



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Ανάπτυξη πειραματικού αυτεμβολίου έναντι
παθογόνων βακτηρίων σε εκτρεφόμενα λαβράκια
(*Dicentrarchus labrax*)**

Σμυρλή Μαρία

Ηράκλειο, 2014



UNIVERSITY OF CRETE
POST GRADUATE STUDIES PROGRAM
ENVIRONMENTAL BIOLOGY AND MANAGEMENT OF TERRESTRIAL
AND MARINE RESOURCES

Master of Science Thesis

**Development of experimental autogenous vaccine
against bacteria pathogenic to intensively cultured
seabass (*Dicentrarchus labrax*)**

Smyrli Maria

Heraklion, 2014

Εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής

Μιχάλης Παυλίδης (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Κωνσταντίνος Μυλωνάς (Ερευνητής Α' Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας,
Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ)

Παντελής Καθάριος (Ερευνητής Γ' Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας,
Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ)

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	6
Περίληψη	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Υδατοκαλλιέργειες.....	11
1.2. Βακτηριακές ασθένειες στις ιχθυοκαλλιέργειες	13
1.3. Αντιμετώπιση βακτηριακών ασθενειών στις ιχθυοκαλλιέργειες.....	15
1.3.1. Θεραπεία	15
1.3.2. Πρόληψη.....	17
1.4. Ασθένειες και πρόληψη ασθενειών από είδη <i>Aeromonas</i>	22
1.5. Προβλήματα και εναλλακτικές λύσεις στην αντιμετώπιση ασθενειών	24
1.6. Σκοπός της εργασίας.....	26
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	27
2.1. Περιγραφή της ασθένειας	28
2.2. Πειραματικός σχεδιασμός	32
2.3. Βακτηριακά στελέχη	33
2.4. Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση του παθογόνου.....	34
2.4.1. Θρεπτικά υποστρώματα	34
2.4.2. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός.....	34
2.4.3. Μοριακός χαρακτηρισμός	37
2.4.4. Δοκιμασίες χημικής ευαισθησίας.....	42
2.4.5. Μελέτη της αύξησης.....	43
2.4.6. Παράγοντες μολυσματικότητας	44
2.5. Παρασκευή εμβολίου αδρανοποιημένης βακτηρίνης.....	45
2.6. Έλεγχος της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών	47
2.6.1. Μέτρηση λυσοζύμης στον ορό του αίματος	48
2.6.2. Προσδιορισμός τίτλου αντισωμάτων – ELISA.....	51
3. Αποτελέσματα	55
3.1. Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση του παθογόνου.....	56
3.1.1. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός.....	56

3.1.2.	Μοριακός χαρακτηρισμός	61
3.1.3.	Δοκιμασίες χημικής ευαισθησίας.....	65
3.1.4.	Μελέτη της αύξησης.....	66
3.1.5.	Παράγοντες μολυσματικότητας	68
3.2.	Έλεγχος της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών	70
3.2.1.	Μέτρηση Λυσοζύμης στον ορό του αίματος	70
3.2.2.	Προσδιορισμός τίτλου αντισωμάτων	72
4.	Συζήτηση	74
	Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	88
	Βιβλιογραφία	90

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Παυλίδη Μ. που δέχτηκε να επιβλέψει την πτυχιακή μου εργασία και τον κ. Μυλωνά Κ. που δέχτηκε να συμμετάσχει στην εξεταστική επιτροπή, για τις συμβουλές και την καθοδήγηση τους όποτε τις χρειάστηκα.

Τον καθηγητή μου από το προπτυχιακό, Πουλακάκη Ν. που με στήριξε στη νέα πορεία που διάλεξα και τον Λυμπεράκη Π. από το Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Κρήτης για τη στήριξη στο πρώτο έτος του μεταπτυχιακού μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις Ντότσικα Ε., Κουτσώνη Ο. και τον Κυριαζή Γ. για την επίβλεψη και πολύτιμη συνεισφορά τους στις ανοσολογικές τεχνικές, την υποδοχή και τη φιλοξενία τους στο εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, τμήμα Μικροβιολογίας, του Ινστιτούτου Pasteur της Αθήνας.

Στη Ντίνα Κοκκάρη, για τη καθημερινή βοήθεια και την κατανόηση της στους διάφορους προβληματισμούς της δουλειάς και όχι μόνο.

Στα παιδιά από το εργαστήριο Παναγιώτη, Μαριάννα, Roberto και JJ για τη βοήθεια τους όποτε αυτή χρειάστηκε και κυρίως για το πολύ ευχάριστο καθημερινό κλίμα, απαραίτητο στις ατελείωτες ώρες που περάσαμε μαζί.

Σε όλο το προσωπικό του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών για το οικείο και ευχάριστο περιβάλλον που έχουν δημιουργήσει εκεί.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους μου Πασχαλιά, Μαργαρίτα, Λιάνα, Κώστα και Μάκη που χωρίς αυτούς δε θα είχα ολοκληρώσει την διατριβή αυτή.

Ευχαριστώ όλους τους υπόλοιπους φίλους και φίλες που παρά την απόσταση που συχνά μεσολαβεί είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν ηθικά κάνοντας τα όλα πιο εύκολα.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου που στέκεται δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και με στηρίζει με κάθε δυνατό τρόπο χωρίς αμφιβολίες, περιστροφές και συγκρίσεις.

Και τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Παντελή που μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο αντικείμενο που ήθελα, που πίστεψε σε μένα και με στήριξε όλον αυτό τον καιρό σε ΟΛΑ και χωρίς αυτόν, πραγματικά τίποτα από όλα αυτά δε θα είχε πραγματοποιηθεί.

Περίληψη

Σκοπός της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση παθογόνων βακτηριακών στελεχών, που προκαλούν θνησιμότητες και νοσηρότητα σε εκτρεφόμενα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*), με αρχική διάγνωση που αφορούσε στέλεχος *Aeromonas* sp. και η ανάπτυξη πειραματικού αυτεμβολίου για την αντιμετώπιση της σχετιζόμενης με αυτά ασθένειας. Η προς διερεύνηση ασθένεια, εμφανίζεται συστηματικά τα τελευταία χρόνια και προσβάλει ψάρια εμπορικού μεγέθους. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενή λαβράκια, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν με φαινοτυπικούς δείκτες και μοριακά εργαλεία. Ο αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας προσδιορίστηκε ως στέλεχος *Aeromonas veronii*, είδος που δεν έχει αναφερθεί ξανά στο λαβράκι. Ένα από τα στελέχη χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή πειραματικού αυτεμβολίου και μελετήθηκε εκτενέστερα. Μελετήθηκαν επιπλέον, η μολυσματικότητα και η απόκριση του σε αντιβιοτικά καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες αύξησης. Παρασκευάστηκε εμβόλιο αδρανοποιημένης βακτηρίνης το οποίο χορηγήθηκε σε λαβράκια, σε συγκέντρωση 10^7 και 10^9 κύτταρα ml^{-1} , με ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Η ανοσολογική απόκριση των εμβολιασμένων ψαριών μελετήθηκε βάσει της ενεργότητας της λυσοζύμης στον ορό και του τίτλου αντισωμάτων για συνολικά 75 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Ο τίτλος αντισωμάτων ανιχνεύθηκε στις δύο συγκεντρώσεις βακτηρίνης σε αραιώσεις 1:1000-1:8000. Σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου προκύπτουν μεταξύ $14^{\text{ης}}$ - $44^{\text{ης}}$ ημέρας στη συγκέντρωση βακτηρίνης 10^9 κύτταρα ml^{-1} , διάστημα στο οποίο ο τίτλος αντισωμάτων παραμένει σταθερός και σε επίπεδα που μπορεί να συγκριθούν με εμβόλια που περιέχουν ανοσοενισχυτικά. Δεν προέκυψε μεταβολή της συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Τα αποτελέσματα της εργασίας συνηγορούν σε επίτευξη ανοσίας εφόσον το εμβόλιο χορηγηθεί τουλάχιστον 2 εβδομάδες πριν την αναμενόμενη έξαρση της ασθένειας, σε συγκέντρωση βακτηρίνης 10^9 κύτταρα ml^{-1} . Ωστόσο, είναι απαραίτητη η πειραματική επιμόλυνση εμβολιασμένων λαβρακίων για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του εμβολίου βάσει το σχετικού ποσοστού επιβίωσης των ψαριών (relative percent survival-RPS).

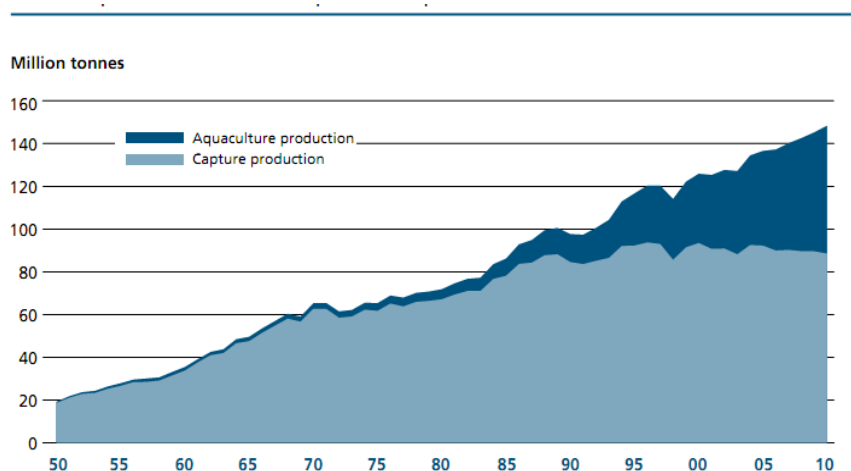
Abstract

The purpose of this study was the characterization and identification of a bacterial pathogen causing mortality and morbidity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*), initially identified as *Aeromonas* sp. and the development of an experimental autogenous vaccine to confront the related disease. The particular disease occurs regularly in recent years and affects fish of commercial size. The bacterial strains that were isolated from diseased seabass were identified and characterized by phenotypic markers and molecular tools. The causative agent of the disease was determined as an *Aeromonas veronii* strain, a species not previously reported in sea bass. One of the strains was used for the preparation of an experimental autogenous vaccine and infectivity, response to antibiotics and optimal growth conditions were further studied. An inactivated bacterin vaccine was prepared and intraperitoneally injected to seabass fish in concentrations of 10^7 and 10^9 cells ml^{-1} . The immune response of the vaccinated fish was studied based on serum lysozyme activity and specific antibody titer for 75 days post-vaccination. Antibody titer was detected in both bacterin concentrations at dilutions ranging from 1:1000-1:8000. Significant differences compared to the control group (unvaccinated fish), were detected between days 14th to 44th in bacterin concentration 10^9 cells ml^{-1} , a time period for which, antibody titer remains constant and may be compared with adjuvanted vaccines. There was no change in the concentration of lysozyme. The results of this work suggest that immunity can be achieved as long as the vaccine is administered at least two weeks before the expected outbreak of the disease, in bacterin concentration of 10^9 cells ml^{-1} . However, a challenge experiment is necessary in order to assess the vaccine's efficacy of protection (relative percent survival-RPS).

1. Εισαγωγή

1.1. Υδατοκαλλιέργειες

Ενώ η αλιευτική παραγωγή παραμένει σχεδόν σταθερή από το 2001 και μετά (90 εκατομμύρια τόνοι ετησίως), η συνολική παραγωγή ψαριών, μαλακίων κ.λπ. αυξάνεται παγκοσμίως με ταχείς ρυθμούς (Εικόνα 1.1). Η αύξηση οφείλεται στην δραματική ανάπτυξη του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών που τις τρεις τελευταίες δεκαετίες (1980-2000) σημειώνει μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης της τάξεως του 8.8% [1]. Αν και ο ρυθμός αυτός έχει μειωθεί (6.3% τη δεκαετία του 2000) συγκριτικά με τις δεκαετίες του 1980 (10.8%) και του 1990 (9.5%), οι υδατοκαλλιέργειες παραμένουν ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος κλάδος της ζωικής παραγωγής τροφίμων συμβάλλοντας με ποσοστό 45.6% το 2008 [2] στην παγκόσμια παραγωγή ψαριών για κατανάλωση από τον άνθρωπο.



Εικόνα 1.1. Η εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγής από την αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες μεταξύ 1950-2010 (FAO, 2012).

Η αύξηση της παραγωγής, η αναγνώριση της διατροφικής αξίας των ψαριών και ο ολοένα αυξανόμενος ανθρώπινος πληθυσμός, έχουν οδηγήσει σε δραματική αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης ψαριών τις τελευταίες 5 δεκαετίες καταγράφοντας μέσο ετήσιο ρυθμό αύξησης 3.2% μεταξύ 1961-2009 [1]. Αν και η συνεισφορά της θαλάσσιας αλιείας στη συνολική παραγωγή παραμένει υψηλή (49% της συνολικής παραγωγής ψαριών το 2009), πρόσφατες εκτιμήσεις που αφορούν το 70% της παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής μεταξύ

1974-2009, δείχνουν ότι η υπερεκμετάλλευση των αποθεμάτων ακολουθεί ανοδική τάση και το 2009 το 29.9% αυτών φαίνεται να έχει ήδη εξαντληθεί, ενώ το 57,4% εκμεταλλεύονται ήδη στο έπακρο [3]. Τα παραπάνω οδηγούν σε μια συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για τα προϊόντα ιχθυοκαλλιεργειών και καθιστούν αναγκαίο να ξεπεραστούν τα προβλήματα όπως οι ασθένειες, που δρουν περιοριστικά στην αύξηση της παραγωγής.

Σήμερα εκτρέφονται περισσότερα από 600 είδη σε 190 χώρες, μεταξύ των οποίων οι κύριες παραγωγοί είναι οι: Κίνα, Ινδία, Βιετνάμ, Ινδονησία, Μπαγκλαντές, Ταϊλάνδη, Μιανμάρ, Φιλιππίνες, Ιαπωνία, Αίγυπτος, Χιλή και Νορβηγία [1,4]. Το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής αφορά ψάρια του γλυκού νερού (56,4%), και ακολούθως μαλάκια, οστρακοειδή και σολομοειδή, ενώ τα θαλάσσια είδη ψαριών αφορούν μόνο το 3.1% αυτής [1]. Μερικά από τα θαλάσσια είδη ιχθύων που καλλιεργούνται είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), ο καλκάνι (*Psetta maxima*), ο κέφαλος (*Mugil cephalus*), το μαγιάτικο (*Seriola dumerilli*), η σφυρίδα (*Epinephelus* sp.), ο βακαλάος (*Gadus* sp.), ο τόνος (*Thunnus thunnus*) κ.α. [1,2]. Μεταξύ αυτών, η παραγωγή εκτρεφόμενων λαβρακίων και τσιπούρας ξεπερνάει κατά πολύ την αλιευτική απόδοση [5], ενώ τα αποθέματα και των δύο ειδών θεωρούνται πλέον υπεραλιευμένα [3].

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις 5 μεγαλύτερες χώρες παραγωγούς της Ευρώπης [1] με την παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες να ανέρχεται στους 142.000 τόνους το 2011 [4]. Το 95% της συνολικής παραγωγής αποτελείται από τσιπούρα και λαβράκι και η Ελλάδα κατέχει τα υψηλότερα ποσοστά παραγωγής στην Ευρώπη, ακολουθούμενη από την Τουρκία. Σε μικρά ποσοστά καλλιεργείται η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*), το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), ο κέφαλος κ.α. [5,6,7].

1.2. Βακτηριακές ασθένειες στις ιχθυοκαλλιέργειες

Οι μολυσματικές ασθένειες από παθογόνα βακτήρια, ιούς, παράσιτα και μύκητες προκαλούν μαζικές θνησιμότητες και μεγάλες οικονομικές απώλειες στις καλλιέργειες. Στο πρόσφατο παράδειγμα της Χιλής, η μισή παραγωγή σολομού (*Salmo salar*) το 2009 χάθηκε εξαιτίας της λοιμώδους αναιμίας (Infectious Salmon Anemia) και το 2007 οι ασθένειες ήταν η δεύτερη κυριότερη αιτία απωλειών στη βιομηχανία υδατοκαλλιεργειών μετά τις καιρικές συνθήκες [2].

Το κόστος των ασθενειών δεν περιορίζεται στην απώλεια βιομάζας. Οι ασθένειες έχουν παράπλευρα κόστη που σχετίζονται με τα έξοδα θεραπείας, πρόληψης και απολύμανσης, το χαμένο χρόνο παραγωγής, το κόστος εργασίας, το κόστος των νέων αποθεμάτων ψαριών μετά από περιστατικά μαζικής θνησιμότητας κ.α. Επίσης, τα ασθενή ψάρια δεν αφομοιώνουν θρεπτικά στον ίδιο βαθμό με τα υγιή και παρουσιάζουν μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης που σχετίζονται με απώλεια βιομάζας, τροφών και αύξηση του χρόνου παραγωγής με τα συνεπακόλουθα κόστη αλλά και τις συνέπειες στον προγραμματισμό.

Αν και τα άγρια ψάρια είναι μόνιμα εκτεθειμένα σε περιβαλλοντικά μικρόβια, δεν θεωρούνται οργανισμοί ιδιαίτερα επιρρεπείς σε ασθένειες. Ωστόσο, αν και σπάνια, περιστατικά μαζικής θνησιμότητας εξαιτίας παθογόνων μικροοργανισμών καταγράφονται ακόμα και στη φύση, σχετιζόμενα συνήθως με περιβαλλοντικές αλλαγές [8].

Σε συνθήκες αιχμαλωσίας, το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών «δοκιμάζεται» σε διαφορετικό βαθμό από ότι των ψαριών που βρίσκονται στη φύση. Η μεγάλη ανάπτυξη του κλάδου των ιχθυοκαλλιεργειών σχετίζεται μεταξύ άλλων με την υιοθέτηση εντατικών συστημάτων εκτροφής. Τα καλλιεργούμενα ψάρια μεγαλώνουν σε μεγάλες πυκνότητες ατόμων με αποτέλεσμα την επιδείνωση των συνθηκών υγιεινής αλλά και την παρατεταμένη έκθεσή τους σε μεγάλες συγκεντρώσεις μικροβίων. Από τα πρώτα αναπτυξιακά τους στάδια, αντιμετωπίζουν έναν αριθμό στρεσογόνων παραγόντων που σχετίζεται με τους διάφορους χειρισμούς που απαιτούνται για την εκτροφή (μεγάλη ιχθυοφόρτιση, μεταφορά μεταξύ δεξαμενών/κλωβών, εμβολιασμούς κλπ) και μπορεί να προκαλέσουν χρόνιο στρες και να καταστείλουν το ανοσοποιητικό τους σύστημα [8,9]. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τη

συσσώρευση μονάδων εκτροφής σε παράλιες περιοχές με σχετικά ρηχά και μικρή ανανέωση νερά, και την έλλειψη οριοθέτησης μεταξύ μονάδων και μεταξύ ασθενών-υγιών ψαριών μπορεί να οδηγήσουν σε γρήγορη μετάδοση των ασθενειών και μεγάλες θνησιμότητες [10].

Κοινές βακτηριακές ασθένειες των ψαριών είναι οι: δονακίωση (*Vibrio anguillarum*), δοθιήνωση (*Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, *A. salmonicida* ssp. *achromogenes*), βραγχιακή βακτηριδίαση (*Flavobacterium branchiophilum*), εντερική σηψαιμία (*Edwardsiella ictaluri*) και παστερέλωση (*Photobacterium damsela*) [11,12,13,14]. Από αυτές οι κύριες ασθένειες που απασχολούν τις καλλιέργειες τσιπούρας και λαβρακιού στη Μεσόγειο είναι: η δονακίωση, η παστερέλωση και η μυξοβακτηρίωση (*Tenacibaculum maritimum*) [13]. Στο λαβράκι, πιο περιστασιακά αναφέρονται ως παθογόνα τα *V. harveyi* [15], *Mycobacterium* sp. (mycobacteriosis) και *Piscirickettsia salmonis* [13].

Η αντιμετώπιση των ασθενειών αποτελεί βασική προτεραιότητα για τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών καθώς εξάρσεις ασθενειών σε διάφορες περιοχές του κόσμου έχουν επηρεάσει σοβαρά την παραγωγή με επακόλουθες κοινωνικο-οικονομικές και οικολογικές συνέπειες [2]. Η ανάπτυξη της εμπορικής δραστηριότητας γύρω από τα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας και ακολούθως η ανάπτυξη και βελτίωση των δικτύων μεταφοράς είχαν σαν αποτέλεσμα τη διασπορά παθογόνων και ασθενειών, με αποτέλεσμα τεράστιες απώλειες στην παραγωγή, όπως στην περίπτωση του κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) και γαρίδας (*Penaeus monodon*, *P. Vannamei* κ.α.) στην Ασία [16,17]. Παράλληλα, η εισαγωγή νέων ειδών στις καλλιέργειες, παρά τα οφέλη που μπορεί να έχει για την ανάπτυξη του κλάδου, έχει οδηγήσει σε εμφάνιση νέων ασθενειών που μπορεί να μεταφέρονται και σε άλλα εκτρεφόμενα είδη ή να επηρεάζουν άγριους πληθυσμούς.

1.3. Αντιμετώπιση βακτηριακών ασθενειών στις ιχθυοκαλλιέργειες

Κάθε πρόγραμμα ελέγχου μιας ασθένειας περιλαμβάνει δύο άξονες: α) τη θεραπεία των μολυσμένων ατόμων και β) την προστασία των υγιών ατόμων με μέτρα πρόληψης. Ο τρόπος αντιμετώπισης της ασθένειας διαφέρει ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα. Η θεραπεία των βακτηριακών ασθενειών που είναι οι συχνότερα εμφανιζόμενες, βασίζεται κυρίως στη χρήση αντιβιοτικών. Σε επίπεδο πρόληψης χρησιμοποιούνται εμβόλια, προβιοτικά βακτήρια, ανοσοενισχυτικά αλλά και αντιβιοτικά.

1.3.1. Θεραπεία

Η θεραπεία των βακτηριακών ασθενειών βασίζεται στη χρήση αντιβιοτικών. Η δράση τους είναι γενική και άμεση. Παρά το υψηλό κόστος αγοράς η έλλειψη εναλλακτικού τρόπου θεραπείας σε περίπτωση εκδήλωσης της ασθένειας και ο περιορισμένος αριθμός εμπορικών εμβολίων για την πρόληψη των ασθενειών, καθιστά συχνά τη χρήση τους, τη μόνη διαθέσιμη λύση. Στην Ελλάδα, διατίθενται ενισχυμένες σουλφοναμίδες, οξυτετρακυκλίνη, φλορφενικόλη, φλουμεκίνη, αμοξυκιλλίνη και οξαλινικό οξύ [18]. Ο μικρός αριθμός διαθέσιμων αντιβιοτικών και η εκτεταμένη και πιθανά αλόγιστη χρήση τους συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Για τους λόγους αυτούς, η χρήση τους διέπεται από αυστηρούς κανόνες και συστάσεις για την ασφάλεια του περιβάλλοντος και του καταναλωτή [19].

Τα αντιβιοτικά χορηγούνται στα ψάρια κυρίως μέσω της τροφής ή με εμβάπτιση. Η ποσότητα των αντιβιοτικών που δεν αφομοιώνεται από τους οργανισμούς, καταλήγει είτε άμεσα στο περιβάλλον είτε έμμεσα από τις εκκρίσεις τους. Έτσι, ποσότητες αντιβιοτικών (μαζί με άλλα παρασιτοκτόνα και οργανικούς ρύπους) διαχέονται στο περιβάλλον και μπορεί να συγκεντρώνονται στο ίζημα ή παρασυρόμενα από τα ρεύματα, να ανιχνεύονται σε απομακρυσμένες από τις μονάδες εκτροφής περιοχές [10,20]. Η επιλεκτική πίεση που ασκείται στους μικροοργανισμούς από τη χρήση αντιβιοτικών, οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Καθώς η δράση τους δεν είναι ειδική, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας μπορεί να αφορά περισσότερα στελέχη, παθογόνα ή μη. Παράλληλα, τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορεί να μεταφέρονται και με οριζόντια μεταφορά (μέσω σύζευξης, μεταγωγής ή μετασηματισμού), από τα ανθεκτικά στελέχη σε άλλα. Έχει παρατηρηθεί ότι οι πληθυσμοί των ανθεκτικών

βακτηρίων αυξάνονται γύρω από τις μονάδες εκτροφής [10,20], ωστόσο γονίδια ανθεκτικότητας μπορεί τελικά να εντοπίζονται σε απομακρυσμένους από αυτές οργανισμούς και περιοχές [21,22].

Η χρήση αντιβιοτικών επιδρά στην ποικιλότητα και τις σχέσεις ανταγωνισμού της εντερικής μικροχλωρίδας των οργανισμών που τα καταναλώνουν. Έχει παρατηρηθεί, ότι η ποικιλότητα της μικροχλωρίδας του εντέρου των καλλιεργουμένων ψαριών μειώνεται μετά τη χρήση αντιβιοτικών ενώ παράλληλα αυξάνεται το ποσοστό των ανθεκτικών στελεχών [23], καθιστώντας τα έτσι πιο ευάλωτα σε λοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνα. Παράλληλα, τα εκτρεφόμενα ψάρια φαίνεται να συγκεντρώνουν στους ιστούς τους μεγαλύτερες ποσότητες ανθρωπογενών τοξικών ουσιών (αντιβιοτικών, παρασιτοκτόνων κ.α.) σε σχέση με τους άγριους πληθυσμούς [24]. Τα υπολείμματα αντιβιοτικών στη σάρκα, μεταφέρονται στον καταναλωτή και όπως στα ψάρια, διαταράσσουν τη μικροβιακή σύσταση του εντερικού σωλήνα και μπορεί να οδηγήσουν σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας ανθρώπινων παθογόνων [25]. Για τους λόγους αυτούς η χρήση τους δε συνίσταται σε περιόδους κοντά στο χρόνο εξαλίευσης.

Έτσι, το κόστος, των αντιβιοτικών για την ιχθυοκαλλιέργεια και τον καταναλωτή, δεν περιορίζεται στο υψηλό κόστος αγοράς τους. Δεδομένων των ενδεχόμενων αρνητικών συνεπειών στην υγεία και την ποιότητα των καλλιεργούμενων ψαριών, στο περιβάλλον και την υγεία του καταναλωτή, ο σκεπτικισμός των καταναλωτών για τα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας αυξάνεται, γεγονός που επηρεάζει τελικά την εμπορευσιμότητα του προϊόντος.

1.3.2. Πρόληψη

Τα ψάρια βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στο μη ειδικό ανοσοποιητικό τους σύστημα για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών [8]. Ενώ η μη ειδική άμυνα ενεργοποιείται από τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, τα συστατικά του ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος (Β-λεμφοκύτταρα, ανοσοσφαιρίνες) και ιδιαίτερα στα ψάρια του θαλασσινού νερού αναπτύσσονται αργότερα [26]. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι καθοριστικά για την επιλογή της μεθόδου που πρέπει να εφαρμοστεί για την επιτυχή πρόληψη μιας ασθένειας. Για παράδειγμα στο λαβράκι, τα λεμφικά όργανα (πρόνεφρος και θύμος) είναι πλήρως ανεπτυγμένα, και ώριμα Β-λεμφοκύτταρα και ανοσοσφαιρίνες (IgM) εντοπίζονται 50 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση του αυγού [27]. Η χρήση εμβολίων δεν θα είχε νόημα πριν από αυτό το χρονικό σημείο εφόσον στοχεύει στην ενεργοποίηση του ειδικού και μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος και την επίτευξη ειδικής ανοσίας μέσω παραγωγής αντισωμάτων (IgM) και κυττάρων μνήμης (B,T λεμφοκύτταρα). Η πρόληψη λοιπόν βασίζεται στη χρήση ουσιών που διεγείρουν τους μηχανισμούς της μη-ειδικής άμυνας κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και στον εμβολιασμό αργότερα, σε ψάρια με πλήρως ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό σύστημα.

1.3.2.1. Εμβόλια

Αν και η πρώτη επιστημονική αναφορά σε εμβόλιο για ψάρια τοποθετείται στη δεκαετία του '40 το πρώτο εμπορικό εμβόλιο για ψάρια κυκλοφόρησε στην Αμερική το 1976 [28]. Παρόλο που τα εμβόλια χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες μόνο τα τελευταία 20 χρόνια, σήμερα κυκλοφορούν στο εμπόριο εμβόλια για αρκετές από τις σημαντικότερες μολυσματικές ασθένειες [12]. Σε περιπτώσεις όπως του σολομού, η ανάπτυξη εμβολίων για τη δονακίωση και τη δοθηνίωση εξελίχθηκε με μεγάλη επιτυχία, οδήγησε σε μείωση της θνησιμότητας αλλά και της ανάγκης χημικών φαρμάκων.

Τα εμβόλια χορηγούνται με ένεση (ενδοπεριτοναϊκά, ενδομυϊκά), με εμβάπτιση σε αραιωμένο διάλυμα εμβολίου ή μέσω της τροφής. Οι μέθοδοι αυτές έχουν διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που σχετίζονται με το κόστος, τις πρακτικές δυσκολίες κατά τη χορήγηση και την αποτελεσματικότητά τους. Παρά το γεγονός ότι η χορήγηση μέσω της τροφής θα ήταν ίσως η ιδανική πρακτική, παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα που σχετίζονται

με τον έλεγχο της δοσολογίας καθώς δεν τρώνε όλα τα ψάρια την ίδια ποσότητα, μέρος αυτής χάνεται στο περιβάλλον, το αντιγόνο περνώντας από το γαστρεντερικό σωλήνα πέπτεται και αποικοδομείται και επίσης απαιτούνται μεγάλες ποσότητες εμβολίου. Προς το παρόν παρέχουν μόνο μικρής διάρκειας προστασία και με αποτελέσματα που ποικίλουν ανάλογα με την περίπτωση.

Αν και σε επίπεδο έρευνας η χορήγηση εμβολίων μέσω της τροφής συγκεντρώνει ενδιαφέρον, σε επίπεδο πρακτικής εφαρμογής τα εμβόλια χορηγούνται κυρίως σε ενέσιμη μορφή και με εμβάπτιση. Αν και το κόστος σε χρόνο και χρήμα είναι αρκετά υψηλό, η χορήγηση μέσω ένεσης παραμένει η αποτελεσματικότερη εναλλακτική λύση ακολουθούμενη από την εμβάπτιση. Η δόση είναι ελεγχόμενη και ίδια μεταξύ των ψαριών και απαιτείται μικρή ποσότητα εμβολίου ανά ψάρι. Ωστόσο, είναι χρονοβόρα διαδικασία και χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό για την εφαρμογή της. Η εμβάπτιση παρέχει καλά επίπεδα προστασίας σε κοινά παθογόνα όπως είδη του γένους *Vibrio*, είναι αρκετά εύκολη στην πράξη, δεν στρεσάρει ιδιαίτερα τα ψάρια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μικρά ψάρια (< 20 g), είναι φθηνή και δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό [28{Somerset, 2005 #274}]. Απαιτεί ωστόσο μεγάλες ποσότητες εμβολίου και σε πολλές περιπτώσεις δεν προσφέρει επαρκή προστασία (π.χ. δοθηνίωση).

Τα περισσότερα εμβόλια για βακτήρια παρασκευάζονται από αδρανοποιημένη (φορμόλη/θέρμανση) βακτηρίνη ή αδρανοποιημένα υπερκείμενα καλλιέργειας (extracellular products-ECPs), ακατέργαστα εκχυλίσματα της κυτταρικής επιφάνειας όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS), μεμβρανικές πρωτεΐνες (OMPs), διαλυτοποιημένα βακτηριακά κύτταρα (lysates) ή εξασθενημένα ζωντανά παρασκευάσματα. Το πρώτο εμβόλιο για ψάρια που κυκλοφόρησε τη δεκαετία του '70 για την πρόληψη της δονακίωσης στα σολομοειδή αποτελούνταν από αδρανοποιημένη βακτηρίνη του *Vibrio anguillarum*. Τα καλά επίπεδα προστασίας που προσέφερε οδήγησαν σε ανάπτυξη παρόμοιων εμβολίων για την αντιμετώπιση άλλων *Vibrio*-σχετιζόμενων ασθενειών των σολομοειδών (*Vibrio ordalii*, *Vibrio salmonicida*) καθώς και της εντερικής ερυθροστομίας (enteric redmouth disease-ERM) που προκαλεί το βακτήριο *Yersinia ruckerii*.

Η ελλιπής προστασία αυτών των εμβολίων έναντι της δοθηνίωσης (*Aeromonas salmonicida*), οδήγησε μετά τη δεκαετία του '90 σε ανάπτυξη ενέσιμων εμβολίων, ελαιώδους αντί υδατικής βάσης, με ανοσοενισχυτικές ουσίες (adjuvants). Τα ανοσοενισχυτικά δεν έχουν αντιγονική δράση αλλά ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα παρέχοντας μία δεξαμενή αποθέματος αντιγόνου και επιτρέπουν την αργή απελευθέρωση του, διευκολύνοντας την έκθεση του αντιγόνου στα κύτταρα του ανοσοποιητικού [29]. Οι ελαιώδεις αυτές παρασκευές αποδείχτηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικές παρέχοντας μακράς διάρκειας προστασία στα ψάρια, συνοδεύονται όμως από σοβαρές παρενέργειες και μειονεκτήματα που σχετίζονται με αυτοανοσία [30], με το σχηματισμό ορατών αλλοιώσεων στο σημείο της ένεσης [31] ενώ μπορεί να επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης [32].

Πολυδύναμα εμβόλια βακτηρίνης ή βακτηρίνης και αδρανοποιημένων ιών ή ικών πρωτεϊνών με ή χωρίς ανοσοενισχυτικά, διατίθενται επίσης στο εμπόριο για παθογόνα όπως το *V. anguillarum* σε συνδυασμό με άλλα όπως *V. ordalii*, *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *Moritella viscosa* και τον ιό που προκαλεί τη λοιμώδη παγκρεατική νέκρωση (Infectious Pagreatic Necrosis/ IPN) [12,33,34].

Τα ζωντανά εμβόλια με εξασθενημένα παθογόνα είναι στην πραγματικότητα μια μόλυνση που προσεγγίζει την πραγματική διαδικασία στη φύση. Χορηγούνται σχετικά εύκολα με εμβάπτιση σε λίγα μόνο άτομα και το παθογόνο διαδίδεται στον πληθυσμό μεταφερόμενο από άτομο σε άτομο. Για το λόγο αυτό απαιτούνται μικρές ποσότητες εμβολίου, για την επίτευξη μακράς διάρκειας προστασίας στον πληθυσμό [33]. Στην Αμερική διατίθενται ζωντανά εμβόλια για την καταπολέμηση του *Edwarsiella ictaluri* στο γατόψαρο [35] και στη Χιλή για την αντιμετώπιση της ηπατικής νέκρωσης των σολομοειδών που προκαλεί το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Renibacterium salmoninarum* [36]. Και στις δύο περιπτώσεις τα εμβόλια αδρανοποιημένης βακτηρίνης δεν παρείχαν επαρκή προστασία. Μελέτες έχουν επίσης γίνει στην πέστροφα για την αντιμετώπιση της δοθηνίωσης [37,38], σε κυπρίνους με στελέχη *A. hydrophila* [39], σε zebrafish (*Danio rerio*) με στελέχη *E. tarda* [40] κ.α. Παρά τις δυνατότητες που προσφέρουν, η χρήση τους παραμένει περιορισμένη εξαιτίας των κινδύνων που σχετίζονται με την εξάπλωση των ζωντανών παθογόνων στο περιβάλλον και σε μη

στοχευόμενους οργανισμούς, με την πιθανότητα μεταλλάξεων και επαναφοράς της λοιμογόνου δράσεως.

Εμβόλια DNA μελετούνται κυρίως για την αντιμετώπιση ιικών λοιμώξεων οι οποίες γενικά δεν αντιμετωπίζονται, με εξαίρεση τον ιό της IPN που αναφέρθηκε παραπάνω και ελάχιστες ακόμα εξαιρέσεις. Τα εμβόλια αυτά περιλαμβάνουν γονίδια του παθογόνου οργανισμού ενσωματωμένα σε κάποιο φορέα-πλασμίδιο, και χορηγούνται στον ξενιστή με σκοπό να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα των σωματικών του κυττάρων. Εκεί αναμένεται να εκφράσουν την ιική πρωτεΐνη και ο οργανισμός να παράσχει αντισώματα για αυτήν. Τα εμβόλια αυτά χορηγούνται στα ψάρια με ενδομυϊκή ένεση ενώ δοκιμάζονται και παρασκευές με επικαλυμμένο αντιγόνο με σκοπό τη χορήγηση μέσω της τροφής. Στις περιπτώσεις αυτές το αντιγόνο εσωκλείεται σε κυστίδια πολυμερών υλικών, όπως τα Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) και αλγινικό οξύ, με σκοπό την προστασία του αντιγόνου από τα γαστρικά υγρά μέχρι να φτάσει στο τμήμα του οπίσθιου εντέρου όπου απορροφάται [41,42,43].

1.3.2.2. Προβιοτικά και ανοσοενισχυτικά

Συστατικά που ενισχύουν το μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών, όπως προβιοτικά βακτήρια και διάφορες ανοσοενισχυτικές (immunostimulants) ουσίες, λειτουργούν ως μέτρο πρόληψης μικροβιακών ασθενειών κυρίως στα νυμφικά στάδια εκτροφής των ψαριών, που το ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι επαρκώς ανεπτυγμένο. Η χορήγηση γίνεται συνήθως μέσω ειδικής διαίτας. Τα συστατικά αυτά, ενισχύουν τους μηχανισμούς μη ειδικής άμυνας προκαλώντας την αύξηση των επιπέδων διαφόρων παραμέτρων της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας (πρωτεΐνες συμπληρώματος, λυσοζύμη, παραγωγή κυτοκινών, φαγοκύτωση, κ.α.) [44,45].

Η αντιμικροβιακή δράση των προβιοτικών έγκειται στην τροποποίηση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου μέσω εκκρίσεων που μπορεί να αναστέλλουν την πρόσδεση και αύξηση άλλων βακτηρίων και του ανταγωνισμού για τα θρεπτικά συστατικά. Τα πιο κοινά, εμπορικά διαθέσιμα, προβιοτικά βακτήρια είναι αυτά που παράγουν γαλακτικό οξύ (*Bacillus ssp.*, *Lactobacillus*) και ο σακχαρομύκητας (*Saccharomyces cerevisiae*). Η χρήση τους έχει πολλαπλά οφέλη για την υγεία και ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ψαριών, αφού αυξάνουν το ποσοστό

αφομοίωσης των θρεπτικών, το ρυθμό ανάπτυξης, την ανθεκτικότητα στο στρες και βελτιώνουν την ποιότητα του νερού μειώνοντας τη συγκέντρωση της αμμωνίας και των νιτρωδών [46].

Στις ουσίες με ανοσοενισχυτική δράση περιλαμβάνονται μια ευρεία γκάμα φυσικών (φυτικά, ζωικά, βακτηριακά συστατικά) και συνθετικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές διεγείρουν το μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα μέσω του μηχανισμού αναγνώρισης προτύπου και μπορεί να χρησιμοποιούνται σαν ανοσοενισχυτικά πρόσθετα στις τροφές ή σε εμβόλια. Οι πλέον κοινές εμπορικές ουσίες με ανοσοενισχυτική δράση είναι οι φυσικής προέλευσης β-glucans και διάφορα συνθετικά νουκλεοτίδια (DNA, RNA) [45,47].

1.4. Ασθένειες και πρόληψη ασθενειών από είδη *Aeromonas*

Σημαντικές ασθένειες των ψαριών σχετίζονται με το γένος *Aeromonas*. Αυτές αφορούν κατά κύριο λόγο ψάρια τα οποία εκτρέφονται στο γλυκό νερό και σχετίζονται με τα είδη *A. hydrophila* και *A. salmonicida*. Το είδος *A. hydrophila* έχει μεγάλο εύρος ξενιστών και μαζί με τα υπόλοιπα κινητά είδη του γένους σχετίζεται με αιμορραγική σηψαιμία (Motile *Aeromonas* Septicaemia) σε κυπρίνους, τιλάπιες, χρυσόψαρα κ.α. Το είδος *A. salmonicida*, προσβάλλει κυρίως είδη της οικογένειας Salmonidae (σολομοί, πέστροφες κ.λ.π.) προκαλώντας τη δοθιήνωση στα σολομοειδή, μία από τις παλαιότερα περιγεγραμμένες ασθένειες των ψαριών. Πιο περιστασιακά αναφέρονται τα είδη *A. bestiarum*, *A. caviae*, *A. sobria* και *A. veronii* (*A. veronii* biovar *sobria*) [48].

Στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου, ασθένειες που σχετίζονται με το γένος αποτελούν σχετικά σπάνια περιστατικά δεδομένου ότι οι κύριες καλλιέργειες τις περιοχής περιλαμβάνουν θαλάσσια είδη ψαριών (τσιπούρα, λαβράκι κ.α.). Στην Ανατολική Μεσόγειο, ασθένειες που σχετίζονται με στελέχη *Aeromonas* σε καλλιέργειες θαλάσσιων ειδών, έχουν αναφερθεί σε σφυρίδες, στο μυτάκι, το λαβράκι και την τσιπούρα. Τα περισσότερα περιστατικά σχετίζονται με το είδος *A. hydrophila* αλλά αναφέρονται και τα είδη *A. caviae* και *A. sobria*. Ανά περίπτωση, μπορεί να συναπομονώνονται σε μικρή συχνότητα μαζί με άλλα παθογόνα όπως τα *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* και *Vibrio alginolyticus* [49,50,51] ή αναφέρονται ως κύριοι αιτιολογικοί παράγοντες με σχετικά χαμηλές θνησιμότητες [52]. Περιστατικά καταγράφονται επίσης τα τελευταία χρόνια στην Τουρκία, σε καλλιέργειες λαβρακιού και τσιπούρας στην περιοχή του Αιγαίου (*A. hydrophila* και *A. sobria*) [53].

Ενώ η δοθιήνωση προλαμβάνεται με εμπορικά εμβόλια [12], οι ασθένειες που σχετίζονται με τα κινητά είδη αερομονάδων προλαμβάνονται κυρίως με αυτογενή προϊόντα δεδομένου ότι η ομάδα περιλαμβάνει στελέχη με ποικίλες αντιγονικές ιδιότητες [54,55,56]. Σύμφωνα με τη σχετική ευρωπαϊκή Οδηγία [57], ως αυτογενές εμβόλιο ορίζεται το εμβόλιο που παράγεται από το εξουδετερωμένο (ή μη) παθογόνο/αντιγόνο που απομονώθηκε από ένα ή περισσότερα ζώα συγκεκριμένης κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης και χρησιμοποιείται μόνο

για την αντιμετώπιση της συγκεκριμένης ασθένειας, στα συγκεκριμένα ζώα της συγκεκριμένης κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης, στη συγκεκριμένη τοποθεσία.

Η αδρανοποιημένη βακτηρίνη ως αντιγονικός παράγοντας δίνει συχνά αρκετά υψηλά ποσοστά προστασίας και μελετάται εκτενώς σε διάφορους συνδυασμούς και παρασκευές. Όσον αφορά τις κινητές αερομονάδες, στις απλούστερες παρασκευές χρησιμοποιείται ως αντιγόνο ολόκληρο το βακτηριακό κύτταρο (βακτηρίνη) αφού αδρανοποιηθεί με φορμόλη [58,59,60]. Σε πιο σύνθετες παρασκευές η βακτηρίνη μπορεί να χορηγείται σε συνδυασμό με βακτηρίνη άλλων ειδών (πολυδύναμα εμβόλια) [61], ή/και σε συνδυασμό με ανοσοενισχυτικά [62] ή μέσα σε μικροκυστίδια αλγινικού οξέος [63] ή λιποσώματα [64]. Σε άλλες περιπτώσεις, χρησιμοποιούνται ως αντιγόνα συστατικά της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης (λιποπολυσακχαρίτες και μεμβρανικές πρωτεΐνες, ανασυνδυασμένες ή μη) [65,66,67] ή εξωκυτταρικά προϊόντα [68] τα οποία μπορεί επίσης να συνδυάζονται με ανοσοενισχυτικά ή να χορηγούνται μέσα σε λιποσώματα [69]. Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων ποικίλει και εξαρτάται από τη φυσική κατάσταση και το αναπτυξιακό στάδιο των ψαριών, από το παθογόνο στέλεχος, τη δοσολογία, τη σύσταση του εμβολίου, τον τρόπο χορήγησης (ένεση, μέσω της τροφής, ή εμβάπτιση) και τις επαναλήψεις του εμβολιασμού.

1.5. Προβλήματα και εναλλακτικές λύσεις στην αντιμετώπιση ασθενειών

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην αντιμετώπιση ασθενειών στην Ευρώπη, αλλά και παγκοσμίως, είναι η έλλειψη αδειοδοτημένων κτηνιατρικών φαρμάκων για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες και κυρίως για είδη εκτός των σολομοειδών (Minor-Use Minor Species) [2a]. Οι κύριες αιτίες όπως συνοψίζονται από την Ομοσπονδία Ευρωπαϊκών Παραγωγών Υδατοκαλλιέργειας [70] περιλαμβάνουν το υψηλό κόστος αδειοδότησης, το χρόνο που απαιτείται, το γεγονός ότι τα έσοδα από τη σχετικά μικρή αγορά των υδατοκαλλιεργειών δεν αποσβήνει απαραίτητα το κόστος αδειοδότησης, στις διαφορές μεταξύ των κρατών μελών στην ερμηνεία των κανονισμών που σχετίζονται με την αδειοδότηση και με την απαγόρευση της μεταβίβασης των αδειών μεταξύ των κρατών αλλά και στο γεγονός ότι η αγορά φαρμάκων κυριαρχείται από λίγες διεθνείς εταιρίες. Χώρες όπως η Αγγλία και η Νορβηγία έχουν προχωρήσει σε αλλαγές που σχετίζονται με τη μείωση του χρόνου που χρειάζεται για την άδεια εισαγωγής ενός φαρμάκου ή με προσωρινή παραχώρηση άδειας ακόμα και με χρήση εμβολίων που βρίσκονται ακόμα στα πρώτα στάδια ανάπτυξης αρκεί να πληρούνται οι βασικές προϋποθέσεις ασφαλείας [71]. Η γενική τάση που επικρατεί είναι ελάττωση της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών και η ανάπτυξη εμβολίων και άλλων μεθόδων καταπολέμησης [2a].

Σήμερα στην Ελληνική αγορά κυκλοφορούν εμβόλια μόνο για τη δονακίωση και την «παστεριδίαση» ή «παστερέλλωση». Δεν διατίθενται εμπορικά εμβόλια για τη λοίμωξη από βακτήρια *Aeromonas*, ενώ στην Ευρώπη διατίθενται μόνο για την αντιμετώπιση της δοθηνώσης [18]. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά. Οι τεχνικές απαιτήσεις που πρέπει να πληροί κάθε κτηνιατρικό προϊόν πριν την εμπορική του διάθεση εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, περιγράφονται στο παράρτημα της Οδηγίας 2001/82/EK και όπως αυτή τροποποιήθηκε, στην Οδηγία 2004/28/EK και με περισσότερες λεπτομέρειες και κατευθυντήριες γραμμές από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Από αυτή τη νομοθεσία εξαιρούνται τα αυτεμβόλια (βλ. παράγραφο 1.4), ενώ παράλληλα οι οδηγίες επιτρέπουν στα κράτη μέλη να επιτρέπουν την κυκλοφορία μη αδειοδοτημένων προϊόντων που σχετίζονται με την αντιμετώπιση εκτάκτων αναγκών όπως στην περίπτωση μιας σοβαρής επιδημίας. Η

αδειοδότηση επιτρέπεται εφόσον ενημερωθεί σχετικά η Ευρωπαϊκή Επιτροπή και εφόσον το περιστατικό δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί με κάποιο εμπορικά διαθέσιμο σκεύασμα.

Σύμφωνα με τον ορισμό που αναφέρθηκε παραπάνω, τα αυτεμβόλια αποτελούν μια μέθοδο «εξατομικευμένης» προστασίας. Αυτά, μπορεί να χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που δεν διατίθενται εμπορικά εμβόλια για μια συγκεκριμένη νόσο, ή αυτά που διατίθενται δεν προσφέρουν επαρκή προστασία. Εφόσον τα αυτεμβόλια εξαιρούνται των προϋποθέσεων αδειοδότησης που περιγράφονται στις παραπάνω οδηγίες, το νομικό πλαίσιο που σχετίζεται με την παραγωγή, αδειοδότηση, μεταφορά (εισαγωγή/εξαγωγή) και χρήση τους, επαφίεται στο δίκαιο της κάθε χώρας-μέλους παρουσιάζοντας μεγάλη ετερογένεια ανάμεσά τους ή μπορεί ακόμα και να απουσιάζει [72]. Στην Ελλάδα, όπως ορίζεται στην ΚΥΑ 282371/2006, άρθρο 4 (ΦΕΚ 731/τ Β') και ακολουθώντας τις παραπάνω ευρωπαϊκές οδηγίες, η παραγωγή αυτεμβολίων επιτρέπεται σε δημόσια κτηνιατρικά εργαστήρια εφόσον αυτά τηρούν τους κανόνες καλής παραγωγής (good manufacturing practices-GMP) [Οδηγία 73]. Το έλλειμμα λυιόν που δημιουργεί η απουσία εμπορικά διαθέσιμων εμβολίων στα ψάρια θα μπορούσαν να καλύψουν τα αυτεμβόλια. Δυστυχώς στην Ελλάδα δεν υπάρχουν εταιρείες στις οποίες θα μπορούσε να γίνει παραγωγή αυτεμβολίων ενώ οι λίγες εταιρείες που δραστηριοποιούνται στο εξωτερικό δεν είναι εξειδικευμένες στις ιχθυοκαλλιέργειες.

1.6. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας ήταν η παρασκευή αυτεμβολίου για την αντιμετώπιση βακτηριακής ασθένειας που εμφανίστηκε σε ιχθυοτροφικές μονάδες λαβρακιού στην περιοχή της Πελοποννήσου. Η ασθένεια πρωτοεμφανίστηκε το 2008 και έκτοτε παρατηρείται κάθε χρόνο κατά τους θερινούς κυρίως μήνες προσβάλλοντας κατά κύριο λόγο ψάρια εμπορεύσιμου μεγέθους. Η ασθένεια προκαλεί θνησιμότητα, ηπατική δυσλειτουργία και παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη στα ψάρια και αύξηση του συντελεστή μετατρεψιμότητας της τροφής (feed conversion ratio-FCR). Βακτηριακά στελέχη, που απομονώθηκαν από ασθενή λαβράκια σε δύο διαφορετικές μονάδες εκτροφής όπου εμφανίστηκε η ασθένεια, μελετήθηκαν ως προς τις μορφολογικές, φυσιολογικές και βιοχημικές τους ιδιότητες. Ακολούθησε παρασκευή εμβολίου με σκοπό την πρόληψη της ασθένειας, με ένα εκ των στελεχών που απομονώθηκαν, και χορήγησή του σε λαβράκια για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας του βάσει της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Περιγραφή της ασθένειας

Η περιγραφή της ασθένειας καθώς και οι σχετικές φωτογραφίες είναι παραχώρηση από την Κα. Νάνσυ Δουράλα, Κτηνίατρο-Ιχθυοπαθολόγο, τον Κ. Αθανάσιο Πράπα, Κτηνίατρο-Ιχθυοπαθολόγο και τον Δρ. Παντελή Καθάριο-Ερευνητή Γ' του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

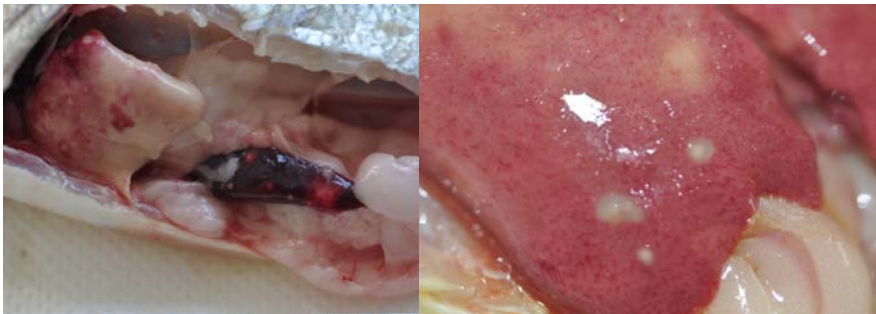
Η νόσος εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 2008 σε δύο ιχθυοτροφικές μονάδες λαβρακιού στην περιοχή της Πελοποννήσου, εγκατεστημένες στη θάλασσα. Έκτοτε παρατηρείται κάθε χρόνο προσβάλλοντας κατά κύριο λόγο ψάρια εμπορεύσιμου μεγέθους (300-400 g). Η ασθένεια εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε θερμοκρασίες νερού > 17-18°C. Η ημερήσια θνησιμότητα είναι σχετικά χαμηλή η αθροιστική όμως θνησιμότητα σε χρονικό διάστημα 3-4 μηνών μπορεί να ανέρχεται στο 7-10% του προσβεβλημένου ιχθυοπληθυσμού παρουσιάζοντας μέγιστο τους θερινούς μήνες και κυρίως τον Ιούλιο. Μεταξύ των συμπτωμάτων περιλαμβάνονται, ανορεξία, νωθρή κολυμβητική συμπεριφορά, σκούρος χρωματισμός του δέρματος, ερυθρότητα των πτερυγίων και των βραγχιακών επικαλυμμάτων και εξωφθαλμία. Τα κύρια όργανα που προσβάλλονται είναι ο νεφρός, ο σπλήνας και το ήπαρ. Παρατηρείται διόγκωση των νεφρών και παρουσία εκτεταμένων νεκρωτικών αλλοιώσεων σε όλο το νεφρικό παρέγχυμα (Εικόνα 2.1) Παρατηρείται επίσης, σπληνομεγαλία και παρουσία υπόλευκων νεκρωτικών οζιδίων σε όλη την επιφάνεια του οργάνου (Εικόνα 2.2). Στο ήπαρ παρατηρούνται νεκρωτικές εστίες και διάχυτες αιμορραγίες (Εικόνα 2.3). Λόγω της ηπατικής βλάβης, παρατηρείται επίσης, αναιμία (Εικόνα 2.4) και ίκτερος που εκδηλώνεται με κίτρινη χρώση του δέρματος και των πτερυγίων και κίτρινη χροιά του ορού (Εικόνα 2.5). Εξωτερικά τα συμπτώματα ποικίλουν. Όταν εμφανίζονται, η πιο χαρακτηριστική κλινική εικόνα είναι η εμφάνιση δερματικών αλλοιώσεων (Εικόνα 2.6) που μπορεί να εκτείνονται μέχρι και τον υποκείμενο μυϊκό ιστό (Εικόνα 2.7). Τα ιστολογικά ευρήματα αποκαλύπτουν μια συστηματική κοκκιωματώδη φλεγμονή (Εικόνα 2.8). Χαρακτηριστική είναι η παρουσία εστιών, αρνητικών κατά Gram βακτηριών εντός των νεκρωτικών αλλοιώσεων (Εικόνα 2.9, 2.10, 2.11).



Εικόνα 2.1. Διόγκωση των νεφρών και παρουσία εκτεταμένων νεκρωτικών αλλοιώσεων σε όλο το νεφρικό παρέγχυμα



Εικόνα 2.2. Σπληνομεγαλία και παρουσία υπόλευκων νεκρωτικών οζιδίων σε όλη την επιφάνεια του οργάνου (αριστερά), που σε μεγέθυνση (δεξιά) φαίνεται ότι αφορούν όλο το σπληνικό παρέγχυμα.



Εικόνα 2.3. Νεκρωτικές εστίες και διάχυτες αιμορραγίες στο ήπαρ.



Εικόνα 2.4. Λαυράκι με στοιχεία αναιμίας στα βράγχια



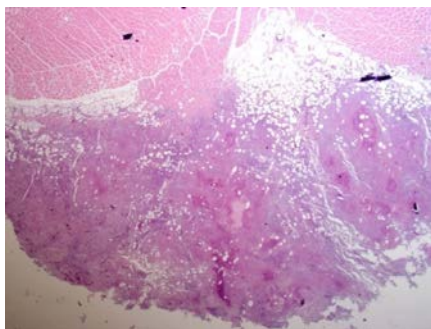
Εικόνα 2.5. Ίκτερος που εκδηλώνεται με κίτρινη χρώση του δέρματος και των πτερυγίων (αριστερά) και κίτρινη χροιά του ορού (δεξιά).



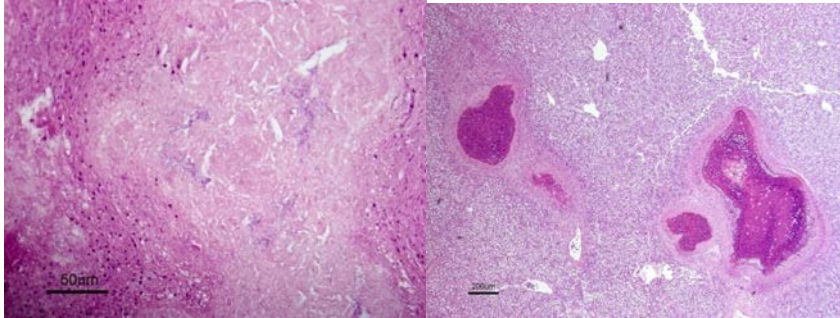
Εικόνα 2.6. Χαρακτηριστική κλινική εικόνα, η εμφάνιση επηρμένων δερματικών αλλοιώσεων (αριστερά) που στην συνέχεια εξελκώνονται (δεξιά).



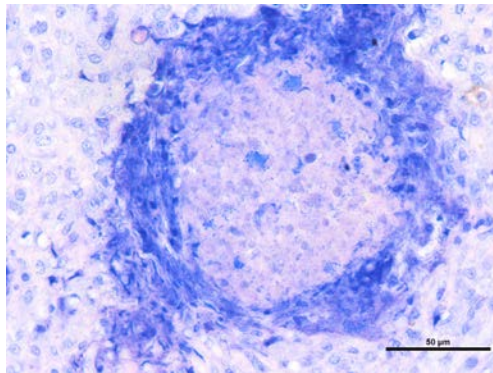
Εικόνα 2.7. Ελκώδεις δερματικές αλλοιώσεις, με εμφανή τα στοιχεία χρόνιας κοκκιωματώδους φλεγμονής.



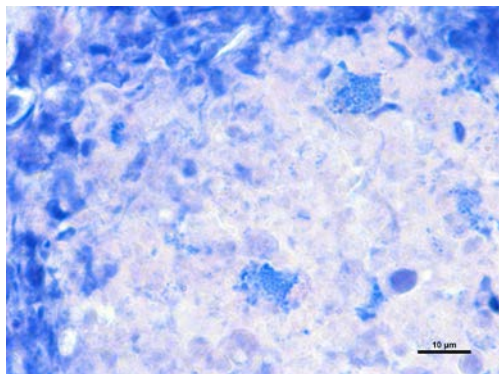
Εικόνα 2.8. Εκτεταμένο δερματικό έλκος με στοιχεία νεκρωτικής κοκκιωματώδους φλεγμονής και παρουσία διάχυτων αθροισμάτων βακτηρίων τα οποία είναι πιο εμφανή στη περιοχή της τυροειδούς νέκρωσης (Χρώση ΗΕ).



Εικόνα 2.9. Μεγέθυνση του νεκρωτικού δερματικού έλκους (αριστερά) και νεκρωτικά κοκκιώματα στο ήπαρ με σαφή όρια (δεξιά). Τα βακτήρια εμφανίζονται σαν μπλε εστίες εντός του νεκρωτικού ιστού (Χρώση HE).



Εικόνα 2.10. Τομή κοκκιώματος στο νεφρό με εστίες βακτηρίων εσωτερικά.



Εικόνα 2.11. Σε μεγέθυνση το εσωτερικό κοκκιώματος στο νεφρό με ξεκάθαρες τις εστίες βακτηρίων.

2.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός της εργασίας βασίστηκε στα ακόλουθα στάδια:

- i. **Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση του παθογόνου:** μελέτη μορφολογικών, φυσιολογικών (παρουσία ενζύμων και προϊόντων μεταβολισμού, παρουσία τοξικών ενζύμων, ευαισθησία σε χημικές ουσίες κλπ) και μοριακών (αλληλουχία γονιδίων) ιδιοτήτων, μελέτη αύξησης και δεικτών μολυσματικότητας.
- ii. **Παρασκευή εμβολίου αδρανοποιημένης βακτηρίνης:** παρασκευή εμβολίου, τυποποίηση της διαδικασίας παραγωγής και καταγραφή της απόδοσης.
- iii. **Έλεγχος της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών:** χορήγηση εμβολίου και συλλογή δειγμάτων, μέτρηση συγκέντρωσης παραγόντων του ειδικού (τίτλος αντισωμάτων) και μη ειδικού (λυσοζύμη) ανοσοποιητικού συστήματος για τη μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών και τον έλεγχο πιθανής επίτευξης ανοσίας.

2.3. Βακτηριακά στελέχη

Στην εργασία περιλαμβάνονται συνολικά 3 κλινικά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν στις δύο μονάδες εκτροφής λαυρακιών όπου εμφανίστηκε η σχετική ασθένεια, από τους ιχθυοπαθολόγους των μονάδων αυτών.

α) Aero NS

Το στέλεχος αυτό, απομονώθηκε από το ήπαρ και το σπλήνα λαβρακιών μεγάλου σχετικού μέσου βάρους (> 100 g). Η απομόνωση του έγινε σε γενικό θρεπτικό μέσο, TSA 2% (Πίνακας 1). Η αρχική διάγνωση που βασίστηκε σε βιοχημικά τεστ, αφορούσε στέλεχος *Aeromonas* sp.

β) Aero PD

Δύο ακόμα στελέχη (A, B) απομονώθηκαν από λαβράκια (200-300 g) σε διαφορετική αλλά γεωγραφικά κοντινή με την πρώτη, μονάδα εκτροφής, επίσης εγκατεστημένη στη θάλασσα. Σε αυτή την περίπτωση, η αρχική διάγνωση που βασίστηκε σε βιοχημικά τεστ αφορούσε επίσης στέλεχος *Aeromonas* sp.

γ) Στέλεχος ελέγχου

Ως στέλεχος ελέγχου στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες, χρησιμοποιήθηκε το τυπικό στέλεχος *Aeromonas hydrophila*, ATCC 7966 που είναι ευγενική παραχώρηση της Dr. Maria Elena Martino, Department of Public Health, Comparative Pathology and Veterinary Hygiene, University of Padova, Italia.

Όλα τα στελέχη αποθηκεύτηκαν και συντηρήθηκαν σε ειδικά για κρυοσυντήρηση κεραμικά σφαιρίδια (microbeads) και σε γλυκερόλη 20% στους -80°C. Το στέλεχος Aero NS, μελετήθηκε εκτενέστερα δεδομένου ότι ήρθε στη διάθεση μας νωρίτερα από τα Aero PDA και Aero PDB και για τον ίδιο λόγο χρησιμοποιήθηκε μόνο αυτό στην παρασκευή του εμβολίου.

2.4. Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση του παθογόνου

Εκτός από τις περιπτώσεις που σημειώνονται, όλα τα πειράματα που περιγράφονται σε αυτή την παράγραφο έγιναν στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών.

2.4.1. Θρεπτικά υποστρώματα

Όλα τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 2.1. Στο κείμενο αναφέρονται με τη συντομογραφία τους.

2.4.2. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε AIA με προσθήκη Αμπικιλίνης, αντιβιοτικό στο οποίο οι αερομονάδες είναι κατά κανόνα ανθεκτικές, και σε TCBS θρεπτικό εκλεκτικό για τα *Vibrio*. Η ικανότητα αύξησης ελέγχθηκε μέχρι και μετά 6 ημέρες επώασης στους 25°C.

Η μορφολογία των αποικιών παρατηρήθηκε έπειτα από επώαση 24 και 48 ωρών στους 25°C σε TSA 0.5%. Η κινητικότητα των στελεχών παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Έγινε επίσης χρώση κατά Gram.

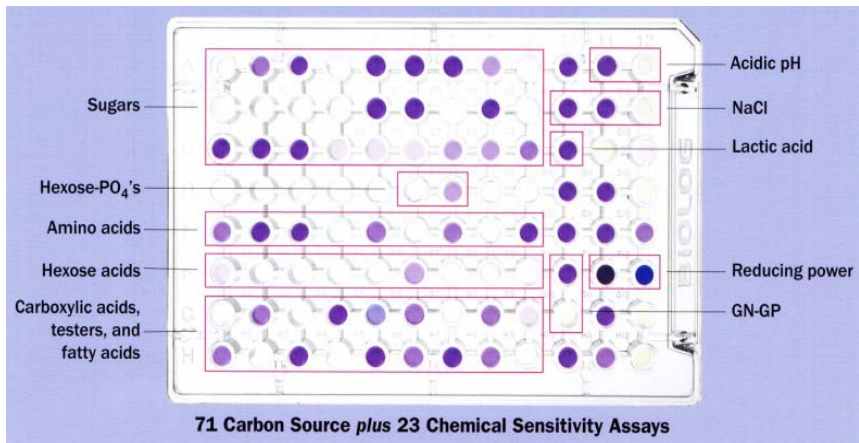
Οι βασικές βιοχημικές δοκιμασίες για το στέλεχος Aero NS πραγματοποιήθηκαν με το API 20E test kit και για το στέλεχος Aero PDB με το API 20NE, στις μονάδες όπου απομονώθηκαν από τους ιχθυοπαθολόγους αυτών, γι' αυτό και η διαφοροποίηση ως προς το σύστημα ταυτοποίησης. Τα δύο αυτά συστήματα μοιράζονται κάποιες κοινές αντιδράσεις. Οι δοκιμασίες που περιλαμβάνουν τα συστήματα αυτά δεν διεξήχθησαν για το στέλεχος Aero PDA.

Η παρουσία του ενζύμου της καταλάσης ελέγχθηκε με 3% H₂O₂ σε υγρή καλλιέργεια βακτηρίου σε TSB 0.5% μετά από επώαση 18-24 ωρών (overnight) στους 25°C. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν άμεσα.

Πίνακας 2.1. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Θρεπτικό υπόστρωμα (σύσταση και ρευστότητα)	Συντομογραφία
Aeromonas Isolation agar + Ampicillin (στερεό)	AIA
Εμπορικό σκεύασμα (Difco) + άγαρ 1.5% + Απεσταγμένο H₂O Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (στερεό)	TCBS
Εμπορικό σκεύασμα (Difco) + άγαρ 1.5% + Απεσταγμένο H₂O Trypticase Soy Agar (στερεό)	TSA 0.5%, 2%, 3%, 4%
Trypticase soy (0.5% NaCl) + NaCl (0%, 1,5%, 2,5%, 3,5%) + άγαρ 1.5% + Απεσταγμένο H₂O Trypticase Soy Broth (υγρό)	TSB 0.5%, 2%, 3%, 4%
Trypticase soy (0.5% NaCl) + NaCl (0%, 1,5%, 2,5%, 3,5%) + Απεσταγμένο H₂O Sea Water Luria Agar (στερεό)	SW-LA
tryptone 1% (Difco) + yeast extract 0.5% (Difco) + άγαρ 1.5% + Θαλασσινό νερό Sea Water Luria Broth (υγρό)	SW-LB
tryptone 1% (Difco) + yeast extract 0.5% (Difco) + Θαλασσινό νερό Blood Agar (στερεό)	BA
Blood Agar Base (Difco) + Αίμα αλόγου/λαβρακιού 5% + άγαρ 1.5% + Απεσταγμένο H₂O Müller-Hinton Agar (στερεό)	MHA
Müller-Hinton + άγαρ 1.5% + Απεσταγμένο H₂O	

Περαιτέρω χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με το Biolog GEN III MicroPlate. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει 96 διαφορετικά υποστρώματα εκ των οποίων τα 2 αφορούν το θετικό και αρνητικό control, 71 αντιδράσεις χρήσης πηγών άνθρακα και 23 αντιδράσεις χημικής ευαισθησίας (Εικόνα 2.12). Μία αντίδραση μπορεί να είναι θετική (+), αρνητική (-) ή ενδιάμεση (I = intermediate) ανάλογα με την αλλαγή του χρώματος που παρατηρείται.



Εικόνα 2.12. Περιγραφή της πλάκας του συστήματος βιοχημικού χαρακτηρισμού και ταυτοποίησης βακτηρίων Biolog GEN III MicroPlate.

Βακτηριακό εναιώρημα (100 μl) σε ρυθμιστικό διάλυμα IF-B, τοποθετήθηκε σε κάθε πυγαδάκι (well) της πλάκας. Η θολρότητα (turbidity, T) του εναιωρήματος προσδιορίστηκε φωτομετρικά μεταξύ 98.1-98.4% (600 nm). Η επώαση έγινε στους 25°C σε δύο επαναλήψεις για το στέλεχος Aero NS και μία επανάληψη για τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB. Πραγματοποιήθηκε μία ακόμα επανάληψη στους 37°C για το στέλεχος Aero NS. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε έπειτα από 48 ώρες επώασης. Η ταυτοποίηση των στελεχών έγινε με το ειδικό λογισμικό και τη βάση δεδομένων που διαθέτει το σύστημα Biolog.

2.4.3. Μοριακός χαρακτηρισμός

Τα γονίδια οικιακής οικονομίας που έχουν χρησιμοποιηθεί σε φυλογενέσεις του γένους *Aeromonas* είναι: *recA*, *chiA*, *gyrB*, *gyrA*, *groB*, *groD*, *dnaJ*, *dnaK*, *dnaX*, *crp60*, *gltA*, *radA*, *tsf*, *zipA*, *groL*, *metG*, *ppsA* και *atpD* [74,75,76,77,78,79,80,81,82]. Μεταξύ αυτών το γονίδιο *gyrB* (που κωδικοποιεί το ένζυμο DNA gyrase B) έχει προταθεί ως κατάλληλος δείκτης των φυλογενετικών σχέσεων στενά συγγενικών ειδών σε διάφορες ομάδες βακτηρίων όπως διάφορα γένη *Enterobacteriaceae* [83], συγγενικά είδη *Mycobacterium* [84] αλλά και είδη *Aeromonas* [74,75]. Το γονίδιο *crp60* κωδικοποιεί την εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη type I chaperonin Crp60 εντοπίζεται σε βακτήρια, αρχαία και οργανίδια ενδοσυμβιωτικής προέλευσης και έχει προταθεί για την ταυτοποίηση και φυλογενετική μελέτη διάφορων μικροοργανισμών [85].

Πίνακας 2.2. Χαρακτηριστικά των ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τον πολλαπλασιασμό γονιδίων με τη μέθοδο της PCR.

Γονίδιο	Ζεύγη εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
gyrB	gyrB3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1100	[74]
	gyrB7F	GGGGTCTACTGCTTCACCAA		
	gyrB9R	ACCTTGACGGAGATAACGGC		
	gyrB14R	TTGTCCGGGTGTACTCGTC		
16S	Bac27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1450	[86]
	518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG		
	800R	TACCAGGGTATCTAATCC		
	1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT		
crp60	C175	GAAATYGAACGGGAAGACAA	760	[81]
	C938	GTYGCTTTTCCAGCTCCA		
aerA	A1	GCC TGAGCGAGAAGGT	416	[87]
	A2	CAGTCCCACCCACTTC		
ahh1	AHH1F	GCCGAGCGCCAGAAAGGTGAGTT	130	[88]
	AHH1R	GAGCGGCTGGATGCGGTTGT		
act	AHCF1	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA	220	[89]
	AHCR1	AACTGACATCGGCCTTGAATC		

Για την ταυτοποίηση των στελεχών πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) 3 γονίδια οικιακής οικονομίας (housekeeping genes): το γονίδιο της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (16S rRNA), το γονίδιο της β-υπομονάδας

της DNA γυράσης (*gyrB*) και το γονίδιο της τύπου I σαπερόνης (*crp60*). Τα γονίδια *gyrB* και *crp60* ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των στελεχών με άλλα, του ίδιου γένους. Το γονίδιο *16S* χρησιμοποιήθηκε μόνο για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και δεν συμπεριλήφθηκε στις φυλογενετικές αναλύσεις. Δεν πολλαπλασιάστηκαν όλα τα γονίδια για όλα τα στελέχη. Συγκεκριμένα, πολλαπλασιάστηκαν και τα τρία προαναφερθέντα γονίδια για το στέλεχος Aero NS, τα γονίδια *gyrB* και *crp60* για το στέλεχος Aero PDB και το γονίδιο *crp60* για το στέλεχος Aero PDA.

Η εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA στα στελέχη Aero PDA και Aero PDB έγινε με τη χρήση kit (Genomic DNA Purification Kit, Promega). Η εξαγωγή γενωμικού DNA του στελέχους Aero NS έγινε με τη μέθοδο του βρασμού. Πιο αναλυτικά, υγρό θρεπτικό (1,5 ml) TSB 0.5% εμβολιάστηκε με μοναδική αποικία, φρέσκιας καλλιέργειας. Έγινε επώαση 18-24 ωρών (overnight) στους 25°C και ακολούθως φυγοκέντρωση στα 5.000 g για 5 min στους 4°C. Η πελέτα που προέκυψε, διαλύθηκε σε 1,5 ml ορού (0.9% NaCl) και φυγοκεντρήθηκε στα 5.000 g για 5 min στους 4°C. Μετά την απόρριψη του υπερκείμενου ορού η πελέτα διαλύθηκε σε 100 μl διπλά αποσταγμένο νερό. Ακολούθησε βρασμός για 10 min και φυγοκέντρωση στα 10.000 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε σε καθαρό eppendorf και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Πίνακας 2.3. Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για τον πολλαπλασιασμό των διαφόρων γονιδίων.

Γονίδιο	Στάδιο	Συνθήκες		
		T (°C)	Χρόνος (min)	Κύκλοι
	Επώαση	94	3	
	Αποδιάταξη	94	1	
16S	Υβριδοποίηση	58	1	30
gyrB	Υβριδοποίηση	58	1	30
crp60	Υβριδοποίηση	56	1	30
aerA υποκινητής	Υβριδοποίηση	50	1	30
aerA	Υβριδοποίηση	50	1	30
ahh1	Υβριδοποίηση	50	1	30
act	Υβριδοποίηση	50	1	30
	Επιμήκυνση	72	1.5	
	Τελική επιμήκυνση	72	10	

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μl που αναλυτικά περιείχε: 1 μl DNA, 12.5 μl Taq PCR Master Mix (Qiagen), 0.2 pmol από κάθε εκκινητή και 10.5 μl ddH₂O. Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν σε Bio-Rad MJ Mini Personal Thermal Cycler. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2.2. Οι συνθήκες της PCR για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3. Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν σε γέλη αгарόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν με τη χρήση του PureLink PCR purification kit (Invitrogen). Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών έγινε μετά από αντίδραση αλληλούχισης με τη μέθοδο Sanger, με χρήση του ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 και την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος που προέκυψε, σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης ABI3730xl sequencer (Applied Biosystems).

Στις φυλογενετικές αναλύσεις συμπεριλήφθηκαν, εκτός από τα υπό μελέτη στελέχη, τα είδη του γένους *Aeromonas* που συμπεριλαμβάνονται στην τελευταία έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [90]. Εκτός από τις αλληλουχίες που παρήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις προέρχονται από της βάση δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) της NCBI. Η συστηματική κατάταξη, ο αριθμός της συλλογής από όπου προέρχεται κάθε στέλεχος και οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών στη GenBank παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.4.

Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Clustal X2 [91]. Οι γενετικές αποστάσεις εκτιμήθηκαν στο MEGA [92] με τη χρήση του Tamura-Nei [93] μοντέλου νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Οι φυλογενετικές σχέσεις προσεγγίστηκαν με α) Ανάλυση σύνδεσης γειτόνων (Neighbor joining-NJ) [94] και β) Ανάλυση μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum likelihood-ML) [95]. Η Ανάλυση NJ εκτελέστηκε στο MEGA υπό το Tamura-Nei μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης, ενώ η Ανάλυση ML εκτελέστηκε με τη χρήση του RAxML [96], υπό το μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης CAT. Η στατιστική υποστήριξη των κλάδων ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap με 1000 επαναλήψεις

Πίνακας 2.4. Συστηματική ταξινόμηση, κωδικοί συλλογών βακτηριακών στελεχών και αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών στην GenBank – NCBI, που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Τα στελέχη που περιγράφηκαν στην παρούσα εργασία σημειώνονται με (*).

Γενωμικό είδος	Φαινοτυπικό είδος	Στέλεχος	GenBank No		
			16S	gyrB	cpn60
<i>A. hydrophila</i> (HG1)	<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 = ATCC 7966	T NR 043638.1	JN711776.1	EU306804.1
<i>A. bestiarum</i> (HG2)		CECT 4227 = CIP 74.30	T NR 026089.2	JN711732.1	EU306796.1
<i>A. salmonicida</i> (HG3)	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	6263/4/5 = LMG 14900 = ATCC 33659	T NR 037011.1	JN711856.1	EU306824.1
<i>A. salmonicida</i> (HG3)	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	CIP 103210 = JCM 7873 = ATCC 27013	T NR 040829.1	JN711857.1	EU306826.1
<i>A. salmonicida</i> (HG3)	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 = ATCC 33658	T NR 043324.1	JN711820.1	EU306828.1
<i>A. salmonicida</i> (HG3)	<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>	AS20/1/1 = CIP 104757 = ATCC 49393	T NR 025295.1	JN711858.1	EU306829.1
Unnamed (HG3)	<i>A. hydrophila</i> -like	CDC 0434-84 = CECT 5173		AF417624.1	EU741642.1
<i>A. caviae</i> (HG4)	<i>A. caviae</i>	CECT 838 = ATCC 15468	T NR 029252.1	AY101783.1	EU306800.1
<i>A. media</i> (HG5A)	<i>A. caviae</i> -like	CDC 0862-83	AY987773.1	AY987539.1	
<i>A. media</i> (HG5B)	<i>A. media</i>	CECT 4232 = RM = ATCC 33907	T NR 036911.2	AY101782.1	EU306808.1
<i>A. eucrenophila</i> (HG6)	<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 = NCIMB 74 = ATCC 23309	T X60411.2	HQ442657.1	EU306803.1
<i>A. sobria</i> (HG7)	<i>A. sobria</i>	208 = CECT 4245	T NR 037012.2	AY101781.1	EU306834.1
<i>A. veronii</i> (HG8Y)	<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	CECT 4246 = ATCC 9071	AY987748.1	AY987514.1	EU306839.1
		AER39	NZ_JH815582.1	HM584517.1	AGWT01000035.1
		B565	NR_102789.1	CP002607.1	CP002607.1
<i>A. jandaei</i> (HG9)	<i>A. jandaei</i>	ATCC 49568 = CDC 0787-80	T NR 037013.2	AJ868391.1	AY922357.1
<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i> (HG10)	<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	ATCC 35624 = CECT 4257	T X60414.2	JN829518.1	EU306838.1
		AER397	NZ_JH815586.1	HM584516.1	AGWV01000003.1
Unnamed (HG11)	<i>Aeromonas</i> sp.	ATCC 35941 = CECT 4253	X60417.1	AJ964951.1	EU306802.1
<i>A. schubertii</i> (HG12)	<i>A. schubertii</i>	ATCC 43700 = CDC 2446-81 = CIP 103437	T NR 037014.2	AJ868402.1	EU306830.1
DNA group 501 / <i>A. diversa</i> (HG13)	<i>A. schubertii</i> -like	CDC 2478-85 = CECT 4254 = ATCC 43946	T GQ365710.1	APVG01000017.1	NZ_APVG01000037.1
<i>A. trota</i> (HG14)	<i>A. trota</i>	ATCC 49657 = CECT 4255	T X60415.2	AJ868392.1	EU306836.1
<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 = ATCC 51208	T NR 025945.2	AY101777.1	EU306795.1
<i>A. encheleia</i> (HG16)	<i>A. encheleia</i>	A 1881 = CECT 4342 = ATCC 51929	T NR 041962.1	AY101799.1	EU306801.1
<i>A. popoffii</i> (HG17)	<i>A. popoffii</i>	LMG 17541	T NR 025317.1	JN711769.1	EU306814.1

<i>A. veronii</i> *	<i>A. sobria</i>	AERO_1 = Aero NS	KF636140.1	KF636138.1	KF636139.1
<i>A. veronii</i> *	<i>A. sobria</i>	Aero PDA			
<i>A. veronii</i> *	<i>A. sobria</i>	Aero PDB			

HG: Ομάδα DNA υβριδοποίησης (DNA hybridization group) [90]

(T): τυπικό στέλεχος.

2.4.4. Δοκιμασίες χημικής ευαισθησίας

Οι δοκιμασίες αυτές πραγματοποιήθηκαν μόνο για το στέλεχος Aero NS. Ελέγχθηκε η απόκριση στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) και σε 10 αντιβιοτικά (φλουμεκίνη, φλορφενικόλη, οξιλικό οξύ, οξυτετρακυκλίνη, ενισχυμένες σουλφοναμίδες, τετρακυκλίνη, φουραζολιδόνη, χλοραμφενικόλη, αμπικιλλίνη, Cefaclor), από τα οποία τα 5 πρώτα διατίθενται στο εμπόριο για χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες (Πίνακας 3.5).

Για τη δοκιμασία ευαισθησίας στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129, υγρή καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης ($OD_{600} = 1,250$), απλώθηκε με μπατονέτα σε MHA και αφού αφέθηκε να στεγνώσει, τοποθετήθηκαν δισκία O/129 (150 $\mu\text{g/ml}$). Η απόκριση στο βιμπριοστατικό παράγοντα ελέγχθηκε μετά από επώαση 24-48 ωρών στους 25°C. Η δημιουργία ζώνης αναστολής, ανεξαρτήτως διαμέτρου, γύρω από το δισκίο, καταγράφηκε ως ευαισθησία στον βιμπριοστατικό παράγοντα.

Η ευαισθησία σε αντιβιοτικά ελέγχθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων [97] σε στερεό θρεπτικό MHA. Ακολούθησε η διαδικασία που συνίσταται από το Clinical and Laboratory Standards Institute [98] με κάποιες προσαρμογές. Συγκεκριμένα, βακτηριακή καλλιέργεια σε εκθετική φάση ανάπτυξης ($OD_{600} = 0.750$) επιστρώθηκε με μπατονέτα σε ειδικό στερεό θρεπτικό (MHA) χαμηλής αλατότητας (0.5% NaCl). Αφού αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετήθηκαν τα δισκία αντιβιοτικών. Ακολούθησε επώαση 48 ωρών στους 22°C και μετρήθηκε η διάμετρος του δακτυλίου αναστολής για κάθε αντιβιοτικό. Η απόκριση προσδιορίστηκε σύμφωνα με τα κριτήρια που περιλαμβάνονται στη λίστα του CLSI [98]. Στις περιπτώσεις που τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν δεν συμπεριλαμβάνονται στην παραπάνω λίστα, η απόκριση προσδιορίστηκε συγκριτικά. Δακτύλιοι αναστολής ≥ 22 mm καταγράφηκαν ως ευαισθησία (susceptibility-S), ≤ 10 mm καταγράφηκαν ως ανθεκτικότητα (resistance-R) και οι ενδιάμεσου μεγέθους δακτύλιοι $10 < X < 22$ mm καταγράφηκαν ως μέτρια ευαισθησία (intermediate-I).

2.4.5. Μελέτη της αύξησης

Η καμπύλη ανάπτυξης του βακτηρίου κατασκευάστηκε μόνο για το στέλεχος Aero NS δεδομένου ότι αυτό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του εμβολίου. Υγρό θρεπτικό TSB 0.5% εμβολιάστηκε με υγρή καλλιέργεια (μετά από επώαση 24 ωρών στους 25°C-overnight) σε αναλογία 1/100. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 25°C σε ανακίνηση (150 rpm) και καταγράφηκε η οπτική απορρόφηση (600 nm) σε τακτά χρονικά διαστήματα για συνολικά 6 ώρες περίπου. Σε κάθε χρονικό σημείο υπολογίστηκε η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων (CFUs ml⁻¹). Το πείραμα έγινε σε 3 επαναλήψεις και ακολούθως υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση ανά χρονική στιγμή. Από την πρότυπη καμπύλη που προέκυψε, υπολογίστηκε ο χρόνος διπλασιασμού της βιομάζας του βακτηρίου.

Προκειμένου να βρεθεί ο βέλτιστος για το μικροοργανισμό συνδυασμός θερμοκρασίας-αλατότητας, το βακτήριο καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο TSB σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0.5%, 2%, 3% και 4%) και 5 διαφορετικές θερμοκρασίες για κάθε συγκέντρωση (4°C, 12°C, 22°C, 30°C, 37°C). Για κάθε συνδυασμό θερμοκρασίας αλατότητας μετρήθηκε η αλλαγή της οπτικής απορρόφησης στο χρόνο (για 6 ώρες) και δημιουργήθηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες. Το πείραμα έγινε σε 3 επαναλήψεις μόνο για το στέλεχος Aero NS που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή εμβολίου. Υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της οπτικής απορρόφησης σε κάθε χρονικό σημείο, και κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις για κάθε συνδυασμό θερμοκρασίας-αλατότητας. Η σύγκριση έγινε βάση της κλίσης της καμπύλης, εφόσον υποδηλώνει το ρυθμό αύξησης της οπτικής απορρόφησης που αποτελεί μια έμμεση εκτίμηση του ρυθμού αύξησης του πληθυσμιακού μεγέθους.

2.4.6. Παράγοντες μολυσματικότητας

Η αιμολυτική ικανότητα του στελέχους Aero NS ελέγχθηκε σε απινωδογονωμένο (defibrinated) αίμα αλόγου και σε αίμα λαυρακιού που συλλέχθηκε από ψάρια των εγκαταστάσεων του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών. Χρησιμοποιήθηκε ειδικό στερεό θρεπτικό (BA) και αίμα σε συγκέντρωση 5% (v/v). Η αιμολυτική δραστηριότητα σε αίμα αλόγου ελέγχθηκε σε θερμοκρασία 25°C και 30°C μετά από επώαση 24-48 ωρών. Η αιμολυτική δραστηριότητα σε αίμα λαυρακιού ελέγχθηκε στους 25°C μετά από επώαση 24-48 ωρών.

Ελέγχθηκε η παρουσία τριών γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή εξωτοξινών στις αερομονάδες. Ελέγχθηκαν δύο γονίδια εξωκυτταρικής αιμολυσίνης, της αερολυσίνης (*aerA*) και το γονίδιο *ahh1* και ένα γονίδιο κυττολυτικής εντεροτοξίνης (*act*). Η εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.3. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 2.2. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μl που αναλυτικά περιείχε: 1 μl DNA, 12.5 μl Taq PCR Master Mix (Qiagen), 0.2 pmol από κάθε εκκινητή και 10.5 μl ddH₂O. Οι συνθήκες της PCR παρατίθενται στον Πίνακα 2.3. Το τυπικό στέλεχος *A. hydrophila* ATCC 7966 χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (control). Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν, και τα προϊόντα καθαρίστηκαν και αλληλουχήθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.3.

2.5. Παρασκευή εμβολίου αδρανοποιημένης βακτηρίνης

Η παρασκευή του εμβολίου έγινε σε TSB 0.5% σε θερμοκρασία δωματίου. Η αδρανοποίηση του παθογόνου στελέχους Aero NS, έγινε με διάλυμα φορμόλης 2% (v/v). Για τον έλεγχο επιμολύνσεων και στειρότητας στα διάφορα στάδια της διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκαν μη επιλεκτικά στερεά θρεπτικά υποστρώματα χαμηλής (TSA 0.5%) και υψηλής (SW-LA) αλατότητας.

Πιο αναλυτικά το πρωτόκολλο παρασκευής έχει ως εξής:

1. **Ανακαλλιέργεια** σε στερεό θρεπτικό TSA 0.5% από το αρχικό στοκ του στελέχους (-80°C) και επώαση για 48 ώρες στους 25°C.
2. **Ενοφθαλμισμός** υγρού θρεπτικού TSB 0.5% και επώαση στους 25°C για 18-24 ώρες (overnight).
3. **Ενοφθαλμισμός** μεγάλου όγκου υγρού θρεπτικού TSB 0.5% σε αναλογία 1/100 από την υγρή καλλιέργεια του βήματος 2, και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 18-24 ώρες (overnight) με ανακίνηση για τουλάχιστον 12 ώρες.
4. **Έλεγχος 1** επιμολύνσης: Καλλιέργεια σε στερεά γενικά θρεπτικά υποστρώματα (TSA 0.5% και SW-LA) στους 25°C για 24-48 ώρες προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν επιμολύνσεις στη βακτηριακή καλλιέργεια.
5. **Αδρανοποίηση** με φορμόλη $\leq 2\%$ v/v, ανάδευση για 30 min και αποθήκευση στους 4°C για τουλάχιστον 48 ώρες.
6. **Έλεγχος 2** στειρότητας: Καλλιέργεια σε στερεά γενικά θρεπτικά υποστρώματα και επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες για να επιβεβαιωθεί η αδρανοποίηση του παθογόνου.
7. **Φυγοκέντρηση** στις 4.000 rpm για 20 min.
8. **Ανασύσταση** σε NaCl 0.9% σε συγκέντρωση 10X.
9. **Έλεγχος 3** στειρότητας: Καλλιέργεια σε στερεά γενικά θρεπτικά υποστρώματα και επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες.
10. **Αραιώσεις** σε NaCl 0.9% μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση (κύτταρα ml⁻¹).
11. **Έλεγχος 4** στειρότητας: Καλλιέργεια σε στερεά γενικά θρεπτικά υποστρώματα και επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες.

Η συγκέντρωση κυττάρων αντιγόνου που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των λαβρακιών, προσδιορίστηκε με άμεση μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (phase contrast) με τη χρήση ειδικής πλάκας κυτταρομετρίας (Neubauer).

2.6. Έλεγχος της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών

Οι πειραματικές δοκιμές έγιναν στις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης, στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, κατά τους μήνες Ιούλιο-Σεπτέμβριο 2013. Στις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 120 λαβράκια, ηλικίας 14 μηνών και μέσου βάρους 100 g. Τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές με θαλασσινό νερό, συνεχόμενης ροής, χωρητικότητας 500 L, με μέση θερμοκρασία νερού 19°C. Τα ψάρια ταίζονταν μία φορά την ημέρα σε καθορισμένο χρονικό διάστημα μεταξύ 10.00 και 12.00 π.μ. Το διάστημα προσαρμογής μετά τη μεταφορά τους από την προπάχυνση στις πειραματικές δεξαμενές, διήρκεσε τρεις εβδομάδες. Το βάρος των ψαριών μετρήθηκε κατά την έναρξη της περιόδου προσαρμογής και οι μετρήσεις συνεχίστηκαν κατά τη δειγματοληψία στα άτομα που περιλαμβάνονταν σε κάθε μία από αυτές.

Πριν την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε έλεγχος τοξικότητας μέσω ενδοπεριτοναϊκού εμβολιασμού 10 λαβρακιών με 0.1 ml βακτηρίνης συγκέντρωσης 10^8 κύτταρα ml^{-1} . Τα ψάρια παρακολούθηθηκαν για τυχόν θνησιμότητες για χρονικό διάστημα εβδομάδων. Για τη διεξαγωγή του πειράματος τα ψάρια χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες ($n = 40$) συγκέντρωσης αντιγόνου. Στις δύο από αυτές χορηγήθηκε διάλυμα βακτηρίνης σε ορό. Οι δύο συγκεντρώσεις βακτηρίνης που χορηγήθηκαν ήταν 10^7 κύτταρα ml^{-1} (ομάδα 1) και 10^9 κύτταρα ml^{-1} (ομάδα 2). Στην τρίτη ομάδα χορηγήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα ορού (NaCl 0.9%) και αυτή χρησιμοποιήθηκε σαν ομάδα ελέγχου (ομάδα 3). Σε όλες τις ομάδες η χορήγηση του αντιγόνου έγινε με ένεση ενδοπεριτοναϊκά, σε ποσότητα 0.1 ml. Η χορήγηση έγινε μία φορά χωρίς επαναληπτική δόση. Το πείραμα δεν είχε επαναλήψεις.

Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν 75 ημέρες. Στο διάστημα αυτό πραγματοποιήθηκαν συνολικά 6 δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημέρες πειράματος 0, 7, 14, 27, 44 και 75. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκε αίμα για την εκτίμηση της δραστηριότητας της λυσοζύμης και του τίτλου των ειδικών αντισωμάτων. Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν με σύριγγα των 2 ml από την ουραία αρτηρία των ψαριών και ακολούθως τοποθετούνταν σε πάγο. Στη συνέχεια συντηρήθηκαν στους 4°C για περίπου 12 ώρες προκειμένου να γίνει η πήξη του αίματος και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 15

min. Ο ορός που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε ανά 100 μl σε erpendorfs χωρητικότητας 0.5 ml, και αποθηκεύτηκε ακολούθως στους -80°C. Συλλέχθηκαν επίσης, δείγματα ιστών από τον πρόνεφρο και το σπλήνα, τα οποία τοποθετήθηκαν μετά τη συλλογή τους σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Σκοπός, η διατήρησή τους με κατάλληλο τρόπο ώστε να είναι διαθέσιμα μελλοντικά για την απομόνωση mRNA και τη διεξαγωγή qPCR, για την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος .

2.6.1. Μέτρηση λυσοζύμης στον ορό του αίματος

Η ανάλυση λυσοζύμης έγινε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων στο τμήμα Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Κρήτης. Από τις ομάδες που χορηγήθηκε βακτηρίνη προσδιορίστηκαν 26/40 δείγματα και από την ομάδα ελέγχου 34/40. Προσδιορίστηκαν τουλάχιστον 3 δείγματα για κάθε ημέρα πειράματος ανά ομάδα βακτηρίνης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι παραλλαγή της δοκιμασίας θολερότητας [99]. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 2.5.

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της λυσοζύμης στον ορό χρειάζεται πρώτα η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με διαδοχικές αραιώσεις γνωστής αρχικής ενεργότητας ενζύμου ($k \text{ units l}^{-1}$) και διατηρώντας σταθερή συγκέντρωση του υποστρώματος της λυσοζύμης, *Micrococcus luteus*. Το βακτήριο αυτό χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα γιατί εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία στην αντιβακτηριδιακή δράση της λυσοζύμης. Η αντιβακτηριδιακή δράση της λυσοζύμης μειώνει την ποσότητα του υποστρώματος στην πορεία του χρόνου με ρυθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του ενζύμου. Η μείωση του υποστρώματος καταγράφεται με φωτομέτρηση και διαιρώντας με το χρόνο, μετράται η μείωση ανά λεπτό. Έτσι κάθε μεταβολή της οπτικής απορρόφησης αντιστοιχίζεται με συγκεκριμένη συγκέντρωση του ενζύμου και σε συνάρτηση με το χρόνο προκύπτει η ενεργότητα του ενζύμου. Η καμπύλη που προκύπτει είναι της μορφής: $y = -a*x + b$, όπου $a =$ συντελεστής μεταβολής της οπτικής απορρόφησης και $b =$ ενεργότητα λυσοζύμης ($U \text{ ml}^{-1}$).

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του ενζύμου στους ορούς των ψαριών, οι οροί επάζονται με το υπόστρωμα της λυσοζύμης και μετράται η διαφορά της οπτικής απορρόφησης σε δεδομένο χρόνο. Αντικαθιστώντας στην εξίσωση της πρότυπης καμπύλης

όπου χ τις τιμές της μεταβολής της οπτικής απορρόφησης/λεπτό στα δείγματα, υπολογίζεται η ενεργότητα της λυσοζύμης στον ορό των ψαριών.

Πίνακας 2.5. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της λυσοζύμης.

Διάλυμα	Σύσταση	Ποσότητα	pH	Τελικός Όγκος (ml)
Διάλυμα 1 (ρυθμιστικό διάλυμα-Δ1)	KH ₂ PO ₄	7,02 g	6,3	500
	NaCl	2,6		
	αζίδιο του Νατρίου	0.52 g		
	dH ₂ O			
Διάλυμα 2 (υπόστρωμα λυσοζύμης-Δ2)	<i>Micrococcus luteus</i>	0.006 g		30
	Διάλυμα 1	30 ml		
Διάλυμα 3 (πυκνό διάλυμα λυσοζύμης-Δ3)	lysozyme	2 mg		2
	dH ₂ O	2 ml		
Διάλυμα 4 (πυκνό διάλυμα λυσοζύμης-Δ4)	Διάλυμα 3	0.1 ml		3
	NaCl (0.0154 mol/l)	2,9 ml		

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, έγιναν αρχικά αραιώσεις του διαλύματος Δ4 (Πίνακας 2.6). Ακολούθως, σε πλάκα μικροτιτλοδότησης προστέθηκαν 200 μl Δ2 και 10 μl από κάθε αραιώση λυσοζύμης σε κάθε κυψελίδα, σε 2 επαναλήψεις. Σε δύο ακόμα επαναλήψεις, προστέθηκαν 200 μl από το Δ2 και 10 μl dH₂O (τυφλό δείγμα). Έγινε φωτομέτρηση στα 540 nm σε χρόνους 0, 10, 20, 30 και 40 min. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η διαφορά της οπτικής απορρόφησης για κάθε επανάληψη και ακολούθως υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων. Η τιμή αυτή διαιρέθηκε στη συνέχεια με το χρόνο από τον οποίο προήλθε η μέτρηση (π.χ. 10 min). Από τις τιμές που προέκυψαν (εκτός του τυφλού δείγματος), κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανά χρονική στιγμή μέτρησης (0, 10, 20, 30 και 40 min). Από αυτές, επιλέχθηκε η καμπύλη που προσέγγιζε καλύτερα τη γραμμικότητα ($0.6 \leq R^2 \leq 1$).

Ως χρόνος επώασης των ορών με το υπόστρωμα της λυσοζύμης-Δ2, υιοθετήθηκε ο χρόνος της επιλεγμένης καμπύλης (10 min). Ο προσδιορισμός των τιμών λυσοζύμης έγινε βάση της εξίσωσης που περιγράφει την πρότυπη καμπύλη όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Πίνακας 2.6. Οι αραιώσεις του διαλύματος λυσοζύμης (Δ4), για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης

	Ποσότητα Δ4 (ml)	Ποσότητα dH ₂ O (ml)	Συγκέντρωση λυσοζύμης (U ml ⁻¹)
α)	0.5	0.5	668
β)	0.5	1,5	334
γ)	0.25	1,75	167
δ)	0.25	3,75	83,5
ε)	0.25	7,75	42
στ)	0.25	15,75	21

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του SigmaPlot v11.0. Έγινε έλεγχος κανονικότητας και ομοιογένειας των διασπορών. Όπου εξασφαλίστηκαν οι προϋποθέσεις για κανονική κατανομή και ομογενοποιημένες διαφορές έγινε παραμετρικός έλεγχος. Στις περιπτώσεις που έστω μία από τις δύο προϋποθέσεις δεν πληρούνταν, έγινε μη παραμετρική ανάλυση (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks). Η σύγκριση των συγκεντρώσεων λυσοζύμης συναρτήσει του χρόνου (ημέρες πειράματος) έγινε ξεχωριστά για κάθε ομάδα συγκέντρωσης αντιγόνου με One-Way ANOVA. Η σύγκριση των συγκεντρώσεων λυσοζύμης μεταξύ των ομάδων αντιγόνου έγινε για κάθε ημέρα πειράματος ξεχωριστά με One Way ANOVA. Δεν ήταν δυνατή η διεξαγωγή Two Way ANOVA και Post hoc tests. Δεδομένου ότι δείγματα με διαφορετική απορρόφηση μπορεί να έχουν τον ίδιο τίτλο, δεν έγιναν στατιστικές αναλύσεις βάσει της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων.

2.6.2. Προσδιορισμός τίτλου αντισωμάτων – ELISA

Ο προσδιορισμός του τίτλου αντισωμάτων έγινε στο εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Pasteur της Αθήνας. Συνολικά, αναλύθηκαν και προσδιορίστηκε ο τίτλος αντισωμάτων σε 99 άτομα που συμπεριλαμβάνουν 37 της ομάδας 1, 36 της ομάδας 2 και 26 της ομάδας 3).

Πίνακας 2.7. Τα διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο της Indirect-ELISA, για τον προσδιορισμό του τίτλου αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών.

Διάλυμα	Σύσταση	Συγκέντρωση	Ποσότητα	pH	Τελικός Όγκος (ml)
Carbonate buffer (ρυθμιστικό διάλυμα)	NaHCO ₃	35 mM	1,465 g	9.6	500ml
	Na ₂ CO ₃	15 mM	0.795 g		
PBS-BSA (Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων)	ddH ₂ O				
	PBS	1X	100 ml		100
Διάλυμα πλύσης (Wash buffer)	BSA	1% w/v	1 g		
	PBS	1X	9.995 ml		1000
PBS 10X (Phosphate buffered saline)	Tween 20	0.05% v/v	0.5 ml		
	NaCl		40 g	7.2	500
	KCl		1 g	7.4	
	Na ₂ HPO ₄		5,75 g		
	KH ₂ PO ₄		1 g		

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- Anti-European Sea bass IgM monoclonal antibody: αραιώση 1:4 σε σχέση με την προτεινόμενη
- Goat-anti mouse IgG (H+L)-HRP: 1:40.000 σε σχέση με την προτεινόμενη
- Pierce TMB substrate kit: σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή

Για τον προσδιορισμό του τίτλου αντισωμάτων διεξήχθη έμμεση (Indirect) ELISA. Αρχικά, διαλυτοποιημένο αντιγόνο (lysate) για το οποίο εξετάζεται η ενδεχόμενη παραγωγή αντισώματος, επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα σε πλάκα μικροτιτλοδότησης. Στο βήμα αυτό το αντιγόνο προσκολλάται και ακινητοποιείται στην πλαστική επιφάνεια της πλάκας μέσω αλληλεπιδράσεων φορτίου. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα δέσμευσης των μη ειδικών θέσεων που περιέχει μη ενεργή πρωτεΐνη (αλβουμίνη βόειου ορού). Ακολούθως, προστίθεται ο υπό αξιολόγηση ορός που ενδεχομένως θα περιέχει τα αντισώματα (I) τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά το συγκεκριμένο αντιγόνο. Στη συνέχεια προστίθεται αντισώμα-II (IgM) που δεσμεύεται στο αντίσωμα (I) του ορού. Το αντίσωμα-II συζευγνύεται ακολούθως με τρίτο

Formatted: English (United States)

Formatted: English (United States)

Formatted: English (United States)

αντίσωμα (III) που είναι συζευγμένο με ένζυμο (IgG+HRP). Στη συνέχεια προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου (TMB), το οποίο αλλάζει χρώμα μετά την αντίδραση με το ένζυμο. Ανάμεσα στα βήματα, η πλάκα ξεπλένεται με ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού προκειμένου να απομακρυνθούν πρωτεΐνες και αντισώματα που δεν έχουν προσδεθεί ειδικά. Έτσι, η αλλαγή χρώματος υποδεικνύει τη σύνδεση μεταξύ των αντισωμάτων του ορού με τα αντισώματα I και II. Όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντισώματος στον ορό, τόσο πιο έντονη είναι και η αλλαγή του χρώματος. Η αντίδραση σταματά με προσθήκη H_2SO_4 και ακολουθεί φωτομέτρηση οπότε γίνεται η ποσοτικοποίηση της αλλαγής χρώματος. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται τελικά για την εκτίμηση του τίτλου των αντισωμάτων.

Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της Indirect ELISA καθώς και η σύσταση τους παρατίθενται στον Πίνακα 2.7. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του τίτλου αντισωμάτων στον ορό εμβολιασμένων λαυρακίων έχει ως εξής:

1. Στρώση του αντιγόνου (lysate) σε επιλεγμένη συγκέντρωση, μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα (carbonate buffer) σε $V_{\text{τελ}} = 100$ μl . Επώαση ο.π. στους 4°C .
2. Άδειασμα και ξέπλυμα 3-5 φορές με διάλυμα πλύσης.
3. Προσθήκη 200 μl διάλυμα δέσμευσης των μη-ειδικών θέσεων (PBS-BSA 1% w/v). Επώαση για 2 h στους 37°C .
4. Άδειασμα και ξέπλυμα 3-5 φορές με διάλυμα πλύσης.
5. Προσθήκη ορού, σε κατάλληλη αραιώση (σε PBS-BSA 1% w/v), σε $V_{\text{τελ}} = 100$ μl . Επώαση για 1 h στους 37°C .
6. Άδειασμα και ξέπλυμα 3-5 φορές με διάλυμα πλύσης.
7. Προσθήκη δεύτερου αντισώματος-IgM (anti-seabass-IgM) σε κατάλληλη αραιώση (σε PBS-BSA 1% w/v), σε $V_{\text{τελ}} = 100$ μl . Επώαση για 45 min στους 37°C .
8. Άδειασμα και ξέπλυμα 3-5 φορές με διάλυμα πλύσης.
9. Προσθήκη τρίτου αντισώματος (IgG-HRP), σε κατάλληλη αραιώση (σε wash buffer), σε $V_{\text{τελ}} = 100$ μl . Επώαση για 45 min στους 37°C .
10. Άδειασμα και ξέπλυμα 3-5 φορές με διάλυμα πλύσης.

11. Προσθήκη 100 μl χρωμογόνου (TMB + H₂O₂ σε αναλογία 1:1 μεταξύ τους). Επώαση στο σκοτάδι για περίπου 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
12. Προσθήκη 100 μl θειικό οξύ 2M χωρίς ξέπλυμα.
13. Φωτομέτρηση στα 450 nm.

Για να μετρηθεί η καθαρή αλληλεπίδραση αντισώματος ορού και αντισώματος-I-II, χρησιμοποιήθηκαν κελιά controls, στα οποία ακολουθήθηκαν όλα τα βήματα της διαδικασίας, πλην της επώασης με ορό. Η μέση τιμή των επαναλήψεων αυτών ανά πλάκα, αφαιρέθηκε από την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων.

Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν διαδοχικά σε 8 αραιώσεις από 1:1000 έως 1:128.000 σε δύο επαναλήψεις. Η τελική τιμή απορρόφησης για κάθε δείγμα, προέκυψε από το μέσο όρο των 2 επαναλήψεων, αφού πρώτα αφαιρέθηκε η τιμή της απορρόφησης των κελιών control (από κάθε επανάληψη ξεχωριστά) προκειμένου να μην επηρεάσει την τιμή του τίτλου η απορρόφηση των λοιπών αντιδραστηρίων. Έτσι κάθε δείγμα περιγράφεται από μια καμπύλη αραιώσεων-οπτικής απορρόφησης.

Προκειμένου να διακριθούν οι θετικοί και αρνητικοί ως προς την παρουσία αντισώματος, οροί, υπολογίστηκε ένα όριο απορρόφησης (cut-off) μεταξύ των δύο καταστάσεων. Μετρήθηκε η απορρόφηση 4 δειγμάτων από κάθε ομάδα συγκέντρωσης αντιγόνου (1,2,3) τη μέρα 0, οπότε δεν είχαν υποστεί καμία μεταχείριση. Ακολούθως, υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των μεγαλύτερων απορροφήσεων που προέκυψαν. Το cut-off υπολογίστηκε από το μέσο όρο των μεγαλύτερων απορροφήσεων προσθέτοντας 3 φορές την τυπική απόκλιση μεταξύ τους.

Ο τίτλος αντισωμάτων για κάθε δείγμα προσδιορίζεται στον υψηλότερο συντελεστή αραιώσης που εξακολουθεί να αποδίδει ένα θετικό σήμα πάνω από την τιμή cut-off. Ο τίτλος ισούται με το αντίστροφο του συντελεστή αραιώσης. Για παράδειγμα, αν η πρώτη αραιώση που εμφανίζει οπτική απορρόφηση μεγαλύτερη του cut-off είναι η 1:1000, τίτλος αντισώματος για το συγκεκριμένο δείγμα είναι 1.000. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο δυαδικός λογάριθμος (log₂) του τίτλου που χρησιμοποιήθηκε στις στατιστικές αναλύσεις.

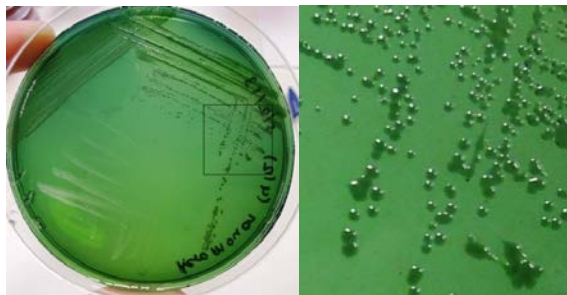
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του SigmaPlot v11.0. Έγινε έλεγχος κανονικότητας και ομοιογένειας των διασπορών. Όπου εξασφαλίστηκαν οι προϋποθέσεις για κανονική κατανομή και ομογενοποιημένες διαφορές έγινε παραμετρικός έλεγχος. Στις περιπτώσεις που έστω μία από τις δύο προϋποθέσεις δεν πληρούνταν, έγινε μη παραμετρική ανάλυση (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks). Έγινε σύγκριση του τίτλου αντισωμάτων μεταξύ των ομάδων αντιγόνου, με One Way ANOVA και ανά ημέρα πειράματος μεταξύ των ομάδων αντιγόνου με One Way ANOVA επίσης. Δεν ήταν δυνατή η διεξαγωγή Two Way ANOVA και Post hoc tests.

3. Αποτελέσματα

3.1. Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση του παθογόνου

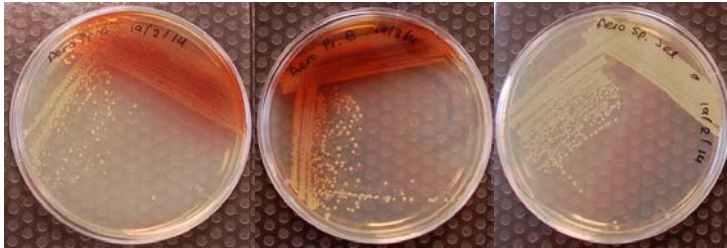
3.1.1. Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός

Όλα τα στελέχη παρουσίασαν πλήρη αύξηση στο AIA + Ampicilin έπειτα από επώαση 48 ωρών στους 25°C. Οι αποικίες είχαν πράσινο χρώμα που σχετίζεται με το μη μεταβολισμό της ξυλόζης χωρίς παρουσία μαύρου στίγματος το οποίο θα υποδήλωνε παραγωγή H₂S (Εικόνα 3.1, Πίνακας 3.1). Στο TCBS, δεν παρατηρήθηκε αύξηση για το Aero NS, μέχρι και μετά από 6 ημέρες επώασης στους 25°C. Τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB παρουσίασαν περιορισμένη αύξηση στο TCBS μετά από 48 ώρες επώασης. Παρατηρήθηκαν αποικίες-συσσωματώματα, όχι μοναδιαίες, κίτρινου και πράσινου χρώματος που παραπέμπει σε παραγωγή οξέων από το μεταβολισμό της σουκρόζης (Biolog-A7, Πίνακας 9).

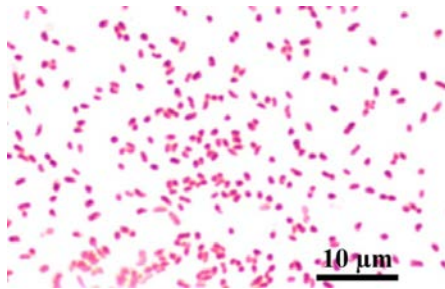


Εικόνα 3.1. Μορφολογία του στελέχους Aero NS μετά από καλλιέργεια σε AIA+ Ampicilin μετά από 48 ώρες επώασης στους 25°C (αριστερά) και σε μεγέθυνση (δεξιά).

Όλα τα στελέχη σχηματίζουν λείες, κυκλικές, αδιαφανείς αποικίες, λευκού-υποκίτρινου χρώματος και δεν είναι δυνατό να διακριθούν μεταξύ τους με γυμνό μάτι κατά τις πρώτες 24 ώρες επώασης στους 25°C σε TSA 0.5%. Μετά τις 24 ώρες επώασης παρατηρείται έκκριση καφέ χρωστικής στα στελέχη Aero PDA και Aero PDB (Εικόνα 3.2) που γίνεται όλο και πιο έντονη μέχρι τις 72 ώρες επώασης. Στο μικροσκόπιο, παρατηρούνται κυρίως μοναδιαία κύτταρα, μπορεί ωστόσο να προκύπτουν ζεύγη ή/και αλυσίδες κυττάρων σχετικά μικρού μήκους (3-10 κύτταρα). Δεν παρατηρήθηκε κινητικότητα των κυττάρων του στελέχους Aero NS, παρατηρήθηκε όμως στα στελέχη Aero PDA και Aero PDB. Όλα τα στελέχη είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφου σχήματος και μεγέθους $\leq 1 \mu\text{m}$ (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.2. Μορφολογία αποικιών των τριών υπό μελέτη στελεχών, μετά από καλλιέργεια σε TSA 0.5% και επώαση στους 25°C για 48 ώρες. Από αριστερά προς τα δεξιά, τα στελέχη Aero PDA, Aero PDB και Aero NS.



Εικόνα 3.3. Χρώση κατά Gram του στελέχους Aero NS.

Όσον αφορά τις δοκιμασίες που διεξήχθησαν με τα API 20E και API 20NE, τα δύο στελέχη (Aero NS, Aero PDB) παρουσίασαν αρκετές ομοιότητες (Πίνακας 3.1). Για το στέλεχος Aero PDB, παρουσιάζονται μόνο οι αντιδράσεις που είναι κοινές στα δύο συστήματα βιοχημικής ταυτοποίησης. Όλα τα στελέχη προέκυψαν θετικά στη δοκιμασία για την παρουσία του ενζύμου της καταλάσης (Πίνακας 3.1).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του Biolog GEN III MicroPlate, αν και ο κατασκευαστής προτείνει μέχρι 36 ώρες επώασης, τις πρώτες 24 ώρες δεν ήταν δυνατό να διαβαστούν τα αποτελέσματα. Μεταξύ 24 και 48 ωρών ξεκαθαρίζουν οι ενδιάμεσες αντιδράσεις από τις αρνητικές και θετικές. Ως εκ τούτου, η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε στις 48 ώρες.

Πίνακας 3.1. Μορφολογικές και φυσιολογικές ιδιότητες των στελεχών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Χαρακτήρας		Προφίλ στελεχών		
		Aero NS	Aero PDA	Aero PDB
β-galactosidase	(ONPG)	+	ΔΔ	+
Arginine dihydrolase	(ADH)	+	ΔΔ	-
Lysine decarboxylase	(LDC)	+	ΔΔ	ΔΔ
Ornithine decarboxylase	(ODC)	-	ΔΔ	ΔΔ
Citrate utilization	(CIT)	V	ΔΔ	ΔΔ
H ₂ S production	(H ₂ S)	-	ΔΔ	ΔΔ
Urease	(URE)	-	ΔΔ	-
Tryptophan deaminase	(TDA)	+	ΔΔ	ΔΔ
Indole production	(IND)	-	ΔΔ	-
Acetoin production	(VP)	V	ΔΔ	ΔΔ
Gelatinase	(GEL)	V	ΔΔ	+
Oxidase	(OX)	+	ΔΔ	+
Catalase		+	+	+
Χρήση υποστρωμάτων				ΔΔ
glucose	(GLU)	+	ΔΔ	+
mannitol	(MAN)	V	ΔΔ	+
inositol	(INO)	-	ΔΔ	ΔΔ
sorbitol	(SOR)	-	ΔΔ	ΔΔ
rhamnose	(RHA)	-	ΔΔ	ΔΔ
sucrose	(SAC)	+	ΔΔ	ΔΔ
melibiose	(MEL)	-	ΔΔ	ΔΔ
amygdalin	(AMY)	-	ΔΔ	ΔΔ
arabinose	(ARA)	-	ΔΔ	-
Ανθεκτικότητα σε				
O/129		-	ΔΔ	ΔΔ
Αύξηση σε				
AIA		+	+	+
TCBS		-	+	+
3% NaCl		+	ΔΔ	ΔΔ
4% NaCl		-	ΔΔ	ΔΔ
Κινητικότητα		-	+	+
Παραγωγή χρωστικών		-	+	+
β-αμύλυση		+	ΔΔ	ΔΔ

ΔΔ: Η δοκιμασία αυτή δεν διεξήχθη.

Τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB παρουσίασαν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους (G12, H5, H6, H12). Ωστόσο οι διαφορές αυτές δεν επηρέασαν την ταυτοποίηση. Και τα δύο αυτά στελέχη ταυτοποιούνται ως *A. sobria* με πιθανότητα 65-69%. Όσον αφορά το Aero NS προέκυψαν αρκετά περισσότερες ενδιάμεσες αντιδράσεις. Το στέλεχος ταυτοποιείται ως *A. veronii* bv. *veronii* και στις δύο θερμοκρασίες (25 και 37°C) με πιθανότητες 56,2% και 50,3% αντίστοιχα. Συνολικά, τα αποτελέσματα του Βιολογ παρατίθενται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Τα υποστρώματα που περιλαμβάνει το σύστημα βιοχημικού χαρακτηρισμού και ταυτοποίησης, BIOLOG GEN III MicroPlate και οι μεταβολικές αποκρίσεις που παρουσίασαν τα στελέχη Aero NS (25 και 37°C), Aero PDA και Aero PDB (25°C) στις 48 ώρες επώασης. Με γκρίζο πλαίσιο σημειώνονται οι αντιδράσεις που παρουσίασαν διαφορές ως προς τη θετική/αρνητική απόκριση μεταξύ των τριών στελεχών.

No	Υπόστρωμα	Aero NS		Aero PDA	Aero PDB	No	Υπόστρωμα	Aero NS		Aero PDA	Aero PDB
		25°C	37°C					25°C	37°C		
A1	NC	-	-	-	-	E1	Gelatin	I	-	-	-
A2	Dextrin	+	+	+	+	E2	Glycyl-L-Proline	I	+	+	+
A3	D-Maltose	+	+	+	+	E3	L-Alanine	I	-	+	+
A4	D-Trehalose	+	+	+	+	E4	L-Arginine	I	+	+	+
A5	D-Cellobiose	-	-	-	-	E5	L-Aspartic Acid	I	+	+	+
A6	Gentiobiose	-	-	-	-	E6	L-Glutamic Acid	I	+	+	+
A7	Sucrose	+	+	+	+	E7	L-Histidine	I	+	+	+
A8	D-Turanose	-	-	-	-	E8	L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-
A9	Stachyose	-	-	-	-	E9	L-Serine	+	+	+	+
A10	PC	+	+	+	+	E10	Lincomycin	I	-	+	+
A11	pH 6	+	+	+	+	E11	Guanidine HCl	+	+	+	+
A12	pH 5	+	I	+	+	E12	Niaproof 4	+	+	+	+
B1	D-Raffinose	-	-	-	-	F1	Pectin	-	+	I	I
B2	α-D-Lactose	-	-	-	-	F2	D-Galacturonic Acid	-	I	-	-
B3	D-Melibiose	-	-	-	-	F3	L-Galactonic Acid Lactone	-	-	-	-
B4	β-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	F4	D-Gluconic Acid	+	+	+	+
B5	D-Salicin	-	-	-	-	F5	D-Glucuronic Acid	-	+	-	-
B6	N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	F6	Glucuronamide	-	+	-	-
B7	N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	-	-	-	F7	Mucic Acid	-	-	-	-
B8	N-Acetyl-D-Galactosamine	I	+	+	+	F8	Quinic Acid	-	-	-	-
B9	N-Acetyl Neuraminic Acid	-	-	-	-	F9	D-Saccharic Acid	-	-	-	-
B10	1% NaCl	+	+	+	+	F10	Vancomycin	+	+	+	+
B11	4% NaCl	-	-	-	-	F11	Tetrazolium Violet	-	-	-	-
B12	8% NaCl	-	-	-	-	F12	Tetrazolium Blue	V	-	+	+
C1	α-D-Glucose	+	I	+	+	G1	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	-	-	-	-
C2	D-Mannose	+	+	+	+	G2	Methyl Pyruvate	+	+	+	+
C3	D-Fructose	+	+	+	+	G3	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-

C4	D-Galactose	+	+	+	+	G4	L-Lactic Acid	-	-	-	-
C5	3-Methyl Glucose	-	-	-	-	G5	Citric Acid	+	+	-	-
C6	D-Fucose	I	I	-	-	G6	α-Keto-Glutaric Acid	-	-	-	-
C7	L-Fucose	-	-	-	-	G7	D-Malic Acid	-	-	-	-
C8	L-Rhamnose	-	-	-	-	G8	L-Malic Acid	+	+	+	+
C9	Inosine	+	+	+	+	G9	Bromo-Succinic Acid	I	I	-	-
C10	1% Sodium Lactate	+	+	+	+	G10	Nalidixic Acid	-	-	-	-
C11	Fusidic Acid	-	-	-	-	G11	Lithium Chloride	-	-	-	-
C12	D-Serine	+	-	+	+	G12	Potassium Tellurite	-	+	+	I
D1	D-Sorbitol	-	I	-	-	H1	Tween 40	+	+	+	+
D2	D-Mannitol	+	+	+	+	H2	γ-Amino-Butyric Acid	-	I	-	-
D3	D-Arabitol	-	-	-	-	H3	α-Hydroxy- Butyric Acid	-	-	-	-
D4	myo-Inositol	-	+	-	-	H4	β-Hydroxy-D,L- Butyric Acid	I	I	-	-
D5	Glycerol	I	+	+	+	H5	α-Keto-Butyric Acid	I	I	I	+
D6	D-Glucose- 6-PO4	+	+	+	+	H6	Acetoacetic Acid	-	I	I	+
D7	D-Fructose- 6-PO4	+	-	+	+	H7	Propionic Acid	I	-	I	I
D8	D-Aspartic Acid	-	-	-	-	H8	Acetic Acid	+	+	+	+
D9	D-Serine	+	+	+	+	H9	Formic Acid	+	I	-	-
D10	Troleandomycin	+	+	+	+	H10	Aztreonam	V	-	I	I
D11	Rifamycin SV	+	+	+	+	H11	Sodium Butyrate	+	-	+	+
D12	Minocycline	-	-	-	-	H12	Sodium Bromate	I	-	-	I

NC:Αρνητικός μάρτυρας, PC: Θετικός μάρτυρας, V: η απόκριση ποικίλει (variable), +: θετική αντίδραση, -: αρνητική αντίδραση, I: ενδιάμεσο αποτέλεσμα

3.1.2. Μοριακός χαρακτηρισμός

Από τη σύγκριση των αλληλουχιών όλων των γονιδίων με αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, NCBI (BLAST), τα 3 στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Aeromonas veronii*.

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών *Aeromonas* και μεταξύ των στελεχών *A. veronii* που συμπεριλήφθηκαν στις αναλύσεις, για τα γονίδια *gyrB* και *crp60* παρατίθενται στους Πίνακες 3.3, 3.4. Η μέση γενετική απόσταση των τριών στελεχών που απομονώθηκαν από τα λαβράκια ήταν 0% μεταξύ των γονιδίων *gyrB* και *crp60*. Η μέση γενετική απόσταση μέσα στον κλάδο *A. veronii* ήταν 0.1%, 1,5% και 1,8% για τα γονίδια 16S, *gyrB* και *crp60* αντίστοιχα και η μέση γενετική απόσταση στο γένος *Aeromonas* ήταν 1,2%, 8.2% και 10.5% για τα 16S, *gyrB* και *crp60* αντίστοιχα.

Πίνακας 3.3. Οι γενετικές αποστάσεις (%), για τα γονίδια *gyrB* και *crp60* μεταξύ των ειδών *Aeromonas* που συμπεριλήφθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Στα είδη *A. salmonicida*, *A. media*, *A. veronii* περιλαμβάνονται όλα τα στελέχη και υποείδη του κλάδου τους.

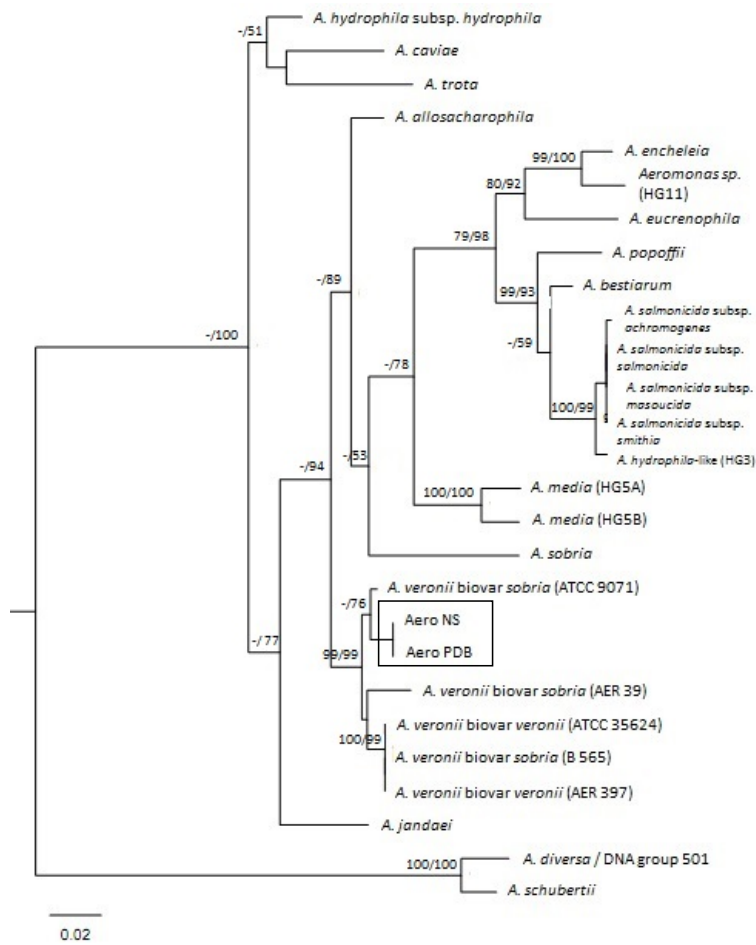
<i>gyrB/ crp60</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 <i>A. hydrophila</i>		7	7	6	8	9	9	13	11	11	7	11	12	10	10	8	10
2 <i>A. bestiarum</i>	8		6	6	10	12	10	13	11	10	10	13	13	11	10	10	6
3 <i>A. salmonicida</i>	8	3		1	11	11	10	13	12	12	11	12	14	12	11	12	10
4 <i>A. hydrophila</i> -like (HG3)	8	3	1		10	11	9	12	11	11	11	12	14	11	10	11	9
5 <i>A. caviae</i>	5	9	9	9		8	9	15	14	13	7	11	11	12	14	7	12
6 <i>A. media</i>	7	7	8	8	8		8	15	16	15	7	13	12	12	15	7	14
7 <i>A. eucrenophila</i>	9	7	7	7	8	8		16	14	12	5	11	12	11	14	5	12
8 <i>A. sobria</i>	9	9	9	10	10	10	10		10	13	16	17	15	14	10	16	17
9 <i>A. veronii</i>	6	9	8	8	8	9	9	8		6	15	15	14	12	4	14	12
10 <i>A. jandaei</i>	5	10	10	9	8	10	10	10	7		12	13	14	12	7	13	12
11 HG11	9	6	7	7	10	9	6	10	10	10		11	11	13	14	1	13
12 <i>A. schubertii</i>	12	13	13	13	13	13	13	16	15	14	14		6	13	14	11	15
13 <i>A. diversa/ DNA group 501</i>	12	13	14	14	14	14	12	16	15	14	13	3		15	14	11	14
14 <i>A. trota</i>	6	11	11	10	7	9	11	10	8	7	11	14	14		12	13	14
15 <i>A. allosaccharophila</i>	6	8	8	8	9	7	9	7	4	7	10	14	14	9		14	13
16 <i>A. encheleia</i>	8	6	7	7	9	9	6	10	9	10	3	14	13	10	9		13
17 <i>A. popoffii</i>	9	3	5	5	10	8	8	10	10	10	7	14	14	11	9	7	

Η τοπολογία των φυλογενετικών δέντρων διαφέρει μεταξύ των γονιδίων (*gyrB*, *crp60*) αλλά και των αναλύσεων (ML, NJ). Τα τρία στελέχη που μελετήθηκαν, ομαδοποιούνται μεταξύ τους και με την ομάδα *Aeromonas veronii* στις δύο αναλύσεις και στα δύο γονίδια. Ωστόσο, η

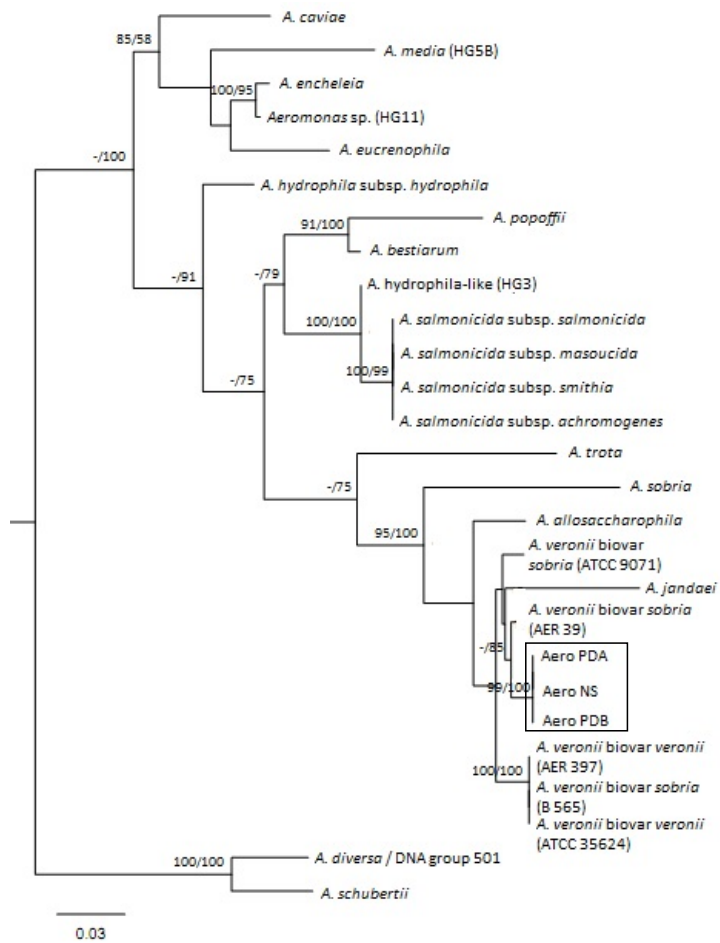
ομάδα της *A. veronii* είναι παραφυλετική (*A. jandaei*) και δε στηρίζεται στατιστικά στην ML ανάλυση για το γονίδιο *crn60*. Σύμφωνα με αυτή την ανάλυση για το γονίδιο *crn60*, τα τρία στελέχη (Aero NS, Aero PDA, Aero PDB) και τα είδη *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei* και *A. allosaccharophila* συγκροτούν μαζί ένα μονοφυλετικό κλάδο που εσωτερικά του οι σχέσεις μεταξύ των ειδών δεν είναι ξεκάθαρες. Τα φυλογενετικά δέντρα που παρήχθησαν παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.4,3.5. Παρατίθενται μόνο τα δέντρα της ML ανάλυσης. Τα αποτελέσματα της NJ ανάλυσης είναι ενσωματωμένα στις τιμές της στατιστικής υποστήριξης των κλάδων της ML.

Πίνακας 3.4. Οι γενετικές αποστάσεις (%), για τα γονίδια *gyrB* και *crn60* μεταξύ των ειδών στελεχών *Aeromonas veronii* που συμπεριλήφθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις.

<i>gyrB/crn60</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> (ATCC 9071)		2	3	3	3	2	2	2
2 <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> (AER39)		2	2	2	2	1	1	1
3 <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> (B565)		1	3	0	0	3	3	3
4 <i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> (ATCC 35624)		1	2	0	0	3	3	3
5 <i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> (AER397)		1	3	0	0	3	3	3
6 Aero NS		1	3	2	2	2	0	0
7 Aero PDA		-	-	-	-	-	-	0
8 Aero PDB		1	3	2	2	2	0	-



Εικόνα 3.4. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών που μελετήθηκαν (σε ορθογώνιο πλαίσιο), με άλλα είδη *Aeromonas* σύμφωνα με την τοπολογία που προέκυψε από την ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ML) για το γονίδιο *gyrB*. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap για την ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (NJ) και ακολουθούν οι τιμές για την ML. Παρουσιάζονται μόνο οι τιμές > 75% για την NJ και > 50% για την ML.



Εικόνα 3.5. Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των στελεχών που μελετήθηκαν (σε ορθογώνιο πλαίσιο), με άλλα είδη *Aeromonas* σύμφωνα με την τοπολογία που προέκυψε από την ανάλυση Μέγιστης Πιθανοφάνειας (ML) για το γονίδιο *crpB60*. Οι αριθμοί στους κλάδους αντιστοιχούν στις τιμές bootstrap για την ανάλυση Σύνδεσης Γειτόνων (NJ) και ακολουθούν οι τιμές για την ML. Παρουσιάζονται μόνο οι τιμές > 75% για την NJ και > 50% για την ML.

3.1.3. Δοκιμασίες χημικής ευαισθησίας

Το στέλεχος Aero NS ήταν ανθεκτικό στην αμπικιλίνη ενώ παρουσίασε ευαισθησία σε σχεδόν όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν (Πίνακας 3.5) καθώς και στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 (Πίνακας 3.1).

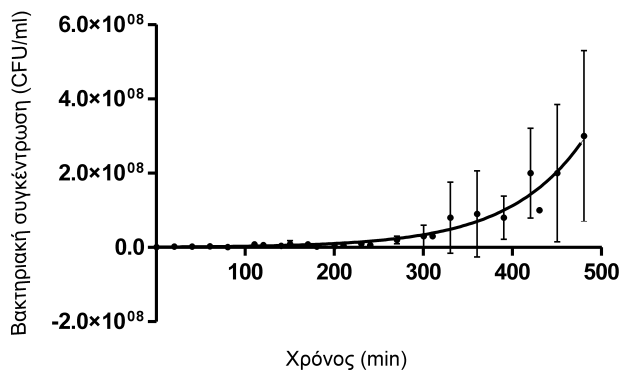
Πίνακας 3.5. Τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν και τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ευαισθησίας για το στέλεχος Aero NS. Με γαλάζιο χρώμα σημειώνονται τα αντιβιοτικά που διατίθενται στο εμπόριο για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες.

Αντιβιοτικό	(μg)	Απόκριση
Beta-lactam penicillins		
Ampicillin (AMP)	10	R
2nd generation Cephalosporins		
Cefaclor (CEC)	30	I
Tetracyclines		
Tetracycline (TE)	30	S
Oxytetracycline (OT)	30	S
Folate pathway Inhibitors		
Sulphamethoxazole/Trimethoprim (SXT)	25	S
Quinolones		
Oxolinic acid (OA)	2	S
Flumequine (UB)	30	S
Phenicols		
Chloramphenicol (C)	30	S
Nitrofurans		
Furazolidone (FR)	50	S
Others		
Florfenicol (FFC)	30	S

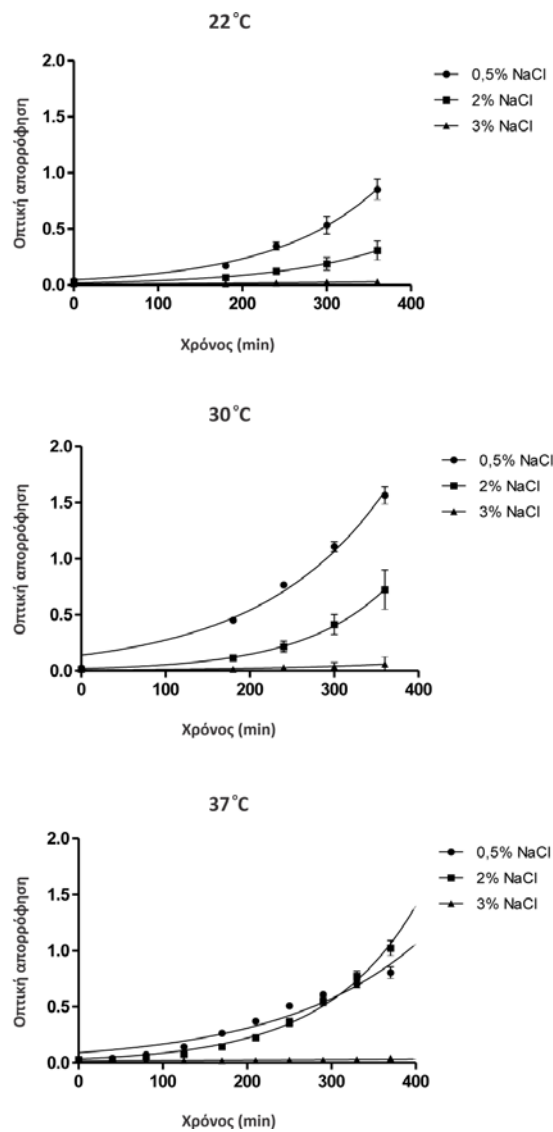
R = ανθεκτικότητα, I = ενδιάμεση ευαισθησία, S = ευαισθησία

3.1.4. Μελέτη της αύξησης

Η καμπύλη ανάπτυξης για το στέλεχος Aero NS (25°C) παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.6. Ο χρόνος διπλασιασμού, προσδιορίστηκε στα 58 min. Δεδομένων των μεγάλων αποκλίσεων που προέκυψαν στην εκτίμηση του πληθυσμιακού μεγέθους η καμπύλη αυτή δε χρησιμοποιήθηκε για την περαιτέρω συσχέτιση πληθυσμιακού μεγέθους και οπτικής απορρόφησης. Η μεγάλη απόκλιση στην εκτίμηση οφείλεται σε τεχνικά σφάλματα κατά τη διαδικασία επιστροφής των αραιώσεων στο στερεό θρεπτικό (plating). Οι βέλτιστες συνθήκες αύξησης για το στέλεχος Aero NS ήταν 0.5% NaCl και θερμοκρασία 30°C. Παρουσίασε μειωμένους ρυθμούς αύξησης σε αλατότητα 2% και 3% NaCl και στις θερμοκρασίες 12°C και 37°C. Στους 12°C δεν παρατηρήθηκε αύξηση κατά τις 6 πρώτες ώρες επώασης σε καμία αλατότητα, αλλά μόνο μετά από επώαση 18-24 h. Το ίδιο ισχύει και για την αλατότητα 3%. Δεν σημειώθηκε αύξηση σε αλατότητα 4% NaCl και σε θερμοκρασία 4°C. Ο ρυθμός αύξησης ήταν ίδιος στις θερμοκρασίες 22°C και 37°C για την αλατότητα 0.5% NaCl αλλά μεγαλύτερος για την αλατότητα 2% στη θερμοκρασία 37°C. Τα αποτελέσματα των δοκιμών στις αλατότητες 0.5%, 2% και 3% NaCl και στις θερμοκρασίες 22°C, 30°C και 37°C παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.7.



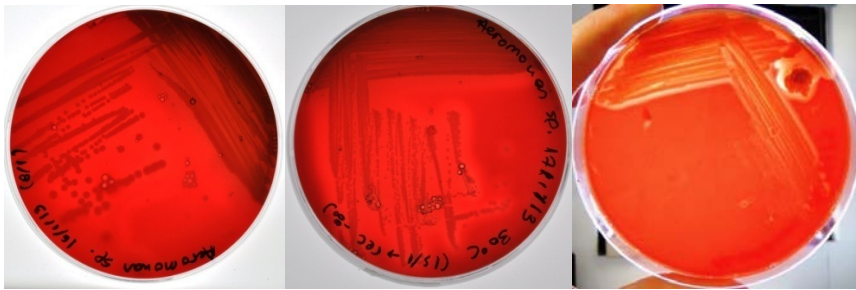
Εικόνα 3.6. Καμπύλη ανάπτυξης για το στέλεχος Aero NS στους 25°C.



Εικόνα 3.8. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αύξησης του στελέχους Aero NS στις θερμοκρασίες 22°C, 30°C και 37°C σε αλατότητα 0.5%, 2% και 3% NaCl.

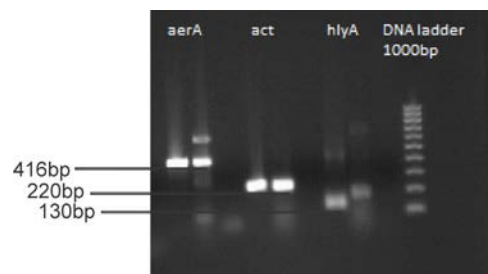
3.1.5. Παράγοντες μολυσματικότητας

Στο αίμα αλόγου παρατηρήθηκε ήπια β-αιμόλυση μόνο μετά από επώαση 48 ωρών στους 25°C και ελαφρώς πιο έντονη στους 30°C. Σε αίμα λαυρακιού, παρατηρείται β-αιμόλυση στους 25°C από τις πρώτες 24 ώρες επώασης. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αιμόλυσης για το στέλεχος Aero NS φαίνονται στην Εικόνα 3.9.

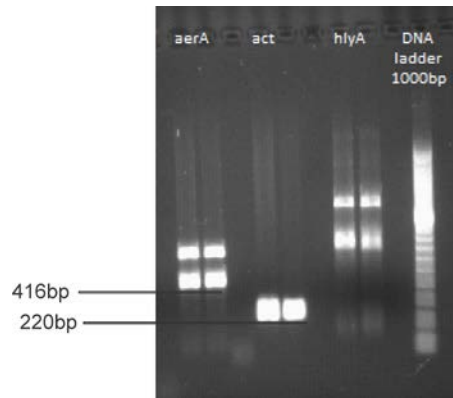


Εικόνα 3.9. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας αιμόλυσης σε στερεό θρεπτικό (BA) για το στέλεχος Aero NS. Από αριστερά προς τα δεξιά, η δοκιμασία σε αίμα αλόγου στους 25°C και 30°C μετά από 48 ώρες επώασης και η δοκιμασία σε αίμα λαυρακιού στους 25°C μετά από 24 ώρες επώασης.

Το τυπικό στέλεχος *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control για τις PCR ήταν θετικό σε όλες τις αντιδράσεις (Εικόνα 3.10). Τα γονίδια *aerA* και *act* εντοπίστηκαν και στα τρία στελέχη που μελετήθηκαν εδώ (Εικόνα 3.10, 3.11). Το γονίδιο *ahh1* εντοπίστηκε μόνο στο θετικό control (Εικόνα 3.10). Σημειώνεται ότι στα γονίδια *aerA* και *ahh1*, προέκυψαν περισσότερες από μία μπάντες, πέραν της αναμενόμενης (Πίνακας 2.2).



Εικόνα 3.10. Τα αποτελέσματα της PCR για τον εντοπισμό γονιδίων τοξικότητας στα στελέχη *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 (αριστερά) και Aero NS (δεξιά).



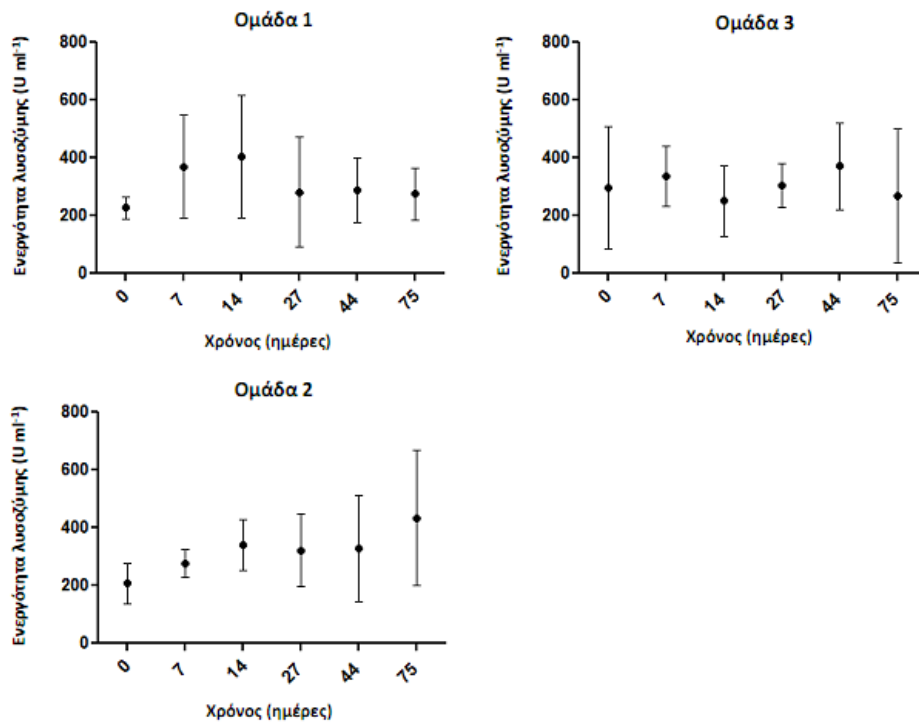
Εικόνα 3.11. Τα αποτελέσματα της PCR για τον εντοπισμό γονιδίων τοξικότητας στα στελέχη Aero PDA (αριστερά) και Aero PDB (δεξιά).

3.2. Έλεγχος της ανοσολογικής απόκρισης των εμβολιασμένων ψαριών

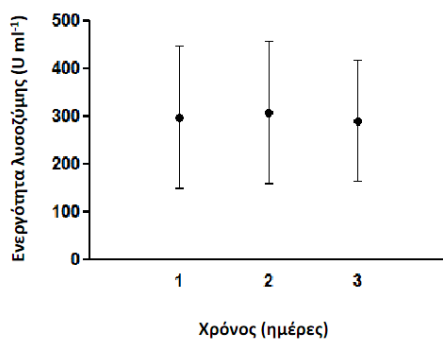
Κατά τον έλεγχο τοξικότητας δεν παρατηρήθηκαν θνησιμότητες οπότε το πείραμα συνεχίστηκε με χορήγηση των δύο συγκεντρώσεων βακτηρίνης. Επίσης, θνησιμότητες δεν παρατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στα εμβολιασμένα ψάρια σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις βακτηρίνης.

3.2.1. Μέτρηση Λυσοζύμης στον ορό του αίματος

Η συγκέντρωση της λυσοζύμης δεν διέφερε σε καμία από τις ημέρες του πειράματος για καμία από τις ομάδες συγκέντρωσης αντιγόνου. Για την κάθε ομάδα ξεχωριστά, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών του πειράματος με $p = 0.441$ για την ομάδα 1, $p = 0.423$ για την ομάδα 2 και $p = 0.739$ για την ομάδα 3. Η συγκέντρωση λυσοζύμης δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων διαφορετικής συγκέντρωσης αντιγόνου σε καμία ημέρα πειράματος. Αναλυτικά, για την ημέρα 0 δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με $p = 0.874$, για την ημέρα 7 με $p = 0.556$, για την ημέρα 14 με $p = 0.106$, για την ημέρα 27 με $p = 0.916$, για την ημέρα 44 με $p = 0.684$ και για την ημέρα 75 με $p = 0.480$. Η μέση τιμή της ενεργότητας λυσοζύμης και η τυπική απόκλιση για κάθε ημέρα πειράματος σε κάθε ομάδα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.12. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση για κάθε συγκέντρωση βακτηρίνης παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.13.



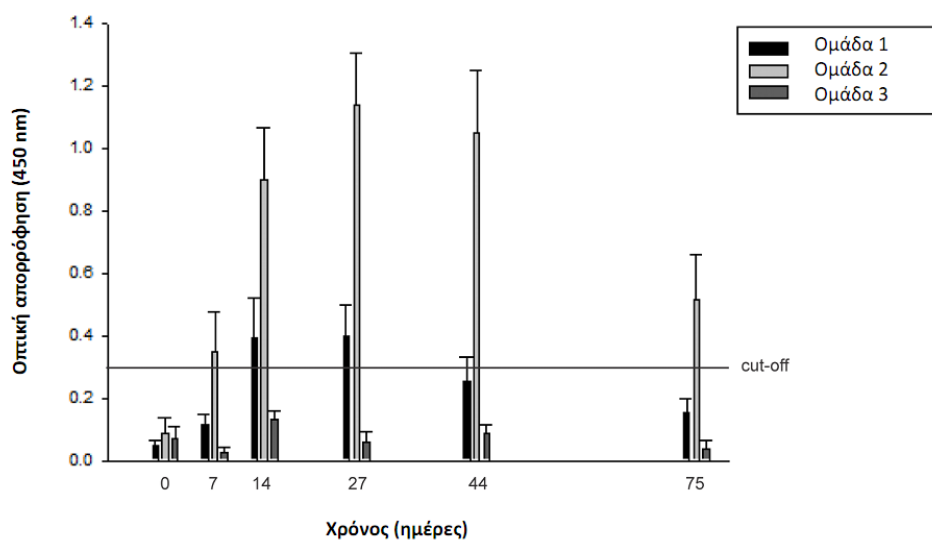
Εικόνα 3.12. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της ενεργότητας λυσοζύμης συναρτήσει του χρόνου (ημέρες πειράματος) στα δείγματα ψαριών που αναλύθηκαν, ανά ομάδα (1,2,3) συγκέντρωσης αντιγόνου.



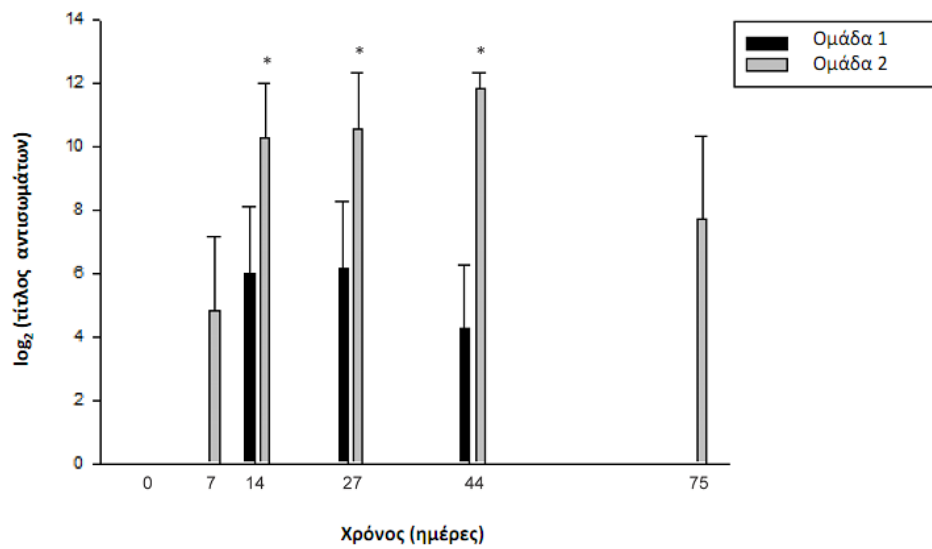
Εικόνα 3.13. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της ενεργότητας λυσοζύμης ανά ομάδα (1,2,3) συγκέντρωσης αντιγόνου.

3.2.2. Προσδιορισμός τίτλου αντισωμάτων

Ειδικά αντισώματα για *Aeromonas veronii* (Aero NS) ανιχνεύθηκαν από την 7^η ημέρα μέχρι την 75^η στην ομάδα 2 και από την 14^η έως την 44^η ημέρα για την ομάδα 1. Ο τίτλος αντισωμάτων ($\log_{(2)}$) σε συνάρτηση με το χρόνο για τις ομάδες 1 και 2 παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.15. Η οπτική απορρόφηση (450 nm) σε αραιώση 1:1000. συνάρτηση του χρόνου για τις 3 συγκεντρώσεις αντιγόνου παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.14. Η ανίχνευση των αντισωμάτων έγινε σε αραιώσεις ορού 1:1000-1:8000 για την ομάδα 2 και 1:1000-1:2000 για την ομάδα 1. Ο τίτλος αντισωμάτων διέφερε μεταξύ των ομάδων αντιγόνου ($p < 0.05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων αντιγόνου παρατηρήθηκαν τις ημέρες 14, 27, 44 ($p < 0.05$). Ο τίτλος αντισωμάτων δεν διέφερε μεταξύ των ομάδων τις ημέρες 7 και 75 με $p = 0.071$ και $p = 0.108$ αντίστοιχα. Μεταξύ των ημερών 14, 27, 44, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p = 0.719$). Τις ημέρες 14 και 27 ο τίτλος διέφερε μόνο μεταξύ των ομάδων 2 και 3 ($p < 0.05$) ενώ την ημέρα 44 στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των ομάδων 2-1 και 2-3 ($p < 0.05$).



Εικόνα 3.14. Η οπτική απορρόφηση (450 nm) σε αραιώση 1:1000 συνάρτηση του χρόνου για τις 3 ομάδες συγκέντρωσης αντιγόνου. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα.



Εικόνα 3.15. Ο τίτλος αντισωμάτων (\log_2) συνάρτηση του χρόνου, για τις ομάδες συγκέντρωσης αντιγόνου 1 και 2. Οι μπάρες αναπαριστούν τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σημειώνονται με (*).

4. Συζήτηση

Σκοπός της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση παθογόνων βακτηριακών στελεχών, που προκαλούν θνησιμότητες και νοσηρότητα σε εκτρεφόμενα λαβράκια και η ανάπτυξη πειραματικού αυτεμβολίου για την αντιμετώπιση της σχετιζόμενης με αυτά ασθένειας. Η ασθένεια που περιγράφηκε παραπάνω προσβάλλει ψάρια εμπορικού μεγέθους και δεν ενδείκνυται η χρήση αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση της τόσο για θέματα κόστους, όσο και για θέματα προστασίας του τελικού καταναλωτή. Από την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των στελεχών που απομονώθηκαν από ασθενή λαβράκια στις εν λόγω μονάδες εκτροφής, ο αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας προσδιορίστηκε ως στέλεχος *Aeromonas veronii*. Το βακτηριακό αυτό είδος δεν έχει αναφερθεί ξανά στο λαβράκι και το περιστατικό συγκαταλέγεται στις λίγες σχετικά περιπτώσεις που στελέχη του γένους *Aeromonas* προσβάλλουν ψάρια του θαλασσινού νερού. Ασθένειες που οφείλονται σε στελέχη *Aeromonas* εμφανίζονται μόνο ως μεμονωμένα περιστατικά στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου όπου τα καλλιεργούμενα είδη είναι κυρίως ψάρια του θαλασσινού νερού και δεν διατίθενται εμβόλια για την πρόληψη ασθενειών από αυτά.

Τα προσβεβλημένα λαβράκια από τις ιχθυοτροφικές μονάδες όπου παρουσιάστηκε η ασθένεια παρουσίασαν χαρακτηριστικά γνωρίσματα αιμορραγικής σηψαιμίας από κινητά είδη *Aeromonas* [48]. Δερματικές αλλοιώσεις που περιλαμβάνουν αποφολίδωση και εξελίσσονται σε νεκρωτικά έλκη, εμφάνιση εξωφθαλμίας και αναιμία, αποτελούν χαρακτηριστικά γνωρίσματα της λοίμωξης από *A. hydrophila*, τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της ασθένειας. Άλλα συμπτώματα όπως ανορεξία, νωθρή κολυμβητική συμπεριφορά, υπόλευκα οζίδια στην επιφάνεια των εσωτερικών οργάνων και κυρίως στο νεφρό (*A. schubertii*), διόγκωση του σπλήνα (*A. caninae*), συμπεριλαμβάνονται στη λοίμωξη από κινητά είδη *Aeromonas* αν και τα δύο πρώτα είναι γενικότερα συμπτώματα ασθένειας. Αιμορραγία του ήπατος, διόγκωση του σπλήνα, νέκρωση των νεφρών, ερυθρότητα των πτερυγίων και σκούρος χρωματισμός του δέρματος είναι συμπτώματα της χρόνιας μορφής δοθινίωσης (*A. salmonicida*) και αρκετά από τα παραπάνω σχετίζονται με τη λοίμωξη από μη τυπικά στελέχη *A. salmonicida*, όπως εκδηλώνεται η ασθένεια σε είδη εκτός των σολομοειδών [100].

Δεδομένου ότι ασθένεια που οφείλεται στο είδος *Aeromonas veronii* περιγράφεται για πρώτη φορά στο λαβράκι, και εξαιτίας διαφόρων ταξινομικών ζητημάτων που σχετίζονται με τα είδη *A. veronii* και *A. sobria* (βλ. παρακάτω) αλλά και με τις δύο βιοποικιλίες του είδους *A. veronii*, ακολουθεί αρκετά λεπτομερής συζήτηση σε σχέση με την τοποθέτηση των στελεχών που μελετήθηκαν εδώ σε συγκεκριμένο τάξο. Στο γένος *Aeromonas* (*Aeromonadaceae*), περιλαμβάνονται βακτηριακά είδη ιδιαίτερα εξαπλωμένα στα υδάτινα οικοσυστήματα κυρίως των γλυκών νερών [101]. Ταξινομούνταν παλαιότερα μαζί με τα *Vibrio*, *Photobacterium*, και *Plesiomonas* στην οικογένεια *Vibrionaceae* που διαχώριζε τα θετικά για τη κυτοχρωμική οξειδάση βακτήρια με δυνατότητα κίνησης μέσω ενός πολικού μαστιγίου και αναερόβιου μεταβολισμού, από τη στενά συγγενική οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, που περιλαμβάνει αρνητικά για την οξειδάση βακτήρια με περίτριχα μαστίγια [102]. Μετά την εργασία των [103] το γένος μεταφέρθηκε στην οικογένεια *Aeromonadaceae*, ενώ όλο και περισσότερα στοιχεία από μοριακές μελέτες (ποσοστό GC, αλληλουχίες του 16S, κ.α.) συνηγορούν στη διάκριση αυτή [101].

Η απομόνωση βακτηρίων *Aeromonas* είναι σχετικά εύκολη σε μη επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα καθώς και σε υποστρώματα καλλιέργειας εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae*) όπως το AIA. Με προσθήκη αμπικιλίνης το AIA γίνεται εκλεκτικό για την απομόνωση στελεχών *Aeromonas*, αφού τα είδη του γένους είναι κατά κανόνα ανθεκτικά σε αυτό το αντιβιοτικό [104]. Η παρουσία πράσινων αποικιών σχετίζεται με την αδυναμία μεταβολισμού της ξυλόζης χαρακτηριστική ιδιότητα του γένους *Aeromonas* [104]. Η απουσία μαύρου στίγματος (Εικόνα 3.1) υποδηλώνει τη μη παραγωγή H_2S , παρατήρηση που συμφωνεί και με το API (Πίνακας 3.1).

Τα στελέχη *Aeromonas* διακρίνονται από τα συγγενικά του γένους *Vibrio* από την αδυναμία αύξησης σε TCBS άγαρ και από την ικανότητα να αυξάνονται σε θρεπτικό χαμηλής αλατότητας και παρουσία του βιμπριοστατικού παράγοντα O/129 [101]. Παραδοσιακά το TCBS άγαρ χρησιμοποιείται για την επιλεκτική απομόνωση ειδών του γένους *Vibrio*. Από τα στελέχη που μελετήθηκαν το Aero NS δεν παρουσίασε αύξηση σε TCBS άγαρ, ενώ τα Aero PDA και Aero PDB παρουσίασαν περιορισμένη μόνο αύξηση. Στις περιπτώσεις που εμφανίζεται αύξηση

στελεχών *Aeromonas* (αραιή αύξηση του είδους *A. salmonicida*) σε TCBS άγαρ, οι αποικίες είναι μικρές (< 1 mm) και ποικίλουν σε χρώμα (κίτρινο/ πράσινο) ανάλογα με την ικανότητα του εκάστοτε στελέχους να μεταβολίζει ή όχι τη σουκρόζη που αποτελεί το αναερόβιο υπόστρωμα του TCBS [101]. Η εικόνα αυτή δε συμβαδίζει με τις λίγες αλλά μεγάλες αποικίες-συσσωματώματα που παρατηρήθηκαν στα στελέχη Aero PDA και Aero PDB. Ωστόσο, το κίτρινο χρώμα των αποικιών των Aero PDA, Aero PDB σχετίζεται με την αναερόβια διάσπαση της σουκρόζης για την οποία τα στελέχη προέκυψαν θετικά. Ο βιμπριοστατικός παράγοντας O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) χρησιμοποιείται για την ταξινομική διάκριση των *Vibrio* spp. από άλλα αρνητικά κατά Gram, θετικά για την οξειδάση βακτήρια [105]. Τα στελέχη του γένους *Aeromonas* είναι κατά κανόνα θετικά για την οξειδάση και ανθεκτικά στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 (150 µg). Ωστόσο, κάποια στελέχη *A. eucrenophila* και *A. veronii* bn. *veronii* μπορεί να εμφανίζουν ευαισθησία [104] όπως και το στέλεχος Aero NS για το οποίο ελέγχθηκε η απόκριση στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 (150 µg). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τη διάκριση όλων των στελεχών από το γένος *Vibrio* και συνηγορούν στη συσχέτιση του στελέχους Aero NS με το είδος *A. veronii* (*A. veronii* bn. *veronii*). Τέλος, η ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, ιδιότητα του στελέχους Aero NS βάσει των δοκιμασιών ευαισθησίας σε αντιβιοτικά, είναι τυπικό γνώρισμα του γένους *Aeromonas* και δεν έχει περαιτέρω ταξινομική αξία [104].

Πρώιμες μελέτες στο γένος *Aeromonas*, διέκριναν δύο κύριες ομάδες βάση χαρακτηριστικών της αύξησης και κάποιων βιοχημικών ιδιοτήτων: α) της *A. hydrophila*, που περιλαμβάνει τους περισσότερους εκπροσώπους του γένους, με μεσόφιλα, κινητά στελέχη που αυξάνονται καλά σε θερμοκρασίες 35-37°C και β) την ομάδα της *A. salmonicida* που περιλαμβάνει ψυχρόφιλα, μη-κινητά στελέχη που εμφανίζουν βέλτιστο αύξησης στους 22-25°C και δεν μεγαλώνουν στους 37°C [101]. Όσον αφορά τις συνθήκες αύξησης, όλα τα στελέχη μεγάλωσαν σε TSB 0.5% NaCl μετά από 24 ώρες επώασης στους 25°C, όμως οι βέλτιστες συνθήκες αλατότητας και θερμοκρασίας μελετήθηκαν μόνο για το στέλεχος Aero NS. Δεδομένου ότι το βέλτιστο αλατότητας παρατηρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση NaCl, το στέλεχος Aero NS διακρίνεται από το γένος *Vibrio*. Οι βέλτιστες συνθήκες αύξησης για το

στέλεχος αυτό ήταν 0.5% NaCl και 30°C, ενώ μεγαλώνει καλά στους 37°C. Βάσει της θερμοκρασίας, το Aero NS κατατάσσεται στα μεσόφιλα στελέχη του γένους *Aeromonas*.

Φαινοτυπικοί χαρακτήρες που παρατηρήθηκαν στα υπό μελέτη στελέχη, όπως ο μεταβολισμός των D-glucose και trehalose, παρουσία της κυτοχρωμικής οξειδάσης και καταλάσης, μη υδρόλυση της ουρίας και μη παραγωγή οξέων από το μεταβολισμό της xylose είναι χαρακτηριστικοί για το γένος *Aeromonas* [104]. Εξετάζοντας τη μορφολογία στο μικροσκόπιο, τα τρία στελέχη που μελετήθηκαν, παρουσίασαν τα τυπικά χαρακτηριστικά του γένους *Aeromonas* που περιλαμβάνει αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ραβδόσχημα, μεγέθους 0.3-1.0 x 1.0-3.5 μm [90]. Από τα τρία στελέχη το Aero NS στερείται της δυνατότητας κίνησης, κινητικότητα όμως παρατηρήθηκε στα στελέχη Aero PDA και Aero PDB.

Η ομάδα των κινητών, μεσόφιλων στελεχών διακρίθηκε περαιτέρω μέσω μελετών DNA υβριδισμού (hybridization group = HG) σε 8 ομάδες [106]. Διακρίθηκαν αρχικά, τρία “φαινοτυπικά” είδη (*A. hydrophila*, *A. sobria* και *A. caviae*) με διακριτές βιοχημικές ιδιότητες, που το καθένα περιλαμβάνει περισσότερες από μία ομάδες υβριδισμού (Abbott, *et al.*, 2003). Επόμενες μελέτες αύξησαν τον αριθμό των ομάδων DNA υβριδισμού καθώς και τα φαινοτυπικά είδη. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περί τα 37 είδη και υποείδη στο γένος. Το σύστημα API περιλαμβάνει μόνο 4 είδη (*A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. sobria* και *A. caviae*) που αντιστοιχούν στα φαινοτυπικά είδη που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ως εκ τούτου η ταυτοποίηση βάσει του API δεν μπορεί να είναι ακριβής στο επίπεδο του είδους. Όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν εδώ ταυτοποιήθηκαν βάσει του API ως *A. sobria*, η φαινοτυπική ομάδα του οποίου περιλαμβάνει και το είδος *A. veronii* *bn. sobria*, οπότε δεν υπάρχει ζήτημα ασυμφωνίας μεταξύ API και γενετικών δεικτών (βλ. παρακάτω) όσον αφορά την ταυτοποίηση στο επίπεδο του είδους. Επιπλέον, το όνομα «*A. sobria*» θεωρείται ότι χρησιμοποιείται συχνά λανθασμένα στη βιβλιογραφία δεδομένου ότι περιλαμβάνει δύο μόνο επιβεβαιωμένα στελέχη (CIP 7433, CDC 9540-76) [101].

Χρήσιμες βιοχημικές δοκιμασίες για την διάκριση ειδών μέσα στο σύμπλεγμα ειδών *A. sobria* συνοψίζονται από τους Abbott, Cheung *et al.* [104]. Αν και το στέλεχος Aero NS βρέθηκε αρνητικό για την παραγωγή Indole, είναι θετικό για τη χρήση σουκρόζης, χαρακτηριστικό του

A. veronii bv. *sobria*. Θετική απόκριση για την ODC είναι χαρακτηριστική του είδους *A. veronii* και πιο συγκεκριμένα του *A. veronii* bv. *sobria*. Η ανικανότητα μετατροπής της τρυπτοφάνης σε Indole είναι σχετικά σπάνιο χαρακτηριστικό των αερομονάδων. Αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των *A. salmonicida* και παρατηρείται συχνά σε στελέχη *A. schubertii* και *A. poroffii* [104]. Πρόσφατα έχει αναφερθεί και στα είδη *A. veronii* και *A. sobria* [80]. Τέλος, η ικανότητα αύξησης σε 3% NaCl (Aero NS) διαφοροποιεί τα είδη *A. veronii* (+) και *A. sobria* (-).

Σε επίπεδο ενδοειδικής διαφοροποίησης βιοχημικοί δείκτες που διακρίνουν τα *A. veronii* βίοναρ *sobria* και *A. veronii* βίοναρ *veronii* περιλαμβάνουν τις δοκιμασίες για Ornithine decarboxylase (ODC), Arginine dihydrolase (ADH) και Salicin. Βάση αυτών τα ODC⁻, ADH⁺, Salicin⁻ (Biolog) όπως το Aero NS ταυτοποιούνται ως *A. veronii* βίοναρ *sobria*. Η ευαισθησία ωστόσο στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 αν και σπάνιο χαρακτηριστικό στο γένος, εμφανίζεται στα *A. veronii* βίοναρ *veronii* [104]. Το Biolog περιλαμβάνει όλα τα είδη και υποείδη *Aeromonas*. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει ασυμφωνία μεταξύ βιοχημικών και γενετικών δεικτών για τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB. Σε κάθε περίπτωση και αυτά τα στελέχη ανήκουν στη φαινοτυπική ομάδα της *A. sobria* που περιλαμβάνει και στελέχη *A. veronii* και πιο συγκεκριμένα στελέχη της βιοποικιλίας *A. veronii* βίοναρ *sobria*.

Η παραγωγή καφέ χρωστικής (στελέχη Aero PDA, Aero PDB) αποτελεί έναν από τους κύριους χαρακτήρες που διαφοροποιούν το υποείδος *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. Ωστόσο εκπρόσωποι του είδους *A. salmonicida* συνήθως δεν έχουν δυνατότητα κίνησης [101,102] όπως τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB. Παραγωγή καφέ χρωστικής έχει ακόμα παρατηρηθεί στο είδος *A. media* [90] περιστασιακά στο είδος *A. hydrophila* [102] και σε σπάνια στελέχη *A. bestiarum* και *A. eucrenophila* [104]. Έχει αναφερθεί μεμονωμένα στο είδος *A. veronii* [107] ωστόσο φαίνεται να αποτελεί εξαιρετικά σπάνια περίπτωση.

Η γενετική διάκριση των *Aeromonas* έχει βασιστεί στο περιεχόμενο του γονιδιώματος σε G+C (mol%), σε DNA υβριδισμό, σε αλληλουχίες του 16S και πιο πρόσφατα σε αναλύσεις που συμπεριλαμβάνουν αρκετούς γενετικούς τόπους ταυτόχρονα (Multilocus sequence analysis = MLSA) [102]. Γενικά τα αποτελέσματα από τις αλληλουχίες 16S έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τον υβριδισμό DNA, ωστόσο παρουσιάζονται αδυναμίες

στη διάκριση στενά συγγενικών ειδών [108,109] ή στελεχών του ίδιου είδους (ενδοειδική διαφοροποίηση < 1%) [79]. Σε πιο πρόσφατες μελέτες, ο αριθμός των γενετικών τόπων ανά ανάλυση αυξάνεται (MLSA) και εντοπίζονται γενετικοί τόποι με μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα. Δεδομένων των παραπάνω, το γονίδιο 16S, δεν χρησιμοποιήθηκε στις φυλογενετικές αναλύσεις της παρούσας εργασίας. Η ταυτοποίηση ωστόσο, βάσει της σύγκρισης της αλληλουχίας του 16S για το στέλεχος Aero NS ταυτοποίησε το είδος ως *A. veronii*, σε συμφωνία με τα άλλα δύο γονίδια.

Από τα συνολικά 27 περιγεγραμμένα είδη του γένους, η 2^η έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [90] περιλαμβάνει 14 είδη και 17 ομάδες DNA υβριδοποίησης (Πίνακας 2.4). Έντεκα νέα είδη (*A. culicicola*, *A. simiae*, *A. molluscorum*, *A. bivalvium*, *A. aquariorum*, *A. tecta*, *A. piscicola*, *A. fluvialis*, *A. taiwanensis*, *A. sanarellii* και *A. rivuli*) έχουν περιγραφεί σχετικά πρόσφατα [110], ενώ για τις ομάδες υβριδοποίησης που δεν έχουν ονομαστεί, η *Aeromonas* sp.HG11 συμπεριλαμβάνεται πλέον στο είδος *A. encheleia* [111] και για την *Aeromonas* sp. HG13 (πρώην ομάδα 501) έχει προταθεί η μετονομασία σε *A. diversa* [112]. Οι λόγοι για τους οποίους παραλείπονται αρκετά είδη από το Bergey's Manual of Systematic Bacteriology σχετίζονται είτε με την πρόσφατη περιγραφή κάποιων εξ αυτών, είτε με λανθασμένη ονοματολογία. Παράλληλα, αρκετά από τα πρόσφατα περιγεγραμμένα είδη έχουν περιγραφεί βάσει ενός μόνο στελέχους και η εγκυρότητα τους αμφισβητείται [113]. Για τους λόγους αυτούς, στις φυλογενετικές αναλύσεις της παρούσας εργασίας συμπεριλήφθηκαν μόνο τα είδη που περιλαμβάνονται στη 2^η έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, δεδομένου ότι αντιπροσωπεύονται όλες οι ομάδες DNA υβριδοποίησης με είδη που είναι καλά περιγεγραμμένα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των φυλογενετικών αναλύσεων και βάσει των μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, δεν προκύπτει η διάκριση των τριών στελεχών που μελετήθηκαν εδώ ούτε μεταξύ τους, ούτε από το είδος *A. veronii*. Όσον αφορά την τοπολογία, τα τρία στελέχη που μελετήθηκαν ομαδοποιούνται μεταξύ τους στις δύο αναλύσεις και στα δύο γονίδια που μελετήθηκαν εδώ. Σε συνδυασμό με τις μηδενικές γενετικές αποστάσεις μεταξύ τους, δεν προκύπτει η διάκρισή τους με γενετικούς δείκτες ως

διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους. Από την τοπολογία των φυλογενετικών δέντρων και βάση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των τριών στελεχών με στελέχη του είδους *A. veronii* δεν προκύπτει η διάκριση τους από το είδος *A. veronii*. Η μέση ενδοειδική απόσταση (εδώ ελέγχθηκε μόνο για το είδος *A. veronii*) για το γονίδιο *gyrB* και το εύρος των αποστάσεων μεταξύ των στελεχών *A. veronii* για το γονίδιο *crp60* συμφωνούν με τη βιβλιογραφία [81,110].

Όσον αφορά τις φυλογενετικές σχέσεις του είδους *A. veronii* με άλλα είδη του γένους, οι περισσότερες φυλογενέσεις διακρίνουν είδη και ομάδες ειδών αλλά συχνά αδυνατούν να ξεκαθαρίσουν τις σχέσεις μεταξύ αυτών. Ανάλογα με το είδος της ανάλυσης και τον αριθμό των γενετικών τόπων που χρησιμοποιούνται, το *A. veronii* ομαδοποιείται με τα *A. sobria*, *A. jandaei* και *A. allosaccharophila* [82,110,114] ενώ σε άλλες η τοπολογία αυτή δεν προκύπτει καν [75,77]. Στην παρούσα εργασία δεν προέκυψε η ομαδοποίηση αυτή βάσει των αναλύσεων για το γονίδιο *gyrB*, ωστόσο το είδος *A. veronii* συγκροτεί ένα μονοφυλετικό κλάδο που στηρίζεται στατιστικά (Εικόνα 3.4). Για το γονίδιο *crp60* το *A. veronii* ομαδοποιείται με τα *A. sobria*, *A. jandaei* και *A. allosaccharophila* και ο κλάδος αυτός στηρίζεται στατιστικά. Ωστόσο, το είδος *A. veronii* είναι παραφυλετικό σε σχέση με το *A. jandaei* στην ανάλυση ML. Η σχέση αυτή δε στηρίζεται στατιστικά, σε καμία από τις δύο αναλύσεις, και δεν θα αναλυθεί περαιτέρω. Εξάλλου, η σχέση των δύο ειδών δεν ξεκαθαρίζεται από το γονίδιο αυτό ούτε στην εργασία των Miñana-Galbis et al. [81]. Σημειώνεται επίσης, ότι η μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών του γένους *Aeromonas* δεν αποτελούν αντικείμενο της παρούσας εργασίας, τα αποτελέσματα προέκυψαν από διαφορετικό σύνολο δεδομένων και η τοπολογία που διαφέρει προκύπτει από διαφορετική ανάλυση. Τέλος, η μέση γενετική απόσταση για το γένος, συμφωνεί με τη βιβλιογραφία και στα δύο γονίδια (Miñana-Galbis, et al., 2009, Martinez-Murcia, et al., 2011).

Η ομαδοποίηση των υπό μελέτη στελεχών με κάποια από τις δύο βιοποικιλίες του είδους *A. veronii* δεν κατέστη δυνατή με τη χρήση των μοριακών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν εδώ. Αν και τα *A. veronii* biovar *sobria* (HG8) και *A. veronii* biovar *veronii* (HG10) περιγράφηκαν ανεξάρτητα, παλαιότερες μελέτες έχουν επισημάνει ότι η διάκριση μεταξύ των δύο αυτών ομάδων DNA υβριδισμού δεν είναι δυνατή παρά τις βιοχημικές τους

διαφορές που παρουσιάζουν [104,115]. Πιο πρόσφατες μελέτες, βασισμένες σε αλληλουχίες γονιδίων οικιακής οικονομίας [74,75,80] καθώς και τα αποτελέσματα των αναλύσεων της παρούσας εργασίας, συμφωνούν με τη διαπίστωση αυτή.

Αν και η ταξινομική του γένους φαίνεται να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα από γεγονότα ανασυνδυασμών [114], τέτοια γεγονότα έχουν εντοπιστεί σε διάφορα γονίδια οικιακής οικονομίας που χρησιμοποιούνται στις σύγχρονες φυλογενέσεις *Aeromonas*, με τα γονίδια *gyrB*, *recA* και *dnaK* να επηρεάζονται περισσότερο [80,82]. Σύμφωνα με τη μελέτη των Silver et al. [116] στελέχη *A. veronii* που μοιράζονται τον ίδιο οικολογικό θώκο μπορεί να διακρίνονται με φαινοτυπικούς δείκτες από άλλα, η ανάλυση όμως αλληλουχιών γονιδίων οικιακής οικονομίας αποτυγχάνει να εκφράσει ένα τέτοιο πρότυπο. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι μια πολύπλοκη και πρόσφατη εξελικτική ιστορία μπορεί να εξηγήσει την υψηλή συχνότητα οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ στελεχών που εντοπίζονται σε διαφορετικό οικολογικό θώκο και να αλλοιώσει το πρότυπο των γονιδίων που μεταφέρονται κάθετα. Επισημαίνουν επίσης, ότι στην περίπτωση ευρύοικων οργανισμών (generalists) όπως τα βακτήρια του γένους *Aeromonas*, η αύξηση απλά του αριθμού των μοριακών δεικτών που χρησιμοποιούνται στις αναλύσεις, δεν είναι επαρκής.

Συνοψίζοντας λοιπόν την ενότητα του χαρακτηρισμού και της ταυτοποίησης των στελεχών που μελετήθηκαν, τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB δεν διακρίνονται μεταξύ τους βάσει των μοριακών και βιοχημικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό και μπορεί πλέον να αντιμετωπίζονται ως το ίδιο στέλεχος Aero PD. Σε σχέση με το στέλεχος Aero NS, προέκυψαν βιοχημικές διαφορές μεταξύ τους οπότε θεωρούνται πλέον διαφορετικά στελέχη, στενά συγγενικά βάσει των μοριακών δεικτών του είδους *A. veronii*.

Η μολυσματικότητα των αερομονάδων φαίνεται να είναι πολυπαραγοντική. Σε αυτήν συμμετέχουν δομικά κυτταρικά στοιχεία (τριχίδια και μαστίγια), ουσίες που σχετίζονται με την ανίχνευση, προσκόλληση και προσβολή του ξενιστή (type III secretion system, adhesins, S-layer proteins), ενδοτοξίνες (λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης/LPS), εξωένζυμα (λιπάση, πρωτεάση) και εξωτοξίνες με εντεροτοξική, αιμολυτική και κυτταροτοξική δράση [102]. Στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκαν τα γονίδια της αερολυσίνης (*aerA*), τυπικής

κυτταρολυτικής τοξίνης του γένους, με αιμολυτική και εντεροτοξική δράση και το γονίδιο της κυτταρολυτικής εντεροτοξίνης, act σε όλα τα κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν. Αυτά σε συνδυασμό με τα θετικά αποτελέσματα της διαδικασίας αιμόλυσης σε στερεό θρεπτικό, συνηγορούν στη μολυσματική φύση στελέχους Aero NS και πιθανά των Aero PDA και Aero PDB [117,118,119]. Παράλληλα, από την εικόνα της αιμόλυσης σε στερεό θρεπτικό προέκυψαν για το στέλεχος Aero NS, ενδείξεις ειδικότητας του μηχανισμού αιμόλυσης στο αίμα (αιμοσφαιρίνη) του λαβρακιού σε σχέση με το αίμα θηλαστικού (άλογο).

Δεδομένης της αντιγονικής ποικιλότητας των κινητών ειδών *Aeromonas* και των ενδείξεων μολυσματικότητας των κλινικών στελεχών που μελετήθηκαν εδώ το περιστατικό αποτέλεσε ιδανική περίπτωση για τη μελέτη της πρόληψης της ασθένειας μέσω της ανάπτυξης πειραματικού αυτεμβολίου. Λόγω χρονικών περιορισμών δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του εμβολίου με πειραματική επιμόλυνση των εμβολιασμένων ψαριών (challenge). Για το λόγο αυτό, μετρήθηκαν ανοσολογικοί δείκτες όπως η συγκέντρωση της λυσοζύμης και ο τίτλος αντισωμάτων στον ορό προκειμένου να γίνει μια εκτίμηση της ενδεχόμενης ανοσολογικής απόκρισης των ψαριών.

Η αποτελεσματικότητα εμβολίων στα ψάρια, ελέγχεται με πειράματα επιμόλυνσης των εμβολιασμένων ψαριών (challenge experiments) και μέτρηση του σχετικού ποσοστού επιβίωσης (relative percent survival-RPS). Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, όπου η ανίχνευση αντισωμάτων είναι δείκτης της αποτελεσματικότητας των εμβολίων, στα ψάρια αυτή η προσέγγιση δεν είναι αξιόπιστη. Μερικά είδη παράγουν αντισώματα σαν απόκριση στον εμβολιασμό [120] ενώ άλλα όχι [58,121]. Παρόλα αυτά, η αποτελεσματικότητα του εμβολίου που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας δεν ήταν δυνατό να ελεγχθεί μέσω πειραματικής επιμόλυνσης. Για το λόγο αυτό, η ενδεχόμενη ανοσολογική απόκριση των εμβολιασμένων λαβρακιών μελετήθηκε βάσει δεικτών του ειδικού και μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος.

Σε γενικές γραμμές, τα συστατικά του ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος (B-λεμφοκύτταρα, ανοσοσφαιρίνες) στα ψάρια του θαλασσινού νερού αναπτύσσονται αργότερα σε σχέση με τα ψάρια του γλυκού νερού [26]. Έτσι, ο χρόνος πλήρους ανάπτυξης του

ανοσοποιητικού συστήματος, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για τον επιτυχή έλεγχο μιας ασθένειας μέσω εμβολιασμού. Στο λαβράκι, τα λεμφικά όργανα (πρόνεφρος και θύμος) είναι πλήρως ανεπτυγμένα σε ιχθύδια 50 ημερών και σε αυτό το στάδιο εντοπίζονται ώριμα Β-λεμφοκύτταρα και ανοσοσφαιρίνες-M (IgM) [27]. Από αυτό το χρονικό σημείο και έπειτα έχει νόημα ο εμβολιασμός που σκοπό έχει την ενεργοποίηση του ειδικού (και μη ειδικού) ανοσοποιητικού συστήματος και την επίτευξη ειδικής ανοσίας μέσω παραγωγής αντισωμάτων (IgM) και κυττάρων μνήμης (B,T λεμφοκύτταρα).

Ένα από τα κύρια συστατικά του μη-ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος είναι το ένζυμο λυσοζύμη, τα επίπεδα ή η ενεργότητα της οποίας είναι σημαντικός δείκτης της μη ειδικής ανοσίας στα ψάρια. Η λυσοζύμη παράγεται στο συκώτι αλλά ανιχνεύεται σε μια ποικιλία ζωικών εκκρίσεων και ιστών όπως βλέννα, σάλιο, αίμα κ.α. Έχει αντιβακτηριδιακή δράση που βασίζεται στη διάσπαση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (σε συνδυασμό με τη δράση του συμπληρώματος και άλλων ενζύμων). Παράλληλα, ενεργοποιεί τα μακροφάγα και τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, προωθώντας τη φαγοκύτωση [122]. Τα επίπεδα της λυσοζύμης αυξάνονται μετά από κάποια λοίμωξη, κατάσταση που σκοπό έχει να προσομοιάσει ο εμβολιασμός. Η λυσοζύμη του ορού, μπορεί να αυξάνεται κατά την πρώτη εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό με αδρανοποιημένη βακτηρίνη [60] ή στη βλέννα ένα μήνα μετά τον εμβολιασμό με αδρανοποιημένη βακτηρίνη με προσθήκη ανοσοενισχυτικών [123] ή χωρίς [124]. Η μέση ενεργότητα λυσοζύμης που προέκυψε σε αυτή την εργασία συμφωνεί με κάποιες από τις τιμές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για το λαβράκι [125] αλλά είναι χαμηλότερη σε σχέση με άλλες αναφορές [126]. Η μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται στις τιμές που προέκυψαν μεταξύ των ημερών του πειράματος σε κάθε συγκέντρωση αντιγόνου, δεν επιτρέπει την ανίχνευση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ εμβολιασμένων (ομάδα 1,2) και ανεμβολίαστων (ομάδα 3) λαβρακιών. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη χρονική στιγμή της μέτρησης ή τον ιστό [127]. Επίσης, στο εμβόλιο που χορηγήθηκε δεν προστέθηκαν ανοσοενισχυτικά. Θα μπορούσαν να ελεγχθούν κι άλλοι βασικοί δείκτες της απόκρισης του μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το συμπλήρωμα, που συμμετέχει στην παραγωγή αντισωμάτων και αυξάνεται όπως και η λυσοζύμη μετά από βακτηριακές λοιμώξεις [26,126,128].

Φυσικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ενεργότητα της λυσοζύμης (θερμοκρασία, pH, αλατότητα), ήταν κοινοί για όλες τις ομάδες σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Επίσης, τα ψάρια βρίσκονταν στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο και ανήκαν στο ίδιο είδος. Ο παράγοντας του φύλου δεν καταγράφηκε και δεν είναι δυνατό να εξεταστεί η επίδρασή του αν και είναι γνωστό ότι επηρεάζει. Ουσίες (β -glucans, βιταμίνη E) που χορηγούνται με την τροφή, διεγείρουν το ανοσοποιητικό, και αυξάνουν τα επίπεδα της λυσοζύμης [129,130] χορηγήθηκαν στα πλαίσια αυτού του πειράματος. Η επίδραση του στρες που πιθανά προκύπτει από τον εμβολιασμό με ένεση, στη συγκέντρωση της λυσοζύμης τουλάχιστον κατά τις πρώτες μέρες του πειράματος, θα μπορούσε να εξεταστεί περαιτέρω εφόσον μελετηθούν και δείκτες του στρες (π.χ. γλυκόζη, κορτιζόλη) αν και είναι πιθανό τα επίπεδα της λυσοζύμης να μην επηρεάζονται ακόμα και λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό [127].

Ειδικά αντισώματα ανιχνεύθηκαν στα εμβολιασμένα λαβράκια από την 7^η μέχρι την 75^η ημέρα μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση αδρανοποιημένης βακτηρίνης *Aeromonas veronii* (Aero NS). Η επίδραση της δοσολογίας είναι ξεκάθαρη, δεδομένου ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (3) παρατηρήθηκαν μόνο για την ομάδα 2. Η απόκριση ήταν σημαντική μεταξύ 14^{ης} και 44^{ης} ημέρας. Παρά την απουσία στατιστικά σημαντικών διαφορών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου για την ομάδα 1 και τις ημέρες 7, 14, 75 για την ομάδα 2, ο τίτλος αντισωμάτων που προέκυψε είναι υψηλός (1000-8000) επίπεδα που μπορεί να συγκριθούν με ενέσιμα εμβόλια που περιέχουν ανοσοενισχυτικά, Αν και η παρουσία αντισωμάτων, δε συνεπάγεται απαραίτητα υψηλά ποσοστά προστασίας, δηλώνει ξεκάθαρη ανοσολογική απόκριση του λαβρακιού στον εμβολιασμό με αδρανοποιημένη βακτηρίνη *Aeromonas veronii*. Συγκριτικά, σε λαβράκια 220 g, ο τίτλος κυμάνθηκε μεταξύ 1000–8000, 14 ημέρες μετά από επαναληπτικό εμβολιασμό με εμπορικό εμβόλιο αδρανοποιημένης βακτηρίνης *Vibrio anguillarum-ordalii* (10^{10} κύτταρα ml⁻¹) και προσθήκη Freund's complete adjuvant (FCA) [131]. Σε άλλη περίπτωση, σε λαβράκια 1-6 kg, ο τίτλος κυμάνθηκε μεταξύ 2000-16.000 μετά από εμβολιασμό (με επαναληπτική δόση και χωρίς) με αδρανοποιημένη βακτηρίνη *V. anguillarum* (10^{10} κύτταρα ml⁻¹) και προσθήκη complete Freund's adjuvant (CFA) [132]. Σε λαβράκια 30-40 g ο τίτλος αντισωμάτων για την πρωτεΐνη του

καψιδίου στελέχους betanodavirus ήταν 8000 με RPS 88,9% μετά από πειραματική μόλυνση [133].

Δεδομένου ότι πρόκειται για ένα από τα ελάχιστα περιστατικά ασθένειας σε λαβράκια ή άλλα θαλάσσια είδη ψαριών από είδη *Aeromonas*, δεν ήταν δυνατή η σύγκριση του εμβολίου και της ενδεχόμενης αποτελεσματικότητας του με αντίστοιχα εμβόλια σε θαλάσσια είδη ψαριών. Η αποτελεσματικότητα της αδρανοποιημένης βακτηρίνης σε μεσόφιλες αερομονάδες και κυρίως του είδους *A. hydrophila*, που είναι το πιο μελετημένο, είναι συχνά ικανοποιητική. Στον κυπρίνο (*Cyprinus carpio*), ενέσιμο εμβόλιο αδρανοποιημένης βακτηρίνης *A. bestiarum* με προσθήκη ανοσοενισχυτικών έδωσε RPS 83% 1 μήνα μετά τη χορήγηση. Η θνησιμότητα των ανεμβολίαστων ψαριών ανήλθε σε ποσοστό 70% [123]. Στον Ινδικό κυπρίνο (*Labeo rohita*), ενέσιμο πολυδύναμο εμβόλιο βακτηρίνης *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda* και *Pseudomonas fluorescens* έδωσε 80% RPS, ίσο για τη βακτηρίνη του *A. hydrophila* 2 μήνες μετά τον εμβολιασμό. Ο τίτλος αντισωμάτων (50) μεγιστοποιήθηκε την τέταρτη εβδομάδα και παρέμεινε σχεδόν σταθερός μέχρι την 8^η. Η θνησιμότητα των ανεμβολίαστων ψαριών ανήλθε στο 100% του πληθυσμού [39]. Ενέσιμο εμβόλιο *A. hydrophila* στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) έδωσε 100% RPS, 1 μήνα μετά τη χορήγηση. Στην ίδια εργασία το πολυδύναμο εμβόλιο *A. hydrophila* και *Lactococcus garvieae*, έδωσε μέγιστο τίτλο στις 30 ημέρες, που διατηρήθηκε μέχρι και 3 μήνες μετά τον εμβολιασμό. Το RPS ήταν 100% τον πρώτο μήνα και 85% τον τρίτο για το πολυδύναμο εμβόλιο. Ο τίτλος ήταν υψηλότερος στη χορήγηση μαζί με ανοσοενισχυτικά και παρέμεινε σχεδόν σταθερός μέχρι και 3 μήνες μετά τον εμβολιασμό. Τα ανοσοενισχυτικά προσέφεραν σταθερή προστασία (95%) μέχρι και τον τρίτο μήνα μετά τον εμβολιασμό, ενώ η θνησιμότητα των ανεμβολίαστων ψαριών ανήλθε σε ποσοστό περίπου 70% για το κάθε παθογόνο [62]. Η σημασία της δοσολογίας επισημαίνεται από τους Dash et al. [60]. Η μεγαλύτερη δόση (10^{10} κύτταρα ml⁻¹) προσέφερε μεγαλύτερη προστασία (80% RPS) στον Ινδικό κυπρίνο (*L. rohita*) από το παθογόνο *A. hydrophila* έναντι 75% και 40% για δοσολογίες 10^7 και 10^5 κύτταρα ml⁻¹ αντίστοιχα. Ο τίτλος (50) μεγιστοποιήθηκε σημαντικά τη 4^η εβδομάδα. Η θνησιμότητα των ανεμβολίαστων ψαριών ανήλθε στο 100% του πληθυσμού.

Σε σύγκριση με εναλλακτικούς τρόπους χορήγησης της βακτηρίνης, η χορήγηση αδρανοποιημένης βακτηρίνης *A. hydrophila* με εμβάπτιση έδωσε χαμηλότερα ποσοστά προστασίας στην πέστροφα (*O. mykiss*). Ο τίτλος αντισωμάτων ήταν 25-200 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό και φαίνεται τα προϊόντα θερμικής αδρανοποίησης να υπερτερούν έναντι της αδρανοποίησης με φορμόλη. Το RPS ήταν μεγαλύτερο για τα προϊόντα θερμικής αδρανοποίησης (RPS 84% vs 67%), ενώ στην περίπτωση αυτή, το πολυδύναμο εμβόλιο για *A. hydrophila* και *A. veronii* bv. *sobria* είχε μικρότερη αποτελεσματικότητα (RPS 67%). Τα ποσοστά θνησιμότητας του ανεμβολίαστου πληθυσμού ήταν 60% [67]. Χορηγούμενα μέσω της τροφής πειραματικά εμβόλια βακτηρίνης εσωκλειόμενης σε λιποσώματα [64], μικροκυτίδια αλγινικού οξέως [63] και biofilms [134,135,136] δεν αξιολογούνται απαραίτητα με πειραματική επιμόλυνση. Γενικά, η επικαλυμμένη βακτηρίνη φαίνεται να υπερτερεί έναντι της ελεύθερης, και στην περίπτωση των biofilms προσέφερε υψηλά επίπεδα προστασίας (RPS 100%, 2 μήνες μετά τη χορήγηση) [135], τίτλο αντισωμάτων ίσο με 1000 και 83% RPS 2 μήνες μετά τη χορήγηση [136].

Σε κάθε περίπτωση, η παραπάνω συζήτηση δεν είχε ως στόχο την άμεση σύγκριση του τίτλου αντισωμάτων που παρουσίασαν τα λαβράκια στην παρούσα εργασία με τον τίτλο αντισωμάτων σε άλλα είδη ψαριών, πόσο μάλλον του γλυκού νερού. Ωστόσο, ο τίτλος αντισωμάτων φαίνεται γενικά να μεγιστοποιείται την τέταρτη εβδομάδα μετά τον εμβολιασμό, όπως προέκυψε και από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του εμβολίου, δεν μπορούμε να κάνουμε εκτίμηση της ενδεχόμενης αποτελεσματικότητας του, βάσει του τίτλου αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, από τα παραδείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι τα αυτεμβόλια αδρανοποιημένης βακτηρίνης στελεχών *Aeromonas* μπορεί να προσφέρουν αρκετά υψηλά επίπεδα προστασίας (75-100%) έως και 3 μήνες μετά τη χορήγηση του εμβολίου με ένεση, παρά τη διαφορά μίας τάξης μεγέθους στον τίτλο αντισωμάτων των ειδών που αναφέρθηκαν σε σχέση με το λαβράκι στην παρούσα μελέτη. Όπως προκύπτει, τα ποσοστά αυτά επηρεάζονται και από άλλους παράγοντες όπως η δοσολογία του εμβολίου ή της πειραματικής επιμόλυνσης (κύτταρα ml⁻¹), οι επαναληπτικοί εμβολιασμοί, ο τρόπος αδρανοποίησης του παθογόνου κ.α

Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Η εμφάνιση της ασθένειας σε θερμοκρασίες > XX °C, καθώς και τα στοιχεία της παθολογίας, συμφωνούν με τα χαρακτηριστικά των λοιμώξεων από κινητά είδη *Aeromonas*. Βάσει της ταυτοποίησης με βιοχημικούς δείκτες τα τρία στελέχη που μελετήθηκαν εδώ ανήκουν στη φαινοτυπική ομάδα ειδών *Aeromonas sobria*. Η ομάδα περιλαμβάνει το είδος *A. veronii* όπως ταυτοποιούνται τα τρία στελέχη βάσει των μοριακών δεικτών. Τα στελέχη Aero PDA και Aero PDB, δεν διακρίνονται βιοχημικά ή γενετικά οπότε μπορούν να θεωρηθούν ταυτόσημα (Aero PD). Σε σχέση με το Aero NS παρουσιάζουν βιοχημικές διαφορές γεγονός που τα καθιστά διακριτά παρά την έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ τους στους δείκτες που εξετάστηκαν εδώ. Από την συνεκτίμηση των βιοχημικών και γενετικών δεικτών και τα 2 στελέχη ταυτοποιούνται ως *Aeromonas veronii* χωρίς να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της βιοποικιλίας. Το στέλεχος Aero NS έχει αιμολυτική ικανότητα με ειδικότητα για το λαβράκι, ενώ γονίδια με κυτταροτοξική/αιμολυτική δράση ανιχνεύθηκαν και στο στέλεχος Aero PD, γεγονός που προσδίδει περαιτέρω στοιχεία για τη μολυσματική φύση των εν λόγω κλινικών στελεχών. Το περιστατικό αυτό, αποτελεί ένα από τα λίγα περιστατικά προσβολής θαλάσσιων ειδών ψαριών από στελέχη του γένους *Aeromonas* και ένα από τα ελάχιστα που έχουν αναφερθεί στο λαβράκι.

Μετά την χορήγηση αδραντοποιημένης βακτηρίνης *A. veronii* σε ενέσιμη μορφή, τα λαβράκια παρουσίασαν ανοσολογική απόκριση, η οποία εκτιμήθηκε βάσει του τίτλου των αντισωμάτων στον ορό του αίματος, και διατηρήθηκε σταθερή για διάστημα 30 ημερών. Το αυτογενές αυτό εμβόλιο μπορεί να προσφέρει προστασία έναντι της ασθένειας εφόσον χορηγηθεί τουλάχιστον 15 ημέρες πριν την αναμενόμενη περίοδο έξαρσης. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας και δεδομένης της έλλειψης εμπορικών σκευασμάτων καθώς και της τάσης περιορισμού της χρήσης αντιβιοτικών που σημειώνεται παγκοσμίως, η χρήση αυτεμβολίων αδραντοποιημένης βακτηρίνης μπορεί να αποτελέσει αξιόλογη εναλλακτική λύση στην πρόληψη βακτηριακών ασθενειών στις υδατοκαλλιέργειες. Το επόμενο ζωτικής σημασίας βήμα είναι η πειραματική επιμόλυνση εμβολιασμένων λαβρακιών με σκοπό την εκτίμηση του ποσοστού επιβίωσης τους αλλά και η εφαρμογή στο πεδίο.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, έχουν συλλεχθεί ιστοί από τα κύρια ανοσοποιητικά όργανα (πρόνεφρος, σπλήνας), με σκοπό τη μελέτη της ανοσολογικής απόκρισης βάσει των επιπέδων έκφρασης γονιδίων του ειδικού και μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος. Τα δείγματα ιστών συντηρήθηκαν με τρόπο που να επιτρέπει την απομόνωση mRNA και τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης μέσω της τεχνικής qPCR. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης, οι παρασκευές εμβολίων που αποσκοπούν στην ελεγχόμενη αποδέσμευση του αντιγόνου, με σκοπό την παρατεταμένη έκθεση αυτού στα κύτταρα του ανοσοποιητικού για την παράταση του χρόνου προστασίας χωρίς τη χρήση ανοσοενισχυτικών ουσιών και επαναληπτική χορήγηση. Δοκιμές με φυσικά ή συνθετικά πολυμερή όπως το poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) και το αλγινικό οξύ, για την επικάλυψη του αντιγόνου (βακτηρίνης ή διαλυτοποιημένης βακτηρίνης) συγκαταλέγονται στα μελλοντικά βήματα.

Βιβλιογραφία

1. FAO (2012) The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department Technical Paper No. 569. Rome. 209 pp.
2. FAO (2011) World aquaculture 2010. FAO Fisheries and Aquaculture Department Technical Paper. No. 500/1. Rome. 105 pp.
3. FAO (2011) Review of the state of world marine fishery resources. FAO Fisheries and Aquaculture Department Technical Paper No. 569. Rome. 334 pp.
4. FAO (2013) FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. 2011/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture. 2011/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura. 2011. Rome/Roma, FAO. 76 pp.
5. Monfort M-C (2007) Marketing of aquacultured seabass and seabream from the Mediterranean basin. Studies and Reviews General Fisheries Commission for the Mediterranean No 82 Rome, FAO 2007 50 pp.
6. FAO (2005-2014) National aquaculture sector overview. Greece. National aquaculture sector overview Fact Sheets. Text by Christoflogiannis, P. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 19 November 2010. [Cited 11 May 2014].
7. Guillen Garcia J, Motova A (2013) Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF)-The Economic Performance of the EU Aquaculture Sector-2012 exercise (STECF-13-03). 2013. Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 25975 EN, JRC 81620, 237 pp.
8. Magnadottir B (2010) Immunological control of fish diseases. Marine Biotechnology 12: 361-379.
9. Ashley PJ (2007) Fish welfare: current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science 104: 199-235.
10. Cabello FC (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology 8: 1137-1144.
11. Ellis AE (1999) Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology 9: 291-308.
12. Sommerset I, Krossøy B, Biering E, Frost P (2005) Vaccines for fish in aquaculture. Expert Review of Vaccines 4: 89-101.
13. Toranzo AE, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246: 37-61.
14. Austin B (2011) Taxonomy of bacterial fish pathogens. Veterinary Research 42: 20.
15. Pujalte MJ, Sitjà-Bobadilla A, Macián MC, Belloch C, Álvarez-Pellitero P, et al. (2003) Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. Systematic and Applied Microbiology 26: 284-292.

16. Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, et al. (2005) Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology* 132: 249-272.
17. Subasinghe RP (2005) Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine* 67: 117-124.
18. FEAP (2009) List of licensed veterinary medicines. Federation of European Aquaculture Producers <http://www.feap.info/default.asp?SHORTCUT=615>.
19. FAO/OIE/WHO (2006) Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Seoul, Republic of Korea, 13-16 June 2006. 97 pp.
20. Romero J, Feijóo CG, Navarrete P (2012) Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. . Health and environment in aquaculture InTech, Croatia 414 pp.
21. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, et al. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8: 251-259.
22. Buschmann AH, Tomova A, López A, Maldonado MA, Henríquez LA, et al. (2012) Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PloS One* 7: e42724.
23. Navarrete P, Mardones P, Opazo R, Espejo R, Romero J (2008) Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 20: 177-183.
24. Cole DW, Cole R, Gaydos SJ, Gray J, Hyland G, et al. (2009) Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212: 369-377.
25. Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M, et al. (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3883-3890.
26. Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56: 486-503.
27. Breuil G, Vassiloglou B, Pepin JF, Romestand B (1997) Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* 7: 29-43.
28. Plant KP, LaPatra SE (2011) Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology* 35: 1256-1262.
29. Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, et al. (2009) Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 1278-1316.
30. Koppang EO, Bjerkås I, Haugarvoll E, Chan EKL, Szabo NJ, et al. (2008) Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *The Journal of Immunology* 181: 4807-4814.

31. Midtlyng PJ, Reitan LJ, Speilberg L (1996) Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology* 6: 335-350.
32. Midtlyng PJ, Lillehaug A (1998) Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants. *Diseases of Aquatic Organisms* 32: 91-97.
33. Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø (1999) Recent developments in fish vaccinology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 72: 203-212.
34. Toranzo AE, Romalde JL, Magariños B, Barja JL (2009) Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. *Options Mediterraneennes* 86: 155-176.
35. Shoemaker CA, Klesius PH, Bricker JM (1999) Efficacy of a modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine in channel catfish as young as seven days post hatch. *Aquaculture* 176: 189-193.
36. Griffiths SG, Melville KJ, Salonijs K (1998) Reduction of *Renibacterium salmoninarum* culture activity in Atlantic salmon following vaccination with avirulent strains. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 607-619.
37. Vaughan LM, Smith PR, Foster TJ (1993) An aromatic-dependent mutant of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* is attenuated in fish and is effective as a live vaccine against the salmonid disease furunculosis. *Infection and immunity* 61: 2172-2181.
38. Thornton JC, Garduno RA, Kay WW (1994) The development of live vaccines for furunculosis lacking the A-layer and O-antigen of *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fish Diseases* 17: 195-204.
39. Swain P, Behera T, Mohapatra D, Nanda PK, Nayak SK, et al. (2010) Derivation of rough attenuated variants from smooth virulent *Aeromonas hydrophila* and their immunogenicity in fish. *Vaccine* 28: 4626-4631.
40. Yang D, Liu Q, Ni C, Li S, Wu H, et al. (2013) Gene expression profiling in live attenuated *Edwardsiella tarda* vaccine immunized and challenged zebrafish: insights into the basic mechanisms of protection seen in immunized fish. *Developmental & Comparative Immunology* 40: 132-141.
41. de las Heras AI, Rodríguez Saint-Jean S, Pérez-Prieto SI (2010) Immunogenic and protective effects of an oral DNA vaccine against infectious pancreatic necrosis virus in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 562-570.
42. Tian J, Yu J (2011) Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 109-117.
43. Hølvold LB, Myhr AI, Dalmo RA (2014) Strategies and hurdles using DNA vaccines to fish. *Veterinary Research* 45: 21.
44. Nayak SK (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 29: 2-14.
45. Ringø E (2011) Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *Journal of Marine Science: Research & Development* 1: 22 pp.

46. Martínez Cruz P, Ibáñez AL, Monroy Hermosillo OA, Ramírez Saad HC (2012) Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology* 2012: 13 pp.
47. Bricknell I, Dalmo RA (2005) The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 457-472.
48. Austin B, Austin DA (2012) *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. Springer.
49. Athanassopoulou F, Prapas T, Rodger H (1999) Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. *Journal of Fish Diseases* 22: 215-218.
50. Soliman WS, Samira SR, AlGhareeb S, Al-Waair O, Al-Deghies E (2011) Study on grouper fish mortality phenomenon at the east costal Libyan area of the Mediterranean Sea with reference to bacteriological and parasitological examinations. *New York Science Journal* 4: 6-14.
51. Tanekhy M (2013) Some study on bacterial infection in some cultured marine fish. *Journal of the Arabian Aquaculture Society* 8: 163-178.
52. Doukas V, Athanassopoulou F, Karagouni E, Dotsika E (1998) Short communication *Aeromonas hydrophila* infection in cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. *Journal of Fish Diseases* 21: 317-320.
53. Öztürk RÇ, Altınok İ (2014) Bacterial and viral fish diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 275-297.
54. Stevenson RMW (1988) Vaccination against *Aeromonas hydrophila*. In: *Fish vaccination* (Ed by Ellis AE), Academic press, New York, : 112-123.
55. Janda JM, Abbott SL, Khashe S, Kellogg GH, Shimada T (1996) Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1930-1933.
56. Rahman MH, Kawai K (2000) Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. *Fish & Shellfish Immunology* 10: 379-382.
57. 2001/82/EK D Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Available from: http://europe.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2001_82_cons2009/dir_2001_82_cons2009_enpdf.
58. Schrøder MB, Ellingsen T, Mikkelsen H, Norderhus EA, Lund V (2009) Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish & Shellfish Immunology* 27: 112-119.
59. Prasad S, Areechon N (2010) Efficacy of formalin-killed *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus* sp. vaccine in red tilapia. *Our Nature* 8: 231-240.
60. Dash S, Das S, Samal J, Ojha P, Patra J, et al. (2011) Dose dependence specific and non-specific immune responses of Indian major carp (*L. rohita* Ham) to intraperitoneal injection of formalin killed *Aeromonas hydrophila* whole cell vaccine. *Veterinary Research Communications* 35: 541-552.

61. Osman KM, Mohamed LA, Abdel Rahman EH, Soliman WS (2009) Trials for vaccination of Tilapia fish against *Aeromonas* and *Pseudomonas* infections using monovalent, bivalent and polyvalent vaccines. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 1: 297-304.
62. Bastardo A, Ravelo C, Castro N, Calheiros J, Romalde JL (2012) Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish & Shellfish Immunology* 32: 756-761.
63. Rodrigues AP, Hirsch D, Figueiredo HCP, Logato PVR, Moraes ÂM (2006) Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. *Process Biochemistry* 41: 638-643.
64. Yasumoto S, Yoshimura T, Miyazaki T (2006) Oral immunization of common carp with a liposome vaccine containing *Aeromonas hydrophila* antigen. *Fish Pathology* 41: 45-49.
65. Behera T, Nanda PK, Mohanty C, Mohapatra D, Swain P, et al. (2010) Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* 28: 320-325.
66. Guan R, Xiong J, Huang W, Guo S (2011) Enhancement of protective immunity in European eel (*Anguilla anguilla*) against *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by a recombinant *Aeromonas* outer membrane protein. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43: 79-88.
67. Dehghani S, Akhlaghi M, Dehghani M (2012) Efficacy of formalin-killed, heat-killed and lipopolysaccharide vaccines against Motile Aeromonads Infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Global Veterinaria* 9: 409-415.
68. Chandran MR, Aruna BV, Logambal SM, R. DM (2002) Immunisation of Indian major carps against *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 1-9.
69. Behera T, Swain P, Sahoo SK (2011) Antigen in chitosan coated liposomes enhances immune responses through parenteral immunization. *International Immunopharmacology* 11: 907-914.
70. FEAP (2004) Federation of European Aquaculture Producers. Resolutions voted by the General Assembly of the FEAP (2004, Budapest). Availability of medicines for farmed fish (Resolution of the Dublin PROFET Conference, 16–17 April 2004).
71. Váradi L, Lane A, Harache Y, Gyalog G, Békefi E, et al. (2011) Regional review on status and trends in aquaculture development in Europe – 2010/Региональный обзор состояния и тенденций развития аквакультуры в Европе – 2010. FAO Fisheries and Aquaculture Circular/Информационный бюллетень ФАО по рыболовству и аквакультуре No. 1061/1. Rome/Рим, ФАО/ФАО 257 pp/стр.
72. Attia Y, Schmerold I, Hönel A (2013) The legal foundation of the production and use of herd-specific vaccines in Europe. *Vaccine* 31: 3651-3655.
73. 2003/94/EK Commission Directive 2003/94/EC of 8 October 2003 laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal products for human use and investigational medicinal products for human use. Available from: http://eur-lex.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2003_94/dir_2003_94_en.pdf.

74. Yanez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ (2003) Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 875-883.
75. Soler L, Yáñez MA, Chacon MR, Aguilera-Arreola MG, Catalán V, et al. (2004) Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1511-1519.
76. Küpfer M, Kuhnert P, Korczak BM, Peduzzi R, Demarta A (2006) Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2743-2751.
77. Saavedra MJ, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ (2006) Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 2481-2487.
78. Nhung PH, Hata H, Ohkusu K, Noda M, Shah MM, et al. (2007) Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA–DNA hybridization to clarify interrelationships within the genus *Aeromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1232-1237.
79. Carnahan AM (2001) Genetic relatedness of *Aeromonas* species based on the DNA sequences of four distinct genomic loci: University of Maryland, College Park. 264 pp.
80. Martino ME, Fasolato L, Montemurro F, Rosteghin M, Manfrin A, et al. (2011) Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4986-5000.
81. Miñana-Galbis D, Urbizu-Serrano A, Farfán M, Fusté MC, Lorén JG (2009) Phylogenetic analysis and identification of *Aeromonas* species based on sequencing of the *cpn60* universal target. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1976-1983.
82. Roger F, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Kodjo A, Lamy B (2012) Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC Microbiology* 12: 1-23.
83. Dauga C (2002) Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 531-547.
84. Kasai H, Ezaki T, Harayama S (2000) Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 301-308.
85. Hill JE, Penny SL, Crowell KG, Goh SH, Hemmingsen SM (2004) *cpnDB*: a chaperonin sequence database. *Genome Research* 14: 1669-1675.
86. Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*, pp 115–147 John Wiley & Sons, Chichester.
87. Wong CY, Heuzenroeder MW, Flower RL (1998) Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology* 144: 291-298.

88. Wang G, Clark CG, Liu C, Pucknell C, Munro CK, et al. (2003) Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1048-1054.
89. Kingombe BCI, D'Aoust J-Y, Huys G, Hofmann L, Rao M, et al. (2010) Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 425-433.
90. Martin-Carnahan AM, Joseph SW (2005) Family Aeromonadaceae Colwell, MacDonell and De Ley 1986, in: Brenner, DJ, Krieg, NR, Staley, JT and Garrity G M Eds *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, Second ed, Springer, New York, pp 474 556–578.
91. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
92. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
93. Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
94. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
95. Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368–376.
96. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology* 75: 758-771.
97. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496.
98. CLSI (2006) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Proposed Guideline. CLSI document M45-P [ISBN 1-56238-583-6]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
99. Parry RM, Chandan RC, Shahani KM (1965) A rapid and sensitive assay of muramidase. *Experimental Biology and Medicine* 119: 384-386.
100. Wiklund T, Dalsgaard I (1998) Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 32: 49–69.
101. Janda JM, Abbott SL (2010) The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 35-73.
102. Farmer III JJ, Arduino MJ, Hickman-Brenner FW (2006) The genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *The prokaryotes*: Springer. pp. 564-596.

103. Colwell RR, Macdonell MT, De Ley J (1986) Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 473-477.
104. Abbott SL, Cheung WK, Janda JM (2003) The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2348-2357.
105. Hofer E, Reis EMF, Quintaes BR, Rodrigues DP, Feitosa IS, et al. (2011) *Vibrio cholerae* resistant to 2, 4-diamino-6, 7-diisopropylpteridine (O/129) isolated from patients with enteritis in Ceara, Brazil. *Journal of Health, Population and Nutrition (JHPN)* 19: 39-42.
106. Popoff MY, Coynault C, Kiredjian M, Lemelin M (1981) Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Current Microbiology* 5: 109-114.
107. Hickman-Brenner FW, MacDonald KL, Steigerwalt AG, Fanning GR, Brenner DJ, et al. (1987) *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 900-906.
108. Martínez-Murcia AJ, Soler L, Saavedra MJ, Chacón MR, Guarro J, et al. (2005) Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *International microbiology* 8: 259.
109. Martínez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD (1992) Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 412-421.
110. Martínez-Murcia AJ, Monera A, Saavedra MJ, Oncina R, López-Alvarez M, et al. (2011) Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 189-199.
111. Huys G, Kämpfer P, Altwegg M, Coopman R, Janssen P, et al. (1997) Inclusion of *Aeromonas* DNA Hybridization Group 11 in *Aeromonas encheleia* and Extended Descriptions of the Species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 1157-1164.
112. Minana-Galbis D, Farfan M, Gaspar Loren J, Carmen Fuste M (2010) Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Systematic and Applied Microbiology* 33: 15-19.
113. Christensen H, Bisgaard M, Frederiksen W, Muttters R, Kuhnert P, et al. (2001) Is characterization of a single isolate sufficient for valid publication of a new genus or species? Proposal to modify recommendation 30b of the Bacteriological Code (1990 Revision). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2221-2225.
114. Lorén Egea JG, Farfán Sellarés M, Fusté Munné MC (2014) Molecular phylogenetics and temporal diversification in the genus *Aeromonas* based on the sequences of five housekeeping genes. *PLoS One* 9: e88805.

115. Kuijper EJ, Steigerwalt AG, Schoenmakers BS, Peeters MF, Zanen HC, et al. (1989) Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 132-138.
116. Silver AC, Williams D, Faucher J, Horneman AJ, Gogarten JP, et al. (2011) Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. *PLoS one* 6: e16751.
117. Ørmen Ø, Østensvik Ø (2001) The occurrence of aerolysin-positive *Aeromonas* spp. and their cytotoxicity in Norwegian water sources. *Journal of Applied Microbiology* 90: 797-802.
118. Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, et al. (2010) Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish. *Food Microbiology* 27: 327-331.
119. Ottaviani D, Parlani C, Citterio B, Masini L, Leoni F, et al. (2011) Putative virulence properties of *Aeromonas* strains isolated from food, environmental and clinical sources in Italy: A comparative study. *International Journal of Food Microbiology* 144: 538-545.
120. Gudmundsdóttir S, Lange S, Magnadóttir B, Gudmundsdóttir BK (2003) Protection against atypical furunculosis in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.); comparison of a commercial furunculosis vaccine and an autogenous vaccine. *Journal of Fish Diseases* 26: 331-338.
121. Corripio-Miyar Y, Mazon de Quero C, Treasurer JW, Ford L, Smith PD, et al. (2007) Vaccination experiments in the gadoid haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L., against the bacterial pathogen *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 118: 147-153.
122. Saurabh S, Sahoo PK (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39: 223-239.
123. Kozinska A, Guz L (2004) The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 16: 437-445.
124. Jinhui S, Qingkui W, Zhiyi Q, Dongqing B, Jingfeng S, et al. (2011) Effect of lipopolysaccharide (LPS) and outer membrane protein (OMP) vaccines on protection of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against *Aeromonas hydrophila*. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah* 63: 8.
125. Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Robaina L, et al. (2007) Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 969-981.
126. Mauri I, Romero A, Acerete L, Mackenzie S, Roher N, et al. (2011) Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish & Shellfish Immunology* 30: 182-188.
127. Maricchiolo G, Caruso G, Genovese L (2008) Haematological and immunological responses in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after short-term acute stress. *Open Fish Science Journal* 1: 28-35.

128. Rus H, Cudrici C, Niculescu F (2005) The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic research* 33: 103-112.
129. Obach A, Quentel C, Laurencin FB (1993) Effect of a-tocopherol and dietary oxidised fish oil on the immuno response of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Diseases of Aquatic Organisms* 15: 175-185.
130. Bagni M, Romano N, Finoia MG, Abelli L, Scapigliati G, et al. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology* 18: 311-325.
131. dos Santos N, Taverne N, Taverne-Thiele AJ, de Sousa M, Rombout JH (1997) Characterisation of monoclonal antibodies specific for sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 175-191.
132. Coeurdacier JL, Pepin JF, Fauvel C, Legall P, Bourmaud AF, et al. (1997) Alterations in total protein, IgM and specific antibody activity of male and female sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) sera following injection with killed *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 7: 151-160.
133. Thiéry R, Cozien J, Cabon J, Lamour F, Baud M, et al. (2006) Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *Journal of Virology* 80: 10201-10207.
134. Azad IS, Shankar KM, Mohan And CV, Kalita B (1999) Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila*—standardization of dose and duration for oral vaccination of carps. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 519-528.
135. Nayak DK, Asha A, Shankar KM, Mohan CV (2004) Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus*-a carnivore model. *Fish & Shellfish Immunology* 16: 613-619.
136. Vinay TN, Patil R, Suresh Babu PP, Rana R, Shankar KM (2013) Evaluation of the efficiency of *Aeromonas hydrophila* biofilm vaccine in *Labeo rohita* employing monoclonal antibody based ELISA. *Scientific Reports* 2: 684.