

PISCIBACTER

IMPACTUL LEZIONAL SI EPIDEMIOLOGIC AL MALADIILOR INFECȚIOASE LA PEȘTII DULCICOLI

Parteneri

**Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Iași – Director Prof.
dr. Vasile Vulpe**

Universitatea Al. I. Cuza Iași

Institutul de Sănătate Publică filiala Iași

Valoare contract 1.550. 000 lei

Durata 01.10.2008 – 30.09.2011

RAPORT ȘTIINTIFIC ȘI TEHNIC

PISCIBACTER

Etapa I

CUPRINS

1. OBIECTIVE GENERALE
2. OBIECTIVELE ETAPEI DE EXECUȚIE
3. REZUMATUL ETAPEI
4. DESCRIEREA ȘTIINTIFICĂ ȘI TEHNICĂ
5. CONCLUZII
6. BIBLIOGRAFIE

1. OBIECTIVE GENERALE

Obiectivele generale ale proiectului constau în investigarea agenților infecțioși ce determină stări patologice și evaluarea impactului leziunilor asupra sănătății peștelui și sănătății consumatorului.

2. OBIECTIVELE ETAPEI DE EXECUȚIE

Obiectivele etapei de execuție sunt reprezentate de evaluarea fizico-chimică a mediului acvatic și evaluarea clinică și microbiologică a efectivelor piscicole.

Activitățile de cercetare sunt reprezentate de:

Examinarea fizico-chimică și clinică a efectivelor piscicole

Investigații microbiologice asupra efectivelor piscicole la sfârșitul ciclului de creștere și începutul perioadei de iernare

Investigații microbiologice asupra efectivelor piscicole la sfârșitul perioadei de iernare

3. REZUMATUL ETAPEI

Studiile din aceasta perioada au constat in activitati de documentare privind flora microbiena ce poate afecta starea de sanatate a efectivelor de crap si in evaluarea tehnicilor specifice microbiologice si electronomicroscopice ce trebuie aplicate in etapele urmatoare.

Coordonatorul de proiect s-a ocupat de evaluarea clinica a efectivului de peste luat in studiu si de asemenea de efectuarea unor investigatii microbiologice asupra materialului biologic respectiv.

Patenerul 1 reprezentat de Universitatea Cuza Iasi a realizat analiza fizico-chimica a efectivului piscicol, precum si activitatile de documentare privind aplicarea tehnicilor de microscopie electronica.

Partenerul ISP Iasi a realizat activitati de documentare a calitatii microbiologice a apei piscicole evaluand starea acestei la inceputul perioadei de iernare si la sfarsitul acesteia.

Cercetările desfășurate în prezenta fază au presupus evaluarea fizico-chimică a apei din bazinele de creștere și parcare pe durata prezentului sezon rece a ciprinidelor în policultură, precum și stabilirea stării fiziologice a peștilor în momentul pescuitului de recoltă.

Observațiile asupra loturilor experimentale au început în luna septembrie 2008, într-un bazin piscicol, B5 cu o suprafață de 18.030 mp și un volum de apă de 29.747 mc.

Popularea bazinului a fost făcută în primăvara anului 2008 cu un amestec de specii în policultură (crap 70%, sânger 8%, novac 12%, alte specii 10%). Parametrii fizico-chimici ai apei luați în studiu în perioada septembrie 2008-februarie 2009 au fost: temperatura apei, oxigenul dizolvat, pH-ul, conductivitatea, ionul de calciu, amoniu dissociat și substanța organică.

Durata observațiilor în intervalul septembrie 2008-februarie 2009 a totalizat un număr de 65 seturi de determinări fizico-chimice într-un interval de 173 zile.

Probele de apă destinate studiului, din bazinele supuse monitorizării, au fost recoltate în luna octombrie. Scopul studiului a fost acela de a determina încărcarea bacteriologică a acestor ape, prin evidențierea următorilor indicatori: număr probabil de coliformi totali, streptococi fecali, *Pseudomonas aeruginosa*, numărul total de bacterii cu dezvoltare la 37 °C, precum și al celor cu dezvoltare la 22 °C.

Pentru realizarea acestui obiectiv, probele de apă au fost recoltate în mod steril, în flacoane de 500 ml, sterilizate anterior. Probele au fost menținute la 4 °C și analizate în maxim 24 ore. Ulterior, acestea au fost diluate până la diluția de 10⁻⁵ și însămânțate, pe medii de cultură solide sau lichide, după caz, în funcție de indicatorul urmărit. Toți indicatorii urmăriți au fost analizați conform STAS – ului 3001/91.

4. DESCRIEREA STIINTIFICA SI TEHNICA

Evaluarea fizico-chimică, clinică și paraclinică a efectivelor piscicole

Cercetările desfășurate în prezenta fază au presupus evaluarea fizico-chimică a apei din bazinele de creștere și parcare pe durata prezentului sezon rece a ciprinidelor în policultură, precum și stabilirea stării fiziologice a peștilor în momentul pescuitului de recoltă.

Orice activitate de acvacultură presupune asigurarea cantitativă și calitativă a apei necesară alimentării bazinelor piscicole. Aceste caracteristici ale apei, atât în din crescătoriile ciprinicole, cât și pentru oricare altă activitate de acvacultură, constituie un factor limitativ fundamental. Mai mult, neasigurarea calității apei provoacă apariția stării de stres urmate de apariția unor maladii bacteriene și ectoparazitare parazitare care pot cuprinde cea mai mare parte a efectivului de pești dintr-o populație.

Prevenția, asigurată prin respectarea cu strictețe a normelor tehnologice (pregătirea corespunzătoare a bazinelor piscicole anterior populărilor de primăvară prin dezinfectarea fundului acestora cu var nestins și clorură de var, asigurarea schimbului hidric sau a asigurării concentrației normale de oxigen în funcție de încărcarea cu biomasă piscicolă), precum și aplicarea tratamentelor curative în timpul sezonului cald (pentru reducerea biomasei algale consumatoare de oxigen sau pentru combaterea paraziților, introducerea în furaje a antibioticelor pentru combaterea unor maladii de tipul bacteriozelor sau tulburărilor de metabolism) pot determina o stare fiziologică optimă a peștilor.

Cercetările desfășurate în cadrul prezentei faze s-au realizat la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Acvacultură și Ecologie Acvatică Iași, aparținând Universității „Al.I.Cuza” din Iași și au vizat trei aspecte:

- calitatea fizico-chimică a apei din bazinele experimentale;
- determinarea stării de sănătate a peștilor, prin examinarea clinică a întregului efectiv, în momentul pescuitului de recoltă din luna octombrie 2008. Cu acest prilej, întregul efectiv piscicol a fost controlat pe masa de sortare, ocazie cu care s-au separat exemplare cu semne evidente de boală. Aceste exemplare au fost folosite ulterior la determinarea stării fiziologice comparative ;
- determinarea profilului metabolic sanguin la exemplare afectate de eritrodermatită, comparativ cu cele sănătoase, parcate pe timpul sezonului rece (octombrie 2008 – februarie 2009).

Observațiile asupra loturilor experimentale au început în luna septembrie 2008, într-un bazin piscicol, B5 cu o suprafață de 18.030 mp și un volum de apă de 29.747 mc.

Popularea bazinului a fost făcută în primăvara anului 2008 cu un amestec de specii în policultură (crap 70%, sânger 8%, novac 12%, alte specii (somm, șalău, știucă) 4%, caras 6%), cu scopul obținerii unei producții finale de 2000 kg pește/ha (foto 1).



Foto 1: Material experimental în momentul pescuitului de recoltă

Popularea bazinului B5 s-a făcut cu pești care au provenit dintr-un experiment anterior, asupra cărora au fost aplicate tratamente preventive, astfel încât, la pescuitul de recoltă nu s-a semnalat un număr mare de exemplare cu semne de boală.

Pe durata sezonului de creștere activă s-a administrat furaj concentrat granulat, cu 27% proteină brută, produs de SC NUTRIMOLD Iași.

Parametrii fizico-chimici ai apei luați în studiu în perioada septembrie 2008-februarie 2009 au fost: temperatura apei, oxigenul dizolvat, pH-ul, conductivitatea, ionul de calciu, amoniu disociaț și substanța organică.

Durata observațiilor în intervalul septembrie 2008-februarie 2009 a totalizat un număr de 65 seturi de determinări fizico-chimice într-un interval de 173 zile. În tabelul 1 sunt redată valorile medii lunare pentru fiecare parametru în parte.

Tabelul 1: Situația parametrilor fizico-chimici în perioada septembrie 2008 – februarie 2009

Nr. crt.	Luna	Parametri fizico-chimici (valori medii)						
		Temp. (°C)	Oxigen dizolvat (mg/l)	pH-ul	Conduc. $\mu\text{S/cm}$	Subst. org. (mg/l KmnO_4)	Amoniu (mg/l)	Ca (mg/l)
1.	Sept. 2008	12,6	7,72	7,9	1021	32,66	0,05	44,56
2.	Oct. 2008	11,03	7,94	8,1	993	37,48	0,035	42,90
3.	Noi. 2008	9,1	8,33	7,9	1011	36,79	0,042	35,42
4.	Dec. 2008	7,1	8,61	7,8	1029	30,77	0,049	39,78
5.	Ian. 2009	2,8	10,03	7,8	1045	28,21	0,038	40,54
6.	Feb. 2009	4,3	10,45	7,7	1007	29,90	0,023	40.17

Temperatura apei, parametrul care condiționează solubilitatea oxigenului în apă și toate ritmurile și mecanismele fiziologice ale peștilor a înregistrat valori medii normale pentru intervalele septembrie-noiembrie 2008 și ianuarie-februarie 2009, cu valori ușor mai crescute în prima jumătate a lunii decembrie.

Oxigenul prezintă valori medii specifice sezonului rece, cu o creștere a concentrației de la 7,72mg/l în luna septembrie, la 10,45 mg/l în luna februarie a.c. Ținând cont de exigența ciprinidelor de cultură față de acest parametru (minim 3 mg/l), se poate aprecia că valorile maxime ale concentrației oxigenului pentru sezonul rece al anului au asigurat supraviețuirea 100% a întregului efectiv de pește (1692 Kg) parcat în condiții de densitate ridicată pe timpul sezonului rece.

Valorile celorlalți parametri sunt în limite normale, cu o excepție înregistrată în cazul concentrației de amoniu care, în luna septembrie 2008 prezintă valoare mai crescută (0,05 mg/l), dar fără efecte asupra peștilor, ca urmare a acumulării cataboliților la fundul bazinelor.

Referindu-ne la **starea de sănătate a materialului experimental**, aceasta s-a realizat prin determinări comparative ale unor *parametri care definesc profilul metabolic sanguin* (tab.2) pe 10 exemplare de pești din fiecare specie.

Tabelul 2: Analiza comparativă a stării de sănătate la ciprinidele de vara a doua la pescuitul de recoltă (pește sănătos/pește bolnav)

Parametrul cercetat	Crap	Sânger
Greutate medie g/ex	370 / 335	570 / 515
Eritrocite (x1000/mm ³)	1.397 / 1.084	1890 / 1580
Hemoglobină (g/100 ml)	10,34 / 9,31	9,28 / 6,40
Hematocrit (%)	55 / 66,17	38 / 55
Glicemia (mg%)	116 / 57,90	68,7 / 70,4

O analiză asupra rezultatelor obținute confirmă faptul că, deși aparent peștii prezintă o stare de sănătate normală, valorile parametrilor studiați reflectă starea de stres dată de instalarea bolii. Astfel, la **crapul** cu eritrodermatită, manifestată pe tot parcursul sezonului de creștere, media valorilor glicemiei și a numărului de eritrocite suferă o descreștere cu 50,1%, respectiv 22,4% comparativ cu crapul sănătos. Această stare este determinată în mare parte de insuficiența ingerare de hrană administrată. În cazul hematocritului, valorile cresc la peștii afectați de boală (+ 20,3%), ceea ce confirmă faptul că boala are efect stresant asupra individului, încetinindu-le creșterea, în medie cu 35g/ex.

O situație similară este întâlnită și în cazul **sângerului**, specie mai vulnerabilă la îmbolnăviri. Valorile tabloului hematologic se modifică comparativ cu al peștelui sănătos, deoarece se înregistrează în medie o scădere de $310 \times 1000/\text{mmc}$ a numărului de eritrocite și cu 31,03% a valorilor hemoglobinei, dar și o creștere cu 102,47% a valorii glucozei. Spre deosebire de crap care efectuează deplasări de-a lungul bazinului în căutarea hranei la mesele de furajare, sângerul își găsește permanent hrana în masa apei, filtrând-o și apoi ingerând-o.

Exemplarele afectate de boală au înregistrat o întârziere a creșterii, valoarea medie a greutateii, și în acest caz, fiind diminuată cu 9,6%. Atât la peștii sănătoși, cât la exemplarele cu semne de eritrodermatită s-au făcut și disecții, pentru conturarea unui tablou complet al cercetărilor.

Examinarea peștilor

Examinarea peștilor impune mai întâi o etapă de teren, în care specialistul ihtiopatolog trebuie să se deplaseze la ferma sau bazinul piscicol afectat.

Se realizează o anchetă clinică în care se apreciază:

- datele hidrotehnice ale bazinului: volum și suprafață, amplasare (posibilități de deversare a unor substanțe toxice), sursa de alimentare cu apă.

- analize fizico-chimice ale apei;
- date epizootologice: locul și data apariției bolii, vârsta și speciile de pești afectate, simptomele și evoluția bolii.

Examinarea directă a peștilor

Prin inspecție s-a apreciat comportamentul peștilor care ofwea informații despre gravitatea bolii. Astfel, s-au examinat mișcările de înot: înot cu gura deschisă, înot pe partea laterală a corpului, sărituri din apă . S-a mai apreciat prezenta exemplarelor muribunde sau moarte langa maluri.

In cazul când sunt afectate toate speciile și vârstele, iar peștii înoată agitați la suprafața apei (cu prezența unei mari mortalități), se poate deduce că factorii patogeni sunt diferiți agenți fizico-chimici (scăderea oxigenului dizolvat, pH anormal al apei, existența unor substanțe toxice). Atunci când este afectată o singură specie sau chiar o vârstă, cu apariția și creșterea treptată mortalității, se poate conchide că este vorba de o boală specifică (infecțioasă, parazitară).

Prin pescuiri repetate, se pot estima semnele clinice ale bolii și formele de evoluție, precum și morbiditatea.

După capturarea peștilor s-au efectuat măsurători biometrice, cum ar fi lungimea totală a corpului, înălțimea și grosimea.

La inspecție s-a apreciat forma și dimensiunile corporale, tonusul și vigoarea mișcărilor, aspectul suprafeței corporale, al înotătoarelor, solzilor, branhiilor și ochilor. Se vor mai aprecia prezența plăgilor, paraziților macroscopici, a petelor pigmentate, tumori, edeme.

S-a efectuat inspecția internă a gurii și cavității branhiale urmarindu-se neoformațiile, infestațiile cu ciuperci sau prezența paraziților.

Branhiile s-au inspectat în ansamblu, urmărindu-se coloritul, integritatea și prezența paraziților.

Necropsia peștilor

S-a așezat peștele în decubit lateral drept și cu o foarfecă anatomică sau bisturiu, s-a realizat o secțiune pe lungimea abdomenului, pornind de la cap (dintre înotătoarele pectorale) până la anus. Din acest punct, secțiunea a continuat spre coloana vertebrală și mai apoi paralel cu aceasta până la cap. S-a conturat astfel un capac abdominal care s-a ridicat cu o pensă, descoperindu-se masa viscerală.

S-a efectuat inspecția de ansamblu a organelor interne, notându-se forma și volumul, poziția și coloritul lor, prezența de paraziți liberi sau închistați pe organe sau pe pereții cavității abdominale.

S-a examinat fiecare organ în parte, înregistrându-se dimensiunile, consistența, coloritul, vascularizația, neformațiile precum și aderențele cu alte organe. Vezicile înotătoare și biliare s-au secționat, iar conținutul s-a examinat microscopic.

Intestinul s-a secționat pe toată lungimea lui. Macroscopic, s-a examinat conținutul intestinal (identificarea leziunilor intestinale și a nematodelor, cestodelor), după care s-au raclat diferite porțiuni din mucoasă, pentru examinarea microscopică.

Rinichiul și ficatul s-au examinat microscopic prin efectuarea preparatelor tip squash (prin strivire între lamă și lamelă). De asemenea s-au recoltat porțiuni din organe ce se colectează în vase numerotate, în vederea efectuării examenului histopatologic.

În funcție de manifestarea stărilor de boală, pentru diagnosticul de laborator s-au colectat pești vii sau numai cadavre proaspete.

Observațiile efectuate în mod continuu (atât la pescuirile de control din timpul sezonului de creștere a peștelui, cât și la pescuitul de recoltă desfășurat în luna noiembrie 2008) asupra acestei populații piscicole au evidențiat existența unui

număr redus de exemplare de crap și sânger cu semne distincte de eritodermatită (foto 2 și 3).



Foto 2 – 3: Exemplare de sânger cu eritodermatită

Lipsa unor îmbolnăviri grave, precum și a atacului ectoparaziților (mai ales *Argulus* și *Cyzicus*) a fost determinată de asigurarea continuă cu furaje de bună calitate, precum și de primenirea apei din bazin, ori de câte ori se înregistra o scădere a concentrației de oxigen sub 4 mg/l.

Examenul bacteriologic efectuat în cazul exemplarelor cu eritrodermatita au pus în evidență prezenta genului *Aeromonas*.

Identificarea tulpinilor de *Aeromonas spp.* s-a realizat pe baza condițiilor necesare dezvoltării culturilor și a caracterelor culturale, morfologice și biochimice distinctive pentru gen, specii și subspecii. Tulpinile s-au dezvoltat în egală măsură pe mediile uzuale aerobe și anaerobe, pe agar-sânge și pe mediul eritrit-agar, în 24 ore la temperatura camerei (20-25°C) cât și la termostat (37°C).

Pe mediile uzuale, culturile de *Aeromonas spp.* au arătat astfel: pe geloză au format colonii de tip "S" rotunde cu diametrul de 2-3 mm, margini regulate, opace, nepigmentate; pe bulion - au prezentat turbiditate omogenă, uneori inel la suprafață și depozit ușor omogenizabil în culturile vechi.

Partenerul Univ. Cuza Iasi a efectuat și activități de documentare pentru pregătirea probelor pentru electronmicroscopie.

Microscopia electronica cu transmisie

Microscopia electronică cu transmisie (TEM) implică utilizarea unui fascicul de electroni la tensiune înaltă emisă de un catod, de regulă filament de tungsten, și focalizată de lentile electrostatice și electromagnetice. Fasciculul de electroni care a fost transmis printr-un specimen parțial transparent pentru electroni transportă informație despre structura internă a specimenului în raza care ajunge la sistemul de formare a imaginii. Variația spațială a acestei informații ("imaginea") este apoi

mărită de o serie de lentile electromagnetice până când este înregistrată la coliziunea cu un ecran fluorescent sau placă fotografică.

Reactivi utilizati:

a. Solutii tampon

1. Tampon Cacodilat Solutie 0,4M stoc (500 ml)

-42.8 g of cacodylic acid-sodium salts +apa bidistilata pana la 500 ml

0.1M Cacodylate Buffer Solutie de lucru

-120 ml of 0,4M cacodilat soluție stoc + 360 ml apa bidistilata pentru a se obtine 480 ml solutie de lucru 0,1 M

- pH se ajustează la 7,2-7,4 prin adăugare de HCL sau NaOH

2,5% Glutaraldehyda in 0.1M tampon cacodilat

- 10 ml of 50% glutaraldehyda + 50 ml of 0.4 M tampon cacodilat soluție stoc

Se aduce volumul la 200 ml cu apa bidistilata.

-pH se ajustează la 7.2-7.4 prin adăugare de HCL sau NaOH

2% tetraoxid de osmiu in tampon cacodilat

- se sparge o fiola de 1g tetraoxid de osmiu (curatata cu sulfocrom si spalata cu apa bidistilata) in 50 ml solutie tampon cacodilat. Se pastreaza intr-o sticla bruna bine inchisa si ferita de lumina, la 4 °C.

2. tampon fosfat (PBS) 0,1 M;

Se prepara mai intai o solutie stoc de 0,2 M tampon fosfat astfel:

- 28,4 g de fosfat de sodiu dibazic se dizolva intr-un litru de apa bidistilata;
- 27,6 g de fosfat de sodiu monobazic se dizolva intr-un litru de apa bidistilata.
- Se amesteca 170 ml solutie fosfat dibazic cu 800 ml solutie de fosfat monobazic; se ajusteaza pH-ul la 7,4.

Pentru a obtine PBS 0,1 M se dilueaza solutia stoc cu apa bidistilata in proportie de 1:1. Se prepara solutiile de glutaraldehida si tetraoxid de osmiu in acelasi mod, utilizand PBS in loc de tampon cacodilat.

b. Solutiile de alcool etilic – se dilueaza corespunzator obtinand concentratiile necesare (35%, 50%, 70%, 90%, 95%,). Alcoolul etilic absolut se recomanda sa aiba o puritate cat mai mare – 99,98%, resturile de apa impiedicand o buna infiltrare a probelor cu rasinile epoxidice.

c. Mediul de includere – rasini sintetice – Epon 812

Amestecul A

Epon 812	62 ml
DDSA (hardener)	100 ml

Amestecul B

Epon 812	100 ml
NMA (hardener)	89 ml

Se combina amestecul A cu amestecul B in proportiile variabile. Se adauga accelerator DMP – 30 in proportie de 1.5-2%.

	ml	ml	ml	ml	ml
Mixture A	10	7	5	3	0
Mixture B	0	3	5	7	10
DMP-30	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Etapale prepararii probelor

- *Prelevarea* probelor se realizeaza de pe exemplare vii, sectionarea tesuturilor realizandu-se direct intr-o picatura de fixator (glutaraldehida). Tesuturile se sectioneaza in blocuri mici de 1 mm³.
- *Fixarea* - datorita rezolutiei înalte oferite de microscopul electronic, este necesara în acest caz, o fixare mai buna pentru a pastra cu finete detaliile ultrastructurale. Pentru acest lucru, o procedura de dubla fixare a devenit procedura standard pentru studiile structurale de finete: prin folosirea unei solutii de glutaraldehida, urmata de cea de a doua fixare cu tetraoxid de osmiu. În timp ce glutaraldehida realizeaza cross-link-ul proteinelor, scopul tetraoxidului de osmiu este de a fixa si colora lipidele si proteinele. Prima etapa a fixarii se realizeaza în glutaraldehydă 2,5% (2 ore). Probele se spala cu tampon fosfat și apoi se realizeaza postfixarea cu tetraoxid de osmiu 2% (2 ore). Tetraoxidul de osmiu leagă și stabilizează bistratul lipidic și proteinele,având rol și în deflexia electronilor și formarea imaginii
- *Deshidratarea* se face în băi succesive de alcool etilic (35%, 50%, 70%, 90%, 95%, câte 15 minute și alcool absolut – de trei ori, câte 20 minute), urmată de trei băi de propilenoxid.
- *Impregnarea* se realizeaza in rășină sintetică de tip Epon 812 (2 zile). Eponul este o rășină epoxi-alifatică pe bază de glicerol obținută prin condensarea epichlorhidrinei cu glicerolul. El are o vâscozitate redusă și este aproape incolor. Eponul pătrunde repede în țesuturi, se secționează ușor, duritatea blocului poate fi modificată după dorință, țesuturile au un contrast ridicat și sunt prezervate foarte bine iar secțiunile sunt foarte rezistente la fasciculul de electroni .Mai intai probele se tin 2-3 ore intr-un amestec de propilen-oxid si rasina Epon (amestec final) (1:1) pentru 2-3 ore, apoi se lasa in rasina pura amestec final peste noapte (12 ore minim).

- *Includerea* se face in capsule BEM de polietilena.
- *Polimerizarea* blocurilor se realizeaza în termostat la 60⁰C timp de doua zile.
- *Secționarea* se face la ultramicrotom, folosind cuțite de sticlă. Secțiunile semifine se preiau pe lame de sticlă, sunt colorate cu albastru de toluidină și analizate la microscopul fonic, iar cele fine se depun pe grile de 400 Mesh (sau de 200 daca acestea sunt acoperite cu o pelicula de formwar consolidata cu carbon).
- Contrastarea se face cu citrat de plumb și acetat de uranil și analizate la microscopul electronic cu transmisie. După cele mai relevante aspecte se realizeaza fotografii.

Includerea probelor se poate realiza clasic, manual, in recipiente de perfect curate sau cu ajutorul microprocesorului automat de tesuturi pentru microscopia electronica Leica AMW. Tehnologia cu microunde



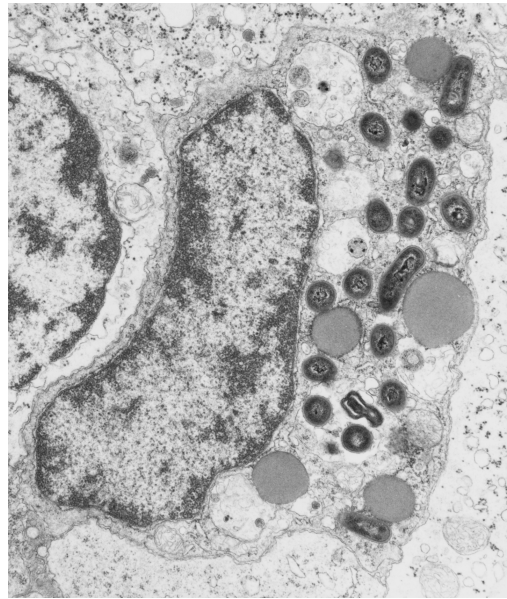
sticla

EM

asigura o impregnare uniforma a probelor atat cu fixatorii cat si cu agentii de deshidratare si de impregnare. Aparatul este dotat cu senzori de control a temperaturii, se programeaza electronic pentru toate etapele procesarii (fixare, deshidratare, includere, polimerizare) ceea ce duce la posibilitatea repetarii experimentelor in aceleasi conditii cu rezultate reproductibile.

Utilizarea microscopiei electronice cu transmisie TEM in investigarea bacteriozelor la pesti

Analiza ultrastructurala a diverselor tesuturi la pestii cu infectii bacteriene aduce un plus de informatii privind interactiunea patogenului cu gazda, a formelor de raspuns a tesuturilor si a localizarii celulare a acestuia.



Investigatiile ultrastructurale au evidentiat faptul ca *Renibacterium salmoninarum* poate supravietui si se multiplica in celulele macrofage la salmonide. Supravietuirea persista 4-5 zile dupa moartea pestelui. Acest fapt se datoreaza rezisteneti crescute a bacteriei si nu reducerii capacitatii de aparare a macrofagelor (Bandin et al., 1993). Bacteriile sunt localizate in fagozomi dar se pot observa si libere in citoplasma. poate

Microscopia electronica cu baleiaj

Spre deosebire de TEM, unde raza de electroni la tensiune înaltă formează imaginea specimenului, microscopul electronic cu scanare (SEM) produce imagini prin detecția electronilor secundari, cu energie scăzută, emisii de pe suprafața specimenului datorită excitării acestuia de către raza principală de electroni. In cazul SEM, raza de electroni parcurge întreg specimenul, detectorii construind o imagine prin maparea semnalelor detectate la poziția razei.

În general, rezoluția TEM este de regulă cu un ordin de mărime mai mare decât cea a SEM, dar, datorită faptului ca imaginea produsă de microscopul cu scanare se bazează pe procese de suprafață și nu pe transmisie, este capabil să vizualizeze probe mai mari, și are o adâncime de penetrare mult mai mare, producând astfel imagini care sunt o bună reprezentare tridimensională a probei.

Pregătirea probelor pentru SEM

- Recoltarea probelor – probele pot fi de dimensiuni mai mari decât la TEM (pot avea până la 1 cm^2).

- Fixarea și deshidratarea este asemănătoare cu cea realizată la pregătirea probelor pentru TEM. Fixarea materialului se prelungește în glutaraldehidă (sau în amestec de glutaraldehidă și paraformaldehidă) până la 72 de ore în cazul probelor de piele pentru a îndepărta mucusul de la suprafața acestuia). După deshidratarea în alcool etilic absolut probele se trec în două bazine de acetona anhidră.

- Uscarea la punctul critic al dioxidului de carbon – este necesară pentru prezervarea detaliilor structurale ale probei analizate. Uscarea la aer poate cauza deformări accentuate ale suprafețelor

materialelor biologice cauzate, în principal, de tensiunea superficială a apei. Utilizând uscarea la punctul critic al dioxidului de carbon această



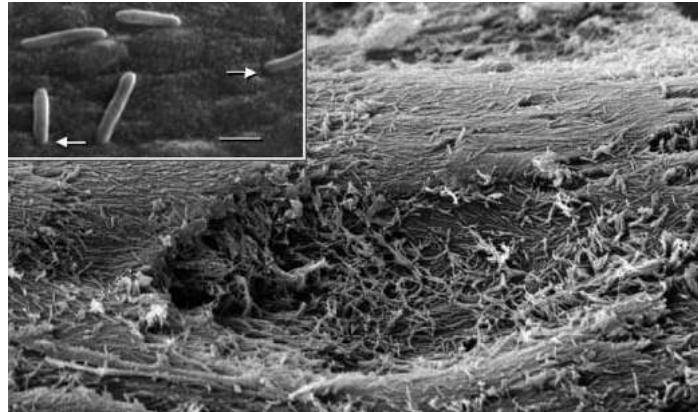
la

tensiune superficială este redusă aproape la 0. În momentul atingerii punctului critic ($31,1^{\circ}\text{C}$ la o presiune de 1250 psi) CO_2 lichid trece direct în fază gazoasă, iar eliminarea acestuia din probe, odată cu scăderea presiunii se realizează cu păstrarea intactă a structurilor existente.

- Metalizarea probelor uscate este necesară pentru observarea acestora în camera de vid a SEM. Metalizarea se realizează fie cu aur fie cu aur-paladiu. Stratul de metal depus are grosimea de 30-60 angstromi (funcție de detaliile ce se doresc a fi observate).

Utilizarea microscopiei electronice cu baleiaj SEM in investigarea bacteriozelor la pesti

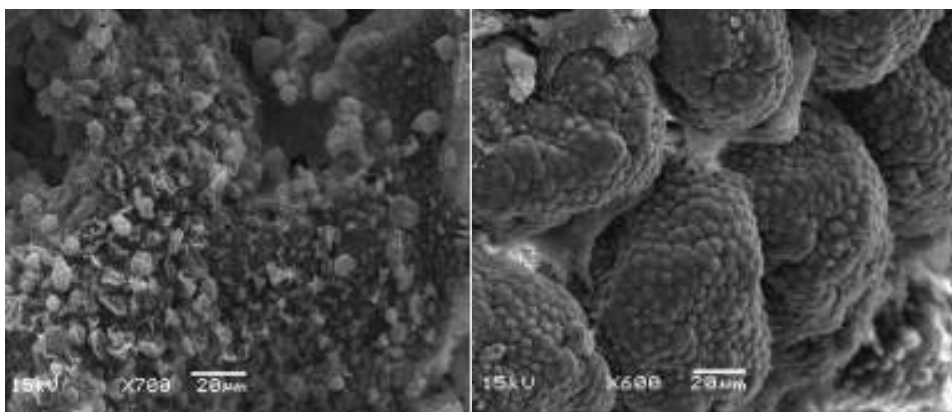
Cu ajutorul SEM analiza aspectele lezionale induse de bacterii la nivelul tegumentului, innotatoarelor, a branhiilor sau a



se pot

epiteliului intestinal. In acest fel se pot aduce informatii suplimentare asupra modului de penetrare a organismului infectat de catre agentul patogen.

In cazul salmonidelor infectate experimental cu *Flavobacterium* (Martinez et al., 2004) s-a demonstrat, cu ajutorul investigatiilor SEM, faptul ca agentul patogen se fixeaza de radiile pestilor in zone deja lezate. Stratul gros de mucus si tegumentul intact fac dificil accesul bacteriilor. In stadiile mai avansate ale infectiei sunt afectate si organele interne.



Nematollahi et al. (2005) au demonstrat grade diferite de virulenta a unor tulpini bacteriene de *Flavobacterium* prin investigatii SEM (corelate cu studii de histologie) asupra epiteliului intestinal. In cazul tulpinii foarte virulente sa putut observa descuamarea intensa a celulelor epiteliale, intinse zone de necroza precum si aglomerari de bacterii. In cazul tulpinilor mai putin virulente exfolierea este redusa, numarul de bacterii atasate de aceasta suprafata fiind mult mai redus. Aderenta bacteriilor la mucusul de pe suprafata epiteliului intestinal sugereaza faptul ca acesta reprezinta un sit important de colonizare cu bacterii a intestinului la pesti.

Investigatiile microbiene efectuate de coordonatorul proiectului si partenerul ISP Iasi au urmarit idntificarea unor eventuale afectiuni bacteriene evoluante si a incarcarii microbiene a zonei piscicole luate in studiu in perioada iernii.

Intervenția crescătorilor, în monitorizarea periodică a indicatorilor microbiologici este dată, în prezent, și de legislație care are drept scop reducerea, eliminarea și evitarea riscului asupra sănătății prin evaluarea și comunicarea riscului. Din acest motiv, este necesar să se țină seama, în primul rând de calitatea surselor de apă. Agenți patogeni care ajung în ape pot fi bacterii, virusuri sau paraziți ei provoacând la om și animale boli transmise hidric, fie prin ingestie fie prin contact direct sau inhalare de aerosoli din apă contaminată..

Pentru confirmarea originii fecale a poluării se determină numărul probabil de coliformi.

Bacteriile coliforme reprezintă un grup de microorganisme ubicviste în tractul intestinal al animalelor cu sânge cald și omului. Coliformii totali se găsesc, de asemenea, în insecte, sol și apă.

Cultivarea rapidă în laborator a făcut ca acest grup de bacterii să fie selectat ca indicator primar pentru prezența organismelor producătoare de boli. Bacteriile coliforme nu sunt organisme patogene, deși pot produce infecții foarte ușoare

Încărcarea bacteriană a coliformilor totali, coliformi fecali și streptococi fecali în tractul digestiv al peștilor din bazine naturale indicată faptul că acești contaminanți se pot regăsi în tubul digestiv al peștilor, fiind în funcție de specie și de temperatura apei la momentul efectuării analizelor (Edwin E. și col

Pseudomonas aeruginosa este un bacil aerob, Gram – negativă, prezentă în mod obișnuit în sol și apă, pe suprafața plantelor. Ocazional, se manifestă ca un agent patogen al plantelor, dar în mod obișnuit este cunoscută ca patogen pentru organismul uman. Bacteria este un patogen oportunist. Poate cauza infecții ale tractului urinar, ale sistemului respirator, dermatite, infecții gastrointestinale, etc. Este o specie tolerantă la o varietate de condiții fizice. Este rezistentă la concentrații ridicate de sare și coloranți, antiseptice slabe și multe dintre antibioticele uzuale. Manifestă predilecție pentru dezvoltarea în mediile umede.

Având în vedere importanța deosebită a calității apei, din punct de vedere microbiologic, pentru sănătatea efectivelor piscicole, s-a avut în vedere, în studiul de față, evaluarea gradului de contaminare a apei din bazine prin aprecierea următorilor indicatori:

Ținând cont de importanța calității apei, din punct de vedere microbiologic, în crescătoriile de pești, mai ales la puiet de vara întâi, s-a avut în vedere evaluarea gradului de contaminare a apei din cele două bazine de creștere, prin determinarea următorilor indicatori: coliformi totali, streptococi fecali, *Pseudomonas aeruginosa*, numărul total de bacterii cu dezvoltare la 37 °C și, respectiv, la 22 °C.

Probele de apă destinate studiului, din bazinele supuse monitorizării, au fost recoltate în luna octombrie. Scopul studiului a fost acela de a determina încărcarea

bacteriologică a acestor ape, prin evidențierea următorilor indicatori: număr probabil de coliformi totali, streptococi fecali, *Pseudomonas aeruginosa*, numărul total de bacterii cu dezvoltare la 37 °C, precum și al celor cu dezvoltare la 22 °C.

Pentru realizarea acestui obiectiv, probele de apă au fost recoltate în mod steril, în flacoane de 500 ml, sterilizate anterior. Probele au fost menținute la 4 °C și analizate în maxim 24 ore. Ulterior, acestea au fost diluate până la diluția de 10⁻⁵ și însămânțate, pe medii de cultură solide sau lichide, după caz, în funcție de indicatorul urmărit.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul de mai jos

TABELUL 1. - Încărcarea bacteriologică a probei de apă prelevată din bazin

Nr. crt.	Indicator biologic		Unit. de măsură	Natura probei analizate/ Apă din bazinele crescătoriilor de pești	Metoda de analiză
1.	Coliformi totali		Nr. probabil/100 cm ³	311x10 ²	STAS 3001/91
2.	Streptococi fecali		Nr. probabil/100 cm ³	2	STAS 3001/91
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Nr. probabil/100 cm ³	130x10	STAS 3001/91
4.	Nr. total bacterii la:	37 °C	U.F.C./ml	86x10 ²	STAS 3001/91
		22 °C	U.F.C./ml	98x10 ²	STAS 3001/91

În urma analizei datelor obținute se remarcă cantitatea redusă de bacterii mai ales a coliformilor, ceea ce se explică prin alimentarea din sursa iazului Ezareni ce

nu vine in contact direct cu apele uzate ale orasului, precum si datorita temperaturii scazute din perioada iernii.

5, CONCLUZII

- Parametrii fizico-chimici ai apei luați în studiu în perioada septembrie 2008-februarie 2009 au fost: temperatura apei, oxigenul dizolvat, pH-ul, conductivitatea, ionul de calciu, amoniu disociat și substanța organică. Valorile majorității parametrilor sunt în limite normale, cu o excepție înregistrată în cazul concentrației de amoniu care, în luna septembrie 2008 prezintă valoare mai crescută (0,05 mg/l), dar fără efecte asupra peștilor, ca urmare a acumulării cataboliților la fundul bazinelor.

- **Starea de sănătate a materialului experimental**, aceasta s-a apreciat prin examen clinic și prin determinări comparative ale unor *parametri care definesc profilul metabolic sanguin*: eritrocite, hemoglobina, hematocrit, glicemia. Valorile parametrilor au fost normale cu excepția exemplarelor afectate de eritrodermatita

- La **crapul** cu eritrodermatită, media valorilor glicemiei și a numărului de eritrocite suferă o descreștere cu 50,1%, respectiv 22,4% comparativ cu crapul sănătos. Această stare este determinată în mare parte de insuficienta ingerare de hrană administrată. În cazul **sângerului** (specie mai vulnerabilă la îmbolnăviri), valorile tabloului hematologic se modifică comparativ cu al peștelui sănătos, deoarece se înregistrează în medie o scădere de 310x1000/mm³ a numărului de eritrocite și cu 31,03% a valorilor hemoglobinei, dar și o creștere cu 102,47% a valorii glucozei. Spre deosebire de crap care efectuează deplasări de-a lungul bazinului în căutarea hranei la mesele de furajare, sângerul își găsește permanent hrana în masa apei, filtrând-o și apoi ingerând-o. Exemplarele afectate de boală au înregistrat o întârziere a creșterii, valoarea medie a greutateii, și în acest caz, fiind diminuată cu 9,6%.

- Investigatiile microbiene au urmarit indicatori ca: număr probabil de coliformi totali, streptococi fecali, *Pseudomonas aeruginosa*, numărul total de bacterii cu dezvoltare la 37 °C, precum și al celor cu dezvoltare la 22 °C. se remarcă cantitatea redusă de bacterii mai ales a coliformilor, ceea ce se explică prin alimentarea din sursa iazului Ezareni ce nu vine în contact direct cu apele uzate ale orașului, precum și datorită temperaturii scăzute din perioada iernii.

Cercetarile etapei urmatoare (in perioada de crestere insotita de temperaturi relativ ridicate) vor conduce la structurarea unui tablou epidemiologic infectios si lezional al efectivelor piscicole si implicatiile acestora asupra sanatatii pestelui si consumatorilor.

6. Bibliografie

1. Bandin, I., Ellis, A.E., Barja, J.L., Secombes, C.J. 1993 - Interaction between rainbowtrout macrophages and *Renibacterium salmoninarum* in vitro. *Fish & Shellfish immunology* 3, 25-33.
2. Bozzola J, Russell L. D 1998 - *Electron Microscopy*, 2nd Edition, BIOS Scientific Publishers
3. Hawkes P W, Spence J C, 2008 - *Science of Microscopy*, Springer Verlag New York
4. Martínez J L, Casado A, Enríquez R, 2004 - Experimental infection of *Flavobacterium psychrophilum* in fins of Atlantic salmon *Salmo salar* revealed by scanning electron microscopy, *Dis Aquat Org*, 59: 79–84.
5. Nematollahi A., Pasmans F, Van den Broeck W, Ducatelle R, Haesebrouck F, DecostereA., 2005 - Association of *Flavobacterium psychrophilum* strains with intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Dis Aquat Org* 67: 67–72.
6. Rangdale RE, Richards RH, Alderman DJ (1999) Histopathological and electron microscopical observations on rainbow trout fry syndrome. *Vet Rec* 144:251–254
7. Shotts, E. B., Jr., and R. Rimmler. 1973. Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol.* 26:550-553.
8. Stoskopf, M/K/ et al (1994): *Fish Medicine*. Philadelphia, Blackwell Publishing.

RAPORTUL ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC
PISCIBACTER
Etapa II - 2009

1. Obiectivele generale
2. Obiectivele etapei de executie
3. Rezumatul etapei
4. Descrierea stiintifica si tehnica
5. Concluzii
6. Bibliografie

1. Obiectivele generale

Obiectivele generale ale proiectului constau în investigarea agenților infecțioși ce determină stări patologice și evaluarea impactului leziunilor asupra sănătății peștelui și sănătății consumatorului.

Obiectivele specifice ale proiectului sunt următoarele:

- Evaluarea fizico-chimică și microbiologică a efectivelor piscicole
- Aprecierea microbiologică a apei piscicole și a afecțiunilor bacteriene ce evoluează în efectivele de crap și păstrăv
- Stabilirea diagnosticului morfopatologic și electronomicroscopic
- Aprecierea stării sanitare a efectivelor piscicole în timpul iernării.
- Diagnostic imunologic și epidemiologic

2. Obiectivele fazei de executie

Etapa II a acestui proiect are ca obiective aprecierea microbiologică apei piscicole și a afecțiunilor infecțioase ce evoluează în efectivele de crap *Cyprinus carpio* luate în studiu. Activitățile de cercetare sunt următoarele:

Activitatea II.1. Inventarierea microflorei bacteriene la crap și stabilirea structurii microbiotei normale

Activitatea II.2. Aprecierea portajului de microflora bacteriana cu potențial patogen pentru ciprinide și alte specii neconvenționale și diagnosticul bacteriologic

Activitatea II.3. Examinarea morfopatologică și electronomicroscopică a exemplarelor de crap cu stări patologice.

3. Rezumat

Studiile s-au realizat asupra efectivelor de crap *Cyprinus carpio* din ferma Podu-Iloaie.

Exemplarele de pești sutiati au avut vârsta cuprinsă între 1 an și 4 ani, respectiv puiet de crap și remont (pregătit pentru reproducere).

S-au prelevat probe de apă pentru examenele microbiologice și probe de pește pentru examenele ihtiopatologice bacteriologice și morfopatologice.

Coordonatorul de proiect a realizat prelevarea tuturor probelor, examenul clinic al peștilor, precum și examenul bacteriologic și morfopatologic (morfoclinic și histologic). A participat și a coordonat interpretarea rezultatelor și a aspectelor concluzive.

Partenerul I, Univ. Al. I. Cuza Iași a realizat prelucrarea și interpretarea probelor și a rezultatelor în cadrul examenelor electroonomicroscopice.

Partenerul II, ISP Iași a realizat prelucrarea și interpretarea probelor și a rezultatelor în cadrul aprecierii microbiologice a apei piscicole.

Diagnosticul bacteriologic este cel de septicemie cu *A. hydrophila* și *Aeromonas caviae* (aeromonoză, boala aeromonadelor mobile). Este posibilă evoluția concomitentă a celor două maladii, aeromonoză evoluând deseori ca o complicație a viremiei de primăvară. Factorii care au favorizat declanșarea și evoluția infecțiilor diagnosticate au fost temperatura scăzută a apei, care reduce până la anulare activitatea sistemului imun, în asociere cu stresul de manipulare și cel de transport.

Examinarea histologica a adus aspecte privind leziunile microscopice în bolile infectioase diagnosticate la crapul de cultura și la alte ciprinide ca: hiperplazia celulelor mucoase, inflamatie limfohistiocitară și necroza cutanată, distrofia balonizantă a dermului în asociere cu supraîncărcarea cu hemosiderină a celulelor epidermice, infiltrații edematoase musculare, infiltrații celulare limfohistiocitare subcutane.

Cu ajutorul microscopului SEM se pot analiza aspectele lezionale induse de bacterii la nivelul tegumentului, înotătoarelor, al branhiilor sau al epiteliului intestinal. În acest fel se aduc

informații suplimentare asupra modului de penetrare a organismului infectat de către agentul patogen.

4. Descrierea proiectului

Etapa s-a caracterizat prin colaborarea strânsă a celor trei parteneri și obținerea de rezultate și concluzii comune.

Studiile s-au realizat asupra efectivelor de crap *Cyprinus carpio* din ferma Podu-Iloaie.

Exemplarele de pești sutiati au avut vârsta cuprinsă între 1 an și 4 ani, respectiv puiet de crap și remont (pregătit pentru reproducere).

S-au prelevat probe de apă pentru examenele microbiologice și probe de pește pentru examen ihtiopatologice bacteriologice și morfopatologice.

Partenerul II, ISP Iași a realizat prelucrarea și interpretarea probelor și rezultatelor în cadrul aprecierii microbiologice a apei piscicole.

Calitatea apei este esențială pentru ca oamenii să aibă un stil de viață sănătos. Extinderea urbanizării, chimizarea excesivă a agriculturii și industriei, creșterea necontrolată a deversărilor reziduale sunt activități antropogenice care au efect determinant asupra condiției microbiologice a apei datorită contaminării cu o paletă largă de microorganisme.

O relație de cauzalitate există între nivelul sanitației și numeroasele boli asociate contaminării apei consumate direct pentru băut sau indirect pentru prepararea hranei, spălarea ustensilelor sau activități recreative.

În ultimii ani, importanța *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* ca agenți patogeni emergenți și reemergenți ce reprezintă o amenințare pentru sănătatea populațională datorită capacității de multiplicare în apă a crescut considerabil.

Microorganisme ubicvitate, larg răspândite în mediul ambiant, sunt semnalate, mai ales, în zonele cu climă temperată. Habitatul natural este reprezentat de o varietate de ecosisteme în care găsesc condiții favorabile supraviețuirii: apa (surse de suprafață sau profunzime, izvoare minerale naturale, marine, clorinate sau neclorinate), efluenți reziduali, sol sau sedimente.

Răspindirea acestor agenți patogeni este puternic influențată de variațiile sezoniere climatice (temperatura, umiditate), concentrațiile crescute de nitriti, CO₂ și amoniu sau nivelul scăzut al O₂ dizolvat în apă.

Comparativ cu alte microorganisme care trăiesc în mediul acvatic, se remarcă potențialul patogen al *Aeromonas* spp. pentru om și animale. Numeroase studii au evidențiat că *Aeromonas caviae* predomină în apele intens poluate, în timp ce *Aeromonas hydrophila* și *Aeromonas sobria* au fost izolate, în principal, în apele ce prezintă o contaminare organică redusă.

Aeromonas spp. cuprinde patogeni oportuniști (*Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* etc.), comensali ai tractului gastro-intestinal al animalelor poikiloterme (pești, amfibieni, reptile), ce sunt implicați în producerea unor leziuni ulceroase tegumentare, exoftalmie, hemoragii interne și septicemie.

Recent, s-a arătat că speciile care generează îmbolnăviri umane sunt: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veroni* biovar *sobria* și *Aeromonas caviae*.

Consumul de produse de pescărie, carne sau vegetale în care au fost detectați acești agenți patogeni poate cauza gastroenterite cu aspect holeriform sau dizinteriform.

Expunerea la apă contaminată cu *Aeromonas* spp. prin ingestie sau contact determină leziuni inflamatorii ale pielii, celulite, eczeme și mionecroze, mai ales, la anumite grupuri populationale cu risc crescut: copii < 5 ani, vârstnici și persoane imunosupresate.

Exigentele nutritive minime ale *Pseudomonas aeruginosa* implică o largă reprezentare a acestui microorganism în mediul ambiant, putând fi detectat în ape de suprafață, marine, reziduale și efluenți ai industriei agroalimentare.

Numeroase studii epidemiologice au pus în evidență legătura directă între prezența *Pseudomonas aeruginosa* în apele naturale și incidența crescută a infecțiilor oculare și cutanate la om și pești.

Metodologie

În perioada luată în studiu (martie-noiembrie 2009) au fost analizate 12 probe de apă ce au provenit din puncte critice ale arealului unei ferme piscicole (zone diferite ale helesteului, sursa de alimentare, evacuare) din localitatea Podu-Iloaiei.

Recoltarea probelor a fost proiectata in 2 etape ce s-au suprapus anotimpului rece (martie) si cald (iunie).

Respectind cerintele standardelor in vigoare din domeniul microbiologiei apei, probele au fost colectate in recipiente sterile ce au fost conservate in timpul transportului spre laborator in lazi frigorifice si examinate in maxim 4 ore.

Metodele folosite pentru evaluarea microbiologica calitativa si cantitativa a apei piscicole din punct de vedere a indicatorilor de contaminare fecala recenta (bacterii coliforme, *Escherichia coli* si enterococi) si a agentilor patogeni emergenti se bazeaza pe tehnica membranelor filtrante.

Un volum măsurat de probă (100 ml, 10 ml si, respectiv, 1 ml) sau diluții a fost filtrat prin membrane de acetat de celuloza, cu porozitatea de 0,45 μm (Millipore), depuse, ulterior, pe suprafața unor medii de cultură selective ce permit dezvoltarea diferentiata a microorganismelor:

- **bacterii coliforme si *Escherichia coli***

După o perioada de incubare (21 ± 3 ore) la o temperatură corespunzătoare ($36 \pm 3^{\circ}\text{C}$), coloniile lactozo-pozitive crescute pe suprafața agarului lactoza-TTC-7 tergitol, au fost identificate pe baza unei scheme minimale de teste biochimice ca fiind:

- bacterii coliforme : oxidazo-negativ, ONPG-pozitiv;
- *Escherichia coli*: oxidazo- negativ, indol pozitiv.

Confirmarea tulpinilor izolate de *Escherichia coli* s-a facut folosind urmatoarele teste:

- fermentarea glucozei ± gaz (+), lactozei (+), zaharozei (+),
- producerea de H₂S (-);
- reactia rosu-metil (+) si Voges-Proskauer (-);
- hidroliza ureei (-);
- motilitate (+/-);
- activitatea lizin-decarboxilazei si fenilalanin-dezaminazei (-);
- capacitatea de utilizare a carbohidratilor (-) (8);

- **enterococi**

Coloniile prezumtive, dezvoltate pe membrana depusa pe suprafata mediului Slanetz-Barthley (48 ore, $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$) sunt transferate pe agar-bila-esculina-azida de sodiu.

Confirmarea enterococilor se bazeaza pe:

- hidroliza esculinei (2 ore, 44°C);
- reactia catalazei (+);
- reactia oxidazei (-);
- aspectul morfologic evidentiat pe frotiul colorat Gram (9);

- ***Pseudomonas aeruginosa***

Agar baza-Pseudomonas, suplimentat selectiv cu cetrimide (100 mg/l) si acid nalidixic (7,5 mg/l), este mediul folosit pentru izolarea acestui microorganism.

Dupa perioada de incubare (44 ± 4 ore) la o temperatura corespunzatoare ($36 \pm 2^{\circ}\text{C}$), coloniile care produc pigment verde sau albastru (piocianina sau pioverdina) sunt imediat confirmate ca fiind determinate de *Pseudomonas aeruginosa*.

Coloniile non-producatoare de piocianina care prezinta fluorescenta in lumina UV (360 ± 20 nm) sunt subcultivate pe agar triptona-soia si, dupa 22 ± 2 ore de incubare la $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sunt identificate cu ajutorul:

- testului oxidazei (+);
- producerii de amoniac din acetamida (+);
- fluorescentei pe mediul King's B (+).

Identificarea diferitelor specii apartinand genului *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* etc.) s-au bazat pe:

- evidentierea capacitatii selective de crestere la diferite temperaturi:
 - 4°C , 22°C , 37°C si 42°C ;
- β -hemolizei pe agar-sange de berbec 5%;
- hidroliza esculinei;
- activitatea lizindecarboxilazei, ornitindecarboxilazei, arginindehidrolazei; (truse API 20 NE – Biomerieux) (10).

- ***Aeromonas* spp.**

Aeromonas spp. a fost izolat utilizind metoda recomandata de *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (EPA: 1605 - 2001).

Dupa filtrarea apei, membranele sunt transferate pe suprafata mediului Aeromonas baza (Oxoid) ce a fost suplimentat selectiv cu ampicilina (5 mg/l) conform cerintelor impuse de Ryan. Placile Petri au fost incubate 48 ore la 30°C.

Coloniile cu morfologie caracteristica (rotunde, aplatizate, diametru 0,5 – 1,5 mm, verzi intunecat, cu centrul negru) au fost repicate pe agar MacConkey si au fost examinate dupa 24 ore de incubare la 37°C (11, 12)

Coloniile transparente, cu diametru de 1 mm, au fost verificate din punct de vedere al activitatii citocromoxidazei (+), catalazei (+), aspectului microscopic pe froiuri colorate Gram.

Au fost confirmate biochimic, utilizind urmatoarele teste de identificare pentru:

- **gen:**
 - productia de indol;
 - fermentarea trehalozei, ramnozei, xilozei;
- **specie :**
 - fermentarea glucozei, lactozei, zaharozei, H₂S,
 - producerea de gaz din glucoza;
 - hidroliza esculinei si ureei, motilitate;
 - ONPG;
 - reactia rosu-metil si Voges-Proskauer;
 - activitatea lizindecarboxilazei, ornitindecarboxilazei si arginindehidrolazei;
 - activitatea fenilalanindezaminazei;
 - capacitatea de utilizare a carbohidratilor;
 - β-hemoliza pe agar-sange 5%;
 - fermentarea manitolului;

(truse API 20 NE – Biomerieux) (11. 12).

Rezultate

In conformitate cu Ordinul nr. 161/2006 care aproba normativul privind clasificarea apelor in vederea stabilirii starii ecologice, valorile maxim admise pentru indicatorii microbiologici sunt:

- **ape clasa I:** bacterii coliforme < 1 000 UFC/100 ml si *Escherichia coli* < 200 UFC/100 ml;
- **ape clasa II:** bacterii coliforme < 10 000 UFC/100 ml si *Escherichia coli* < 2 000 UFC/100 ml.

Rezultatele obtinute in acest studiu demonstreaza ca, atit apa recoltata in diferite zone ale lacului, cit si sursa de alimentare corespund normelor microbiologice prevazute de legislatia romaneasca pentru ecosistemul destinat cresterii si dezvoltarii culturilor piscicole (tabelul nr.1).

Tabelul nr. 1

*Variatiile sezoniere ale contaminarii microbiologice ale apei
recoltate din arealul unei ferme piscicole*

Punct recolta	Bacterii coliforme*	<i>E. coli</i>*	Enterococi*	<i>Ps. aeruginosa</i>*	Aeromonas spp.*	<i>Aeromonas hydrophila</i>*
SEZON RECE						
Sursa alimentare ^{1, 2}	53 51-54	36 32-39	21 20 - 23	13 10 -15	4 3-4	4 3-4
Helesteu ^{1, 2, 4}	5913 5879-5947	1724 1632-1815	508 504-512	139 132-145	6 5-7	6 5-7
Evacuare	16943	6918	7786	154	25	17

(Bahluiet) ^{1,2}	16817-17069	6828-7007	7561-8010	149-158	21-29	15-19
SEZON CALD						
Lac centru (mal)	94	62	34	0	1116	744
Lac centru (mijloc)	293	117	236	14	3784	2433
Evacuare mal ^{3,6}	2476	2476	414	0	6847	5869
Evacuare mijloc ^{3,6}	3241	2315	847	0	5766	4530
Coda lac (mal) ^{4,5}	51	42	41	84	5736	4135
Coda lac (mijloc) ⁵	30	17	31	95	4344	4344

¹x mediu; ² interval min-max; ³ prezent *Pseudomonas fluorescens*; ⁴ prezent *Pseudomonas cepacia*; ⁵ prezent *Aeromonas caviae*, ⁶ prezent *Aeromonas salmonicida*

* se exprima in UFC/100 ml

Contaminarea mediului acvatic cu indicatori de poluare fecala (bacterii coliforme, *Escherichia coli*, enterococi) s-a dovedit a fi mult mai intensa in sezonul rece, valorile obtinute fiind de 50-100 ori mai mari decit in timpul verii.

Cauzele posibile ale acestui fenomen sunt reprezentate de precipitatiile frecvente si temperaturile relativ ridicate ale apei inregistrate in aceasta perioada ce au antrenat o crestere substantiala a substratului nutritiv, factori ce au favorizat multiplicarea florei microbiene mezofile.

Cu variatii sezoniere semnificative ale densitatii populatiilor bacteriene, *Aeromonas* spp. a fost izolat constant in mediul acvatic investigat, speciile identificate fiind reprezentate de: *Aeromonas hydrophila* (70,6%), *Aeromonas caviae* (17,6%), *Aeromonas salmonicida* (11,8%).

Nivelul maxim al contaminarii cu aceste microorganisme a fost inregistrat in timpul verii si a fost cuprins in intervalul $1,1 \times 10^3$ - $6,6 \times 10^3$ UFC/100 ml.

Punctele critice identificate în arealul acestei ferme piscicole au fost reprezentate de zonele de evacuare și, respectiv, coada lacului (mal), cu valori de 3-6 ori mai mari față de zona lac centru (mal și mijloc).

Semnalam prezenta *Pseudomonas aeruginosa* doar în aproximativ 7/10 din probele de apă analizate, evidențiindu-se o relație de invers proporționalitate comparativ cu nivelul poluării fecale.

Dintre speciile aparținând genului *Pseudomonas* ce au tropism pentru pești au fost izolate în proporții similare (15,3%) *Pseudomonas fluorescens* și *Pseudomonas cepacia*.

Coordonatorul de proiect a realizat prelevarea tuturor probelor, examenul clinic al peștilor, precum și examenul bacteriologic și morfopatologic (morfoclinic și histologic). A participat și a coordonat interpretarea rezultatelor și a aspectelor concluzive.

Bolile infecțioase constituie una din principalele cauze ale pierderilor prin mortalitate și/sau depreciere organoleptică a peștilor. Densitatea mare a peștilor în sistemele intensive de exploatare determină creșterea concentrației pe unitatea de volum a germenilor eliminați în mediul acvatic și implicit, a șansei de realizare în lanț a unor infecții cu microorganisme patogene sau comensale, condiționat patogene (oportuniste).

Infecțiile localizate și septicemice produse de germeni oportuniști sunt condiționate de apariția unor breșe în sistemul barierelor antiinfecțioase naturale, cauzate de diverși factori endogeni sau ambientali. Factorii favorizanți incriminați frecvent în declanșarea acestor infecții sunt stresul termic, stresul și leziunile produse prin manipulare, parazitozele cutanate, supraaglomerarea și parametrii fizico-chimici necorespunzători ai apei.

Inventarierea florei bacteriene s-a realizat prin examene bacteriologice cantitative și calitative, pe exemplarele de pești studiate. Examenul bacterioscopic direct a evidențiat o microflora polimorfa, predominant Gram-negativă, la nivelul fiecăreia din nișele anatomice investigate (piele, branhii, intestin). Gradul de colonizare al celor trei nișe a fost diferit, sub acest raport intestinul situându-se pe primul loc.

Examenul bacteriologic propriu-zis a fost efectuat pe probe de mucus cutanat, mucus branhial și conținut intestinal. Examenele au permis izolarea unui număr mare de tulpini bacteriene, identificate în proporție de 79%. Microflora Gram-negativă a predominat, fiind reprezentată în ordine descrescătoare de specii bacteriene aparținând următoarelor familii:

Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Cytophagaceae, Cystobacteriaceae, Flavobacteriaceae și *Lysobacteriaceae*.

În cazul suspiciunii de boală infecțioasă, **diagnosticul de certitudine** se bazează pe evidențierea, izolarea și identificarea agentului etiologic, deoarece exprimarea clinică și morfopatologică sunt adesea necaracteristice.

Pe parcursul ultimilor doi ani în fermele de ciprinide din județul Iași au fost diagnosticate infecții cu tulpini bacteriene aparținând speciilor mobile din cadrul genului *Aeromonas*, declanșate pe fond de stres indus de factori biotici și abiotici.

Aeromonoze diagnosticate

S-au efectuat investigații anamnetice și examen morfopatologic și bacteriologic pe crap fitofag și crap comun de 2 veri, în scopul identificării factorilor determinanți și favorizanți ai îmbolnăvirii peștilor și pierderilor prin mortalitate în două unități de profil din județul Iași..

Crapii fitofagi morți a fost recoltați dintr-o ferma piscicolă din cuștile în care erau ținute la mal pentru pescuit și livrări zilnice.

Exemplarele de crap comun ne-au parvenit dintr-o exploatație în sistem „policultură,, (crap, caras, *Polyodon spathulla*), fiind recent achiziționate în scopul populării unui iaz cu o suprafață de 4,5 hectare.

Examenele morfopatologice și bacteriologice efectuate pe pești au respectat protocolul de lucru specific fiecărui tip de investigație.

Investigațiile bacteriologice au constatat în microscopie directă pe frotiuri colorate Gram și însămânțări în vederea izolării și identificării eventualelor germeni prezenți în țesuturile și organele cu leziuni, sânge și rinichi.

În acest scop s-au utilizat medii neselective pe care se dezvoltă majoritatea bacteriilor cu potențial ihtiopatogen: bulionul BHI, geloza nutritivă, agar TSA, geloza-sânge.

Incubarea mediilor însămânțate s-a făcut la 25⁰ C timp de 24-48 de ore

Identificarea tulpinilor bacteriene izolate s-a efectuat pe baza caracterelor culturale, morfologice și biochimice, folosind schema dichotomică redată mai jos (schema 1).

În paralel, au fost investigate microbiologic și fizico-chimic eșantioane de apă prelevate din cele două unități.

Investigațiile anamnetice au relevat următoarele aspecte:

- creșterea morbidității și a mortalității la pești în luna mai;
- temperatura apei avea valori cuprinse între 12 °C în ferma F1 și 15° C în ferma F2, - valori inferioare temperaturii optime de creștere a celor două specii afectate (22 – 25° C);
- crapii au fost supuși stresului de manipulare, transport și adaptare la noile condiții iar peștele fitofag, stresului de capturare și celui datorat supraaglomerării în cuști;
- pierderile prin mortalitate s-au redus treptat, concomitent cu încălzirea apei.

Examenul clinic

În ambele ferme, principalele simptome ale peștilor bolnavi fost starea de hipodinamie și leziunile cutanate.

Examenul anatomopatologic

Examenul extern la cele trei exemplare de sânger a evidențiat echimoze cutanate, zone cu lepidortoză și lipsa solzilor (fig. 1), hipersecreție de mucus branhial și, la un singur exemplar, fragmentarea înotătoarei caudale.

La examenul intern s-au constatat hemoragii musculare de diverse dimensiuni, inflamația cataral-hemoragică a viscerelor și aerocistită (fig. 2).



Fig. 1. Sânger cu hemoragii la baza înotătoarelor pectorale și zone cutanate denudate.



Fig. 2 . Sânger: leziuni interne de tip hemoragic și inflamator

Crapii investigați clinic și morfopatologic au prezentat: exoftalmie unilaterală , echimoze în regiunea abdominală, la baza aripioarelor și perirectal, lepidortoză și căderea solzilor pe arii întinse, ulcere cutanate superficiale și profunde .

Examenul intern a relevat prezența de lichid ascitic, uneori sanguinolent, aderența viscerelor la pereții cavității abdominale, enterită catarală, ficatul hipertrofiat, friabil și cu mici focare congestive sau hemoragice.



Fig. 3. Crap cu exoftalmie



Fig.4. Crap cu ulcere cutanate și zone denudate.



A



B

Fig. 5. Crapi cu ascită : A – lichid ascitic seros; B – lichid ascitic sanguinolent

Examenul bacteriologic

Examenul bacterioscopic direct al ulcerelor cutanate și amprentelor din ficat și rinichi în frotiuri colorate Gram a evidențiat o microfloră Gram negativă polimorfă, cu predominanța formelor bacilare și cocobacilare.

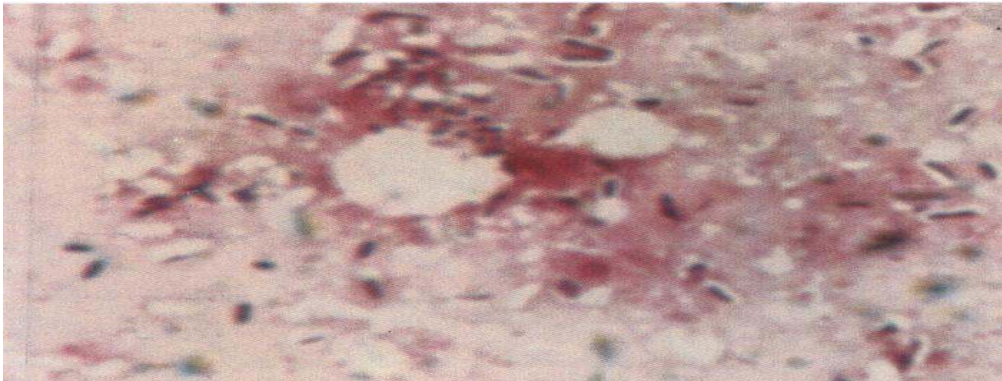


Fig. 6. Frotiu din ulcer cutanat la crap

Din ulcerile cutanate s-au obținut culturi mixte de tulpini bacteriene care au fost încadrate în genurile *Aeromonas*, *Lisobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* – genuri care formează microbiota rezidentă, normală a peștilor.

Însămănțările efectuate din sângele recoltat din cord și din rinichi, pe geloza TSA și geloza-sânge, au avut drept rezultat la toți peștii investigați, izolarea în culturi pure a unor tulpini hemolitice de *Aeromonas hydrophila* și *Aeromonas caviae*



Fig. 7. Cultură pură de *Aeromonas hydrophila* pe TSA.



Fig. 8. Hemoliza produsă de tulpinile de *Aeromonas spp.* pe geloza-sânge

Testarea sensibilității tulpinilor de *A. hydrophila* față de antibiotice și chimioterapice prin antibiogramă - metoda difuzimetrică a indicat o sensibilitate de 100 /100 față de spectinomycin, furazolidon și gentamicină. Față de celelalte antibacteriene testate (amoxicilin, polimixină, cloramfenicol, tetraciclină, ș.a), comportamentul a variat de la o tulpină bacteriană la alta manifestând sensibilitate moderată sau rezistență.

Parametrii microbiologici și fizico-chimici ai eșantioanelor de apă s-au situat în limitele admise de STAS-urile în vigoare.

Coordonatorul de proiect a dezvoltat obiectivul de baza al proiectului, respectiv leziunile determinate de germenii infectiosi, cu preponderenta din punct de vedere histologic.

Astfel, în cazul eritrodermatitei crapului și a aeromonozelor diagnosticate în această etapa s-au remarcat leziuni ale pielii dar și a organelor interne.

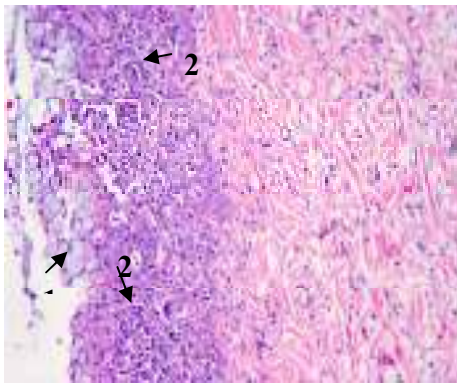
La examenul histologic din fragmente de piele din regiunile ulcerative s-au observat, pe fondul unei necroze a epidermului, o hiperplazie a celulelor secretoare de mucus.

La probele recoltate din ficat, histologic s-a observat o distrofie hidrică, cu identificarea unui nodul limfoid Lohligher (Biggs), asemănător cu formațiunile limfoide din diferitele organe și mai ales din ficatul păsărilor, cu rol în apărarea imună.

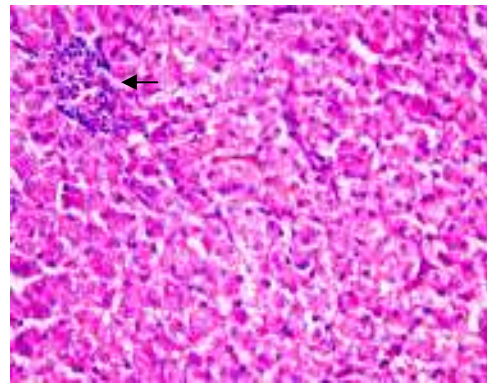
La nivel intestinal s-au identificat numeroase celule mucipare vii, care în unele zone erau necrozate, iar în lamina propria a vilozităților intestinale s-au putut identifica infiltrații cu celule inflamatorii.



Fig. 9. Eritrodermatita crapului. Crap și novac cu ulcere în zonele dorsală și caudală. Se observă lizereu alb datorită procesului de cicatrizare.



A



B

Fig. 10. Eritrodermatita crapului. A. Hiperplazia celulelor mucoase (1). Zone de necroză în mijlocul epidermei (2). B. Ficat. Nodul limfoid de tip Lohligner (Biggs)

La examenul clinic s-a diagnosticat la caras și crap evoluția septicemiei hemoragice bacteriene. Indivizii afectați prezentau la examenul macroscopic, zone de eritem localizat de diferite dimensiuni, în contrast cu paliditatea branhiilor. Zonele cele mai afectate au fost localizate la baza înotătoarelor.

La deschiderea cavității abdominale s-au evidențiat organele interne mărite în volum, turgescențe, cu aspect umed, lucios, culoare roșie intensă, consistență crescută.

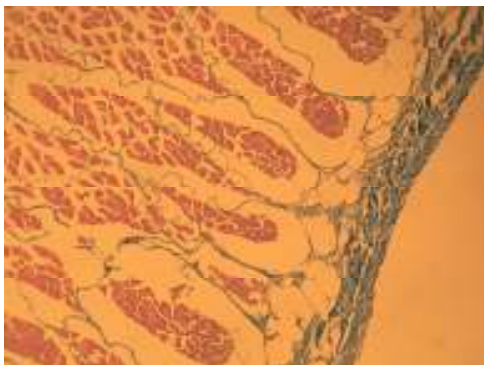
La examenul microbiologic pe geloză nutritivă s-au dezvoltat din sângele provenit din cord și din ficatul carasilor examinați colonii netede, nepigmentate sau ușor pigmentate în crem, culturi pure de *Aeromonas hydrophila*.

Examenul histologic al fragmentelor recoltate din piele au evidențiat în unele regiuni distrofia balonizantă a dermului în asociere cu supraîncărcarea cu hemosiderină a celulelor epidermice.

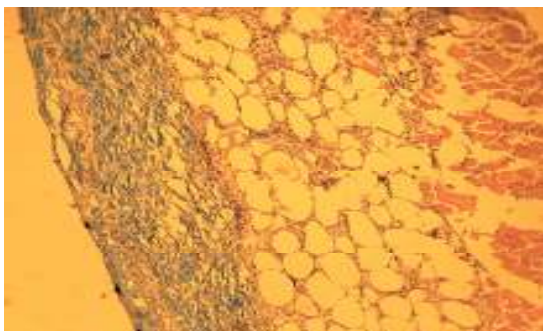
La examenul musculaturii somatice s-au evidențiat infiltrații edematoase interstițiale interfasciculare și interfibrilare. Fibrele musculare apar dissociate de infiltratul edematos. La nivelul țesutului adipos subcutanat s-au identificat infiltrații celulare limfohistiocitare .

Examenul histologic al ficatului a scos în evidență distrofia balonizantă a hepatocitelor. Din punct de vedere structural, leziunea s-a identificat inițial prin celule tumefiate, cu citoplasma fin buretoasă, nuclei în necrobioză și vacuole. Hepatocitele complet goale conțineau un material proteic cu aspect filamentos. Din punct de vedere structural se produce o alterare gravă cu caracter ireversibil a membranelor hepatocitelor și organitelor acestora.

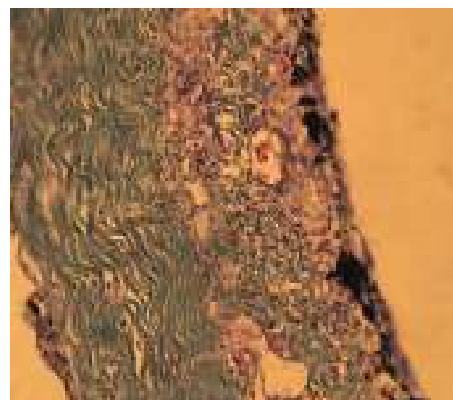
La examenul histologic al intestinului s-a remarcat o infiltrație limfohistiocitară la nivelul corionului cu caracter difuz sau focalizat. De asemenea, s-a observat ectazia vaselor limfatice din corion și subseroasa intestinală.



A

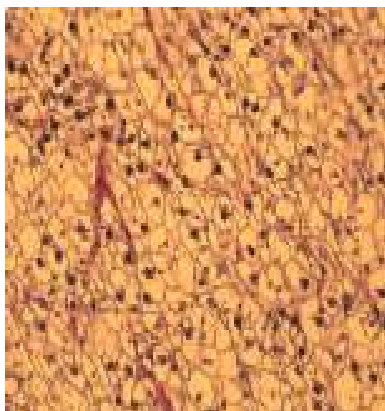


B



C

Fig. 11. A. Piele și musculatură somatică. Infiltrații edematoase subcutanate și interfasciculare musculare. Col. HEA, x 100. B. Suprafață corporală. Infiltrații celulare limfohistiocitare în țesutul adipos subcutanat. Col. HEA, x 100. C. Piele. Hemosideroză localizată superficială. Col. HEA, x 200



B

Fig. 12. Septicemie hemoragica bacteriena. A. Ficat. Hepatoză hidrică (balonizantă). Gonflarea hepatocitelor. Col. HEA, x 400. B. Intestin. Hiperplazia limfohistiocitară a corionului vilozitar. Col. HEA, x 100.

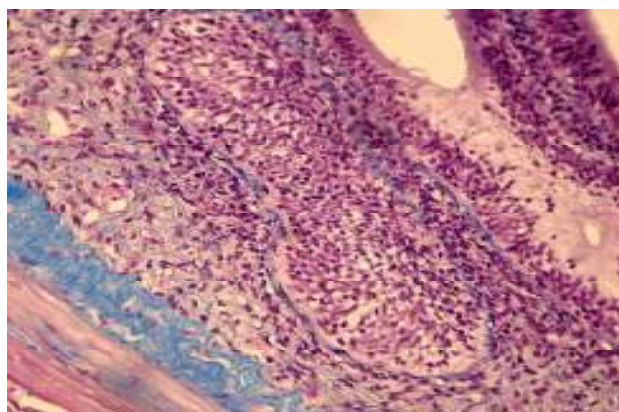


Fig. 13. Intestin. Lamina propria. Hiperplazie limfohistiocitară foliculară. Col. HEA, x 400

Partenerul I, Univ. Al. I. Cuza Iași a realizat prelucrarea și interpretarea probelor și rezultatelor în cadrul examenelor electroonmicroscopice.

Material si metoda de lucru

- Recoltarea probelor – probele pot fi de dimensiuni mai mari decat la TEM (pot avea pana la 1 cm^2).
- Fixarea si deshidratarea este asemanatoare cu cea realizata la pregatirea probelor pentru TEM. Fixarea materialul se prelungeste in glutaraldehida (sau in amestec de glutaraldehida si paraformaldehida) pana la 72 de ore in cazul probelor de piele pentru a inlatura mucusul de la suprafata acesteia). Dupa deshidratarea in alcool etilic absolut probele se trec in doua bai de acetona anhidra.
- Uscarea la punctul critic al dioxidului de carbon – este necesara pentru prezervarea detaliilor structurale ale probei analizate. Uscarea la aer poate cauza deformari accentuate ale suprafetelor materialelor biologice cauzate, in principal, de tensiunea supeficiala a apei. Utilizand uscarea la punctul critic al dioxidului de carbon aceasta tensiune supeficiala este redusa aproape la 0. In momentul atingerii punctului critic ($31,1^{\circ}\text{C}$ la o presiune de 1250 psi) CO_2 lichid trece direct in faza gazoasa, iar eliminarea acestuia din probe, odata cu scaderea presiunii se realizeaza cu pastrarea intacta a structurilor existente.
- Metalizarea probelor uscate este necesara pentru observarea acestora in camera de vid a SEM. Metalizarea se realizeaza fie cu aur fie cu aur-paladiu. Stratul de metal depus are grosimea de 30-60 angstromi (functie de detaliile ce se doresc a fi observate). Roberts R.J. (2003) și Ferguson H.W. (2006) descriu pielea la pești ca fiind alcătuită dintr-un epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat, dar la care celulele epidermale de suprafață sunt viabile și au capacitatea de a se divide. În analiza electronmicroscopică aceste celule externe pot fi interpretate ca având o structură cu aspect de mici proeminente digitiforme.

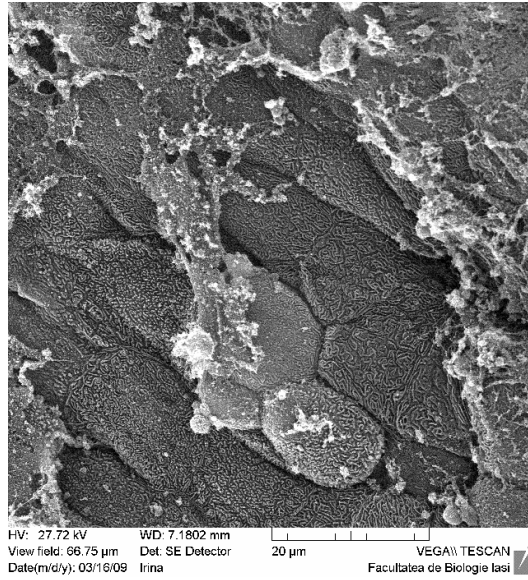


Figura 14 - Dispunerea celulelor epiteliale de suprafață sub aspect de amprentă digitală

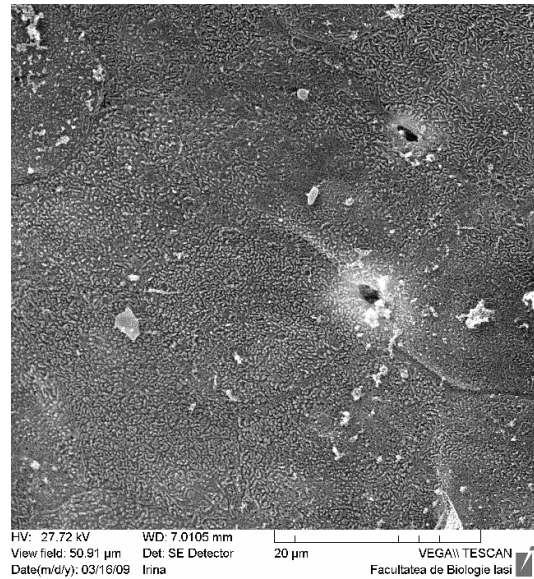


Figura 15 - Detaliu asupra dispunerii celulelor epiteliale – celula secretoare de mucus

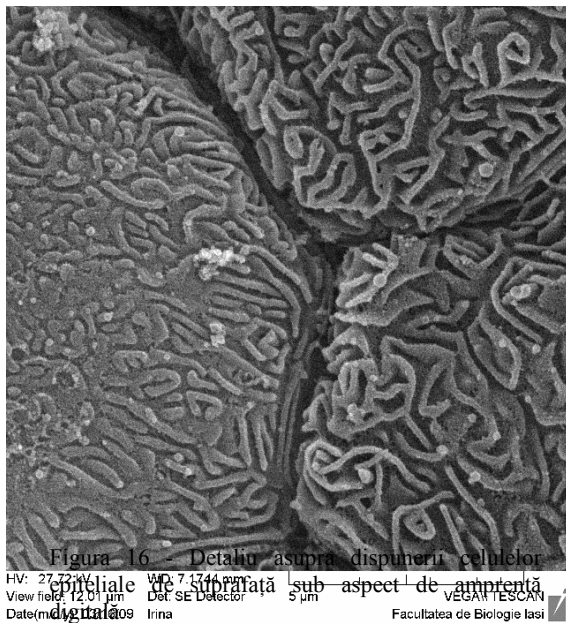


Figura 16 - Detaliu asupra dispunerii celulelor epiteliale de suprafață sub aspect de amprentă digitală

Celulele secretoare de mucus sunt găsite în epiderma tuturor teleostenilor, dar numărul lor variază mult în funcție de loc și de specie. Aceste celule își au originea de obicei în straturile mijlocii ale epidermei, dar într-o epidermă subțire baza celulelor mucoase se poate observa în membrana bazală. Ele cresc în dimensiuni și elaborează secreții de îndată ce se apropie de suprafață (**Roberts R.J. 2003**).

Au fost investigate electrono-microscopice leziuni de diferite dimensiuni aflate în stadii diferite de evoluție.

La probele recoltate din zone cu leziuni ulcerative, am putut identifica prezența globulelor roșii (hematiilor), cu un aspect de disc, cu zona centrală proeminentă (datorată prezentei nucleului în aceste celule), care denotă un proces

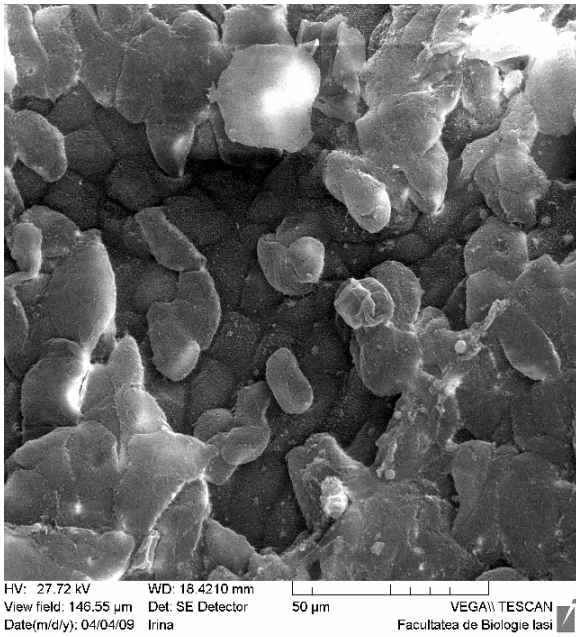


Figura 17 – Zona inflamată în apropierea unei leziuni codale la crapul oglindă

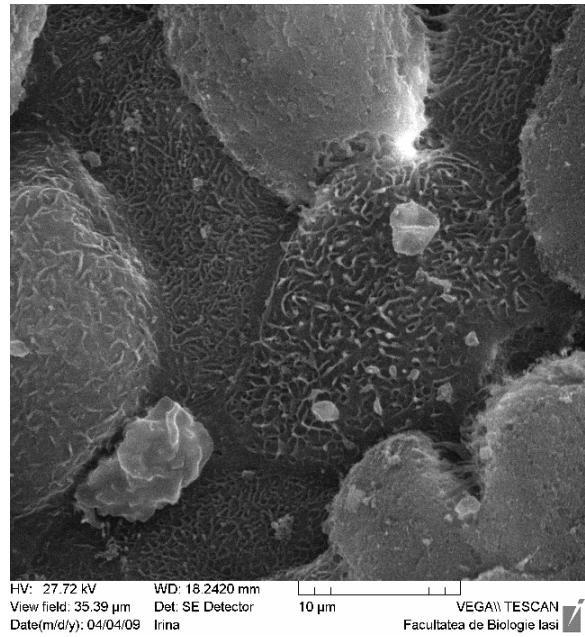
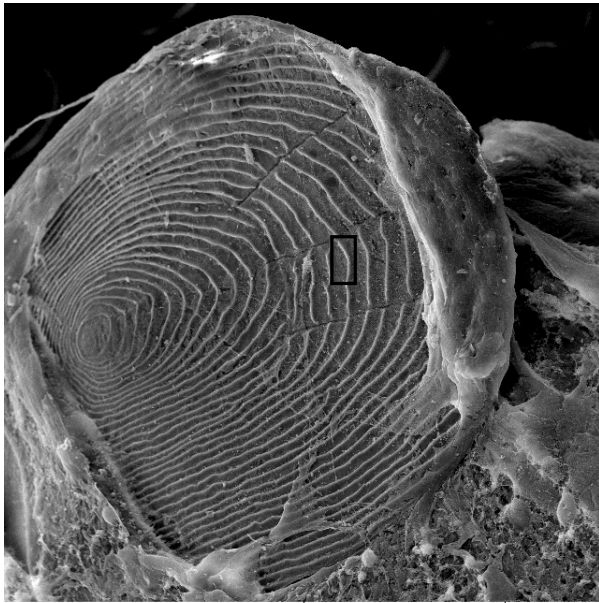
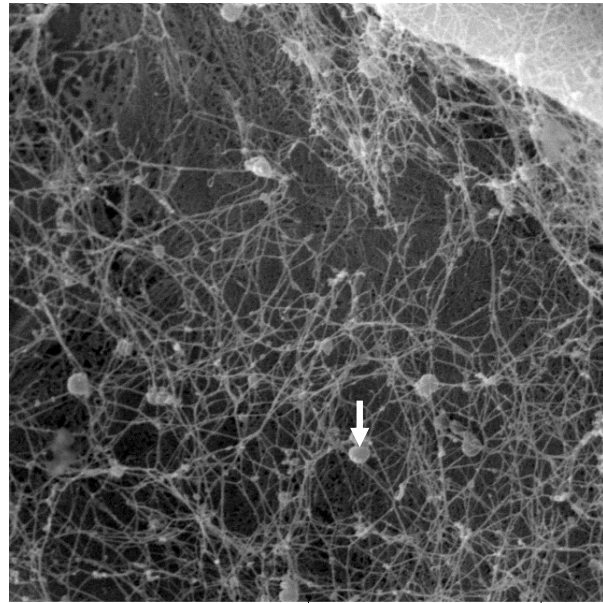


Figura 18 – Zona infl în apropierea unei leziuni codale la crapul oglindă (detaliu)



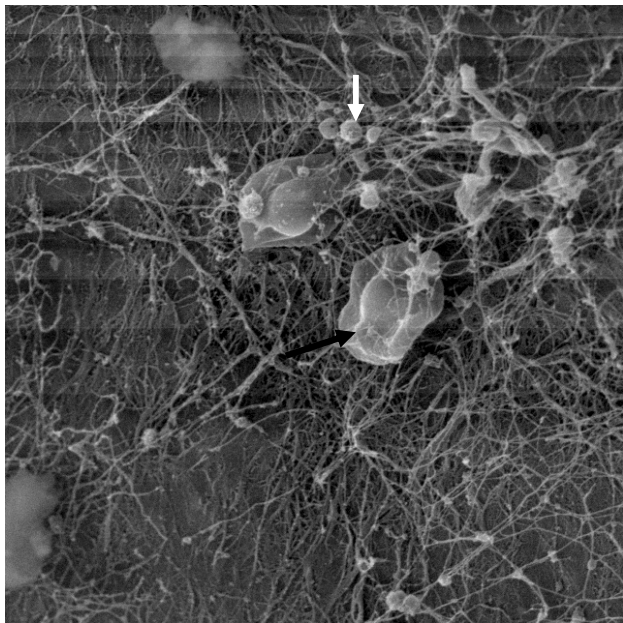
HV: 27.48 kV WD: 7.6742 mm
View field: 1.48 mm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
500 µm VEGA\\ TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 19 – Solz din apropierea zonei inflamata in a unei leziuni codale la crapul oglinda (detaliu)



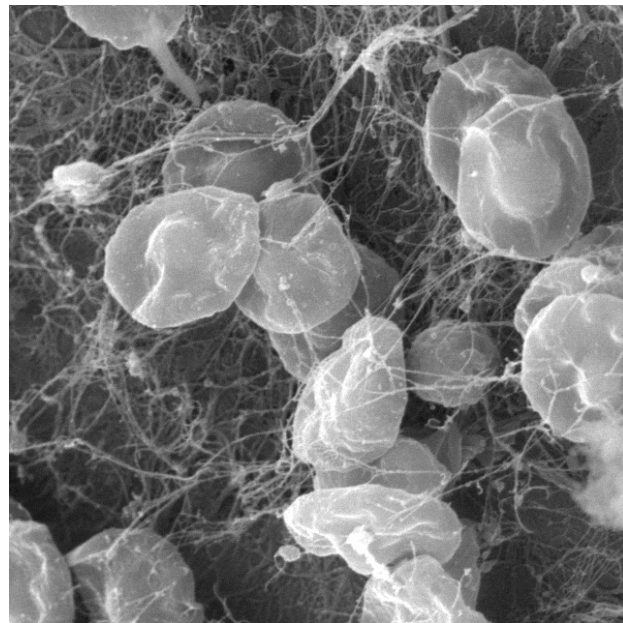
HV: 27.48 kV WD: 7.7801 mm
View field: 25.63 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
10 µm VEGA\\ TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 20 – Solz din apropierea zonei inflamata in a unei leziuni codale la crapul oglinda (detaliu)



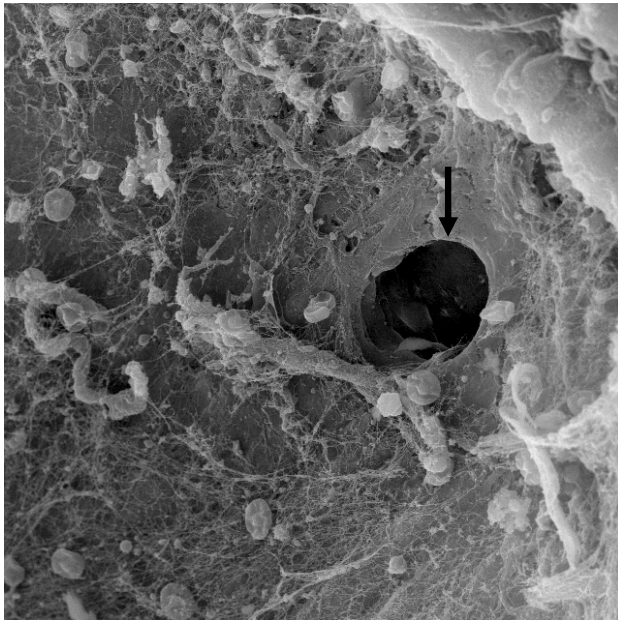
HV: 27.48 kV WD: 7.0864 mm
View field: 30.66 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
10 µm VEGA\\ TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 21 - Leziune codala la crapul oglinda (detaliu) – se observa hematii prinse intr-o retea de fibrina si bacterii sferice (coci) cu dimensiuni de 1 micrometru



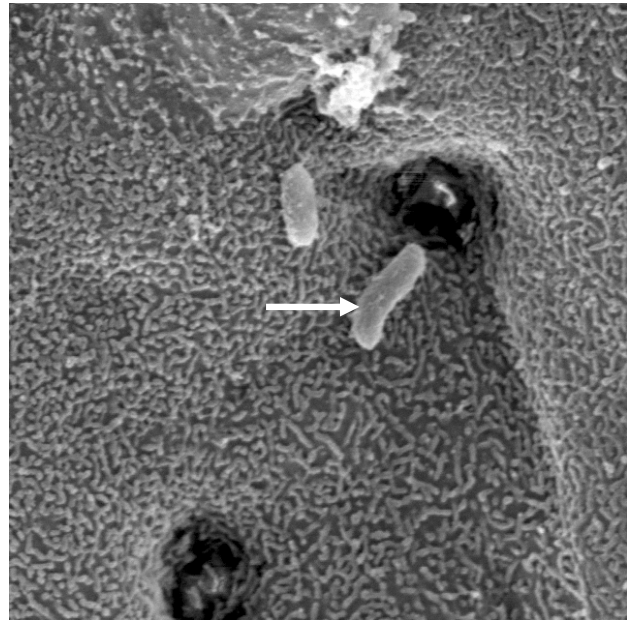
HV: 27.48 kV WD: 7.1135 mm
View field: 24.17 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
10 µm VEGA\\ TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 22 - Leziune codala la crapul oglinda (detaliu) – se observa hematii prinse intr-o retea de fibrina si bacterii sferice (coci) cu dimensiuni de 1 micrometru



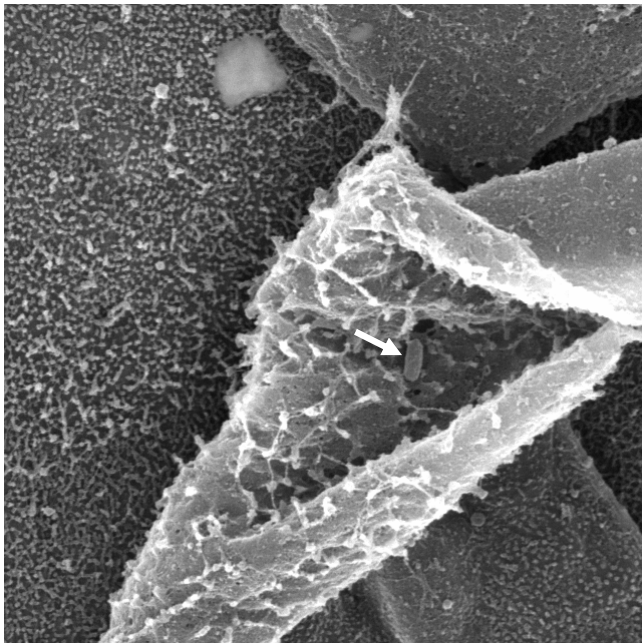
HV: 27.48 kV WD: 7.0587 mm
View field: 113.95 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
50 µm VEGA\\TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 23 – Leziune codala la crapul oglinda – celula secretoare de mucus



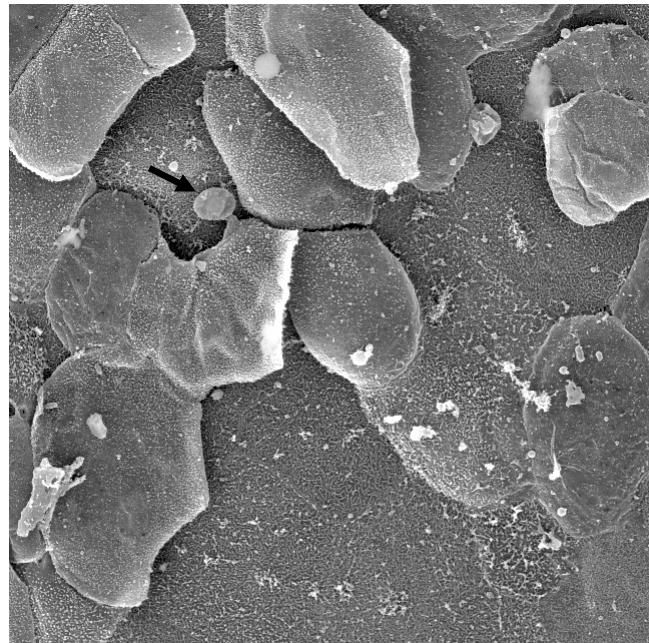
HV: 27.56 kV WD: 9.6439 mm
View field: 17.21 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
5 µm VEGA\\TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 24 – Regiune din apropierea unei leziuni mari la crapul oglinda – celula secretoare de mucus si bacterii (bacilli) fixate in apropierea acesteia



HV: 27.56 kV WD: 9.6063 mm
View field: 30.10 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
10 µm VEGA\\TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 25 – Regiune inflamata din apropierea unei leziuni mari la crapul oglinda – celula epidermica descumata cu bacili



HV: 27.56 kV WD: 9.7031 mm
View field: 97.93 µm Det: SE Detector
Date(m/d/y): 11/25/09 Irina
20 µm VEGA\\TESCAN
Facultatea de Biologie Iasi

Figura 26 – Regiune inflamata din apropierea unei leziuni mari la crapul oglinda – celule epidermice descumate; sunt prezente hematii

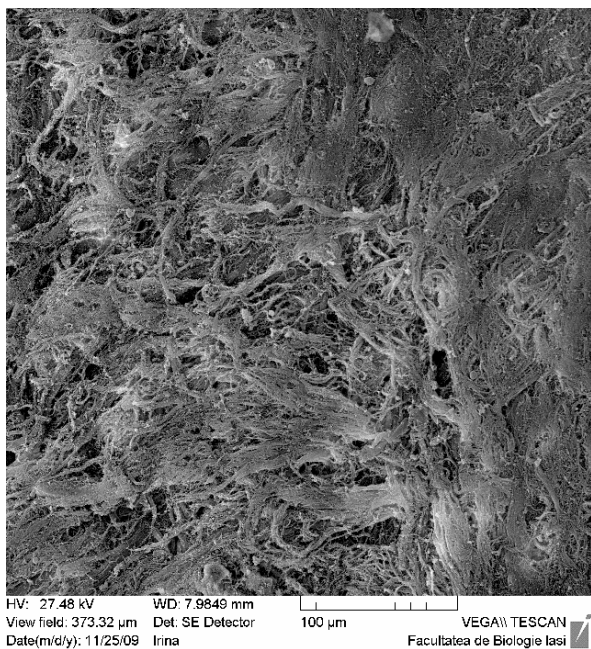


Figura 27 – Leziune dorsala la crapul oglanda (ansamblu)

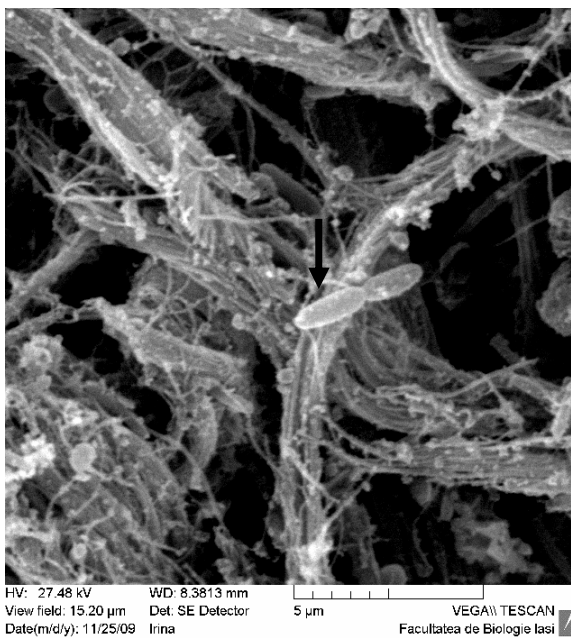


Figura 28 – Leziune dorsala la crapul oglanda (detaliu) – se observa bacilli in diviziune

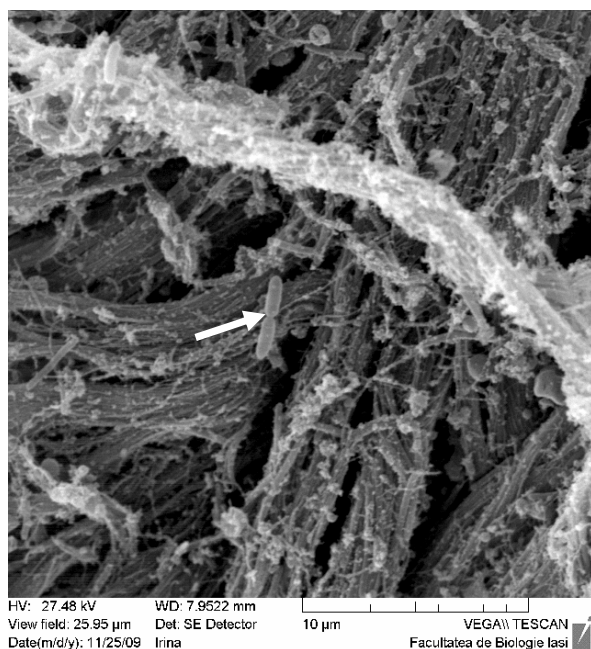


Figura 29 – Leziune dorsala la crapul oglanda (detaliu) – se observa bacilli in diviziune

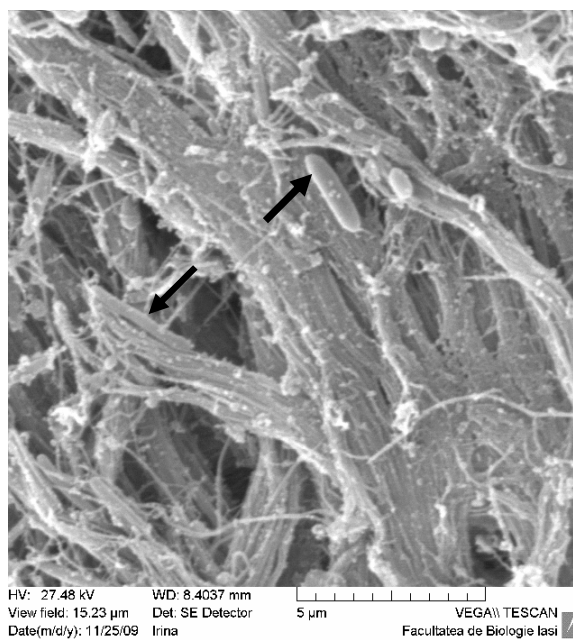


Figura 30 – Leziune dorsala la crapul oglanda (detaliu) – se observa numerosi bacilli in leziune

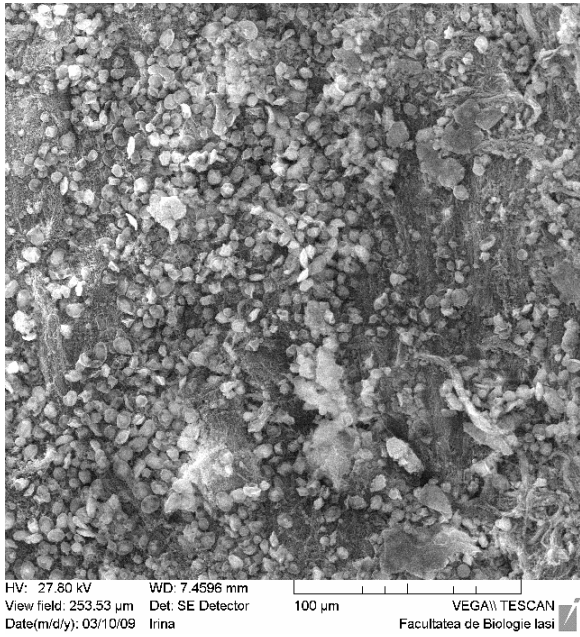


Figura 31 – Leziune dorsala mare la crapul oglinda (ansamblu)

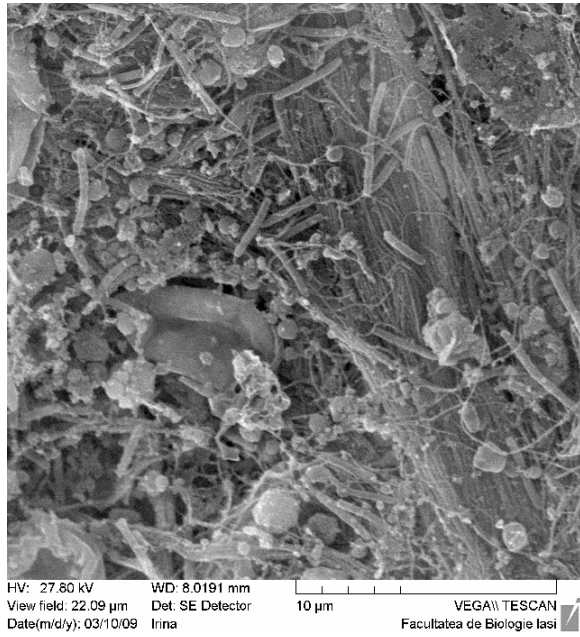


Figura 32 – Leziune dorsala mare la crapul oglinda (detaliu)

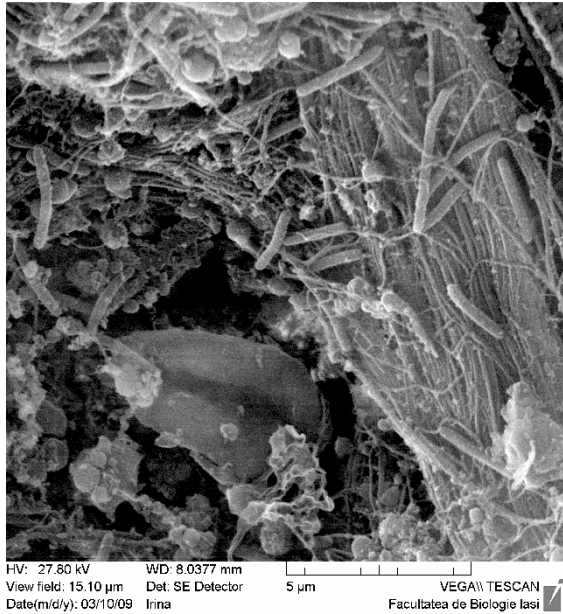


Figura 33 – Leziune dorsala mare la crapul oglinda (detaliu)

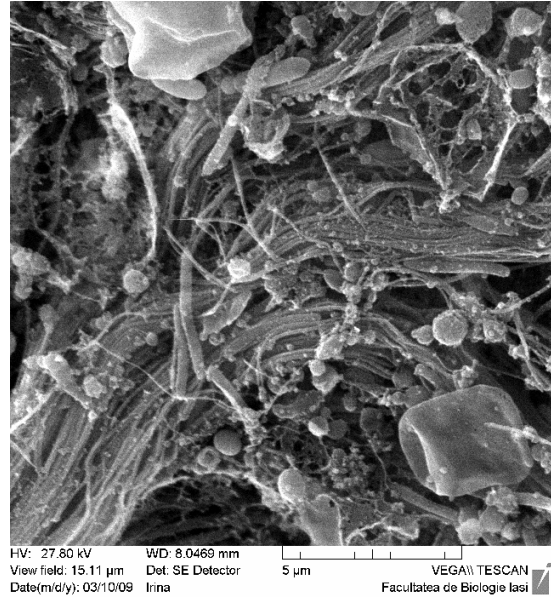


Figura 34 – Leziune dorsala mare la crapul oglinda (detaliu)

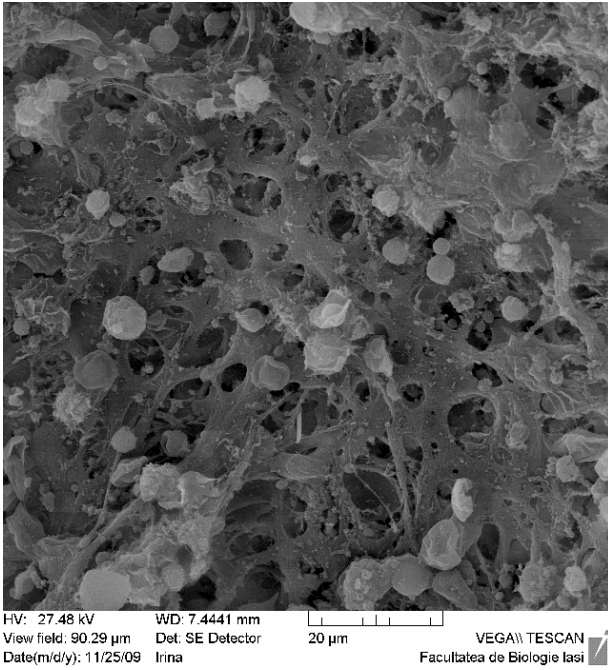


Figura 35 – Leziune codala vindecata la crapul oglinda (ansamblu)

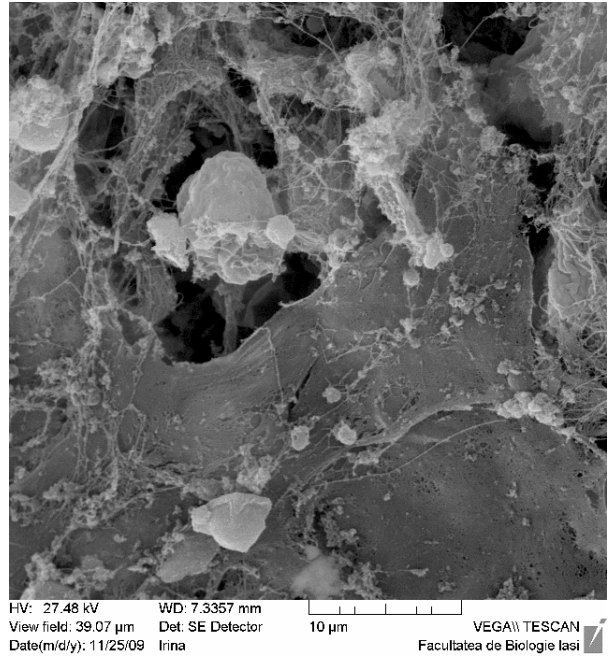


Figura 36 – Leziune codala vindecata la crapul oglinda (detaliu)

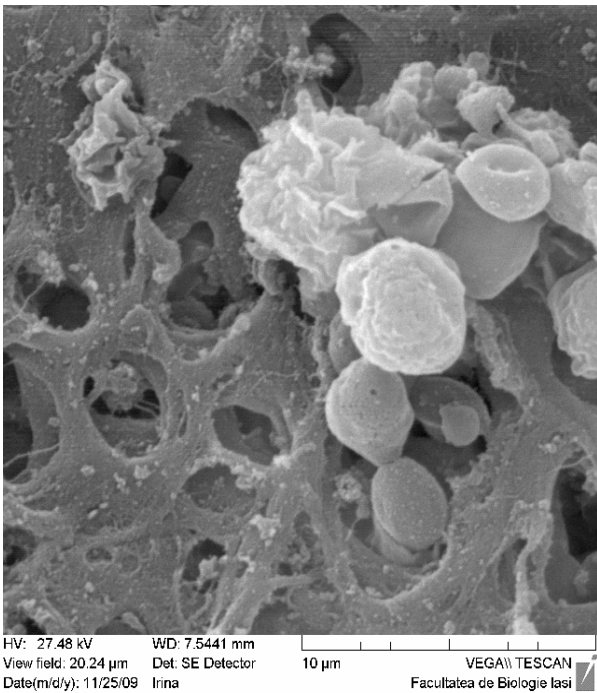


Figura 37 – Leziune codala vindecata la crapul oglinda (detaliu)

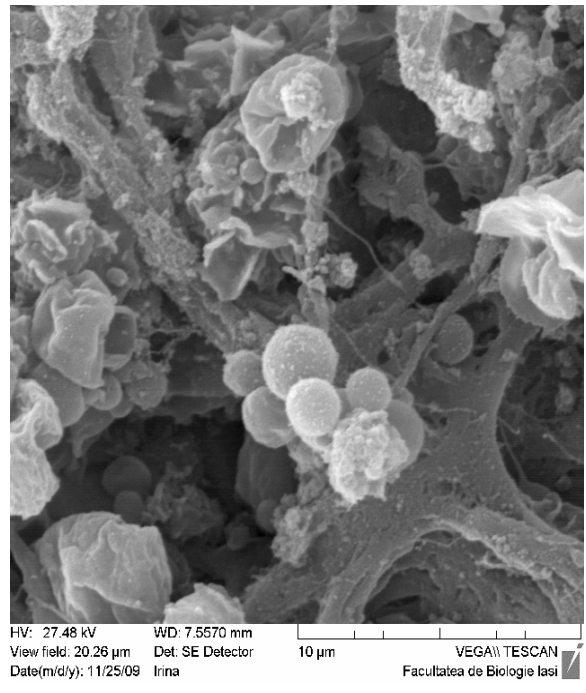


Figura 38 – Leziune codala vindecata la crapul oglinda (detaliu)

În ceea ce privește branhiile s-a observat că suprafața epiteliului lamelar este neregulată, așa cum suprafața epidermei prezintă microvili distinctivi. Aceste neregularități ajută la atașarea mucusului cuticular, care în plus față de rolul său de a reduce infecțiile și abrazivitatea, are un important rol în reglarea schimbului de gaze, apă și ioni. Fiecare lamelă este considerată a fi mai degrabă un înveliș subțire de celule ale cărui suprafețe, două la număr, sunt susținute (sau cel mai probabil, unite) cu ajutorul unor celule de susținere.

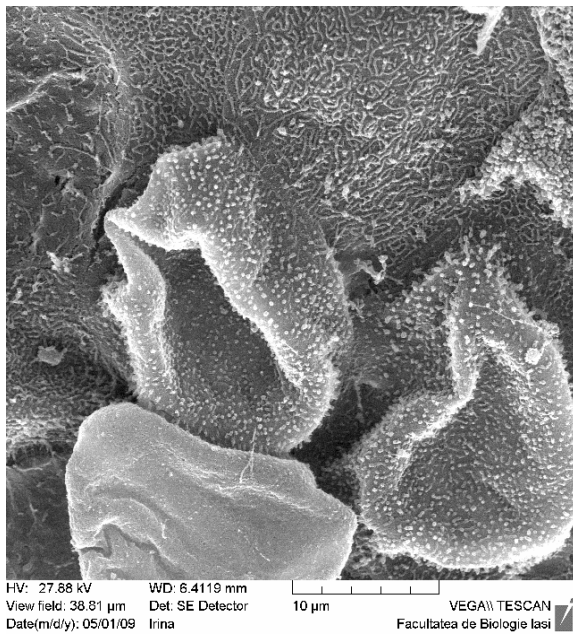


Figura 43 – Zona din apropierea leziunii – celule epidermice inflamate

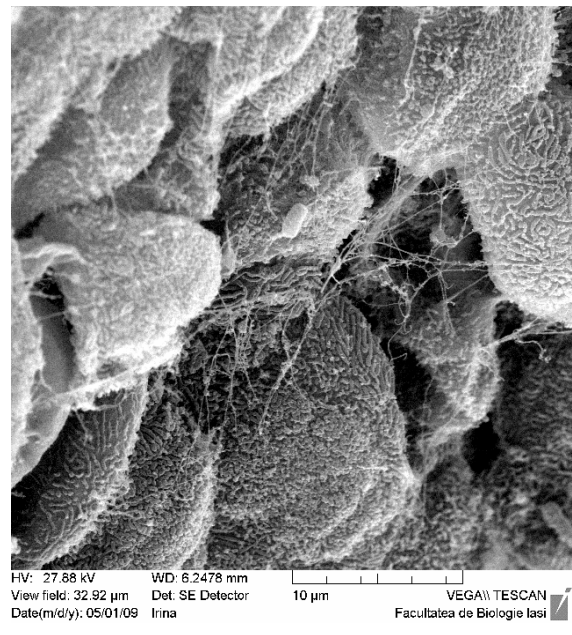


Figura 44 – Zona din apropierea leziunii – celule epidermice inflamate

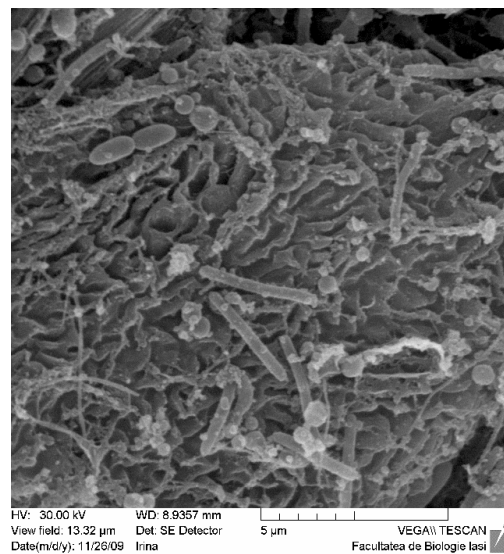


Figura 45 – Leziune dorsala mare la crapul oglinda (detaliu)

Figura 46 – Leziune dorsala mare la crapul oglinda (detaliu)

Cu ajutorul microscopului SEM se pot analiza aspectele lezionale induse de bacterii la nivelul tegumentului, înotătoarelor, al branhiilor sau al epiteliului intestinal. În acest fel se pot aduce informații suplimentare asupra modului de penetrare a organismului infectat de către agentul patogen.

5. Concluzii

Apariția îmbolnăvirilor în perioada posthibernală, la temperaturi ale apei inferioare confortului termic al peștilor, stoparea pierderilor concomitent cu creșterea temperaturii mediului și tabloul lezional pledează pentru diagnosticul de viremie de primăvară.

Diagnosticul bacteriologic este cel de septicemie cu *A. hydrophila* și *Aeromonas caviae* (aeromonoză, boala aeromonadelor mobile). Este posibilă evoluția concomitentă a celor două maladii, aeromonoză evoluând deseori ca o complicație a viremiei de primăvară.

Factorii care au favorizat declanșarea și evoluția infecțiilor diagnosticate au fost temperatura scăzută a apei, care reduce până la anulare activitatea sistemului imun, în asociere cu stresul de manipulare și cel de transport.

Aeromonas hydrophila este un microorganism larg raspindit in toate tipurile de ape investigate, ponderi semnificativ crescute evidentiindu-se in anotimpul cald. *Pseudomonas aeruginosa* a fost izolat sporadic si in cantitati mici, intr-o relatie de proportionalitate inversa fata de nivelul contaminarii fecale.

Rezultatele acestui studiu releva o variatie importanta a nivelului contaminarii apei cu indicatori de poluare fecala recenta (bacterii coliforme, *Escherichia coli*, enterococi) in functie de distributia situs-urile de recoltare a probelor, risc crescut fiind identificat in zona de evacuare a bazinelor piscicole. Valori crescute ale contaminarii apelor piscicole cu bacterii coliforme, *Escherichia coli* si enterococi au fost constatate in sezonul rece ce a evoluat cu precipitatii abundente.

Examinarea histologica a adus aspecte privind leziunile microscopice in bolile infectioase diagnosticate la crapul de cultura si la alte ciprinide ca: hiperplazia celulelor mucoase, inflamatie limfohistiocitara si necroza cutanata, distrofia balonizantă a dermului în asociere cu supraîncărcarea cu hemosiderină a celulelor epidermice, infiltrații edematoase musculare, infiltrații celulare limfohistiocitare subcutane.

Examenul electronomicroscopic al pielii a prezentat aspecte particulare ale celulelor epidermale, cu mici proeminente si aspect general de amprenta digitalak deschiderea porilor celulelor secretoare, ca niste cratere.

Examenul electronomicroscopic al branhiilor prezinta suprafata epiteliului lamelar neregulată – microviliile cu rol in captarea mucusului cuticular ce reduce infectiile și abrazivitatea. S-au decelat aspecte morfologice ale lamelelor primare si secundare, remarcandu-se in premiera la crap, deschiderea porilor celulelor mucoase.

În concluzie, cu ajutorul microscopului SEM se pot analiza aspectele lezionale induse de bacterii la nivelul tegumentului, înotătoarelor, al branhiilor sau al epiteliului intestinal. În acest fel se pot aduce informații suplimentare asupra modului de penetrare a organismului infectat de către agentul patogen.

Rezultate exprimate în lucrări științifice:

1. Lazăr M., Vulpe V., Guguianu Eleonora, Oprean O.Z., 2009 - *Aspecte epidemiologice privind bolile peștilor de fermă din Moldova*, Lucr. Șt. USAMV-FMV, Vol. 52 (11), Partea a II-a, pg. 974-980, Iași.

2. Guguianu Eleonora, Vulpe V., Rîmbu Cristina, Roșca Liliana, Lazăr M., 2009 - *Aeromonoză de primăvară la ciprinidele de crescătorie*, Lucr. științifice, Simp. „Progrese și perspective în medicina Veterinară”, Vol. 52 (2), pg. 953-956, Iași.

3. Vulpe V., Gostin Irina, Minea Manuela, Guguianu Eleonora, Lazăr M., 2009 – *Infecții cutanate și leziuni produse de acestea la crapul de cultură *Cyprinus carpio**. Simp. FMV București.

4. Gostin Irina, Vulpe V., Minea Manuela, Guguianu Eleonora, Lazăr M., Sarli G., Oprean O.Z., 2010 - SEM investigations regarding bacterial infections in *Cyprinus carpio*. *Analele Științifice ale Universității "Al I. Cuza", Iași, ser. Biologie animală*, 55, 2010 (in press, ISI Index).

Bibliografie

1. Ahne W., Bjorklund H.V., Essbauer S., Fijan N., Kurath G., Winton J.R. - *Spring viremia of carp (SVC)*. Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 52, pg. 261-272, 2002 Austin B. 2006 - *The bacterial microflora of fish, revised*. The Scientific World Journal 6, pg. 931-934;
2. Altwege, M., A.G. Steigerwalt – *Biochemical identification of Aeromonas spp. isolated from humans*, Journal of Clinical Microbiology, 1990, vol. 28, No. 2, 258-26
3. Austin B., Austin D.A., 2007 - *Bacterial fish pathogens. Diseases of farmed and wild fish*. Fourt edition. Praxis, Publishing Ltd, chichester, UK;
4. Buller N.B., 2003 - *Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual*, Cabi Publishing, UK;
5. Di Bari, H. E. Hachich, M. J. Melo Adalgisa, I. Z. M. Sato – *Aeromonas spp. and microbial indicators in raw drinking water sources*, Brazilian Journal of Microbiology, 2007, vol. 38, 516 – 521.
6. Ferguson H.W. - *Systemic Pathology of Fish*, Published by Scotian Press, UK, 2006;
7. Genten F., Terwinghe E., Danguy A. 2009 - *Atlas of Fish Histology*, Department of Histology and Biopathology of Fish Fauna, Université Libre de Bruxelles (U.L.B.), Brussels;
8. Golas, I., Z. Filipkowska, D. Lewandowska – Potentiality contamination of Enterobacteriaceae, Pseudomonas spp. and Aeromonas spp. in raw drinking water sources, Polish Journal of Environmental Studies, 2002, vol. 11, No. 4, 325-330
9. P. Legnani, E. Leoni, F. Soppelsa – *The occurrence of Aeromonas spp. In drinking water supplies of an area of the Dolomite Mountains – Italy*, Journal of Applied Microbiology, 1998, vol. 85, 271-278
10. Munteanu Gabriela, Bogatu D., 2003 - *Tratat de ihtiopatologie*, Ed. Excelsior Art, Timișoara
11. Noga E.J., 2000 - *Fish disease - Diagnosis and treatment*, Blackwell Publishing, Iowa, USA;
12. Rahman, M., G. Huys, M. J. Albert – *Persistence, transmissin and virulence characteristics of Aeromonas strains in a duckweed aquaculture - based Hospital sewage water recycling plant in Bangladesh*, Appl. Environ. Microbiology, 2007, vol. 73, No. 5, 1444-1451
13. Okinbowab, O. L., M. D. Barton, H. Peng – *Antimicrobial resistance in bacterial isolated from aquaculture sources in Australia*, Journal of Applied Microbiology, 2006, vol. 100, 1103-1113
14. Oprean O.Z., 1998 - *Morfopatologie generală veterinară*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași;
15. Oprean O.Z., 2002 - *Morfopatologie specială veterinară*, Ed. Evcont-Consulting, pg. 156-160, Suceava
16. Roberts R. J., 2003 - *Fish pathology*. Bailliere Tindall, 2nd edition, London
17. Sharon Abbott, Wendy K. N. Cheng – *The genus Aeromonas: biochemical characteristic, atypical reactions and phenotypic identification schemes*, Journal of Clinical Microbiology, 2003, vol. 41, No. 46, 2348 – 2357
18. Woo P.T.K. and Bruno D.W., 2003 - *Fish diseases and Disorders - Vol. 3 - Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Ed. CABI Publishing, London, UK;
19. ISO 19458: 2007 - *Calitatea apei; Prelevarea pentru analiza microbiologică*.
20. ISO 9308-1: 2004 - *Detectia și numărarea de Escherichia coli și de bacterii coliforme; partea 1 - metoda prin filtrare pe membrană*.
21. ISO 7899-2: 2004 - *Detectia și numărarea enterococilor; partea 1-metoda prin filtrare pe membrană*
22. ISO 12780: 2003 - *Calitatea apei: Detectarea și numărarea Pseudomonas aeruginosa prin filtrarea pe membrană*
23. EPA 1605: 2001 – *Aeromonas spp. in finished water by membrane filtration using ampicillin-dextrin agar*

