7 και Θ9 στο 20‰, κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στο πρώτο πείραμα. Τα ενυδρεία με τα ψάρια μάρτυρες ήταν το Θ8 και το Θ9. Οι αλατότητες αυτές επιλέχθηκαν βάσει των θνησιμοτήτων που παρατηρήθηκαν στο πρώτο πείραμα. Η θερμοκρασία του νερού διατηρείτο σταθερά στους 27 °C με τη βοήθεια θερμοαντιστάσεων. Σε κάθε ενυδρείο τοποθετήθηκαν από 30 λαβράκια μέσου βάρους 11 γρ.

2.3. Προκαταρκτικό πείραμα για τον καθορισμό της δόσης του ιού με την οποία θα ενοφθαλμίζονταν τα ψάρια του πρώτου πειράματος

Πρέπει να αναφερθεί ότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχει πρωτόκολλο μόλυνσης λαβρακιών πολύ μικρού μέσου βάρους, με εξαίρεση εκείνο των Skliris και Richards (1999), σύμφωνα με το οποίο λαβράκι μέσου βάρους 10 γρ. ενοφθαλμίστηκε με 100 μl ιού τίτλου 10^8 TCID₅₀/ml. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές δόσεις του ιού, δηλαδή 30 μl και 50 μl (τίτλος 10^7 TCID₅₀/ml).

Έτσι, στις 23 Μαΐου του 2006, 20 λαβράκια μέσου βάρους $3.7 \pm 0,2$ γρ., που διατηρείτο σε δεξαμενή με νερό αλατότητας 30‰, ενοφθαλμίστηκαν με τον ιό Noda. Ο ενοφθαλμισμός έγινε ενδομυϊκά, εφόσον ήταν ήδη γνωστό ότι ο ενδομυϊκός τρόπος μόλυνσης είναι ο πιο αποτελεσματικός (Skliris και Richards, 1999). Πριν τον ενοφθαλμισμό τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με φαινοξυαιθανόλη (Merck, Germany). Μετά τον ενοφθαλμισμό, τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές (πολυεστερικές) των 180 λίτρων, με νερό αλατότητας 33‰.

Το προκαταρκτικό πείραμα έληξε στις 31 Μαΐου. Για τα λαβράκια, βάσει του χρόνου εκδήλωσης των συμπτωμάτων και των αλλοιώσεων στο πείραμα αυτό, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια η δόση των 30 μl, γιατί τα ποσοστά θνησιμότητας και γενικότερα η εξέλιξη της νόσου με τη δόση αυτή προσομοίαζαν σε εκείνα της φυσικής εκδήλωσης της λοίμωξης σε μια μονάδα λαβρακιών του ίδιου μεγέθους. Επιπρόσθετα, εφόσον θα ακολουθούσε ιστοπαθολογική μελέτη προτιμήθηκε η δόση με την πιο αργή εκδήλωση συμπτωμάτων. Είναι γνωστό ότι οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις εμφανίζονται τουλάχιστον τέσσερις με πέντε ημέρες μετά τη μόλυνση. Όσον αφορά στις τσιπούρες (ασυμπτωματικοί φορείς), αποφασίστηκε να ενοφθαλμιστούν και με τις δύο δόσεις του ιού, για να ελεγχθεί αν η εκδήλωση των συμπτωμάτων εξαρτάται από τη δόση με την οποία θα ενοφθαλμιστούν τα ψάρια. Εφόσον τα λαβράκια, τα οποία είναι γνωστό πως είναι πολύ ευαίσθητα στη μόλυνση με τον συγκεκριμένο ιό εκδήλωσαν τη νόσο με δόση 30 μl, επιλέχθηκε η ίδια αλλά και μεγαλύτερη δόση για τις τσιπούρες.

2.4. Πρωτόκολλο ενοφθαλμισμού ψαριών

A. Ενοφθαλμισμός ψαριών πρώτου πειράματος

Το απόγευμα της 31^{ης} Μαΐου του 2006 ξεκίνησε το πρώτο πείραμα, κατά το οποίο ενοφθαλμίστηκαν ενδομυϊκά 300 λαβράκια (ενυδρεία Γ1, Θ2, Θ3, Πίνακας 6) και 85 τσιπούρες (ενυδρείο T1, Πίνακας 6) με 30 μl ιού (τίτλος 10^7 TCID₅₀/ml). Το μέσο βάρος των λαβρακιών ήταν $4\pm 0,2$ γρ. και των τσιπούρων $3\pm 0,2$ γρ. Οι αλατότητες του νερού στα ενυδρεία που ζούσαν τα λαβράκια (100 λαβράκια/ενυδρείο) ήταν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, 0‰, 18‰ ή 33‰, ενώ για τις τσιπούρες ήταν 30‰. Επιπλέον, ενοφθαλμίστηκαν και άλλες 85 τσιπούρες (ενυδρείο T2, Πίνακας 6) με 50 μl ιού (τίτλος ιού 10^7 TCID₅₀/ml, αλατότητα νερού 30‰, μέσο βάρος ψαριών $3\pm 0,2$ γρ.).

Παράλληλα με τα ψάρια που ενοφθαλμίστηκαν με τον ιό, υπήρχαν και ψάρια-μάρτυρες (ενυδρεία Γ2, Θ1, Θ4, T4, T5, Πίνακας 6) στα οποία χορηγήθηκαν 30 ή 50 μl PBS/ψάρι. Η αντιστοιχία των μολυσμένων ψαριών με εκείνη των μαρτύρων ήταν ένα ενυδρείο με μάρτυρες (100 λαβράκια ή 85 τσιπούρες) για κάθε ενυδρείο με ενοφθαλμισμένα ψάρια. Τα ψάρια-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν για ναδειχθεί ότι η εκδήλωση των συμπτωμάτων στα μολυσμένα ψάρια δεν οφειλόταν στους χειρισμούς που έγιναν κατά τον ενοφθαλμισμό. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα ακόμη ενυδρείο με λαβράκια και ένα με τσιπούρες (τα υπόλοιπα ψάρια από τον αρχικό πληθυσμό που εισήχθη στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου), στα οποία δεν έγινε κανένας χειρισμός. Τα ψάρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει σαφές ότι το νόσημα δεν οφειλόταν στην ύπαρξη μη σωστών περιβαλλοντολογικών συνθηκών (pH, NH₃, NO₃) εντός των ενυδρείων.

B. Μόλυνση ψαριών δευτέρου πειράματος

Το δεύτερο πείραμα άρχισε στις 24 Απριλίου του 2007. Ως τροφή στα λαβράκια χορηγήθηκε ο ένας οφθαλμός από 60 διαφορετικές τσιπούρες που προέρχονταν από τα ενυδρεία T1 και T2 (μολυσμένες ασυμπτωματικές τσιπούρες)

του προηγούμενου πειράματος. Συνολικά δηλαδή, ο αριθμός των οφθαλμών που χορηγήθηκαν στα λαβράκια ήταν 60. Οι οφθαλμοί διατηρείτο στους -80°C και επιλέχθηκαν τυχαία.

2.5. Κλινική εξέταση ψαριών πρώτου και δευτέρου πειράματος

Όλα τα ψάρια (πειραματόζωα και μάρτυρες) ελέγχονταν δύο φορές την ημέρα και καταγράφονταν λεπτομερώς το είδος και η ένταση των συμπτωμάτων που παρουσιάστηκαν. Καταγράφονταν επίσης οι ημερήσιοι θάνατοι αλλά και οι συνολικές θνησιμότητες σε κάθε δεξαμενή, με ιδιαίτερη αναφορά στην ημέρα που ξεκίνησαν οι απώλειες των ψαριών, αλλά και στην ημέρα που παρατηρήθηκαν οι μέγιστες απώλειες.

2.6. Πρωτόκολλο δειγματοληψίας παθολογικών υλικών από τα ψάρια-πειραματόζωα

A. Δειγματοληψίες από τα ψάρια του πρώτου πειράματος

Μετά την πειραματική μόλυνση, οι δειγματοληψίες των παθολογικών υλικών ξεκίνησαν από την τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό με τον ιό. Η ημέρα αυτή επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία και την εμπειρία από το προκαταρκτικό πείραμα που προηγήθηκε του κυρίως πειράματος. Συγκεκριμένα, τα συμπτώματα αλλά και οι πρώτες αλλοιώσεις στους ιστούς εμφανίζονται από την 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση. Με βάση τα προαναφερθέντα, από κάθε ενυδρείο (μολυσμένα ψάρια και ψάρια-μάρτυρες), από την τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό και μετά, συλλέγονταν καθημερινά τα νεκρά ψάρια των τελευταίων δύο ωρών καθώς και τυχαία πέντε ζωντανά ψάρια για απομόνωση και ανίχνευση του ιού και ιστοπαθολογική εξέταση. Από τα ζωντανά ψάρια, τα δύο διατηρούνταν σε φορμόλη 10%, μέχρι να εξεταστούν παθολογοανατομικά, και τα τρία σε θερμοκρασία -80°C μέχρι να διενεργηθούν οι ενδεδειγμένες εξετάσεις για απομόνωση και μοριακή ανίχνευση του Noda-ιού. Για το τελευταίο, πριν τα ψάρια καταψυχθούν, αποχωριζόταν και φυλασσόταν ξεχωριστά ο

κάθε οφθαλμός και ο εγκέφαλος. Η διαδικασία αυτή κρίθηκε απαραίτητη έτσι ώστε να μη μειώνεται η συγκέντρωση του ιού από το επαναλαμβανόμενο ξεπάγωμα των ιστών σε κάθε ανάλυση. Το πείραμα αυτό διάρκεσε 21 ημέρες.

Όσον αφορά στα νεκρά ψάρια, αυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν για εργαστηριακές εξετάσεις, απλώς προσμετρούνταν στον προσδιορισμό των ποσοστών θνησιμότητας.

B. Δειγματοληψίες από τα ψάρια του δευτέρου πειράματος

Οι δειγματοληψίες στο πείραμα αυτό γίνονταν κάθε τρεις ημέρες. Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δύο λαβράκια από κάθε ενυδρείο. Το ένα χρησιμοποιείτο για μοριακή ανίχνευση και απομόνωση του Noda-ιού και από το άλλο ο ένας οφθαλμός χρησιμοποιείτο για μοριακές εξετάσεις και το υπόλοιπο για ιστοπαθολογική ανάλυση. Έτσι, ξεκινώντας από την τρίτη ημέρα μετά τη μόλυνση, η τελευταία δειγματοληψία έγινε την 39^η ημέρα μετά την έναρξη του δευτέρου πειραματισμού.

2.7. Ιστοπαθολογική εξέταση ψαριών πρώτου και δευτέρου πειράματος

Τα παθολογικά υλικά που προορίζονταν για ιστοπαθολογικές εξετάσεις αρχικά μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα ουδέτερης φορμόλης περιεκτικότητας 10% (Roberts, 1987). Μετά από την παραμονή τους σε διάλυμα απασβεστοποίησης για μία ημέρα μπήκαν στο μηχάνημα της ιστοκινέτας και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Ακολούθως παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές οι οποίες χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη- εοσίνη, σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Drury και Wallington (1980). Αναλυτικότερα η διαδικασία χρωματισμού είχε ως εξής: Αρχικά οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν μέσα σε ξυλόλη (Carlo Erba Reagenti Spa, Rodano) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε αντικατάσταση της ξυλόλης με νέα και οι πλάκες παρέμειναν σε αυτή για άλλα 5 λεπτά. Ακολούθησε βύθιση των αντικειμενοφόρων σε δοχείο με απόλυτη αλκοόλη (Scharlau Chemie

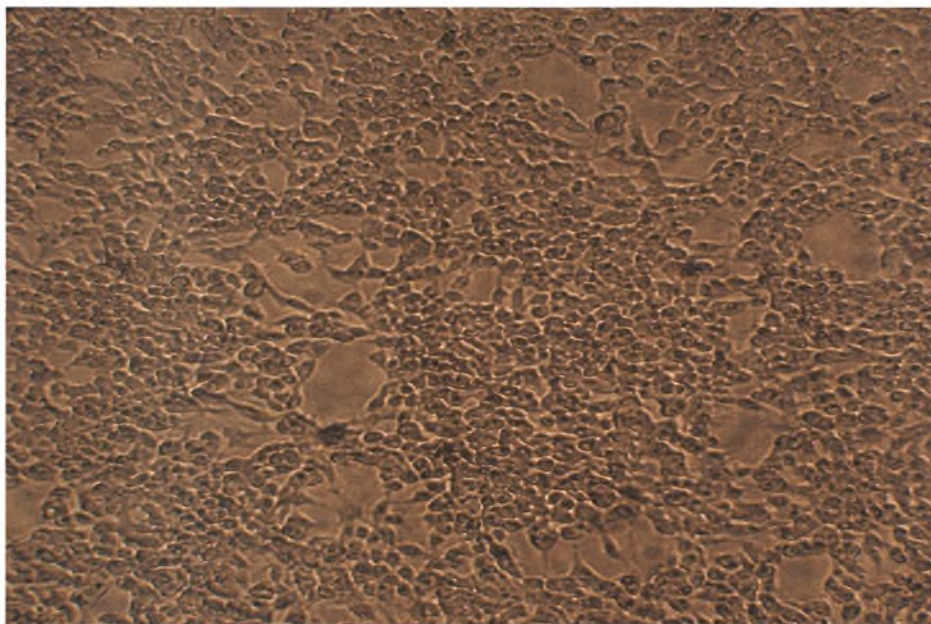
S.A., Spain) για 5 λεπτά, αλλαγή της απόλυτης αλκοόλης με νέα και παραμονή για 5 ακόμη λεπτά. Μετά οι αντικειμενοφόρες μεταφέρθηκαν σε δοχείο με αλκοόλη 96°, όπου παρέμειναν για ένα λεπτό, ακολούθησε αλλαγή αυτής και παραμονή στη νέα αλκοόλη (96°) για ένα λεπτό. Στη συνέχεια βυθίστηκαν για ένα λεπτό σε δοχείο με αλκοόλη 70° και μετά σε δοχείο με νερό για ένα ακόμη λεπτό. Ακολούθως οι πλάκες καλύφθηκαν με αιματοξυλίνη (Merck KGaA, Germany) για 12 λεπτά και μετά βυθίστηκαν σε δοχείο με νερό (βρύσης) για 5 λεπτά. Η διαδικασία συνεχίστηκε με 1-2 εμβαπτίσεις των πλακών σε διάλυμα όξινης αλκοόλης 1% και βύθισή τους και πάλι σε δοχείο με τρεχούμενο νερό (βρύσης) για 5 λεπτά. Ακολούθησε χρώση τους με εοσίνη (Bio-Optica, Italy) επί 10 λεπτά και ξέπλυμα τους με νερό βρύσης. Στη συνέχεια έγινε μία εμβάπτιση σε δοχείο με αλκοόλη 70°, δύο εμβαπτίσεις σε αλκοόλη 96° και παρέμειναν σε απόλυτη αλκοόλη για δύο λεπτά. Αφού άλλαξε η απόλυτη αλκοόλη με νέα ποσότητα, έμειναν σε αυτή για δύο ακόμη λεπτά. Τέλος βυθίστηκαν σε ξυλόλη για δύο λεπτά και αφού άλλαξε η ξυλόλη, παρέμειναν στη νέα για 5 λεπτά.

Η διαδικασία του εγκλεισμού των δειγμάτων, της λήψης τομών από αυτά και της χρώσης των τομών, έγινε στο εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η διαδικασία της επεξεργασίας των δειγμάτων στο μηχάνημα της ιστοκινέτας έγινε στο εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του παραπάνω τμήματος.

2.8. Καλλιέργεια των κυττάρων SSN-1

Αρχικά τα κύτταρα που ήταν αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο (-196°C) μέσα σε ειδικά φιαλίδια (Cryotubes, Corning, USA, 1ml κυττάρων/φιαλίδιο) αποψύχονταν γρήγορα με την τοποθέτηση του φιαλιδίου σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40°C. Στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 2.000 στροφές για 5 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί η κρυσπροστατευτική ουσία DMSO, που είναι τοξική για τα κύτταρα στη φάση του πολλαπλασιασμού τους και μετά τοποθετούνταν προς ανάπτυξη μέσα σε πλαστικές

φιάλες των 250 ml (75 cm², Primaria Tissue Culture Flask, BD Falcon, USA), στις οποίες προστίθενταν και 15 ml υποστρώματος ανάπτυξης. Τα κύτταρα κάθε φιαλιδίου διανέμονταν ισόποσα σε δύο πλαστικές φιάλες. Η επώαση των κυτταροκαλλιεργειών γινόταν στους 25⁰C μέχρι να σχηματιστεί πλήρες ταπήτιο, περίπου σε 1-2 ημέρες (Εικόνα 4). Σε περίπτωση που χρειαζόταν να παραμείνουν στην φιάλη για περισσότερες ημέρες, χωρίς να γίνει αλλαγή του θρεπτικού υποστρώματος, η θερμοκρασία επώασης ήταν 20⁰C.



Εικόνα 4. Υγιή κύτταρα της κυτταρικής σειράς SSN-1, κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού τους.

Για τις διόδους των κυτάρων αφαιρούνταν το θρεπτικό υπόστρωμα και με τη βοήθεια ξέστρου (353086 Cell Scraper, BD Falcon, USA) τα κύτταρα αποκολλούνταν από την πλαστική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθετο 5 ml θρεπτικού υποστρώματος και με μια αποστειρωμένη πιπέτα γινόταν καλή ανάμιξη αυτού με τα αποκολλημένα κύτταρα, έτσι ώστε να υπάρχουν όσο το δυνατό λιγότερα συσσωματώματα κυτάρων. Ακολούθως, γινόταν προσθήκη 40 ml υποστρώματος ανάπτυξης και τα κύτταρα διανέμονταν σε άλλες φιάλες των 250 ml ή σε πλάκες των 24 ή των 96

φρεατίων (Primaria, BD Falcon, USA). Η αναλογία διανομής σε νέες φιάλες ήταν μία φιάλη σε τρεις (15 ml κυττάρων/φιάλη), στις πλάκες των 24 φρεατίων μία φιάλη σε 2 πλάκες και σε εκείνες των 96 φρεατίων μία φιάλη σε 3 πλάκες.

2.9. Κατεργασία των παθολογικών υλικών για απομόνωση του ιού

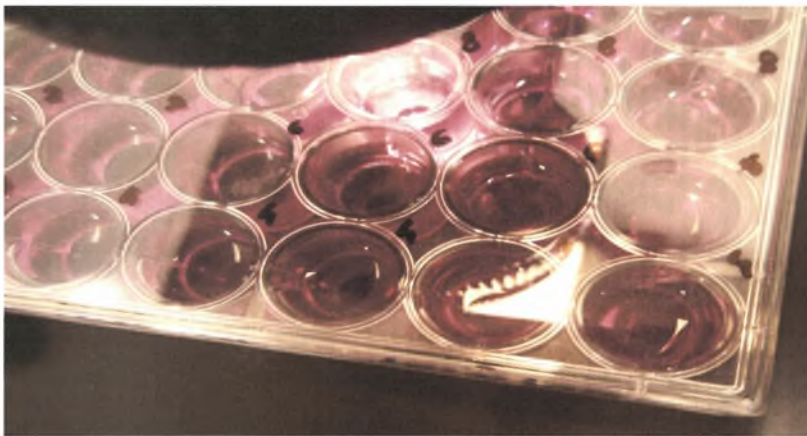
Πριν από τον ενοφθαλμισμό των κυτταροκαλλιιεργειών με τα παθολογικά δείγματα, ποσότητα 1-2 γρ. από κάθε ιστό αναμιγνυόταν με υπόστρωμα συντήρησης (MEM με 2% FCS) σε αναλογία 1/10 (w/v) και ομογενοποιούνταν με τον ομογενοποιητή Ultra Turrax IKA T18 basic (China). Στη συνέχεια ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο υγρό συλλεγόταν, προστίθετο διάλυμα αντιβιοτικών (ITT 19, Sigma, UK) σε αναλογία 1/10 και τοποθετούνταν στους 4°C για 24 ώρες, ώστε να δράσει το αντιβιοτικό. Σε περίπτωση που το υπερκείμενο ήταν πολύ θολό ή και ανεξάρτητα από τη θολερότητα, φιλτραρόταν με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm (Millipore, USA) για να απομακρυνθούν τα βακτήρια.

2.10. Απομόνωση του ιού από τα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος

Για την απομόνωση του ιού από τα επεξεργασμένα δείγματα παθολογικών υλικών και των δύο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυτταροκαλλιέργειες με πλήρες ταπήτιο κυττάρων που αναπτύσσονταν σε πλάκες των 24 φρεατίων. Από κάθε δείγμα ενοφθαλμίζονταν δύο φρεάτια με κύτταρα, δηλαδή σε κάθε πλάκα εξετάζονταν ταυτόχρονα 10 δείγματα παθολογικού υλικού (2 φρεάτια παρέμεναν ως μάρτυρες κυττάρων και 2 περιείχαν το θετικό μάρτυρα, δηλαδή ενοφθαλμίζονταν με δείγμα που ήταν γνωστό ότι περιείχε τον ιό). Η ποσότητα του ενοφθαλμίσματος ήταν 100 μl/φρεάτιο. Αρχικά απομακρυνόταν το θρεπτικό υπόστρωμα των κυτταροκαλλιιεργειών και στη συνέχεια στο ένα φρεάτιο προστίθετο το δείγμα όπως είχε μετά την κατεργασία του (κεφάλαιο 2.9.), ενώ στο άλλο προστίθετο το ίδιο δείγμα αραιωμένο 1/10. Η διαδικασία αυτή ίσχυε και για τα 10 δείγματα που εξετάζονταν σε

κάθε πλάκα. Μία ώρα μετά την επώαση των ενοφθαλισμένων κυτταροκαλλιεργειών στους 25°C (προσρόφηση του ιού) προστίθετο σε κάθε φρεάτιο 1 ml θρεπτικού υποστρώματος συντήρησης (Εικόνα 5). Για τις επόμενες 10 ημέρες τα κύτταρα παρατηρούνταν καθημερινά σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο για την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) του ιού. Από όσα δείγματα παρουσίαζαν τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις του ιού συλλεγόταν το υπερκείμενο υγρό της κυτταροκαλλιέργειας και φυλασσόταν στους -80°C, μέχρις ότου τιτλοποιηθεί.

Ένα δείγμα χαρακτηριζόταν ως αρνητικό όταν, ύστερα από τρεις διαδοχικές διόδους (τυφλές διόδοι) σε αντίστοιχες κυτταροκαλλιέργειες, δεν εμφάνιζε CPE.

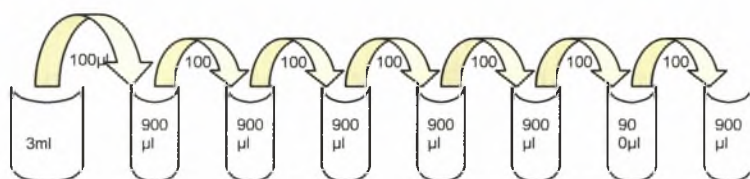


Εικόνα 5. Πλάκα των 24 φρεατίων που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του Noda-ιού από τα δείγματα των παθολογικών υλικών.

2.11. Τιτλοποίηση του Noda-ιού σε πλάκες των 96 φρεατίων

Η διαδικασία για την τιτλοποίηση του ιού (Σχήμα 2) και στα δύο πειράματα είχε ως εξής: Αρχικά μέσα σε γυάλινα αποστειρωμένα φιαλίδια των 5 ml (Sarstedt D-51588, Germany), που περιείχαν υπόστρωμα συντήρησης κυττάρων, γίνονταν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις (10^{-1} έως 10^{-7}) του υπερκείμενου υγρού των θετικών κυτταροκαλλιεργειών (900 μl MEM με 2% FCS και 10% αντιβιοτικά συν 100 μl υπερκείμενο υγρό). Στη συνέχεια από κάθε αραιώση λαμβάνονταν 50 μl και

μεταφέρονταν στα φρεάτια της πλάκας, στα οποία είχε ήδη αναπτυχθεί πλήρες ταπήτιο κυττάρων. Από κάθε αραιώση δείγματος ενοφθαλμιζονταν 4 φρεάτια, δηλαδή σε κάθε πλάκα των 96 φρεατίων τιτλοποιούνταν ταυτόχρονα 3 δείγματα (Σχήμα 3). Μετά ακολουθούσε επώαση μίας ώρας στους 25⁰C, προσθήκη 100 μl/φρεάτιο υποστρώματος συντήρησης και επταήμερη επώαση στους 25⁰C. Την 7^η ημέρα μετά τον ενοφθαλισμό γινόταν η ανάγνωση του αποτελέσματος. Ο τίτλος της λοιμογόνου δύναμης του ιού σε κάθε δείγμα παθολογικού υλικού εκφράστηκε ως η μέση λοιμογόνος δόση για την κυτταροκαλλιέργεια (Tissue culture infective dose 50%, TCID₅₀) και υπολογίστηκε με τη μέθοδο των Reed και Muench (1938).



Σχήμα 2: Παρασκευή διαδοχικών υποδεκαπλάσιων αραιώσεων για την τιτλοποίηση του Noda-ιού.

Αραιώση/Δείγμα	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
10 ⁻⁵		+		+								+	+
10 ⁻⁶		+											
10 ⁻⁷													

Σχήμα 3: Πλάκα των 96 φρεατίων ενοφθαλισμένη με τρία διαφορετικά θετικά δείγματα (1, 2, 3) παθολογικού υλικού. Με + παρουσιάζονται οι αραιώσεις στις οποίες παρατηρείται CPE.

2.12. Εκχύλιση του ιικού RNA για την εφαρμογή της κλασικής PCR και της real-time PCR

Σε ειδικό για ομογενοποίηση πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα τοποθετούνταν 50-100 mg οφθαλμού. Στη συνέχεια προστίθετο 0,75 ml TRIZOL LS για κάθε 100 mg ιστού και ακολουθούσε ομογενοποίηση με τον ομογενοποιητή Ultra Turrax IKA T18 basic (China). Κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης ο σωλήνας ήταν τοποθετημένος μέσα σε δοχείο που περιείχε πάγο. Ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία 15-30°C για 5 λεπτά και προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου (J.T. Baker, Netherlands) ανά 0,75 ml TRIZOL LS. Ο σωλήνας αναδευόταν έντονα με το χέρι και το μίγμα επωαζόταν εκ νέου στους 15-30°C για 5 λεπτά. Μετά γινόταν φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο υγρό συλλεγόταν σε έναν νέο σωλήνα. Στη συνέχεια, προστίθετο 0,5 ml διαλύματος ισοπροπανόλης (2-προπανόλη), ακολουθούσε ανάδευση για 5 λεπτά στους 15-30°C και εκ νέου φυγοκέντρηση στις ίδιες, όπως προηγουμένως, συνθήκες. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο υγρό απορριπτόταν και στο ίζημα προστίθετο 1 ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Το μίγμα αναδευόταν με τη βοήθεια vortex (MSI minishaker IKA, China) και στη συνέχεια φυγοκεντρούνταν στις 12.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C. Ακολούθως, το υπερκείμενο απορριπτόταν και το ίζημα αφηνόταν να στεγνώσει στον αέρα. Τέλος, προστίθετο στο ίζημα 50 μl H₂O [κατεργασμένο με DEPC (Sigma, Germany)], το μίγμα αναδευόταν με πιπέτα και χρησιμοποιούνταν άμεσα ή αποθηκευόταν στους -20°C.

Όλες οι φυγοκεντρήσεις που αναφέρονται σε αυτό το πρωτόκολλο, γίνονταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Centurion, Scientific Ltd (UK). Οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επεξεργασία των δειγμάτων που αναφέρονται στο κεφάλαιο αυτό, αλλά και στο σύνολο των μοριακών αναλύσεων, ήταν της εταιρείας Gilson (USA) και του τύπου Pipetman ultra. Επίσης όλοι οι χειρισμοί των δειγμάτων έγιναν σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής Esco Laminar Flow Cabinet EN 1822.1 (Singapore).

2.13. Αντίστροφη μεταγραφή (RT) - Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Πριν ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης του cDNA έπρεπε να απομακρυνθεί το κυτταρικό DNA που είχε απομονωθεί μαζί με το γενωμικό υλικό του Noda-ιού κατά την εκχύλιση. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η εξής τεχνική. Αρχικά, σε έναν αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών, σωλήνα μικροφυγοκέντρου προστίθετο 1 μg εκχυλισμένου υλικού, 1 μl από το 10x DNase buffer και H₂O, μέχρι ο συνολικός όγκος να φθάσει στα 9 μl. Στη συνέχεια, προστίθετο 1 μl DNάσης (1 μονάδα) και μετά από ανάδευση με πιπέτα το μίγμα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Για να σταματήσει η αντίδραση ακολουθούσε προσθήκη 1 μl EDTA 20 mM και επώαση στους 65 °C για 10 λεπτά. Μετά από το στάδιο αυτό, το προϊόν που ήταν πλέον απαλλαγμένο από κυτταρικό DNA τοποθετούνταν σε πάγο, εάν επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί άμεσα, ή αποθηκευόταν στους -20 °C. Ο τελικός όγκος του προϊόντος αυτού ήταν 10 μl.

Για τη σύνθεση του cDNA, τόσο στην κλασική PCR όσο και στη real-time PCR, ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο. Στα 10 μl του παραπάνω προϊόντος προστίθετο 2 μl του 10X M-MuLV ρυθμιστικού διαλύματος (FINNZYMES, Finland), 1 μl μίγματος dNTPs (5 mM το καθένα, Invitrogen, UK), 2 μl τυχαίου εξαμερούς εκκινητή (10mM, Random Hexamer Primers, Invitrogen, UK), 1 μl αναστολέα RNAσών (10 μονάδες/μl, Invitrogen, UK), 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης (RT RNase H, M-MuLV, FINNZYMES, Finland) και νερό ελεύθερο RNAσης, ώστε ο τελικός όγκος να ανέλθει στα 20 μl. Το μίγμα επωαζόταν στους 37°C για 60 λεπτά και στη συνέχεια στους 65°C για 15 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης που περιείχε το cDNA του ιού αποθηκευόταν στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.14. Κλασική PCR για την ανίχνευση του ιού στα ψάρια του ιχθυογεννητικού σταθμού

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή Techne TC-312, με τη χρήση Taq DNA πολυμεράσης. Το μίγμα αντίδρασης αποτελούνταν από 2

μl cDNA, 0,2 μl Taq DNA πολυμεράσης, 2 μl του 10X ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης, 0,1 μl από τον κάθε εκκινητή (R3 και F2), 0,5 μl διαλύματος dNTPs (10 mM), 0,8 μl διαλύματος MgCl₂ (50 mM) και 14,1 μl νερό, ώστε ο συνολικός όγκος του διαλύματος να ανέρχεται στα 20 μl. Όλα τα αντιδραστήρια ήταν της εταιρείας Invitrogen (UK).

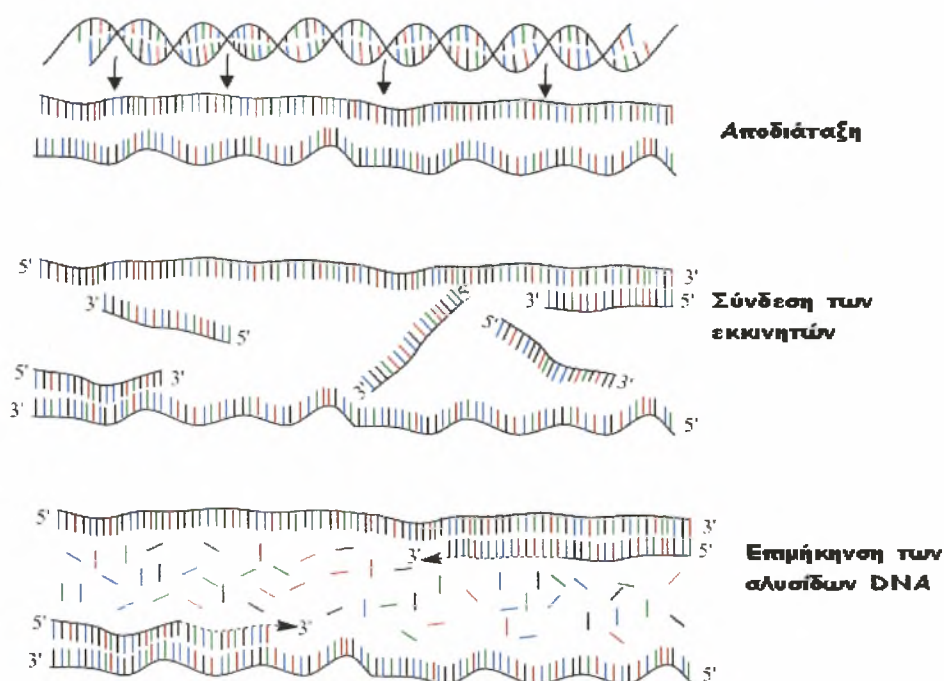
Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης

Το πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης περιελάμβανε την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου cDNA εκμαγείου με θέρμανση του μίγματος αντίδρασης στους 94°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια 40 κύκλους με τις παρακάτω συνθήκες: 94°C για 30 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη cDNA), 50°C για 30 δευτερόλεπτα (σύνδεση των εκκινητών στο cDNA-στόχο) και 72°C για 40 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση των αλυσίδων με τη βοήθεια της πολυμεράσης). Η αντίδραση ολοκληρωνόταν με επώαση στους 72 °C για 5 λεπτά (Εικόνα 6).

Στο σύνολο των δειγμάτων η εκχύλιση του ιικού RNA και η κλασική PCR πραγματοποιήθηκαν δύο φορές, για να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων.

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν κάτω από συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές RNA. Για τα διάφορα στάδια της δοκιμής (εκχύλιση, αντίστροφη μεταγραφή, PCR, ηλεκτροφόρηση), χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστοί χώροι, διαφορετικές πιπέτες και ρύγχοι πιπετών με φίλτρο.

PCR : Polymerase Chain Reaction



Εικόνα 6. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και τα στάδιά της.

2.15. Ποσοτική real-time PCR για την ανίχνευση του ιού στα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος

A. Αντιδραστήρια για την εφαρμογή της real-time PCR

Η real-time PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή LightCycler 2.0. Ο πολλαπλασιασμός έγινε μέσα σε γυάλινα τριχοειδή (LightCycler capillaries) των 20 μl και ο συνολικός όγκος του μίγματος αντίδρασης ήταν 20 μl . Κάθε τριχοειδές περιείχε το cDNA του εξεταζόμενου δείγματος, ανοδικό και καθοδικό εκκινητή για τον ιό ή για το 18S rRNA, MgCl_2 , H_2O μέχρι όγκου 18 μl και 2 μl από το Master mix του kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I, το οποίο περιείχε τη χρωστική. Ο θερμοκυκλοποιητής και τα αντιδραστήρια ήταν της εταιρείας Roche (Germany). Στον πίνακα 7 φαίνεται η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων που περιείχε κάθε τριχοειδές.

Πίνακας 7. Συγκέντρωση των αντιδραστηρίων στη real-time PCR (τελικός όγκος 20 μ l).

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση (μ l)	
	RdRP RNA	18S rRNA
Master mix	2	2
Ανοδικός εκκινητής	1	1
Καθοδικός εκκινητής	1	1
MgCl ₂	0,8	0,8
H ₂ O	13,2	13,2
cDNA	2	2

B. Πρόγραμμα θερμοκυκλοποίησης

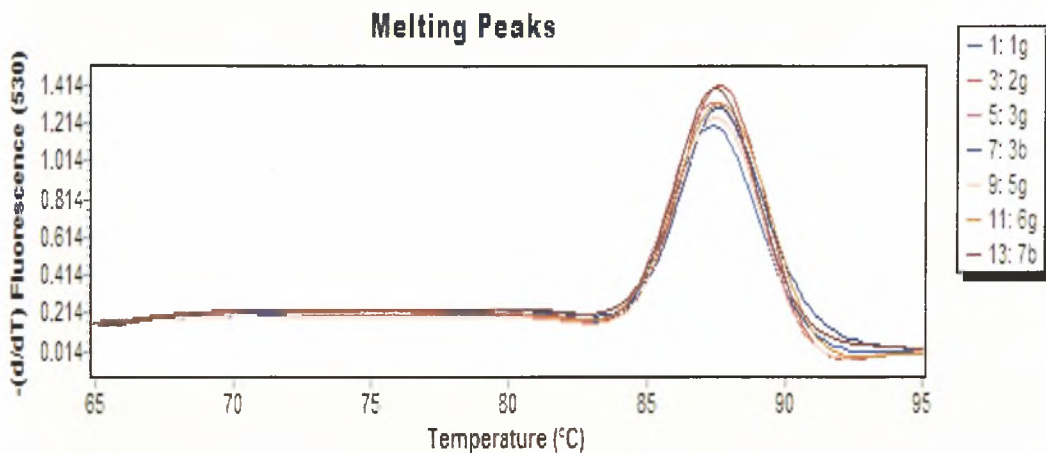
Στον πίνακα 8 φαίνεται το προφίλ θερμοκυκλοποίησης για την ανάλυση των δειγμάτων από τα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος, που εφαρμόστηκε για 55 κύκλους.

Πίνακας 8. Θερμοκρασιακό προφίλ της real-time PCR με τη χρωστική SYBR Green I (πηγή: Dalla Valle και συν., 2005).

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (sec)
Προ-αποδιάταξη	95	600
Αποδιάταξη	95	20
Σύνδεση εκκινητών και επιμήκυνση αυτών	60	15

Για κάθε δείγμα γινόταν και ταυτόχρονη ανίχνευση του 18S rRNA. Με τον τρόπο αυτό, ελεγχόταν η ακεραιότητα του RNA ή η πιθανή παρουσία αναστολέων, διότι το 18S rRNA ανιχνεύεται πάντα μαζί με τα ιικά RNAs.

Οι καμπύλες τήξης ελέγχονταν για το σχηματισμό διμερών από τα μόρια των εκκινητών ή την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Το γράφημα 1 αποτελεί παράδειγμα ελέγχου των καμπυλών τήξης των προϊόντων της real time PCR.



Γράφημα 1. Καμπύλη τήξης των προϊόντων της real-time PCR. Στον άξονα y φαίνεται ο φθορισμός που μετράται κατά τη διάρκεια ενίσχυσης του προϊόντος και στον x η θερμοκρασία στην οποία υποβάλλονται τα δείγματα.

Στο σύνολο των δειγμάτων, η εκχύλιση του ιικού RNA και η real-time PCR πραγματοποιήθηκαν δύο φορές, για να επιβεβαιωθεί η δυνατότητα αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων.

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν κάτω από συνθήκες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές RNA. Για τα διάφορα στάδια της δοκιμής (εκχύλιση, αντίστροφη μεταγραφή, real-time PCR, ηλεκτροφόρηση) χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστοί χώροι, διαφορετικές πιπέτες και ρύγχοι πιπετών με φίλτρο.

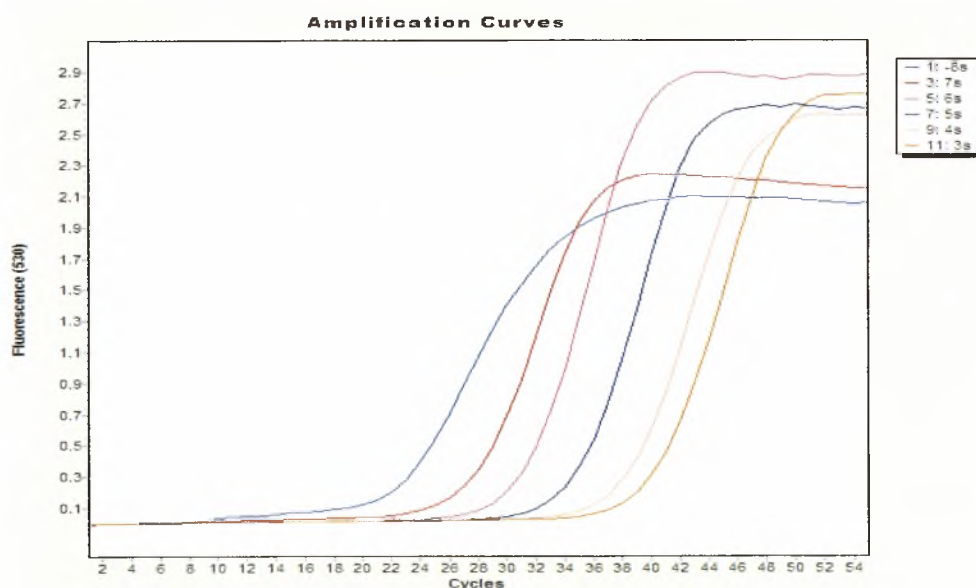
Γ. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης (καμπύλη αναφοράς)

Για να είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση του Noda-ιού με τη real-time PCR πρέπει οι τιμές που προκύπτουν σε κάθε ανάλυση να συγκριθούν με αντίστοιχες τιμές από διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του ιού-αναφοράς. Αρχικά ο ιός-αναφοράς ενοφθαλμίστηκε σε κύτταρα SSN-1. Μετά από δέκα ημέρες συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό της κυτταροκαλλιέργειας και φυγοκεντρήθηκε στις 3.000 στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Στο υπερκείμενο αυτό υγρό έγινε τιτλοποίηση του ιού,

σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.11 και ο τίτλος του ήταν $10^{8.7}$ TCID₅₀/ml.

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν 6 υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του γνωστού τίτλου ιού-αναφοράς. Συγκεκριμένα, οι αραιώσεις αυτές ήταν από $10^{8.7}$ έως $10^{3.7}$. Στη συνέχεια, από κάθε αραιώση εκχυλίστηκε το RNA και συντέθηκε cDNA, με τις ίδιες μεθόδους που αναφέρονται στα κεφάλαια 2.12 και 2.13. Τα cDNAs πολλαπλασιάστηκαν με τη real-time PCR όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Στο γράφημα 2 φαίνονται οι καμπύλες φθορισμού που προέκυψαν από την ανάλυση στη συσκευή της real-time PCR, ενώ στον πίνακα 9 φαίνεται ο αριθμός των κύκλων (Ct), από τον οποίο αρχίζει η εκθετική αύξηση του φθορισμού σε κάθε αραιώση του ιού.



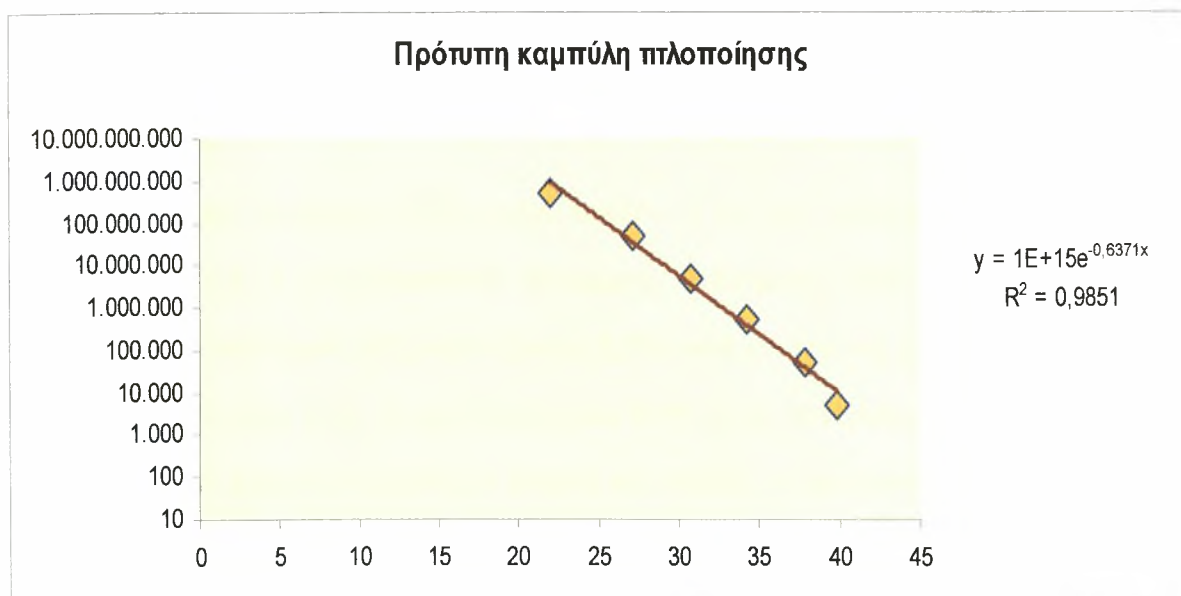
Γράφημα 2. Καμπύλες φθορισμού που προέκυψαν από τις υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του ιού-αναφοράς. Στον άξονα x φαίνεται ο αριθμός των κύκλων, κατά τον οποίο η ένταση του φθορισμού ξεπερνάει το καθορισμένο όριο που προσδιορίζεται από τη συσκευή της real-time PCR.

Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις του ιού-αναφοράς και αριθμός κύκλων που απαιτούνται για έναρξη της εκθετικής αύξησης του φθορισμού.

Δεκαδικές αραιώσεις πρότυπου δείγματος	Κύκλος έναρξης γραμμικής αύξησης (Ct)
5×10^8	21,99
5×10^7	27,2
5×10^6	30,76
5×10^5	34,25
5×10^4	37,81
5×10^3	39,85

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη που φαίνεται στο γράφημα 3 που ακολουθεί. Στο άξονα y του γραφήματος δίνεται ο τίτλος του ιού. Στον άξονα x δίνονται οι τιμές των Ct. Στο γράφημα επίσης φαίνεται η γραφική παράσταση της καμπύλης καθώς και η τιμή R^2 .

Γράφημα 3. Πρότυπη καμπύλη τιτλοποίησης του ιού για τη real-time PCR.



Οι κύκλοι που φαίνονται στον πίνακα 9 και που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης (γράφημα 1) είναι οι μέσοι όροι των κύκλων που προέκυψαν για κάθε δείγμα, αφού αναλύθηκε δύο φορές με τη μέθοδο της real-time PCR.

Οι τίτλοι που προέκυψαν από την ανάλυση όλων των δειγμάτων του πρώτου και του δεύτερου πειράματος με τη μέθοδο της real time PCR υπολογίστηκαν με βάση τη γραφική παράσταση της παραπάνω πρότυπης καμπύλης τιλοποίησης (γράφημα 3).

2.16. Ανάλυση με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της κλασικής PCR και της real-time PCR

Η ανάλυση των προϊόντων της κλασικής PCR και της real-time PCR γινόταν σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης με χρήση πηκτής αγαρόζης.

Για την παρασκευή της πηκτής, 1,8 γρ. αγαρόζης αναμιγνυόταν με 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1XTAE μέσα σε κωνική φιάλη. Ακολουθούσε ρευστοποίηση της αγαρόζης με θέρμανση μέχρι το σημείο βρασμού και συνεχή έντονη ανάδευση. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης αφηνόταν να κρυώσει στους 50 °C και τότε προστίθετο 7,5 ml διαλύματος 1% βρωμιούχου αιθιδίου και ακολουθούσε πολύ καλή ανάδευση. Μετά το μίγμα μεταφερόταν σε ειδικό πλαίσιο όπου, ύστερα από περίπου 20 λεπτά, στερεοποιούνταν και στη συνέχεια τοποθετούνταν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Από κάθε αντίδραση PCR λαμβάνονταν 2 μl του προϊόντος αυτής και αναμιγνύονταν με 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (10X BlueJuice gel Loading buffer, Invitrogen, UK), που περιείχε 0,3% (w/v) κυανού της βρωμοφαινόλης, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA και 65% (w/v) σουκρόζη. Ακολουθούσε τοποθέτηση των μιγμάτων αυτών στα βοθρία της πηκτής. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε τάση 150 Volts για 30 λεπτά μέσα σε 700 ml διαλύματος 1XTBE. Παράλληλα, σε ξεχωριστά βοθρία της πηκτής τοποθετούνταν DNA-δείκτης μοριακού βάρους (100

base pair ladder, Invitrogen, UK), καθώς και θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Ο θετικός μάρτυρας ήταν cDNA, το οποίο είχε πολλαπλασιαστεί με τον ίδιο τρόπο όπως και τα προς έρευνα δείγματα, αλλά προερχόταν από δείγμα που είχε διαγνωστεί ως θετικό στο Noda-ιό με κάποια άλλη μέθοδο. Ο αρνητικός μάρτυρας περιείχε όλα τα συστατικά του μίγματος αντίδρασης της PCR, εκτός από μολυσμένο ιστό που αντικαταστάθηκε με δις-απεσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό γινόταν αφενός σύγκριση με ένα υλικό το οποίο δεν περιέχει ιικό γένωμα και αφετέρου έλεγχος για τυχόν επιμόλυνση των αντιδραστηρίων με μολυσμένο υλικό, κατά την τήρηση του πρωτοκόλλου της μεθόδου. Η θέση του προϊόντος της PCR γινόταν ορατή με απευθείας τοποθέτηση της πηκτής επάνω στην τράπεζα της συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας (UVITEC STX-20-M, UK).

2.17. Καθαρισμός των προϊόντων της real-time PCR για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Sequencing)

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και καθώς η πηκτή ήταν τοποθετημένη στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, αποχωρίζονταν, με τη βοήθεια λεπίδας νυστεριού, οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στο ιικό γενωμικό τμήμα που είχε πολλαπλασιαστεί με τη real-time PCR. Στη συνέχεια, τα τμήματα αυτά καθαρίζονταν από την πηκτή με τη χρήση του εμπορικού kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή.

2.18. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

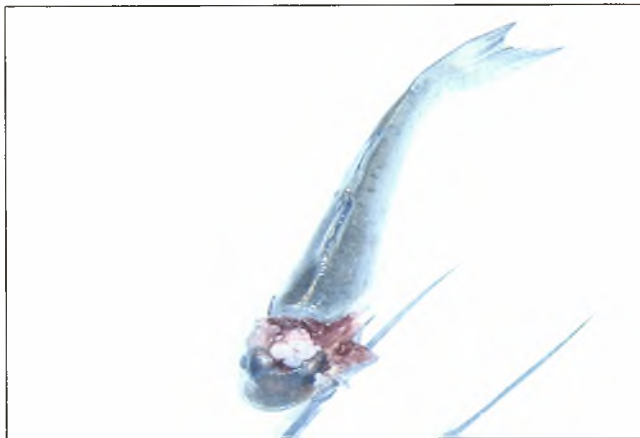
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Windows ver. 12.0) και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για τιμές $P < 0,05$.

II. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

1.1. Ιχθυοπαθολογικός έλεγχος των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού

Από τα δείγματα των ψαριών του ιχθυογεννητικού σταθμού, που λήφθηκαν για έλεγχο πριν την έναρξη των κυρίως πειραμάτων, διαπιστώθηκε με τη μέθοδο της RT-PCR ότι δεν υπήρξε προηγούμενη μόλυνση με τον ιό Noda. Επίσης, κατά τις παρασιτολογικές και μικροβιολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν, δεν απομονώθηκε κανένας παθογόνος μικροοργανισμός. Τέλος, η νεκροτομική εξέταση έδειξε ότι η κατάσταση των ψαριών ήταν φυσιολογική (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Φυσιολογική εμφάνιση εγκεφάλου λαβρακιού.

1.2. Κλινική εξέταση των λαβρακιών του προκαταρκτικού πειράματος

Την 3^η μετά την έναρξη του προκαταρκτικού πειράματος, στη δεξαμενή με τα 10 λαβράκια που είχαν ενοφθαλμιστεί με τη δόση των 50 μl ιού, βρέθηκε ένα ετοιμοθάνατο ψάρι με έντονα συμπτώματα, χαρακτηριστικά της νόσου. Κατά τη νεκροτομική εξέταση διαπιστώθηκαν αιμορραγίες στον εγκέφαλο. Την επόμενη ημέρα (τέταρτη ημέρα) βρέθηκαν 3 νεκρά ψάρια, ενώ τα υπόλοιπα 6 ήταν ετοιμοθάνατα. Τα τελευταία εμφάνιζαν έντονα νευρικά συμπτώματα. Την 5^η ημέρα πέθαναν τα 4 από τα 6 ετοιμοθάνατα λαβράκια και την τελευταία ημέρα του

προκαταρκτικού πειράματος (6^η) ήταν όλα νεκρά (Πίνακας 10). Συνολικά, η θνησιμότητα στα ψάρια που ενοφθαλμίστηκαν με 50μl ιού ανήλθε στο 90% .

Σχετικά με τα ψάρια που ενοφθαλμίστηκαν με τη δόση των 30 μl ιού, τα αποτελέσματα είχαν ως εξής: την 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση διαπιστώθηκαν εμφανή συμπτώματα σε 5 από τα 10 ενοφθαλμισμένα λαβράκια. Συγκεκριμένα, τα ψάρια ήταν απαθή και ανόρεκτα, ενώ η κολύμβηση ήταν κυκλική και σπειροειδής. Την επόμενη ημέρα (5^η ημέρα) 3 από αυτά ήταν νεκρά και την 6^η ημέρα πέθαναν και τα άλλα 2. Τα υπόλοιπα 5 παρέμειναν υγιή (Πίνακας 11). Το ποσοστό θνησιμότητας στην περίπτωση αυτή ανήλθε στο 50%.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της κλινικής εξέτασης των λαβρακιών που μολύνθηκαν με 50 μl ιού.

Ημέρες μετά τη μόλυνση	Νεκρά/Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός/Είδος εξέτασης	
3 ^η (28/5/2006)	0 / 0%	20%	1 θνησιγενές	1/ M	
4 ^η (29/5/2006)	3 / 33%	100%	3 νεκρά	2/ M	1/ I
5 ^η (30/5/2006)	4 / 66%	100%	4 νεκρά	2/ M	2 / I
6 ^η (31/5/2006)	2 / 100%	100%	2 νεκρά	1/ M	1/ I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της κλινικής εξέτασης των λαβρακιών που μολύνθηκαν με 30 μl ιού.

Ημέρες μετά τη μόλυνση	Νεκρά-Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός/Είδος εξέτασης	
4 ^η (29/5/2006)	0 / 0%	50%	0		
5 ^η (30/5/2006)	3 / 30%	50%	3 νεκρά + 1 υγιές	2 M	2 I
6 ^η (31/5/2006)	2 / 33%	50%	2 νεκρά	2 I	

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

1.3. Κλινική εξέταση των ψαριών του πρώτου πειράματος

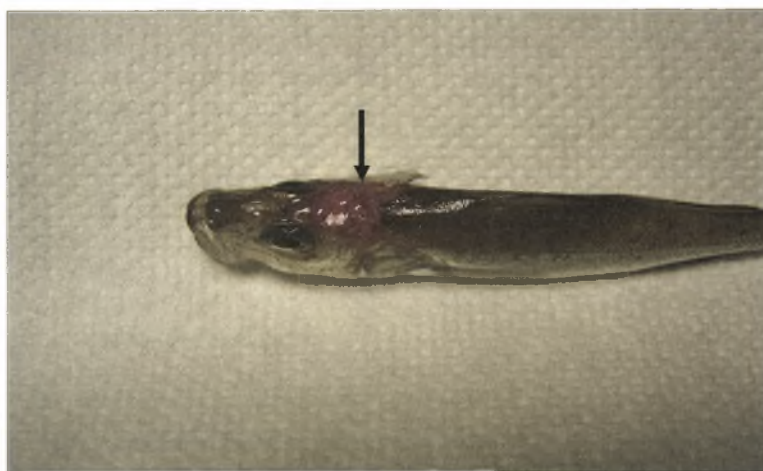
Την 1^η και τη 2^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των λαβρακιών (ενυδρεία Γ1, Θ2, Θ3) και των τσιπούρων (ενυδρεία Τ1, Τ2) με τον Noda-ιό, η συμπεριφορά των ψαριών που μολύνθηκαν ήταν ίδια με εκείνη των μαρτύρων. Βρέθηκαν όμως δύο νεκρά λαβράκια στο ενυδρείο Θ2 (δόση ιού 30 μl, αλατότητα νερού 18‰) την πρώτη ημέρα, ενώ τη δεύτερη ημέρα βρέθηκαν 1 νεκρό στο ενυδρείο Θ2 και 2 νεκρά στο ενυδρείο Γ1 (δόση ιού 30 μl, αλατότητα νερού 0‰).

Την 3^η ημέρα, πολλά από τα λαβράκια ήταν νωχελικά, λάμβαναν τροφή, αλλά όχι με την ίδια όρεξη όπως πριν, και παρέμεναν στον πυθμένα των ενυδρείων (Εικόνα 8). Η συμπεριφορά τους ήταν σαφώς αλλαγμένη. Τα συμπτώματα αυτά ήταν κοινά για όλα τα μολυσμένα λαβράκια και ελάχιστα πιο έντονα στα λαβράκια που βρίσκονταν στο ενυδρείο Γ1, το οποίο περιείχε γλυκό νερό (0‰ αλατότητα). Επίσης στο ενυδρείο Θ2 υπήρχε 1 νεκρό ψάρι.



Εικόνα 8. Λαβράκια με αρχικά συμπτώματα της νόσου (ανορεξία και νωχελικότητα). Στην επιφάνεια του νερού φαίνεται η τροφή, τα ψάρια όμως δε δείχνουν ενδιαφέρον και μένουν στον πυθμένα της δεξαμενής.

Την 4^η ημέρα, στο ενυδρείο Γ1 υπήρχαν 7 νεκρά ψάρια και επιπλέον το 50% των ψαριών εμφάνιζε νευρικά συμπτώματα, όπως κυκλική και σπειροειδή κολύμβηση με νωχελικότητα και έντονη διέγερση όταν ενοχλούνταν, ανορεξία, κολύμβηση με το κεφάλι προς τον πυθμένα και ετερόπλευρη κολύμβηση. Τέσσερα από τα 7 νεκρά ψάρια είχαν αιμορραγίες στον εγκέφαλο και συμφόρηση των μηνίγγων, ενώ ο ίδιος αριθμός ψαριών εμφάνιζε πιο σκούρο χρωματισμό δέρματος (Εικόνες 9 και 10). Από τα λαβράκια που διαβιούσαν στο ενυδρείο Θ2 (νερό ενδιάμεσης αλατότητας, 18 ‰), συμπτώματα εμφάνιζε το 10%. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μειωμένη πρόσληψη τροφής και κολύμβηση στην επιφάνεια του νερού (δύο ψάρια), ενώ σε δώδεκα ψάρια τα συμπτώματα ήταν πιο έντονα (ανορεξία, κυκλική κολύμβηση, νωχελικότητα). Τέλος, στα λαβράκια του ενυδρείου Θ3 (πλήρης αλατότητα, 33‰) η νόσος εμφανιζόταν με πιο ήπια μορφή από εκείνη που παρατηρήθηκε στα λαβράκια του Θ2. Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 12.



Εικόνα 9. Αλλοιώσεις σε λαβράκι του ενυδρείου Γ1 (σκούρος χρωματισμός του δέρματος, συμφόρηση του εγκεφάλου και των μηνίγγων).





Εικόνα 10. Κάτοψη ενυδρείου. Τα βέλη δείχνουν ψάρια που κολυμπούν σε κάθετη θέση, με το κεφάλι προς τον πυθμένα του ενυδρείου. Επίσης σε ορισμένα ψάρια διακρίνεται ο πιο σκούρος χρωματισμός του δέρματος.

Πίνακας 12. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του πρώτου πειράματος, την τέταρτη ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων * ¹	Υπόλοι- πα* ²	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Γ1	7 / 7%	50%	5	86	3 M	2 I
Θ2	0 / 0%	10%	5	91	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	3%	5	95	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

*¹ Τα δείγματα σε όλο το πείραμα λαμβάνονται τυχαία από ζωντανά (υγιή και νοσούντα) ψάρια.

*² Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Την 5^η ημέρα, στο ενυδρείο Γ1 βρέθηκαν άλλα 5 νεκρά ψάρια. Επιπλέον 17 ψάρια κολυπούσαν στην επιφάνεια, 8 από τα οποία έμεναν το περισσότερο διάστημα ακίνητα. Περίπου 45 ψάρια κολυπούσαν με κάποιου βαθμού κλίση και 3 ήταν ακίνητα στον πυθμένα, σε πλάγια θέση. Τα ψάρια αυτά δεν λάμβαναν τροφή. Στο ενυδρείο Θ2 υπήρχαν 2 ακόμη νεκρά λαβράκια, ενώ βρέθηκαν περίπου 20

λαβράκια με νευρικά συμπτώματα. Από αυτά, τα 3 ήταν σχεδόν ακίνητα στην επιφάνεια, τα 2 βρίσκονταν στον πυθμένα και τα 8 κινούνταν με χαρακτηριστική σπειροειδή κολύμβηση (Εικόνα 11). Τα ψάρια αυτά έλαβαν μικρή ποσότητα τροφής. Στα λαβράκια του ενυδρείου Θ3 (33‰ αλατότητα) παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κλινική εικόνα, σε σχέση με εκείνη της 4^{ης} ημέρας. Ειδικότερα βρέθηκαν 5 νεκρά ψάρια, ενώ συνολικά 15 ψάρια εμφάνιζαν κυκλική κολύμβηση. Από αυτά, τα 3 εμφάνιζαν σπειροειδή κολύμβηση, όχι όμως πολύ χαρακτηριστική, ενώ 5 βρίσκονταν συνεχώς στην επιφάνεια. Το 60-70% των ψαριών αυτών τράφηκε κανονικά (Πίνακας 13).



Εικόνα 11. Με βέλη καταδεικνύονται η σπειροειδής κολύμβηση, η κάμψη του σώματος κατά την κολύμβηση και ψάρια που επιπλέουν στην επιφάνεια του νερού. Φαίνεται επίσης η διάταση της κοιλιακής χώρας των τελευταίων, λόγω διάτασης της νηκτικής τους κύστης (1^ο πείραμα, 5^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό).

Πίνακας 13. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, την 5^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός /Είδος εξέτασης	
Γ1	5 / 6%	85%	5	76	3 M	2 I
Θ2	2 / 2%	24%	5	84	3 M	2 I
Θ3	5 / 5%	18%	5	85	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Την 6^η ημέρα στο ενυδρείο με το γλυκό νερό (Γ1) βρέθηκαν 18 νεκρά ψάρια και 13 ασθενή. Από τα ασθενή, τα 6 ήταν στην επιφάνεια, τα 4 στον πυθμένα και 3 είχαν χαρακτηριστική κολύμβηση. Τροφή λάμβαναν περίπου 20 ψάρια. Από τα ψάρια του ενυδρείου με νερό ενδιάμεσης αλατότητας (Θ2), 2 ήταν νεκρά, 5 ήταν στην επιφάνεια, 2 στον πυθμένα και 5 εμφάνιζαν σπειροειδή κολύμβηση. Περίπου 30 ψάρια λάμβαναν τροφή. Στο ενυδρείο με το θαλασσινό νερό (Θ3) βρέθηκαν 4 λαβράκια νεκρά, 4 κολυμπούσαν μόνο στην επιφάνεια, 2 κολυμπούσαν με τη χαρακτηριστική σπειροειδή κολύμβηση και περίπου 30 λάμβαναν τροφή (Πίνακας 14).

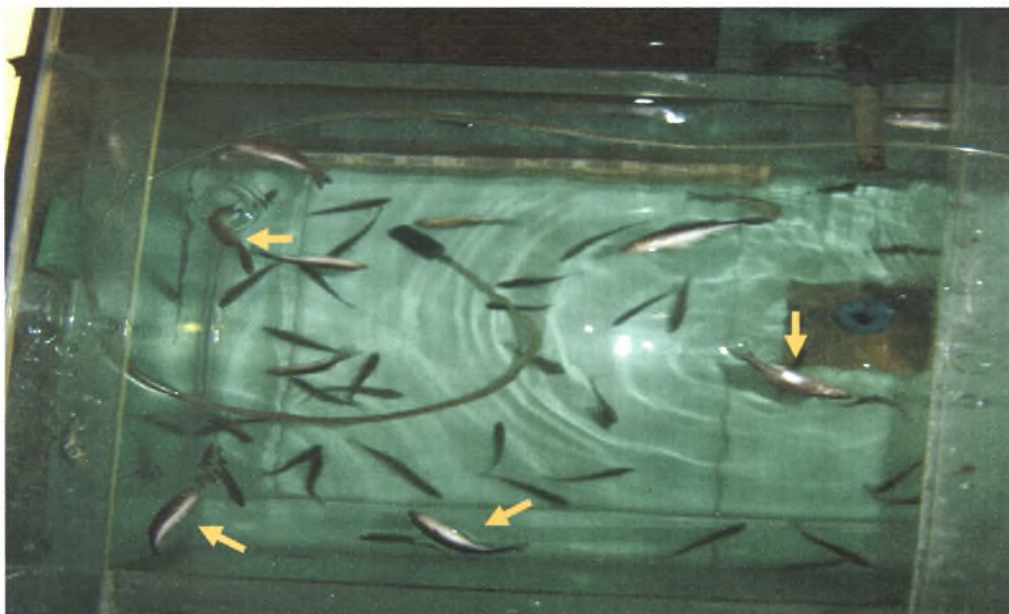
Πίνακας 14. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, την 6^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Γ1	18 / 24%	50%	5	53	3 M	2 I
Θ2	2 / 2%	20%	5	77	3 M	2 I
Θ3	4 / 5%	20%	5	76	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Την 7^η ημέρα, στο ενυδρείο Γ1 βρέθηκαν μόνο 5 νεκρά ψάρια στην επιφάνεια, πιθανώς λόγω της μεγάλης θνησιμότητας που παρατηρήθηκε την προηγούμενη ημέρα. Συμπτώματα εμφανίζονταν στο 50% των εναπομεινάντων ψαριών, ενώ περίπου 8 ψάρια κολυμπούσαν την περισσότερη ώρα στην επιφάνεια του νερού. Στο ενυδρείο Θ2 βρέθηκαν 3 νεκρά λαβράκια και 8 να κολυμπούν στην επιφάνεια. Γενικά, το 25% των ψαριών εμφάνιζε συμπτώματα. Στο ενυδρείο Θ3 βρέθηκαν 7 νεκρά ψάρια, ενώ το 70% των υπολοίπων εμφάνιζε νευρικά συμπτώματα. Δέκα από τα ψάρια αυτά κολυμπούσαν στην επιφάνεια του νερού (Πίνακας 15, Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Μεγάλο ποσοστό προσβεβλημένων από τη νόσο ψαριών. Τα βέλη δείχνουν ψάρια που επιπλέουν ζωντανά στην επιφάνεια του νερού με χαρακτηριστική στάση.

Πίνακας 15. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, την 7^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Γ1	5 / 9%	50%	5	43	3 M	2 I
Θ2	2 / 3%	25%	5	70	3 M	2 I
Θ3	7 / 9%	70%	5	64	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Την 8^η ημέρα βρέθηκαν νεκρά 4 λαβράκια στο ενυδρείο Γ1, 5 στο ενυδρείο με το θαλασσινό νερό (Θ3) και 8 στο ενυδρείο Θ2. Επισημαίνεται ότι στο τελευταίο ενυδρείο την ημέρα αυτή σημειώθηκε η μεγαλύτερη θνησιμότητα (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, την 8η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοιπα*	Αριθμός /Είδος εξέτασης	
Γ1	4 / 9%	50%	5	34	3 M	2 I
Θ2	8 / 11%	50%	5	57	3 M	2 I
Θ3	5 / 8%	70%	5	54	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Την 9^η ημέρα βρέθηκε 1 νεκρό λαβράκι στο ενυδρείο Γ1, ενώ από τα ζωντανά ψάρια, συμπτώματα εμφάνιζε ένα μικρό ποσοστό. Στο ενυδρείο με νερό ενδιάμεσης αλατότητας (Θ2) βρέθηκαν 2 νεκρά ψάρια, ενώ πολλά από τα ζωντανά επέπλεαν στην επιφάνεια του νερού. Στο ενυδρείο με το θαλασσινό νερό (Θ3) βρέθηκαν 5 νεκρά λαβράκια, εκ των οποίων τα 2 βρίσκονταν πάνω στην εξωτερική επιφάνεια της οροφής του ενυδρείου. Είναι γνωστό ότι λόγω των νευρικών συμπτωμάτων, τα ψάρια διεγείρονται έντονα και πολύ συχνά βρίσκονται εκτός των δεξαμενών τους. Στο συγκεκριμένο ενυδρείο παρατηρήθηκε έντονη διέγερση των λαβρακιών, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να βρίσκονται στην επιφάνεια του νερού, ενώ λίγα ήταν αυτά που φαίνονταν υγιή. Γενικά, σε όλα τα ενοφθαλμισμένα λαβράκια, ανεξαρτήτως της αλατότητας του νερού όπου διαβιούσαν, ο χρωματισμός του δέρματος ήταν πιο σκούρος από ότι τις πρώτες μέρες μετά τη μόλυνση και

κάποια από αυτά έδειχναν στοιχεία πλήρους απώλειας της όρασης τους (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, την 9^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοιπα*	Αριθμός/Είδος εξέτασης	
Γ1	1 / 3%	25%	5	28	3 M	2 I
Θ2	2 / 4%	50%	5	50	3 M	2 I
Θ3	5 / 9 %	80%	5	44	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Τη 10^η ημέρα βρέθηκαν νεκρά ακόμη 3 ψάρια στο ενυδρείο Γ1, 3 στο ενυδρείο Θ2 και 3 στο ενυδρείο Θ3 (Πίνακας 18).

Πίνακας 18. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 10^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοιπα*	Αριθμός/Είδος εξέτασης	
Γ1	3 / 11%	20%	5	20	3 M	2 I
Θ2	3 / 6%	50%	5	42	3 M	2 I
Θ3	3 / 7%	80%	5	36	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Την 11^η ημέρα, στο ενυδρείο Γ1 (γλυκό νερό, 0‰) βρέθηκε 1 νεκρό λαβράκι. Στο ενυδρείο Θ2 (ενδιάμεση αλατότητα, 18‰) βρέθηκαν 2 νεκρά λαβράκια και 2 με έλκη στο ρύγχος και τα βραγχιακά επικαλύμματα. Από τα υπόλοιπα ψάρια, τροφή λάμβαναν περίπου 10. Τα λαβράκια που ζούσαν στο ενυδρείο με το θαλασσινό νερό

(Θ3) ήταν όλα ζωντανά, όμως πολλά από αυτά επέπλεαν στην επιφάνεια του νερού και εμφάνιζαν νευρικά συμπτώματα, ενώ υπήρχε και ένα ψάρι με έλκη στην ουρά (Πίνακας 19, Εικόνα 13). Από τα 9 υπόλοιπα ψάρια που φαίνονταν υγιή, τα 5 τρέφονταν.

Πίνακας 19. Κατάσταση ενοφθαλισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, την 11^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοιπα*	Αριθμός/Είδος εξέτασης	
Γ1	1 / 5%	20%	5	14	3 M	2 I
Θ2	2 / 5%	50%	5	35	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	75%	5	31	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.



Εικόνα 13. Νεκρωτικές αλλοιώσεις στο ουραίο πτερύγιο λαβρακιού.

Τη 12^η ημέρα υπήρχαν 3 νεκρά λαβράκια στο ενυδρείο Γ1 και 1 στο ενυδρείο Θ2. Τα ψάρια του ενυδρείου Θ3 (θαλασσινό νερό) ήταν όλα ζωντανά (Πίνακας 20).

Πίνακας 20. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 12^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Γ1	3 / 21%	20%	5	6	3 M	2 I
Θ2	1 / 3%	50%	5	29	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	75%	5	26	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Τη 13^η ημέρα στο ενυδρείο Γ1 υπήρχε 1 λαβράκι με ελαφρά συμπτώματα, ενώ τα υπόλοιπα ήταν ενεργητικά και τρέφονταν. Στο ενυδρείο Θ2 υπήρχαν 5 λαβράκια με ελαφρά συμπτώματα και τα υπόλοιπα ήταν αρκετά ενεργητικά και τρέφονταν. Στο ενυδρείο Θ3 βρέθηκε 1 νεκρό λαβράκι του οποίου τα μάτια ήταν φαγωμένα, κάτι που δείχνει ότι κάποια ψάρια ήταν πολύ ενεργητικά και έψαχναν για τροφή. Επιπλέον στο ενυδρείο αυτό υπήρχαν και 5 ψάρια που επέπλεαν σχεδόν ακίνητα στην επιφάνεια του νερού και 2 με ελαφρά συμπτώματα (Πίνακας 21).

Πίνακας 21. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 13^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Γ1	0 / 0%	16%	5	1	3 M	2 I
Θ2	0 / 0%	30%	5	24	3 M	2 I
Θ3	1 / 4%	50%	5	20	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα, ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Τη 14^η ημέρα στο ενυδρείο με το γλυκό νερό (Γ1) υπήρχε 1 λαβράκι χωρίς συμπτώματα, οπότε αυτή ήταν η τελευταία ημέρα του πειράματος για το ενυδρείο Γ1.

Στο ενυδρείο Θ2 υπήρχε 1 ψάρι νεκρό, 2 ψάρια με ελαφρά συμπτώματα, ενώ τα υπόλοιπα ήταν πολύ ενεργητικά. Στο ενυδρείο Θ3 υπήρχαν 5 λαβράκια με ελαφρά συμπτώματα, ενώ τα υπόλοιπα ήταν και εδώ πολύ ενεργητικά (Πίνακας 22).

Πίνακας 22. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 14^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτ ων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Γ1	0 / 0%	0%	1	0	1 M	
Θ2	1 / 4%	10%	5	18	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	30%	5	15	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα νεκρά και τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Τη 15^η ημέρα δεν βρέθηκε νεκρό ψάρι σε κανένα από τα δύο πειραματικά ενυδρεία και η κατάσταση παρέμεινε η ίδια όπως την προηγούμενη ημέρα (Πίνακας 23).

Πίνακας 23. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 15^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Θ2	0 / 0%	10%	5	13	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	30%	5	10	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Τη 16^η ημέρα τα ψάρια των ενυδρείων Θ2 και Θ3 παρέμεναν ενεργητικά και φαίνονταν υγιή (Πίνακας 24).

Πίνακας 24. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 16^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Θ2	0 / 0%	5%	5	8	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	10%	5	5	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Τα ενοφθαλμισμένα λαβράκια συνέχιζαν να φαίνονται υγιή τη 17^η και τη 18^η ημέρα μετά τη μόλυνση με τον ιό. Έτσι ο πειραματισμός τελείωσε τη 17^η ημέρα για το ενυδρείο Θ3 και τη 18^η για το ενυδρείο Θ2 (Πίνακες 25 και 26).

Πίνακας 25. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 17^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Υπόλοι- πα*	Αριθμός/ Είδος εξέτασης	
Θ2	0 / 0%	0%	5	3	3 M	2 I
Θ3	0 / 0%	0%	5	0	3 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

* Ως υπόλοιπα ορίζονται τα ζωντανά ψάρια που παρέμεναν στο ενυδρείο, αφού είχαν αφαιρεθεί τα ψάρια που πάρθηκαν ως δείγματα την ημέρα αυτή.

Πίνακας 26. Κατάσταση ενοφθαλμισμένων λαβρακιών του 1^{ου} πειράματος, τη 18^η ημέρα.

Ενυδρείο	Νεκρά/ Ποσοστό %	Νευρικά συμπτώματα %	Αριθμός δειγμάτων	Αριθμός/Είδος εξέτασης	
Θ2	0 / 0%	0%	3	1 M	2 I

M= μοριακή εξέταση, I= ιστολογική εξέταση

Όσον αφορά στις τσιπούρες του 1^{ου} πειράματος, αυτές αναπτύχθηκαν φυσιολογικά όλο το διάστημα που διήρκησε το πείραμα και δεν παρατηρήθηκε καμία

διαφορά σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες των μαρτύρων. Δηλαδή δεν εμφανίστηκε καμία θνησιμότητα ούτε στις τσιπούρες-μάρτυρες, αλλά ούτε και στις ενοφθαλμισμένες με τις δύο διαφορετικές δόσεις του ιού (30 μl και 50 μl). Το πείραμα διήρκησε μέχρι τις 21/6/2006. Την ημέρα αυτή λήφθηκαν τα τελευταία ψάρια ως δείγματα.

Όσον αφορά στους μάρτυρες των λαβρακιών, κανένα από τα ψάρια δεν εμφάνισε νευρικά συμπτώματα, όμως βρέθηκαν κάποια νεκρά, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 27.

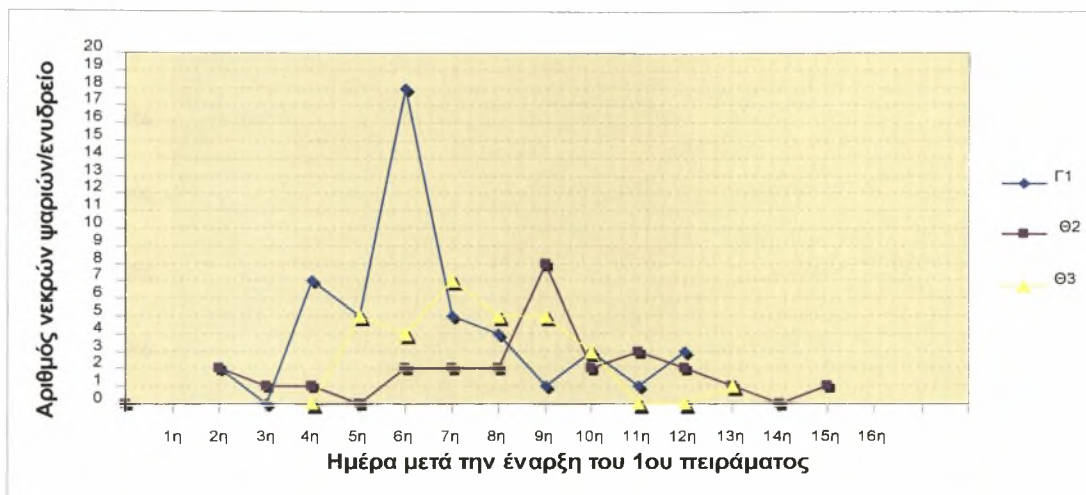
Πίνακας 27. Αριθμός νεκρών λαβρακιών ανά ενυδρείο-μάρτυρα και ανά ημέρα που διαπιστώθηκαν οι θάνατοι, μετά την έναρξη του 1^{ου} πειράματος.

Ενυδρείο	Ημερομηνία	Νεκρά
Γ2 (0‰)	1 ^η	1
Γ2	3 ^η	1
Θ1 (18‰)	8 ^η	1
Θ4 (33‰)	7 ^η	1
Θ4	16 ^η	1

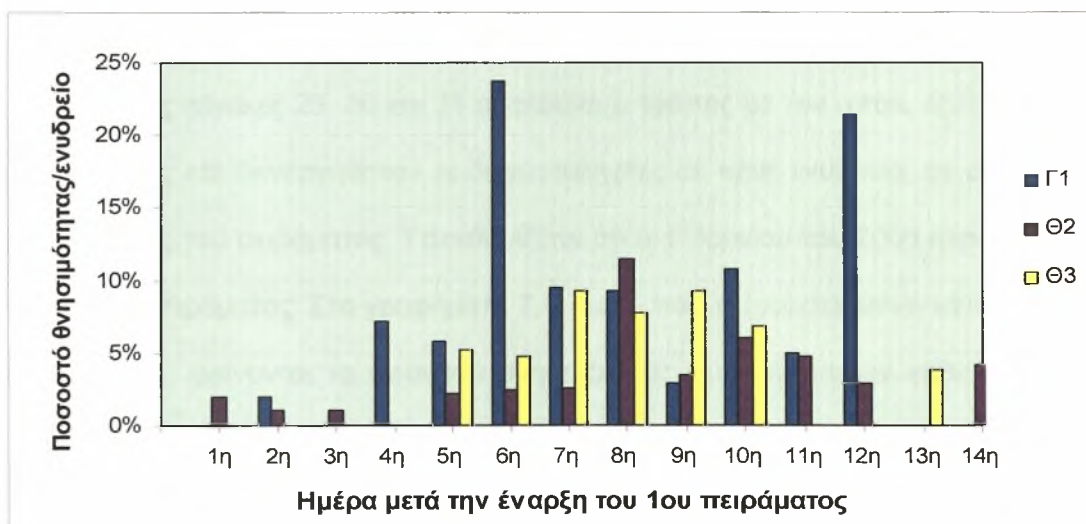
Στον πίνακα 28 φαίνεται ο μέσος όρος του ποσοστού της συνολικής θνησιμότητας των ψαριών, που παρατηρήθηκε σε κάθε ενυδρείο με ενοφθαλμισμένα λαβράκια, ενώ στα γραφήματα 4 και 5 παρουσιάζεται ο αριθμός των νεκρών λαβρακιών σε κάθε ενυδρείο, σε συνάρτηση με την ημέρα του πειράματος και το ποσοστό θνησιμότητας των λαβρακιών, ανά ενυδρείο και ανά ημέρα πειράματος, αντίστοιχα.

Πίνακας 28. Μέσος όρος ποσοστού συνολικής θνησιμότητας ανά ενυδρείο.

Ενυδρείο	Γ1 (αλατότητα 0‰)	Θ2 (αλατότητα 18‰)	Θ3 (αλατότητα 33‰)
Μ.Ο. θνησιμότητας	49%	27%	30%

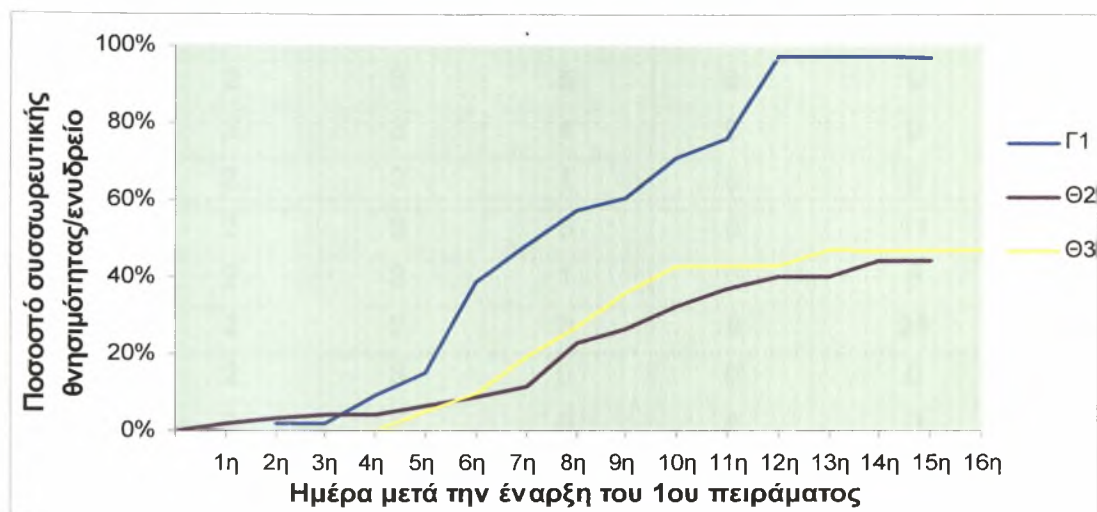


Γράφημα 4. Αριθμός νεκρών λαβρακιών ανά ενυδρείο και ανά ημέρα του 1^{ου} πειράματος.



Γράφημα 5. Ποσοστό θνησιμότητας ψαριών ανά ενυδρείο και ανά ημέρα του 1^{ου} πειράματος.

Στο γράφημα 6 φαίνεται η διαφορά στην εξέλιξη της συσσωρευτικής θνησιμότητας για κάθε ένα από τα ενυδρεία. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικώς σημαντική μεταξύ των ενυδρείων Γ1-Θ2 (0,022, Games-Howell) και Γ1-Θ3 (0,046, Games-Howell), όχι όμως μεταξύ των ενυδρείων Θ2 και Θ3.



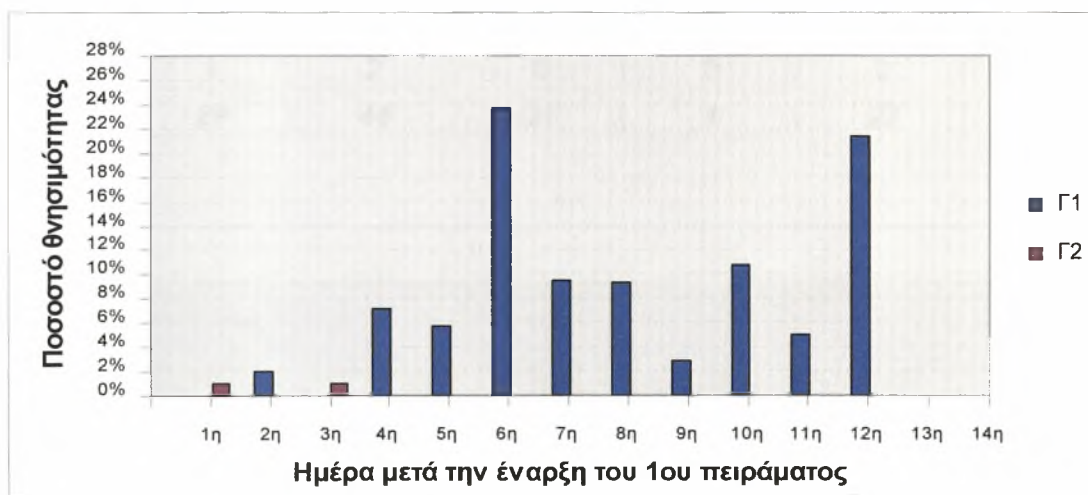
Γράφημα 6. Ποσοστό συσσωρευτικής θνησιμότητας ανά ενυδρείο και ανά ημέρα του πειράματος.

Στους πίνακες 29, 30 και 31 αναλύεται ο τρόπος με τον οποίο εξελίχθηκαν οι θνησιμότητες και διενεργήθηκαν οι δειγματοληψίες σε κάθε ενυδρείο, σε συνάρτηση με τις ημέρες του πειράματος. Υπενθυμίζεται ότι η 1^η Ιουνίου του 2006 ήταν η πρώτη ημέρα του πειράματος. Στα γραφήματα 7, 8 και 9, που παρουσιάζονται κάτω από τον κάθε πίνακα, φαίνονται τα ποσοστά θνησιμότητας των λαβρακιών κάθε ενυδρείου ανά ημέρα πειράματος.

Πίνακας 29. Θνησιμότητες και δειγματοληψίες στα ενυδρεία Γ1 (αλατότητα 0‰, μολυσμένα ψάρια) και Γ2 (αλατότητα 0‰, ψάρια-μάρτυρες) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.

Ημέρα πειράματος	Δείγματα για ιστολογική εξέταση	Δείγματα για μοριακή εξέταση	Νεκρά ψάρια (ενυδρείο Γ1)	Νεκρά ψάρια (ενυδρείο Γ2)	% θνησιμότητα (ενυδρείο Γ1)	% θνησιμότητα (ενυδρείο Γ2)
0	0	0	0	0	0	0
1 ^η	0	0	0	1	0	1
2 ^η	0	0	2	0	2	0
3 ^η	0	0	0	1	0	1
4 ^η	2	3	7	0	7	0
5 ^η	2	3	5	0	6	0

6 ^η	2	3	18	0	24	0
7 ^η	2	3	5	0	9	0
8 ^η	2	3	4	0	9	0
9 ^η	2	3	1	0	3	0
10 ^η	2	3	3	0	11	0
11 ^η	2	3	1	0	5	0
12 ^η	2	3	3	0	21	0
13 ^η	2	3	0	0	0	0
14 ^η	0	1	0	0	0	0
Σύνολο	20	31	49	2		



Γράφημα 7. Ποσοστό θνησιμότητας των ψαριών ανά ημέρα στα ενυδρεία Γ1 (αλατότητα 0‰) και Γ2 (μάρτυρας του Γ1).

Πίνακας 30. Θνησιμότητες και δειγματοληψίες στα ενυδρεία Θ2 (αλατότητα 18‰, μολυσμένα ψάρια) και Θ1 (αλατότητα 18‰, ψάρια-μάρτυρες) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.

Ημέρα πειράματος	Δείγματα για ιστολογική εξέταση	Δείγματα για μοριακή εξέταση	Νεκρά ψάρια (ενυδρείο Θ2)	Νεκρά ψάρια (ενυδρείο Θ1)	% θνησιμότητα (ενυδρείο Θ2)	% θνησιμότητα (ενυδρείο Θ1)
0	0	0	0	0	0	0
1 ^η	0	0	2	0	2	0
2 ^η	0	0	1	0	1	0
3 ^η	0	0	1	0	1	0
4 ^η	2	3	0	0	0	0

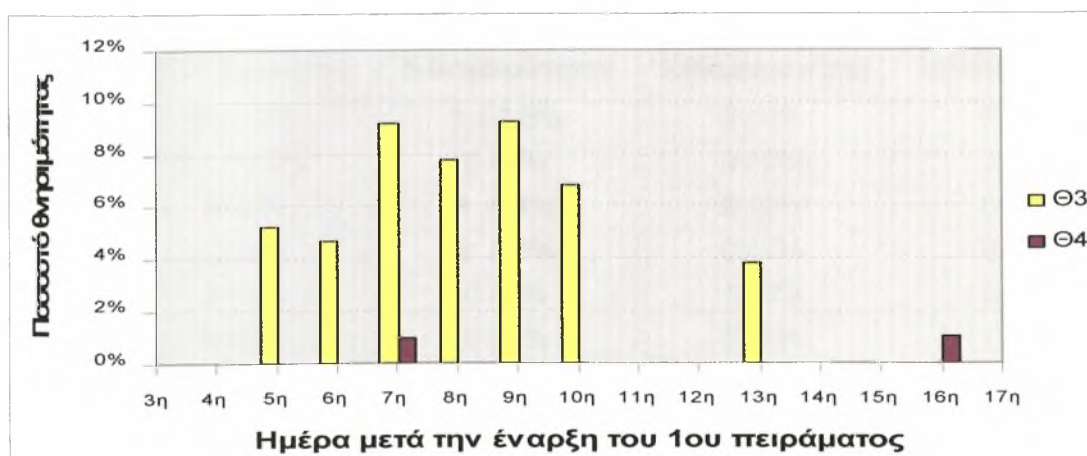
5 ^η	2	3	2	0	2	0
6 ^η	2	3	2	0	2	0
7 ^η	2	3	2	0	3	0
8 ^η	2	3	8	1	11	1
9 ^η	2	3	2	0	4	0
10 ^η	2	3	3	0	6	0
11 ^η	2	3	2	0	5	0
12 ^η	2	3	1	0	3	0
13 ^η	2	3	0	0	0	0
14 ^η	2	3	1	0	4	0
15 ^η	2	3	0	0	0	0
16 ^η	2	3	0	0	0	0
17 ^η	2	3	0	0	0	0
18 ^η	1	2	0	0	0	0
Σύνολο	29	44	27	1	27	1



Γράφημα 8. Ποσοστό θνησιμότητας των ψαριών ανά ημέρα στα ενυδρεία Θ2 (αλατότητα 18‰) και Θ1(μάρτυρας του Θ2).

Πίνακας 31. Θνησιμότητες και δειγματοληψίες στα ενυδρεία Θ3 (αλατότητα 33‰, μολυσμένα ψάρια) και Θ4 (αλατότητα 33‰, ψάρια-μάρτυρες) κατά τη διάρκεια του 1^{ου} πειράματος.

Ημέρα πειράματος	Δείγματα για ιστολογική εξέταση	Δείγματα για μοριακή εξέταση	Νεκρά ψάρια (ενυδρείο Θ3)	Νεκρά ψάρια (ενυδρείο Θ4)	% θνησιμότητα (ενυδρείο Θ3)	% θνησιμότητα (ενυδρείο Θ4)
0	0	0	0	0	0	0
1 ^η	0	0	0	0	0	0
2 ^η	0	0	0	0	0	0
3 ^η	0	0	0	0	0	0
4 ^η	2	3	0	0	0	0
5 ^η	2	3	5	0	5	0
6 ^η	2	3	4	0	5	0
7 ^η	2	3	7	1	9	1
8 ^η	2	3	5	0	8	0
9 ^η	2	3	5	0	9	0
10 ^η	2	3	3	0	7	0
11 ^η	2	3	0	0	0	0
12 ^η	2	3	0	0	0	0
13 ^η	2	3	1	0	4	0
14 ^η	2	3	0	0	0	0
15 ^η	2	3	0	0	0	0
16 ^η	2	3	0	1	0	1
17 ^η	2	3	0	0	0	0
Σύνολο	28	42	30	2	30	2



Γράφημα 9. Ποσοστό θνησιμότητας των λαβρακίων ανά ημέρα στα ενυδρεία Θ3 (αλατότητα 33‰) και Θ4 (μάρτυρας του Θ3).

1.4. Κλινική εξέταση των λαβρακιών του δευτέρου πειράματος

Το δεύτερο πείραμα περιελάμβανε δύο ομάδες πειραματικά μολυσμένων λαβρακιών [ενυδρεία: Θ6 (αλατότητα 0‰) και Θ7 (αλατότητα 20‰)] και τους αντίστοιχους μάρτυρες (ενυδρεία: Θ8 (αλατότητα 0‰) και Θ9 (αλατότητα 20‰)].

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα μολυσμένα ψάρια εμφάνιζαν φυσιολογική κίνηση και φυσιολογική αντίδραση σε ερεθίσματα. Η όρεξη των ψαριών ήταν επίσης φυσιολογική και γενικά δεν εμφανίστηκε κανένα σύμπτωμα κατά τη διάρκεια των 39 ημερών που διήρκησε το πείραμα. Παρόλα αυτά, εκδηλώθηκαν μικρή θνησιμότητα η οποία αναλύεται στον πίνακα 32, που ακολουθεί. Στον ίδιο πίνακα φαίνεται και η θνησιμότητα που παρατηρήθηκε στα ενυδρεία που διαβίωναν τα αντίστοιχα ψάρια-μάρτυρες. Επιπλέον, στα γραφήματα 10 και 11 παρουσιάζονται τα ποσοστά θνησιμότητας που διαπιστώθηκαν ανά ημέρα πειράματος στα μολυσμένα ψάρια και τα ψάρια-μάρτυρες.

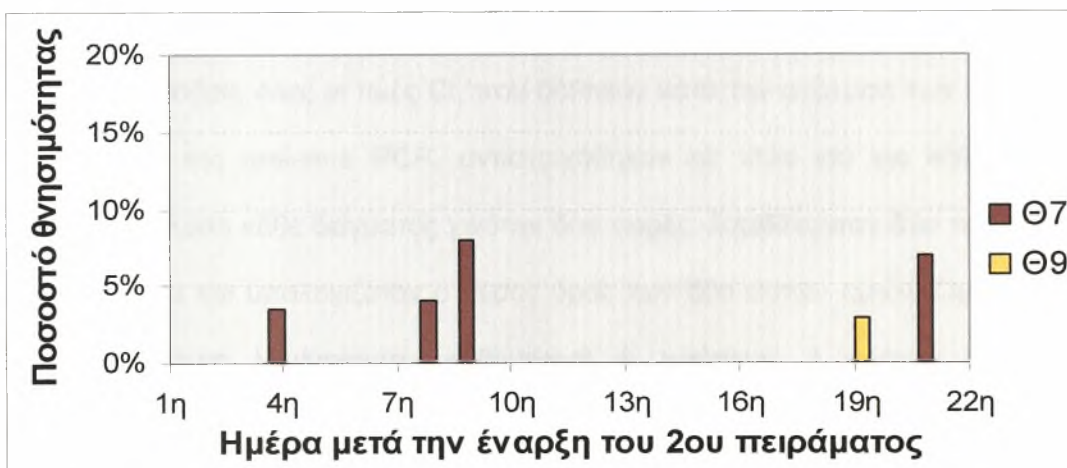
Πίνακας 32. Εξέλιξη θνησιμοτήτων στα ενυδρεία με τα ψάρια-πειραματόζωα [(Θ6 (αλατότητα 0‰), Θ7 (αλατότητα 20‰)] και τα ψάρια-μάρτυρες [(Θ8 (αλατότητα 0‰), Θ9 (αλατότητα 20‰)] κατά τη διάρκεια του 2^{ου} πειράματος.

Ημέρα πειράματος	Ενυδρείο Θ7 (Νεκρά ψάρια / %θνησιμότητα)	Ενυδρείο Θ6 (Νεκρά ψάρια / %θνησιμότητα)	Ενυδρείο Θ9 (Νεκρά ψάρια / %θνησιμότητα)	Ενυδρείο Θ8 (Νεκρά ψάρια / %θνησιμότητα)
4 ^η	2 / 7%	1 / 3,5%	0 / 0%	0 / 0%
7 ^η	3 / 12,5%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
8 ^η	0 / 0%	1 / 4%	0 / 0%	0 / 0%
9 ^η	0 / 0%	2 / 8%	0 / 0%	0 / 0%
13 ^η	0 / 0%	0 / 0%	1 / 3%	0 / 0%
19 ^η	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	1 / 3%
21 ^η	0 / 0%	1 / 7%	0 / 0%	0 / 0%
22 ^η	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
23 ^η	1 / 9%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
26 ^η *	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%	0 / 0%
Σύνολο	6 / 20%	5 / 16,5%	1 / 3%	1 / 3%

* Παρότι το πείραμα διήρκησε 39 ημέρες, εδώ περιγράφεται η εξέλιξη μέχρι την 26^η ημέρα, διότι την ημέρα αυτή βρέθηκε το τελευταίο νεκρό ψάρι.



Γράφημα 10. Ποσοστό θνησιμότητας των λαβρακιών ανά ημέρα στα ενυδρεία Θ6 (αλατότητα 0‰) και Θ8 (μάρτυρας του Θ6).



Γράφημα 11. Ποσοστό θνησιμότητας των λαβρακιών ανά ημέρα στα ενυδρεία Θ7 (αλατότητα 20‰) και Θ9 (μάρτυρας του Θ7).

2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

2.1. Μοριακές εξετάσεις

2.1.1. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)

Η κλασική PCR, που χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί αν τα ψάρια (ιχθυογεννητικού σταθμού), που αποτέλεσαν το υλικό για όλα τα πειράματα, δεν είχαν προσβληθεί από τον Noda-ιό, εφαρμόστηκε σε ποσοστό 3% του αρχικού πληθυσμού τους. Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν αρνητικά.

2.1.2. Έλεγχος των ψαριών του πρώτου και του δευτέρου πειράματος με Real-time PCR

A. Φωτομέτρηση εκχυλισμένων δειγμάτων

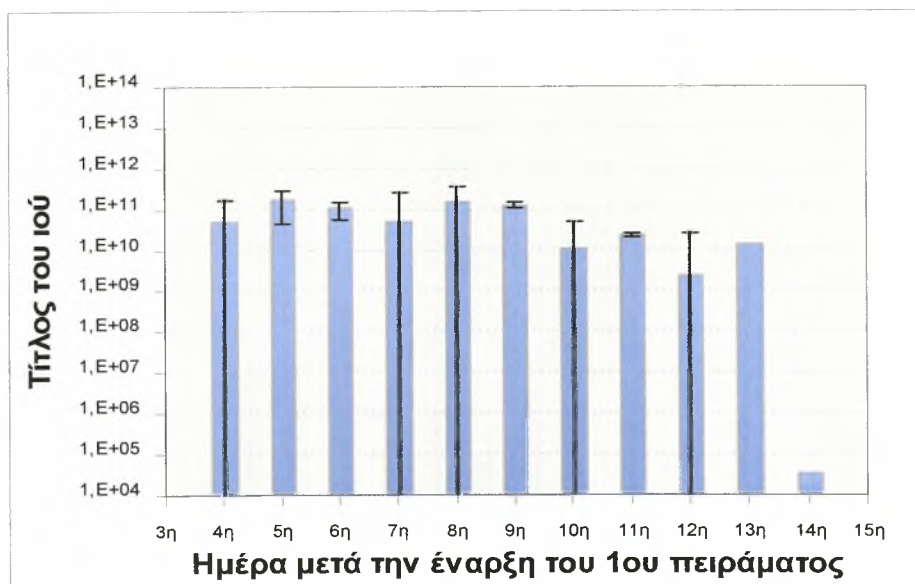
Πριν από την εφαρμογή της μεθόδου έγινε φωτομετρικός έλεγχος των δειγμάτων και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων, υπολογίστηκε η ποσότητα του RNA σε μg ανά μl δείγματος. Για τη διάγνωση με τη συγκεκριμένη μοριακή μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα με λόγο $D260 \text{ nm} / D280 \text{ nm} \geq 1,8$.

B. Τιτλοποίηση των δειγμάτων παθολογικού υλικού (οφθαλμοί) από τα ψάρια του πρώτου πειράματος

Μετά τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης τιτλοποίησης (κεφάλαιο 2.15.Γ., *Υλικά και Μέθοδοι*), όλες οι τιμές Ct, που δόθηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων στη συσκευή της real-time PCR, αντιστοιχήθηκαν σε τίτλο ιού για κάθε δείγμα. Επειδή η ανάλυση κάθε δείγματος γινόταν δύο φορές, λαμβάνονταν δύο τιμές τίτλου ιού ανά δείγμα και υπολογιζόταν ο μέσος όρος των δύο αυτών τιμών. Όμως για τη μοριακή ανάλυση λαμβάνονταν καθημερινά οι οφθαλμοί 3 ψαριών από κάθε ενυδρείο, οπότε τελικά υπήρχαν 3 μέσοι όροι τίτλων ιού την ημέρα. Από τους τίτλους αυτούς, υπολογίστηκε ο μέσος όρος ανά ημέρα πειράματος. Στους πίνακες 33, 34 και 35, καθώς και στα γραφήματα 12, 13 και 14 παρουσιάζονται ανά ενυδρείο οι εν λόγω μέσοι όροι του ιού στα λαβράκια, ενώ στους πίνακες 36 και 37 και στα γραφήματα 15 και 16 παρουσιάζονται οι ημερήσιοι μέσοι όροι του ιού στις τσιπούρες. Όπως διαπιστώνεται από τους πίνακες και τα γραφήματα που αφορούν στις τσιπούρες, ο ιός απομονωνόταν σταθερά από τους ιστούς τους, παρότι αυτές δεν εκδήλωσαν συμπτώματα. Στα ενυδρεία με τα ψάρια-μάρτυρες δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα.

Πίνακας 33. Μέσος όρος των τίτλων του ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στα λαβράκια του ενυδρείου Γ1 (30 μl ιού, αλατότητα 0‰).

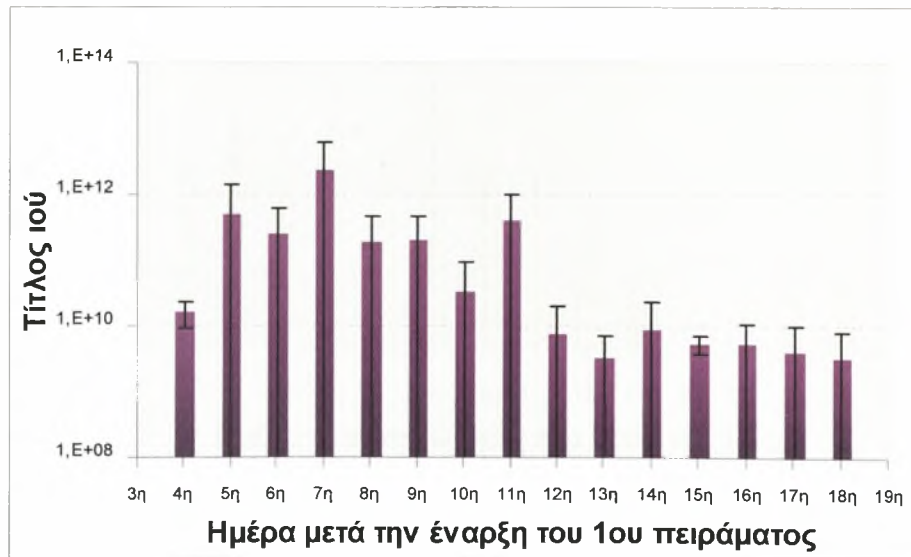
Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
4 ^η	$4,8 \times 10^{10}$
5 ^η	$1,6 \times 10^{11}$
6 ^η	1×10^{11}
7 ^η	5×10^{10}
8 ^η	$1,5 \times 10^{11}$
9 ^η	$1,2 \times 10^{11}$
10 ^η	$1,1 \times 10^{10}$
11 ^η	$2,3 \times 10^{10}$
12 ^η	2×10^9
13 ^η	$1,3 \times 10^{10}$
14 ^η	$3,4 \times 10^4$



Γράφημα 12. Ενυδρείο Γ1: μέσος όρος των τίτλων του ιού στα λαβράκια ανά ημέρα.

Πίνακας 34. Μέσος όρος των τίτλων του ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στα λαβράκια του ενυδρείου Θ2 (30 μl ιού, αλατότητα 18‰).

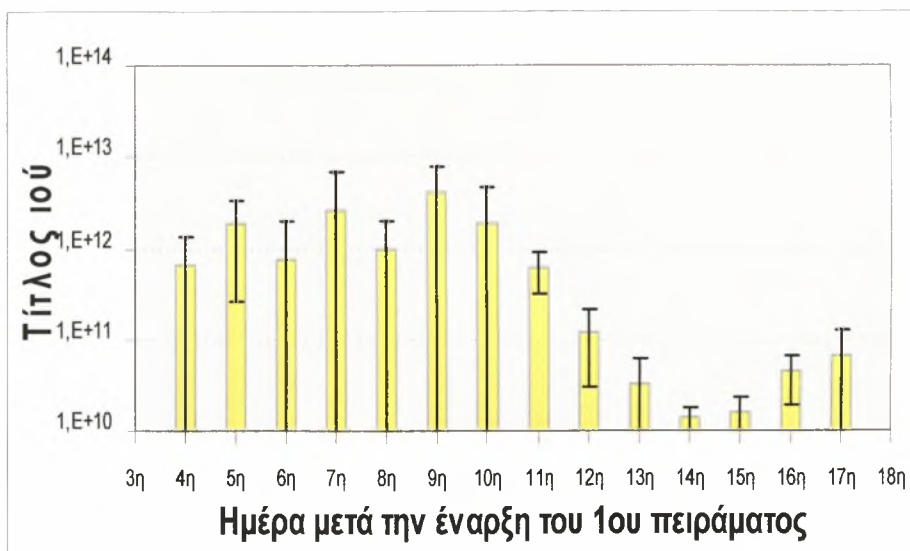
Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
4 ^η	$1,6 \times 10^{10}$
5 ^η	$5,1 \times 10^{11}$
6 ^η	$2,4 \times 10^{11}$
7 ^η	$2,3 \times 10^{12}$
8 ^η	$1,9 \times 10^{11}$
9 ^η	2×10^{11}
10 ^η	$3,3 \times 10^{10}$
11 ^η	4×10^{11}
12 ^η	7×10^9
13 ^η	3×10^9
14 ^η	8×10^9
15 ^η	5×10^9
16 ^η	5×10^9
17 ^η	4×10^9
18 ^η	3×10^9



Γράφημα 13. Ενυδρείο Θ2: μέσος όρος των τίτλων του ιού στα λαβράκια ανά ημέρα.

Πίνακας 35. Μέσος όρος των τίτλων ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στα λαβράκια του ενυδρείου Θ3 (30 μλ ιού, αλατότητα 33‰).

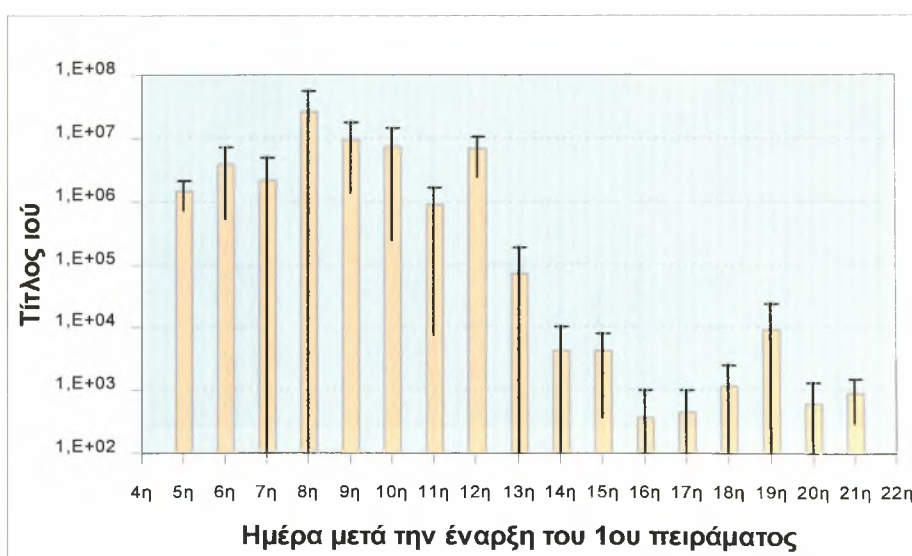
Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
4 ^η	$6,6 \times 10^{11}$
5 ^η	$1,8 \times 10^{12}$
6 ^η	$7,6 \times 10^{11}$
7 ^η	$2,6 \times 10^{12}$
8 ^η	$9,7 \times 10^{11}$
9 ^η	$3,9 \times 10^{12}$
10 ^η	$1,8 \times 10^{12}$
11 ^η	$6,3 \times 10^{11}$
12 ^η	$1,2 \times 10^{11}$
13 ^η	$3,2 \times 10^{10}$
14 ^η	$1,3 \times 10^{10}$
15 ^η	$1,6 \times 10^{10}$
16 ^η	$4,3 \times 10^{10}$
17 ^η	$6,4 \times 10^{10}$



Γράφημα 14. Ενυδρείο Θ3: μέσος όρος των τίτλων του ιού στα λαβράκια ανά ημέρα.

Πίνακας 36. Μέσος όρος των τίτλων του ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στις τσιπούρες του ενυδρείου T1 (30 μl ιού, αλατότητα 30‰).

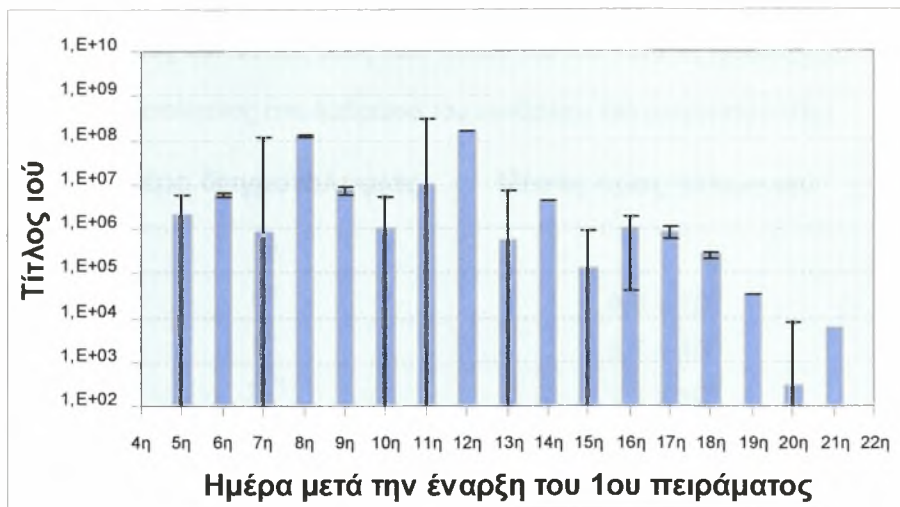
Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
5 ^η	$1,4 \times 10^6$
6 ^η	$3,8 \times 10^6$
7 ^η	$2,1 \times 10^6$
8 ^η	$2,5 \times 10^7$
9 ^η	$9,2 \times 10^6$
10 ^η	$7,3 \times 10^5$
11 ^η	8×10^6
12 ^η	$6,5 \times 10^6$
13 ^η	7×10^4
14 ^η	4×10^3
15 ^η	4×10^3
16 ^η	367
17 ^η	428
18 ^η	1×10^3
19 ^η	9×10^3
20 ^η	612
21 ^η	894



Γράφημα 15. Ενυδρείο T1: μέσος όρος των τίτλων του ιού στις τσιπούρες ανά ημέρα.

Πίνακας 37. Μέσος όρος των τίτλων του ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στις τσιπούρες του ενυδρείου T2 (50 μl ιού, αλατότητα 30‰).

Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
5 ^η	$2,1 \times 10^6$
6 ^η	$5,9 \times 10^6$
7 ^η	8×10^5
8 ^η	$1,2 \times 10^8$
9 ^η	$7,3 \times 10^6$
10 ^η	1×10^6
11 ^η	1×10^7
12 ^η	$1,6 \times 10^8$
13 ^η	5×10^5
14 ^η	$4,2 \times 10^6$
15 ^η	1×10^5
16 ^η	9×10^5
17 ^η	8×10^5
18 ^η	2×10^5
19 ^η	3×10^4
20 ^η	274
21 ^η	5×10^3



Γράφημα 16. Ενυδρείο T2: μέσος όρος των τίτλων του ιού στις τσιπούρες ανά ημέρα.

Από τη στατιστική μελέτη των τίτλων του ιού ανά ενυδρείο με λαβράκια προέκυψε ότι, με βάση την αλατότητα του νερού, υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στους τίτλους αυτούς μεταξύ των ενυδρείων Γ1-Θ3 (0,012, Games-Howell), Γ1-Θ2 (0,037, Games-Howell) και Θ2-Θ3 (0,009, Dunnett). Αντίθετα, για τις τσιπούρες δεν διαπιστώθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ενυδρείων.

Γ. Τιτλοποίηση των δειγμάτων παθολογικού υλικού (οφθαλμοί) από τα ψάρια του δευτέρου πειράματος

Στο 2^ο πείραμα, η ανεύρεση του μέσου όρου των τίτλων του ιού κάθε δείγματος έγινε όπως και στο 1^ο πείραμα, με τη διαφορά ότι εδώ οι δειγματοληψίες γίνονταν κάθε τρεις ημέρες και λαμβάνονταν οι οφθαλμοί 2 λαβρακιών από κάθε ενυδρείο, οπότε οι μέσοι όροι των τίτλων του ιού ανά ημέρα δειγματοληψίας ήταν δύο. Στα ενυδρεία με τα ψάρια-μάρτυρες δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα. Στους πίνακες 38 και 39, καθώς και στα γραφήματα 17 και 18 παρουσιάζονται ανά ενυδρείο οι μέσοι αυτοί όροι του ιού.

Πίνακας 38. Μέσος όρος των τίτλων του ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στα λαβράκια του ενυδρείου Θ6 (αλατότητα 0‰).

Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
3 ^η	0
6 ^η	$9,6 \times 10^5$
9 ^η	$5,7 \times 10^5$
12 ^η	$1,1 \times 10^5$
15 ^η	$4,7 \times 10^5$
18 ^η	5×10^3
21 ^η	728
24 ^η	$1,1 \times 10^4$
27 ^η	2×10^3
30 ^η	$1,4 \times 10^4$

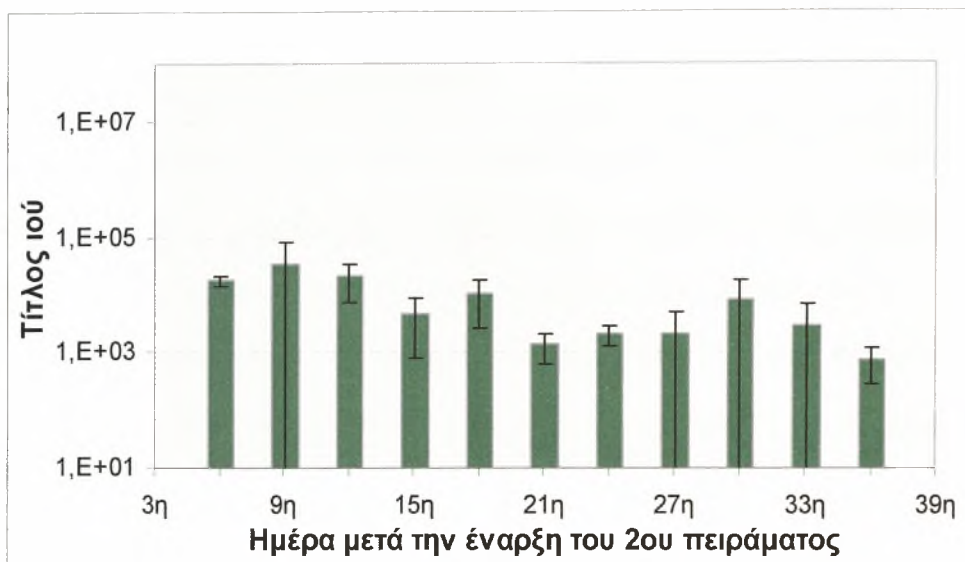
33 ^η	5 x 10 ³
36 ^η	328



Γράφημα 17. Ενυδρείο Θ6: μέσος όρος των τίτλων του ιού στα λαβράκια ανά ημέρα.

Πίνακας 39. Μέσος όρος των τίτλων του ιού κατά τις ημέρες της δειγματοληψίας στα λαβράκια του ενυδρείου Θ7 (αλατότητα 20‰).

Ημέρα δειγματοληψίας	Μέσος όρος τίτλων ιού
3 ^η	0
6 ^η	1,7 x 10 ⁴
9 ^η	3,3 x 10 ⁴
12 ^η	2,1 x 10 ⁴
15 ^η	4 x 10 ³
18 ^η	1 x 10 ⁴
21 ^η	1 x 10 ³
24 ^η	2 x 10 ³
27 ^η	2 x 10 ³
30 ^η	8 x 10 ³
33 ^η	2 x 10 ³
36 ^η	745



Γράφημα 18. Ενυδρείο Θ7: μέσος όρος των τίτλων του ιού στα λαβράκια ανά ημέρα.

2.2. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της real-time PCR (Sequencing)

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων της real-time PCR έγινε για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα της μεθόδου αυτής. Επίσης έγινε και για να διερευνηθεί αν υπάρχει συγγένεια με τα αντίστοιχα γονιδιακά τμήματα που έχουν προσδιοριστεί μέχρι στιγμής σε άλλα είδη ψαριών και κυρίως με εκείνα του λαβρακιού.

Από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των τμημάτων αυτών προέκυψε ότι συγγενεύουν με τα αντίστοιχα γονιδιακά τμήματα από άλλα είδη ψαριών και ότι δεν υπήρξε μετάλλαξη παρόλες τις διόδους που έγιναν κατά τη διάρκεια του πειράματος σε λαβράκι και σε τσιπούρα. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού το γονίδιο της πολυμεράσης είναι εξελικτικά συντηρημένο στους ιούς.

2.3. Απομόνωση του ιού από τα ψάρια του πρώτου και δευτέρου πειράματος με ενοφθαλισμό των κυττάρων SSN-1

Κατά τη διάρκεια του πρώτου πειράματος και από την 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση των ψαριών, ένα από τα ζωντανά ψάρια που συλλέγονταν καθημερινά από κάθε ενυδρείο χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση του ιού. Συγκεκριμένα, η συλλογή των ψαριών από το ενυδρείο Γ1 διήρκησε 11 ημέρες (4^η -14^η), από το Θ2 15 ημέρες (4^η-18^η), από το Θ3 14 ημέρες (4^η-17^η) και από τα ενυδρεία Τ1 και Τ2 διήρκησε 17 ημέρες (5^η-21^η). Επίσης κατά το 2^ο πείραμα από τα ενυδρεία Θ6 και Θ7 συλλέγονταν ψάρια για 12 ημέρες ανά τριήμερο, αρχής γενομένης από την 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση.

Τα παθολογικά υλικά από τα ψάρια δύο διαδοχικών ημερών, μετά την κατεργασία τους, αναμιγνύονταν και μέρος του μίγματος αυτού χρησιμοποιούνταν για τον ενοφθαλισμό των κυτταροκαλλιιεργειών SSN-1. Στον πίνακα 40 φαίνεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε και τα δείγματα με τα οποία ενοφθαλμίστηκαν οι καλλιέργειες.

Πίνακας 40. Δειγματοληψίες από τα ψάρια του κάθε ενυδρείου που χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση του Noda-ιού.

α/α δείγματος	Προέλευση δείγματος (ενυδρείο)	Ημέρα συλλογής δείγματος	Κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα
1	Γ1	4 ^η και 5 ^η	+
2	Γ1	6 ^η και 7 ^η	+
3	Γ1	8 ^η και 9 ^η	+
4	Γ1	10 ^η και 11 ^η	+
5	Γ1	12 ^η και 13 ^η	+
6	Γ1	14 ^η	+
7	Θ2	4 ^η και 5 ^η	+
8	Θ2	6 ^η και 7 ^η	+
9	Θ2	8 ^η και 9 ^η	+

10	Θ2	10 ^η και 11 ^η	+
11	Θ2	12 ^η και 13 ^η	+
12	Θ2	14 ^η και 15 ^η	+
13	Θ2	16 ^η και 17 ^η	+
14	Θ2	18 ^η	+
15	Θ3	4 ^η και 5 ^η	+
16	Θ3	6 ^η και 7 ^η	+
17	Θ3	8 ^η και 9 ^η	+
18	Θ3	10 ^η και 11 ^η	+
19	Θ3	12 ^η και 13 ^η	+
20	Θ3	14 ^η και 15 ^η	+
21	Θ3	16 ^η και 17 ^η	+
22	T1	5 ^η και 6 ^η	+
23	T1	7 ^η και 8 ^η	+
24	T1	9 ^η και 10 ^η	+
25	T1	11 ^η και 12 ^η	+
26	T1	13 ^η και 14 ^η	+
27	T1	15 ^η και 16 ^η	-
28	T1	17 ^η και 18 ^η	-
29	T1	19 ^η και 20 ^η	+
30	T1	21 ^η	-
31	T2	5 ^η και 6 ^η	+
32	T2	7 ^η και 8 ^η	+
33	T2	9 ^η και 10 ^η	+
34	T2	11 ^η και 12 ^η	+
35	T2	13 ^η και 14 ^η	+
36	T2	15 ^η και 16 ^η	+
37	T2	17 ^η και 18 ^η	+
38	T2	19 ^η και 20 ^η	-

39	T2	21 ^η	-
40	Θ6	3 ^η και 6 ^η	+
41	Θ6	9 ^η και 12 ^η	+
42	Θ6	15 ^η και 18 ^η	+
43	Θ6	21 ^η και 24 ^η	+
44	Θ6	27 ^η και 30 ^η	-
45	Θ6	33 ^η και 36 ^η	-
46	Θ7	3 ^η και 6 ^η	+
47	Θ7	9 ^η και 12 ^η	+
48	Θ7	15 ^η και 18 ^η	-
49	Θ7	21 ^η και 24 ^η	-
50	Θ7	27 ^η και 30 ^η	-
51	Θ7	33 ^η και 36 ^η	-

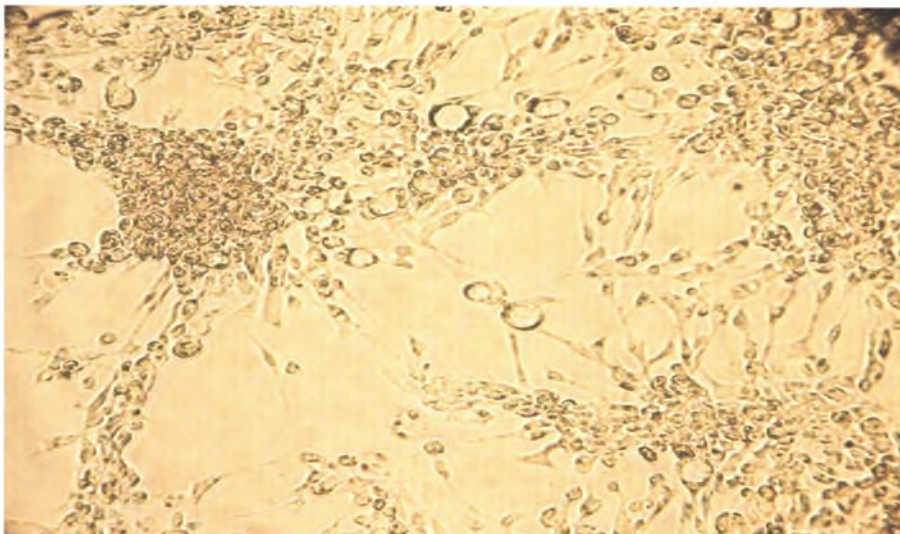
+ : Θετικό αποτέλεσμα - : Αρνητικό αποτέλεσμα

Το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα χαρακτηριζόταν από την παρουσία περιοχών με κυκλικά και κοκκιώδη κύτταρα στο ταπήτιο, που στη συνέχεια εξαπλώνονταν και εκφυλίζονταν, όπως περιγράφηκε αρχικά από τους Fregichs και συν. (1996). Έτσι, από την 4^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων, άρχισαν να εμφανίζονται τα κενοτόπια στα κύτταρα, τα οποία αυξάνονταν σε μέγεθος και αριθμό και, περίπου την 8^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό, η μονοστοιβάδα άρχιζε να εκφυλίζεται. Δηλαδή τα κύτταρα νεκρώνονταν και το μονόστοιβο ταπήτιο συρρικνωνόταν μέχρι την πλήρη καταστροφή του (Εικόνες 14-19). Όλα τα δείγματα λαβρακιών (Πίνακας 40), που προέρχονταν από τα ενυδρεία Γ1, Θ2 και Θ3, έδωσαν θετικά αποτελέσματα από την πρώτη μέχρι την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας, χωρίς η αλατότητα του νερού να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό του ιού στον οργανισμό τους.

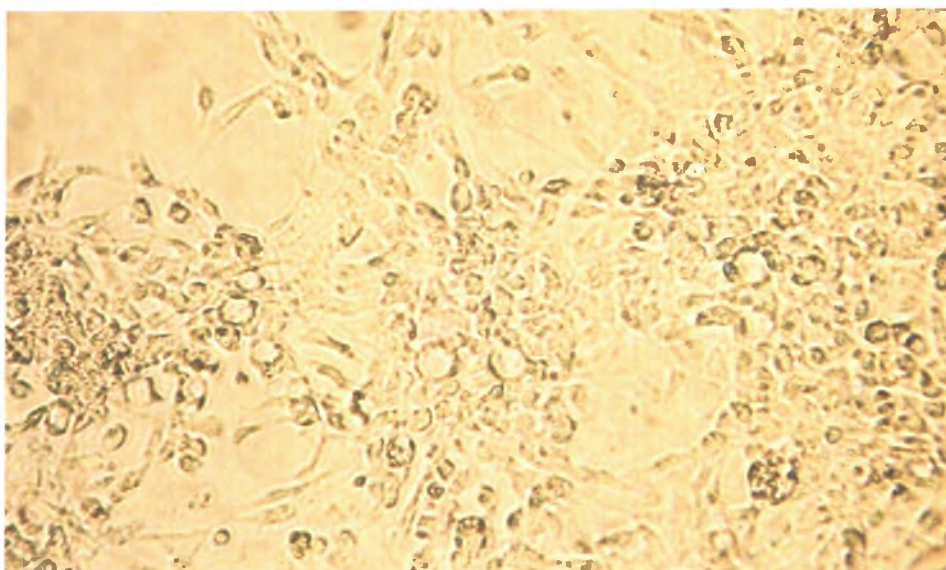
Σχετικά με τις τσιπούρες του πρώτου πειράματος (Πίνακας 40), στο ενυδρείο T1, όπου τα ψάρια μολύνθηκαν με 30 μl ιού, θετικά ήταν 5 από τα 9 δείγματα (5^η έως

14^η ημέρα μετά τη μόλυνση), ενώ από εκείνες του ενυδρείου T2 (50 μl ιού), θετικό αποτέλεσμα έδωσαν περισσότερα δείγματα (7 από τα 9) και ειδικότερα όσα πάρθηκαν μεταξύ 5^{ης} και 18^{ης} ημέρας.

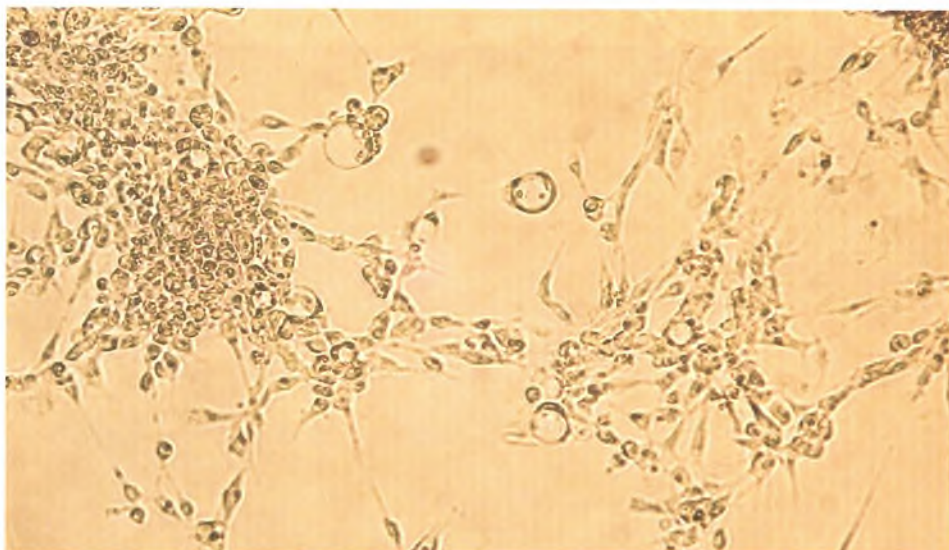
Στο δεύτερο πείραμα, από τα λαβράκια που μολύνθηκαν με χορήγηση οφθαλμών μολυσμένων τσιπούρων του πρώτου πειράματος, ο ιός απομονώθηκε για πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα (Πίνακας 40). Συγκεκριμένα, από τα ψάρια του ενυδρείου Θ6 (αλατότητα 0‰), απομόνωση του ιού επιτεύχθηκε από το μίγμα παθολογικών υλικών τεσσάρων δειγματοληψιών (3^η έως την 24^η ημέρα), ενώ από τα ψάρια του Θ7 (αλατότητα 20‰), ιός απομονώθηκε μόνο στις δύο πρώτες δειγματοληψίες (3^η έως 12^η ημέρα). Στα ενυδρεία με τα ψάρια-μάρτυρες δεν βρέθηκε κανένα θετικό δείγμα.



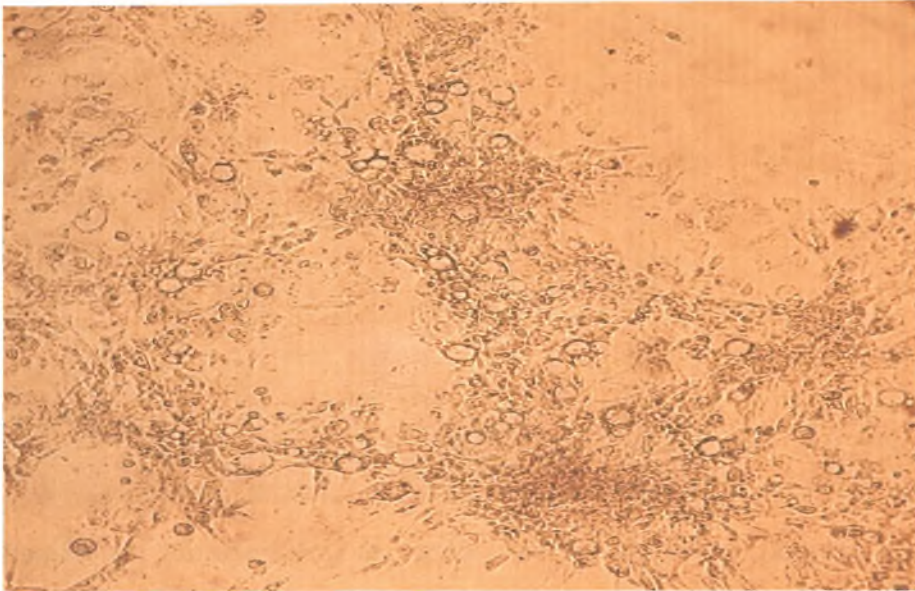
Εικόνα 14. Κυτταροπαθογόνος δράση του ιού την 4^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με ιστούς του δείγματος με α/α 5.



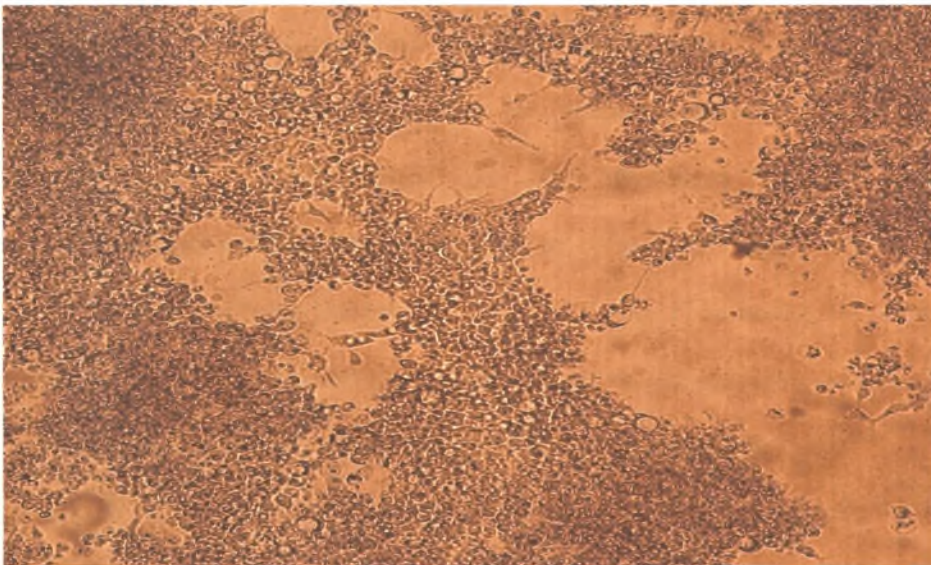
Εικόνα 15. Κυτταροπαθογόνος δράση του ιού την 5^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με ιστούς του δείγματος με α/α 11.



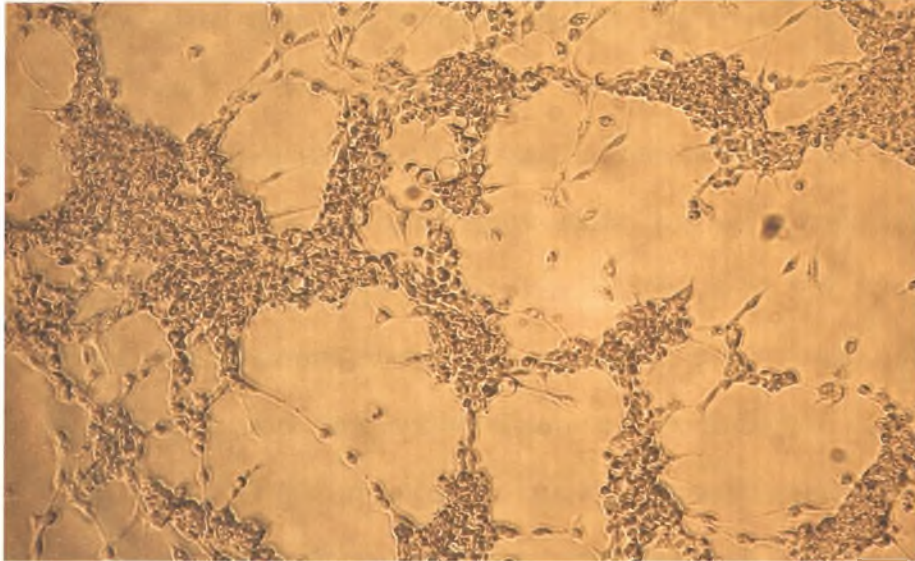
Εικόνα 16. Κυτταροπαθογόνος δράση του ιού την 6^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με ιστούς του δείγματος με α/α 19.



Εικόνα 17. Κυτταροπαθογόνος δράση του ιού την 7^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με ιστούς του δείγματος με α/α 22.



Εικόνα 18. Κυτταροπαθογόνος δράση του ιού την 8^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με ιστούς του δείγματος με α/α 31.



Εικόνα 19. Κυτταροπαθογόνος δράση του ιού τη 10^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με ιστούς του δείγματος με α/α 40.

2.4. Ιστοπαθολογική εξέταση

2.4.1. Ιστοπαθολογική μελέτη των ψαριών του πρώτου πειράματος

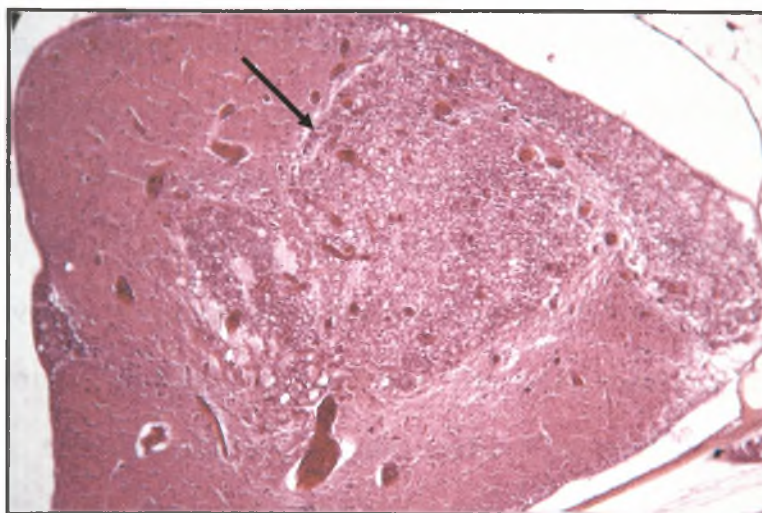
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο δειγματοληψίας των ψαριών του πρώτου πειράματος καθημερινά, από την 4^η ημέρα του πειράματος και μετά, λαμβάνονταν από κάθε ενυδρείο 2 ζωντανά ψάρια για ιστοπαθολογική εξέταση. Αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν μόνο στον αμφιβληστροειδή, το νευρικό σύστημα και, σε κάποιες περιπτώσεις, στο ήπαρ των λαβρακιών. Στο ήπαρ, οι αλλοιώσεις αφορούσαν σε ποικίλου βαθμού λιπώδη εκφύλιση. Τα αποτελέσματα της εξέτασης κάθε δείγματος ξεχωριστά για κάθε ενυδρείο αναλύονται σε πίνακες στο παράρτημα.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται ανά είδος ψαριού τα ευρήματα που προέκυψαν από την ιστολογική μελέτη.

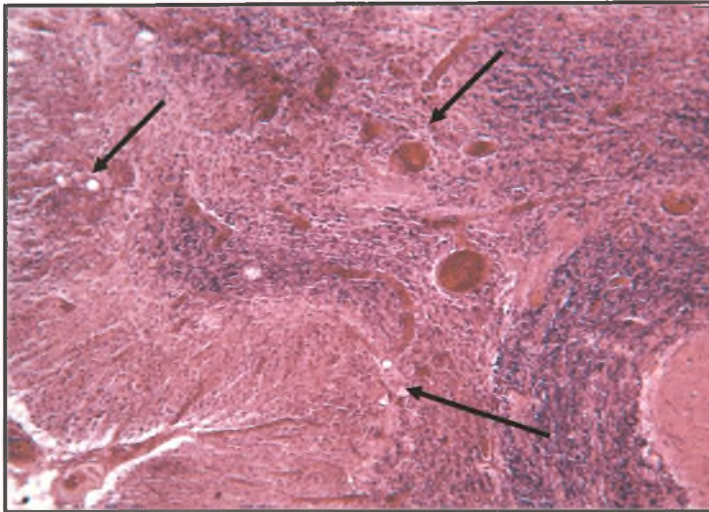
Λαβράκια

Τα ψάρια που συλλέχθηκαν την 4^η ημέρα από το ενυδρείο Γ1 (αλατότητα 0‰) είχαν φυσιολογική ιστοπαθολογική εικόνα. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκε κενοτοπιώδης εκφύλιση την 5^η ημέρα του πειράματος στο ένα από τα δύο ψάρια που

εξετάστηκαν την ημέρα αυτή. Τις επόμενες ημέρες παρατηρήθηκαν κυρίως μη φλεγμονώδεις αλλοιώσεις στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή, καθώς και κενотоποίηση και κυτταρική νέκρωση του αμφιβληστροειδούς και του εγκεφάλου. Όσον αφορά στις αλλοιώσεις του αμφιβληστροειδούς, στο μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων παρατηρήθηκε σταδιακή εξάπλωση των κενотоπίων σε όλες τις στοιβάδες του. Δηλαδή τα κενотоπία εντοπίζονταν τις πρώτες ημέρες στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα και με το πέρασ των ημερών εντοπίζονταν και στο εσωτερικό και εξωτερικό δικτυωτό στρώμα. Από τη δέκατη ημέρα τα κενотоπία ανευρίσκονταν σε όλες τις στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς, εκτός από τον εξωτερικό αφοριστικό υμένα (Παράρτημα, Πίνακας 51). Στον εγκέφαλο κενотоπία παρατηρήθηκαν κυρίως στον οπτικό λοβό, ενώ σε τέσσερα δείγματα διαπιστώθηκε κενотоπιώδης εκφύλιση και στα εγκεφαλικά ημισφαίρια (Εικόνα 20). Στα ίδια αυτά δείγματα παρατηρήθηκε επίσης συμφόρηση των αγγείων του εγκεφάλου. Σε ένα από τα δείγματα των ψαριών της 12^{ης} ημέρας εντοπίστηκαν κενотоπία και στον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα (Εικόνα 21) και το διεγκέφαλο (Παράρτημα, Πίνακας 51).



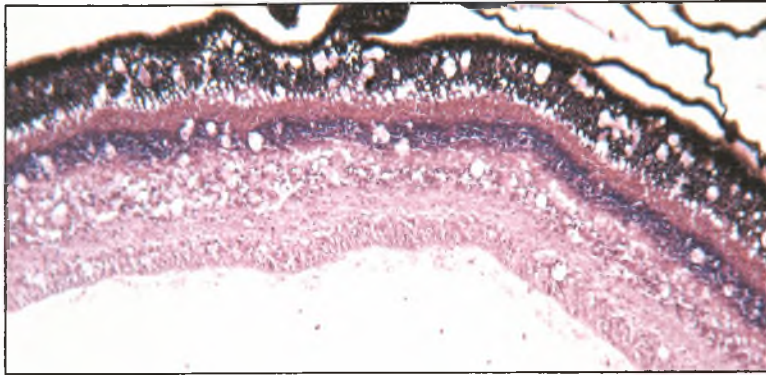
Εικόνα 20. Ενυδρείο Γ1: Ιστολογική τομή εγκεφαλικού ημισφαιρίου λαβρακιού (δείγμα 4114, ημέρα 11^η). Το βέλος δείχνει την περιοχή η οποία έχει εκφυλιστεί λόγω της παρουσίας κενотоπίων. (X 100).



Εικόνα 21. Ενυδρείο Γ1: Ιστολογική τομή παρεγκεφαλίδας λαβρακιού (δείγμα 4125, ημέρα 12^η). Τα βέλη δείχνουν τον μικρό αριθμό κενοτοπιών που παρατηρήθηκαν, καθώς και τη συμφόρηση των αγγείων της περιοχής. (X 100).

Στο ενυδρείο Θ2 (αλατότητα 18‰) κενοτοπιώδης εκφύλιση παρατηρήθηκε αρχικά την 4^η ημέρα στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς και τον οπτικό λοβό του εγκεφάλου. Από την επόμενη ημέρα, τα κενοτόπια εντοπίζονταν σε όλες τις στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς, εκτός από τον εξωτερικό αφοριστικό υμένα. Σε όλα τα δείγματα δηλαδή ο αμφιβληστροειδής ήταν έντονα εκφυλισμένος (Εικόνες 22 και 23). Από τη 15^η ημέρα οι αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή άρχισαν να υποχωρούν σταδιακά (Παράρτημα, Πίνακας 52). Σχετικά με τον εγκέφαλο, τα κενοτόπια εντοπίζονταν κυρίως στον οπτικό λοβό. Σε αρκετές περιπτώσεις ανευρίσκονταν και στα εγκεφαλικά ημισφαίρια (Εικόνα 24). Επίσης, σε περιορισμένο αριθμό δειγμάτων, εντοπίστηκαν κενοτόπια στο μεσεγκέφαλο (Εικόνα 25), τον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα, το νωτιαίο μυελό (Εικόνα 26) και το διεγκέφαλο (Παράρτημα, Πίνακας 52).

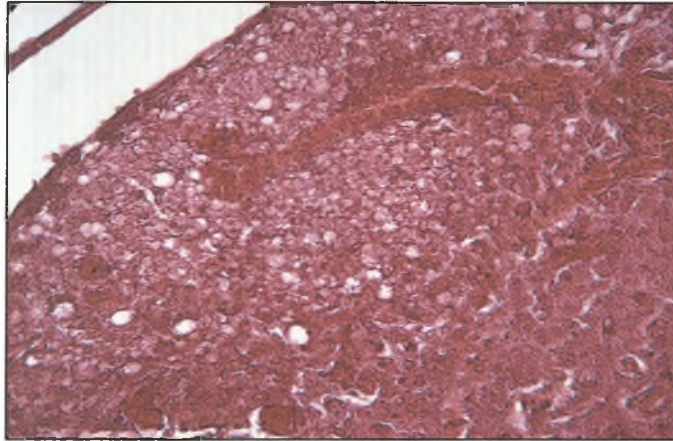




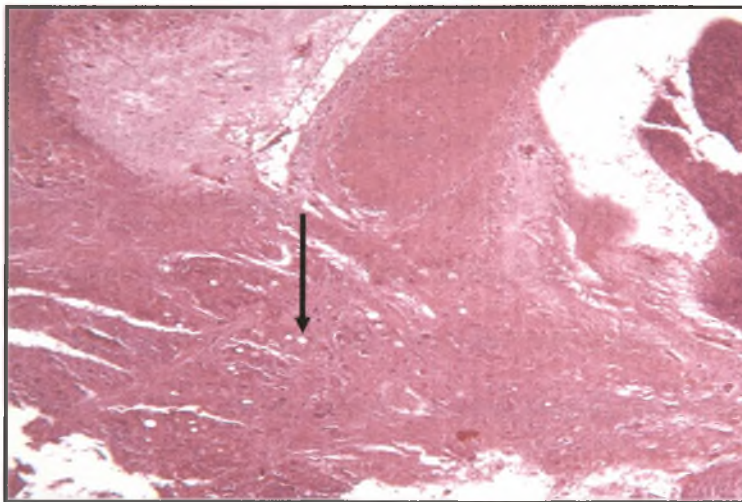
Εικόνα 22. Ευδρείο Θ2: Ιστολογική τομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού λαβρακιού (δείγμα 2145, ημέρα 14^η). Παρατηρούνται κενोटόπια στο μελάγχρουν επιθήλιο, στη στοιβάδα των ραβδίων και κωνίων, στην εξωτερική πυρηνική στοιβάδα, στο εξωτερικό δικτυωτό στρώμα, στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα, στο εσωτερικό δικτυωτό στρώμα, στη στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων και στη στοιβάδα νευρικών ινών του χιτώνα (X 400).



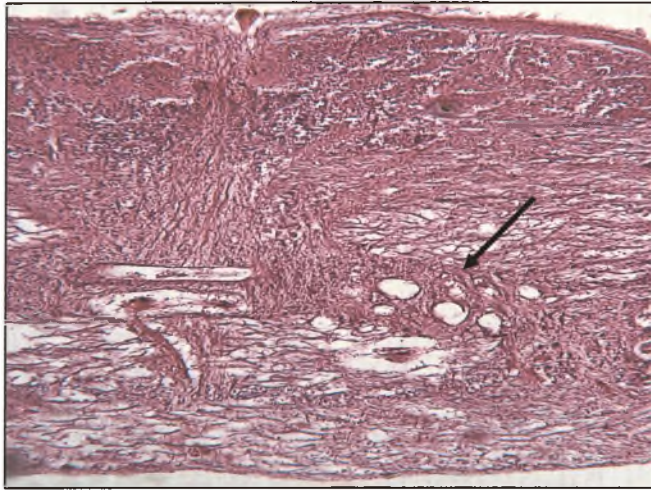
Εικόνα 23. Ευδρείο Θ2: Ιστολογική τομή του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού λαβρακιού (δείγμα 295, ημέρα 9^η). Κενोटόπια παρατηρούνται σε όλες τις στιβάδες του χιτώνα, εκτός του εξωτερικού αφοριστικού υμένα (X 400).



Εικόνα 24. Ενυδρείο Θ2: ιστολογική τομή εγκεφαλικού ημισφαιρίου λαβρακιού (δείγμα 294, ημέρα 9^η). Παρατηρείται κενοτοπιώδης εκφύλιση του παρεγχύματος, καθώς και συμφόρηση των αγγείων της περιοχής (X 400).

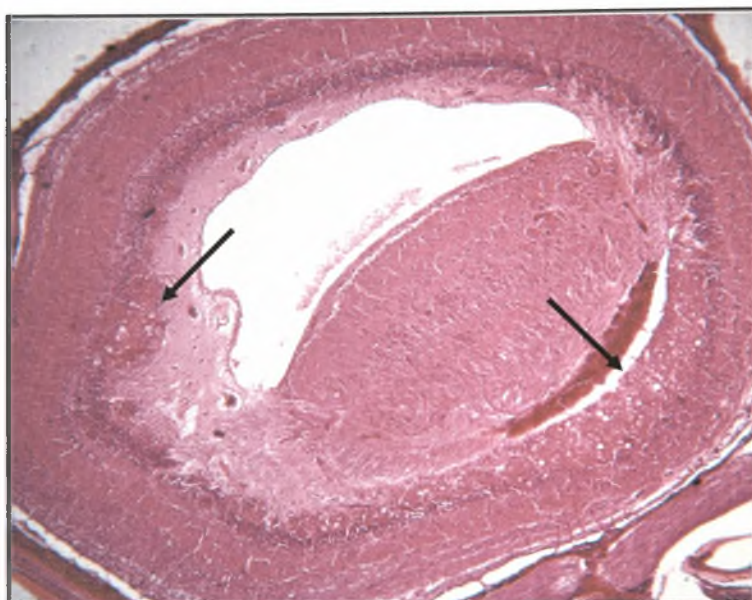


Εικόνα 25. Ενυδρείο Θ2: Ιστολογική τομή του μεσεγκεφάλου λαβρακιού (δείγμα 294, ημέρα 9^η). Το βέλος δείχνει κενοτόπια τα οποία βρίσκονται διασκορπισμένα στο μεσεγκέφαλο (X 100).



Εικόνα 26. Ευδρείο Θ2: Επιμήκης ιστολογική τομή του νωτιαίου μυελού λαβρακιού (δείγμα 2144, ημέρα 14^η) (X 400). Το βέλος δείχνει κενοτόπια.

Στο ευδρείο Θ3 (αλατότητα 33‰) κενοτόπια παρατηρήθηκαν στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο από την 4^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό. Στον αμφιβληστροειδή χιτώνα τα κενοτόπια παρατηρήθηκαν κυρίως στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα, το εσωτερικό και το εξωτερικό δικτυωτό στρώμα. Από την 8^η ημέρα και μετά ανευρίσκονταν σχεδόν σε όλες τις στοιβάδες του. Όσον αφορά στον εγκέφαλο, κενοτοποίηση παρατηρήθηκε αρχικά στον οπτικό λοβό (Εικόνα 27), αλλά από την όγδοη ημέρα σε πέντε λαβράκια διαπιστώθηκε κενοτοποίηση και στα εγκεφαλικά ημισφαίρια. Επιπλέον, σε δύο δείγματα παρατηρήθηκαν κενοτόπια και στο διεγκέφαλο, τον προμήκη και την παρεγκεφαλίδα (Παράρτημα, Πίνακας 53).



Εικόνα 27. Ενυδρείο Θ3: Ιστολογική τομή οπτικού λοβού του εγκεφάλου λαβρακιού (δείγμα 384, ημέρα 8^η). Τα βέλη δείχνουν περιοχές της φαιάς ουσίας του λοβού στις οποίες παρατηρείται κενοτοπιώδης εκφύλιση (X 100).

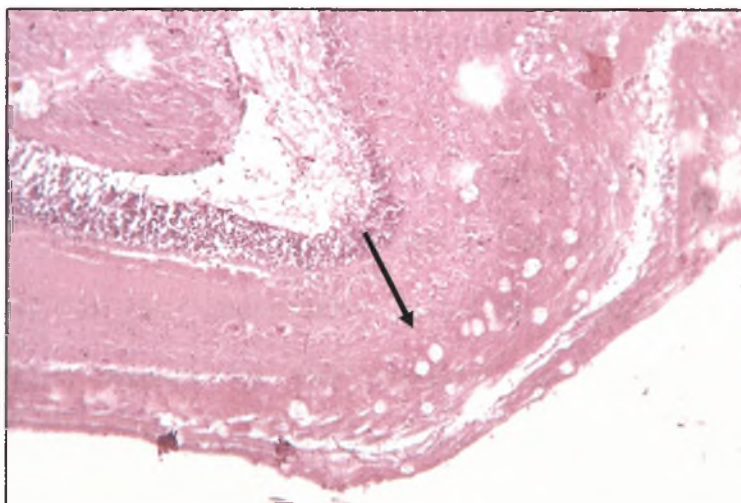
Τσιπούρες

Στο ενυδρείο T1 (αλατότητα 30‰, δόση ιού 30μl) κενοτόπια βρέθηκαν την 5^η ημέρα του πειράματος στον αμφιβληστροειδή και τον οπτικό λοβό του εγκεφάλου. Οι στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς, στις οποίες εντοπίστηκαν τα κενοτόπια, ήταν κυρίως η εσωτερική πυρηνική στοιβάδα, το εσωτερικό δικτυωτό στρώμα και η στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Σε μικρότερο βαθμό εντοπίστηκαν κενοτόπια και στη στοιβάδα των νευρικών ινών (Παράρτημα, Πίνακας 54). Δεν παρατηρήθηκε εξάπλωση των κενοτοπιών σε σχέση με το χρόνο διάρκειας του πειράματος. Όσον αφορά στον εγκέφαλο, τα κενοτόπια εντοπίστηκαν κυρίως στον οπτικό λοβό (Εικόνα 28). Σε δύο μόνο δείγματα βρέθηκαν κενοτόπια και στον προμήκη, το διεγκέφαλο και την παρεγκεφαλίδα. Σε επτά ψάρια τόσο ο αμφιβληστροειδής όσο και ο εγκέφαλος δεν έφεραν αλλοιώσεις και σε δύο ακόμη τα ευρήματα στον εγκέφαλο ήταν φυσιολογικά (Παράρτημα, Πίνακας 54).

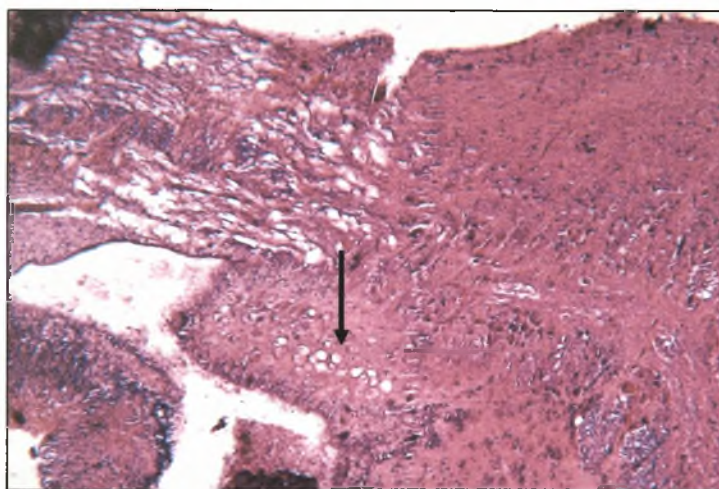


Εικόνα 28. Ενωδρείο T1: Ιστολογική τομή του οπτικού λοβού τσιπούρας (δείγμα 181, ημέρα 8^η). Τα βέλη δείχνει κενοτόπια (Χ 100).

Στο ενωδρείο T2 (αλατότητα 30‰, δόση ιού 50μl) κενοτόπια βρέθηκαν την 5^η ημέρα του πειράματος στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς και στον οπτικό λοβό του εγκεφάλου ενός από τα δύο ψάρια που εξετάστηκαν. Όπως και στα δείγματα των τσιπούρων του προηγούμενου ενωδρείου, οι στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς στις οποίες εντοπίζονταν κενοτόπια ήταν κυρίως η εσωτερική πυρηνική στοιβάδα, το εσωτερικό δικτυωτό στρώμα και η στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Σε μικρότερο βαθμό κενοτόπια παρατηρήθηκαν και στη στοιβάδα των νευρικών ινών (Παράρτημα, Πίνακας 55). Δεν παρατηρήθηκε εξάπλωση των κενοτοπίων στις υπόλοιπες στοιβάδες του αμφιβληστροειδούς κατά τη διάρκεια του πειραματισμού. Όσον αφορά στον εγκέφαλο, τα κενοτόπια εντοπίζονταν κυρίως στον οπτικό λοβό (Εικόνα 29). Σε λίγες περιπτώσεις εντοπίστηκαν και στον προμήκη (Εικόνα 30), τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, το διεγέφαλο, το νωτιαίο μυελό, το μεσεγέφαλο και την παρεγκεφαλίδα. Σε έξι από τα ψάρια που εξετάστηκαν τα ευρήματα ήταν φυσιολογικά τόσο στον αμφιβληστροειδή όσο και στον εγκέφαλο.



Εικόνα 30. Ενυδρείο T2: Ιστολογική τομή του οπτικού λοβού τσιπούρας (δείγμα 5184, ημέρα 18^η). Το βέλος δείχνει κενोटόπια (X 100).



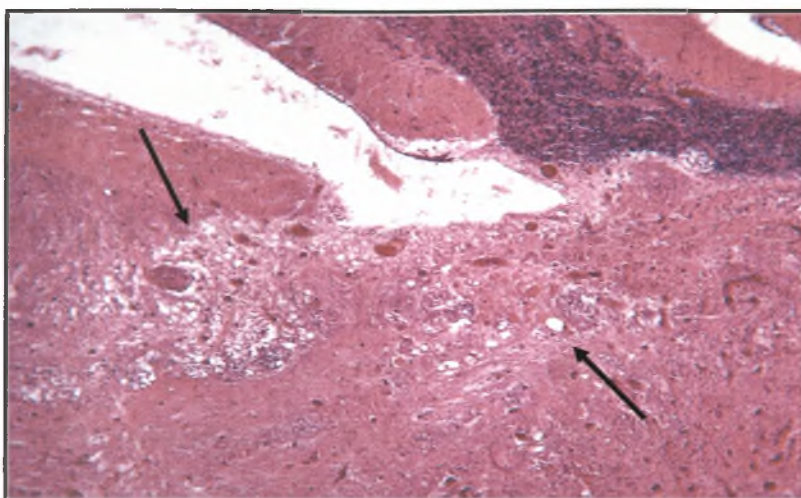
Εικόνα 29. Ενυδρείο T2: Ιστολογική τομή του προμήκη τσιπούρας (δείγμα 5165, ημέρα 16^η). Το βέλος δείχνει κενोटόπια (X 100).

2.4.2. Ιστοπαθολογική μελέτη των ψαριών του δευτέρου πειράματος

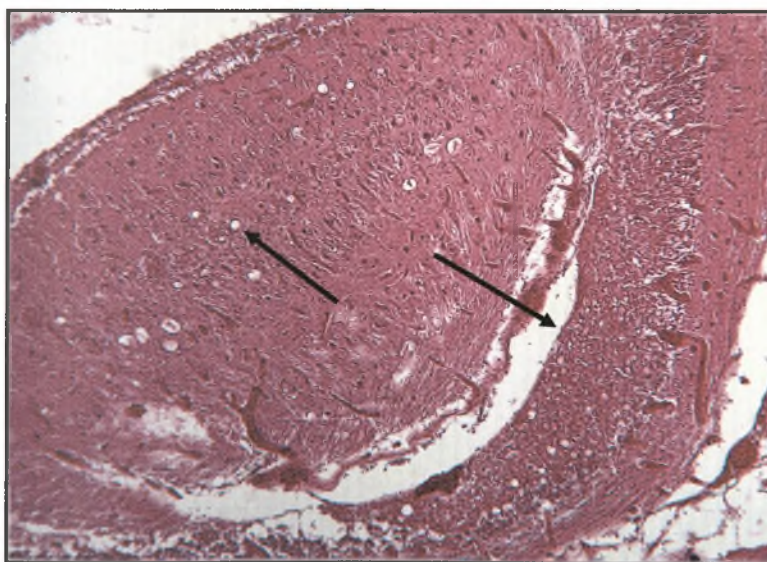
Υπενθυμίζεται ότι στα ψάρια του πειράματος αυτού οι δειγματοληψίες γίνονταν κάθε τρεις ημέρες κι ότι ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων είναι μικρότερος από τον αριθμό των δειγμάτων του 1^{ου} πειράματος.

Σχετικά με τα λαβράκια του ενυδρείου Θ6 (αλατότητα 0%), αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στο δείγμα που λήφθηκε την 9^η ημέρα του πειράματος. Ειδικότερα διαπιστώθηκε η παρουσία κενοτοπίων στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο. Γενικά στα ψάρια του ενυδρείου αυτού, προσβεβλημένη ήταν κυρίως η εσωτερική πυρηνική στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς. Σε λίγες περιπτώσεις αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν και στο εσωτερικό δικτυωτό στρώμα και στη στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Παράρτημα, Πίνακας 56). Στον εγκέφαλο κενοτόπια εντοπίστηκαν στον οπτικό λοβό, την υπόφυση και το νωτιαίο μυελό με την ίδια σχεδόν συχνότητα. Σε ένα ψάρι βρέθηκαν κενοτόπια και στον προμήκη (Εικόνα 31). Η παρουσία αλλοιώσεων ήταν εμφανής μέχρι και την τελευταία ημέρα των δειγματοληψιών (36^η ημέρα). Συγκεκριμένα, σε ένα δείγμα της ημέρας αυτής εντοπίστηκαν κενοτόπια στον αμφιβληστροειδή και το νωτιαίο μυελό. Τέλος, σε έξι από τα δώδεκα ψάρια που εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, ο αμφιβληστροειδής και ο εγκέφαλος ήταν φυσιολογικοί.

Στο ενυδρείο Θ7 (αλατότητα 20‰) κενοτόπια βρέθηκαν στον αμφιβληστροειδή και τον εγκέφαλο στο δείγμα που λήφθηκε την 9^η ημέρα του πειράματος. Και στα ψάρια του ενυδρείου αυτού η στοιβάδα του αμφιβληστροειδούς που ήταν έντονα προσβεβλημένη ήταν η εσωτερική πυρηνική στοιβάδα. Σε δύο περιπτώσεις προσβολή παρατηρήθηκε και στο εσωτερικό δικτυωτό στρώμα, καθώς και στη στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (Παράρτημα, Πίνακας 57). Στον εγκέφαλο τα κενοτόπια εντοπίστηκαν κυρίως στην υπόφυση, αλλά σε ένα δείγμα βρέθηκαν και στον οπτικό λοβό (Εικόνα 32). Σε επτά από τα δώδεκα λαβράκια που εξετάστηκαν ιστοπαθολογικά, τα ευρήματα στον αμφιβληστροειδή ή/και στον εγκέφαλο ήταν φυσιολογικά.



Εικόνα 31. Ιστολογική τομή στη βάση της παρεγκεφαλίδας λαβρακιού (δείγμα A12, ημέρα 18^η). Τα βέλη δείχνουν περιοχές στις οποίες παρατηρείται κενοτοπιώδης εκφύλιση (X 400).



Εικόνα 32. Ιστολογική τομή οπτικού λοβού λαβρακιού (δείγμα B12, ημέρα 18^η). Τα βέλη δείχνουν διασκορπισμένα κενοτόπια, καθώς και περιοχή που έχει εκφυλιστεί (X 400).

Συμπερασματικά, για το σύνολο των ιστολογικών τομών και από τα δύο πειράματα, το πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου ήταν πιο έντονα προσβεβλημένο απ' ό,τι το οπίσθιο και ο νωπιαίος μυελός. Πιο συχνά προσβεβλημένος βρέθηκε ο οπτικός

λοβός. Στον οπτικό λοβό οι αλλοιώσεις βρίσκονταν κυρίως στη φαιά ουσία. Σε αρκετές περιπτώσεις υπήρχαν εμφανείς αλλοιώσεις στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, στα οποία η εικόνα της κενοδοπιώδους εκφύλισης όταν υπήρχε, ήταν πιο έντονη σε σύγκριση με αυτή του οπτικού λοβού. Δεν παρατηρήθηκαν κενοτόπια στο οπτικό νεύρο, σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες ήταν δυνατή η παρατήρησή του. Το ίδιο ισχύει και για τον οσφρητικό λοβό. Στον αμφιβληστροειδή, τα κενοτόπια ήταν εμφανή κυρίως σε περιοχές εκ διαμέτρου αντίθετες από την οπτική θηλή.

Σε κυτταρικό επίπεδο, παρατηρήθηκε πύκνωση και συρρίκνωση των μολυσμένων κυττάρων, εστιακή πύκνωση και καρυορρηξία των πυρήνων των νευρικών κυττάρων. Σε μεμονωμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε και παρουσία διηθήσεων από μονοπύρηνα κύτταρα.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (VER) είναι μία σημαντική νόσος των θαλάσσιων ψαριών, κυρίως των λαρβών, αλλά και ψαριών μεγαλύτερου μεγέθους. Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι οι Noda-ιοί, που προσβάλλουν ψάρια της κλάσης οστεϊχθείς, και ανήκουν στην οικογένεια *Nodaviridae*, γένος *Betanodavirus* (Carstens και συν., 2000). Μέχρι σήμερα, η νόσος έχει παρατηρηθεί σε ολόκληρο σχεδόν τον κόσμο, εκτός της Αφρικής (Munday και συν., 2002), σε περισσότερα από 30 είδη ψαριών. Τα περισσότερα περιστατικά έχουν αναφερθεί σε περιοχές στις οποίες υπάρχει εντατική εκτροφή των ψαριών σε θαλασσινούς κλωβούς. Ανάμεσα στα ψάρια που προσβάλλονται, μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζουν τα λαβράκια, τα είδη του γένους *Epinephelus* και τα πλατύψαρα (Munday και συν., 2002).

Η νόσος χαρακτηρίζεται από προσβολή του ΚΝΣ και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού. Οι πρώτοι που περιέγραψαν συνοπτικά τις αλλοιώσεις της νόσου, πριν ακόμα προσδιοριστεί ο αιτιολογικός παράγοντας, ήταν οι Glazebrook και Campbell το 1987. Τον επόμενο χρόνο (1988), αναφέρθηκαν στη Μαρτινίκα μαζικές θνησιμότητες σε λαβράκι της Μεσογείου, σχετιζόμενες με εγκεφαλίτιδα και παρουσία ιικών σωματιδίων στα νευρικά κύτταρα (Bellance και Gallet de Saint-Aurin). Η ανίχνευση όμως του Noda-ιού επιτεύχθηκε 3 χρόνια αργότερα στη Γαλλία από τους Breuil και συνεργάτες (1991). Τα επόμενα 5 χρόνια, αναφέρθηκαν περιπτώσεις ιογενούς νόσου σε εκκολαπτόμενες προνύμφες και νεαρά άτομα διαφορετικών ειδών θαλάσσιων ψαριών. Κατά την ιστολογική εξέταση των μολυσμένων ψαριών, το κύριο εύρημα ήταν η παρουσία κενοτοπίων στα νευρικά κύτταρα, τον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού, αλλοιώσεις που χαρακτηρίζουν τη νόσο (Munday και συν., 2002).

Περιστατικά φυσικής λοίμωξης (δύο) έχουν αναφερθεί και σε ψάρια του γλυκού νερού, από τους Munday και συνεργάτες (2002) στην Αυστραλία. Ειδικότερα,

οι ερευνητές αυτοί αναφέρουν την ύπαρξη των τυπικών ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και την ανεύρεση σωματιδίων του Noda-ιού στον εγκέφαλο αυστραλιανού γατόψαρου, που ζούσε σε γλυκό νερό γύρω από κλωβούς στους οποίους εκτρεφόταν ασιατικό λαβράκι. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν επίσης κλινικό περιστατικό σε sleepy cod κατά το οποίο απομονώθηκε ο Noda-ιός. Το 2003 ο ιός απομονώθηκε από ψάρι (gurpy) ενυδρείου, που εμφάνιζε κλινικά συμπτώματα. Στην περίπτωση αυτή όμως ως πηγή μόλυνσης θεωρήθηκε το θαλάσσιο περιβάλλον (Hegde και συν., 2003). Προσβολή ψαριών γλυκού νερού, συμπεριλαμβανομένου και του ευρωπαϊκού χελιού, παρατηρήθηκε και στην Ταϊβάν λόγω εισόδου ασυμπτωματικά μολυσμένων θαλάσσιων ασιατικών λαβρακιών (Chi και συν., 2003).

Όσον αφορά στη χώρα μας, η νόσος έχει παρατηρηθεί τόσο σε ψάρια που εκτρέφονται στη θάλασσα, όσο και σε ψάρια που εκτρέφονται σε γλυκό νερό. Αναλυτικότερα η νόσος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1995, σε τρεις περιοχές της χώρας στις οποίες τα λαβράκια εκτρέφονταν σε κλωβούς στη θάλασσα και διήρκεσε 4 μήνες (αρχές Ιουλίου-τέλος Οκτωβρίου). Προσβλήθηκαν ψάρια νεαρής (μέσο βάρος 10-30 γρ.) και μεγαλύτερης ηλικίας (μέσο βάρος 350-580 γρ.) και οι θάνατοι παρατηρήθηκαν όταν η θερμοκρασία του νερού κυμαινόταν από 25°C έως 27°C. Η συνολική θνησιμότητα στα νεαρής ηλικίας ψάρια κυμάνθηκε από 15% έως 60%, ενώ στα μεγαλύτερα ήταν 11%. Σημειώνεται ότι στην περιοχή όπου η θερμοκρασία του νερού ήταν υψηλότερη (27°C), η νόσος ήταν πιο οξείας μορφής και η θνησιμότητα ήταν μεγαλύτερη (60%) (Le Breton και συν., 1997). Πέντε χρόνια αργότερα (καλοκαίρι του 2000), στην περιοχή της Ηπείρου παρατηρήθηκε το επόμενο κρούσμα. Η μονάδα περιλάμβανε διάφορα είδη ψαριών, μεταξύ των οποίων λαβράκια και οξύρρυγχους, που εκτρέφονταν σε γλυκό νερό. Τα λαβράκια (μέσο βάρος 50-80 γρ.) εκτρέφονταν με δύο διαφορετικά συστήματα κυκλοφορίας νερού (κλειστό, ανοιχτό) και το πρόβλημα εμφανίστηκε όταν η θερμοκρασία του νερού έφτασε στους 25-28 °C. Εκείνα που εκτρέφονταν στο κλειστό σύστημα παρουσίασαν χαρακτηριστικά συμπτώματα της νόσου και το ποσοστό θνησιμότητας ανήλθε στο

30% του συνολικού πληθυσμού. Αντίθετα σε εκείνα που εκτρέφονταν στο ανοιχτό σύστημα, η συνολική θνησιμότητα ήταν χαμηλή (5%), ενώ η διάγνωση βασίστηκε σε εργαστηριακές εξετάσεις επειδή απουσίαζαν τα συμπτώματα (Athanasopoulou και συν., 2003). Τα λαβράκια αυτά είχαν μεταφερθεί από τη θάλασσα στο γλυκό νερό και εκδήλωσαν τη νόσο 8 μήνες μετά τη μεταφορά τους. Νευρικά συμπτώματα σε τσιπούρες (ασυμπτωματικοί φορείς), λόγω φυσικής προσβολής τους από τον Noda-ιό, παρατηρήθηκαν, για πρώτη φορά παγκοσμίως, το 2007 στη χώρα μας (Bitchava και συνεργάτες). Η νόσος εκδηλώθηκε σε μικτή εκτροφή τσιπούρας-λαβρακιού στην περιοχή του ανατολικού Αιγαίου. Τα ψάρια (μέσο βάρος 50-80 γρ.) εκτρέφονταν σε κλωβούς δίπλα σε λαβράκια, τα οποία είχαν εμφανίσει τη νόσο ένα χρόνο πριν. Τα συμπτώματα εκδηλώθηκαν όταν η θερμοκρασία του νερού είχε φτάσει στους 28°C (τέλη Αυγούστου) και διήρκεσαν περίπου δύο μήνες. Η συνολική θνησιμότητα ήταν 19%. Τέλος, σε πρόσφατη επιδημιολογική έρευνα που διενεργήθηκε από τους Bitchava και συνεργάτες (εργασία προς δημοσίευση) σε φαινομενικώς υγιή λαβράκια από μονάδες της Ηπείρου, διαπιστώθηκε με τη μέθοδο της real-time PCR ότι το περίπου 80% των ψαριών ήταν μολυσμένα. Σημειώνεται ότι οι τίτλοι του ιού στα δείγματα ήταν αρκετά υψηλοί (10^3 έως $10^{4.5}$).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το λαβράκι είναι το πιο ευαίσθητο είδος ψαριού στη Μεσόγειο στη μόλυνση από Noda-ιό και μαζί με την τσιπούρα αποτελεί το κύριο παραγωγικό είδος των εντατικών ιχθυοκαλλιεργειών στην χώρα μας. Είναι επίσης γνωστό ότι το λαβράκι ανήκει στα αληθώς ευρύαλα είδη, δηλαδή μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί τόσο σε γλυκό όσο και σε θαλασσινό νερό. Η δυνατότητα αυτή σχετίζεται με την ικανότητά του να διατηρεί σταθερή τη συγκέντρωση των ιόντων στο πλάσμα και στους ιστούς του (οσμωρύθμιση), όπως συμβαίνει με όλα τα ευρύαλα είδη ψαριών (Wurts, 1987). Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, θελήσαμε να διερευνήσουμε την εξέλιξη της λοίμωξης από Noda-ιό στο λαβράκι, σε περίπτωση που εκτραφεί υπό διαφορετικές συνθήκες αλατότητας (0‰, 18‰, 33‰). Η μελέτη αυτή, είναι η πρώτη διεθνώς στην οποία γίνεται συσχέτιση της αλατότητας με την

παθογένεια και την παθολογία της νόσου, καθώς και με την ευπάθεια του λαβρακιού, διότι οι διεθνείς μέχρι τώρα έρευνες επικεντρώνονται μόνο στη συσχέτιση της λοίμωξης με την ηλικία των ψαριών, τη θερμοκρασία του νερού που αυτά διαβιούν ή την οδό μόλυνσης (Peducasse και συν., 1999· Thiery και συν., 1997). Επιπλέον, επειδή σύμφωνα με προηγούμενα ευρήματά μας και η τσιπούρα που θεωρείται ασυμπτωματικός φορέας του ιού, μπορεί να εκδηλώσει τη νόσο μετά από φυσική προσβολή (Bitchava και συν., 2007), ελέγχθηκε πειραματικά και η υπόθεση αυτή. Σε αμφότερα τα είδη μελετήθηκαν οι διαφορές που αφορούσαν στην εκδήλωση της νόσου από πλευράς παθογένειας, συμπτωμάτων, παθολογοανατομικών αλλοιώσεων και θνησιμοτήτων.

Ως πειραματόζωα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν λαβράκια μέσου βάρους $4\pm 0,2$ γραμμαρίων και τσιπούρες μέσου βάρους $3\pm 0,2$ γραμμαρίων, διότι σύμφωνα με τους Peducasse και συνεργάτες (1999) και Thiery και συνεργάτες (1997) η λοίμωξη είναι πιο βαριάς μορφής σε ιχθύδια. Ως οδός ενοφθαλμισμού επιλέχθηκε η ενδομυϊκή, εφόσον ήταν ήδη γνωστό ότι αυτός ο τρόπος μόλυνσης είναι ο πιο αποτελεσματικός (Skliris και Richards, 1999). Σχετικά με τη δόση του ενοφθαλμίσματος, στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπήρχε τίποτε σχετικό, γι' αυτό προηγήθηκε του κυρίως πειράματος ένα προκαταρκτικό, ώστε να προσδιοριστεί η κατάλληλη λοιμογόνος δόση του ιού για τον ενοφθαλμισμό των λαβρακιών. Έτσι μία ομάδα ψαριών ενοφθαλμίστηκε με 30 μl ιού και μία δεύτερη με 50 μl (τίτλοι ιού 10^7 TCID₅₀/ ml). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για το κυρίως πείραμα, καταλληλότερη ήταν η δόση των 30 μl, διότι η εξέλιξη της νόσου από πλευράς συμπτωμάτων και αλλοιώσεων, προσομοιάζε με εκείνη της φυσικής λοίμωξης σε λαβράκια ίδιου μεγέθους. Σχετικά με τις τσιπούρες, αυτές αποφασίστηκε να ενοφθαλμιστούν και με τις δύο δόσεις, ώστε να ελεγχθεί αν η εκδήλωση συμπτωμάτων εξαρτάται από τη δόση του ιού.

Στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος, έγινε και ένα δεύτερο με στόχο να διαπιστωθεί αν οι τσιπούρες, στις οποίες κατά το πρώτο

πείραμα η μόλυνση ήταν ασυμπτωματική, μπορούσαν να τη μεταδώσουν σε λαβράκια, μετά από χορήγηση σε αυτά οφθαλμών μολυσμένων τσιπούρων. Οι οφθαλμοί επιλέχθηκαν διότι οι ιχθυοκαλλιεργητές μικτών μονάδων λαβρακιού-τσιπούρας έχουν παρατηρήσει ότι τα λαβράκια κανιβαλίζουν και καταναλώνουν αδύναμα, θνησιγενή και νεκρά ψάρια, ξεκινώντας πρώτα από τους οφθαλμούς.

Ως κύρια μέθοδος ανίχνευσης του ιού στα παθολογικά υλικά από τα μολυσμένα ψάρια χρησιμοποιήθηκε η real-time PCR, και στους δύο πειραματισμούς, διότι από τη βιβλιογραφία ήταν γνωστό ότι υπερέρχει της κλασικής και της ένθετης RT-PCR (Breuil και συν., 2002; Grove και συν., 2006). Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της, έγινε με την κλασική μέθοδο απομόνωσης του ιού με ενοφθαλμισμό κυτταροκαλλιεργειών. Η τελευταία μέθοδος δεν προτιμήθηκε ως κύρια μέθοδος διάγνωσης διότι είναι χρονοβόρα και επιπλέον, η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται συνήθως είναι μόνιμα μολυσμένη με ρετροϊό (Iwamoto και συν., 1999).

ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Το 1^ο πείραμα περιλάμβανε ως πειραματόζωα λαβράκια και τσιπούρες. Η κλινική εικόνα των λαβρακιών, διαπιστώθηκε ότι ήταν ίδια με εκείνη που έχει περιγραφεί μέχρι τώρα στη διεθνή βιβλιογραφία, δηλαδή παρατηρήθηκαν συμπτώματα που σχετίζονταν με προσβολή του εγκεφάλου και του αμφιβληστροειδούς (Breuil και συν., 1991; Mori και συν., 1992; Munday και Nakai, 1997; Bono και συν., 1999). Οι διαφορές στην αλατότητα του νερού των ενυδρείων δεν επηρέασαν το χρόνο έναρξης των συμπτωμάτων, εφόσον αυτά άρχισαν να εκδηλώνονται από την 3^η ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των ψαριών, σε όλα τα ενυδρεία. Επηρέασαν όμως την ένταση των συμπτωμάτων και το ποσοστό νοσηρότητας των λαβρακιών, μεταξύ εκείνων που βρίσκονταν σε νερό με αλατότητα 0‰ και εκείνων που ήταν σε νερό με αλατότητα 18‰ ή 33‰. Συγκεκριμένα στα

ψάρια που εκτρέφονταν στο γλυκό νερό παρατηρήθηκε έξαρση του ποσοστού νοσηρότητας (85%) την πέμπτη ημέρα μετά τη μόλυνση και ακολούθως την έκτη ημέρα παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο (24%) από όλα τα ποσοστά θνησιμότητας, που εκδηλώθηκαν και στα τρία ενυδρεία. Από την όγδοη ημέρα η νοσηρότητα άρχισε να μειώνεται, αλλά οι θάνατοι συνεχίζονταν και το πείραμα τερματίστηκε τη δέκατη τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των λαβρακιών. Αντίθετα, η εξέλιξη της νόσου στα δύο άλλα ενυδρεία ήταν διαφορετική. Ειδικότερα στο ενυδρείο με την πλήρη αλατότητα (33‰), το ποσοστό νοσηρότητας αυξήθηκε από την έβδομη ημέρα (70%) και κορυφώθηκε τη δέκατη (80%). Τις επόμενες ημέρες τα συμπτώματα άρχισαν να γίνονται ηπιότερα και τη δέκατη έβδομη ημέρα τα εναπομείναντα λαβράκια φαίνονταν υγιή. Στο ενυδρείο αυτό, το πείραμα διήρκησε τρεις επιπλέον ημέρες, από ό,τι στο ενυδρείο με το γλυκό νερό, διότι η συνολική θνησιμότητα των ψαριών ήταν μικρότερη (30%). Σημειώνεται ότι ο μέγιστος αριθμός νεκρών ψαριών που βρέθηκε ήταν 7 και αυτό συνέβη την έβδομη ημέρα του πειράματος. Όσον αφορά στο ενυδρείο με νερό αλατότητας 18‰, η χρονική εξέλιξη της νόσου ήταν ίδια με εκείνη που παρατηρήθηκε στα ψάρια που βρίσκονταν στο νερό της πλήρους αλατότητας. Τα νευρικά συμπτώματα όμως ήταν ηπιότερα και το μέγιστο ποσοστό ψαριών με συμπτώματα έφθασε στο 50% (8^η ημέρα). Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας ήταν 27% και ο μέγιστος αριθμός νεκρών ψαριών ήταν 8 ψάρια, την όγδοη ημέρα του πειράματος. Το πείραμα διήρκησε 18 ημέρες, για τους ίδιους όπως προηγουμένως λόγους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα ποσοστά θνησιμότητας και νευρικών συμπτωμάτων στα ψάρια των ενυδρείων με τις τρεις αλατότητες, συμπεραίνουμε ότι η νόσος εξελίχθηκε με διαφορετικό τρόπο που επηρεάστηκε από την αλατότητα του νερού. Η διαφορά αυτή προφανώς οφείλεται στη διαφορετική φυσιολογία και ομοιοστασία των λαβρακιών στις διαφορετικές αλατότητες, οι οποίες εξαρτώνται από το στρες που υφίστανται τα ψάρια. Σύμφωνα με τους Pasnik και συνεργάτες (2009), διάφοροι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες μπορεί να προκαλέσουν στρες, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της φυσιολογικής ομοιοστασίας

των ψαριών. Σε περίπτωση που ο παράγοντας είναι παρών για μεγάλο χρονικό διάστημα ή ενταθεί, τα ψάρια παρουσιάζουν κάποιες αρχικές αλλαγές στη συμπεριφορά και στη συνέχεια επέρχονται πρωτογενείς, δευτερογενείς και τριτογενείς αντιδράσεις στο στρες. Οι πρωτογενείς αντιδράσεις, αφορούν στην έκκριση κορτικοστεροειδών και κατεχολαμινών. Οι δευτερογενείς, αφορούν σε αλλαγές στις αιματολογικές και μεταβολικές παραμέτρους και στην οξεοβασική ισορροπία και μπορεί να αρχίσουν λεπτά ή ώρες μετά την επίδραση του παράγοντα. Οι τριτογενείς αντιδράσεις, αφορούν σε αλλαγές στην φυσιολογία του ψαριού (ομοιοστατικές διαταραχές) και ξεκινούν λεπτά ή ημέρες μετά από το ερέθισμα. Επομένως, είναι φανερό ότι το στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία των ψαριών (Pasnik και συν., 2009).

Η αντίδραση στο στρες των τελεόστεων ψαριών έχει σημαντικές ομοιότητες με εκείνη των χερσαίων σπονδυλωτών, όπως στην πρόσληψη και τη μεταφορά του οξυγόνου, την κινητοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων, τη μείωση στη χρήση της ενέργειας για ανάπτυξη και αναπαραγωγή και κυρίως, στην ανασταλτική επίπτωση στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος.

Υπάρχουν επίσης σημαντικές ενδείξεις ότι υπάρχει έντονη επίδραση μεταξύ του νευροενδοκρινούς και του ανοσοποιητικού συστήματος στα ψάρια (Wendelaar Bonga, 1997). Συγκεκριμένα το στρες επιδρά στον άξονα υποθάλαμου-υπόφυσης-πρόσθιου νεφρού και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των κορτικοστεροειδών στην κυκλοφορία (Barton και συν., 1991). Οι νευρικές ίνες του συμπαθητικού συστήματος προκαλούν απελευθέρωση κατεχολαμινών από τα χρωμόφιλα κύτταρα που βρίσκονται στον πρόσθιο νεφρό (Burton, 2002). Τα κορτικοστεροειδή μπορούν να μειώσουν την ανοσολογική ικανότητα, επηρεάζοντας τον αριθμό των λεμφοκυττάρων και την ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων (Barton και συν., 1991). Οι ορμονικές αλλαγές μειώνουν την αποτελεσματικότητα των φλεγμονωδών αντιδράσεων και παρεμποδίζουν την παραγωγή και απελευθέρωση αντισωμάτων (Rottmann και συν., 1992). Πράγματι *in vivo* μελέτες των Weyts και συνεργάτες (1999), έδειξαν ότι

προκλήθηκε μείωση στον πολλαπλασιασμό των λευκοκυττάρων, μείωση των κυττάρων που παράγουν αντισώματα και μείωση των αντισωμάτων που εξουδετερώνουν ιούς, σε ψάρια στα οποία χορηγήθηκαν κορτικοστεροειδή. Επιπλέον τα κορτικοστεροειδή μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή, μέσω της αλλαγής στα επίπεδα των ορμονών που είναι απαραίτητες για την ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος (Barton και συν., 1991).

Η κορτιζόλη εμπλέκεται στους μηχανισμούς εγκλιματισμού των τελεόστεων ψαριών στο θαλασσινό, αλλά και στο γλυκό νερό. Εφόσον η αλλαγή στην αλατότητα του περιβάλλοντος είναι μία στρεσογόνα κατάσταση, η έκκριση ACTH, και ως αποτέλεσμα η σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης, συμβαίνει όταν ένα ευρύαλο είδος μεταφέρεται σε περιβάλλον με διαφορετική αλατότητα. Η χορήγηση εξωγενούς κορτιζόλης από τους Evans και Claiborne (2006) σε ψάρι που βρισκόταν σε γλυκό νερό, έδειξε ότι αυξάνει την πρόσληψη Na^+ και Cl^- από το περιβάλλον.

Κατά το στρες αυξάνονται και περιφερικές ορμόνες, όπως η θυροξίνη, η προλακτίνη και η σωματολακτίνη (Burton, 2002). Η προλακτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστικότητα των ευρύαλων ψαριών στο γλυκό νερό και επίσης εμπλέκεται και σε άλλες βιολογικές δραστηριότητές τους, όπως για παράδειγμα η αναπαραγωγή, η συμπεριφορά και ο μεταβολισμός (Moriyama και συν., 2002). Στα τελεόστεα ψάρια εντοπίστηκε ένα πεπτιδίο ομόλογο με το πεπτιδίο απελευθέρωσης της προλακτίνης των θηλαστικών. Το πεπτιδίο αυτό (RFa) δρα στον υποθάλαμο για την απελευθέρωση της προλακτίνης και της σωματολακτίνης. Τα κύτταρα παραγωγής του πεπτιδίου αυτού και οι νευρώνες από τους οποίους μεταφέρεται εντοπίστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, στον υποθάλαμο και τον τελεγκέφαλο αντίστοιχα (Moriyama και συν., 2002).

Όσον αφορά στη φυσιολογία της οσμωρύθμισης, οι ορμόνες παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ομοιοστατική ρύθμιση των σωματικών υγρών, που συντελείται με τον καθορισμό της λειτουργικότητας των μεμβρανικών καναλιών και των μεταφορέων νερού και ιόντων στα επιθήλια. Οι Evans και Claiborne (2006),

αναφέρουν ότι οι οσμωρυθμιστικές ορμόνες χωρίζονται σε δύο τύπους, τις ορμόνες ταχείας δράσης και τις ορμόνες βραδείας δράσης. Οι ταχείας δράσης ορμόνες, είναι κυρίως αμίνες και ολιγοπεπτιδικές ορμόνες, όπως οι κατεχολαμίνες, το νατριουρικό πεπτιδίο και η ουροτενσίνη, και συνήθως ρυθμίζουν τη λειτουργικότητα των καναλιών και των μεταφορέων που υπάρχουν ήδη στα επιθήλια. Οι βραδείας δράσης είναι αργής έναρξης και μακροχρόνιας δράσης. Στον τύπο αυτό περιλαμβάνονται στεροειδείς ορμόνες, όπως είναι η κορτιζόλη στα τελεόστεα, και πρωτεϊνικές ορμόνες, όπως η αυξητική ορμόνη (GH), η προλακτίνη (PRL) και άλλες. Αυτές οι ορμόνες προκαλούν την εκ νέου σύνθεση των καναλιών και των μεταφορέων και αναδιοργανώνουν τους οσμωρυθμιστικούς ιστούς για να αντεπεξέλθουν στο νέο οσμωτικό περιβάλλον. Οι προαναφερθέντες ερευνητές για να μελετήσουν τη σημασία της προλακτίνης στην οσμωρύθμιση, έκαναν πειράματα στο ευρύαλο είδος killifish (*Fundulus heteroclitus* L.). Τα ψάρια αυτά δεν μπορούσαν να επιβιώσουν σε γλυκό νερό, λόγω της υπονατριαιμίας που τους προκλήθηκε μετά από πειραματική υποφυσεκτομή. Η χορήγηση εξωγενούς προλακτίνης τα κατέστησε ικανά να επιβιώσουν. Στη συνέχεια, παρατήρησαν ότι άλλα τελεόστεα ευρύαλα είδη, όπως το χέλι και η τιλάπια, εάν ζουν μόνιμα σε γλυκό νερό μπορούν να επιβιώσουν χωρίς την παρουσία προλακτίνης. Εάν όμως τα είδη αυτά μεταφερθούν από το θαλασσινό σε γλυκό νερό τότε το επίπεδο της προλακτίνης στο πλάσμα και η έκφραση του γονιδίου της ορμόνης στην υπόφυση αυξάνεται. Η βασική δράση της προλακτίνης στα ψάρια, εντοπίζεται κυρίως στα βράγχια, αλλά και στα άλλα οσμωρυθμιστικά όργανα, όπως ο νεφρός, το έντερο και η ουροδόχος κύστη, όπου γενικά αναστέλλει τη διαπερατότητα του νερού και αυξάνει την επαναρόφηση Na^+ και Cl^- (Evans και Claiborne, 2006).

Οι Varsamos και συνεργάτες (2006), διερεύνησαν την έκφραση των mRNA των ορμονών της υπόφυσης στο λαβράκι. Η έρευνα είχε δύο πειραματικές ομάδες. Στη μία ομάδα τα λαβράκια παρέμειναν στο θαλασσινό νερό και στη δεύτερη ομάδα μεταφέρθηκαν σε γλυκό νερό και παρέμειναν εκεί για ένα μήνα. Οι ορμόνες της υπόφυσης που μελετήθηκαν ήταν η προλακτίνη (prl), η αυξητική ορμόνη (gh), η

σωματολακτίνη (sl), η προοπιομελανοκορτίνη (pomc) και οι γοναδοτροπίνες gthI και gthII. Από τη μελέτη αυτή, διαπιστώθηκε ότι στην υπόφυση η έκφραση του mRNA της προλακτίνης αυξήθηκε 4,5 φορές όταν τα ψάρια μεταφέρθηκαν στο γλυκό νερό σε σχέση με εκείνη των ψαριών που παρέμειναν στο θαλασσινό νερό. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με το ρόλο-κλειδί που παίζει η συγκεκριμένη ορμόνη στη διαδικασία της οσμωρύθμισης. Οι ίδιοι μελετητές διαπίστωσαν επίσης ότι η έκφραση του mRNA της αυξητικής ορμόνης αυξήθηκε κατά 1,9 φορές όταν τα ψάρια μεταφέρθηκαν και παρέμειναν στο γλυκό νερό. Για τη σωματολακτίνη, διαπίστωσαν ότι η έκφραση του mRNA της ήταν 1,8 φορές μικρότερη στα ψάρια που βρίσκονταν στο γλυκό νερό σε σχέση με εκείνα που ήταν στο θαλασσινό. Για τις υπόλοιπες ορμόνες δεν παρατήρησαν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών τους κατά τη διαβίωση των ψαριών σε γλυκό και θαλασσινό νερό. Τέλος τα επίπεδα της κορτιζόλης στο αίμα των ψαριών που παρέμειναν στο θαλασσινό νερό, ήταν 6,5 φορές μικρότερα από εκείνα των ψαριών στο γλυκό νερό. Επισημαίνεται ότι ο έλεγχος της έκκρισης της κορτιζόλης γίνεται κυρίως από την υπόφυση (Wendelaar Bonga, 1997). Στην ίδια μελέτη η δραστηριότητα της βραγχιακής Na^+/K^+ -ATPάσης ήταν 2,3 φορές μεγαλύτερη στα ψάρια που μεταφέρθηκαν στο γλυκό νερό σε σχέση με εκείνη των ψαριών που ζούσαν στο θαλασσινό. Οι Varsamos και συνεργάτες (2002a,b) έδειξαν ότι η ικανότητα του λαβρακιού για οσμωρύθμιση στηρίζεται εν μέρει στη φαινοτυπική πλαστικότητα των βραγχιακών ιονοκυττάρων, τα οποία ονομάζονται και κύτταρα πλούσια σε μιτοχόνδρια (mitochondria rich cells, MRCs) και στην περιεκτικότητά τους σε Na^+/K^+ -ATPάση, που διαφέρει σημαντικά όταν τα ψάρια βρίσκονται στο γλυκό νερό σε σχέση με εκείνα που ζουν στη θάλασσα. Η προλακτίνη, η αυξητική ορμόνη, ο ηπατικός, τύπου-ινσουλίνης, αυξητικός παράγοντας I και η κορτιζόλη επηρεάζουν τον αριθμό και το μέγεθος των MRCs, καθώς και τη δραστηριότητα της Na^+/K^+ -ATPάσης κατά τη διάρκεια της μετεμβρυακής ανάπτυξης των τελεόστεων. Στο λαβράκι, κατά τη μεταφορά του από το θαλασσινό στο γλυκό νερό, ο αριθμός και το μέγεθος των MRCs αυξάνεται. Επίσης αυξάνεται

και η δραστηριότητα της Na^+/K^+ -ΑΤΡάσης. Τα παραπάνω συμβαίνουν ως επακόλουθο της αυξημένης έκφρασης της προλακτίνης και του αυξημένου επιπέδου της κορτιζόλης στο πλάσμα (Varsamos και συν., 2006).

Από τα προηγούμενα είναι φανερός ο σημαντικός ρόλος της υπόφυσης στην επίτευξη της ομοιοστασίας στα ψάρια. Ο ρόλος της αυτός υποδηλώνει και την αναγκαιότητα που υπάρχει για τη σωστή λειτουργία της, ειδικά για τα ψάρια που μεταφέρονται σε γλυκό νερό και υφίστανται το οσμωτικό στρες. Επίσης φαίνεται και ο ρόλος του υποθαλάμου και του τελεγκεφάλου στην ορμονική ισορροπία. Όπως προέκυψε από την ιστοπαθολογική μελέτη των λαβρακιών του πρώτου, αλλά και του δευτέρου πειράματος, παρατηρήθηκαν κενोटόπια, εκτός των άλλων περιοχών του ΚΝΣ και στον τελεγκέφαλο, τον υποθάλαμο και την υπόφυση, τα οποία οφείλονταν στη δράση του Noda-ιού. Επομένως, εφόσον ο ιός προσβάλλει το νευρικό σύστημα των ψαριών, είναι πιθανόν να προκαλεί διαταραχή στη λειτουργία της υπόφυσης, που έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία των ψαριών να αντεπεξέλθουν στην διαδικασία της οσμωρύθμισης. Η αδυναμία αυτή είναι δυνατόν να προκάλεσε τη μαζική θνησιμότητα που παρατηρήθηκε στα λαβράκια που ζούσαν στο γλυκό νερό και τα πιο έντονα νευρικά συμπτώματα. Ακόμα σε συσχέτισμό με τα παραπάνω, μπορεί να θεωρηθεί ότι εφόσον η μείωση της αλατότητας αποτελεί οσμωτικό στρες για τα λαβράκια, τα ψάρια αυτά ήταν από την αρχή πιο επιρρεπή στη λοίμωξη, αφού το στρες επιδεινώνει την εκδήλωση μιας νόσου. Τέλος, επειδή όπως διαπιστώθηκε η εξέλιξη της νόσου στα ψάρια και των τριών ενυδρείων ήταν ίδια από άποψη χρόνου, είναι φανερό ότι οι διαφορές που εντοπίστηκαν στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα των ψαριών δεν οφείλονταν στον ιό, αλλά στη διαφορετική φυσιολογία και ομοιοστασία τους στις διαφορετικές αλατότητες. Το στοιχείο αυτό είναι σε συμφωνία και με τη στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής.

Αναφορικά με την τσιπούρα, έχουν πραγματοποιηθεί δύο πειραματικές μελέτες μέχρι σήμερα και γενικά είναι ένα είδος στο οποίο η διερεύνηση της παθογόνου δράσης του ιού είναι ακόμη σε αρχικά στάδια. Στην παρούσα έρευνα

σκοπός ήταν να διερευνηθεί ο συσχετισμός της πιθανής εκδήλωσης συμπτωμάτων με τη δόση του ιού. Γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο ενυδρεία με νερό ίδιας αλατότητας (30‰). Οι τσιπούρες κάθε ενυδρείου μολύνθηκαν ενδομυϊκά με διαφορετική δόση ιού, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Στο ένα ενυδρείο τα ψάρια μολύνθηκαν με δόση 30μl ιού (τίτλος ιού 10^7 TCID₅₀/ml) και στο άλλο με δόση 50 μl ιού (τίτλος ιού 10^7 TCID₅₀/ml). Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια και των δύο ενυδρείων δεν εμφάνισαν κανένα σύμπτωμα και δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι, γεγονός που δείχνει αφενός ότι τα ψάρια αυτά είναι ασυμπτωματικοί φορείς και αφετέρου ότι η εκδήλωση των συμπτωμάτων δεν εξαρτάται από τη δόση του ιού. Τα παραπάνω ευρήματα είναι σύμφωνα με τα συμπεράσματα των Castric και συνεργάτες (2001), οι οποίοι αναφέρουν ότι η τσιπούρα παραμένει ασυμπτωματικός φορέας του ιού, ακόμη και όταν προσβληθεί με στέλεχος πολύ παθογόνο για το λαβράκι. Συμφωνούν επιπλέον και με τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Aranguren και συνεργάτες (2002). Οι ερευνητές αυτοί ενοφθάλμισαν, με στέλεχος που είχε απομονωθεί από κλινικά νοσούν λαβράκι, τσιπούρες μέσου βάρους 0,7, 2 και 4 γραμμαρίων ενδομυϊκά, καθώς και τσιπούρες 0,7 γραμμαρίων, ενδοπεριτοναϊκά ή με τη μέθοδο της εμβάπτισης. Με εξαίρεση τους θανάτους στα ψάρια που είχαν ενοφθαλμιστεί ενδομυϊκά, το ποσοστό των οποίων ήταν χαμηλότερο όσο μεγαλύτερο ήταν το βάρος των λαβρών τσιπούρας, δεν παρατήρησαν κανένα άλλο σύμπτωμα. Το γεγονός ότι στις τσιπούρες η μόλυνση είναι ασυμπτωματική, αποδείχθηκε επιπρόσθετα τόσο από το δεύτερο πείραμα που διενεργήθηκε, όσο και από την εξέταση των δειγμάτων με τη μέθοδο της real-time PCR, στοιχεία που θα αναλυθούν παρακάτω. Η απουσία συμπτωμάτων στις τσιπούρες της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οφειλόταν σε μη ενδεδειγμένο τρόπο μόλυνσης. Σύμφωνα όμως με τους Skliris και Richards (1999), η μέθοδος της ενδομυϊκής μόλυνσης, την οποία εφαρμόσαμε, έχει αποδειχτεί ως η πιο αποτελεσματική.

Σχετικά με το 2^ο πείραμα, αυτό έγινε σε δύο ομάδες λαβρακιών, τα οποία διατηρήθηκαν σε νερό αλατότητας 0‰ και 20‰, για 39 ημέρες. Μέχρι στιγμής με

βάσει τη διεθνή βιβλιογραφία, έχει ελεγχθεί η μετάδοση του ιού από ασυμπτωματικά μολυσμένες τσιπούρες σε λαβράκια, με τη μέθοδο της συμβίωσης (Castric και συν., 2001), που ήταν επιτυχής. Στη δική μας περίπτωση τα ψάρια μολύνθηκαν με βρώση οφθαλμών από τις ασυμπτωματικά μολυσμένες τσιπούρες του πρώτου πειράματος, διότι σκοπός ήταν να διαπιστωθεί αν τα λαβράκια μπορεί να μολυνθούν με αυτόν τον τρόπο, επειδή στη φύση κανιβαλίζουν. Σημειώνεται ότι αυτός ο τρόπος μόλυνσης λαβρακιών εφαρμόζεται για πρώτη φορά σε διεθνές επίπεδο. Επίσης ελέγχθηκε και η πιθανότητα επίδρασης της διαφορετικής αλατότητας του νερού στην εκδήλωση της λοίμωξης.

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος τα ψάρια εμφάνιζαν φυσιολογική κίνηση και φυσιολογική αντίδραση σε ερεθίσματα, ενώ η όρεξή τους ήταν αμείωτη. Παρόλα αυτά, εκδηλώθηκαν λίγες θνησιμότητες και στα δύο ενυδρεία, οι οποίες ξεκίνησαν την τέταρτη ημέρα μετά τη βρώση των οφθαλμών τσιπούρας. Ειδικότερα στο ενυδρείο με το γλυκό νερό το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας έφθασε στο 20%, ενώ στο ενυδρείο με το νερό αλατότητας 20‰ στο 16,6%. Το γεγονός ότι τα ζωντανά ψάρια κάθε ενυδρείου εκδήλωσαν και το φαινόμενο του κανιβαλισμού, στο οποίο είχε βασιστεί το πείραμα αυτό, δεν φαίνεται να επηρέασε το ποσοστό θνησιμότητας. Στα αντίστοιχα ενυδρεία με τα ψάρια μάρτυρες το ποσοστό θνησιμότητας ήταν 3%. Τα παραπάνω αποτελέσματα της κλινικής εξέτασης δεν βοηθούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικών με την επίδραση του κανιβαλισμού ή της αλατότητας στην εκδήλωση νευρικών συμπτωμάτων. Η απουσία αυτών, μπορεί όμως να οφείλεται στο ότι τα λαβράκια του 2^{ου} πειράματος ήταν μεγαλύτερης ηλικίας (μέσο βάρος 11γρ.) σε σχέση με εκείνα του 1^{ου}, οπότε η πιθανότητα να εκδηλωθεί η νόσος με τη χαρακτηριστική της μορφή ήταν μικρή. Τέλος, δεν υπάρχουν αντίστοιχες διεθνείς εργασίες, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για σύγκριση.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Ανίχνευση του Noda-ιού με *real-time PCR*

Στις διαγνωστικές μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση των παθολογικών υλικών (οφθαλμοί) που προέκυψαν από τα δύο πειράματα, προστέθηκε η ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*real-time PCR*). Η μέθοδος αυτή λειτουργεί κατά τη γραμμική φάση ενίσχυσης του προϊόντος της PCR και αφορά στη μέτρηση μιας φθορίζουσας ουσίας που προσκολλάται στη διπλή έλικα του DNA. Το σήμα του φθορίζοντος αυτού μορίου, αυξάνεται αναλογικά με την ποσότητα του προϊόντος της ενίσχυσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα του νουκλεϊκού οξέος-στόχου, τόσο πιο γρήγορα θα ξεκινήσει η ανίχνευση της φθορίζουσας ουσίας (Bustin και Mueller, 2005).

Μέχρι τώρα η *real-time PCR* είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη στην Ιατρική και θεωρείται ως η πιο ευαίσθητη μέθοδος ενίσχυσης τμημάτων DNA ή RNA ιών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Όσον αφορά στην επιστήμη της Ιχθυοπαθολογίας, έχει χρησιμοποιηθεί σε πολύ μικρό βαθμό για την ανίχνευση και τιτλοποίηση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών. Πιο συγκεκριμένα το 2001 οι Dhar και συνεργάτες ανέπτυξαν τη μέθοδο για την τιτλοποίηση του ιού της αιμοποιητικής νέκρωσης και του συνδρόμου των λευκών κηλίδων (*white spot syndrome*) σε γαρίδες (*Penaeus* sp.). Οι Ciulli και συνεργάτες (2006) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο για τον εντοπισμό βήτα Noda-ιών. Τον επόμενο χρόνο (2007) οι Balcázar και συνεργάτες την εφάρμοσαν για την ανίχνευση και την τιτλοποίηση του βακτηρίου *Aeromonas salmonicida* και διαπίστωσαν ότι η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε για την απομόνωση βακτηρίων. Το 2009 οι Cheng-Long και συνεργάτες ανέπτυξαν τη μέθοδο για τον εντοπισμό του ιριδοϊού σε όργανα καλκανιού και για τη διενέργεια επιδημιολογικής μελέτης του ιού. Τέλος οι Jang και συνεργάτες (2009) τη

χρησιμοποίησαν για τον εντοπισμό του ιού του white spot syndrome σε άγριους γεννήτορες και σε λάρβες γαρίδας (*Fenneropenaeus chinensis*, Osbeck). Σχετικά όμως με τον Noda-ιό, η ανίχνευσή του μέσω της real-time PCR βρίσκεται ακόμα σε πρωταρχικά στάδια, γεγονός που μας ώθησε στο να συμπεριληφθεί η συγκεκριμένη μέθοδος στα πλαίσια της διατριβής. Το σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν για παρουσία Noda-ιού τόσο στο 1^ο όσο και στο 2^ο πείραμα, αναλύθηκε με τη μέθοδο αυτή, η οποία σύμφωνα με τους Dalla Valle και συνεργάτες (2005), είναι πολύ πιο ευαίσθητη από την κλασική PCR ή τη μέθοδο απομόνωσης σε κυτταροκαλλιέργειες, όταν χρησιμοποιείται για το συγκεκριμένο σκοπό. Επίσης σύμφωνα με τους Abe και συνεργάτες (1999), η τεχνική της είναι πιο εύκολη και λιγότερο χρονοβόρα, η ευαισθησία της είναι παρόμοια με εκείνη της nested PCR και η ειδικότητά της μεγαλύτερη από εκείνη της κλασικής PCR. Τα πλεονεκτήματα αυτά της δίνουν την ικανότητα να εντοπίζει τους ιούς σε υποκλινικές λοιμώξεις ή σε λοιμώξεις που παρατηρείται αναζωπύρωση τους μετά από ανοσοκατασταλτική θεραπεία (Abe και συν., 1999), αλλά και σε γεννήτορες έτσι ώστε να προληφθεί η κάθετη μετάδοσή του (Dalla Valle και συν., 2005). Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του χρόνου εξέλιξης μιας νόσου σε οξείες καταστάσεις και για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας θεραπειών ενάντια στους ιούς (Abe και συν., 1999).

Η πιο απλή μέθοδος real-time PCR στηρίζεται στη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR Green I (Mackay και συν., 2002). Παρόλο που η χρωστική αυτή μπορεί να προσκολληθεί σε οποιαδήποτε διπλή έλικα DNA, συμπεριλαμβανομένων των διμερών των εκκινητών και των μη ειδικών προϊόντων της αντίδρασης, η ειδικότητα του προϊόντος του πολλαπλασιασμού μπορεί να ελεγχθεί από τις καμπύλες τήξης. Το γεγονός αυτό εκμηδενίζει την ανάγκη για έλεγχο του προϊόντος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, μειώνει το χρόνο της ανάλυσης και επιτρέπει την εξέταση πολλών δειγμάτων παράλληλα, σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (Dalla Valle και συν., 2005). Στην παρούσα διατριβή η καμπύλη τήξης έδειξε ότι τα διμερή των εκκινητών και τα ψευδώς θετικά προϊόντα δεν εμφανίζονταν όταν ο ιός

ανιχνευόταν στο δείγμα. Σε απουσία του ιού, παραγόταν μειωμένης έντασης φθορισμός, ο οποίος αναγνωριζόταν εύκολα αφού η θερμοκρασία τήξης της καμπύλης ήταν μικρότερη κατά 10°C . Επίσης η ανίχνευση του 18s rRNA του λαβρακιού, που ανιχνευόταν πάντοτε μαζί με το RNA του Noda-ιού, αποκλείει την πιθανότητα υποβάθμισης του RNA ή την πιθανή παρουσία αναστολέων, που θα οδηγούσαν στη λήψη ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Όσον αφορά στα λαβράκια του 1^{ου}, διαπιστώθηκε ότι σε εκείνα που βρίσκονταν σε νερό αλατότητας 0‰ ο μέσος όρος των τίτλων του ιού ημερησίως, διατηρήθηκε υψηλός, της τάξης του 10^{10} , σε όλο το διάστημα που διήρκησε το πείραμα. Ειδικότερα, από την τέταρτη ημέρα του πειράματος, ο μέσος όρος των τίτλων ήταν $4,8 \times 10^{10}$ και παρέμεινε σε περίπου ίδια επίπεδα μέχρι την τελευταία ημέρα (14^η, τίτλος $3,4 \times 10^{10}$). Η μέγιστη τιμή του ($1,6 \times 10^{11}$) παρατηρήθηκε την πέμπτη ημέρα, κάτι που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της κλινικής εξέτασης, αφού την ημέρα εκείνη το ποσοστό των ψαριών με νευρικά συμπτώματα έφθασε στο 85% και την επομένη παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας (24%) στο ενυδρείο αυτό. Για τα λαβράκια που ζούσαν στο νερό ενδιάμεσης αλατότητας (18‰), ο ημερήσιος μέσος όρος των τίτλων του ιού, κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα. Συγκεκριμένα την πέμπτη ημέρα του πειράματος ο μέσος όρος των τίτλων παρουσίασε μεγάλη αύξηση ($5,1 \times 10^{11}$), όμως η μεγαλύτερη τιμή του ($2,3 \times 10^{12}$) παρατηρήθηκε την έβδομη ημέρα, κατά την οποία ο τίτλος ήταν περίπου 15 φορές μεγαλύτερος από ό,τι στα ψάρια του ενυδρείου με το γλυκό νερό. Και στην περίπτωση αυτή, ο υψηλότερος μέσος όρος των τίτλων συμπίπτει με την ημέρα κατά την οποία παρουσιάστηκε το μεγαλύτερο ποσοστό ψαριών με νευρικά συμπτώματα (50%), αλλά και το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμοτήτων (8^η ημέρα, 11%). Για όλο το διάστημα που διήρκησε το πείραμα (18 ημέρες), οι ημερήσιοι μέσοι όροι των τίτλων του ιού παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα αν και, από τη δωδέκατη ημέρα και μετά, παρατηρήθηκε μικρή μείωση αυτών (μέσος όρος τίτλων 10^9) που διατηρήθηκε μέχρι την τελευταία ημέρα του πειραματισμού. Παράλληλα άρχισε να μειώνεται και το

ποσοστό των λαβρακιών που παρουσίαζαν νευρικά συμπτώματα, έως ότου τις δύο τελευταίες ημέρες του πειράματος τα ψάρια φαινόταν απολύτως υγιή παρότι, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο ιός ανιχνευόταν με τη μοριακή μέθοδο. Συμπερασματικά φαίνεται ότι οι μέσοι όροι των τίτλων του ιού, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ήταν αρκετά υψηλότεροι στα λαβράκια του ενυδρείου αυτού (αλατότητα 18‰) σε σύγκριση με εκείνα που ζούσαν στο γλυκό νερό. Εντούτοις τα νευρικά συμπτώματα ήταν αρκετά πιο ήπια και τα νεκρά ψάρια ήταν συνολικά περίπου τα μισά. Πάντως και στα δύο ενυδρεία, η ημέρα που παρατηρήθηκαν οι μέγιστοι μέσοι όροι των τίτλων του ιού συμπίπτει με την ημέρα που υπήρχαν τα εντονότερα συμπτώματα στα ψάρια και ακολουθείται από την ημέρα με τη μεγαλύτερη θνησιμότητα σε αυτά. Στα λαβράκια του ενυδρείου με νερό πλήρους αλατότητας (33‰), ο μέσος όρος των τίτλων του ιού ημερησίως κυμάνθηκε ακόμα υψηλότερα. Μάλιστα κάποιες ημέρες ήταν 50 φορές μεγαλύτερος από τον μέσο όρο του τίτλου που παρατηρήθηκε στα ψάρια του ενυδρείου με την ενδιάμεση αλατότητα. Αναλυτικότερα, από την τέταρτη κιόλας ημέρα ο μέσος όρος των τίτλων ήταν της τάξης του 10^{11} και την πέμπτη ημέρα τριπλασιάστηκε ($1,8 \times 10^{12}$). Οι υψηλότεροι μέσοι όροι τίτλων παρατηρήθηκαν την έβδομη ($2,6 \times 10^{12}$) και την ένατη ημέρα ($3,9 \times 10^{12}$), κατά τις οποίες παρατηρήθηκε και το υψηλότερο ποσοστό ψαριών με νευρικά συμπτώματα (70% και 80%, αντίστοιχα). Ο μεγαλύτερος αριθμός νεκρών ψαριών βρέθηκε επίσης την έβδομη ημέρα. Οι υψηλές αυτές τιμές διατηρήθηκαν μέχρι την ενδέκατη ημέρα, ενώ από τη δωδέκατη άρχισαν να μειώνονται, κάτι που συνέβη και στα ψάρια των δύο προηγούμενων ενυδρείων. Παρόλα αυτά παρέμειναν σχεδόν δεκαπλάσιες μέχρι και την τελευταία ημέρα του πειράματος σε σύγκριση με εκείνες στα ψάρια που βρίσκονταν σε νερό αλατότητας 0‰ και 18‰. Είναι φανερό λοιπόν ότι και στα λαβράκια του τρίτου ενυδρείου υπάρχει συσχετισμός των μέγιστων τίτλων του ιού με τον μέγιστο αριθμό νεκρών ψαριών που βρέθηκε, αλλά και με την ένταση των νευρικών συμπτωμάτων. Εντούτοις η στατιστική σύγκριση των ημερησίων μέσων όρων των τίτλων του ιού και στα τρία ενυδρεία, με τον συνολικό αριθμό των

νεκρών ψαριών σε αυτά, έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ τους, εφόσον το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων και ταυτόχρονα ο χαμηλότερος μέσος όρος των τίτλων του ιού παρατηρήθηκε στα λαβράκια που ζούσαν στο γλυκό νερό. Επομένως είναι φανερό ότι στην εξέλιξη της νόσου έπαιξε καθοριστικό ρόλο η διαφορετική αλατότητα που επικρατούσε στα ενυδρεία, και κατ' επέκταση η ορμονική ανισορροπία των ψαριών λόγω του οσμωτικού στρες.

Η μόνη μέτρηση των τίτλων του Noda-ιού σε πειραματικά μολυσμένα ψάρια με τη μέθοδο της real-time PCR, έγινε το 2005 από τους Dalla Valle και συνεργάτες. Οι συγγραφείς αυτοί χρησιμοποίησαν ως πειραματικό υλικό 50 λαβράκια. Ο μέγιστος τίτλος του ιού που ανιχνεύτηκε σε αυτά ήταν $4,31 \times 10^9$. Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα λαβράκια του εν λόγω πειράματος ζύγιζαν 20-90 γραμμάρια, καθώς επίσης ότι η μόλυνση των ψαριών έγινε με εμβάπτιση. Όμως όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ενδομυϊκή έγχυση, την οποία εφαρμόσαμε, είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος μόλυνσης και η νόσος είναι πιο οξεία σε ψάρια μικρού μεγέθους, όπως ήταν τα πειραματόζωα στην παρούσα έρευνα. Επομένως ήταν αναμενόμενο οι τίτλοι του ιού που προσδιορίστηκαν στα πλαίσια της διατριβής αυτής, να είναι μεγαλύτεροι σε σχέση με τους τίτλους που έχουν προσδιοριστεί μέχρι στιγμής σε λαβράκι.

Όσον αφορά στις τσιπούρες του 1^{ου} πειράματος, σε εκείνες του ενυδρείου T1 που έλαβαν τη μικρότερη δόση (30μl) ιού, οι ημερήσιοι μέσοι όροι των τίτλων του στους οφθαλμούς των ψαριών, ήταν σαφώς μικρότεροι απ' ότι στα λαβράκια που ενοφθαλμίστηκαν με τη ίδια ποσότητα. Ο μέγιστος τίτλος ήταν $2,5 \times 10^7$ την όγδοη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό των ψαριών. Γενικά όμως οι μέσοι όροι των τίτλων του ιού ήταν της τάξης του 10^6 τις ημέρες που βρέθηκαν αυξημένοι, δηλαδή από την πέμπτη έως τη δωδέκατη ημέρα. Το στοιχείο αυτό αποδεικνύει ότι η εξάπλωση του ιού στους ιστούς των τσιπούρων ήταν παρόμοια με εκείνη στα λαβράκια. Στις τσιπούρες του ενυδρείου T2, που ενοφθαλμίστηκαν με τη δόση των 50μl, οι ημερήσιοι μέσοι όροι των τίτλων του ιού ήταν επίσης της τάξης του 10^6 . Σε σχέση όμως με εκείνους των ψαριών του ενυδρείου T1, ήταν αρκετά αυξημένοι την όγδοη

($1,2 \times 10^8$) και τη δωδέκατη ημέρα ($1,6 \times 10^8$). Από τη δέκατη τρίτη ημέρα και μετά οι τίτλοι μειώθηκαν όπως και στα ψάρια του πρώτου ενυδρείου, αλλά διατηρήθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα από ό,τι σε εκείνο. Η μέγιστη μέση τιμή τους που παρατηρήθηκε ήταν $1,6 \times 10^8$. Ο τίτλος αυτός ήταν έξι φορές μεγαλύτερος από το μέγιστο τίτλο των τσιπούρων που μολύνθηκαν με την προαναφερθείσα μικρότερη δόση.

Με το πείραμα αυτό αποδείχτηκε ότι ο ιός προσβάλλει τους οφθαλμούς της τσιπούρας, όπως συμβαίνει και στο λαβράκι και ότι μπορεί να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί στο ψάρι αυτό, όπως ακριβώς και στο λαβράκι. Βέβαια είναι εμφανές ότι στις τσιπούρες ο βαθμός πολλαπλασιασμού του ιού είναι μικρότερος απ' ό,τι στα λαβράκια. Μάλιστα παραμένει μικρότερος ακόμη και όταν οι τσιπούρες ενοφθαλμιστούν με μεγάλη δόση ιού (50 μl). Παρό,τι όμως ο ιός πολλαπλασιάζεται στις τσιπούρες, αυτές δε νοσούν, γεγονός που επιβεβαιώνει τα ευρήματα άλλων ερευνητών, ότι δηλαδή είναι ασυμπτωματικοί φορείς του ιού (Castric και συν., 2001).

Η σχέση των τίτλων του ιού στους οφθαλμούς ιχθυδίων τσιπούρας με τη δοσολογία του ιού κατά τον ενοφθαλμισμό των ψαριών, καθώς επίσης και ο συσχετισμός της εκδήλωσης της νόσου με τη δόση του ιού γίνεται για πρώτη φορά διεθνώς και γι' αυτό δεν είναι δυνατόν να γίνει σύγκριση με ευρήματα άλλων ερευνητών. Επισημαίνεται επίσης ότι η ανίχνευση και η τιτλοποίηση του Noda-ιού στους ιστούς λαβρακιών με τη μέθοδο της real-time PCR έγινε για πρώτη φορά σε εθνικό επίπεδο, ενώ για τους ιστούς των τσιπούρων έγινε για πρώτη φορά σε διεθνές επίπεδο. Επιπλέον για πρώτη φορά διεθνώς χρησιμοποιήθηκε τόσο μεγάλος αριθμός ψαριών και έγινε ποσοτικοποίηση του ιού στους ιστούς τους, σε συνάρτηση με τις ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό τους.

Στο 2^ο πείραμα τα αποτελέσματα της real-time PCR έδειξαν ότι ο στόχος του επιτεύχθηκε, δηλαδή ο ιός μεταδόθηκε στα λαβράκια μέσω της βρώσης οφθαλμών ασυμπτωματικά μολυσμένων τσιπούρων, παρό,τι η λοίμωξη δεν εκδηλώθηκε με χαρακτηριστικά συμπτώματα. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού, οι ημερήσιοι μέσοι όροι των τίτλων του ιού στα ψάρια κυμάνθηκαν από 10^4 (λαβράκια ενυδρείου

Θ7, αλατότητα 20‰) μέχρι 10^5 (λαβράκια ενυδρείου Θ6, αλατότητα 0‰). Οι υψηλότερες τιμές, στα ψάρια και των δύο ενυδρείων, παρατηρήθηκαν την 6^η, 9^η, 12^η, και 15^η ημέρα του πειράματος. Η διαφορά αυτή στους τίτλους του ιού, μεταξύ των ψαριών των δύο ενυδρείων, οδήγησε στο να εξετάσουμε τη συγκέντρωσή του στους οφθαλμούς των τσιπούρων που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό μόλυνσης των λαβρακιών. Διαπιστώθηκε λοιπόν με τη real-time PCR, ότι ο μέσος όρος του τίτλου στους 30 οφθαλμούς τσιπούρων που χορηγήθηκαν στα λαβράκια του ενυδρείου Θ6 ήταν $1,7 \times 10^7$, ενώ εκείνος των οφθαλμών (30) που χορηγήθηκαν στα λαβράκια του Θ7 ήταν $0,9 \times 10^7$. Προκύπτει δηλαδή ότι οι οφθαλμοί που χορηγήθηκαν στα ψάρια του ενυδρείου Θ6 είχαν περίπου διπλάσια ποσότητα ιικών σωματιδίων από ό,τι είχαν οι οφθαλμοί που χορηγήθηκαν στα λαβράκια του Θ7. Εντούτοις είναι άγνωστο ποια ήταν ακριβώς η ποσότητα του λοιμογόνου ιού που έλαβε κάθε ψάρι μέσω των οφθαλμών, για τρεις λόγους. Πρώτον, το πρωτόκολλο μόλυνσης των λαβρακιών δεν διασφάλιζε τον ισόποσο καταμερισμό του μολυσματικού υλικού ανά λαβράκι, οπότε δεν είναι βέβαιο ότι κάθε ψάρι τράφηκε με έναν οφθαλμό και επίσης κάθε οφθαλμός είχε διαφορετικό τίτλο ιού. Επιλέχθηκε όμως ο τρόπος αυτός διότι προσεγγίζει τον φυσικό τρόπο μόλυνσης των ψαριών. Δεύτερον, οι οφθαλμοί των τσιπούρων είχαν αποθηκευτεί σε βαθιά κατάψυξη (-80°C) για διάστημα περίπου ενός χρόνου. Μετά την απόψυξή τους, είναι πιθανόν το ποσοστό των λοιμογόνων ιικών σωματιδίων που υπήρχε σε αυτούς να μειώθηκε, η μοριακή όμως μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αδύνατον να το προσδιορίσει, διότι δεν έχει αυτή τη δυνατότητα. Τρίτον, φαίνεται ότι μολύνθηκε ένα ποσοστό μόνο των λαβρακιών που βρίσκονταν σε κάθε ενυδρείο, διότι υπήρξαν δείγματα οφθαλμών από αυτά τα οποία είχαν μηδενικό τίτλο ιού μετά από την ανάλυση με την real-time PCR. Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι ούτε και από τα αποτελέσματα της μοριακής μεθόδου μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση της αλατότητας στην εκδήλωση της νόσου στα συγκεκριμένα ψάρια. Επειδή όμως ο ιός ανιχνεύτηκε στα παθολογικά υλικά είναι απαραίτητο να προλαμβάνεται το φαινόμενο του κανιβαλισμού, ειδικά όταν η

εκτροφή είναι μικτή (λαβράκια-τσιπούρες), διότι μπορεί ψάρια φορείς να συμβιώνουν με ψάρια ευαίσθητα στη νόσο.

Απομόνωση του Noda-ιού σε κύτταρα SSN-1

Στην παρούσα διατριβή ένας αριθμός παθολογικών υλικών (οφθαλμοί) εξετάστηκε και με την κλασική μέθοδο της απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες. Δεν εξετάστηκε το σύνολο των παθολογικών υλικών διότι ο κύριος σκοπός ήταν η αξιολόγηση της μοριακής μεθόδου (real-time PCR) για την διάγνωση παθολογικών καταστάσεων που οφείλονται σε Noda-ιό. Η απομόνωση του ιού εφαρμόστηκε ως μέθοδος επιβεβαίωσης των αποτελεσμάτων της real-time PCR, διότι ανιχνεύει μόνο τα λοιμογόνα ιικά σωματίδια, ενώ η μοριακή μέθοδος ανιχνεύει γενωμικό υλικό, ανεξαρτήτως εάν αυτό είναι λοιμογόνο ή όχι. Σε όλες τις περιπτώσεις που απομονώθηκε ιός από τα πειραματόζωα, το κυτταροπαθογόνο αποτέλεσμα (CPE) χαρακτηριζόταν από την παρουσία κυκλικών και κοκκιωδών κυττάρων με κενοτόπια και την εν συνεχεία μερική ή ολική καταστροφή του ταπητίου. Οι αλλοιώσεις αυτές των κυττάρων της κυτταροκαλλιέργειας ήταν σε συμφωνία με εκείνες που αναφέρονται από τους (Frerichs και συν., 1996· Iwamoto και συν., 1999).

Ο ιός απομονώθηκε από όλα τα λαβράκια του 1^{ου} πειράματος, ασχέτως εάν διαβιούσαν σε νερό διαφορετικής αλατότητας, από την πρώτη μέχρι την τελευταία δειγματοληψία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώθηκαν και τα αντίστοιχα αποτελέσματα της real-time PCR. Αναφορικά με τις τσιπούρες, το χρονικό διάστημα κατά το οποίο απομονώθηκε ο ιός ήταν σχετικά μικρότερο, τόσο από εκείνες που ενοφθαλμίστηκαν με 30 μl ιού όσο και από εκείνες που ενοφθαλμίστηκαν με 50 μl (6 και 7 δειγματοληψίες θετικές, αντίστοιχα σε σύνολο 9). Αρνητικά ήταν κυρίως τα δείγματα που πάρθηκαν τις τελευταίες ημέρες του πειραματισμού. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της real-time PCR, δηλαδή την ανίχνευση του ιού σε όλες τις τσιπούρες μέχρι και την τελευταία ημέρα του πειράματος (21^η). Η αδυναμία απομόνωσής του από τα παθολογικά υλικά των τσιπούρων των τελευταίων

ημερών του πειράματος, ακόμη και όταν έγιναν τρεις τυφλές δίοδοι όσων ήταν αρνητικά στην πρώτη δίοδο, οφειλόταν πιθανώς στο πολύ χαμηλό ιικό φορτίο, το οποίο όμως μπόρεσε να ανιχνεύσει η μοριακή μέθοδος. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα των Dalla Valle και συνεργάτες (2005), οι οποίοι σύγκριναν την ευαισθησία της ποσοτικής PCR με εκείνη της κλασικής PCR, αλλά και με εκείνη της απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες. Η ευαισθησία της ποσοτικής PCR ήταν περίπου 10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την ευαισθησία των δύο άλλων μεθόδων. Εντούτοις εξαιτίας του γεγονότος ότι η PCR ανιχνεύει λοιμογόνο και μη γενωμικό υλικό δεν μπορεί να αντικαταστήσει εξ ολοκλήρου την απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες, διότι η νόσος προκαλείται από τα λοιμογόνα ιικά σωματίδια και η παρουσία τους επιβεβαιώνεται μόνο με τη μέθοδο της απομόνωσης. Επομένως σε αμφίβολες νοσολογικές καταστάσεις πρέπει να χρησιμοποιούνται και οι δύο τεχνικές, η κάθε μία για τα πλεονεκτήματά της. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο συσχετισμός των αποτελεσμάτων της απομόνωσης του ιού με εκείνα της real-time PCR, σε τόσο μεγάλο όγκο πειραματικού υλικού, έγινε για πρώτη φορά σε διεθνές επίπεδο.

Όσον αφορά στα λαβράκια του 2^{ου} πειράματος, από εκείνα που ζούσαν στο γλυκό νερό ο ιός δεν απομονώθηκε από την 27^η ημέρα και μετά, ενώ από τα λαβράκια που ζούσαν σε νερό ενδιάμεσης αλατότητας, η απομόνωση ήταν δυνατή μόνο κατά τις πρώτες 15 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αντίθετα η real-time PCR έδειξε ότι στους οφθαλμούς των λαβρακιών αυτών υπήρχε ιός μέχρι και την τελευταία ημέρα του πειράματος, ασχέτως αν δεν μπορούσε να προσδιορίσει αν ήταν λοιμογόνος ή όχι. Αποδείχθηκε δηλαδή και στην περίπτωση αυτή ότι η μοριακή μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη από την κλασική μέθοδο απομόνωσης σε κυτταροκαλλιέργειες, κάτι που δηλώνουν και οι ξένοι ερευνητές (Dalla Valle και συν., 2005).

Ιστοπαθολογικές εξετάσεις

Η καθημερινή λήψη και εξέταση παθολογικών υλικών από τα ψάρια του 1^{ου} πειράματος, αρχίζοντας από την τέταρτη ημέρα μετά τη μόλυνση, καθώς και ο συσχετισμός των αλλοιώσεων με τις ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό, γίνεται για πρώτη φορά διεθνώς. Σκοπός ήταν η λεπτομερής καταγραφή της εξέλιξης της νόσου από πλευράς ιστολογικών αλλοιώσεων, για την οποία δεν υπάρχει τίποτε σχετικό στη βιβλιογραφία. Επίσης είναι η πρώτη φορά που γίνεται μελέτη της ιστολογικής εικόνας σε τόσο μεγάλο αριθμό ψαριών διεθνώς.

Όσον αφορά στα λαβράκια, παρατηρήθηκε ότι και στα τρία ενυδρεία οι αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή ξεκίνησαν από την εσωτερική στοιβάδα του. Η ένταση και η εξάπλωση αυτών άρχισαν να κλιμακώνονται από την έκτη ημέρα της μόλυνσης και μετά, μέχρις ότου τις τελευταίες ημέρες των δειγματοληψιών υπήρχε κενотоπιώδης εκφύλιση σε όλες σχεδόν τις στοιβάδες του αμφιβληστροειδή. Οι αλλοιώσεις στον εγκέφαλο αφορούσαν κυρίως στον οπτικό λοβό και στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, αλλά υπήρξαν και περιπτώσεις που εντοπίζονταν και σε άλλες περιοχές, όπως σε προμήκη, παρεγκεφαλίδα, διεγκέφαλο, μεσεγκέφαλο και νωτιαίο μυελό (ένα ψάρι). Οι αλλοιώσεις στον εγκέφαλο ήταν πιο έντονες στα ψάρια του ενυδρείου με την ενδιάμεση αλατότητα και λιγότερο έντονες στα ψάρια του ενυδρείου με το γλυκό νερό. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με το ποσοστό συνολικής θνησιμότητας των ψαριών στα δύο ενυδρεία. Δηλαδή στα λαβράκια που βρίσκονταν σε νερό ενδιάμεσης αλατότητας το ποσοστό θνησιμότητας ήταν πολύ μικρό, παρότι οι αλλοιώσεις ήταν έντονες, ενώ σε εκείνα που ζούσαν στο γλυκό νερό ήταν πολύ μεγάλο. Η απουσία έντονων αλλοιώσεων στον εγκέφαλο των λαβρακιών που ζούσαν σε γλυκό νερό, πιθανώς να οφείλεται στο ότι αυτές δεν πρόλαβαν να εξελιχθούν, διότι η λοίμωξη ήταν βαριάς μορφής και οδήγησε σε μαζική θνησιμότητα τις πρώτες ημέρες του πειράματος. Ακόμη παρατηρήθηκε και λιπώδης εκφύλιση στο ήπαρ των μολυσμένων λαβρακιών, αλλοίωση που δεν σχετίζεται με τη νόσο.

Σχετικά με τις τσιπούρες, παρό,τι δεν εκδήλωσαν συμπτώματα, η εικόνα που προέκυψε από την ιστοπαθολογική μελέτη ήταν παρόμοια με εκείνη που παρατηρήθηκε στα λαβράκια. Αυτό δείχνει ότι ο ιός πολλαπλασιάστηκε στα κύτταρα των ίδιων οργάνων, όπως και στα λαβράκια, αλλά πιθανώς όχι σε βαθμό ικανό να προκαλέσει αλλοιώσεις σε ζωτικά κέντρα του εγκεφάλου, ώστε να εκδηλωθούν συμπτώματα. Διαπιστώθηκε επίσης ότι στον αμφιβληστροειδή χιτώνα των τσιπούρων οι αλλοιώσεις ήταν σταθερά παρούσες από την ένατη ημέρα και μετά, αλλά δεν ήταν τόσο έντονες όσο στα λαβράκια, παρό,τι το συγκεκριμένο πείραμα διήρκησε περισσότερες ημέρες. Γενικά πάντως τόσο στον εγκέφαλο όσο και στον αμφιβληστροειδή, τα κενοτόπια ήταν πολύ λιγότερα σε σύγκριση με εκείνα στα λαβράκια και γι' αυτό δεν υπήρξε μεγάλου βαθμού νέκρωση των ιστών της τσιπούρας και κατ' επέκταση δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα που να οφείλονται στη νέκρωση αυτή. Τα παραπάνω ιστολογικά ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της real-time PCR, τα οποία έδειξαν ότι ο ιός είχε τροπισμό στους οφθαλμούς της τσιπούρας και πολλαπλασιάστηκε στα κύτταρα του αμφιβληστροειδή, αν και η ποσότητά του ήταν σαφώς μικρότερη από ό,τι στα λαβράκια.

Όσον αφορά στο 2^ο πείραμα, οι αλλοιώσεις στον αμφιβληστροειδή των μολυσμένων λαβρακιών περιορίστηκαν στην εσωτερική πυρηνική στοιβάδα, το εσωτερικό δικτυωτό στρώμα, τη στοιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων και σε ένα ψάρι, στη στοιβάδα των νευρικών ινών. Σε όλες τις περιπτώσεις τα κενοτόπια στον αμφιβληστροειδή ήταν πολύ λιγότερα σε αριθμό από ό,τι στα λαβράκια του 1^{ου} πειράματος και το χαρακτηριστικό είναι ότι οι στοιβάδες στις οποίες εντοπίστηκαν ήταν ίδιες με εκείνες στις οποίες εντοπίστηκαν κενοτόπια στις τσιπούρες του 1^{ου} πειράματος. Όσον αφορά στον εγκέφαλο, για πρώτη φορά διεθνώς εντοπίζονται κενοτόπια στην υπόφυση λαβρακιών, σχεδόν με την ίδια συχνότητα που εντοπίστηκαν στον οπτικό λοβό.

Από τα αποτελέσματα της ιστοπαθολογικής εικόνας των λαβρακιών του 2^{ου} πειραματισμού δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την εξέλιξη

των αλλοιώσεων σε συνάρτηση με τη διάρκεια του πειράματος, ούτε και συμπεράσματα που να αφορούν στη συσχέτιση της αλατότητας με την ιστοπαθολογική εικόνα. Πιθανώς αυτό να ήταν εφικτό εάν τα ψάρια που λήφθηκαν ως δείγματα ήταν περισσότερα σε αριθμό και οι δειγματοληψίες γίνονταν συχνότερα και όχι κάθε τρεις ημέρες. Εντούτοις και τα ιστολογικά ευρήματα, όπως τα αποτελέσματα της μοριακής και της κλασικής μεθόδου, ενισχύουν την αρχική υπόθεση μετάδοσης του ιού σε λαβράκια, διαμέσου της βρώσης οφθαλμών μολυσμένης τσιπούρας.

Συμπερασματικά στο σύνολο των ιστολογικών τομών και από τα δύο πειράματα, το πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου ήταν πιο έντονα προσβεβλημένο από ό,τι το οπίσθιο και ο νωτιαίος μυελός. Πιο συχνά προσβεβλημένος βρέθηκε ο οπτικός λοβός, στον οποίο οι αλλοιώσεις εντοπίζονταν κυρίως στη φαιά ουσία. Σε αρκετές περιπτώσεις υπήρχαν εμφανείς αλλοιώσεις στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, στα οποία η εικόνα της κενοτοπιώδους εκφύλισης όταν υπήρχε, ήταν πιο έντονη σε σύγκριση με εκείνη του οπτικού λοβού. Δεν παρατηρήθηκαν κενοτόπια στο οπτικό νεύρο, σε όλες τις περιπτώσεις στις οποίες ήταν δυνατή η παρατήρηση του. Το ίδιο ισχύει και για τον οσφρητικό λοβό. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με εκείνα των Grotmol και συνεργάτες (1997), οι οποίοι αναφέρουν ότι ο οπτικός λοβός προσβάλλεται εντονότερα και υπάρχει κενοτοποίηση των νευρώνων των κεφαλικών γαγγλίων του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και των νωτιαίων γαγγλίων. Σε αντίθεση, οι Le Breton και συνεργάτες (1997) αναφέρουν ότι σε νοσούντα ενήλικα ευρωπαϊκά λαβράκια, ο οπτικός λοβός σπάνια ήταν προσβεβλημένος. Επίσης οι Munday και συνεργάτες (2002), αναφέρουν ότι η πιο χαρακτηριστική αλλοίωση είναι η παρουσία κενοτοπιών στη φαιά ουσία του εγκεφάλου. Τα κενοτόπια φαίνεται ότι είναι ενδοκυτταροπλασματικά, αν και η ακριβής τους θέση δεν είναι πάντα προσδιορίσιμη (Munday και συν., 2002).

Αναφορικά με τον αμφιβληστροειδή, οι Munday και συνεργάτες (1992) διαπίστωσαν ότι η κενοτοποίηση αφορά τα κυτταρικά συστατικά του, ειδικά τις

διπολικές και γαγγλιωνικές πυρηνικές στοιβάδες. Σύμφωνα με τους Grotmol και συνεργάτες (1995), μπορεί να βρεθούν μικρά κενοτόπια και στη στοιβάδα των ραβδίων και των κωνίων. Τα στοιχεία αυτά είναι επίσης σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της διατριβής, παρότι σε αυτή η ιστοπαθολογική μελέτη ήταν πιο εκτενής σε σχέση με τις παραπάνω εργασίες και παρατηρήθηκε η παρουσία κενοτοπίων και στη στοιβάδα των οπτικών κυττάρων. Στον αμφιβληστροειδή τα κενοτόπια ήταν εμφανή κυρίως σε περιοχές εκ διαμέτρου αντίθετες από την οπτική θηλή. Στην παρούσα διατριβή στα ψάρια του πρώτου πειράματος στα οποία πραγματοποιήθηκε πιο εκτενής ιστοπαθολογική μελέτη, η παρουσία των κενοτοπίων ήταν πιο έντονη στην περιοχή του αμφιβληστροειδούς που βρίσκεται εκ διαμέτρου αντίθετα από το σημείο στο οποίο το οπτικό νεύρο εισέρχεται στο χιτώνα. Η παρατήρηση αυτή ίσως υποδεικνύει ότι ο ιός δεν εισήλθε στους οφθαλμούς μέσω του οπτικού νεύρου. Στο πρώτο πείραμα που η μόλυνση των ψαριών έγινε ενδομυϊκά, αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην άμεση είσοδο του ιού στην κυκλοφορία του αίματος και διαμέσου αυτής στους οφθαλμούς.

Τις τελευταίες ημέρες κατά τις οποίες τα περισσότερα λαβράκια που πάρθηκαν ως δείγματα ήταν φαινομενικώς υγιή, δεν υπήρχαν ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις στον εγκέφαλο, αλλά στον οφθαλμό. Οπότε ίσως είναι καλύτερα να ελέγχονται οι οφθαλμοί για την παρουσία του ιού και όχι ο νευρικός ιστός, κάτι που συμβαίνει στα περισσότερα διαγνωστικά εργαστήρια. Πιθανώς η ανάπτυξη του νευρικού ιστού να είναι πιο γρήγορη από ό,τι του αμφιβληστροειδούς χιτώνα. Εξ άλλου έχει παρατηρηθεί ότι ψάρια τα οποία επιβιώνουν μετά από οξεία μορφή της νόσου μπορεί να μη φέρουν αλλοιώσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Αυτό είναι δυνατόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα τελεόστεα ψάρια έχουν την ικανότητα να παράγουν νέους νευρώνες και να αναγεννούν τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους (Ferguson 2006).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τελικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα έρευνα συνοψίζονται στα εξής:

- Παρότι τα λαβράκια στο ενυδρείο του γλυκού νερού είχαν μικρότερους τίτλους ιού από τα λαβράκια στα ενυδρεία με ενδιάμεση και πλήρη αλατότητα, οι θνησιμότητες στα ψάρια αυτά ήταν μεγαλύτερες.
- Το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας που παρατηρήθηκε στα λαβράκια του γλυκού νερού είναι πιθανό να οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών αυτών να αντιμετωπίσει τον ιό. Η διαταραχή αυτή προκλήθηκε από το οσμωτικό στρες στο οποίο υποβάλλονται τα ψάρια όταν μεταφέρονται στο γλυκό νερό.
- Η προσβολή του ΚΝΣ και ιδιαίτερα της υπόφυσης από τον ίδιο τον ιό, είναι πιθανό να οδήγησε στη διαταραχή της ομοιοστασίας του οργανισμού των ψαριών σε επίπεδο ορμονών. Αποτέλεσμα της ορμονικής διαταραχής ήταν η πρόκληση προβλημάτων στην οσμωρύθμιση των ψαριών. Τα ψάρια αυτά ήταν πιο επιρρεπή σε οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση και κατ' επέκταση στη μόλυνση από το Noda-ιό.
- Πρέπει να δοθεί μεγάλη σημασία στην αποφυγή των στρεσσογόνων καταστάσεων σε διαχειριστικό επίπεδο στις μονάδες, αφού αποδείχθηκε στην παρούσα μελέτη η σημασία της πρόκλησης στρες κατά τη διάρκεια της μόλυνσης με το Noda-ιό.
- Η μέθοδος της real-time PCR είναι μια πολύ αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου στους ιστούς των ψαριών. Δίνει τη δυνατότητα να συσχετισθούν τα συμπτώματα, η παθολογοανατομική εικόνα και οι θνησιμότητες στα ψάρια, με την εξέλιξη των τίτλων του ιού κατά τη διάρκεια της νόσου.

- Στα λαβράκια του 1^{ου} πειράματος υπήρξε αντιστοιχία μεταξύ της ημέρας που παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτεροι τίτλοι του ιού στους ιστούς των ψαριών και της ημέρας που παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό συμπτωμάτων.
- Οι τσιπούρες δεν εκδηλώνουν συμπτώματα ακόμη και αν μολυνθούν με μεγάλη δόση ιού.
- Η μόλυνση στις τσιπούρες μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο εργαστηριακά με τη χρήση της real-time PCR ή μετά από ιστολογική εξέταση.
- Οι τίτλοι του ιού στα παθολογικά υλικά (οφθαλμοί) των τσιπούρων ήταν μικρότεροι από εκείνους στα λαβράκια, παρότι η μολύνουσα δόση στις τσιπούρες ήταν ίδια και μεγαλύτερη από τη δόση στα λαβράκια.
- Οι τίτλοι του ιού στις τσιπούρες είχαν την ίδια εξέλιξη, από απόψεως χρόνου, όπως και εκείνοι των λαβρακιών.
- Ο ιός μεταδόθηκε σε υγιή λαβράκια μετά από βρώση οφθαλμών των ασυμπτωματικά μολυσμένων τσιπούρων του πρώτου πειράματος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- Abe, Inoue K., Tanaka T., Kato J., Kajiyama N., Kawaguchi R., Tanaka S., Yoshida M. and Kohara M. (1999) Quantification of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9): 2899-2903.
- Albarino C.G., Price B.D., Eckerle L.D. and Ball A. (2001) Characterization and template properties of RNA dimers generated during flock house virus RNA replication. *Virology* 289: 269-282.
- Aranguren R., Tafalla C., Novoa B. and Figueras A. (2002) Nodavirus replication in a turbot cell line. *Journal of Fish Diseases* 25: 361-366.
- Aranguren R., Tafalla C., Novoa B. and Figueras A. (2002) Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus to sea bream, *Sparus aurata* L., using different infection models. *Journal of Fish Diseases* 25(6): 317-324.
- Arimoto M., Mori K., Nakai T., Muroga K. and Furusawa I. (1993) Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Journal of Fish Diseases* 16: 461-469.
- Arimoto M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroga K., Furusawa I. (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Fish Pathology* 27: 191-195.
- Arimoto M., Sato J., Maruyama K., Mimura G. and Furusawa I. (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* 143: 15-22.
- Aspehaug V., Devold M. and Nylund A. (1999) The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 19(5): 196-203.

- Athanassopoulou F., Billinis C. and Prapas Th. (2004) Important disease conditions of new cultured species (*Acipenser gueldenstaedi*, *Mugil* sp., *Dicentrarchus labrax* and *Silurus* sp, *Oreochromis* sp.) in intensive freshwater farming conditions in Greece: First incidence of Nodavirus infection in *Acipenser* sp. *Diseases of Aquatic Organisms* 60: 247-252.
- Athanassopoulou F., Billinis C., Psychas V. and Karipoglou K. (2003) Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* L. farmed in freshwater recirculated and open system facilities in Greece. *Journal of Fish Diseases* 26: 361-365.
- Awang A.B. (1987) Sea bass (*Lates calcarifer*) larvae and fry production in Malaysia. In: *Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi Lates calcarifer* (ed. by J.W. Copland & D.I. Grey), pp. 144–147. ACIAR, Canberra.
- Azad I.S., Jithendran K.P., Shekhar M.S., Thirunavukkarasu A.R. and de la Pena L.D. (2006) Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)-A case study. *Aquaculture* 255(1-4): 39-47.
- Balcázar J.L., Vendrell D., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Gironés O. and Múzcuiz J.L. (2007) Quantitative detection of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR using self-quenched, fluorogenic primers. *Journal of Medical Microbiology* 56: 323-328.
- Banu G.R and Nakai T. (2004) Inoculation of BALB/c Mice with Fish-pathogenic Nodaviruses. *Journal of Comparative Pathology* 130: 202-204.
- Barker D.E., MacKinnon A.-M., Boston L., Burt M., Cone D.K., Speare D.J., Griffiths S., Cook M., Ritchie R. and Olivier G. (2002) First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 49: 99-105.

- Barton B.A. and Iwama G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1: 3-26.
- Bellance R. and Gallet de Saint-Aurin D. (1988) L'encephalite virale de loup de mer. *Caraibes Medical* 2: 105-114.
- Bitchava K., Xylouri E., Fragkiadaki E., Athanassopoulou F., Papanastassopoulou M. and Sabatakou O. (2007) First incidence of clinical signs of nodavirus infection in sea bream, *Sparus auratus* L., showing nervous clinical signs. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 59(1): 3-9.
- Bloch B., Gravningen K. and Larsen J.L. (1991) Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 65-70.
- Bondad-Reantaso M.G., Kanchanakhan S. and Chinabut S. (2000) Review of grouper diseases and health management strategies for grouper and marine finfish diseases. In: *APECFWG02/2000 Workshop. Development of a Regional Research Program on Grouper Virus Transmission and Vaccine Development*, Bangkok, 18-20 October 2000, pp. 27-60.
- Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J. and Hoffmann R.W. (1996) Picorna-like virus associated with mortality and spongious encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 26: 75-80.
- Bovo G., Maltese C., Mutinelli F., Rosin R. and Montesi F. (1999a) A rapid and efficient method for diagnosing viral encephalopathy in symptomatic specimens. Abstract P-162. *Ninth International Conference of the European Association of Fish Pathologists*, 19-24 September 1999, Rhodes.
- Bovo G., Nishizawa T., Maltese C., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F. and De Mas S. (1999) Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus research* 63: 143-146.

- Breuil G. and Romestand B. (1999) A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application to the screening of spawners in a sea bass hatchery. *Journal of fish diseases* 22: 45-52.
- Breuil G., Bonami J.R., Pepin J.F. and Pichot Y. (1991) Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 97: 109-116.
- Breuil G., Mouchel O., Fauvel C. and Pepin J.F. (2001) Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 45: 25-31.
- Breuil G., Pepin J.F., Castric J., Fauvel C. and Thiery R. (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 20(3): 95-100.
- Breuil G., Pepin J.F.P, Boscher S. and Thiery R. (2002) Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) *Journal of Fish Diseases* 25: 697-702.
- Burton B.A. (2002) Stress in Fishes: a Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.
- Bustin S.A. and Mueller R. (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 109: 365-379.
- Callinan R.B. (1988) Diseases of Australian native fishes. In: *Fish Diseases* (ed. by D.I. Bryden), pp. 459–472. Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sydney, Sydney.
- Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., Mc Geoch D.J., Pringle C.R. and Wickner R.B. (2000) *Virus Taxonomy*. Academic Press, San Diego.

- Castric J., Thiery R., Jeffroy J., de Kinkelin P. and Raymond J.C. (2001) Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of aquatic organisms* 47: 33-38.
- Chang S.F., Ngoh G.H. and Kueh S. (1997) Detection of viral nervous necrosis nodavirus by reverse transcription polymerase chain reaction in locally farmed marine food fish. *Singapore Veterinary Journal* 21: 39–44.
- Chang S.F., G. H. Ngoh, L. F. S. Kueh, Q. W. Qin, C. L. Chen, T. J. Lam and Y. M. Sin (2001) Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture* 192(2-4): 133-145.
- Chen L.J., Su Y.C. and Hong J.R. (2009) Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti-necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology* (article in press).
- Cheng-Long W., Cheng-Yin S., Jie H. and Xiao-Yu K. (2009) Real-time PCR assay for sensitive organ detection and epidemic investigation of Turbot reddish body iridovirus. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 6(1): 61-67.
- Chi S.C., Hu W.W. and Lo B.L. (1999) Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases* 22: 173–182.
- Chi S.C., Lo C.F. and Lin S.C. (2001) Characterization of grouper nervous necrosis virus. *Journal of Fish Diseases* 24: 3–13.
- Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E. and Chen S.N. (1997) Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 20: 185–193.
- Chi S.C., Lo J., Lin S.C., Wen W.W., Lo G.F., Kou G.H. and Chen S.N. (2000) The survey of viral nervous necrosis among cultured groupers in Taiwan. In:

APEC FWG 02/2000. Development of a Regional Research Program on Grouper Virus Transmission and Vaccine Development, Bangkok, 18–20 October 2000.

Chi S.C., Shieh J.R. and Lin S.J. (2003) Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 221–228.

Chua F.H.C., Loo J.J. and Wee J.Y. (1995) Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. In: *Diseases in Asian Aquaculture II* (ed. by M. Schariff, J.R. Arthur & R.P. Subasinghe), pp. 235-241. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines.

Ciulli S., Galletti E., Gallina L., Vaccari F. and Prosperi S. (2006) Detection and quantification of *Betanodavirus* by real time PCR. *Veterinary Research Communications* 30(1): 235-238.

Coerdacier J.-L., Laporte F. and J.-F. Pepin (2003) Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish & Shellfish Immunology* 14(5): 435-447.

Comps M., Pepin J.F. and Bonami J.R. (1994) Purification and characterisation of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 123: 1–10.

Comps M., Trindade M. and Delsert C. (1996) Investigation of fish encephalitis viruses (FEV) expression in marine fishes using DIG-labelled probes. *Aquaculture* 143: 113–121.

Curtis P.A., Drawbridge M., Iwamoto T., Nakai T., Hedrick R.P. and Gendron A.P. (2001) Nodavirus infection of juvenile white seabass, *Atractoscion nobilis*, cultured in southern California: first record of viral nervous necrosis (VNN) in North America. *Journal of Fish Diseases* 24: 263-271.

- Dalla Valle L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P. and Colombo L. (2000) Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of fish diseases* 23: 321-327.
- Dalla Valle L., Toffolo V., Lamprecht M., Maltese C., Bovo G., Belvedere P. and Colombo L. (2005) Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Veterinary Microbiology* 110: 167-179.
- Danayadol Y., Direkbusarakom S. and Supamattaya K. (1995) Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. In: *Diseases in Asian Aquaculture II* (ed. by M. Schariff, J.R Arthur. & R.P. Subasinghe), pp. 227-233. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines
- Delsert C., Morin N. and Comps M. (1997) Fish nodavirus lytic cycle and semipermissive expression in mammalian and fish cell cultures. *Journal of virology* 71: 5673-5677.
- Delsert C., Morin N. and Comps M. (1997) A fish encephalitis virus that differs from other nodaviruses by its capsid protein processing. *Archives of Virology* 142: 2359-2371.
- Dhar A.K., Roux M.M. and Klimpel K.R. (2001) Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2835-2845.
- Drury R.A. and Wallington E.A. (1980) Carleton's Histological Techniques. Oxford University Press, Oxford, pp. 520.
- Evans D.H. and Claiborne J.B. (2006) *The Physiology of Fishes*. 3rd ed. Taylor and Francis Group, Boca Raton.

- Ferguson H. (2006) Systemic Pathology of Fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease. Scotian Press, 2nd ed., London, UK, pp. 263.
- Frerichs G.N., Rodger H.D. and Peric Z. (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology* 77: 2067-2071.
- Frerichs G.N., Tweedie A., Starkey W.G. and Richards R.H. (2000) Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture* 185: 13-24.
- Fukuda Y., Nguyen H.D., Furuhashi M. and Nakai T. (1996) Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathology* 31: 165-170.
- Gilda D., Lio-Po and de la Pena L.D. Chapter 1. Viral Diseases. Aquaculture Extension Manual.
- Glazebrook J.S. and Campbell R.S.F. (1987) Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. In: *Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi (Lates calcarifer)* (ed. by J.W. Copland & D.L. Grey), pp. 204–206. Proceedings of an international workshop, Darwin, N.T. Australia, 24–30, September 1986, Australian Centre for International Agriculture Research (ACIAR) vol. 20, ACIAR, Canberra (1987).
- Glazebrook J.S., Heasman M.P. and De Beer S.W. (1990) Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases* 13: 245-249.
- Glazebrook J.S. (1995) Diseases risk associated with translocation of a virus lethal for barramundi (*Lates calcarifer*). Thesis
- Gomez D.K., Sato J., Mushiake K., Isshiki T., Okinaka Y. and T. Nakai (2004) PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases* 27: 603-608.

- Grotmol S. and Totland G.K. (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 89–96.
- Grotmol S., Bergh O. and Totland G.K. (1999) Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 95-106.
- Grotmol S., Totland G.K. and Kryvi H. (1997b) Detection of nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 79-84.
- Grotmol S., Totland G.K., Kvellestad A., Fjell K. and Olsen A.B. (1995) Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in the central nervous system and retina. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 15: 176–180.
- Grotmol S., Totland G.K., Thorud K. and Hjeltnes B.K. (1997a). Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 85-97.
- Grove S., Faller R., Soleim B.K. and Dannevig B.H. (2006) Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *Journal of Virological Methods* 132(1-2): 104-112.
- Grove S., Johansen R., Dannevig B.H., Reitan L.J. and Ranheim T. (2003) Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. *Diseases of Aquatic Organisms* 53: 211-221.

- Hart D., Frerichs G.N., Rambaut A. and Onions D.E. (1996) Complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the snakehead fish retrovirus. *Journal of Virology* 70: 3606-3616.
- Hegde A., The H.C., Lam T.J. and Sin Y.M. (2003) Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy, *Poicelia reticulata* – comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology*.
- Huang B., Tan C., Chang S.F., Munday B., Mathew J.A., Ngoh G.H. and Kwang J. (2001) Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases* 24(3): 135.
- Husgaro S., Grotmol S., Hjeltnes B., Rodseth O.M. and Biering E. (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of Aquatic Organisms* 45: 33-44.
- ICTVdB Management (2006) 00.045.0.02. Betanodavirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.
- Ito Y., Okinaka Y., Mori K.I., Sugaya T., Nishioka T., Oka M. and Nakai T. (2008) Variable region of Betanodavirus RNA2 is sufficient to determine host specificity. *Diseases of Aquatic Organisms* 79(3): 199-205.
- Iwamoto T., Kazuyuki M., Takeda A., Okinaka Y., Mori K.I., Arimoto M., Okuno T. and Nakai T. (2005) Characterization of *Striped jack* nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of General Virology* 86: 2807-2816.
- Iwamoto T., Mise K., Takeda A., Okinaka Y., Mori K., Arimoto M., Okuno T. and Nakai T. (2005) Characterization of *Striped jack* nervous necrosis virus

subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of general virology* 86: 2807-2816.

Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. and Nakai T. (1999) High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 37-47.

Iwamoto T., Mori K., Arimoto M. and Nakai T. (2001) A combined cell-culture and RT-PCR method for rapid detection of piscine nodaviruses. *Journal of Fish Diseases* 24(4): 231.

Iwamoto T., Nakai T., Mori K., Arimoto M. and Furusawa I. (2000) Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms* 43: 81-89.

Iwamoto T., Okinaka Y., Mise K., Mori K.-I., Arimoto M., Okuno T. and Nakai T. (2004) Identification of Host-Specificity Determinants in Betanodaviruses by Using Reassortants between Striped Jack Nervous Necrosis Virus and Sevenband Grouper Nervous Necrosis Virus. *Journal of General Virology* 78: 1256-1262.

Jang I.-K., Meng X.-H., Seo H.-C., Cho Y.-R., Kim B.-R., Ayyaru G. and Kim J.-S. (2009) A TaqMan real-time PCR assay for quantifying white spot syndrome virus (WSSV) infections in wild broodstock and hatchery-reared postlarvae of fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 287: 40-45.

Johansen R. (2004) Nodavirus infection of farmed marine fish with emphasis on subclinical and persistent infection. Thesis, Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, 2004.

Johansen R., Amundsen M., Dannevig B.H. and Sommer A.I. (2003) Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 35-41.

Johansen R., Sommerset I., Torud B., Korsnes K., Hjortaas M.J., Nilsen F., Nerland A.H. and Dannevig B.H. (2004) Characterization of nodavirus and viral

- encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.)
Journal of Fish Diseases 27: 591-601.
- Johnson S.C., Groman D.B., Cusack R.R., Sperker S.A., Leggiadro C.T., Ritchie R. and Cook M.D. (2001) Identification and characterization of a piscine neuropathy nodavirus from juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). Abstract P-045. In: *Tenth International Conference of the European Association of Fish Pathologists*, 9–14 September 2001, Dublin.
- Jung S.-J., Miyazaki T., Miyata M. and Oishi T. (1996) Histopathological studies on viral nervous necrosis in a new host Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Bulletin of the Faculty of Bioresources, Mie University* 16: 9–16.
- Kai Y.H. and Chi S.C. (2006) Development and evaluation of inactivated NNV vaccine and bath challenge model in fry of *Epinephelus coioides*. In: *First international symposium of nervous necrosis virus*, pp. 13, Hiroshima, Japan.
- Lai Y.S., Murali S., Chiu H.C., Ju H.Y., Lin Y.S., Chen S.C., Guo I.C., Fang K. and Chang C.Y. (2001) Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus-susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel), brain tissue. *Journal of Fish Diseases* 24: 299–309.
- Lai Y.S., Chiu H.C., Murali S., Guo I.C., Chen S.C., Fang K. and Chang C.Y. (2001) In vitro neutralization by monoclonal antibodies against yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) and immunolocalization of virus infection in yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases* 24(4): 237.
- Le Breton A., Grisez L., Sweetman J. and Olievier F. (1997) Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of fish diseases* 20: 145-151.
- Lin L., He J., Mori K., Nishioka T., Wu J.L., Weng S., Mushiake K., Arimoto M. and Nakai T. (2001) Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in

- hatchery-reared groupers in the People's Republic of China. *Fish Pathology* 36: 186-188.
- Lu M.W., Liu W. and Lin C.S. (2003) Infection competition against grouper nervous necrosis virus by virus-like particles produced in *Escherichia coli*. *Journal of general virology* 84: 1577-1582.
- Mackay I.M., Arden K.E. and Nitsche A. (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30(6): 1292-1305.
- Maeno Y. (2002) Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared orange-spotted grouper in the Philippines. *Jircas Research Highlight*.
- Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2003, Part 2, Section 2.1., Chapter 2.1.7
- Mladineo I. (2003) The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *Journal of Applied Ichthyology* 19(6): 366.
- Mori K., Mangyoku T., Iwamoto T., Arimoto M., Tanaka S. and Nakai T. (2003) Serological relationships among genotypic variants of Betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms* 57 (1-2): 19-26.
- Mori K., Mushiake K. and Arimoto M. (1998) Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathology* 33: 443-444.
- Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K. and Furusawa I. (1992) Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* 187: 368-371.
- Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mekuchi T. and Kanno T. (1991) A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathology* 26: 209-210.
- Moriyama S., Ito T., Takahashi A., Amano M., Sower S.A., Hirano T., Yamamori K. and Kawauchi H. (2002) A Homolog of Mammalian PRL-Releasing Peptide (Fish- Arginyl- Phenylalanyl- Amide Peptide) Is a Major Hypothalamic Peptide of PRL Release in Teleost Fish. *Endocrinology* 143(6): 2071-2079.

- Munday B.L., Kwang J. and Moody N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of fish diseases* 25: 127-142.
- Munday B. L., Langdon J.S., Hyatt A. and Humphrey J.D. (1992) Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture* 103: 197-211.
- Munday B.L. and Nakai T. (1997) Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13: 375–381.
- Munday B.L., Nakai T. and Nguyen H.D. (1994) Antigenic relationship of the picorna-like virus of larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch, to the nodavirus of larval striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *Australian Veterinary Journal* 71: 384.
- Muroga K. (1995) Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish: a review. *Fish Pathology* 30: 71–85.
- Murphy F.A., Rott P., Studdert M.J. and White D.O. (1993) *Veterinary virology* Academic Press, 2nd ed., Inc. California, 1993.
- Mushiake K., Arimoto M., Furusawa T., Furusawa I. and Muroga K. (1992) Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 2351-2356.
- Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K. (1994) Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology* 29: 177-182.
- Nagai T. and Nishizawa T. (1999) Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA 1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology* 80: 3019-3022.



- Nakai T., Nguyen H.D., Nishizawa T., Muroga K., Arimoto M. and Ootsuki K. (1994) Occurrence of viral nervous necrosis in kelp grouper and tiger puffer. *Fish Pathology* 29: 211-212.
- Nathanson N. and Tyler K.T. (1997) Entry, dissemination, shedding and transmission of viruses. In: *Viral pathogenesis* (ed. by N. Nathanson), pp. 13-33. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Nguyen H.D., Mekuchi T., Imura K., Nakai T., Nishizawa T. and Muroga K. (1994) Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 60: 551-554.
- Nguyen H.D., Nakai T. and Muroga K. (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 24(2): 99-105.
- Nilsen R., Ranheim T., Hansen M.K., Taksdal T. and Totland G.K. (2001) Pathology in persistent nodavirus infected juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. Abstract P-117. In: *Tenth International Conference of the European Association of Fish Pathologists*, 9–14 September 2001, Dublin.
- Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T. and Muroga K. (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1633-1636.
- Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K. (1995) Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of nervous necrosis in marine fish. *Journal of General Virology* 76: 1563–1569.
- Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I. and Muroga K. (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 18: 103-107.

- Nishizawa T. (2002) Betanodavirus, *Nodaviridae*, pp. 595-599. In: *The Springer index of Viruses* (ed. by C.A. Tidona and C. Darai). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Oh M.J., Jung S.J., Kim S.R., Rajendran K.V., Kim Y.J. and Kim H.Y. (2001) A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared red drum, *Sciaenops ocellatus*. Abstract P-118. In: *Tenth International Conference of the European Association of Fish Pathologists*, 9–14 September 2001, Dublin.
- Pasnik D., Evans J. and Klesius P. (2009) Stress in Fish. Book chapter Physiology Review 1997 77(3):591-625
- Peducasse S., Castric J., Thiery R., Jeffroy L., Le Ven A. and Baudin Laurencin F. (1999) Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Diseases of Aquatic Organisms* 36(1): 11-20.
- Reed L.J. and Muench H. (1938) A simple method for estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27: 493-497.
- Renault T., Haffner P., Baudin-Laurencin F., Breuil G. and Bonami J.R. (1991) Mass mortalities in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 11: 68–73.
- Roberts RJ (1989) *Fish Pathology*. Bailliere, Tindall, London.
- Rottmann R.W., Francis-Floyd R. and Durborow R. (1992) The role of stress in fish disease. SRAC Publications No. 474.
- Schneemann A. and Marshall D. (1998) Specific Encapsidation of Nodavirus RNAs Is Mediated through the C Terminus of Capsid Precursor Protein Alpha. *Journal of Virology* 72: 8738-8746.

- Sideris, D.C. (1997) Cloning, expression and purification of the coat protein of encephalitis virus (DIEV) infecting *Dicentrarchus labrax*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 42: 409-417.
- Skirris G.P. and Richards R.H. (1999) Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. *Virus research* 63: 85-93.
- Skirris G.P. and Richards R.H. (1999) Nodavirus isolated from experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Journal of Fish Diseases* 22: 315-318.
- Skirris G.P., Krondiris J.V., Sideris D.C., Shinn A.P., Starkey W.G. and Richards R.H. (2001) Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus research* 75: 59-67.
- Sohn S.G. and Park M.A. (1998) Viral diseases of cultured marine fish and shrimp in Korea. *Fish Pathology* 33: 189-192.
- Sommerset I. and Nerland A.H. (2004) Complete sequence of RNA1 and subgenomic RNA3 of Atlantic halibut nodavirus (AHNV). *Diseases of Aquatic Organisms* 58(2-3): 117-25.
- Sommerset I., Skern R., Biering E., Bleie H., Uglens Fiksdal I., Grove S. and Nerland A.H. (2005) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish & shellfish immunology* 18:13-29.
- Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Shinn A.P., Richards R.H. and Ferguson H.W. (2000) Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 23: 419-422.
- Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Jenkins M.E., Roy W., Richards R.H. and Ferguson H.W. (2001) Nodavirus infection of Atlantic cod, Dover sole and halibut in the United Kingdom. Abstract P-116. In: *Tenth International*

Conference of the European Association of Fish Pathologists, 9–14 September 2001, Dublin.

Stirling Institute of Aquaculture. (2004) Study of the market for aquaculture produced lubina y dorada species. Report to the European Commission, DG Fisheries.

Takizawa N., Adachi K.. and Kobayashi N. (2008) Establishment of reverse genetics system of Betanodavirus for the efficient recovery of infectious particles. *Journal of Virological Methods* 151: 271-275.

Tanaka A., Aoki H. and Nakai T. (1998) Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology* 33: 31-36.

Tanaka S., Mori K., Arimoto M., Iwamoto T. and Nakai T. (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of fish diseases* 24: 15-22.

Thiery R., Arnauld C. and Delsert C. (1999a) Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of fish diseases* 22: 201-207.

Thiery R., Cozien J., de Boisseson C., Kerbart-Boscher S. and Nevarez L. (2004) Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of general virology* 85: 3079-3087.

Thiery R., Peducasse S., Castric J., Le Ven A., Jeffroy L. and Baudin Laurencin F. (1997) Experimental transmission of viral encephalopathy to juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 17: 118-122.

Thiery R., Raymond J.C. and Castric J. (1999) Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Virus research* 63: 11-17.

- Toffolo V., Negrisolo E., Maltese C., Bovo G., Belvedere P., Colombo L. and Dalla Valle L. (2007) Phylogeny of Betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 298-308.
- Totland G.K., Grotmol S., Morita Y., Nishioka T. and Nakai T. (1999) Pathogenicity of nodavirus strains from striped jack *Pseudocaranx dentex* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, studied by waterborne challenge of yolk-sac larvae of both teleost species. *Diseases of Aquatic Organisms* 38(3): 169-175.
- Varsamos S., Diaz J.P., Charmantier G., Blasco C., Connes R. and Flik G. (2002a) Location and morphology of chloride cells during the postembryonic development of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Anatomy Embryology* 205: 203-213.
- Varsamos S., Diaz J.P., Charmantier G., Flik G., Blasco C. and Connes R. (2002b) Branchial chloride cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to freshwater, seawater and doubly-concentrated seawater. *Journal of Experimental Zoology* 293: 12-26.
- Varsamos S., Xuereb B., Commes T., Flik G. and Spanings-Pierrot C. (2006) Pituitary hormone mRNA expression in European sea bass *Dicentrarchus labrax* in seawater and following acclimation to fresh water. *Journal of Endocrinology* 191: 473-480.
- Watanabe K., Nishizawa T. and Yoshimizu M. (2000) Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 41: 219–223.
- Watanabe K., Yoshimizu M., Ishima M., Kawamata K. and Ezura Y. (1999) Occurrence of viral nervous necrosis in hatchery-reared barfin flounder. *Bulletin of the Faculty Fisheries Hokkaido University* 50: 101-113.

- Wendelaar Bonga S.E. (1997) The stress response in fish. *Physiology Review* 77(3): 591-625.
- Weyts F.A.A., Cohen N., Flik G. and Verburg-van Kemenade B.M.L. (1999) Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 1-20.
- Wurts W.A. (1987) Osmoregulation, red drum, and euryhaline fish: Environmental Physiology. In: *An evaluation of specific ionic and growth parameters affecting the feasibility of commercially producing red drum (Sciaenops ocellatus)*. Doctoral dissertation. Texas A&M University, College Station.
- Yoshikoshi K. and Inoue K. (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *Journal of fish diseases* 13: 69-77.
- Yuasa K., Koesharyani I., Roza D., Mori K., Katata M. and Nakai T. (2002) Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with recombinant coat protein of betanodavirus. *Journal of Fish Diseases* 25: 53-56.
- Zafran, Koesharyani I., Johnny F., Yuasa K., Harada T. and Hatai K. (2000) Viral nervous necrosis in humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathology* 35: 95-96.
- Zafran, Harada T., Koesharyani I., Yuasa K. and Hatai K. (1998) Indonesian hatchery reared sea bass larvae (*Lates calcarifer*) associated with viral nervous necrosis (VNN). *Indonesian Fisheries Research Journal* IV: 19-22.
- Αθανασοπούλου Φ. (2005) Διδακτικές Σημειώσεις του μαθήματος της Ιχθυοπαθολογίας. Νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα. Παν/κές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Ιμσιρίδου Α. (2006) Εργαστηριακές τεχνικές γενετικής ανάλυσης. Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Τμήματος Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Κλαουδάτος Σ. (2003) Πανεπιστημιακές παραδόσεις του μαθήματος

Υδατοκαλλιέργειες Ι, Βόλος 2003, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας σελ. 6-10.

Πάσχος Γ. (2004) Ιχθυοκαλλιέργειες εσωτερικών υδάτων, Β' Έκδοση, Ιωάννινα, σελ. 5-10.

http¹: http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture_processing/aquaculture_el.htm

http²: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_greece/en

http³: <http://ec.europa.eu/fisheries>

http⁴: <http://www.minagric.gr> Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

http⁵: <http://www.virustaxonomyonline.com/virtax/lpext.dll/vtax/agp-0013/psr11/psr11-sec1-0003#psr11-sec1-0003>

http⁶: http://www.expasy.ch/viralzone/al_by_species/47.html

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 41. Ποσοστό (%) συσσωρευτικής θνησιμότητας ανά ημέρα, στα ενυδρεία με τα λαβράκια του 1^{ου} πειράματος.

Ημερομηνία	Ενυδρείο Γ1* (αλατότητα 0‰)	Ενυδρείο Θ2* (αλατότητα 18‰)	Ενυδρείο Θ3* (αλατότητα 33‰)
1/6/2006	0	0,02	0
2/6/2006	0,02	0,03	0
3/6/2006	0,02	0,04	0
4/6/2006	0,09	0,04	0
5/6/2006	0,15	0,06	0,05
6/6/2006	0,39	0,09	0,10
7/6/2006	0,48	0,11	0,19
8/6/2006	0,57	0,23	0,27
9/6/2006	0,60	0,26	0,36
10/6/2006	0,71	0,32	0,43
11/6/2006	0,76	0,37	0,43
12/6/2006	0,97	0,40	0,43
13/6/2006	0,97	0,40	0,47
14/6/2006	0,97	0,44	0,47
15/6/2006	0,97	0,44	0,47

* Σε όλα τα ενυδρεία τα λαβράκια ενοφθαλμίστηκαν ενδομυϊκά με 30 μl ιού, τίτλου 10⁷ TCID₅₀/ml.

Πίνακας 42. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των λαβρακιών του ενυδρείου Γ1 (1^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
4η	442	18,32	8×10^9
	444	17,85	$1,1 \times 10^{10}$
	445	14,1	$1,2 \times 10^{11}$
5η	452	13,18	$2,2 \times 10^{11}$
	455	13,03	$2,5 \times 10^{11}$
	456	16,8	$2,2 \times 10^{10}$
6η	464	15,84	$4,1 \times 10^{10}$
	4610	16,59	$2,5 \times 10^{10}$
	4618	13,08	$2,4 \times 10^{11}$
7η	471	14,46	$9,9 \times 10^{10}$
	474	21,97	8×10^8
	476	15,52	5×10^{10}
8η	481	12,33	$3,9 \times 10^{11}$
	484	15,16	$6,3 \times 10^{10}$
	485	18,88	6×10^9
9η	491	13,25	$2,1 \times 10^{11}$
	492	14	$1,3 \times 10^{11}$
	493	16,56	$2,6 \times 10^{10}$
10η	4101	16,17	$3,3 \times 10^{10}$
	4102	39,95	$8,8 \times 10^3$
	4103	30,46	$3,7 \times 10^5$
11η	4111	42,32	2×10^3
	4112	39,3	$1,3 \times 10^4$
	4113	15,01	7×10^{10}
12η	4121	20,37	2×10^9
	4122	29,24	$8,1 \times 10^5$
	4123	19,28	4×10^9
13η	4131	37,99	3×10^4
	4132	33,7	$4,7 \times 10^5$
	4133	15,84	$4,1 \times 10^{10}$
14η	4141	37,8	$3,4 \times 10^4$

Πίνακας 43. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των λαβρακιών του ενυδρείου Θ2 (1^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
4 ^η	241	18,22	9×10^9
	242	16,72	$2,3 \times 10^{10}$
	244	17,25	$1,7 \times 10^{10}$
5 ^η	251	10,18	$1,5 \times 10^{12}$
	252	17,06	$1,9 \times 10^{10}$
	255	22,13	7×10^8
6 ^η	261	16,13	$3,4 \times 10^{10}$
	264	17,2	$1,7 \times 10^{10}$
	265	11,47	$6,7 \times 10^{11}$
7 ^η	271	38,12	$2,8 \times 10^4$
	274	7,89	$6,5 \times 10^{12}$
	273	11,94	5×10^{11}
8 ^η	284	17,75	$1,2 \times 10^{10}$
	286	15,66	$4,6 \times 10^{10}$
	287	11,9	5×10^{11}
9 ^η	291	11,95	$4,9 \times 10^{11}$
	292	15,01	7×10^{10}
	293	15,6	$4,8 \times 10^{10}$
10 ^η	2101	0	0
	2102	36,29	9×10^4
	2103	14,44	1×10^{11}
11 ^η	2113	14,56	$9,3 \times 10^{10}$
	2111	10,67	$1,1 \times 10^{12}$
	2112	21,47	1×10^{11}
12 ^η	2121	39,81	$9,6 \times 10^3$
	2123	23,24	3×10^8
	2122	16,85	$2,2 \times 10^{10}$
13 ^η	2132	25,13	$1,1 \times 10^8$
	2133	18,58	7×10^9
	2131	20,31	2×10^9
14 ^η	2143	27,58	2×10^7
	2141	16,6	$2,5 \times 10^{10}$
	2142	25,13	$1,1 \times 10^8$
15 ^η	2151	19,51	4×10^9
	2152	19,17	5×10^9
	2153	18,59	7×10^9
16 ^η	2161	28,28	1×10^7
	2162	19,43	4×10^9
	2163	17,88	$1,1 \times 10^{10}$
17 ^η	2171	17,94	$1,1 \times 10^{10}$
	2172	21,47	1×10^9

	2173	23,25	$3,7 \times 10^8$
18 ⁿ	2181	0	0
	2183	18,73	6×10^9

Πίνακας 44. Τίτλοι του Noda-ιού με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των λαβρακιών του ενυδρείου Θ3 (1^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
4 ^η	341	55	0
	342	10,35	$1,3 \times 10^{12}$
	344	11,56	$6,3 \times 10^{11}$
5 ^η	351	8,99	$3,2 \times 10^{12}$
	352	13,81	$1,5 \times 10^{11}$
	353	9,71	2×10^{12}
6 ^η	364	32,09	1×10^7
	365	9,63	$2,1 \times 10^{12}$
	366	14,29	$1,1 \times 10^{11}$
7 ^η	371	14,18	$1,1 \times 10^{11}$
	372	14,86	$7,7 \times 10^{10}$
	376	7,65	$7,6 \times 10^{12}$
8 ^η	381	9,63	$2,1 \times 10^{12}$
	387	13,42	$1,9 \times 10^{11}$
	386	11,78	$5,5 \times 10^{11}$
9 ^η	391	15,05	$6,8 \times 10^{10}$
	392	7,57	8×10^{12}
	393	8,77	$3,7 \times 10^{12}$
10 ^η	3101	16,66	$2,4 \times 10^{10}$
	3102	8,3	5×10^{12}
	3103	12,53	$3,4 \times 10^{11}$
11 ^η	3111	11,68	$5,8 \times 10^{11}$
	3112	12,51	$3,4 \times 10^{11}$
	3113	10,91	$9,6 \times 10^{11}$
12 ^η	3121	13,72	$1,6 \times 10^{11}$
	3122	17,15	$1,8 \times 10^{10}$
	3123	13,47	$1,8 \times 10^{11}$
13 ^η	3131	15,22	$6,1 \times 10^{10}$
	3132	23,29	$3,5 \times 10^8$
	3133	16,07	$3,5 \times 10^{10}$
14 ^η	3141	17,13	$1,8 \times 10^{10}$
	3142	18,04	1×10^{10}
	3143	17,79	$1,2 \times 10^{10}$
15 ^η	3151	16,62	$2,5 \times 10^{10}$
	3152	17,97	1×10^{10}
	3153	17,65	$1,3 \times 10^{10}$
16 ^η	3161	15,01	7×10^{10}
	3162	15,93	$3,9 \times 10^{10}$
	3163	16,88	$2,1 \times 10^{10}$
17 ^η	3171	13,99	$1,3 \times 10^{11}$
	3173	19,35	4×10^9

	3172	15,39	$5,5 \times 10^{10}$
--	------	-------	----------------------

Πίνακας 45. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των τσιπούρων* του ενυδρείου T1 (1^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
5 ^η	151	33,27	6×10^5
	152	31,59	$1,8 \times 10^6$
	153	31,61	$1,8 \times 10^6$
6 ^η	161	29,45	$7,1 \times 10^6$
	162	33,59	5×10^5
	163	30,43	$3,8 \times 10^6$
7 ^η	171	33,31	6×10^5
	172	29,91	$5,3 \times 10^6$
	173	33,87	4×10^5
8 ^η	183	27,9	19×10^6
	184	33,78	4×10^5
	185	26,18	$5,7 \times 10^7$
9 ^η	191	28	$1,8 \times 10^7$
	192	29,3	$7,8 \times 10^6$
	193	31,3	$2,2 \times 10^6$
10 ^η	1101	28,35	$1,4 \times 10^7$
	1102	35,04	2×10^5
	1103	29,39	$7,4 \times 10^6$
11 ^η	1111	39,55	1×10^4
	1112	31,72	$1,6 \times 10^6$
	1113	32,82	8×10^5
12 ^η	1121	31,66	$1,7 \times 10^6$
	1122	29,06	$9,1 \times 10^6$
	1123	29,12	$8,7 \times 10^6$
13 ^η	1131	41,73	$2,8 \times 10^3$
	1132	45,66	232
	1133	35	2×10^5
14 ^η	1141	48,59	36
	1142	39,55	$1,1 \times 10^4$
	1143	42,93	$1,3 \times 10^3$
15 ^η	1151	53,3	2
	1152	40,23	$7,4 \times 10^3$
	1153	40,83	5×10^3
16 ^η	1161		0
	1162	43,25	1×10^3
	1163	49,2	24
17 ^η	1171	47,22	86

	1172	43,2	$1,1 \times 10^3$
	1173	47,23	85
18 ⁿ	1181	43,75	785
	1182	41,89	$2,6 \times 10^3$
	1183	46,23	161
19 ⁿ	1191	49,23	24
	1192	38,25	$2,6 \times 10^4$
	1193	43,18	$1,1 \times 10^3$
20 ⁿ	1201	42,87	$1,3 \times 10^3$
	1202	45,91	198
	1203	45,46	264
21 ⁿ	1211	42,85	$1,4 \times 10^3$
	1212	43,29	1×10^3
	1214	45,63	237

* Οι τσιπούρες του ενυδρείου T1 ενοφθαλμίστηκαν ενδομυϊκά με 30 μl ιού, τίτλου 10^7 TCID₅₀/ml. Η αλατότητα του νερού ήταν 30‰.

Πίνακας 46. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των τσιπούρων* του ενυδρείου T2 (1^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
5 ^η	551	29,83	5,5 x 10 ⁶
	552	34,56	2 x 10 ⁵
	553	33,56	5 x 10 ⁵
6 ^η	561	29,65	6,2 x 10 ⁶
	562	28,96	9,7 x 10 ⁶
	563	31,66	1,7 x 10 ⁶
7 ^η	571	35,95	1 x 10 ⁵
	572	31,91	1,5 x 10 ⁶
	574	32,69	9 x 10 ⁵
8 ^η	583	23,96	2,3 x 10 ⁸
	584	33,14	6 x 10 ⁵
	582	25,02	1,2 x 10 ⁸
9 ^η	591	28,2	1,5 x 10 ⁷
	592	30,7	3,2 x 10 ⁶
	593	30,8	3 x 10 ⁶
10 ^η	5101	35,06	2 x 10 ⁵
	5102	36,05	1 x 10 ⁵
	5103	30,93	2 x 10 ⁶
11 ^η	5111	29,84	5 x 10 ⁶
	5112	28,44	1,3 x 10 ⁷
	5113	28,75	1,1 x 10 ⁷
12 ^η	5121	22,81	4,8 x 10 ⁸
	5122	35,62	1 x 10 ⁵
	5123	34,33	3 x 10 ⁵
13 ^η	5131	38,84	1,8 x 10 ⁴
	5132	32,34	1,1 x 10 ⁶
	5133	33,8	4 x 10 ⁵
14 ^η	5141	28,65	1,2 x 10 ⁷
	5142	32,97	7 x 10 ⁵
	5143	40,95	4,6 x 10 ³
15 ^η	5151	36,85	6,3 x 10 ⁴
	5152	35,45	1 x 10 ⁵
	5153	35,25	2 x 10 ⁵
16 ^η	5161	33,38	6 x 10 ⁵
	5162	33,65	5 x 10 ⁵
	5163	31,55	1,8 x 10 ⁶
17 ^η	5171	36,81	6,5 x 10 ⁴
	5172	31,53	1,8 x 10 ⁶
	5173	33,35	6 x 10 ⁵
18 ^η	5181	34,67	2 x 10 ⁵
	5182	40,01	8,5 x 10 ³

	5183	33,64	5×10^5
19 ⁿ	5191	36,89	$6,2 \times 10^4$
	5192	37,96	3×10^4
	5193	42,09	$2,2 \times 10^3$
20 ⁿ	5201	45,03	347
	5202	44,68	434
	5203	48,29	43
21 ⁿ	5211	39,16	$1,4 \times 10^4$
	5212	45,03	347
	5213	42,36	$1,9 \times 10^3$

* Οι τσιπούρες του ενυδρείου T2 ενοφθαλμίστηκαν ενδομυϊκά με 50 μl ιού, τίτλου 10^7 TCID₅₀/ml. Η αλατότητα του νερού ήταν 30‰.

Πίνακας 47. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, σε οφθαλμούς τσιπούρων του 1^{ου} πειράματος, που δόθηκαν στα λαβράκια του ενυδρείου Θ6 στο 2^ο πείραμα.

Κωδικός δείγματος (ενυδρεία T1 & T2)	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
162	33,59	5×10^5
183	27,9	$1,9 \times 10^7$
1101	28,35	$1,4 \times 10^7$
1111	39,55	1×10^4
1113	32,82	8×10^5
1121	31,66	$1,7 \times 10^6$
1122	29,06	$9,1 \times 10^6$
1131	41,73	$2,8 \times 10^3$
1132	45,66	232
1141	48,59	36
1142	39,55	$1,1 \times 10^4$
1152	40,23	$7,4 \times 10^3$
1153	40,83	5×10^3
1162	43,25	1×10^3
1163	49,2	24
1173	47,23	85
1183	46,23	161
1201	42,87	$1,4 \times 10^3$
1202	45,91	198
1212	43,29	1×10^3
5121	22,81	$4,8 \times 10^8$
5131	38,84	$1,8 \times 10^4$
5151	36,85	$6,3 \times 10^4$
5152	35,45	1×10^5
5163	31,55	$1,8 \times 10^6$
5171	36,81	$6,5 \times 10^4$
5172	31,53	$1,8 \times 10^6$
5173	33,35	6×10^5
5181	34,67	2×10^5
5191	36,89	$6,2 \times 10^4$
5203	48,29	43
Μέσος όρος τίτλων:		$1,7 \times 10^7$

Πίνακας 48. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, σε οφθαλμούς τσιπούρων του 1^{ου} πειράματος, οι οποίοι δόθηκαν στα λαβράκια του ενυδρείου Θ7 στο 2^ο πείραμα.

Κωδικός δείγματος (ενυδρεία T1 & T2)	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
161	29,45	$7,1 \times 10^6$
171	33,31	6×10^5
172	29,91	$5,3 \times 10^6$
173	33,87	4×10^5
184	33,78	4×10^5
1102	35,04	2×10^5
1103	29,39	$7,4 \times 10^6$
1112	31,72	$1,6 \times 10^6$
1123	29,12	$8,7 \times 10^6$
1143	42,93	$1,3 \times 10^3$
1151	53,3	2
1161		0
1171	47,22	86
1172	43,2	$1,1 \times 10^3$
1182	41,89	$2,5 \times 10^3$
1191	49,23	24
1192	38,25	$2,6 \times 10^4$
1193	43,18	$1,1 \times 10^3$
1203	45,46	264
1211	42,85	$1,4 \times 10^3$
583	23,96	$2,3 \times 10^8$
5103	30,93	2×10^6
5113	28,75	$1,1 \times 10^7$
5142	32,97	7×10^5
5143	40,95	$4,7 \times 10^3$
5153	35,25	2×10^5
5182	40,01	$8,5 \times 10^3$
5183	33,64	5×10^5
5193	42,09	$2,2 \times 10^3$
5202	44,68	434
5211	39,16	$1,4 \times 10^4$
Μέσος όρος τίτλων:		9×10^6

Πίνακας 49. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των λαβρακιών του ενυδρείου Θ6* (2^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
3η	A1	0	0
	A2	0	0
6η	A3	31,5	$1,9 \times 10^5$
	A4	42,23	2×10^3
9η	A5	32,32	$1,1 \times 10^6$
	A6	41,76	$2,8 \times 10^3$
12η	A7	34,85	2×10^5
	A8	44,67	437
15η	A9	32,75	8×10^5
	A10	36,45	$8,2 \times 10^4$
18η	A11	42,25	2×10^3
	A12	39,89	$9,2 \times 10^3$
21η	A13	42,78	$1,4 \times 10^3$
	A14	0	0
24η	A15	38,56	$2,1 \times 10^4$
	A16	44,36	532
27η	A17	0	0
	A18	41,03	$4,4 \times 10^3$
30η	A19	38,56	$2,1 \times 10^4$
	A20	40,32	7×10^3
33η	A21	0	0
	A22	39,68	1×10^4
36η	A23	44,85	389
39η ???	A24	45,47	262

* Η αλατότητα του νερού στο ενυδρείο Θ6 ήταν 0‰.

Πίνακας 50. Τίτλοι του Noda-ιού, με τη real-time PCR, στους οφθαλμούς των λαβρακιών του ενυδρείου Θ7* (2^ο πείραμα).

Ημέρα δειγματοληψίας	Κωδικός δείγματος	Κύκλος Ct	Τίτλος ιού
3η	B1	0	0
	B2	0	0
6η	B3	38,69	1,9 x 10 ⁴
	B4	39,07	1,5 x 10 ⁴
9η	B5	36,75	6,7 x 10 ⁴
	B6		0
12η	B7	39,54	1,1 x 10 ⁴
	B8	37,98	3 x 10 ⁴
15η	B9	42,36	1,9 x 10 ³
	B10	40,23	7,4 x 10 ³
18η	B11	39,09	1,5 x 10 ⁴
	B12	40,89	4,8 x 10 ³
21η	B13	42,32	1,9 x 10 ³
	B14	43,56	886
24η	B15	41,86	2,6 x 10 ³
	B16	42,68	1,5 x 10 ³
27η	B17	41,08	4,3 x 10 ³
	B18	0	0
30η	B19	43,32	1 x 10 ³
	B20	39,05	1,5 x 10 ⁴
33η	B21	0	0
	B22	40,63	5,7 x 10 ³
36η	B23	44,74	418
	B24	43,26	1 x 10 ³
39η	B25	0	0

* Η αλατότητα του νερού στο ενυδρείο Θ7 ήταν 20‰.

Πίνακας 51. Ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης στα δείγματα που συνελέγησαν από τα λαβράκια του ενυδρείου Γ1 (1^ο πείραμα).

Ημέρα	Δείγμα	Στοιβάδες Αμφιβληστροειδούς	Νευρικός ιστός
4 ^η	446	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
	447	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
5 ^η	451	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
	453	+ Κενοτόπια στην 6*	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
6 ^η	461	+++ Κενοτόπια στην 6	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και συμφόρηση των αγγείων του λοβού
	462	++ Κενοτόπια στην 6	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και τα εγκεφαλικά ημισφαίρια
7 ^η	473	++ Κενοτόπια στην 2, 4, 5, 6,	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	475	+++ Κενοτόπια στην 5, 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
8 ^η	482	++ Κενοτόπια στην 5, 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	483	++ Κενοτόπια στην 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
9 ^η	494	++ Κενοτόπια στην 5, 6, 7	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και συμφόρηση των αγγείων του λοβού
	495	++ Κενοτόπια στην 5, 6, 7	Φυσιολογικά ευρήματα
10 ^η	4104	++ Κενοτόπια στις 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και κενοτοπιώδης εκφύλιση στα εγκεφαλικά ημισφαίρια
	4105	++ Κενοτόπια στις 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
11 ^η	4114	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, κενοτοπιώδης εκφύλιση στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και συμφόρηση των αγγείων
	4115	++ Κενοτόπια στην 6 και 7	Φυσιολογικά ευρήματα
12 ^η	4124	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	4125	++ Κενοτόπια στην 6 και 7	++ Κενοτόπια στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, τον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα και το

Πίνακας 52. Ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης στα δείγματα που συνελέγησαν από τα λαβράκια του ενυδρείου Θ2 (1^ο πείραμα).

Ημέρα	Δείγμα	Στοιβάδες Αμφιβληστροειδούς	Νευρικός ιστός
4 ^η	243	+ Κενοτόπια στην 6*	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	245	+ Κενοτόπια στην 6	Φυσιολογικά ευρήματα
5 ^η	253	++ Κενοτόπια στις 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και συμφόρηση των αγγείων του λοβού
	254	++ Κενοτόπια στις 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
6 ^η	262	+++ Κενοτόπια στην 6	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα, το μεσεγκέφαλο και το διεγκέφαλο
	263	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
7 ^η	272	+++ Κενοτόπια στην 5, 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, την παρεγκεφαλίδα και το μεσεγκέφαλο
	275	++ Κενοτόπια στην 4, 5, 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και συμφόρηση των αγγείων του λοβού
8 ^η	281	++ Κενοτόπια στις 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	282	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
9 ^η	294	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στα εγκεφαλικά ημισφαίρια και το μεσεγκέφαλο
	295	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
10 ^η	2104	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, το μεσεγκέφαλο, το διεγκέφαλο και την παρεγκεφαλίδα
	2105	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
11 ^η	2114	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	2115	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
12 ^η	2124	++ Κενοτόπια στις 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στα εγκεφαλικά ημισφαίρια

Πίνακας 53. Ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης στα δείγματα που συνελέγησαν από τα λαβράκια του ενυδρείου Θ3 (1^ο πείραμα).

Ημέρα	Δείγμα	Στοιβάδες Αμφιβληστροειδούς	Νευρικός ιστός
4 ^η	343	Φυσιολογικά ευρήματα	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	345	+ στην 6* και 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
5 ^η	354	++ Κενοτόπια στην 6 και 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	355	++ Κενοτόπια στην 6 και 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
6 ^η	362	++ Κενοτόπια στην 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	367	++ Κενοτόπια στην 4, 5, 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
7 ^η	373	+++ Κενοτόπια στην 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και συμφόρηση των αγγείων του λοβού
	374	+++ Κενοτόπια στην 4, 5, 6, 7	Φυσιολογικά ευρήματα
8 ^η	383	+++ Κενοτόπια στην 4, 5, 6, 7	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, το διεγέφαλο, τον προμήκη, την παρεγκεφαλίδα και συμφόρηση των αγγείων
	384	+++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό και κενοτοπιώδης εκφύλιση στα εγκεφαλικά ημισφαίρια
9 ^η	394	+++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, το διεγέφαλο και την παρεγκεφαλίδα
	395	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
10 ^η	3104	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	3105	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
11 ^η	3114	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	3115	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
12 ^η	3124	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	3125	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
13 ^η	3134	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	3135	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
14 ^η	3144	++ Κενοτόπια στην 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό

Πίνακας 54. Ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης στα δείγματα που συνελέγησαν από τις τσιπούρες του ενυδρείου T1(1^ο πείραμα).

Ημέρα	Δείγμα	Στοιβάδες Αμφιβληστροειδούς	Νευρικός ιστός
5 ^η	154	+ Κενοτόπια στην 6*, 7	Μεγάλα** κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	155	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
6 ^η	164	+ Κενοτόπια στην 6, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	165	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
7 ^η	174	+ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	175	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
8 ^η	181	++ Κενοτόπια στην 6, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	182	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
9 ^η	194	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	195	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
10 ^η	1104	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
	1105	++ Κενοτόπια στην 6, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
11 ^η	1114	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	1115	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
12 ^η	1124	++ Κενοτόπια στην 6, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	1125	++ Κενοτόπια στην 6, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
13 ^η	1134	++ Κενοτόπια στην 6, 7	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τον προμήκη και το διεγκέφαλο
	1135	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
14 ^η	1144	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	1145	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
15 ^η	1154	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα

Πίνακας 55. Ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης στα δείγματα που συνελέγησαν από τις τσιπούρες του ενυδρείου T2 (1^ο πείραμα).

Ημέρα	Δείγμα	Στοιβάδες Αμφιβληστροειδούς	Νευρικός ιστός
5 ^η	554	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
	555	+ Κενοτόπια στην 6*	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
6 ^η	564	+ Κενοτόπια στην 6	Φυσιολογικά ευρήματα
	565	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
7 ^η	573	++ Κενοτόπια στην 6, 8	Μεγάλα** κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	574	Φυσιολογικά ευρήματα	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
8 ^η	581	Φυσιολογικά ευρήματα	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, το μεσεγκέφαλο, το διεγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα και τον προμήκη
	585	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
9 ^η	594	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	595	++ Κενοτόπια στην 6, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
10 ^η	5104	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
	5105	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
11 ^η	5114	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	5115	++ Κενοτόπια στην 6, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
12 ^η	5124	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, το μεσεγκέφαλο και την παρεγκεφαλίδα
	5125	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
13 ^η	5134	++ Κενοτόπια στην 6, 8	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	5135	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	Μεγάλα κενοτόπια στον οπτικό λοβό
14 ^η	5144	++ Κενοτόπια στην 6, 8	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
	5145	++ Κενοτόπια στην 6, 8	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
15 ^η	5154	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	Φυσιολογικά ευρήματα
	5155	Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
16 ^η	5164	++ Κενοτόπια στην 6, 8	Φυσιολογικά ευρήματα
	5165	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	+ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό, το διεγκέφαλο, την παρεγκεφαλίδα, τον

Πίνακας 57. Ευρήματα της ιστοπαθολογικής μελέτης στα δείγματα που συνελέγησαν από τα λαβράκια του ενυδρείου Θ7 (2^ο πείραμα).

Ημέρα	Δείγμα	Στοιβάδες Αμφιβληστροειδούς	Νευρικός ιστός
3 ^η	B2	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
6 ^η	B4	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
9 ^η	B6	++ Κενοτόπια στην 6*, 7, 8	+ Κενοτόπια στην υπόφυση
12 ^η	B8	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
15 ^η	B10	Φυσιολογικά ευρήματα	Κενοτόπια στην υπόφυση
18 ^η	B12	++ Κενοτόπια στην 6, 7, 8, 9	++ Κενοτόπια στον οπτικό λοβό
21 ^η	B14	++ Κενοτόπια στην 6	Φυσιολογικά ευρήματα
24 ^η	B16	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
27 ^η	B18	Φυσιολογικά ευρήματα	Φυσιολογικά ευρήματα
30 ^η	B20	+ Κενοτόπια στην 6	+ Κενοτόπια στην υπόφυση
33 ^η	B22	+ Κενοτόπια στην 6	Φυσιολογικά ευρήματα
36 ^η	B24	Φυσιολογικά ευρήματα	+ Κενοτόπια στην υπόφυση

+ = ελάχιστα ++ = αρκετά +++ = πολλά

- * 1: μελάγχρουν επιθήλιο
 2: στοιβάδα των ραβδίων και κωνίων
 3: εξωτερικός αφοριστικός υμένας
 4: εξωτερική πυρηνική στοιβάδα
 5: εξωτερικό δικτυωτό στρώμα

- 6: εσωτερική πυρηνική στοιβάδα
 7: εσωτερικό δικτυωτό στρώμα
 8: στοιβάδα γαγγλιακών κυττάρων
 9: στοιβάδα νευρικών ινών



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Τηλ.: ~~74.760-61~~

2441066080



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000103811