

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 55, No 2 (2004)



Rickettsia-like organisms (R.L.O.) infections of fin-fish

F. ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ),
E. KARAGOUNI (ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ Ε.)

doi: [10.12681/jhvms.15188](https://doi.org/10.12681/jhvms.15188)

To cite this article:

ATHANASSOPOULOU (Φ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) F., & KARAGOUNI (ΚΑΡΑΓΚΟΥΝΗ Ε.) E. (2017). Rickettsia-like organisms (R.L.O.) infections of fin-fish. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 55(2), 165–173. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15188>

Ρικέτσιες και μικροοργανισμοί προσομοιάζοντες με ρικέτσιες (R.L.O.) σε εκτρεφόμενα ψάρια

Φ. Αθανασοπούλου¹, Ε. Καραγκούνη²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Οι ρικετσιώσεις είναι μεγάλη ομάδα ασθενιών στα θηλαστικά και προκαλούνται από είδη της οικογένειας Rickettsiaceae. Τα είδη αυτά είναι Gram⁻ ενδοκυτταρικά βακτήρια που πολλαπλασιάζονται σε διάφορες θέσεις στο εσωτερικό των ευκαριωτικών κυττάρων και μεταδίδονται συνήθως με ενδιάμεσο ξενιστή Αρθρόποδα. Μέχρι το 1994, όλες οι ρικετσιώσεις που είχαν απομονωθεί αφορούσαν σολομούς εκτρεφόμενους στη θάλασσα. Όμως, έγινε φανερό ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είχαν ευρύτερη εξάπλωση σε ξενιστές από διάφορες γεωγραφικές περιοχές, τόσο σε θαλάσσια οικοσυστήματα όσο και σε γλυκά νερά. Πρόσφατα, η ύπαρξη μικροοργανισμών που προσομοιάζουν τις ρικέτσιες (R.L.O.) διαπιστώθηκε για πρώτη φορά και σε είδη των Μεσογειακών Ιχθυοκαλλιέργειών. Στην Ελλάδα μια παρόμοια ασθένεια εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε νεαρά εκτρεφόμενα λαβράκια το 1997. Η ασθένεια εκδηλώθηκε σε ιχθύδια μεγέθους 0,5-10γρ., λίγες ημέρες μετά την τοποθέτησή τους σε κλωβούς, χαρακτηρίστηκε από νευρική συμπτωματολογία και επιδεινώθηκε κατά τους χειμερινούς μήνες (θερμοκρασία νερού <15-18° C), με αποτέλεσμα την αύξηση της θνησιμότητας έως και 15%. Η *Piscirickettsia salmonis* είναι το πλέον μελετημένο στέλεχος από τα στελέχη των ρικετσιών που έχουν βρεθεί και απομονωθεί στα ψάρια. Το στέλεχος LF-89^T απομονώθηκε από νοσοούντα σολομό σε θαλασσινούς κλωβούς της Ν. Χιλής κατά τη διάρκεια μιας επιζωΐας. Η πηγή μόλυνσης και ο τρόπος μετάδοσης των ρικετσιώσεων και ειδικότερα του μικροοργανισμού *P. salmonis* δεν είναι ακόμη εξακριβωμένα. Παρ' όλα αυτά, θεωρείται ότι η οριζόντια μετάδοση είναι πιθανή στο υδάτινο περιβάλλον. Αν και οι ρικέτσιες ανιχνεύθηκαν στις γονάδες ψαριών, η κάθετη μετάδοση, τουλάχιστον για τον *P. salmonis*, δεν έχει αποδειχθεί. Οι κυριότερες νοσολογικές ενότητες που εμφανίζονται στα ψάρια είναι οι εξής: α. Νόσος από *P. salmonis* (Piscirickettsiosis / Salmonid rickettsial septicaemia), β. Νόσος σε σαλμονίδες στην περιοχή της Χιλής και του Καναδά, γ. Νόσος στο σολομό του Ατλαντικού σε ιχθυοκαλλιέργειες της Ιρλανδίας, δ. Νόσος του *Salmo salar* στη Νορβηγία, ε. Νόσος από R.L.O. στο λαβράκι. Παρά τις τεκμηριωμένες ομοιότητες των παθολογικών ευρημάτων σε καθεμία από τις περιπτώσεις μόλυνσεων από R.L.O. (ιστική νέκρωση, αλλοιώσεις των αγγείων, προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων και

Rickettsia-like organisms (R.L.O.) infections of fin-fish

Athanassopoulou F.¹, Karagouni E.²

ABSTRACT. Rickettsia-like organisms (R.L.O.) infections of fin-fish have been reported in several salmonid and non-salmonid species in both fresh and seawater since 1939. This organism was not considered of economical importance to the global fin-fish aquaculture industry until *Piscirickettsia salmonis* was confirmed as the etiology agent of mass mortalities in the Chile during the 1990's. All cultured salmonid species can be infected by this intracellular bacteria and in diseased fish it may provoke a systemic response affecting most internal organs, but preferentially targeting the liver. For other R.L.O's the pathology may vary depending on both the immunogenicity of the R.L.O. and the species of fish affected; eg, R.L.O. infections of the Hawaiian tilapia result in a systemic granulomatous inflammatory response. Initial published reports on R.L.O's affecting cultured juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) were described from sea-cages, at rearing temperatures ranging from 12-15°C, in the Mediterranean off the coast of France. In this outbreak the reported pathology was restricted to the mesencephalic regions of the brain. Subsequently, the organism was identified from cultured sea bass of the coast of Greece, with moribund fish showing similar pathology; i.e brain, olfactory nerve and internal organs inflammation. These samples were preliminarily screened by immunohistochemistry and found to cross react with antisera to *P. salmonis*. This finding was also confirmed by demonstrating antigenic similarities between *P. salmonis* and European sea bass R.L.O. isolates from Greece. Recently, a systemic type of the disease was demonstrated by histopathology in juvenile cultured juvenile sea bass. The meningitis, as well as other internal lesions affecting sea bass, is nearly identical to that seen in for R.L.O. infected Atlantic salmon from British Columbia, Canada. Similar lesions have been noted for piscirickettsiosis in both Chilean and Eastern Canadian outbreaks: i.e liver, pancreas, retina, brain stem, meninges and the lamina propria of intestine.

Key words: Rickettsia-like organisms (R.L.O.), marine fish, Mediterranean fish, cultured fish

¹ Εργαστήριο Ιχθυολογίας και Ιχθυοπαθολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Τριετών 221, 431 00 Καρδίτσα, Ελλάς
E-mail: eathan@vet.uth.gr - *Corresponding author

² Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Ave., 115 21 Athens, Greece.
E-mail: ekaragouni@mail.pasteur.gr.

¹ Laboratory of Ichthyology & Fish Pathology, University of Thessaly, Faculty of Veterinary Medicine, School of Health Sciences, 221 Trikalon str., 431 00 Karditsa, Greece.
E-mail: eathan@vet.uth.gr - *Corresponding author

² Hellenic Pasteur Institute, 127 Vas. Sofias Ave., 115 21 Athens, Greece.
E-mail: ekaragouni@mail.pasteur.gr.

των μακροφάγων), υπάρχουν ορισμένες διαφορές (για παράδειγμα, υπερπλασία των βραγχίων παρατηρείται μόνο στο Χιλιανό *Coho-salmo*, ενώ η θρόμβωση παρατηρείται μόνο περιστασιακά στις περιπτώσεις της Ιρλανδίας και της Νορβηγίας). Αυτές οι διαφορές είναι που καταδεικνύουν την ύπαρξη παρόμοιων και όχι ταυτόσμων αιτιολογικών παραγόντων. Η ακριβής, λοιπόν, σχέση μεταξύ των διαφόρων παρατηρούμενων R.L.O. αναμένεται να διαλευκανθεί, ενώ προς το παρόν οι έρευνες που διεξάγονται με τη μέθοδο PCR ενισχύουν τη θεωρία της ύπαρξης τουλάχιστον 4 γενετικών μεταβλητών. Εκτός από τα Salmonidae και άλλα είδη ψαριών αποτελούν στόχο των R.L.O. Μεταξύ αυτών, αναφέρονται το *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, *O. aureus*, *Tilapia zillii*, *T. hornorum* και μερικά υβρίδια. Τα προσβεβλημένα ψάρια εμφάνιζαν πηλατικές αλλοιώσεις, χαρακτηριζόμενες από διηθητική νεκρωτική πηλατίδα, έντονη αγγείτιδα, ινώδεις θρόμβους και κοκκώματα. Μόνο μια δοκιμή εμβολίου χρησιμοποιώντας μια βακτηρίνη έχει δημοσιοποιηθεί. *In vitro* δοκιμές έχουν δείξει ευαισθησία του παράγοντα στη στρεπτομυκίνη, γενταμικίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη, κλαριθρομυκίνη και οσαφαλοξακίνη, καθώς και αντοχή στην πενικιλίνη και σπεκτινομυκίνη. Στην πράξη, ποικίλα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί χρησιμοποιώντας αντιβιοτικά από το στόμα.

Λέξεις ευρετηρίασης: Οργανισμοί προσομοιάζοντες σε Ρικέτιες, Θαλάσσια ψάρια, Μεσογειακά είδη, εκτρεφόμενα ψάρια

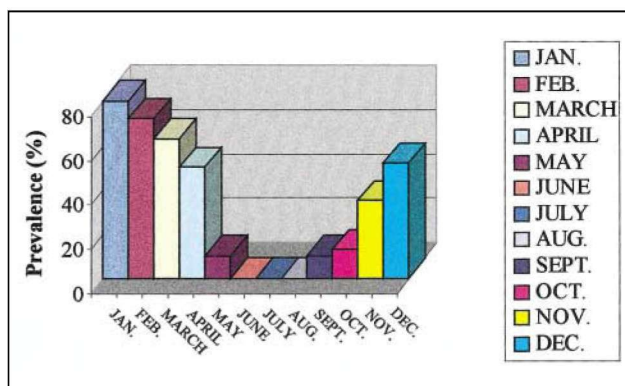
1. Ιστορική αναδρομή

Οι ρικετσιώσεις είναι μεγάλη ομάδα ασθενειών στα θηλαστικά που προκαλούνται από είδη της οικογένειας Rickettsiaceae. Τα είδη αυτά είναι Gram⁻ ενδοκυτταρικά βακτήρια που πολλαπλασιάζονται σε διάφορες θέσεις στο εσωτερικό των ευκαριωτικών κυττάρων και μεταδίδονται συνήθως με ενδιάμεσο ξενιστή Αρθρόποδα. Στα ψάρια, αναφορά για προσβολή από μικροοργανισμό που προσομοιάζει με ρικέτιες εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1939 κατά την εξέταση ψαριών του είδους *Tetrodon fahaka* από τον ποταμό Νείλο, στην Αίγυπτο. Οι μικροοργανισμοί παρατηρήθηκαν τυχαία σε κυτταροκαλλιέργειες, αλλά τότε δεν έγιναν προσπάθειες να καλλιεργηθούν (Mohamed 1939). Το 1975, οι Ozel και Sschwanz-Pfützner καλλιεργήσαν για πρώτη φορά R.L.O. από ψάρια κατά την εξέταση πέστροφας (*Onchorynchus mykiss*) για τον ιό *Egtved*. Κατά την προσπάθειά τους να καλλιεργήσουν τον ιό, σε κυτταρικές σειρές πέστροφας (RTG-2) (Wolf & Quimby 1962) παρατήρησαν ότι τα κύτταρα περιείχαν επιπλέον έναν ενδοκυτταρικό μικροοργανισμό που έμοιαζε με ρικέτσια. Όμως, η έρευνα για τον μικροοργανισμό αυτό παρέμεινε περιορισμένη και η ταξινόμηση του θέσης και σημασία δεν καθορίστηκαν. Ο μικροοργανισμός δε διατηρήθηκε και δεν είναι πλέον διαθέσιμος για έρευνα. Δεν υπήρξαν περαιτέρω αναφορές για ρικέτιες στα ψάρια μέχρι το 1986, όταν ο Davies παρατήρησε R.L.O. σε ιστούς του είδους *Callionymus lyra L.* που είχε αλιευθεί από τις ακτές της Ουαλίας (Davies 1986). Αρχικά, οι ρικετσιώσεις θεωρήθηκαν ότι ήταν περιορισμένες στα είδη του σολομού στη Ν. Χιλή, όμως, ο μικροοργανισμός και η κλινική εικόνα που τον συνοδεύει έχει βρεθεί σε

πολλά μέρη του κόσμου. Στα περισσότερα είδη του σολομού (*Onchorynchus kisutch*, *O. tshawytscha*, *O. masou*, *O. mykiss*, *Salmo salar*) ο μόνος μικροοργανισμός που έχει αναφερθεί είναι ο *Piscirickettsia salmonis* που προκαλεί σοβαρές απώλειες στους εκτρεφόμενους ιχθυοπληθυσμούς. Στα ψάρια αυτά, προκαλεί κλινικά συμπτώματα, όπως λήθαργο, σκούρο χρωματισμό στο δέρμα, αναπνευστική δυσκολία, ανώμαλη κολύμβηση και αιμορραγικές εξωτερικές αλλοιώσεις στην έδρα και τον οφθαλμό και συχνά συνοδεύεται από εξοφθαλμία και στοματίτιδα. Οι πιο χαρακτηριστικές αλλοιώσεις εμφανίζονται στα εσωτερικά όργανα που φέρουν υπόλευκα ή κιτρινωπά υποκαψικά οζίδια στο ήπαρ, τη σπλήνα και το νεφρό και συνοδεύονται από ασκίτη, περιτονίτιδα, πετέχειες και εκχυμώσεις, δίνοντας χαρακτηρισά συστηματικής σηψαιμικής ασθένειας. Η σοβαρότητα της λοίμωξης στα είδη αυτά έδωσε το έναυσμα για την έναρξη μελέτης της ασθένειας σε εργαστηριακό επίπεδο και στην ανάπτυξη ορισμένων διαγνωστικών τεχνικών. Όμως, η παθογένεια, ο βαθμός ευαισθησίας των ειδών και η λοιμογόνος ικανότητα του μικροοργανισμού, καθώς και ο τρόπος μετάδοσης της νόσου, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητά.

Στις αρχές του 1990, η ασθένεια διαγνώστηκε και σε άλλα είδη σολομού στη Χιλή, καθώς επίσης και στη Νορβηγία και την Ιρλανδία και οι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντιγόνο (Lannan et al. 1991). Σήμερα, επιδημίες έχουν αναφερθεί σε όλα τα είδη του σολομού. Στις ακτές του Δ. Καναδά οι Brocklebank et al. (1992) και Evelyn (1992) παρατήρησαν ότι εκτρεφόμενοι σολομοί του είδους *Salmo salar* σε θαλάσσιους κλωβούς εμφάνιζαν ίδια συμπτώματα και αλλοιώσεις με αυτές των σολομών από τη Χιλή. Ο αιτιολογικός παράγοντας απομονώθηκε σε κυτταρικές σειρές εμβρύων *CHSE-214* και η νόσος αναπαράχθηκε πειραματικά. Ο μικροοργανισμός ήταν μορφολογικά όμοιος με αυτόν των σολομών της Χιλής, είχε, όμως, μικρότερη λοιμογόνο δύναμη.

Μέχρι το 1994, όλες οι ρικέτιες που είχαν διαγνωστεί αφορούσαν σολομούς εκτρεφόμενους στη θάλασσα. Όμως, έγινε φανερό ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είχαν ευρύτερη εξάπλωση σε ξενιστές από διάφορες γεωγραφικές περιοχές, τόσο σε θαλάσσια οικοσυστήματα όσο και σε γλυκά νερά (Εικόνα 1). Οι Chern & Chao (1994) περιέγραψαν την ασθένεια σε όλα τα είδη του ψαριού Τιλάπια (*Oreochromis & Tilapia* sp.) από θαλάσσια και θερμά γλυκά νερά από την Ταϊβάν. Οι Khoo et al (1995) ανέφεραν την ύπαρξη R.L.O. σε νοσούντα ψάρια του καλλωπιστικού τροπικού είδους του γλυκού νερού *Panaque suttoni* από την Κολομβία. Στη Χιλή οι Caggero et al. (1995) απομόνωσαν *P. salmonis* από ασθενή είδη σολομού (*Onchorynchus kisutch*) και πέστροφας εκτρεφόμενα, επίσης, σε γλυκό νερό. Ένα διαφορετικό, μέχρι στιγμής μη ταυτοποιημένο, βακτήριο απομονώθηκε σε κυτταρικές σειρές από ασθενή σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), εκτρεφόμενο αποκλειστικά σε γλυκό νερό. Ο μικροοργανισμός είναι μικρότερος (διαμέτρου 0,2-0,8 μ) της *P.*



Εικόνα 1. Ποσοστό μόλυνσης από οργανισμούς προσομιάζοντες σε ρικετσιές σε εκτρεφόμενο λαβράκι στην Ελλάδα (έτος 1996).

Figure 1. Overall prevalence of Rickettsia-like infections of sea bass in Greece (year 1996).

salmonis (0,5-1,5 μ), ενώ και τα δύο έχουν κοκκοειδή μορφή. Το μη-ταυτοποιημένο αυτό βακτήριο βρέθηκε ενδοκυτταρικά σε δείγματα σπλήνα και νεφρού, δεν αναπτύχθηκε σε βακτηριολογικά υποστρώματα, αλλά και δεν αναγνωρίστηκε με πολυκλωνικά αντισώματα σε *P. salmonis*. Τα στελέχη που έχουν απομονωθεί από άλλα είδη ψαριών, πλην των σαλμονιδών, δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς και δεν έχει εξακριβωθεί η σχέση τους με τον *P. salmonis* (Mauel et al. 2003).

Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ρικετσιές των ψαριών μπορούν να προσβάλλουν τον άνθρωπο ή άλλα θηλαστικά. Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη των ρικετσιών των ψαριών κυμαίνεται από 15-18°C, με ανώτατο όριο τους 25°C, γεγονός που πιθανόν να αποτρέπει την ανάπτυξή τους σε θερμοδαιμα ζώα.

2. Ταξινόμηση της *Piscirickettsia salmonis*

Η *P. salmonis* είναι το πλέον χαρακτηρισμένο στέλεχος από τα στελέχη των ρικετσιών που έχουν βρεθεί και απομονωθεί στα ψάρια. Το στέλεχος LF-89^T απομονώθηκε από νοσούντα σολομό σε θαλασσινούς κλωβούς της Ν. Χιλής κατά τη διάρκεια μιας επιζωοτίας. Ο μικροοργανισμός ταξινομήθηκε ως νέο γένος στην τάξη Rickettsiales της οικογένειας Rickettsiaceae, με βάση τη μορφολογική του ομοιότητα και την υποχρεωτικά ενδοκυτταρική φύση του (Fryer et al. 1992). Έχει ήδη συμπεριληφθεί στην Αμερικανική Τράπεζα τυποποιημένων καλλιέργειών με τον κωδικό ATCC VR-1361. Πολλά στελέχη ρικετσιών που απομονώθηκαν από ψάρια από το 1989 έχουν ταυτοποιηθεί ορολογικά ως *P. salmonis* με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στο στέλεχος VR-1361. Αντίθετα, μονοκλωνικά αντισώματα που αναπτύχθηκαν σε ορισμένα εργαστήρια εναντίον συγκεκριμένων στελεχών απέδειξαν τη γενετική ποικιλομορφία που υφίσταται μεταξύ των στελεχών αυτού του είδους. Το γένος *Piscirickettsia* ανήκει στη Γ' υποδιαίρεση των Πρωτοβακτηρίων.

2.1. Χαρακτηριστικά του στελέχους LF-89^T

Το στέλεχος αυτό είναι ακίνητο, Gram⁻, υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό βακτήριο και συνήθως κοκκοειδούς μορφολογίας, διαμέτρου 0,5-1,5 μ. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχει τυπική μορφολογία κυτταρικού τοιχώματος Gram⁻ βακτηρίου και πρωτόπλασμα προκαρυωτικού κυττάρου. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε ορισμένες κυτταρικές σειρές, αλλά όχι σε μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα. Η ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού είναι 15-18°C με αργή ανάπτυξη στους 20°C και μικρότερη των 10°C.

3. Τρόπος μετάδοσης

Η πηγή μόλυνσης και ο τρόπος μετάδοσης των ρικετσιώσεων και ειδικότερα του *P. salmonis* δεν είναι ακόμη εξακριβωμένα. Με εξαίρεση την επιζωοτία της Χιλής, οι ρικετσιώσεις των ψαριών είναι σποραδικές και εμφανίζονται με λίγες θνησιμότητες που οφείλονται στη μειωμένη λοιμογόνο ικανότητα στις άλλες γεωγραφικές περιοχές, ενώ δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής ενδιάμεσος ξενιστής. Πειραματική μόλυνση με *P. salmonis* έχει επιτευχθεί με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Garces et al. 1991), όμως ο φυσιολογικός τρόπος μετάδοσης της νόσου δεν έχει αποδειχθεί. Στο χερσαίο περιβάλλον, εκτός της *Coxiella burnetti*, χρειάζεται ενδιάμεσος ξενιστής ή φορέας για τη μετάδοση των οργανισμών αυτών. Στο είδος *C. burnetti*, όταν λείπει ο ενδιάμεσος ξενιστής ή φορέας, υπάρχει στάδιο σπορογονίας. Δεν έχουν παρατηρηθεί τέτοια στάδια των R.L.O. στα ψάρια (Weiss & Moulder 1984) και θεωρείται ότι ο *P. salmonis* μπορεί να μεταδοθεί άμεσα στο υδάτινο περιβάλλον. Πειραματικές μολύνσεις περιορισμένου αριθμού σε είδη σολομού αποδείχθηκαν αντιφατικές σχετικά με την οριζόντια μετάδοση των R.L.O. (Garces et al. 1991, Cvitanich et al. 1991). Παρ' όλα αυτά, θεωρείται ότι η οριζόντια μετάδοση είναι πιθανή στο υδάτινο περιβάλλον. Μια θεωρία αφορά στην απελευθέρωση του αιτιολογικού παράγοντα από τα κόπρανα μετά την ανίχνευσή του στο έντερο νοσούντος ψαριού και την επιβίωσή του στο νερό με συνέπεια τη μόλυνση των υπολοίπων.

Αν και οι ρικετσιές ανιχνεύθηκαν στις γονάδες ψαριών, η κάθετη μετάδοση, τουλάχιστον για τον *P. salmonis*, δεν είχε αποδειχθεί πλήρως, μέχρι πρόσφατα που έγιναν πειραματικές μελέτες σε *Coho salmon* από τον Bustos et al. (1994). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι 98,3% του γόνου που προήλθαν από θετικούς γεννήτορες ήταν θετικοί, ενώ μόνο το 26,7% του γόνου που προέρχονταν από αρνητικούς γεννήτορες ήταν θετικοί (Bustos et al. 1994). Εξαιτίας του κινδύνου πραγματικής κάθετης μόλυνσης, στη Χιλή σε σολομούς χρησιμοποιούνται κατάλληλες τεχνικές ανίχνευσης για τον προσδιορισμό της ύπαρξης μόλυνσης του γόνου.

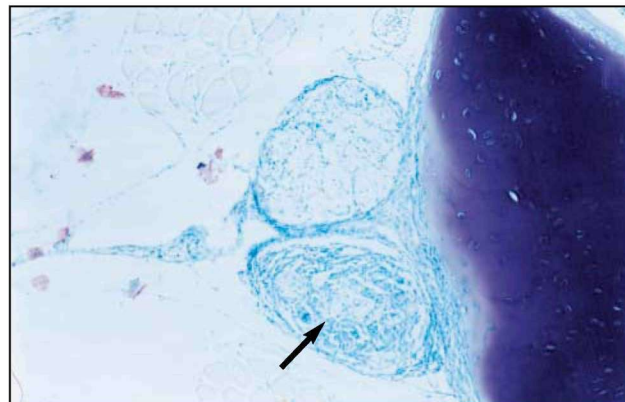
4. Τρόποι διάγνωσης του *P. salmonis*

Το κύριο μέρος των ερευνητικών προσπαθειών που έχουν γίνει μέχρι σήμερα σχετικά με τη διάγνωση των ρικετσιώσεων των ψαριών αναφέρονται στο είδος *P.*



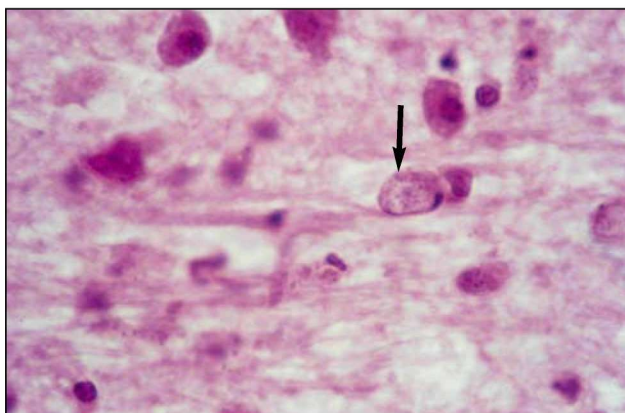
Εικόνα 2. Πάχυνση αμφιβληστροειδούς (τόξο) λόγω φλεγμονής από RLO σε λαβράκι. Giemsa X200.

Figure 2. Lesion in the eye of cultured sea bass (arrow) due to RLO infection. Giemsa X200.



Εικόνα 3. Φλεγμονή του οσφρητικού βολβού (τοξο) λόγω μόλυνσης από RLO σε λαβράκι. Giemsa X250.

Figure 3. Lesion in the olfactory nerve of sea bass (arrow) due to RLO infection. Giemsa X250.



Εικόνα 4. RLO Μικροοργανισμοί (τόξο) μέσα σε μακροφάγο του αμφιβληστροειδούς σε λαβράκι. Giemsa X450 (arrow).

Figure 4. RLO organisms (arrow) inside macrophages of the retina of a sea bass. Giemsa X450 (arrow).

salmonis. Στα σαλμονοειδή, η μόλυνση με R.L.O. μπορεί να οδηγήσει σε σηψαιμία που διαγιγνώσκεται από την εμφάνιση έντονων ελκών στο δέρμα, ο προσδιορισμός δε του μικροοργανισμού γίνεται σε επιχρίσματα ή τομές ιστών με ιστοχημικές χρώσεις με διάφορες χρωστικές, όπως εωσίνη-αιματοξυλίνη, πορτοκαλί της ακριδίνης, Gram, Giemsa, Giemex, Machiavello και Periodic acid Schiff (PAS) (Fryer et al. 1990, Branson & Nieto 1991, Cvitanich et al. 1991, Lannan & Fryer 1991). Παρ'ότι οι τεχνικές αυτές δεν είναι ειδικές για τον *P. salmonis*, είναι γρήγορες και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διάγνωση της σηψαιμίας από ρικέτσιες στα σαλμονοειδή. Παράλληλα, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη εξειδικευμένων τεχνικών για την ανίχνευση του *P. salmonis*. Ο μικροοργανισμός μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί σε κυτταρικές σειρές (Lannan & Fryer 1991), αλλά χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικών, γεγονός που προδιαθέτει στην ανάπτυξη και άλλων μικροβιακών παραγόντων (Lannan et al. 1991).

Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης του παθογόνου μικροοργανισμού αποτελούν τεχνικές ανοσοφθορισμού και ανοσοιστοχημείας, στις οποίες χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντι-*P. salmonis* αντισώματα κουνελιού σημασμένα με υπεροξειδάση (Lannan et al. 1991, Alday-Sanz et al. 1994). Επιπλέον, για την ανίχνευση της σηψαιμικής μορφής της ρικετσίωσης, έχουν γίνει προσπάθειες για την ανάπτυξη της μεθόδου ELISA (Cassigoli 1994). Πρόσφατα, για την ανίχνευση του *P. salmonis* έχει περιγραφεί η ανάπτυξη της μεθόδου nested PCR (Mauel et al. 1996). Αυτή η τεχνική είναι γρήγορη, ειδική και υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση του γενώματος του *P. salmonis* από εκτρεφόμενα ψάρια και ιστούς ασυμπτωματικών φορέων.

5. Η Νόσος

5.1 Η νόσος στη Μεσόγειο και την Ελλάδα

Πρόσφατα, η ύπαρξη μικροοργανισμών που προσομοιάζουν τις ρικέτσιες (R.L.O.) διαπιστώθηκε για πρώτη φορά και σε είδη των Μεσογειακών ιχθυοκαλλιέργειών (Comps et al. 1996). Το 1996, στη Γαλλία, σε ιχθυοκαλλιέργειες του είδους *Dicentrarchus labrax* L. (λαβράκι), βάρους 30-70 γρ., εκδηλώθηκε νόσος η οποία χαρακτηρίστηκε από έντονη φλεγμονή των μηνίγγων, νευρικά συμπτώματα και τύφλωση, με αποτέλεσμα την ανικανότητα προσανατολισμού και ανεύρεσης τροφής. Η θνησιμότητα ήταν μεγάλη ιδίως κατά τους ψυχρότερους μήνες του έτους. Ο εντοπισμός του μικροοργανισμού σε αυτήν την περίπτωση περιορίστηκε στον εγκέφαλο, ενώ δε βρέθηκε στα εσωτερικά όργανα και το αίμα. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι μικροοργανισμοί είχαν μορφολογία παρόμοια του είδους *Piscirickettsia salmonis*, όμως, εμφάνιζαν και διαφορές, όπως η παρουσία πολύμορφων πυκνωτικών σωματιδίων (PEDB), καθιστώντας έτσι την ταυτοποίηση δύσκολη (Comps et al. 1996). Κατά συνέπεια, η νόσος που εκδηλώθηκε δεν είχε τη χαρακτηριστική συστηματική σηψαιμική εικόνα που παρατηρήθηκε στα άλλα είδη (Comps et al. 1996).

Εικόνα 5. Α: Ανοσοϊστοχημική χρώση των μηνίγγων όπου φαίνονται οι μικροοργανισμοί (τόξο) μέσα σε ιστοκύτταρα.

AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) and Haematoxyline X1000.

Β: Ανοσοϊστοχημική χρώση εγκεφάλου όπου φαίνονται οι μικροοργανισμοί (τόξο) μέσα σε κύτταρα. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) and Haematoxyline X1000.

Γ: Ανοσοϊστοχημική χρώση των μηνίγγων και νευρώνων όπου φαίνονται οι μικροοργανισμοί (τόξο) μέσα σε ιστοκύτταρα. DAB (3,3-diaminobenzidine hydrochloride) and Haematoxyline X1000.

Figure 5. A: Immunohistochemical staining of meninges showing rickettsia (arrow) within histiocytes. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) and Haematoxyline X1000.

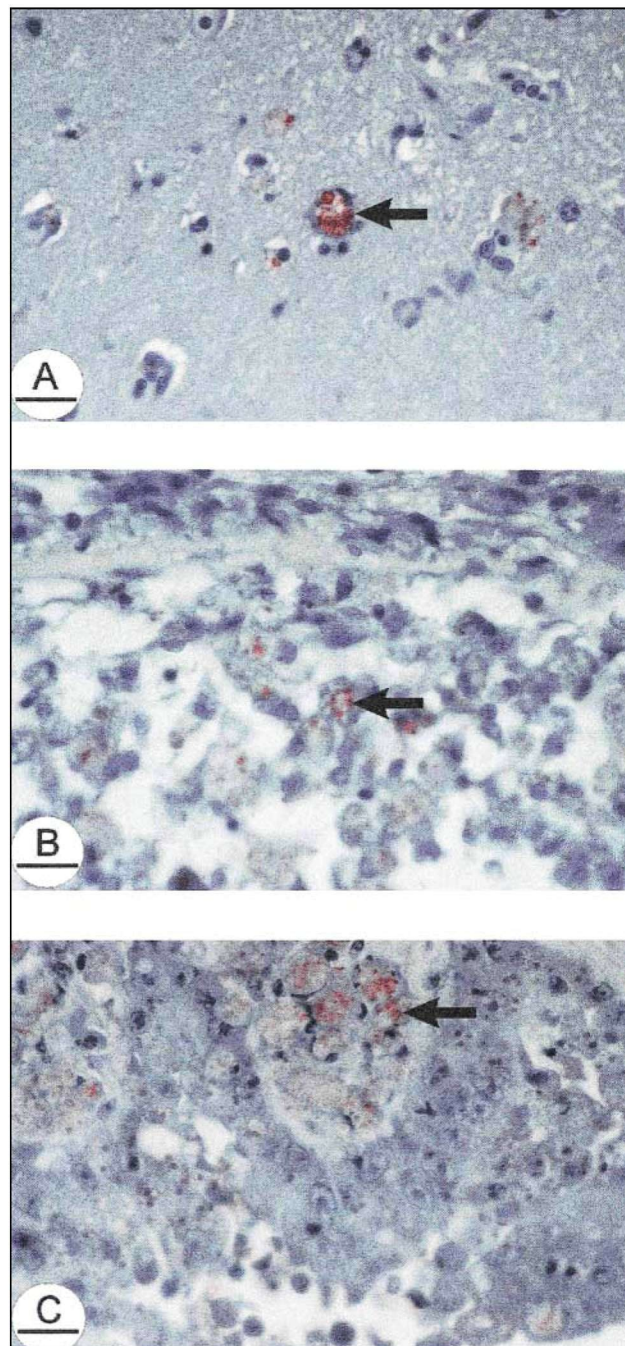
B: Immunohistochemical staining of cerebellum showing rickettsial (arrow) laden histiocytes and neurons. AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) and Haematoxyline X1000.

C: Immunohistochemical staining of cerebellum showing rickettsial (arrow) laden histiocytes and neurons. DAB (3,3-diaminobenzidine hydrochloride) and Haematoxyline X1000.

Στην Ελλάδα, μια παρόμοια νόσος εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε νεαρά εκτρεφόμενα λαβράκια το 1997. Η νόσος εκδηλώθηκε σε ιχθύδια βάρους 0,5-10gr., λίγες ημέρες μετά την τοποθέτησή τους σε κλωβούς, χαρακτηρίστηκε από νευρική συμπτωματολογία και επιδεινώθηκε κατά τους χειμερινούς μήνες (θερμοκρασία νερού <math>< 15-18^{\circ}\text{C}</math>), με αποτέλεσμα την αύξηση της θνησιμότητας έως και 15% (Athanassopoulou et al. 1999). Έκτοτε, η νόσος έχει προκαλέσει σημαντικές απώλειες σε πολλές εκτροφές σε όλη την Ελλάδα. Η ύπαρξη R.L.O. διαπιστώθηκε ιστοπαθολογικά εκτός από τα κύτταρα του εγκεφάλου, για πρώτη φορά, και στον οφθαλμό, προκαλώντας σοβαρή εξοφθαλμία και διόγκωσή του, στο οσφρητικό νεύρο και σε επιδερμικά κύτταρα της κεφαλής, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο τρόπος εισόδου του μικροοργανισμού πολύ πιθανόν να είναι αρχικά από το δέρμα. (Athanassopoulou et al. 1999)- Εικόνες 2-4. Προσπάθειες απομόνωσης των R.L.O. από προσβεβλημένους ιστούς σε κυτταρικές σειρές SSN-1 δεν απέβησαν επιτυχείς, ενώ η εξέταση των δειγμάτων με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά των αντιγόνων του *Piscirickettsia salmonis*, έδωσε θετικά αποτελέσματα (Athanassopoulou et al. 1999, Steiropoulos et al. 2002), Εικόνα 5. Συστηματική μορφή της νόσου βρέθηκε πολύ πρόσφατα σε λαβράκι (Athanassopoulou et al. 2003, in press).

5.2. Σηψαιμική νόσος από *Piscirickettsia salmonis* (Piscirickettsiosis / Salmonid rickettsial septicaemia)

Είναι μια μολυσματική ασθένεια της οποίας υπεύθυνο αντιγόνο είναι μία υποχρεωτικά ενδοκυτταρική ρικέτσια, η *Piscirickettsia salmonis*. Η εν λόγω ασθένεια είχε τεράστιο οικονομικό αντίκτυπο σε θαλάσσιες οικονομικές καλλιέργειες σολομών στη νότια Χιλή, από τότε που αναφέρθηκε το 1989, όταν προκάλεσε το θάνατο 1,5 εκατομμυρίων ψαριών. Τότε θεωρήθηκε ότι η ασθένεια προσβάλλει μόνο το είδος *Coho salmon*, ενώ λόγω των ασυνήθων χαρακτηριστικών της, της αποδοθήκαν αρχικά ποι-



κίες ονομασίες. Επιζωοτίες συνήθως συμβαίνουν 10 έως 12 εβδομάδες μετά την είσοδο υγιών ψαριών στα θαλάσσια νερά, κατά κανόνα από το Μάρτιο έως τον Αύγουστο, ενώ η έξαρση της νόσου μπορεί να διαρκέσει έως 10 εβδομάδες και μετά υποχωρεί (Cvitanič et al. 1991). Το ίδιο στέλεχος είναι παθογόνο για τους σολομούς του Ατλαντικού, την ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* και το είδος *Chinook salmon (Oncorhynchus tsawytscha)*, ενώ παρόμοιοι παθογόνοι παράγοντες έχουν βρεθεί σε τιλάπιες (*Tilapia spp.*), στον πλεκόστομο με τα μπλε μάτια (*Panaque suttoni*) και σε δροάκινες (*Callionymus lyra*).

Η γεωγραφική κατανομή της νόσου, παρ' όλα αυτά, εί-

να ευρύτερη απ' ότι αρχικά είχε υπολογιστεί, αφού παρόμοιοι ρικετοσιακοί οργανισμοί έχουν αναφερθεί πρόσφατα σε σολομούς εκτρεφόμενους σε θάλασσα στον Καναδά (Brocklebank et al. 1992), την Ιρλανδία (Rodger & Drinan 1993) και τη Νορβηγία (Olsen et al. 1993). Η θνησιμότητα σε αυτές τις χώρες δεν είχε ούτε το μέγεθος ούτε τις οικονομικές επιπτώσεις των αντίστοιχων της Χιλής και δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν ο υπεύθυνος μικροοργανισμός είναι η *Piscirickettsia salmonis*. Σημειώνεται όμως ότι οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από τις Καναδικές και Ιρλανδικές καλλιέργειες αντέδρασαν θετικά με πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της *Piscirickettsia salmonis* (Brocklebank et al. 1992, Alday-Sanz et al. 1994).

5.3. Νόσος στα Salmonidae στην περιοχή της Χιλής και του Καναδά από το *P. salmonis*

Ο *P. salmonis* προκαλεί επιζωοτίες σε σαλμονοειδή με ποσοστά θνησιμότητας που κυμαίνονται από 0,06% (Evelyn 1992, Rodger & Drinan 1993, Olsen et al. 1997) μέχρι και 90% (Branson & Nieto 1991). Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από πολλά μη ειδικά κλινικά συμπτώματα. Τα νοσούντα ψάρια συλλέγονται στην επιφάνεια του νερού, είναι ληθαργικά, εμφανίζουν ανορεξία και αποχρωματισμό των βραγχίων, εξώφθαλμο και ο αιματοκρίτης τους είναι συχνά <25%. Τα πρώτα συμπτώματα είναι αιμορραγίες και δερματικές αλλοιώσεις που κυμαίνονται από μικρά έως μεγάλα, διαμέτρου 2 εκ., έλκη (Branson & Nieto 1991). Στα εσωτερικά όργανα παρατηρούνται πετέχειες και αιμορραγίες κυρίως στη νηκτική κύστη. Διαγνωστικές είναι οι κρεμώδεις αλλοιώσεις στο ήπαρ των χρόνια νοσούντων ψαριών, όπου υπόλευκα ή κιτρινωπά υποκαψικά οζίδια υπάρχουν στο ήπαρ, τη σπλήνα και το νεφρό και συνοδεύονται με ασκίτη, περιτονίτιδα, πετέχειες και εκχυμώσεις, δίδοντας χαρακτηρισά συστηματικής σηψαιμικής νόσου. Στις οξείες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί αιφνίδιος θάνατος χωρίς την εμφάνιση συμπτωμάτων (Cvitanich et al. 1991).

Ιστολογικώς, οι αλλοιώσεις θεωρούνται νεκρωτικής και φλεγμονώδους μορφής και παρατηρούνται σε όλα τα εσωτερικά όργανα. Επίσης, παρατηρείται εναπόθεση θρόμβων στα μικρά αγγεία, νέκρωση του επιθηλίου τους και διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα (Branson & Nieto 1991, Bravo & Campos 1989, Cubillos et al. 1990, Cvitanich et al. 1991). Στα βράγχια η υπερπλασία έχει ως αποτέλεσμα τη συγκόλληση των δευτερογενών νηματίων και τα βακτήρια εντοπίζονται στα μακροφάγα κύτταρα του ιστού.

Μικροσκοπικές αλλοιώσεις έχουν περιγραφεί και σε άλλα όργανα, όπως ο εγκέφαλος, οι σκελετικοί μύες, το δέρμα, η καρδιά, τα βράγχια και οι ωοθήκες (Cvitanich et al. 1991). Συγκεκριμένες ιστολογικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν ήπια έως οξεία περικαρδίτιδα, ήπια ενδοκαρδίτιδα, καθώς και υαλοειδή νέκρωση του μυοκαρδίου (Cvitanich et al. 1991). Νέκρωση και φλεγμονή των εντερικών λαχνών, υπερπλασία του επιθηλίου των βραγχίων και παρουσία R.L.O. μικροοργανισμών στους δευτερογενείς χώρους αίματος των λαχνών έχουν, επίσης, ανιχνευ-

θεί (Branson & Nieto 1991). Οι ίδιοι συγγραφείς περιγράφουν επιπρόσθετη εκφύλιση των νεφρικών σωληναρίων και πυοκοκκώδη φλεγμονή με εξελκώσεις της υπερκείμενης επιδερμίδας, Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, πυοκοκκώδη φλεγμονή των βραγχίων και σπληνίτιδα με οξεία αγγειίτιδα και αιμορραγία παρατηρήθηκαν στον Καναδά (Brocklebank et al. 1992).

Οι μικροοργανισμοί προσβάλλουν μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των περιφερικών μακροφάγων στα οποία αντιγράφονται μέσα σε ποικίλου σχήματος, μεμβρανώδη, ενοκυτταροπλασματικά κενότοπια (Cvitanich et al. 1991). Ωστόσο, *P. salmonis* έχει βρεθεί και εξωκυτταρικά, ως αποτέλεσμα κυτταρικής λύσης. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η *P. salmonis* μολύνει τα κύτταρα-στόχος, εξουδετερώνει τους ενδοκυτταρικούς αμυντικούς μηχανισμούς και επιβιώνει μέσα στα κύτταρα του ξενιστή είναι ασαφείς και απαιτούν περαιτέρω έρευνα. Τα ιστοπαθολογικά ευρήματα από φυσικά και πειραματικά προσβεβλημένα ψάρια αφορούν μόνο σε προχωρημένα στάδια της νόσου, ενώ δεν υπάρχουν στοιχεία για την αλληλουχία των ιστολογικών μεταβολών που οδηγούν στην εκδήλωση νόσου.

5.4. Νόσος στο σολομό του Ατλαντικού σε ιχθυοκαλλιέργειες της Ιρλανδίας

Στην Ιρλανδία, μία ασθένεια σχετιζόμενη με R.L.O. εκδηλώθηκε στον Ατλαντικό σολομό (*Salmo salar*) το 1991 (Rodger & Driman 1993). Στην εξέταση κάτω από το απλό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η ασθένεια αποδείχθηκε να προκαλεί παρόμοιες αλλοιώσεις με τη νόσο που προκαλείται από το *P. salmonis*. Μέχρι τότε η νόσος ήταν γνωστή στη Χιλή, τον Καναδά και τη Νορβηγία. Οι παθολόγοι παράγοντες που ελήφθησαν από τις χώρες αυτές φαίνεται να έχουν παρόμοια DNA και RNA ανάλυση, αν και βρέθηκε μία μικρή διαφορά σε ένα δείγμα που απομονώθηκε στη Χιλή. Στις ορολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκε ανοσοφλουροσκεΐνη. Οι R.L.O. από την επιζωοτία του 1991 φαίνεται να ταιριάζουν με το *P. salmonis* (Χιλή), όπως έδειξαν οι ανάλογες ανοσοϊστοχημικές μελέτες. Πρόσφατα, μία R.L.O. ασθένεια περιγράφηκε σε εκτρεφόμενους σολομούς Ατλαντικού και στη Σκωτία. Ωστόσο, αυτοί οι R.L.O. μπορεί να διαφέρουν από τους άλλους που απομονώθηκαν στις άλλες περιοχές, αφού δεν υπήρξε αντίδραση με τον αντιορό του *P. salmonis*. Η R.L.O. ασθένεια εκδηλώθηκε σε θαλάσσιες εκτροφές *Atlantic salmon* στην Ιρλανδία το 1995-6. Τα κρούσματα εμφανίστηκαν το φθινόπωρο, όταν η θερμοκρασία του νερού μειώνεται στους 12-16°C. Τα κλινικά συμπτώματα, η παθολογία και ιστοπαθολογία ήταν παρόμοια με τις παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη ρικετοσίωση στη Χιλή, αλλά και στην Ιρλανδία το 1991 (Almendras & Fuentealba, 1997, Almendras et al. 2000).

5.5. Νόσος του *Salmo salar* στη Νορβηγία

Το 1988 θνησιμότητα παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες του Ατλαντικού σολομού κατά μήκος της δυτικής ακτής της

Νορβηγίας. Το κύριο ιστοπαθολογικό εύρημα αφορούσε σε νέκρωση του ήπατος και γι' αυτό η ασθένεια ονομάστηκε νεκρωτική ηπατίτιδα των σαλμονιδών. Η μόλυνση από R.L.O. διαγνώστηκε σε 51 υδατοκαλλιέργειες Ατλαντικού σολομού στη δυτική ακτή της Νορβηγίας από το 1988 έως το 1992. Το 91% από αυτές έλαβε χώρα το φθινόπωρο, από τον Αύγουστο έως το Μάρτιο. Η ασθένεια, εκτός από ελάχιστες περιπτώσεις, εκδηλώθηκε σε νεαρά ψάρια και μόνο μετά την έκθεσή τους σε καθαρό θαλασσινό νερό. Τα νοσούντα ψάρια ήταν ποικίλης προέλευσης και διατρέφονταν με διάφορα σιτηρέσια.

Ως προς τα κλινικά συμπτώματα, παρατηρήθηκε αρχικά μη φυσιολογική κολύμβηση κοντά στην επιφάνεια και κατά μήκος των διχτύων των κλωβών. Οι τυπικές μακροσκοπικές αλλοιώσεις, στο 63% των ψαριών, χαρακτηρίζονταν από καλά περιγεγραμμένα, λευκά, κυκλικά οζίδια με διάμετρο από 5 έως 6 mm στο σκώπι και μεγαλοσπλήνια. Το 35% αυτών των ψαριών είχαν, επίσης, υπόχρωμα βράγχια και διάσπαρτες αιμορραγίες στους σκελετικούς μυς, το περισπλάχνιο λίπος, το στομαχικό τοίχωμα και τη νηκτική κύστη. Το ήπαρ ήταν αποχρωματισμένο και πρασινωπό, με λευκές, αλλά και αιμορραγικές κηλίδες. Βρέθηκαν, επίσης, μικρές ποσότητες ασπιτικού υγρού, ενώ ο σπλήνας και ο νεφρός ήταν οίδηματικοί. Μικρά λευκά οζίδια υπήρχαν και σε άλλα όργανα, όπως την καρδιά, το νεφρό, το σπλήνα, τους μυς και το δέρμα.

Η ιστοπαθολογική εξέταση ανέδειξε πολυοζώδεις νεκρωτικές περιοχές στο ηπατικό παρέγχυμα με φλεγμονώδη αντίδραση, περιανγείτιδα και, περιστασιακά, θρόμβους. Σε περιπτώσεις χρόνιας μόλυνσης, οι φλεγμονώδεις εξεργασίες χαρακτηρίστηκαν από διήθηση μακροφάγων εξελισσόμενες σε κοκκίωμα. Στο νεφρό παρατηρήθηκε εκφύλιση και νέκρωση του αιμοποιητικού ιστού και, σε σοβαρές περιπτώσεις, και του επιθηλίου των σωληναρίων. Στην καρδιά, φλεγμονώδεις και ουλώδεις αλλοιώσεις παρατηρήθηκαν κάτω από το επικάρδιο, αλλά και το μυοκάρδιο. Ανάλογες μεταβολές υπήρξαν και στο λευκό πολφό του σπλήνα, καθώς και στις μήνιγγες. Τμήματα του δέρματος εμφάνισαν κοκκώδη φλεγμονή, ενώ δεν υπήρχαν ιστοπαθολογικά ευρήματα στο έντερο, τα βράγχια, τους οφθαλμούς και το πάγκρεας (στο τελευταίο, μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ίνωση της εξωκρινούς μοίρας και νέκρωση). Στη μικροσκοπική παρατήρηση, μετά από μεγάλη μεγέθυνση, καταστήθηκαν ορατοί ενδοκυτταρικοί οργανισμοί παρόμοιοι με ρικέτσιες μέσα σε υγιή κύτταρα, που, όμως, βρισκόνταν στην περιμέτρο φλεγμονωδών, εκφυλισμένων και νεκρωτικών περιοχών. Οι παρατηρούμενοι R.L.O. ήταν κοκκώδεις ή πλειομορφικοί, μονήρεις ή σε ομάδες μέσα σε κυτταροπλασματικά κενοτόπια.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν μορφολογικές ομοιότητες με το αναγνωρισμένο στέλεχος *Piscirickettsia salmonis* (Fryer et al. 1992) που προκάλεσε την ίδια νόσο στη Χιλή, όπως και με τον R.L.O. που απομονώθηκε από τη νόσο της Ιρλανδίας (Rodger & Drinan 1993). Παράλληλα, ανοσοϊστοχημικές μελέτες, που έγιναν με αντισώ-

ματα ενάντια στο απομονωθέν αίτιο, επιβεβαιώνουν την αρχική εκτίμηση για στενή αντιγονική σχέση με τον εν λόγω μικροοργανισμό, ενισχύοντας την υποψία ότι πρόκειται για τον ίδιο μικροοργανισμό.

5.6. Ρικετσιώσεις σε άλλα είδη - μη Σαλμονίδες

Εκτός από τα είδη Salmonidae, και άλλα είδη ψαριών αποτελούν στόχο των RLO. Μεταξύ αυτών, αναφέρονται το *Oreochromis mossambicus*, *O. niloticus*, *O. aureus*, *Tilapia zillii*, *T. hornorum* και μερικά υβρίδια. Τα προσβεβλημένα ψάρια εμφάνιζαν ηπατικές αλλοιώσεις, χαρακτηριστιζόμενες από διηθητική νεκρωτική ηπατίτιδα, έντονη αγγείτιδα, ινώδεις θρόμβους και κοκκίωμα. Οι R.L.O. παρατηρήθηκαν μέσα σε μακροφάγα κοντά στο κέντρο των κοκκιωμάτων, κυρίως στο σπλήνα και το νεφρό. Επίσης, παρατηρήθηκαν φλεγμονώδη κύτταρα στον αιμοποιητικό και νεφρικό ιστό, πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων των βραγχίων, χαμηλός αιματοκρίτης και κενοτοπιώδη μακροφάγα που περιείχαν τα R.L.O. (Chern & Chao 1994). Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν διαπιστώθηκε ότι ήταν ορολογικώς και γενετικώς συναφείς με τον αρχικό μικροοργανισμό *P. salmonis*.

5.7. Συμπέρασμα

Παρά τις τεκμηριωμένες ομοιότητες των παθολογικών ευρημάτων σε καθεμία από τις περιπτώσεις μόλυνσεων από R.L.O. (ιστική νέκρωση, αλλοιώσεις των αγγείων, προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων και των μακροφάγων), υπάρχουν ορισμένες διαφορές (για παράδειγμα, υπερπλασία των βραγχίων παρατηρείται μόνο στο Χιλιανό *Coho-salmo*, ενώ και η θρόμβωση παρατηρείται μόνο περιστασιακά στις περιπτώσεις της Ιρλανδίας και της Νορβηγίας).

Αυτές οι διαφορές είναι που καταδεικνύουν την ύπαρξη παρόμοιων και όχι ταυτόσημων αιτιολογικών παραγόντων. Η ακριβής λοιπόν σχέση μεταξύ των διαφόρων παρατηρούμενων R.L.O. αναμένεται να διαλευκανθεί, ενώ προς το παρόν οι έρευνες που διεξάγονται με τη μέθοδο PCR ενισχύουν τη θεωρία της ύπαρξης τουλάχιστον 4 γενετικών μεταβλητών (Valdebenito & Jauriguiberry Veterquimica, pers. com. 1995).

6. Αντιβακτηριακά φάρμακα

In vitro δοκιμές έχουν δείξει ευαισθησία του παράγοντα στη στρεπτομυκίνη, γενταμυκίνη, τετρακυκλίνη (Fryer et al. 1990), χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη, κλαριθρομυκίνη και σαραφλοξακίνη (Cvitanich et al. 1991), καθώς και αντίσταση στην πενικιλίνη (Fryer et al. 1990), πενικιλίνη G και σπεκτινομυκίνη (Cvitanich et al. 1991). Στην πράξη, ποικίλα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί χρησιμοποιώντας αντιβιοτικά από το στόμα (Cassigoli 1994). Οι απώλειες από το μικροοργανισμό έχουν αυξηθεί προοδευτικά και προφανώς ως απόρροια της αντοχής στα αντιβιοτικά (Bustos et al. 1994, Cassigoli 1994). Ανάμεσα στα πρόσφατα χρησιμοποιημένα αντιβιοτικά, ανήκουν οι κινολόνες -που είναι και οι πιο δημοφιλείς-, το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη.

Παρόλο που η ανθεκτικότητα στις κινολόνες δεν μπορεί να μην συνυπολογιστεί, εντούτοις υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που ίσως επηρεάζουν την αναποτελεσματικότητα των θεραπειών. Οι *in vitro minimum* ανασταλτικές συγκεντρώσεις οξολινικού οξέος, οξυτετρακυκλίνης και φλοροκινολονών αυξήθηκαν κατά 40 - 60% μετά την έκθεση σε Mg, ενώ πιστεύεται, επίσης, πως η αδράνεια των αντιβιοτικών στο έντερο των σολομών που διατηρούνται σε θαλάσσιο περιβάλλον μπορεί να σχετίζεται με τις μεγάλες ποσότητες νερού που καταπίνουν (Barnes et al. 1995). Τέλος, το εύρος της απαιτούμενης φαρμακευτικής δόσης και της διάρκειας της αγωγής ποικίλλει σημαντικά.

Άλλες κινολόνες, όπως η ενροφλοξακίνη (*Bayer*) και η δανοφλοξακίνη (*Pfizer*) χορηγούνται ενδοπεριτοναϊκά. Με αυτήν την ενδοπεριτοναϊκή οδό χορήγησης τα αποτελέσματα ήταν πολύ ενθαρρυντικά, πιθανώς γιατί κάθε ψάρι λαμβάνει την κατάλληλη δόση (Cassigoli 1994). Οξυτετρακυκλίνη, σπιραμυκίνη και φλορφαινικόλη, έχουν επίσης, χρησιμοποιηθεί (Cassigoli 1994).

Στρατηγικές για την αποτροπή της κάθετης μετάδοσης του *P. salmonis* περιλαμβάνουν την ενδοπεριτοναϊκή έγχυση των αντιβιοτικών στους γεννήτορες 30 έως 60 d, καθώς και ανάμειξη του νερού με αντιβιοτικά κατά την ωρίμανση των αυγών μετά τη γονιμοποίηση (Bustos et al. 1994).

7. Εμβόλια

Το ανοσοποιητικό σύστημα των σαλμονιδών δεν εμφανίζει ισχυρή χημική αντίσταση κατά του μικροοργανισμού, γεγονός που εν μέρει δικαιολογεί τη λοιμογόνο ι-

κανότητα του στελέχους αυτού, αλλά και αποδεικνύει τις μικρές δυνατότητες για εφαρμογή αποτελεσματικών προληπτικών μέτρων. Ένα άλλο αξιοσημείωτο γνώρισμα του βακτηρίου είναι ότι εκδηλώνεται 4 έως 6 εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ψαριών στα θαλάσσια νερά, μπλοκάροντας έτσι τη μακροχρόνια και δαπανηρή περίοδο ανάπτυξης των γόνων. Είναι, λοιπόν, προφανές πως η έγκαιρη ανίχνευση του μικροοργανισμού θα ήταν καταλυτική για την εύρεση στρατηγικών προφύλαξης.

Είναι γενικά παραδεκτό ότι ένα εμβόλιο θα συνέβαλε σημαντικά στον έλεγχο της νόσου (Cassigoli 1994) και γι' αυτό πολλές ομάδες ερευνητών έχουν καταρτίσει προγράμματα που στοχεύουν στην ανάπτυξη ενεργητικής ανοσίας στη Χιλή και τον Καναδά. Μία αρχική δοκιμή εμβολίου (Smith et al. 1995) και ανοσοπροστατευτική αντίδραση έχει αναφερθεί σε εμβολιασμένα ψάρια (Fryer et al. 1990). Παρά το γεγονός ότι τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, η ερμηνεία τους πρέπει να γίνει με προσοχή και επιφύλαξη, καθώς η φυσική πρόκληση είναι χαμηλή, ενώ στις υπάρχουσες πειραματικές μολύνσεις συνυπήρχε και το *Renibacterium salmolinarum*, κάνοντας τα αποτελέσματα αμφισβητήσιμα. Άλλωστε, οι δοκιμές είναι πολύ περιορισμένες για να έχουμε βάσιμες αποδείξεις ότι τα προληπτικά αυτά μέτρα μπορούν να έχουν ισχύ και σε μεγαλύτερα είδη, εκεί δηλαδή που οι οικονομικές επιπτώσεις είναι και πιο σημαντικές (Smith et al. 1995).

Πολύ πρόσφατα πάντως, έχουν ανιχνευθεί αντιγόνα του *P. salmonis* που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή εμβολίου (Mauel et al, 2003).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Alday-Sanz V, Rodger H, Turnbull T, Adams A and Richards RH (1994) An immunohistochemical diagnostic test for rickettsial disease. *J. Fish Dis*, 17: 189-191.
- Almendras F and Fuentealba C (1997) Salmonid rickettsial septicaemia caused by *Piscirickettsia salmonis*: a review. *Dis. Aquat. Org.*, 29:137-144
- Almendras F, Fuentealba C, Markham F and Speare D (2000) Pathogenesis of liver lesions caused by experimental infection with *Piscirickettsia salmonis* in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12 (6):552-7.
- Athanassopoulou F, Sabatakou O, Groman D and Prapas A (1999) First incidence of *Rickettsia*-like infections in cultured sea bass (*D. labrax*). Proceedings of 9th International Conference of the European Association of Fish Pathologists, Rhodes, 19-24 Sept 1999.
- Athanassopoulou F, Groman D, Prapas Th and Sabatakou O (2003). Pathological and epidemiological observations on Rickettsiosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) from Greece. *J. Appl. Ichthyol.* In Press.
- Bottger E (1989) Rapid determination of bacterial ribosomal RNA. Sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett* 65: 171-176.
- Branson EJ and Nieto D (1991) Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum) in South America. *J. Fish Dis* 14: 147-156.
- Bravo S and Campos M (1989). Coho salmon syndrome in Chile. *FHS/AFS News* 17: 3.
- Brocklebank JR, Speare DJ, Armstrong RD and Evelyn T (1992) Septicemia suspected to be caused by a *rickettsia*-like agent in farmed Atlantic salmon. *Can. Vet. J* 33: 407-418.
- Bustos P, Entrala P, Montana J and Calbuyahue J (1994) Septicemia rickettsial salmonidea (SRS): estudio de transmision vertical en salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*). In: Fundacion Chile (ed) Proceedings Primer Seminario Internacional: patologia y nutricion en el desarrollo de la acuicultura, 33-40.
- Caggero A, Castro H and Sandino AM (1995) First isolation of *Piscirickettsia salmonis* from coho salmon and rainbow trout during freshwater stage of their life cycle. *J. Fish Dis* 18:277-289.
- Cassigoli J (1994) Septicemia rickettsial del salmon. In: Fundacion Chile (ed). Proceedings Primer Seminario Internacional: Patologia y nutricion en el desarrollo de la acuicultura: factores de exito October 3-7. Puerto Montt. P : 17-20.
- Chern RS and Chao CB (1994) Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapia in Taiwan. *Fish Pathol* 29: 61-71.
- Comps M, Raymond JC and Plassiart GN (1996) *Rickettsia*-like organism infecting juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol* 16: 30-33.
- Cubillos V, Farias C, Alberdi A, Alvarado V, Scaffer J.W and Enriquez R (1990) Caracteristicas anatomopatologicas del

- síndrome del salmón coho, una nueva enfermedad de los salmónidos. *Patol. Anim* 4: 14-17.
- Cvitanich JD, Garate O and Smith CE (1990). Etiological agent in a Chilean coho salmon disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *FHS/AFS Newsl* 18: 1-2.
- Cvitanich J.D, Garate O and Smith C.E (1991) The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulates. *J. Fish Dis* 14: 121-145.
- Davies A.J (1986) A rickettsia-like organism from dragonets, *Callionymus lyra* L. in Wales. *Bull. Eur. Assoc. Fish Path* 6: 103.
- Eliades P, Karagouni E, Stergiatou I and Miras K (1998) A simple method for the serodiagnosis of human hydatid disease based on a protein A/ colloidal dye conjugate. *J. Immunol. Meth* 218:123-132.
- Enriquez R (1995) Actual situation of the disease produced by *Piscirickettsia salmonis* in Chile. *Dis. Fish Schellfish*: 22.
- Evelyn TPT (1992) Salmonid Rickettsia Septicemia. In : Kent M.L (ed) . Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific northwest. *Ca. Spec. Pub. Fish Aquat. Sci* 116: 18-19.
- Fryer JL, Lannan CN, Garces LH, Larenas JJ and Smith PA (1990) Isolation of Rickettsiales-like organism from diseased coho salmon *Onchorynchus kisutch* (Walbaum) in Chile. *Fish Pathol* 25: 107-114.
- Fryer JL, Lannan CN, Giovannotti SJ and Wood ND (1992) *Piscirickettsia salmonis* gen. nov, sp.nov, the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. Syst. Bacteriol* 42: 120-126.
- Fryer JL and Lannan CN (1994) Rickettsial and chlamydial infections of freshwater and marine fishes, bivalves and crustaceans. *Zool. Stud* 33: 95-107.
- Garces LH, Larenas JJ, Smith PA, Sandino S, Lannan CN and Fryer JL (1991). Infectivity of a rickettsia isolated from coho salmon . *Dis. Aquat. Org* 11: 93-97.
- Havarstein LS, Assjord PM, Ness S and Endresen C (1988) Purification and partial characterization of an IgM-like serum immunoglobulin from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Comp. Immunol* 12: 773-785.
- Khoo L, Dennis PM and Lewbart GA (1995) Rickettsia-like organisms in the blue-eyed plecostomus *Panaque suttoni* . *J. Fish Dis* 18: 157-164.
- Lannan, CN, Winton, JR and Fryer JL (1984). Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* 20: 671-676.
- Lannan CN Ewing SA and Fryer JL (1991). A fluorescent antibody test for detection of the rickettsia causing disease in Chilean salmonids. *J. Aquat. Anim. Health* 3: 229-234.
- Mauel MJ, Giovannoni SJ and Fryer JL (1996). Development of polymerase chain reaction assays for detection, identification and differentiation of *Piscirickettsia salmonis*. *Dis. Aquat. Org.* 26: 189-195.
- Mauel M., Miller D., Frazier K., Ligget A.D., Styer L, Montgomery-Brock D., Brock J., 2003. Characterization of piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. *Dis. Aquat. Org.*, 53: 249-270
- Mohamed, Z (1939). The discovery of a rickettsia in a fish. Ministry Agriculture Cairo, Technical Science Service, Veterinary Section Bulletin 214: 1-6.
- Olsen AB, Melby HP, Speilbeg L, Evensen O and Hastein T (1997). Piscirickettsia salmonis infection in Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway—epidemiological, pathological and microbiological findings. *Dis. Aquat. Org.* 31: 35-48.
- Ozel M, and Schwanz-Pfützner, I (1975). Vergleichende elektro-nmikroskopische Untersuchungen an Rhabdoviren pflanzlicher und tierischer Herkunft: III. Egtved –Virus (VHS) der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und Rickettsienähnliche Organismen. *Zentralblatt fuerr Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, I Abt. Originale A* 230: 1-14.
- Rodger HD, & Drinan EM (1993). Observation of a Rickettsia-like organism in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. in Ireland. *J. Fish Dis.* 16: 361-369.
- Romestand B, Breuil G, Bourmaud AF, Coeurdacier JL and Bouix G (1995). Development and characterization of monoclonal antibodies against sea bass immunoglobulins *Dicentrarchus labrax* L. *Fish & Shellfish Immunology* 5: 347-357.
- Sanchez C, Lopez-Fierro P, Zapata A, & Dominguez J (1993). Characterization of monoclonal antibodies against heavy and light chains of trout immunoglobulin. *Fish & Shellfish Immunology* 3: 237-251.
- Scapigliati G, Romano N, Picchiatti M, Mastrolia L, Scalia D & Abelli L (1996). Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* L. immunoglobulins: immunolocalization of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunoassays. *Fish & Shellfish Immunology* 383-401.
- Smith PA, Lannan CN, Garces LH, Jarpa M, Larenas J, Casswell-Reno P, Whipple M and Fryer JL (1995). Piscirickettsiosis: a bacterin field trial in coho salmon *Onchorynchus kisutch* (Walbaum). *Bull. Eur. Assoc. Fish Path.* 15: 137-141.
- Steiropoulos N., Yuksel Sema A., Thompson K., Adams S., Ferguson H., 2002. Detection of Rickettsia-like organisms (RLOs) in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) by immuno-histochemistry. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22(5): 338-342.
- Stolen JS., Anderson DP., Roberston BS. and Van Muiswinkel WB (eds) (1990). *Techniques in Fish Immunology*, JS. Stolen, TC. Fletcher, DP., Anderson, SOS Publ., Fair Haven, N.J.
- Ternynck Th. and Avrameas S (1988). *Techniques Immunoenzymatiques*. Translation : (1990). Λυμπέρη Π., Έξδοση Ε.Ι.Π.
- Walker DH (ed.) (1988). *Biology of rickettsial diseases*, vol I and II. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Weiss E and Moulder JW (1984). Order Rickettsiales Gieszkie-wicz 1939, 25AL. In: Krieg NL (ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol 1. Williams and Wilkins, Baltimore/London, P. 687-729.
- Wolf K and Quimby MC (1962). Established eurythermicline of fish cells *in vitro*. *Science* 135: 1065-1066.