



Διδακτορική Διατριβή

Σμυρλή Μαρία

Συγκριτική μελέτη στελεχών Aeromonas veronii ως νοσογόνου παράγοντα σε εκτρεφόμενα λαβράκια. Ανάπτυξη αυτεμβολίων για την πρόληψη της ασθένειας

Ηράκλειο, Μάιος 2021





PhD Thesis

Smyrli Maria

Comparative study on *Aeromonas veronii* isolates as disease agent in farmed European seabass. Development of autogenus vaccines for the prevention of the disease

Heraklion, May 2021

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες και μέλη της 3-μελούς επιτροπής: Καθάριο Παντελή, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Παυλίδη Μιχάλη, Παν. Κρήτης και Αθανασάκη Ειρήνη, Παν. Κρήτης για την επίβλεψη και καθοδήγηση στη διάρκεια του διδακτορικού μου. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής: Καλαντίδη Κρίτων, Παν. Κρήτης, Μπακόπουλο Βασίλειο, Παν. Αιγαίου, Ντότσικα Ελένη, Ιν. Παστέρ, Αθήνα και Χαμηλό Γεώργιο, Παν. Κρήτης για την εποικοδομητική κριτική, τα σχόλια και παρατηρήσεις τους επί της παρούσας εργασίας που θα αποτελέσουν για μένα χρήσιμα εργαλεία για τη συνέχεια της πορείας μου. Να ευχαριστήσω επίσης από καρδιάς την Όλγα Κουτσώνη, Ιν. Παστέρ για την υπέροχη συνεργασία και τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου, τους Γιάννη Παπαδάκη, Γιώργο Στρακαντούνα και Μανώλη Βασιλάκη για τη συνεργασία και βοήθεια τους στη διεξαγωγή των πειραμάτων στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Σε προσωπικό επίπεδο, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό των Aqualabs, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας και συνύπαρξης στο κοινό εργασιακό μας περιβάλλον. Είναι ανεκτίμητης αξίας η συνεισφορά σε επίπεδο συνεργασίας και ανθρώπινων σχέσεων, των πρώην και νυν συναδέλφων στο εργαστήριο Ντίντας Κοκκάρη, Μαριάννας Τσέρτου, Παναγιώτη Καλατζή, Νίκου Σειμένη, Αγγελικής Αντωνακάκη, Maria-Chiara Cascarano, Αντριάνας Τρίγκα και Σταύρου Ντρουμπογιάννη. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και την οικογένεια μου για την αγάπη και την υποστήριξη τους σε κάθε βήμα.

Περιεχόμενα

П٤	Τερίληψη6					
Ał	stract.		8			
1.	Εισα	ιγωγή	10			
	1.1.	Υδατοκαλλιέργειες	10			
1.2. 1.3.		Ασθένειες στις Υδατοκαλλιέργειες	12			
		Γενικά χαρακτηριστικά του γένους Aeromonas	14			
	1.4. ιχθυοκ	Το γένος <i>Aeromonas</i> ως αιτιολογικός παράγοντας ασθενειών στην αλλιέργεια	16			
	1.5. ασθενε	Τεχνολογίες αλληλούχισης στη διάγνωση, επιδημιολογία και πρόληψη των ειών στην ιχθυοκαλλιέργεια	19			
	1.6.	Το ανοσοποιητικό σύστημα των εκτρεφόμενων ιχθύων	24			
	1.7.	Εμβόλια στην ιχθυοκαλλιέργεια	26			
	1.8.	Η υπό μελέτη ασθένεια	34			
	1.9	Σκοπός της εργασίας	37			
2.	Υλικ	ά και Μέθοδοι	38			
	2.1.	Συλλογή βακτηρίων και απομόνωση Aeromonas spp	38			
	2.2.	Μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση Aeromonas spp	40			
	2.3.	Χαρακτηρισμός βακτηρίων	46			
	2.4.	Αλληλούχιση νέας γενιάς	49			
	2.5.	Μελέτη λοιμογονικότητας <i>in vivo</i>	53			
	2.6.	Παρασκευή αυτεμβολίων	56			
	2.7.	Εμβολιασμός ιχθύων	57			
	2.8.	Εκτίμηση αποτελεσματικότητας εμβολίων	61			
	2.8.1	l. Επιβίωση εμβολιασμένων ιχθύων	61			
	2.8.2	2. Τίτλος αντισωμάτων - Πείραμα 2	63			
	2.8.3	3. Γονιδιακή Έκφραση - Πείραμα 1.2	70			
3.	Απο ⁻	τελέσματα	73			
	3.1.	Στοιχεία Επιζωοτιολογίας	73			
	3.2.	Απομόνωση - Ανίχνευση - Ταυτοποίηση Aeromonas spp	78			
	3.2.1	Ι. Φυλογενετικές αναλύσεις	84			
	3.3.	Χαρακτηρισμός βακτηρίων	88			
	3.3.1	 Μορφολογία αποικιών και χαρακτηριστικά αύξησης 	88			
3.3.		2. Μορφολογία κυττάρων-Ηλεκτρονική Μικροσκοπία	89			
	3.3.3	3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός	90			
3.3.		4. Αιμολυτική ικανότητα σε στερεό θρεπτικό	96			

	3.3.5.	Ιεραρχική ανάλυση συστάδων	97	
	3.3.6.	Ευαισθησία σε αντιβιοτικά	100	
3	3.4. Αλλ	ηλούχιση νέας γενιάς	102	
	3.4.1.	Πολυτοπική τυποποίηση αλληλουχίας	104	
	3.4.2.	Σύγκριση ολικού γονιδιώματος	105	
	3.4.3.	Σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί	108	
	3.4.4.	Αντιγονική ποικιλότητα – Αντίστροφη εμβολιολογία	109	
3	8.5. Μελ	λέτη λοιμογονικότητας <i>in vivo</i>	126	
	3.5.1.	Λαβράκι	126	
	3.5.2.	Zebrafish (Danio rerio)	133	
3	3.6. Εκτί	μηση Αποτελεσματικότητας εμβολίων	135	
	3.6.1.	Επιβίωση εμβολιασμένων ιχθύων	136	
	3.6.2.	Τίτλος αντισωμάτων	140	
	3.6.3.	Γονιδιακή Έκφραση	141	
4.	Συζήτησι	٦	143	
	Ανίχνευσ	η αερομονάδων – Στοιχεία παθολογίας και επιζωοτιολογίας	143	
	Συγκριτικ	κή μελέτη — Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των στελεχών λαβρακιού	145	
	Απόκρισι	η σε αντιβιοτικά	148	
	Συγκριτική γονιδιωματική1			
	Αντιγονι	κή ποικιλότητα – Αντίστροφη εμβολιολογία	152	
	Μολυσμ	ατικότητα	157	
	Αυτεμβό	λια Aeromonas veronii στο λαβράκι	162	
5.	Συμπερά	ισματα	172	
6.	Δημοσιέ	υσεις	174	
7.	Βιβλιογρ	αφία	175	

Περίληψη

Αντικείμενο της μελέτης είναι ασθένεια εκτρεφόμενων λαβρακιών που οφείλεται στο βακτήριο Aeromonas veronii bv. sobria. Η ασθένεια επηρεάζει εκτρεφόμενα λαβράκια βάρους > 50 g σε ιχθυοτροφικές εκμεταλλεύσεις στο Αιγαίο, κυρίως δυτικά. Εμφανίζεται σε θερμοκρασίες > 18°C ενώ οι εξάρσεις σημειώνονται κυρίως τους θερινούς μήνες σε θερμοκρασία > 21°C. Η αθροιστική θνησιμότητα μπορεί να φτάσει μέχρι το 80% του εκτρεφόμενου πληθυσμού. Η εργασία αφορά αναδυόμενη παθολογία για την ιχθυοκαλλιέργεια λαβρακιού και αρχικά αποτέλεσε/θεωρήθηκε τοπικό και μεμονωμένο περιστατικό. Μελετήθηκε η παθολογία και τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της ασθένειας. Η ποικιλότητα των βακτηριακών στελεχών του παθογόνου μελετήθηκε με μοριακά (16S rRNA και gyrB) και βιοχημικά (Biolog και API20E) εργαλεία. Στα πλαίσια της εργασίας αναπτύχθηκε πρωτόκολλο ανίχνευσης του γένους. Η λοιμογονικότητα του παθογόνου ελέγχθηκε in vivo με πειραματικές μολύνσεις σε υγιή λαβράκια και zebrafish και in vitro σε στερεό αιματούχο θρεπτικό υπόστρωμα. Αλληλουχήθηκαν τα γονιδιώματα αντιπροσωπευτικών στελεχών και μελετήθηκαν οι φυλογενετικές σχέσεις, και η αντιγονική φύση και ποικιλότητα του παθογόνου. Εφαρμόστηκαν οι αρχές της αντίστροφης εμβολιολογίας για τον εντοπισμό συντηρημένων μεμβρανικών πρωτεϊνών-αντιγόνων και την επιλογή στελεχών για την ανάπτυξη εμβολίου Aeromonas veronii ευρείας εφαρμογής. Τέλος, παρασκευάστηκε εμβόλιο βακτηρίνης (υδατοδιαλυτό και ελαιώδες). Ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα του εμβολίου με τεχνητή μόλυνση των εμβολιασμένων ιχθύων, καθώς και με τη μέτρηση του τίτλου αντισωμάτων (ELISA) στον ορό του αίματος και τον έλεγχο έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω gPCR. Εντοπίστηκαν τρεις φαινότυποι του παθογόνου που διακρίνονται ως προς την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής και αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιοχές του Αιγαίου. Τα στελέχη διαφορετικών περιοχών δεν διακρίνονται μεταξύ τους με τα γονίδια οικιακής οικονομίας που εξετάστηκαν πλην του ppsA. Τα συμπτώματα της ασθένειας αναπαρήχθησαν στις τεχνητές μολύνσεις σε λαβράκι, επιβεβαιώνοντας την παθογονικότητα του *A. veronii*. Η χρήση zebrafish για τη μελέτη μολυσματικότητας βακτηρίων στα είδη της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας ενθαρρύνεται από τα αποτελέσματα εφόσον, όπως και στο λαβράκι προκλήθηκε θνησιμότητα των μολυσμένων ατόμων. Οι γονιδιωματικές αναλύσεις έδειξαν υψηλή ομοιότητα μεταξύ των στελεχών A. veronii από λαβράκι στις διαφορετικές περιοχές του Αιγαίου. Ωστόσο, η διάκριση τους έγινε εφικτή μέσω των σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που αντιστοιχούν στις φαινοτυπικές ομάδες που αναφέρθηκαν παραπάνω και στη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των στελεχών (Ανατολικό/Δυτικό Αιγαίο). Οι αντιγονικές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης παρουσίασαν επίσης υψηλό ποσοστό ομοιότητας σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, εντοπίστηκαν ωστόσο διαφορές στην πρωτεΐνη S-layer, τη maltoporin LamB και το O-antigen που συνηγορούν στη χρήση πολυσθενούς εμβολίου για το εκτρεφόμενο στο Αιγαίο λαβράκι. Το ελαιώδες δισθενές (NS+PDB+Montanide) εμβόλιο βακτηρίνης που χορηγήθηκε με ένεση σε ενήλικα λαβράκια έδωσε προστασία στον εμβολιασμένο πληθυσμό έναντι μόλυνσης με μπάνιο με το στέλεχος PDB (RPS = 62.5%). Το υδατικό δισθενές (NS+PDB) εμβόλιο που χορηγήθηκε με εμβάπτιση σε ιχθύδια λαβρακιού έδωσε επίσης προστασία έναντι του στελέχους PDB (RPS = 89,4%). Ο τίτλος αντισωμάτων για τα αντιγόνα NS και PDB διατηρήθηκε σταθερός για τουλάχιστον 60 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ένεση με το ελαιώδες δισθενές (NS+PDB+Montanide) εμβόλιο. Η γονιδιακή έκφραση των γονιδίων ΜΗCII-β, IgM και κυρίως του TCR-β στον μεσονεφρικό ιστό παρουσίασε αυξητική τάση μέχρι την ημέρα 15 μετά τον εμβολιασμό με ενέσιμο ελαιώδες και υδατικό εμβόλιο με το στέλεχος NS, ενώ η κυτταρική ανοσία (CD4) φαίνεται να ενεργοποιείται την ημέρα 30 μόνο στην ομάδα που εμβολιάστηκε με την ελαιώδη παρασκευή. Με τα αποτελέσματα που παρήχθησαν εδώ ενθαρρύνεται η χρήση των αυτεμβολίων για την αντιμετώπιση ασθενειών έναντι του παθογόνου *Α. veronii*. Η εφαρμογή επαναληπτικών εμβολιασμών ή/και η αύξηση της δόσης αντιγόνου στα επί μέρους εμβόλια προτείνονται μελλοντικά για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων.

Abstract

The object of the study was a bacterial disease affecting farmed European seabass caused by Aeromonas veronii bv. sobria. The disease affects farmed sea bass weighing> 50 g on fish farms in the Aegean Sea, mainly in the west. It occurs in temperature > 21-22°C, while the outbreaks occur mainly in the summer months. The cumulative mortality can reach up to 80% of the farmed population. The current study concerns an emerging pathology for seabass fish farming and was initially considered a local, individual case. The pathology and epidemiological features of the disease were studied. Pathogen diversity was studied with molecular (16S rRNA and gyrB) and biochemical (Biolog and API20E) tools. As part of the work, a genus-based detection protocol was developed. The infectivity of the pathogen was tested in vivo, with experimental infections in healthy seabass and zebrafish and in vitro, on a blood agar medium. The genomes of representative strains were sequenced, and the phylogenetic relationships and the antigenic nature and diversity of the pathogen were studied. The principles of reverse vaccinology were applied to detect conserved membrane proteins-antigens for the development of the widely used Aeromonas veronii vaccine. Finally, a bacterial vaccine (water and oil-based) was developed. The efficacy of the vaccine was tested by challenge tests on the vaccinated fish, by measuring the titer of antibodies (ELISA) in the blood serum and by the expression of selected genes related to the immune system via qPCR. Three phenotypes of the pathogen were identified which are distinguished in terms of motility and pigment production and correspond to different regions of the Aegean Sea. Strains from different regions were almost (ppsA) indistinguishable with the studied housekeeping genes used as genetic markers. The symptoms of the disease were reproduced in artificial infections in seabass, confirming the pathogenicity of *A. veronii*. The use of zebrafish for the study of bacterial infectivity in Greek fish farming species is encouraged by the results since infections induced mortality in zebrafish too. Genomic analyses showed high similarity between A. veronii strains of seabass in different regions of the Aegean Sea. However, their differentiation was possible by single nucleotide polymorphisms corresponding to the phenotypic groups mentioned above and the different geographical origins of the strains (East /West Aegean). The outer membrane antigenic proteins also showed a high degree of similarity at the amino acid sequence, but differences were found in the S-layer protein,

maltoporin LamB, and O-antigen, suggesting the use of a multivalent vaccine for Aegean seabass culture. The injectable bivalent adjuvanted (NS+PDB+Montanide) vaccine offered protection to adult seabass against bath challenge with strain PDB (RPS = 62.5%). The aqueous bivalent (NS + PDB) vaccine administered by immersion in seabass fry also provided protection against strain PDB (RPS = 89.4%). The antibody titer for NS and PDB antigens was stable for at least 60 days after injection vaccination with bivalent adjuvanted (NS+PDB+Montanide) vaccine. Gene expression of MHCII- β , IgM and especially TCR- β genes in the head kidney tissue increased up to day 15 after vaccination by injection with aqueous and adjuvanted injectable vaccine with strain NS, while cellular immunity (CD4) appears to be activated on day 30 only in the group vaccinated with the adjuvanted preparation. The results produced here encourage the use of autogenous vaccines for the control of *A. veronii* disease in farmed European seabass. Boost vaccinations and/or increased antigen doses are proposed in the future to increase the vaccine efficacy.

1. Εισαγωγή

1.1. Υδατοκαλλιέργειες

Η αύξηση της παραγωγής, η αναγνώριση της διατροφικής αξίας των ιχθύων και ο ολοένα αυξανόμενος ανθρώπινος πληθυσμός, έχουν οδηγήσει σε σημαντική αύξηση της παγκόσμιας κατανάλωσης τις τελευταίες δεκαετίες. Η παραγωγή από τις υδατοκαλλιέργειες αυξάνεται παγκοσμίως από τη δεκαετία του '60 και οι υδατοκαλλιέργειες παραμένουν στους ταχύτερα αναπτυσσόμενους κλάδους παραγωγής τροφής σημειώνοντας μέσο ετήσια αύξηση της κατανάλωσης της τάξεως του 3.2% την περίοδο 1961-2016, ενώ ο μέσος ετήσιος ρυθμός αύξησης για την περίοδο 2000-2016 ανήλθε στο 5.8% (FAO, 2018a). Ο ρυθμός αυτός ξεπερνά το ρυθμό παραγωγής από χερσαία ζώα (2.8%) καθώς και το ρυθμό αύξησης του ανθρώπινου πληθυσμού (1.6%).



Εικόνα 1. Η εξέλιξη της παγκόσμιας παραγωγής ζωικών οργανισμών (ψάρια, μαλάκια, οστρακοειδή κλπ.) από την αλιεία και τις υδατοκαλλιέργειες την περίοδο 1950-2016 (FAO, 2018a).

Η παγκόσμια παραγωγή ζωικών υδρόβιων οργανισμών (ψάρια, μαλάκια, οστρακοειδή κλπ.) ανήλθε το 2016 στους 171 εκατομμύρια τόνους. Η ποσότητα βρώσιμων ειδών που προέκυψε από τις υδατοκαλλιέργειες αντιστοιχεί στο 53% της συνολικής παραγωγής. Από το σύνολο της παραγωγής από υδατοκαλλιέργειες το 32% (54.1 εκατομμύρια τόνους ετησίως) αντιστοιχεί σε είδη ιχθύων και από αυτά μόνο το 12% (6.6 εκατομμύρια τόνους ετησίως) σε είδη που εκτρέφονται στη θάλασσα (θαλάσσια και διάδρομα είδη) (FAO, 2019, 2018a). Η συνεισφορά της αλιείας στη συνολική παραγωγή παραμένει υψηλή (47% της συνολικής παραγωγής βρώσιμων ζωικών ειδών το 2016), ωστόσο, εκτιμήσεις που αφορούν το 80% (θαλάσσια είδη) της παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής μεταξύ 1974-2015 έδειξαν ότι η υπερεκμετάλλευση των αποθεμάτων ακολουθεί ανοδική τάση με το 60% αυτών να θεωρούνται εξαντλημένα (FAO, 2019, 2018a). Συγκεκριμένα, καταγράφηκε μείωση της βιώσιμης εκμετάλλευσης θαλάσσιων ειδών (από το 90% στο 66,9%) και αντίστοιχη αύξηση (από 10% στο 33,1%) της μη βιώσιμης εκμετάλλευσης αυτών. Ανάμεσα στις περιοχές που πλήττονται περισσότερο από την υπερεκμετάλλευση των αλιευτικών αποθεμάτων βρίσκονται η Μεσόγειος και η Μαύρη Θάλασσα. Συνεπώς, η τάση για αυξανόμενη ζήτηση των προϊόντων ιχθυοκαλλιεργειών καθιστά αναγκαίο να ξεπεραστούν προβλήματα όπως οι ασθένειες που δρουν περιοριστικά στην αύξηση της παραγωγής και εγείρουν σοβαρά θέματα ευζωίας των εκτρεφόμενων ιχθύων.

Σήμερα εκτρέφονται περισσότερα από 360 είδη ιχθύων σε πάνω από 200 χώρες, μεταξύ των οποίων η Κίνα είναι με διαφορά η μεγαλύτερη παραγωγός (62%). Στη Μεσόγειο οι Αίγυπτος, Ισπανία, Τουρκία, Ιταλία και Γαλλία συγκαταλέγονται στις 28 μεγαλύτερες παγκοσμίως (FAO, 2018b) ενώ η Τουρκία και η Ελλάδα συγκαταλέγονται στους δώδεκα σημαντικότερους παραγωγούς εκτρεφόμενων ιχθύων σε θαλασσινά και παράκτια νερά (FAO, 2018a).

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*) είναι τα σημαντικότερα εμπορικά είδη στην περιοχή της Μεσογείου, εκτρεφόμενα σχεδόν αποκλειστικά στην περιοχή αυτή, κυρίως σε θαλασσινό και λιγότερο σε υφάλμυρο νερό (Barazi-Yeroulanos, 2010; FAO, 2018b). Η παραγωγή εκτρεφόμενων λαβρακιών και τσιπούρας ξεπερνάει κατά πολύ την αλιευτική απόδοση (FAO, 2011a; Monfort, 2006), ενώ τα φυσικά αποθέματα και των δύο ειδών θεωρούνται πλέον εξαντλημένα (FAO, 2011b). Περίπου το 65% της συνολικής παραγωγής λαβρακιού και το 57% της παραγωγής τσιπούρας επιτυγχάνεται στις ακτές της Τουρκίας και της Ελλάδας (FAO, 2018b). Εκτός της περιοχής του Αιγαίου, στην Τουρκία το λαβράκι εκτρέφεται επίσης στη Μαύρη Θάλασσα (Akova, Balci, 2015). Ακολουθούν σε παραγωγή η Αίγυπτος, η Ισπανία και η Τυνησία (Barazi-Yeroulanos, 2010; FAO, 2018b).

Άλλα σημαντικά εκτρεφόμενα θαλάσσια είδη της Μεσογείου είναι ο κρανιός (Argyrosomus regius) και ο κέφαλος (Mugil cephalus) στα οποία πρωτοστατεί

παραγωγικά η Αίγυπτος (Barazi-Yeroulanos, 2010; FAO, 2018b). Στην Ισπανία, ο κλάδος των υδατοκαλλιέργειών δραστηριοποιείται και στις ακτές του Ατλαντικού με την παραγωγή κυρίως ειδών ψυχρών νερών όπως το καλκάνι (*Scophthalmus maximus*) και αλλά επίσης και τσιπούρας. Επιπλέον, η Τουρκία δραστηριοποιείται όπως προαναφέρθηκε και στην υφάλμυρη Μαύρη Θάλασσα με την παραγωγή ειδών ψυχρών αλλά και θερμών νερών όπως το λαβράκι, το καλκάνι, η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και ο σολομός του Ατλαντικού (Akova, Balci, 2015; Öztürk and Altinok, 2014). Η Αίγυπτος δραστηριοποιείται κατά κύριο λόγο σε υφάλμυρα νερά στο Δέλτα του Νείλου με κύρια θαλάσσια είδη τον κρανιό, το λαβράκι και διάφορα είδη κέφαλων.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η Ελλάδα είναι η 5ⁿ μεγαλύτερη παραγωγός χώρα λόγω της παραγωγής της σε τσιπούρα και λαβράκι (STECF, 2018). Σε μικρό ποσοστό καλλιεργούνται επίσης στη χώρα, η πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), ο κρανιός (*Argyrosomus regius*), ο κέφαλος (*Mugil cephalus*), το μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*), το βραχύπτερο φαγκρί (*Pagrus major*) κ.α (FAO, 2018b).

1.2. Ασθένειες στις Υδατοκαλλιέργειες

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων, το 2007 οι ασθένειες ήταν η δεύτερη κυριότερη αιτία απωλειών στη βιομηχανία υδατοκαλλιεργειών μετά τις καιρικές συνθήκες (FAO, 2011a) και θεωρούνται σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη του κλάδου των υδατοκαλλιέργειών (Brummett et al., 2014). Για παράδειγμα ο οικονομικός αντίκτυπος της προσβολής σολομοειδών από θαλάσσιες ψείρες (*Lepeophtheirus* spp. και *Caligus* spp.) εκτιμήθηκε βιβλιογραφικά, στα 480 εκατομμύρια δολάρια για την περίοδο 1993-2000, ποσό που ισοδυναμεί με 4-10% της αξίας παραγωγής, ανάλογα με τη χώρα (Costello, 2009). Το 2011, μόνο στη Νορβηγία, το κόστος προσβολής σολομού από την ψείρα του σολομού, *Lepeophtheirus salmonis* εκτιμήθηκε στα 436 εκατομμύρια δολάρια ποσό που αντιστοιχεί στο 9% των εσόδων (Abolofia et al., 2017). Στη θαλάσσια εκτροφή, το 60% περίπου των ασθενειών έχει εκτιμηθεί ως βακτηριακής ή ιικής προέλευσης και το 50% περίπου των ασθενειών αφορά είδη ιχθύων (Lafferty et al., 2015).

Το κόστος των ασθενειών δεν περιορίζεται στην απώλεια βιομάζας λόγω αυξημένης θνησιμότητας ή/και αλλοιώσεων. Παράπλευρα κόστη των ασθενειών

περιλαμβάνουν την απώλεια τροφών εφόσον αυτές οδηγούν επίσης σε μείωση του ρυθμού αύξησης και μετατρεψιμότητας τροφής, ενώ η απώλεια όρεξης είναι βασικό σύμπτωμα των άρρωστων ιχθύων. Άλλες έμμεσες δαπάνες που συνδέονται με τις πρακτικές διαχείρισης των ασθενειών και την απόσβεση της αξίας του προϊόντος που είναι δύσκολο να εκτιμηθούν. Για παράδειγμα, στο έμμεσο κόστος των μολυσματικών ασθενειών συγκαταλέγονται τα έξοδα θεραπείας και πρόληψης, η πρόληψη της εξάπλωσης (π.χ. απολύμανση), η απώλεια εκτάσεων προς εκμετάλλευση (αγρανάπαυση), η απασχόληση εξειδικευμένου προσωπικού (πχ τα συνεργεία εμβολιασμού) κ.α. Παράλληλα, οι ασθένειες επηρεάζουν και τη ζήτηση των προϊόντων υδατοκαλλιέργειας αφού μπορεί να επηρεάζουν την εμφάνιση και πιθανά τη γεύση τους και αυξάνουν το σκεπτικισμό του καταναλωτή (Lafferty et al., 2015). Παράλληλα, τα ζητήματα ευζωίας των εκτρεφόμενων ψαριών συμπεριλαμβανομένων των ασθενειών αλλά και των γενικότερων συνθηκών διαβίωσης (π.χ. πυκνότητα πληθυσμού) και του τρόπου θανάτωσης των ζώων, έχουν αρχίσει να απασχολούν τους καταναλωτές κυρίως μετά τη δεκαετία του 2000 επηρεάζοντας επίσης την εμπορευσιμότητα των προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας(Ashley, 2007; Huntingford and Kadri, 2009).

Η μετάδοση των ασθενειών διευκολύνεται από τη συσσώρευση μονάδων εκτροφής σε παράλιες περιοχές με σχετικά ρηχά και μικρή ανανέωση νερά και την έλλειψη οριοθέτησης μεταξύ μονάδων και μεταξύ ασθενών-υγιών ιχθύων (Cabello, 2006; Murray and Peeler, 2005). Επίσης, η μεταφορά ιχθυοαποθεμάτων μεταξύ μονάδων καθώς και η εντατικοποίηση της εμπορικής δραστηριότητας της ιχθυοκαλλιέργειας συμβάλλουν στη διασπορά παθογόνων και ασθενειών σε άλλες περιοχές και είδη ενώ ανταλλαγή παθογόνων/ασθενειών παρατηρείται και με τους άγριους πληθυσμούς (Bondad-Reantaso et al., 2005; Murray and Peeler, 2005; Subasinghe, 2005).

Ο έλεγχος των ασθενειών περιλαμβάνει τη θεραπεία των μολυσμένων ατόμων και την προστασία των υγιών ατόμων με μέτρα προφύλαξης. Ο τρόπος αντιμετώπισης μιας ασθένειας διαφέρει ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα (παράσιτα, βακτήρια, ιοί). Σε περίπτωση εκδήλωσης βακτηριακής ασθένειας τα αντιβιοτικά αποτελούν προς το παρόν, τη μοναδική λύση. Χορηγούνται στα ψάρια κυρίως μέσω της τροφής ή με εμβάπτιση και η δράση τους είναι γενική και άμεση. Το κόστος τους είναι υψηλό και η

χρήση τους διέπεται από αυστηρούς κανόνες για την ασφάλεια του περιβάλλοντος και του καταναλωτή (FAO/OIE/WHO, 2006) αφού η επιλεκτική πίεση που ασκείται στους μικροοργανισμούς από τη χρήση τους οδηγεί σε ανάπτυξη και διασπορά ανθεκτικών στελεχών στο περιβάλλον (Allen et al., 2010; Buschmann et al., 2012; Cabello, 2006; Romero et al., 2012) και τον καταναλωτή (Cole et al., 2009; Navarrete et al., 2008).

Ωστόσο, η πρόληψη είναι προτιμότερη από τη θεραπεία, και προς αυτήν την κατεύθυνση, οι ορθές διαχειριστικές πρακτικές είναι επιτακτικής σημασίας ειδικά στην αντιμετώπιση των ευκαιριακών παθογόνων. Η διατήρηση χαμηλής ιχθυοφόρτισης, καλών συνθηκών υγιεινής και χαμηλού στρες με περιορισμό του υπερβολικών χειρισμών μειώνει την πιθανότητα μόλυνσης και την έντασή της όταν αυτή εμφανιστεί.

Σκευάσματα από προβιοτικά και διάφορες ανοσοενισχυτικές (immunostimulants) ουσίες, χρησιμοποιούνται για να ενισχύσουν μηχανισμούς της μη ειδικής άμυνας των ιχθύων. Η χορήγηση τους προκαλεί την αύξηση των επιπέδων διαφόρων παραγόντων της χυμικής και κυτταρικής ανοσίας όπως πρωτεΐνες του συμπληρώματος, λυσοζύμη, παραγωγή κυτοκινών, φαγοκύττωση, κ.α. Λειτουργούν ως μέτρο πρόληψης μικροβιακών ασθενειών κυρίως στα νυμφικά στάδια εκτροφής των ιχθύων, που το ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι επαρκώς ανεπτυγμένο. Χορηγούνται συνήθως μέσω της τροφής με ειδική δίαιτα (Nayak, 2010; Ringø et al., 2011). Τέλος, σε επίπεδο πρόληψης τα εμβόλια αποτελούν μία επιτυχημένη προσπάθεια περιορισμού των ασθενειών στην ιχθυοκαλλιέργεια. Η χρήση τους ενδείκνυται αφότου ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των οργάνων και συστατικών του ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος εφόσον στοχεύουν στην επίτευξη ειδικής ανοσίας.

1.3. Γενικά χαρακτηριστικά του γένους Aeromonas

Οι αερομονάδες είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδόσχημα, δυνητικά αναερόβια, βακτήρια (0,3-1,0 x 1,0-3,5 μm) που δεν σχηματίζουν σπόρια και είναι ευρέως διαδεδομένα παγκοσμίως στο υδάτινο περιβάλλον (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Τα περισσότερα στελέχη *Aeromonas* spp. είναι κινητά μέσω ενός πολικού μαστίγιου αλλά παρατηρούνται επίσης πλευρικά (peritrichous) μαστίγια καθώς και μη κινητά στελέχη. Γενικά εμφανίζονται ως μοναδιαία κύτταρα αλλά μπορεί να δημιουργούν και μικρές αλυσίδες κυττάρων.

Διακρίνονται από τα υπόλοιπα εντεροβακτήρια (Enterobacteriaceae) μέσω της θετικής αντίδρασης στην οξειδάση και από τα *Vibrionaceae*, από την ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε θρεπτικά μέσα χαμηλής αλατότητας, από την ανθεκτικότητά τους στον (βιμπριοστατικό) παράγοντα 2,4-διαμινο-6,7-διισοπροπυλ-πτεριδίνη (O129) και την μη ικανότητα ανάπτυξης σε TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar) που είναι εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τα *Vibrionaceae* (Janda and Abbott, 2010; Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

Η απομόνωση αερομονάδων είναι σχετικά εύκολη σε μη εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα χαμηλής αλατότητας, καθώς και σε υποστρώματα καλλιέργειας εντεροβακτηρίων. Η μορφολογία των αποικιών μπορεί να ποικίλλει ακόμα και σε στελέχη του ίδιου είδους. Σχηματίζουν ομαλές, κυκλικές, κυρτές αποικίες, λείες ή αδρές ή με υφή βουτύρου, διαμέτρου 2-3 mm μετά από 24-48 h επώασης. Οι αποικίες μπορεί να είναι ημιδιαφανείς ή αδιαφανείς. Ο χρωματισμός είναι γενικά υπόλευκος/κρεμ.

Τα ψυχρόφιλα στελέχη εμφανίζουν βέλτιστη θερμοκρασία αύξησης μεταξύ 22-25°C και δεν μεγαλώνουν στους 37°C, είναι συνήθως ακίνητα και παράγουν χρωστική στο άγαρ (Janda and Abbott, 2010). Σε αυτά ανήκουν κυρίως στελέχη του είδους *A*. *salmonicida* και συγκεκριμένα το υποείδος *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*. Τα υπόλοιπα υποείδη *A. salmonicida* θεωρούνται «μη-τυπικά» και μπορεί να αποκλίνουν σε κάποιους από τους παραπάνω χαρακτήρες (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Οι μεσόφιλες αερομονάδες αναπτύσσονται καλά σε θερμοκρασίες μεταξύ 35-37°C, είναι κινητές και γενικά δεν παράγουν χρωστική (Janda and Abbott, 2010). Η ομάδα των μεσόφιλων, εκπροσωπείται από το είδος *A. hydrophila*.

Στη 2ⁿ έκδοση του Εγχειριδίου Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (Martin-Carnahan and Joseph, 2005) το γένος αποτελείται από τα 14 ακόλουθα είδη: *A. hydrophila, A. allosaccharophila, A. bestiarum, A. caviae, A. encheleia, A. eucrenophila, A. jandaei, A. media, A. popoffii, A. salmonicida, A. schubertii, A. sobria, A. trota, A. veronii και τα δύο μη ονοματισμένα τάξα Aeromonas spp. (DHG 11 and G501). Μέχρι σήμερα, στα προαναφερθέντα είδη συμπεριλαμβάνονται δύο υποείδη του <i>A. hydrophila (hydrophila και ranae)* (Huys et al., 2003), πέντε υποείδη του *A. salmonicida (salmonicida, achromogenes, masoucida,*

pectinolytica και smithia) και δύο βιοποικιλίες (biovariety) του Α. veronii (veronii και sobria).

Η συστηματική του γένους εξελίσσεται διαρκώς συμπεριλαμβανομένων διαδικασιών περιγραφής νέων ειδών, ονοματοδότησης (Miñana-Galbis et al., 2010), συστηματικής ανακατάταξης (Beaz-Hidalgo et al., 2013) και συνωνυμοποίησης (Huys et al., 2005). Τα νέα είδη περιλαμβάνουν με χρονολογική σειρά περιγραφής τα εξής: *A. molluscorum* (Minana-Galbis, Farfan, Fuste, & Loren, 2004), *A. simiae* (Harf-Monteil et al., 2004), *A. bivalvium* (Minana-Galbis, Farfan, Fuste, & Loren, 2007), *A. tecta* (Demarta et al., 2008), *A. piscicola* (Beaz-Hidalgo, Alperi, Figueras, & Romalde, 2009), *A. fluvialis* (Alperi et al., 2010b), *A. sanarellii* και *A. taiwanensis* (Alperi et al., 2010a), *A. rivuli* (Figueras et al., 2011), *A. australiensis* (Aravena-Román et al., 2013), *A. cavernicola* (Martinez-Murcia et al., 2013), *A. dhakensis* (Beaz-Hidalgo et al., 2013), *A. aquatica, A. finlandensis* και *A. lacus* (Beaz-Hidalgo et al., 2015), *A. rivipollensis* (Marti and Balcázar, 2015), *A. lusitana* (Martinez-Murcia et al., 2017), *ενώ* το είδος *A. sharmana* έχει αποκλειστεί από το γένος (Martinez-Murcia, Figueras, Saavedra, & Stackebrandt, 2007).

1.4. Το γένος Aeromonas ως αιτιολογικός παράγοντας ασθενειών στην ιχθυοκαλλιέργεια

Οι αερομονάδες συναντώνται σε γλυκό, υφάλμυρο και θαλασσινό νερό, είτε ελεύθερα, είτε ως συμβιωτικά ή ως παθογόνα σε ψυχρόαιμους και θερμόαιμους οργανισμούς (Janda and Abbott 2010). Σημαντικές ασθένειες των ιχθύων σχετίζονται με το γένος *Aeromonas.* Τα ψυχρόφιλα στελέχη, του υποείδους *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, είναι ο τυπικός αιτιολογικός παράγοντας της δοθιήνωσης (furunculosis) που προσβάλει κυρίως σολομοειδή (είδη της οικογένειας Salmonideae όπως σολομοί, και πέστροφες) και είναι μία από τις παλαιότερα περιγεγραμμένες ασθένειες των ιχθύων. Τα άλλα υποείδη του *A. salmonicida* που θεωρούνται «μη-τυπικά» σχετίζονται με ασθένειες σε σολομοειδή και άλλα είδη (μη σολομοειδή και θερμόφιλα) όπως κυπρινοειδή, χέλια, χρυσόψαρα κ.α (Austin and Austin, 2012; Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012; Menanteau-Ledouble et al., 2016). Η ομάδα των μεσόφιλων αερομονάδων εκπροσωπείται βιβλιογραφικά από το είδος *A. hydrophila.* το οποίο είναι γνωστός αιτιολογικός παράγοντας ελκωτικών, αιμορραγικών και σηψαιμικών ασθενειών και μολύνσεων σε καλλιεργούμενα και διακοσμητικά (ενυδρείων) ψάρια των γλυκών νερών, όπως τιλάπιες, κυπρίνους, πέστροφες, χρυσόψαρα κλπ. (Austin and Austin, 2012). Παρόλα αυτά, η χρήση σύγχρονων διαγνωστικών εργαλείων στην παθολογία ιχθύων έχει αυξήσει σημαντικά τον αριθμό των εμπλεκόμενων σε ασθένειες ειδών *Aeromonas* spp. (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012) συμπεριλαμβανομένων των *A. bestiarum, A. caviae, A. jandaei, A. piscicola, A. schubertii, A. sobria* και *A. veronii* (Austin and Austin, 2012).

Ανάμεσά τους το είδος *Α. veronii* αποκτά ολοένα και αυξανόμενη σημασία ως παθογόνο στις υδατοκαλλιέργειες. Εξάρσεις ασθενειών συνοδευόμενες από σημαντικές απώλειες έχουν αναφερθεί στο αφρικανικό γατόψαρο (*Clarias gariepinus*), σε κυπρινοειδή (*Puntius gonionotus, Labeo rohita* και *Catla catla*) και στον οφιοκέφαλο (*Channa striatus*) σε μονάδες εκτροφής στο Μπαγκλαντές (Rahman et al., 2002), στο γατόψαρο (*Leiocassis longirostris*) (Cai et al., 2012), στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) στην Κίνα και το Βιετνάμ (Hoai et al., 2019; Liu et al., 2016) και σε κυπρινοειδή (Ran et al., 2018; Zhu et al., 2015) στην Κίνα. Έχει επίσης αναφερθεί στο *Plecoglossus altivelis* στην Ιαπωνία (Takeuchi et al., 2018) και σε τιλάπιες (*Oreochromis niloticus*) στη Σαουδική Αραβία (Hassan et al., 2017). Εκτός της υδατοκαλλιέργειας, το είδος αναφέρεται επίσης ως παθογόνο διακοσμητικών ειδών (Sreedharan et al., 2013). Όπως και άλλες μεσόφιλες αερομονάδες, το είδος *Α. veronii* έχει σχετιστεί επίσης με ευκαιριακές λοιμώξεις ως αποτέλεσμα χειρισμών που καταπονούν τον οργανισμό των ιχθύων όπως π.χ. η μεταφορά ιχθυαποθέματος (Dong et al., 2017; Dror et al., 2006; Marques et al., 2016).

1.4.1. Αερομονάδες στη Μεσογειακή Ιχθυοκαλλιέργεια

Μέχρι πρόσφατα οι αερομονάδες δεν αποτελούσαν σοβαρό αιτιολογικό παράγοντα ασθενειών στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια Απομονώνονται συχνά σε αλμυρά και υφάλμυρα νερά αλλά και στο ίζημα (Dumontet et al., 2000; Sechi et al., 2002), μπορεί να αποτελούν μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας ή/και απομονώνονται από ιστούς φαινομενικά υγειών ιχθύων (Floris et al., 2013; Pedonese et al., 2012; Scarano et al., 2018; Toranzo et al., 1993). Ακόμα και στις περιπτώσεις που έχουν απομονωθεί από άρρωστα ψάρια, οι περισσότερες πηγές δεν παρέχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν τη μολυσματικότητα των αερομονάδων. Σε πολυάριθμες μελέτες, ψυχρόφιλα και θερμόφιλα είδη αερομονάδων έχουν απομονωθεί κατά τη διάρκεια μικροβιακής επιτήρησης κυρίως από καλλιεργούμενες τσιπούρες και λαβράκια και σποραδικά από τη χιόνα (*Diplodus puntazzo*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), τη συναγρίδα (*Dentex dentex*), τη σφυρίδα (*Epinephelus* spp.), το καλκάνι (*Scophthalmus maximus*), το ασπροσάφριδο (*Trachurus mediterraneus*), τον κρανιό (*Argyrosmus regius*) και τον κέφαλο (*Mugil cephalus*) (Athanassopoulou et al., 1999; Balebona et al., 1998; Colorni et al., 1981; El-Barbary, 2017, 2010; Hassan et al., 2015; Martino et al., 2011; Öztürk and Altinok, 2014; Soliman et al., 2011; Uzun and Ogut, 2015; Yardımcı and Timur, 2015; Yiagnisis and Athanassopoulou, 2012; Zorrilla et al., 2003). Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις, βρέθηκαν σε χαμηλά ποσοστά ή/και σε μικτές λοιμώξεις με κυρίαρχα θαλάσσια παθογόνα των γενών *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* και *Tenacibaculum*.

Στις λίγες αναφορές όπου οι αερομονάδες (μεσόφιλα και ψυχρόφιλα είδη) έχουν αποτελέσει πρωτεύον παθογόνο σε καλλιεργούμενα ψάρια στη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα, το είδος που κυρίως επηρεάστηκε, ήταν το λαβράκι. Στη Μαύρη Θάλασσα (Τουρκία) έχει αναφερθεί λοίμωξη στο λαβράκι οφειλόμενη στο ψυχρόφιλο είδος *A. salmonicida* subsp. *masoucida/achromogenes* (5 και 100 g). Η ασθένεια εμφανίστηκε στους 16°C και προκάλεσε αθροιστική θνησιμότητα κατά τη διάρκεια της έξαρσης (περίοδος 2 μηνών) που έφτασε το 20% (Karatas et al., 2005). Τα ψάρια που επηρεάστηκαν παρουσίασαν εξωτερικά αιμορραγίες και εσωτερικά διόγκωση του σπλήνα και λευκές αλλοιώσεις στα εσωτερικά όργανα.

Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε περίπτωση δοθιήνωσης (ψυχρόφιλο, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) επίσης σε λαβράκι, στην Ισπανία (μεσογειακές ακτές) (Fernández-Álvarez et al., 2016). Η ασθένεια εμφανίστηκε και πάλι μεταξύ 16-17°C και επηρέασε νεαρά ψάρια (9 g) προκαλώντας αθροιστική θνησιμότητα έως 3,8% σε περίοδο 2 μηνών. Αρχικά, τα ψάρια ήταν ασυμπτωματικά, αλλά σταδιακά, εμφάνισαν ελκώδεις αλλοιώσεις στο δέρμα και τους μύες. Εσωτερικά το μόνο κλινικό σημάδι που καταγράφηκε ήταν η διόγκωση του σπλήνα. Οι δοκιμές μολυσματικότητας έδειξαν ότι το στέλεχος από το λαβράκι ήταν επίσης μολυσματικό για το καλκάνι και την πέστροφα,

εφιστώντας την προσοχή στους πιθανούς κινδύνους μετάδοσης μεταξύ ειδών που εκτρέφονται στην ίδια τοποθεσία ή/και άγριων πληθυσμών.

Στο Δ. Αιγαίο, το μεσόφιλο είδος *Α. hydrophila* προκάλεσε νοσηρότητα και χαμηλή ημερήσια θνησιμότητα (0,5-1%) σε καλλιεργούμενο λαβράκι (150 και 330 g) και στη χιόνα (~45 g) (Doukas et al., 1998) σε δύο διαφορετικές ιχθυοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Τα κλινικά σημάδια της νόσου περιλάμβαναν ερύθημα και οίδημα της έδρας, πετέχειες στο δέρμα και εσωτερικά διόγκωση των οργάνων, αιμορραγίες και εκχυμώσεις. Το περιστατικό έξαρσης της ασθένειας εκδηλώθηκε σε θερμοκρασίες μεταξύ 13-15°C και αποδόθηκε σε στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες (απότομη πτώση αλατότητας και θερμοκρασίας λόγω έντονης βροχόπτωσης). Σε άλλη περίπτωση στο λαβράκι (40 g), το ίδιο είδος αναφέρθηκε σε μικτή λοίμωξη με το μύκητα *Saprolegnia parasitica* (Dincturk et al., 2018). Το περιστατικό αναφέρθηκε σε εκτρεφόμενα λαβράκια σε θαλασσινό νερό, σε χερσαίες δεξαμενές του İzmir Katip Çelebi University Fisheries Research and Training Center. Η θνησιμότητα (18%) συσχετίστηκε με στρεσογόνους παράγοντες όπως απότομη πτώση θερμοκρασίας (10°C), αύξηση θολερότητας, και μεγάλη ιχθυοφόρτιση.

Στον Ατλαντικό Ωκεανό, στα Gran Canaria, το ψυχρόφιλο είδος *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, έχει αναφερθεί σε τσιπούρες (1 g), μετά από μεταφορά στην εγκατάσταση εκτροφής (Real et al., 1994). Περιγράφηκε ως οξεία λοίμωξη και η θνησιμότητα έφτασε στο 6-7% τις πρώτες 3 ημέρες. Τα ψάρια εμφάνισαν αναιμικά βράγχια, σκούρο χρωματισμό του δέρματος και πετέχειες στο στόμα και τα βράγχια. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 16°C.

1.5. Τεχνολογίες αλληλούχισης στη διάγνωση, επιδημιολογία και πρόληψη των ασθενειών στην ιχθυοκαλλιέργεια

Ο αποτελεσματικός έλεγχος των μολυσματικών ασθενειών στα ψάρια απαιτεί πρόσβαση σε γρήγορες, αξιόπιστες και ευαίσθητες τεχνικές ταυτοποίησης. Δεδομένης της έλλειψης ειδικών τεστ για υδρόβιους οργανισμούς, στην υδατοκαλλιέργεια έχουν υιοθετηθεί στην εργαστηριακή ρουτίνα τα αυτοματοποιημένα συστήματα αναγνώρισης ανθρώπινων βακτηριακών παθογόνων όπως όπως API 20E, API ZYM, API 20NE, Vitek, Biolog MicroPlates κ.α. Παρά τις τροποποιήσεις για την καλύτερη προσαρμογή των συστημάτων αυτών σε παθογόνα ιχθύων (π.χ. θερμοκρασία επώασης) παρουσιάζουν περιορισμούς στην ταυτοποίηση παθογόνων ιχθύων συμπεριλαμβανομένου συγκεκριμένα των *Aeromonas* spp. (Austin, 2011; Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012; Topic Popovic et al., 2007). Πολλά κοινά παθογόνα ιχθύων λείπουν από τις βάσεις δεδομένων; για παράδειγμα, το σύστημα API 20Ε περιλαμβάνει μόνο 4 (*A. salmonicida, A. hydrophila, A. sobria* και *A. caviae*) από τα είδη αερομονάδων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε άλλες περιπτώσεις προκύπτουν ψευδώς αρνητικές/θετικές αντιδράσεις σε σύγκριση με τη διεξαγωγή του ίδιου τεστ εκτός συστήματος με αποτέλεσμα εσφαλμένη ταυτοποίηση είτε μεταξύ ειδών αερομονάδων στα API και Biolog (Guo et al., 2016; Santos et al., 1993) είτε μεταξύ των κοινών παθογόνων *Aeromonas* spp. και *Vibrio* spp. στα συστήματα API και Vitek (Abbott et al., 1998; Park et al., 2003).

Πέραν των περιορισμών των αυτοματοποιημένων τεστ, οι φαινοτυπικοί δείκτες έχουν γενικώς αποδειχθεί ανεπαρκείς για τη διάκριση μεταξύ ειδών αερομονάδων (Beaz-Hidalgo et al., 2010). Η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους για τις αερομονάδες αποδείχτηκε περίπλοκη διαδικασία και με τη χρήση άλλων τεχνικών με βάση το γονίδιο οικιακής οικονομίας 16S rDNA όπως τη μελέτη πολυμορφισμών του μήκους θραυσμάτων περιορισμού (restriction fragment length polymorphism, rDNA-RFLP) και τη Φασματομετρίας Μάζας (laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS). Και οι δύο αυτές μέθοδοι παρά τα πλεονεκτήματα τους από πλευράς κόστους και χρόνου εμφανίζουν περιορισμούς πέραν του επιπέδου του γένους εξαιτίας του γενετικού δείκτη που χρησιμοποιείται κυρίως όσον αφορά νέα και στενά συγγενικά είδη σε παθογόνα αλλά και περιβαλλοντικά στελέχη (Graf, 1999; Párez-Sancho et al., 2018; Vávrová et al., 2015; Vega-Sánchez et al., 2014).

Η λανθασμένη ταυτοποίηση οδηγεί σε εσφαλμένη διάγνωση. Διαφορετικά κλινικά σημάδια μπορεί να αποδίδονται στο ίδιο είδος χωρίς να είναι εφικτό να διασαφηνιστεί εάν πρόκειται για το εύρος των κλινικών γνωρισμάτων του μικροοργανισμού σε διαφορετικούς πληθυσμούς ξενιστή (π.χ. άγριοι/εκτρεφόμενοι) ή για διαφορετικά παθογόνα (Burr et al., 2012). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *A. hydrophila* (Rasmussen-Ivey et al., 2016) που είναι το πλέον αναφερόμενο στη βιβλιογραφία ανάμεσα στις μεσόφιλες αερομονάδες ενώ στην πραγματικότητα η παρουσία του είναι υπερτιμημένη (Nielsen et al., 2001). Τα νέα εργαλεία

ταυτοποίησης έχουν επιτρέψει την ταυτοποίηση πολύ περισσότερων ειδών που εμπλέκονται σε ασθένειες ιχθύων συμπεριλαμβανομένων των *A. veronii, A. bestiarum, A. caviae, A. jandaei, A. piscicola, A. schubertii* και *A. sobria* (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012).

Η αλληλούχιση γονιδίων οικιακής οικονομίας θεωρείται πλέον απαραίτητη για τη σωστή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους στο γένος *Aeromonas*. Η υιοθέτηση τους και οι μέθοδοι της πολυτοπικής τυποποίησης αλληλουχίας (Multilocus sequence typing, MLST) και ανάλυσης πολλαπλών τόπων (multilocus sequence analysis, MLSA) οδήγησε μεταξύ άλλων στις συστηματικές ανακατατάξεις που περιγράφηκαν παραπάνω. Έγινε δυνατή η μελέτη της εξέλιξης του γένους, η οριοθέτηση ειδών και η μελέτη υποπληθυσμών του ίδιου είδους (Carmen Fusté et al., 2012; Lorén Egea et al., 2014; Lorén et al., 2018).

Ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων οικιακής οικονομίας έχουν δοκιμαστεί σε φυλογενετικές μελέτες του γένους *Aeromonas*: 16S rRNA, atpD, cpn60 (groL), dnaJ, dnaK, dnaX, gltA, gyrA, gyrB, mdh, metG, ppsA, radA, recA, rpoB, rpoD, tsf, zipA και chiA όπως συνοψίζονται στη σχετική εργασία (Navarro and Martinez-Murcia, 2018). Μεταξύ αυτών τα γονίδια για το ένζυμο DNA gyrase B, gyrB και για τον παράγοντα σ⁷⁰ της RNA πολυμεράσης, rpoD είναι τα πιο κοινά σε αριθμό διαθέσιμων αλληλουχιών στις βάσεις γενετικών δεδομένων και έχουν προταθεί ως επαρκή για την ταυτοποίηση *Aeromonas* spp. αφού επιτρέπουν τη διάκριση στενά συγγενικών ειδών (Beaz-Hidalgo and Figueras, 2012; Navarro and Martinez-Murcia, 2018; Soler et al., 2004; Yanez et al., 2003). Πράγματι, ολοένα και περισσότερες μελέτες με τη χρήση ενός ή και των δύο παραπάνω γονιδίων ανέδειξαν σε πολλές περιπτώσεις και αντίθετα με προηγούμενες μελέτες, το είδος *A. veronii* ως κυρίαρχο έναντι του *A. hydrophila* και άλλων αερομονάδων σε λοιμώξεις διαφόρων ειδών ιχθύων αλλά και στο υδάτινο περιβάλλον της εκτροφής (De Jagoda et al., 2014; Hossain et al., 2018; Hu et al., 2012; Khor et al., 2015; Zhou et al., 2013).

Η αλληλούχιση νέας γενιάς και η ανάπτυξη εργαλείων για τη σύγκριση και τον χαρακτηρισμό γονιδιωμάτων επέτρεψε την αναγνώριση νέων ειδών ή εσφαλμένα ταυτοποιημένων γονιδιωμάτων βακτηρίων (Beaz-Hidalgo et al., 2015; Colston et al., 2014) και τη διαλεύκανση των σχέσεων μεταξύ συγγενικών ειδών όπως *A. sobria* και *A. veronii* bv. *sobria* (Gauthier et al., 2017). Στην υδατοκαλλιέργεια όπως και αλλού, η

αλληλούχιση γονιδιωμάτων έδωσε τη δυνατότητα μελέτης των μολυσματικών χαρακτηριστικών των παθογόνων μικροοργανισμών και σύγκρισης των μηχανισμών μολυσματικότητας ανάμεσα σε διαφορετικά τάξα όπως μεταξύ Vibrio spp., Aeromonas spp., Photobacterium damselae subsp. piscicida, Tenacibaculum maritimum, Flavobacterium spp. κ.α. (Sudheesh et al., 2012). Με τον τρόπο αυτό αναδεικνύονται τα μοναδικά χαρακτηριστικά κάποιων παθογόνων αλλά και στοιχεία μολυσματικότητας με αυξημένη ομολογία ανάμεσα σε τάξα. (π.χ εκκριτικό σύστημα type III).

Η κατανόηση των συνθηκών που διέπουν την εμφάνιση και εξάπλωση των μολυσματικών ασθενειών αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την ανάπτυξη μιας βιώσιμης παγκόσμιας βιομηχανίας υδατοκαλλιέργειας. Η γονιδιωματική ανάλυση εισάγει νέα εργαλεία και μέσω της μοριακής πλέον επιδημιολογίας δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού της προέλευσης, της οδού εξάπλωσης ενός παθογόνου και της εκτίμησης της αλληλεπίδρασης με περιβαλλοντικούς παράγοντες και άγριους πληθυσμούς (Bayliss et al., 2017). Για παράδειγμα, οι μελέτη των σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) για την εκτίμηση του ρυθμού με τον οποίο εξελίσσονται τα βακτηριακά γονιδιώματα μπορεί να διαφωτίσει πτυχές της εξέλιξης των παθογόνων και να βοηθήσει στην κατανόηση της εμφάνισης των νέων ασθενειών, των σχέσεων μεταξύ παθογόνου και ξενιστή και των προτύπων μετάδοσης των ασθενειών (Duchêne et al., 2016). Μέσω των αναλύσεων σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν εντοπιστεί τύποι παθογόνων στελεχών (pathotypes) A. veronii που μπορεί να επηρεάζουν την εκτροφή του γατόψαρου (Ictalurus punctatus) σε απομακρυσμένες περιοχές (Κίνα και ΗΠΑ) (Tekedar et al., 2019), πληροφορία καθοριστικής σημασίας για τον περιορισμό της ασθένειας μέσω εμβολιασμού. Η επιβεβαίωση της παρουσίας των pathotypes μέχρι πρόσφατα βασιζόταν σε βιοχημικές, μοριακές και ανοσολογικές τεχνικές αναλύσεις μεγάλου αριθμού στελεχών (Rahman et al., 2002).

1.5.1. Αντίστροφη εμβολιολογία (Reverse Vaccinology)

Η δυνατότητα αναλύσεων σε επίπεδο γονιδιώματος οδήγησε στην ανάπτυξη της αντίστροφης εμβολιολογίας (reverse vaccinology), μεθοδολογία που περιγράφει τον εντοπισμό αντιγόνων ξεκινώντας από πληροφορίες του γονιδιώματος (Rappuoli,

2000). Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές τεχνικές ανάπτυξης εμβολίων δεν απαιτείται η καλλιέργεια του παθογόνου μικροοργανισμού. Δεν απαιτούνται μικροβιολογικές, βιοχημικές, οροτυπικές αναλύσεις για τον προσδιορισμό της ποικιλότητας και ανοσογονικότητας του ενώ υπερβαίνει και τη δυσκολία εντοπισμού και μελέτης των λιγότερο άφθονων αντιγόνων.

Οι τρέχουσες προσεγγίσεις αντίστροφης εμβολιολογίας περιλαμβάνουν συγκριτικές αναλύσεις πολλαπλών γονιδιωμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση συντηρημένων αντιγόνων εντός ενός ετερογενούς (π.χ διαφορετικοί ορότυποι/είδη) πληθυσμού στελεχών με σκοπό την επίτευξη διασταυρούμενης προστασίας (Adu-Bobie et al., 2003). Παράλληλα, η δυνατότητα επιλογής υποψήφιων αντιγόνων για δοκιμή σε ζωικά μοντέλα, με αυξημένη πιθανότητα δράσης σε μεγάλο αριθμό στελεχών, μειώνει το κόστος και το χρόνο των μεταγενέστερων αναλύσεων μειώνοντας συνολικά το χρόνο ανάπτυξης ενός εμβολίου στα 1-2 χρόνια αντί 5-10 προηγουμένως (Rappuoli, 2000).

Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου αφορά στο σχεδιασμό εμβολίου έναντι του ανθρώπινου παθογόνου Neisseria meningitidis (ορότυπος B) (Masignani et al., 2019). Η αρχική επιλογή πιθανών αντιγόνων έγινε in silico, σε μια μεγάλη συλλογή στελεχών Neisseria spp. από ασθενείς και φορείς, με παγκόσμια εξάπλωση (Masignani et al., 2019). Συντηρημένα αντιγόνα ακολούθως αξιολογήθηκαν in vitro ως προς την προστατευτική τους ικανότητα, ενώ η τελική επιλογή βασίστηκε στη δυνατότητα διασταυρούμενης προστασίας. Η προσπάθεια αυτή κατέληξε στην ανάπτυξη ενός πολύ-σθενούς ανασυνδυασμένου εμβολίου υπομονάδας ευρείας κάλυψης (universal) για τις ασθένειες που προκαλούνται από στελέχη Neisseria meningitidis (ορότυπος B).

Η αντίστροφη εμβολιολογία συγκεντρώνει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον και στη ζωική παραγωγή και έχει πρόσφατα εισαχθεί ως μεθοδολογία στην ανάπτυξη εμβολίων για γνωστά παθογόνα στην ιχθυοκαλλιέργεια. Οι μελέτες αυτές, στις περισσότερες περιπτώσεις περιλαμβάνουν μόνο *in silico* αναλύσεις και αφορούν είδη ευρείας εξάπλωσης (γεωγραφικά και σε επίπεδο ξενιστών) για τα οποία είτε κυκλοφορούν εμπορικά εμβόλια που χρήζουν όμως βελτιστοποίησης (π.χ. εμπλουτισμός αντιγόνων για παροχή διασταυρούμενης προστασίας), είτε λόγω μεγάλης ποικιλότητας δεν αντιμετωπίζονται με εμπορικά εμβόλια. Στα είδη που έχουν μελετηθεί συμπεριλαμβάνονται κυρίως είδη του θαλασσινού νερού όπως το *Ph*.

damselae subsp. piscicida (Andreoni et al., 2016), V. anguillarum (Baliga et al., 2018) και τα δυο με ευρεία εξάπλωση και εύρος ξενιστών, το A. salmonicida subsp. salmonicida που προκαλεί τη δοθηίνωση των σολομοειδών (Marana et al., 2017), το Streptococcus parauberis που προκαλεί ασθένειες στον ιππόγλωσσο (Paralichthys olivaceus) (Kim et al., 2019) και είδη Vibrio spp. όπως το V. parahaemolyticus που ευθύνονται για ασθένειες στην υδατοκαλλιέργεια και ζωονόσους (Wang et al., 2021). Σε συνδυασμό με εργαλεία βιοπληροφορικής που μπορούν να προβλέψουν τις ανοσογονικές περιοχές (επίτοπους) πρωτεϊνών (immunoinformatics), η επιλογή πρωτεϊνών για εμβόλια μπορεί να εξειδικευτεί περεταίρω όπως στην περίπτωση των παθογόνων Edwardsiella tarda και Flavobacterium columnare όπου οι συγγραφείς ταυτοποίησαν επίτοπους T-λεμφοκυττάρων στις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (Mahendran et al., 2016).

1.6. Το ανοσοποιητικό σύστημα των εκτρεφόμενων ιχθύων

Η ασθένεια δεν θα εκδηλωθεί αν οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν το παθογόνο και δεν επηρεάζουν αρνητικά την κατάσταση υγείας (φυσιολογική κατάσταση/ανοσοποιητικό σύστημα) του ξενιστή. Σε συνθήκες αιχμαλωσίας, το ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων «δοκιμάζεται» σε διαφορετικό βαθμό από ότι αυτών που βρίσκονται στη φύση. Στα εντατικά συστήματα εκτροφής που έχουν υιοθετηθεί στην ιχθυοκαλλιέργεια, τα 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 στρεσσογόνων 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 (Ashley, 2007; Magnadottir, 2010; Tort, 2011).

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση, μετάδοση και την πρόληψη των ασθενειών. Ως εξώθερμοι οργανισμοί, η θερμοκρασία σώματος των ιχθύων και ακολούθως οι φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως και το ανοσοποιητικό καθορίζονται από αυτήν. Η θερμοκρασία του νερού επηρεάζει βασικούς ποιοτικούς παράγοντες όπως τη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η

διαλυτότητα του οξυγόνου μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά τους θερινούς μήνες ενώ παράλληλα ο μεταβολισμός των θερμόφιλων ειδών ιχθύων και οι ανάγκες τους σε οξυγόνο αυξάνονται. Στο ανοσοποιητικό σύστημα των ιχθύων, παρατηρείται καταστολή του ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα συστατικά του μη-ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος είναι πιο ανθεκτικά (Magnadottir, 2010), ενώ το θερμοκρασιακό στρες (απότομες μεταβολές ή ακραίες τιμές σε σχέση με το βέλτιστο του είδους) επιδρά αρνητικά στο σύνολο του ανοσοποιητικού (Abram et al., 2017; Dittmar et al., 2014).

Στα πλαίσια της κλιματικής αλλαγής, η αύξηση της αλατότητας και της θερμοκρασίας έχουν δημιουργήσει συνθήκες κατάλληλες για την εισβολή και εγκαθίδρυση τροπικών ειδών κυρίως στην Α. Μεσόγειο (Lejeusne et al., 2010; Raitsos et al., 2010). Η άνοδος της θερμοκρασίας ευνοεί ευκαιριακά παθογόνα ή παθογόνα των ζεστών νερών όπως διάφορα είδη *Vibrio* οδηγώντας σε νέες/αναδυόμενες παθολογίες στα θαλάσσια οικοσυστήματα (Bally and Garrabou, 2007; Danovaro et al., 2009; Vezzulli et al., 2010). Η εμφάνιση παθολογίας συναρτήσει της αυξημένης θερμοκρασίας μπορεί να σχετίζεται με ευπάθεια του ξενιστή ή/και ενισχυμένη διασπορά του παθογόνου. Ωστόσο, η έκφραση μολυσματικών παραγόντων είναι θερμο-εξαρτώμενη και έτσι η θερμοκρασία μπορεί να ενισχύει τη μολυσματικότητα του παθογόνου. Για παράδειγμα, η ευαισθησία του *Capoeta damascina* και η εμφάνιση κλινικών σημαδιών σε προσβολή από *Α. hydrophila*, αυξάνεται ανάλογα με τη θερμοκρασία (Goharrizi et al., 2015), ενώ ανθρώπινα κλινικά στελέχη του ίδιου είδους παρήγαγαν περισσότερες εντεροτοξίνες στους 37°C από ότι στους 28°C (Mateos et al., 1993).

Τα ψάρια βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στο μη ειδικό ανοσοποιητικό τους σύστημα για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών. Η μη ειδική άμυνα ενεργοποιείται από τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ενώ τα συστατικά του ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος (Β-λεμφοκύτταρα, ανοσοσφαιρίνες) και ιδιαίτερα στα ψάρια του θαλασσινού νερού αναπτύσσονται αργότερα σε σχέση με τα ψάρια του γλυκού νερού (Magnadottir, 2010; Uribe et al., 2011). Για παράδειγμα στο λαβράκι, τα λεμφικά όργανα (μεσονεφρικό ιστός και θύμος) είναι πλήρως ανεπτυγμένα, και ώριμα Β-λεμφοκύτταρα και ανοσοσφαιρίνες (IgM) εντοπίζονται 50 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (Breuil et al., 1997). Επίσης, το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από

τον εμβολιασμό μέχρι την παραγωγή προστατευτικών αντισωμάτων, διαφέρει ανάμεσα στα είδη, με τα ψυχρόφιλα είδη να εμφανίζουν καθυστέρηση σε σχέση με αυτά των θερμών νερών (Magnadottir, 2010).

Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι καθοριστικά για την επιλογή της στρατηγικής εμβολιασμού που πρέπει να εφαρμοστεί για την επιτυχή πρόληψη μιας ασθένειας. Η χρήση εμβολίων δεν θα είχε νόημα πριν από την ανάπτυξη των οργάνων και συστατικών του ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος εφόσον στοχεύει στην ενεργοποίηση του και την επίτευξη ειδικής ανοσίας μέσω παραγωγής αντισωμάτων (IgM) και κυττάρων μνήμης (B,T λεμφοκύτταρα). Έτσι, η πρόληψη βασίζεται στη χρήση ουσιών (π.χ β-glucans και προβιοτικά βακτήρια) που διεγείρουν τους μηχανισμούς της μη-ειδικής άμυνας κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και στον εμβολιασμό

Παράλληλα, η κατάσταση του οργανισμού του ψαριού ως ξενιστή αλληλεπιδρά με τις συνθήκες αύξησης των παθογόνων. π.χ. ο επιπολασμός (prevalence) της νόσου το χειμώνα μπορεί να συμπίπτει με χαμηλότερη δραστικότητα παραμέτρων κυρίως του μη-ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος, ή καθυστερημένη ή/και χαμηλότερη απόκριση όσον αφορά τη μεγιστοποίηση του τίτλου αντισωμάτων (Le Morvan et al., 1998; Magnadottir, 2010). Τα παραπάνω παίζουν καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό του ελάχιστου χρονικού διαστήματος που μπορεί να μεσολαβεί ανάμεσα στον εμβολιασμό και την πιθανή έκθεση στο παθογόνο.

1.7. Εμβόλια στην ιχθυοκαλλιέργεια

Ο εμβολιασμός, ως αποτελεσματική μέθοδος πρόληψης ενός ευρέος φάσματος βακτηριακών και ιογενών ασθενειών έχει συμβάλλει στην περιβαλλοντική, κοινωνική και οικονομική βιωσιμότητα της παγκόσμιας υδατοκαλλιέργειας. Από τις πρώτες αναφορές της δεκαετίας του 1940 και το πρώτο εμβόλιο για ψάρια το 1976 ενάντια στο βακτήριο *Yersinia ruckeri* η ανάπτυξη νέων εμβολίων τις τελευταίες δεκαετίες έχει μειώσει σημαντικά τον αντίκτυπο των μολυσματικών ασθενειών στα ψάρια (Gudding and Goodrich, 2014; Plant and LaPatra, 2011).

Σήμερα διατίθενται πάνω από 20 εμπορικά εμβόλια για την πρόληψη ασθενειών σε εκτρεφόμενα είδη ιχθύων συμπεριλαμβανομένων των: σολομός του Ατλαντικού, πέστροφας, λαβρακιού και τσιπούρας, μαγιάτικου (Seriola

dumerili/quinqueradiata), τιλάπιας (Oreochromis niloticus/mossambicus), και γατόψαρων (Ictalurus punctatus/Pangasionodon hypophthalmus) (Brudeseth et al., 2013; Ma et al., 2019; Miccoli et al., 2019). Σε ορισμένες περιοχές του κόσμου, κατά κύριο λόγω σε είδη υψηλής αξίας έχει γίνει μια στροφή από τα αντιβιοτικά προς τον εμβολιασμό με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη νορβηγική εκτροφή σολομού που οδήγησε σε δραματική μείωση στη χρήση αντιβιοτικών (Sommerset et al., 2005). Τα περισσότερα εμπορικά εμβόλια χορηγούνται με ένεση ή εμβάπτιση και περιέχουν αδρανοποιημένη βακτηρίνη ενώ κοινές είναι οι παρασκευές με προσθήκη ανοσοενισχυτικών και τα πολυδύναμα εμβόλια (Adams, 2019; Ma et al., 2019).

Kοινές βακτηριακές ασθένειες που πλήττουν τη μεσογειακή θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια αλλά παρουσιάζουν επίσης, παγκόσμιο ενδιαφέρον (Rodger, 2016) είναι η δονακίωση (Vibrio anguillarum), η φωτοβακτηρίωση/παστερέλωση (Photobacterium damselae subsp. piscicida), η μυξοβακτηρίωση (Tenacibaculum maritimum), η μυκοβακτηρίωση (Mycobacterium marinum) και λοιμώξεις από Pseudomonas spp., Streptococcus iniae, Lactococcus garvieae etc (Colorni, 2004; Ghittino et al., 2003; Öztürk and Altinok, 2014; Rigos and Katharios, 2010; Rodgers and Furones, 1998; Toranzo et al., 2005; Vendramin et al., 2016).

Από τις παραπάνω ασθένειες, τα αδειοδοτημένα στην Ελλάδα εμβόλια για τσιπούρα και λαβράκι αφορούν μόνο τη δονακίωση και τη φωτοβακτηρίωση (Ma et al., 2019; Miccoli et al.). Πειραματικά έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί στο λαβράκι εμβόλια για τη μυξοβακτηρίωση (Khalil et al., 2018; Salati et al., 2005) και μυκοβακτηρίωση (Ravid-Peretz et al., 2019; Ziklo et al., 2018) με αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα. Το μοναδικό εμπορικό εμβόλιο ενάντια στο *T. maritimum,* κυκλοφορεί μόνο στην Ισπανία για το καλκάνι (Romalde et al., 2005), ενώ διεθνώς, δεν υπάρχει εμπορικό εμβόλιο για ψάρια για το *M. marinum*.

Οι λοιμώξεις Aeromonas spp. συνήθως αντιμετωπίζονται με αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος που διατίθενται στην Ελλάδα για χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι η οξυτετρακυκλίνη, η φλουμεκίνη, η αμοξυκιλλίνη, οι ενισχυμένες σουλφοναμίδες και το οξαλινικό οξύ (FEAP, 2009). Στη Μεσόγειο και τη Μαύρη θάλασσα, στελέχη Aeromonas spp. από ιχθυοτροφεία παρουσίασαν ευαισθησία στα περισσότερα από τα εμπορικά διαθέσιμα και κοινώς χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά όπως η φλορφενικόλη, η οξυτετρακυκλίνη και το

οξαλινικό οξύ αλλά ήταν ανθεκτικά σε άλλα όπως την σουλφαμεθοξαζόλη (Scarano et al., 2018; Uzun and Ogut, 2015).

Τα εμπορικά διαθέσιμα εμβόλια για αερομονάδες σε Ευρώπη, ΗΠΑ, Καναδά κλπ., αφορούν μόνο στην πρόληψη της δοθηίνωσης (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) των σολομοειδών (Ma et al., 2019). Στην Κίνα και το Βιετνάμ έχουν αδειοδοτηθεί εμβόλια για την πρόληψη των αιμορραγικών/σηψαιμικών νόσων που προκαλεί το είδος *A.hydrophila* για τα είδη γλυκών νερών *Ctenopharyngodon idella* (grass carp) και *Pangasionodon hypophthalmus* (striped catfish) αντίστοιχα (Brudeseth et al., 2013; Ma et al., 2019). Στην Ελλάδα δεν διατίθενται γενικώς εμβόλια για αερομονάδες (FEAP, 2009; Miccoli et al., 2019; Sommerset et al., 2005). Οι ασθένειες που σχετίζονται με τα κινητά και μεσόφιλα είδη αερομονάδων προλαμβάνονται κυρίως με αυτογενή προϊόντα (Austin and Austin, 2012) δεδομένου ότι η ομάδα περιλαμβάνει διαφορετικά είδη και στελέχη του ίδιου είδους με ποικίλες αντιγονικές ιδιότητες (Janda et al., 1996; Rahman and Kawai, 2000; Stevenson, 1988).

1.7.1. Τύποι εμβολίων στην ιχθυοκαλλιέργεια

Το ιδανικό εμβόλιο πρέπει να προκαλέσει ικανή διέγερση του μη-ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος, έτσι ώστε αυτό να μπορεί να κατευθύνει αποτελεσματικά το ειδικό ανοσοποιητικό στην απενεργοποίηση και απομάκρυνση του παθογόνου και στην ανάπτυξη ανοσολογικής μνήμης. Επιπλέον, το εμβόλιο πρέπει να προστατεύει τα ψάρια για παρατεταμένη περίοδο, με την ελάχιστη δυνατή δόση αντιγόνου, να χορηγείται αποτελεσματικά και με ευκολία, ιδανικά άπαξ και χωρίς να στρεσάρει τα ψάρια.

Τα εμβόλια χορηγούνται κυρίως με ένεση (ενδοπεριτοναϊκά/ενδομυϊκά), με εμβάπτιση σε αραιωμένο διάλυμα εμβολίου ή δια στόματος μέσω της τροφής. Γενικά, η ενέσιμη χορήγηση παρουσιάζει την υψηλότερη αποτελεσματικότητα, προσφέρει μακράς διάρκειας προστασία, εξασφαλίζει δόση ελεγχόμενη και ίδια μεταξύ των ατόμων, ενώ απαιτεί μικρή ποσότητα εμβολίου ανά ψάρι. Ωστόσο, δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ψάρια κάτω των 20 g, στα πρώιμα δηλαδή αναπτυξιακά στάδια των ιχθύων όποτε είναι και περισσότερα ευάλωτα σε παθογόνα. Είναι διαδικασία κοστοβόρα και χρονοβόρα, χρειάζεται εξειδικευμένο προσωπικό για την εφαρμογή της και είναι στρεσογόνος για τα ψάρια (Plant and LaPatra, 2011). Όσον αφορά την καλή διαβίωση των ζώων και το κόστος/δυσκολία χειρισμού, ο εμβολιασμός μέσω του βλεννογόνου, θα ήταν η ιδανική μέθοδος χορήγησης εμβολίων. Η εμβάπτιση (υπερωσμωτική διήθηση, άμεση εμβάπτιση και ψεκασμός) μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μικρά ψάρια (<20 g), μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονα σε μεγάλο αριθμό ιχθύων, δεν στρεσάρει όσο η ένεση, είναι φθηνή και δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό. Απαιτεί ωστόσο μεγάλες ποσότητες εμβολίου, ειδικά για ψάρια μεγάλου μεγέθους και αν και παρέχει καλά επίπεδα προστασίας σε κοινά παθογόνα όπως είδη του γένους *Vibrio*, σε πολλές περιπτώσεις δεν προσφέρει επαρκή προστασία (π.χ. δοθιήνωση) (Evensen, 2009; Sommerset et al., 2005).

Τα εμβόλια που χορηγούνται μέσω της τροφής, προς το παρόν παρέχουν μόνο μικρής διάρκειας προστασία και με αποτελέσματα που ποικίλουν ανάλογα με την περίπτωση. Τα κύρια προβλήματα της μεθόδου σχετίζονται με τον έλεγχο της δοσολογίας καθώς δεν τρώνε όλα τα ψάρια την ίδια ποσότητα και με το ότι το αντιγόνο πέπτεται και αποικοδομείται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπλέον, μέρος της τροφής και του εμβολίου χάνονται στο περιβάλλον και γι' αυτό απαιτείται μεγάλη ποσότητα εμβολίου (Plant and LaPatra, 2011; Sommerset et al., 2005). Αν και λόγω της περιορισμένης αποτελεσματικότητας των τρεχουσών σκευασμάτων τα στοματικά εμβόλια δεν αποτελεσματικότητας των τρεχουσών σκευασμάτων τα στοματικά ευβόλια δεν αποτελούν κοινή πρακτική, υπάρχουν λίγα εμπορικά διαθέσιμα όπως π.χ για το *Lactococcus garvieae* για το μαγιάτικο στη Ιαπωνία ή για τη *Yersinia ruckeri* των σολομοειδών σε ΗΠΑ, Καναδά και Ευρώπη (Brudeseth et al., 2013; Ma et al., 2019).

Προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των εμβολίων που χορηγούνται μέσω του βλεννογόνου δοκιμάζονται διάφορα συστατικά ως φορείς αντιγόνων που είτε αυξάνουν την πρόσδεση του αντιγόνου στους εξωτερικούς βλεννογόνους είτε λειτουργούν προστατευτικά ώστε το αντιγόνο να μπορεί να διασχίσει το πεπτικό σύστημα και να φτάσει στο έντερο όπου θα απορροφηθεί έχοντας αποφευχθεί η αποδόμηση του από τα γαστρικά υγρά (Munang'andu et al., 2015). Στις περιπτώσεις αυτές, το αντιγόνο εσωκλείεται σε κυστίδια πολυμερών υλικών, όπως τα Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) και αλγινικό οξύ, φορτισμένα λιποσώματα κ.α.

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 (Gudding, R., Lillehauga, A., Evensen, 1999). Στην Αμερική διατίθενται ζωντανά εμβόλια για την καταπολέμηση του *Edwarsiella ictaluri* στο γατόψαρο και στη Χιλή, ΗΠΑ και Καναδά (cross-protection of *Arthrobacter* spp.) για την αντιμετώπιση της ηπατικής νέκρωσης των σολομοειδών που προκαλεί το ενδοκυτταρικό βακτήριο *Renibacterium salmoninarum* (Sommerset et al., 2005). Στο Ισραήλ διατίθεται ζωντανό εμβόλιο για του *Herpesvirus* στον κυπρίνο και στις ΗΠΑ για το *Flavobacterium columnaris* σε ψάρια του γλυκού νερού (Ma et al., 2019). Μελέτες έχουν επίσης σε κυπρίνους για την *Α. hydrophila* (Swain et al., 2010), σε zebrafish (*Danio rerio*) για την *Ε. tarda* (Yang et al., 2013) κ.α.

Παρά τις δυνατότητες που προσφέρουν, η αδειοδότηση και χρήση ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων παραμένει περιορισμένη (Ma et al., 2019) εξαιτίας των κινδύνων που σχετίζονται με την εξάπλωση των ζωντανών παθογόνων στο περιβάλλον και σε μη στοχευόμενους οργανισμούς, καθώς και με την πιθανότητα μεταλλάξεων και επαναφοράς της λοιμογόνου δράσεως (Mohd-Aris et al., 2019). Έτσι, αντί των ζωντανών εμβολίων, στην ιχθυοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται ευρέως αντιγόνα σε μορφή αδρανοποιημένης (φορμόλη/θέρμανση) βακτηρίνης (Brudeseth et al., 2013; Ma et al., 2019).

Η ελλιπής προστασία των εμβολίων αδρανοποιημένης βακτηρίνης έναντι της δοθιήνωσης (*A. salmonicida*) των σολομοειδών, οδήγησε μετά τη δεκαετία του '90 στην ανάπτυξη και υιοθέτηση των ενέσιμων εμβολίων, με προσθήκη ελαίων ποικίλης προέλευσης (opuκτά αλλά και φυτικά, ζωικά ή συνθετικά έλαια) ως ανοσοενισχυτικών ουσιών (adjuvants)(Plant and LaPatra, 2011; Sommerset et al., 2005). Αν και φαίνεται να έχουν και αντιγονική δράση αλληλεπιδρώντας με το μη-ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα (Coffman et al., 2010) κατά βάση τα ανοσοενισχυτικά έλαια χρησιμοποιούνται στα εμβόλια παρέχοντας μία δεξαμενή αποθέματος αντιγόνου που επιτρέπει την ελεγχόμενη/σταδιακή απελευθέρωση του, διευκολύνοντας την έκθεση του αντιγόνου στα κύτταρα του ανοσοποιητικού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Wilson-Welder et al., 2009). Η αποτελεσματικότητα τους ποικίλει αναλόγως της προέλευσης τους. Τα ορυκτέλαια χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω του ότι παραμένουν στο σημείο της ένεσης, προκαλώντας φλεγμονή και ανοσολογική αντίδραση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, χαρακτηριστικό που τα καθιστά αποτελεσματικότερα σε σχέση με άλλους τύπους ελαίων (Aucouturier et al., 2001). Παρά τα μειονεκτήματά τους που σχετίζονται παρενέργειες όπως αυτοανοσία και σχηματισμός ορατών αλλοιώσεων στο σημείο της ένεσης (Koppang et al., 2008; Midtlyng, 1996), παρέχουν μακράς διάρκειας προστασία στα ψάρια, μειώνουν τον αριθμό των εμβολιασμών, την ποσότητα του αντιγόνου που χρειάζεται και επιτρέπουν την εμπορευσιμότητα ιχθύων σε μεγαλύτερα μεγέθη (Aucouturier et al., 2001; Sommerset et al., 2005).

Άλλες εκδοχές των αντιγόνων περιλαμβάνουν ολόκληρα διαλυτοποιημένα βακτηριακά κύτταρα ή τμήματα (subunit) του παθογόνου όπως υπερκείμενα καλλιέργειας ή εξωκυττάριες πρωτεΐνες (ECPs) εκχυλίσματα της κυτταρικής επιφάνειας όπως λιποπολυσακχαρίτες (LPS) ή μεμβρανικές πρωτεΐνες (OMPs) και νουκλεικά οξέα (DNA/RNA). Μία παραλλαγή των εμβολίων ζωντανών εξασθενημένων παθογόνων αποτελούν τα εμβόλια ανασυνδυασμένου φορέα (recombinant vector) τα οποία χρησιμοποιούν ένα ασθενές παθογόνο για να παράξει ένα επιλεγμένο αντιγόνουπομονάδα (Barnes, 2017). Μεταξύ αυτών, τα πρωτεϊνικά εμβόλια υπομονάδας για βακτηριακά παθογόνα μελετώνται όλο και περισσότερο για χρήση στης ιχθυοκαλλιέργειες (Maiti et al., 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το είδος *Α. hydrophila* του οποίου η ποικιλότητα δεν έχει επιτρέψει την ανάπτυξη εμπορικού εμβολίου (Maiti et al., 2020; Mzula et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, με την αναγωγή του *Α. veronii* σε σημαντικό παθογόνο στις ιχθυοκαλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί εμβόλια έναντι των ασθενειών που προκαλεί με όλους τους τύπους αντιγόνου που προαναφέρθηκαν, ωστόσο φαίνεται πως υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για εμβόλια υπομονάδας (εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών) και εμβόλια ανασυνδυασμένου φορέα και σε αρκετές περιπτώσεις για τη χορήγηση διά της στοματικής οδού. Τα παραδείγματα αφορούν στην πλειοψηφία τους τον κοινό κυπρίνο (*C. carpio*) καθώς και τα είδη *Oncorhynchus mykiss, Paralabrax maculatofasciatus* και *Misgurnus anguillicaudatus*. Έχουν μελετηθεί εμβόλια αδρανοποιημένης βακτηρίνης (Jiang et al., 2019; Merino-Contreras et al., 2001; Song et al., 2018), κύτταρο ghost (Jiang et al., 2019), ζωντανό εξασθενημένο παθογόνο (Liu et al., 2017; Zhang et al., 2020), εμβόλια εξωκυττάριων προϊόντων και

εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Merino-Contreras et al., 2001; Song et al., 2018), εμβόλια DNA (Gao et al., 2013; Vazquez-Juarez et al., 2005) και τέλος εμβόλια πρωτεϊνών μέσω ανασυνδυασμένου φορέα (Ju et al., 2020; Kong et al., 2019, 2020; Tian et al., 2019; Zhang et al., 2018, 2019).

1.7.2. Αυτεμβόλια στην Ιχθυοκαλλιέργεια

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην αντιμετώπιση των ασθενειών, είναι η έλλειψη αδειοδοτημένων κτηνιατρικών φαρμάκων για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες (FAO, 2011a). Η γενική τάση που επικρατεί είναι ελάττωση της χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών και η ανάπτυξη εμβολίων και άλλων μεθόδων καταπολέμησης. Ωστόσο, παρά την ανάπτυξη των εμβολίων για ψάρια τις τελευταίες δεκαετίες, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλές βακτηριακές ασθένειες, ειδικά για είδη εκτός των σολομοειδών για τις οποίες δεν διατίθενται μέσα πρόληψης όπως τα εμβόλια (Adams, 2019; Pridgeon and Klesius, 2012).

Οι κύριες αιτίες όπως έχουν συνοψιστεί από την Ομοσπονδία Ευρωπαϊκών Παραγωγών Υδατοκαλλιέργειας (FEAP, 2004) περιλαμβάνουν το χρόνο αδειοδότησης, το γεγονός ότι τα έσοδα από τη σχετικά περιορισμένη αγορά των υδατοκαλλιεργειών δεν αποσβαίνουν απαραίτητα το κόστος αδειοδότησης, τις διαφορές μεταξύ των κρατών μελών στην ερμηνεία των κανονισμών που σχετίζονται με την αδειοδότηση, την απαγόρευση της μεταβίβασης των αδειών μεταξύ των κρατών, αλλά και το γεγονός ότι η αγορά φαρμάκων κυριαρχείται από λίγες διεθνείς εταιρίες.

Το έλλειμα αδειδοτημένων εμβολίων για χρήση στην ιχθυοκαλλιέργεια, μπορεί να καλυφθεί από τη χρήση αυτεμβολίων. Τα αυτεμβόλια ανήκουν στην κατηγορία των ανοσολογικών φαρμάκων: «το κτηνιατρικό φάρμακο που προορίζεται για χορήγηση σε ένα ζώο με σκοπό την πρόκληση ενεργητικής ή παθητικής ανοσίας τη διάγνωση του επιπέδου ανοσίας του» και περιγράφονται ως «αδρανοποιημένα ανοσολογικά κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία παράγονται από παθογόνους οργανισμούς και αντιγόνα που λαμβάνονται από ζώο ή ζώα σε επιδημιολογική μονάδα και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του ζώου αυτού ή των ζώων αυτών στην ίδια επιδημιολογική μονάδα ή για τη θεραπεία ζώου ή ζώων σε μια μονάδα όπου έχει επιβεβαιωθεί επιδημιολογική σύνδεση» (Κανονισμός ΕΕ 2019/6).

Ως μια μέθοδος «εξατομικευμένης» προστασίας χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις που δεν διατίθενται εμπορικά εμβόλια για μια συγκεκριμένη νόσο και: «μόνο στα εκεί αναφερόμενα ζώα σε εξαιρετικές περιστάσεις, σύμφωνα με κτηνιατρική συνταγή και μόνο εάν δεν έχει εγκριθεί κανένα ανοσολογικό κτηνιατρικό φάρμακο για το είδος-στόχο και την ένδειξη» (Άρθρο 106, παράγραφος 5, Κανονισμός ΕΕ 2019/6) και εξαιρούνται των προϋποθέσεων αδειοδότησης για τα κτηνιατρικά φάρμακα. Στην Ευρώπη, το νομικό πλαίσιο για την παραγωγή, αδειοδότηση, μεταφορά (εισαγωγή/εξαγωγή) και χρήση τους, επαφίεται στο δίκαιο της κάθε χώρας-μέλους παρουσιάζοντας μεγάλη ετερογένεια ανάμεσά τους (Attia et al., 2013). Στην Ελλάδα, όπως ορίζεται στην ΚΥΑ 282371/2006, άρθρο 4 (ΦΕΚ 731/τ Β') και ακολουθώντας τις ευρωπαϊκές οδηγίες 2001/82/ΕΚ και 2004/28/ΕΚ, τα αυτεμβόλια εξαιρούνται των προϋποθέσεων αδειοδότησης από τον ΕΟΦ και η παραγωγή τους επιτρέπεται σε δημόσια κτηνιατρικά εργαστήρια εφόσον αυτά τηρούν τους κανόνες ορθής παρασκευαστικής πρακτικής (good manufacturing practices-GMP) (βλ. και Ερώτηση 3046/23-10-2013). Ο νέος κανονισμός 2019/6 αναμένεται να τεθεί σε ισχύ από τον Ιανουάριο, 2022.

Ο πρόσφατος Κανονισμός (ΕΕ) 2019/6 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 11ης Δεκεμβρίου 2018, για τα κτηνιατρικά φάρμακα που θεσπίζει τους κανόνες για τη διάθεση στην αγορά, την παρασκευή, την εισαγωγή, την εξαγωγή, τη διάθεση, τη διανομή, τη φαρμακοεπαγρύπνηση, τον έλεγχο και τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων και κατήργησε την οδηγία 2001/82/ΕΚ. Σε αυτόν, εκτιμάται ότι «θα πρέπει να διασφαλιστεί η ποιότητα των κτηνιατρικών φαρμάκων που παράγονται στην Ένωση με την απαίτηση να τηρούν οι παρασκευαστές τις αρχές της ορθής παρασκευαστικής πρακτικής των φαρμάκων». Στον κανονισμό εντάσσονται τα αυτεμβόλια (Άρθρο 2, παράγραφος 3) αλλά προκειμένου να διαφυλαχθεί η ποιότητά τους χωρίς να παρεμποδίζεται η παρασκευή και η διαθεσιμότητα τους, και εφόσον παράγονται με διαφορετικό τρόπο από τα βιομηχανικώς παρασκευαζόμενα προϊόντα, εκτιμάται ότι θα πρέπει να εκπονηθούν λεπτομερείς κατευθυντήριες γραμμές ορθής παρασκευαστικής πρακτικής ειδικά για τα προϊόντα αυτά.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση των σολομοειδών στην Ισλανδία, όπου λόγω απουσίας της δοθίνωσης στην περιοχή, δεν υπήρχαν αδειοδοτημένα εμβόλια *Α. salmonicida* όταν παρουσιάστηκαν λοιμώξεις που

οφείλονταν σε μη-τυπικά στελέχη *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*. Αν και τελικά αποδείχθηκε ότι εμπορικά εμβόλια κατά της δοθηίνωσης (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*) παρείχαν επαρκή διασταυρούμενη προστασία σε κάποια από τα είδη ξενιστών (Atlantic salmon, Atlantic halibut), μέχρι την αδειοδότηση και άλλων προϊόντων το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε με αυτογενή εμβόλια (Gudmundsdóttir and Gudmundsdóttir, 1997).

Επίσης, η ελλιπής εκπροσώπηση της αντιγονικής ποικιλότητας του παθογόνου στα εμπορικά εμβόλια που συνήθως περιλαμβάνουν μικρό αριθμό στελεχών σχετίζεται με μειωμένη αποτελεσματικότητα στο πεδίο και την εμφάνιση εξάρσεων της ασθένειας σε εμβολιασμένα για το παθογόνο ψάρια (Mikkelsen et al., 2007). Στις περιπτώσεις αυτές, η χρήση των τοπικών στελεχών *V. anguillarum* έδωσε υψηλότερα ποσοστά προστασίας στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και στον γάδο (*Gadus morhua*) σε σχέση με το εμπορικό εμβόλιο και ανέδειξε μέσα στον ίδιο ορότυπο τη σημασία της αντιγονικής διαφοροποίησης σε επίπεδο στελέχους (Marana et al., 2019; Mikkelsen et al., 2011).

1.8. Η υπό μελέτη ασθένεια

Η ασθένεια όπως περιγράφεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017) εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 2008 και ακολούθως, η πρώτη έξαρση καταγράφηκε τον Ιούνιο του 2009 σε δύο γειτονικές ιχθυοτροφικές μονάδες λαβρακιού στην περιοχή της Πελοποννήσου, εγκατεστημένες στη θάλασσα. Πρόσβαλλε κατά κύριο λόγο ψάρια εμπορεύσιμου μεγέθους (250-400 g) ενώ μικρότερα ψάρια (<50 g) σε γειτονικούς κλωβούς δεν εμφάνισαν σημάδια ασθένειας. Επίσης, τσιπούρες εκτρεφόμενες σε επηρεάστηκαν. γειτονικούς κλωβούς δεν Νοσηρότητα και θνησιμότητα παρατηρούνται σε θερμοκρασία νερού >18°C αλλά αυξάνονται κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών φτάνοντας στο μέγιστο τον Ιούνιο και τον Ιούλιο (θερμοκρασία νερού: 24-26°C). Η ημερήσια θνησιμότητα είναι σχετικά χαμηλή (0.5%), η αθροιστική όμως θνησιμότητα σε χρονικό διάστημα 3-4 μηνών μπορεί να ανέρχεται στο 17-20% του προσβεβλημένου ιχθυοπληθυσμού εφόσον έχει χορηγηθεί θεραπεία με αντιβιοτικά.

Η κλινική εικόνα των ιχθύων περιλάμβανε λήθαργο, νωθρή κολυμβητική συμπεριφορά, και απώλεια όρεξης. Στα βράγχια είναι εμφανής η αναιμία και σε προχωρημένα στάδια της νόσου τα ψάρια εμφανίζουν ίκτερο που εξωτερικά γίνεται

εμφανής από την υποκίτρινη εικόνα των πτερυγίων αλλά και στον ορό του αίματος (Εικόνα 2 Α-Β). Εξωτερικά άλλα κλινικά σημάδια που σχετίζονται με τη νόσο, είναι ο σκούρος χρωματισμός του δέρματος και ερυθρότητα των πτερυγίων και των βραγχιακών επικαλυμμάτων. Περιστασιακά, εμφανίζονται επιφανειακές επιδερμικές αλλοιώσεις, οι οποίες προοδευτικά μπορεί να γίνονται ελκωτικές και να επεκτείνονται στον υποκείμενο μυϊκό ιστό (Εικόνα 2 Γ-Δ).

Εσωτερικά, τα κύρια όργανα που προσβάλλονται είναι ο νεφρός, ο σπλήνας και το ήπαρ. Παρατηρείται διόγκωση του σπλήνα με πολυάριθμα υπόλευκα οζίδια σε όλη την επιφάνεια του οργάνου (Εικόνα 2 Ε-Ζ). Σε προχωρημένες περιπτώσεις παρατηρείται επίσης διόγκωση του νεφρού με υπόλευκα οζίδια επίσης και την παρουσία εκτεταμένης νέκρωσης στο νεφρικό παρέγχυμα (Εικόνα 2 Η). Στο ήπαρ παρατηρούνται υπόλευκα οζίδια, νεκρωτικές εστίες και διάχυτες αιμορραγίες (Εικόνα 2 Θ). Στην ηπατική βλάβη αποδίδεται η αναιμία και ο ίκτερος που περιγράφηκαν παραπάνω.

Τα ιστολογικά ευρήματα αποκαλύπτουν συστηματική κοκκιωματώδη φλεγμονή εξαιτίας της λοίμωξης. Τυροειδης νέκρωση παρατηρήθηκε στις δερματικές αλλοιώσεις, και καλά οριοθετημένες νεκρωτικές αλλοιώσεις στο ήπαρ (Εικόνα 3 Α-Β). Βακτήρια ήταν ορατά στο νεφρό εντός αλλά και εκτός των κοκκιωμάτων. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία εστιών, ραβδόμορφων, αρνητικών κατά Gram βακτηριών εντός των νεκρωτικών αλλοιώσεων (Εικόνα 3 Γ-Δ). Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχα (acid-fast) βακτήρια στις τομές με χρώση Ziehl-Neelsen.



Εικόνα 2. Α) Ικτερική εμφάνιση νοσούντος λαβρακιού. Β) Κίτρινο χρώμα στον ορό του αίματος που υποδεικνύει ηπατική δυσλειτουργία. Γ) Λαβράκι με ελκώδεις δερματικές αλλοιώσεις. Δ) Ελκώδης επιδερμική αλλοίωση με ορατή κοκκιωματώδη αντίδραση. Ε) Λαβράκι με σπληνομεγαλία. Ζ) Υπόλευκα οζίδια στο σπλήνα Η) Διογκωμένος νεφρός με εκτεταμένες νεκρωτικές αλλοιώσεις Θ) Εστιακές νεκρώσεις στο ήπαρ. Όλες οι εικόνες ανακτήθηκαν από φυσικά μολυσμένα ψάρια και παραχωρήθηκαν από τους κτηνιάτρους της ιχθυοτροφικής μονάδας. Η εικόνα περιλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).



Εικόνα 3. Α) Νεκρωτικές αλλοιώσεις στο ήπαρ (χρώση hematoxylin and eosin, H&E). B) Επιδερμική αλλοίωση που παρουσιάζει εκτεταμένη νέκρωση (H&E). Γ) Κοκκίωμα στο νεφρό με βακτηριακές εστίες στο κέντρο (χρώση polychrome). Δ) Μεγαλύτερη μεγέθυνση της προηγούμενης εικόνας που δείχνει τις εστίες των βακτηριδίων μέσα στο κοκκίωμα. Όλες οι εικόνες ανακτήθηκαν από φυσικά μολυσμένα ψάρια. Οι εικόνες Α-B έχουν παραχωρηθεί από τον κτηνίατρο της ιχθυοτροφικής μονάδας. Η εικόνα περιλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).
1.9 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της εργασίας ήταν να μελετηθεί η αναδυόμενη παθολογία που προκαλεί το είδος Aeromonas veronii bv. sobria σε εκτρεφόμενα λαβράκια στην περιοχή του Αιγαίου πελάγους. Ασθένεια εκτρεφόμενων λαβρακιών οφειλόμενη στο είδος A. veronii περιγράφεται για πρώτη φορά στο λαβράκι. Έγινε προσπάθεια προσέγγισης της προέλευσης της ασθένειας και μελετήθηκαν επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της με σκοπό την εκτίμηση του ρίσκου για την ευρύτερη ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η ποικιλότητα του παθογόνου σε επίπεδο φαινοτύπου, βιοχημικών ιδιοτήτων, γενετικής και γενωμικής πληροφορίας. Εφόσον πρόκειται για νέα παθολογία στην εκτροφή λαβρακιού, στους στόχους συμπεριλήφθηκε η ανάπτυξη πρωτοκόλλου διάγνωσης ασθενειών αερομονάδων. Δεδομένης της έλλειψης εμπορικών εμβολίων για αερομονάδες και στη βάση της βιώσιμης ανάπτυξης της ιχθυοκαλλιέργειας χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών, στους στόχους της εργασίας συμπεριλήφθηκε η ανάπτυξη αυτεμβολίων για την πρόληψη της ασθένειας. Τα εμβόλια αξιολογήθηκαν in vivo και in vitro ώστε να εκτιμηθεί η προοπτική υιοθέτησης τους από τις πληττόμενες ιχθυοτροφικές εκμεταλλεύσεις. Για την ταχύτερη και μεγαλύτερης κλίμακας αξιολόγηση παθογόνων στελεχών για τη χρήση τους σε εμβόλια χρησιμοποιήθηκε και αξιολογήθηκε εναλλακτικός οργανισμός μοντέλο (zebrafish) έναντι του λαβρακιού. Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης των διαδικασιών ανάπτυξης εμβολίων χρησιμοποιήθηκαν καινοτόμες μέθοδοι στην ανάπτυξη εμβολίων σύμφωνα με τις αρχές της αντίστροφης εμβολιολογίας. Η αντιγονική ποικιλότητα αναλύθηκε στη βάση επιλογής στελεχών για ένα εμβόλιο ευρείας χρήσης στην εκτροφή λαβρακιού στο Αιγαίο πέλαγος αλλά και με την προοπτική ανάπτυξης ενός εμβολίου *Α. veronii* για ευρεία χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Συλλογή βακτηρίων και απομόνωση Aeromonas spp.

Η συλλογή των βακτηρίων ξεκίνησε συστηματικά τον Ιούλιο, 2014 και εμπλουτίστηκε έως το Μάρτιο, 2019 με βακτήρια από εκτρεφόμενα σε κλωβούς σε θαλασσινό νερό, άρρωστα λαβράκια. Συμπεριλήφθηκαν δείγματα από περιόδους έξαρσης ασθένειας αλλά και από περιόδους που τα ψάρια δεν εμφάνιζαν κλινικά σημάδια. Στη συλλογή συμπεριλήφθηκαν επίσης, τα στελέχη που σχετίζονται με την περιγραφή της ασθένειας τα οποία απομονώθηκαν το 2009. Οι δειγματοληψίες έγιναν σε ψάρια εμβολιασμένα για τα παθογόνα βακτήρια *V. anguillarum* και *Ph. damselae* subsp. *piscicida* και δεν είχαν δεχτεί φαρμακευτική αγωγή με αντιβιοτικά. Τέλος, συμπεριλήφθηκαν στελέχη από περιστατικά ασθένειας και θνησιμότητας σε είδη ιχθύων του γλυκού νερού και συγκεκριμένα από μονάδα εκτροφής του είδους *Xiphophorus helleri* και του είδους *Danio rerio* (zebrafish).

Το σύνολο των περιοχών από όπου έχουν αντληθεί δεδομένα παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Αυτές περιλαμβάνουν: α) την περιοχή όπου πρωτο-εμφανίστηκε και περιγράφηκε η ασθένεια και β) περιοχές με υποψία ασθένειας από αερομονάδες σύμφωνα με τους κτηνιάτρους των μονάδων εκτροφής. Για λόγους προστασίας ευαίσθητων πληροφοριών και εμπιστευτικότητας δεν μπορούν να δοθούν τα στοιχεία των μονάδων.

Η συλλογή των ιχθύων και βακτηρίων έγινε: α) με επιτόπιες δειγματοληψίες στο πεδίο, β) από ψάρια που στάλθηκαν από τις μονάδες εκτροφής και εξετάστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε και γ) από απομονώσεις των κτηνιάτρων των συνεργαζόμενων μονάδων που στάλθηκαν προς ανάλυση στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

Η απομόνωση βακτηρίων έγινε ασηπτικά από το νεφρό των ιχθύων, σε γενικά (TSA 2%) και εκλεκτικά (AIAA) θρεπτικά μέσα (Πίνακας 1). Το θρεπτικό μέσο AIA χρησιμοποιείται για την εκλεκτική απομόνωση *Enterobacteriaceae* και άλλων παθογόνων που σχετίζονται με εντερικές ασθένειες. Με προθήκη αμπικιλλίνης (AIAA) γίνεται εκλεκτικό για αερομονάδες (συγκεκριμένα *A. hydrophila* από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα) αφού το γένος παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αυτό (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Οι αποικίες των αερομονάδων αναμένεται

να είναι άχρωμες (πράσινες όπως το θρεπτικό) αφού δεν μεταβολίζουν την ξυλόζη (πηγή άνθρακα που περιέχεται στο θρεπτικό). Όλα τα στελέχη που συλλέχθηκαν, συντηρήθηκαν στους -80°C σε ειδικά δοχεία με κεραμικά σφαιρίδια (Microbank, PRO-LAB Diagnostics) κατάλληλα για μακροχρόνια κρυογονική αποθήκευση βακτηρίων.



Εικόνα 4. Η περιοχή μελέτης. Με μάυρο χρώμα συμβολίζονται οι περιοχές δειγματοληψίας σε άρρωστα ψάρια. Ο κόκκινος αστερίσκος σε κύκλο υποδεικνύει την περιοχή που πρωτοεμφανίστηκε και περιγράφηκε η ασθένεια στο λαβράκι. Ο αστερίσκος υποδεικνύει άλλη αναφορά για παρουσία *A.veronii* σε άρρωστα λαβράκια (Uzun and Ogut, 2015).

Καταγράφηκε μακροσκοπικά η κλινική εικόνα των ιχθύων που εξετάστηκαν καθώς και μορφομετρικά γνωρίσματα τους (μήκος και βάρος). Επίσης, συλλέχθηκαν και συντηρήθηκαν ιστοί σε μονιμοποιητικό διάλυμα για ιστολογική εξέταση. Μετά από την αφυδάτωση και εγκλεισμό των ιστών σε ρητίνη, έγινε χρώση των τομών (4 μm) με methylene blue/azure II/basic fucsin (polychrome) σύμφωνα με τους (Bennett et al., 1976).

Για τη μονιμοποίηση των ιστών χρησιμοποιήθηκαν μονιμοποιητικά διαλύματα φορμόλης. Το διάλυμα φορμαλδεΰδης-γλουταραλδεΰδης (4:1), (4F:1G) παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη συνταγή: 23,2 g NaH₂PO₄H₂O, 5,4 g NaOH, 200 ml φορμαλδεΰδης 37%, 80 ml γλουταραλδεΰδης 25%, απιονισμένο νερό μέχρι τα 2 λίτρα. Το ρυθμιστικό διάλυμα ουδέτερης φορμόλης (10% neutral buffered formalin) παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη συνταγή: 10 ml φορμαλδεΰδης 37%, 0.8 g Nacl, 0.4 g KH₂PO₄, 0.65 g Na₂HPO₄, απιονισμένο νερό μέχρι τα 100 ml. Και τα δύο διαλύματα χρησιμοποιούνται εξίσου στη μονιμοποίηση ιστών για ιστολογία, ενώ το διάλυμα 4F:1G χρησιμοποιείται και ως συντηρητικό δειγμάτων που προορίζονται για ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Θρεπτικό υπόστρωμα (σύσταση και ρευστότητα)	Συντομογραφία
Aeromonas Isolation agar + Ampicillin (στερεό)	AIAA
Εμπορικό σκεύασμα (Difco) + Απιονισμένο Η2Ο	
Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (στερεό)	TCBS
Εμπορικό σκεύασμα (Difco) + Απιονισμένο Η2Ο	
Tryptone Soy Agar (στερεό)	TSA 0.5%, 2%
Tryptone Soy (0,5% NaCl) + NaCl (0%, 1,5%) + άγαρ 1.5% + Απιονισμένο H₂O	
Tryptone Soy Broth (υγρό)	TSB 0.5%, 2%
Tryptone Soy (0,5% NaCl) + NaCl (0%, 1,5%) + Απιονισμένο Η₂Ο	
Blood Agar (στερεό)	BA
Blood Agar Base + Αίμα λαβρακιού 5% + άγαρ 1.5% + Απιονισμένο Η $_2$ Ο	
Müller-Hinton Agar (στερεό)	MHA 0.5%
Müller-Hinton + NaCl 0,5% + άγαρ 1.5% + Απιονισμένο H ₂ O	
Müller-Hinton broth (υγρό)	MHB 0.5%
Müller-Hinton + NaCl 0,5% + Απιονισμένο Η2Ο	
Motility Indole Ornithine Medium	MIO
Εμπορικό σκεύασμα (Merck) + Απιονισμένο Η2Ο	

Πίνακας 1. Θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.2. Μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση Aeromonas spp.

Από την παραπάνω διαδικασία συλλογής προέκυψε ένας αριθμός βακτηριακών στελεχών αγνώστου είδους. Ακολούθησε επιλεκτική διαλογή των απομονωμένων στελεχών με στόχο το γένος *Aeromonas*. Η ταυτοποίηση βασίστηκε στη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Η διαδικασία που υιοθετήθηκε περιλάμβανε:

1) Την επιλογή των στελεχών που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο ΑΙΑΑ.

 Ανίχνευση αερομονάδων μέσω PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για το γένος Aeromonas, για τη δια-γονιδιακή (intergenic spacer) περιοχή 16S-23S rRNA (IGS) (Kong et al., 1999).

3) Ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους μέσω PCR με χρήση ειδικών εκκινητών για το γένος *Aeromonas*, του γονιδίου της εξωκυτταρικής λιπάσης: Glycerophospholipid-cholesterol acyltransferase (GCAT) (Chacon et al., 2002).

4) Ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους στελεχών που βρέθηκαν θετικά στο Aeromonas-IGS ή/και στο GCAT με αλληλούχιση των γονιδίων οικιακής οικονομίας 16S rRNA (Lane, 1991) και *gyrB* (Yanez et al., 2003) και σύγκριση των αλληλουχιών με BLAST στην GenBank, NCBI.

Η εξαγωγή ολικού γενωμικού DNA έγινε με τη μέθοδο του βρασμού. Πιο αναλυτικά, υγρό θρεπτικό (1 ml) TSB 0.5% εμβολιάστηκε με μοναδική αποικία, φρέσκιας (48 ωρών) καλλιέργειας σε άγαρ. Έγινε επώαση 16-18 ωρών (overnight) στους 25°C και ακολούθως φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C). Το ίζημα ξεπλύθηκε σε 1 ml ορού και φυγοκεντρήθηκε όπως παραπάνω. Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα διαλύθηκε σε 100 μl διπλά αποσταγμένο νερό. Ακολούθησε βρασμός για 10 min και φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε καθαρό eppendorf και αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Όλες οι αντιδράσεις PCR 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 διπλά αποσταγμένο H₂O. Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν σε Bio-Rad MJ Mini Personal Thermal Cycler. Τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν σε γέλη αγαρόζης με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Τα ζεύγη εκκινητών (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακας 2. Οι συνθήκες της PCR για κάθε γονίδιο παρουσιάζονται στον Πίνακας 3.

Γονίδιο	Ζεύγη εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πηγή
IGS-23S	Aero-F	GGAAACTTCTTGGCGAAAAC	550	(Kong et al., 1999)
	Aero-R	GGTTCTTTTCGCCTTTCCCT		
GCAT	GCAT-F	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	237	(Chacon et al., 2002)
	GCAT-R	GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT		
gyrB	gyrB3F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1100	(Yanez et al., 2003)
	gyrB7F	GGGGTCTACTGCTTCACCAA		
	gyrB9R	ACCTTGACGGAGATAACGGC		
	gyrB14R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC		
16S	Bac27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1450	(Lane, 1991)
	518F	CCAGCAGCCGCGGTAATACG		
	800R	TACCAGGGTATCTAATCC		
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		

Πίνακας 2. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τον πολλαπλασιασμό γονιδίων με τη μέθοδο της PCR.

Χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση και αλληλουχήθηκαν τα γονίδια *gyr*B και 16S rRNA. Η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους έγινε με τυχαία επιλογή για 1-7 στελέχη/δειγματοληψία/χρονική στιγμή και ανάλογα με το συνολικό διαθέσιμο αριθμό στελεχών. Οι PCR πραγματοποιήθηκαν όπως παραπάνω και 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, σε αυτοματοποιημένη συσκευή αλληλούχισης. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν με άλλες αλληλουχίες με τους αλγόριθμους του BLAST στη βάση δεδομένων GenBank, NCBI. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων των στελεχών με άλλα, του ίδιου γένους.

Ενεργοποίηση πολυμεράσης	Αποδιάταξη (denaturation)	Αναδιάταξη (annealing)	Επιμήκυνση (extension)	Τελική Επιμήκυνση
IGS-23S				
0.4%	94°C	60°C	72°C	72%
94 C	1 min	1 min	1 min	72 C
2 11111		35 cycles		3 11111
GCAT-F				
	94°C	65°C	72°C	72%
95 C	1 min	1 min	1 min	72 C
3 min		35 cycles		- 5 min
gyrB/16S				
0.4%C	94°C	55°C	72°C	72%
94 C	30′′	30"	1 min	72 C
3 min		35 cycles		- TO MIN

Πίνακας 3. Οι συνθήκες της PCR για κάθε γονίδιο.

Φυλογενετικές αναλύσεις

Στις φυλογενετικές αναλύσεις για το γονίδιο *gyr*B συμπεριλήφθηκαν, εκτός από τα υπό μελέτη στελέχη, όλα τα μέχρι τώρα περιγεγραμμένα είδη του γένους *Aeromonas* βάσει των τυπικών στελεχών (type strains) στα οποία έχει βασιστεί η περιγραφή του είδους, καθώς και ένα ακόμα στέλεχος *A. veronii* (Ae4) που έχει απομονωθεί από άρρωστο λαβράκι στην Ιταλία (Martino et al., 2011). Για το γονίδιο 16S, συμπεριλήφθηκαν μόνο τα είδη που περιλαμβάνονται στη 2^η έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Εκτός από τις αλληλουχίες που παρήχθησαν στα πλαίσια της εργασίας, οι υπόλοιπες προέρχονται από τη βάση δεδομένων GenBank, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (Πίνακας 4). Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Clustal W (Thompson et al., 1994). Οι γενετικές αποστάσεις εκτιμήθηκαν, και οι φυλογενετικές αναλύσεις με ανάλυση σύνδεσης γειτόνων (Neighbor joining, NJ) (Saitou and Nei, 1987) διεξήχθησαν στο MEGA X (Kumar et al., 2018) υπό το Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Η στατιστική υποστήριξη των κλάδων ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap με 1000 επαναλήψεις

•

Species	Strain		gyrB	165
A. allosaccharophila	CECT 4199	(T)	AY101777.1	NR 025945.2
A. aquatica	CECT 8025	(T)	HG970927.1	
A. aquatilis	AE207		LT630723.1	
A. australiensis	CECT 8023	(T)	NZ CDDH00000000.1	
A. bestiarum	CECT 4227/CIP 7430	(T)	JN711732.1	NR 026089.2
A. bivalvium	868E	(T)	EF465525.1	
A. cavernicola	MDC 2508		HQ442702.1	
A. caviae (punctata)	CECT 838/ATCC 15468	(T)	AY101783.1	NR 029252.1
A. crassostreae	AOSE3-14A		LT630719.1	
A. dhakensis	CIP 107500	(T)	NZ_CDBH0000000.1	
A. diversa (group 501)	CDC 2478-85/CECT 4254	(T)	GU062400.1	GQ365710.1
A. encheleia	CECT 4342/A 1881*	(T)	AY101799.1	NR 041962.1
A. enterica	113634		LT630718.1	
A. enteropelogenes (trota)	CECT 4487/DSM 6394	(T)	EF465526.1	NR 044846.1
A. eucrenophila	CECT 4224/NCMB 74	(T)	HQ442657.1	X60411.2
A. finlandensis	CECT 8028	(T)	HG970923.1	
A. fluvialis	717	(T)	FJ603455.1	
A. hydrophila subsp. hydrophila	CECT 839/ATCC 7966	(T)	JN711776.1	NR 043638.1
A. hydrophila subsp. ranae	CIP 107985	(T)	AM262162.1	
A. intestinalis	1178C		LT630717.1	
A. jandaei	ATCC 49568/CDC 0787-80	(T)	AJ868391.1	NR 037013.2
A. lacus	CECT 8024	(T)	HG970925.1	
A. lusitana	MDC 2473	(T)	HQ442676.1	
A. media	CECT 4232/RM	(T)	AY101782.1	NR 036911.2

Πίνακας 4. Συστηματική κατάταξη, αριθμός της συλλογής από όπου προέρχεται κάθε στέλεχος και οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών στη GenBank για τα στελέχη Aeromonas spp. που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Η ένδειξη (Τ) αναφέρεται στα τυπικά στελέχη.

A. molluscorum	848T	(T)	AM179827.1	
A. piscicola	S1.2	(T)	JN711765.1	
A. popoffii	LMG 17541	(T)	JN711769.1	NR 025317.1
A. rivipollensis	P2G1	(T)	HG799676.1	
A. rivuli	DSM 22539	(T)	FJ969434.1	
A. salmonicida subsp. achromogenes	LMG 14900/6263/4/5	(T)	JN711856.1	NR 037011.1
A. salmonicida subsp. masoucida	CIP 103210/JCM 7873	(T)	JN711857.1	NR 040829.1
A. salmonicida subsp. pectinolytica	DSM 12609	(T)	AM262158.1	
A. salmonicida subsp. salmonicida	CECT 894	(T)	JN711820.1	NR 043324.1
A. salmonicida subsp. smithia	CIP 104757/AS20/1/1	(T)	JN711858.1	NR 025295.1
A. sanarellii	A2-67	(T)	FJ807277.1	
A. schubertii	ATCC 43700/CDC 2446-81	(T)	AJ868402.1	NR 037014.2
A. simiae	CIP 107798	(T)	AJ632224.1	
A. sobria	CECT 4245/208	(T)	AY101781.1	NR 037012.2
A. taiwanensis	A2-50	(T)	FJ807272.1	
A. tecta	F518	(T)	AJ964952.1	
A. veronii biovar veronii	CECT 4257/ ATCC 35624	(T)	AY101795.1	X60414
A. veronii biovar veronii	AER397		HM584516.1	
A. veronii biovar sobria	CECT 4246/ATCC 9071		AY987514.1	AY987748.1
A. veronii biovar sobria	AER39		HM584517.1	
A. veronii	B565		CP002607.1	
A. veronii	Ae4		JF323096.1	
Aeromonas sp. HG11	ATCC 35941	(T)	AJ964951.1	X60417.1

2.3. Χαρακτηρισμός βακτηρίων

2.3.1. Μορφολογία αποικιών και χαρακτηριστικά αύξησης

Η μορφολογία των αποικιών παρατηρήθηκε έπειτα από επώαση 24 και 48 ωρών στους 25°C σε AIAA και TSA 0.5%. Έγινε χρώση κατά Gram, και παρατηρήθηκε η κινητικότητα των στελεχών στο μικροσκόπιο και στο ειδικό για την κινητικότητα θρεπτικό μέσο MIO. Η παραγωγή χρωστικής ελέγχθηκε σε TSA 0.5%. και MHA 0.5% μετά από επώαση 24-72 ωρών στους 25°C και ομοίως στα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά (TSB και MHB 0.5%) μετά από επώαση 7 ημερών. Τα τυπικά στελέχη (type strains) συλλογής LMG 3785 (*A. veronii* bv. *sobria*) και LMG 9075 (*A. veronii* bv. *veronii*) χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες (control) στις βιοχημικές και φαινοτυπικές δοκιμασίες χαρακτηρισμού.

2.3.2. Μορφολογία κυττάρων - Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Η μορφολογία των βακτηρίων μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία με μικροσκοπία διέλευσης (transmission electron microscopy, TEM) και σάρωσης (scanning electron microscopy, SEM) στη Μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας "Βασίλης Γαλανόπουλος", Τμ. Βιολογίας, Παν. Κρήτης. Για την παρατήρηση χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες σε εκθετική φάση αύξησης (επώαση 6 ωρών, TSB 0.5%). Για τη μικροσκοπία διέλευσης η βακτηριακή καλλιέργεια διατηρήθηκε σε διάλυμα 2,5% γλουταραλδεΰδης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffer) και έγινε αρνητική χρώση (negative stain) των βακτηρίων με χρήση 4% (w/v) οξικού ουρανύλιου (uranyl acetate) (pH 7.2). Η παρατήρηση έγινε σε μικροσκόπιο διέλευσης JOEL JEM2100 στα 80 kV. Για τη μικροσκοπία σάρωσης τα βακτήρια πλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα κακοϋλικού νατρίου (sodium cacodylate buffer), μονιμοποιήθηκαν με OsO4 και αφυδατώθηκαν με διαδοχικά αυξανόμενη αλκοόλη, τοποθετήθηκαν σε στέλεχος και επικαλύφθηκαν με ψεκασμό με χρυσό-παλλάδιο. Η παρατήρηση έγινε σε μικροσκόπιο σάρωσης JEOL JSM-6390LV στα 20 kV. Δόθηκε έμφαση στην παρατήρηση κυτταρικών δομών που σχετίζονται με την κινητικότητα και την πρόσδεση των βακτηρίων όπως μαστίγια (flagellum) ή βλεφαρίδες (cilia), κροσσοί (fimbriae) και σμήριγγες (pili).

2.3.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

Για τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά κιτ ταυτοποίησης API 20E και Biolog GEN III MicroPlate (Biolog). Το API 20E περιλαμβάνει 21 υποστρώματα και το Biolog 96 υποστρώματα που αντιστοιχούν σε αντιδράσεις μεταβολισμού πηγών άνθρακα και χημικής ευαισθησίας. Οι αντιδράσεις αναλόγως της αλλαγής χρώματος των υποστρωμάτων ταξινομούνται ως θετικές (+), αρνητικές (-) ή ενδιάμεσες (I=intermediate) και στα δύο συστήματα. Τα δύο συστήματα ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκαν μόνο για χαρακτηρισμό και σύγκριση των διαφορετικών στελεχών και όχι για ταυτοποίηση.

Χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό εναιώρημα στα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα, αφότου προσδιορίστηκε η θολερότητά τους ανάλογα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Η επώαση έγινε στους 25°C. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε στις 24 h για το API 20E και για το Biolog στις 48 αναλόγως με τις οδηγίες. Η παρουσία του ενζύμου της καταλάσης ελέγχθηκε με 3% H₂O₂ σε φρέσκια στερεή καλλιέργεια βακτηρίου σε TSA 0.5% στους 25°C. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν άμεσα. Τα τυπικά στελέχη (type strains) συλλογής LMG 3785 (*A. veronii* bv. *sobria*) και LMG 9075 (*A. veronii* bv. veronii) χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες (control) στις βιοχημικές και φαινοτυπικές δοκιμασίες χαρακτηρισμού.

2.3.4. Αιμολυτική ικανότητα σε στερεό θρεπτικό

Η αιμολυτική ικανότητα των βακτηρίων ελέγχθηκε σε αίμα λαβρακιού από ψάρια εκτρεφόμενα στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Χρησιμοποιήθηκε ειδικό στερεό θρεπτικό (ΒΑ) και αίμα σε συγκέντρωση 5% (v/v). Η αιμολυτική δραστικότητα ελέγχθηκε σε θερμοκρασία 25°C μετά από επώαση 24-48 ωρών.

2.3.5. Ιεραρχική ανάλυση συστάδων

Οι μορφολογικοί και βιοχημικοί χαρακτήρες που μελετήθηκαν συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων των API 20E και BIOLOG, της κινητικότητας, παραγωγής χρωστικής και αιμολυτική ικανότητα (119 χαρακτήρες) χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή Ιεραρχικής ανάλυση συστάδων. Η Ιεραρχική ανάλυση συστάδων (Hierarchical Cluster analysis) διεξήχθη με το πρόγραμμα στατιστικών αναλύσεων IBM SPSS Statistics, χρησιμοποιώντας την μεταξύ-ομάδων (between-groups) μέθοδο σύνδεσης (linkage) και για τις αποστάσεις τη χ² ανάλυση.

2.3.6. Απόκριση σε αντιβιοτικά

Συνολικά ελέγχθηκε η ευαισθησία σε επτά αντιβιοτικά που αντιστοιχούν στις κινολόνες (Quinolones): φλουμεκίνη (Flumequine, UB: Quinolones) και οξιλινικό οξύ (Oxolinic acid, OA), στον αναστολέα της οδού φυλλικού οξέος (Folate pathway Inhibitors): τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (Sulphamethoxazole/Trimethoprim, SXT), στις τετρακυκλίνες (Tetracyclines): οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline, OT), και τετρακυκλίνη (Tetracycline, TE), στην πενικιλίνη βήτα-λακτάμης (Beta-lactam penicillins): αμπικιλλίνη (Ampicillin, AMP) και τέλος στη φλορφενικόλη (Florfenicol, FFC), εκ των οποίων τα τέσσερα πρώτα είναι αδειοδοτημένα για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα (FEAP, 2009). Ελέγχθηκε επίσης, η ευαισθησία στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine) (150 μg) που χρησιμοποιείται για την ταξινομική διάκριση των *Vibrio* spp. από άλλα αρνητικά κατά Gram, θετικά για την οξειδάση βακτήρια όπως οι αερομονάδες που όμως είναι κατά κανόνα ανθεκτικές σε αυτόν (Abbott et al., 2003; Martin-Carnahan and Joseph, 2005).

Η ευαισθησία στους χημικούς παράγοντες ελέγχθηκε με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων (disk diffusion) (Bauer et al., 1966) με χρήση εμπορικών δισκίων 6-mm (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) σε στερεό θρεπτικό MHA 0.5%. Ακολουθήθηκε η διαδικασία με βάση τις προδιαγραφές (CLSI, 2006), με κάποιες τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε φρέσκια βακτηριακή καλλιέργεια σε στατική φάση ανάπτυξης (16-18 ωρών) και η συγκέντρωση των κυττάρων προσδιορίστηκε φωτομετρικά και με άμεση μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με τη χρήση ειδικής πλάκας κυτταρομετρίας (Neubauer) στα ~3×10⁸ cfu ml⁻¹ (OD₆₀₀ = 0.750). Το βακτηριακό εναιώρημα επιστρώθηκε ασηπτικά με μπατονέτα στο MHA. Αφού αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθετήθηκαν τα δισκία των αντιβιοτικών. Ακολούθησε επώαση 48 ωρών στους 22-25°C και μετρήθηκε η διάμετρος του δακτυλίου αναστολής.

Η απόκριση προσδιορίστηκε σχετικά-σε σύγκριση με άλλα Enterobacteriaceae (CLSI, 2016, 2010) αφού δεν έχουν οριστεί σαφή κριτήρια για τις αερομονάδες (Scarano et al. 2018; Lamy et al. 2012; Baron et al. 2017; Aravena-Roman et al. 2012). Δακτύλιοι αναστολής \leq 13 (AMP), \leq 12 (TE, OT), \leq 10 (SXT), \leq 12 (OA, UB) και \leq 12 (FFC)

καταγράφηκαν ως ανθεκτικότητα (resistance, R). Δακτύλιοι αναστολής \geq 17 (AMP), \geq 16 (TE, OT), \geq 16 (SXT), \geq 24 (OA, UB) και \geq 18 (FFC) καταγράφηκαν ως ευαισθησία (susceptibility, S). Οι ενδιάμεσου μεγέθους δακτύλιοι καταγράφηκαν ως μέτρια ευαισθησία/ανθεκτικότητα (intermediate, I).

2.4. Αλληλούχιση νέας γενιάς

Επιλέχθηκαν για αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος 10 στελέχη από τη συλλογή που περιγράφεται παραπάνω. Η επιλογή τους έγινε με βάση τη γεωγραφική προέλευση, το χρόνο απομόνωσης, τις διαφορετικές ιχθυοτροφικές μονάδες, τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και τέλος τον ξενιστή (Πίνακας 5).

Στέλεχος	Περιοχή	Τοποθεσία (Ιχθ. Μονάδα)	Ξενιστής	Ημ/νία απομόνωσης	Κινητικότητα	Χρωστική
NS	W	Αργολικός (1-2)	D. labrax	2009 (*)	-	-
PDB	W	Αργολικός (1-2)	D. labrax	2009 (*)	+	+
NS 2	W	Αργολικός (1-2)	D. labrax	2015	+	+
NS 6.15.2	W	Αργολικός (1-2)	D. labrax	2015	+	+
NS 13	W	Αργολικός (3)	D. labrax	2015	-	-
NS 22	W	Αργολικός (1-2)	D. labrax	2016	+	+
AG 5.28.6	E	Αγαθονήσι (5)	D. labrax	2015	+	I.
VCK 1	E	Κάλυμνος (6)	D. labrax	2015	+	I
BIOO50A	E	Güllück (7)	D. labrax	2010	+	I
XU 1	other	Ξάνθη (9)	X. helleri	2015	+	-

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων για αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος στελεχών.

W: Δυτικό Αιγαίο, Ε: Ανατολικό Αιγαίο, (+): Θετική αντίδραση, (-): Αρνητική αντίδραση, Ι: Μέτρια παραγωγή χρωστικής, (*): (Smyrli et al., 2017)

Έγινε αλληλούχιση νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) τύπου paired-end, χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Illumina MiSeq (Illumina, Inc.) από την Omega Bioservices. Η συναρμολόγηση (assembly) των τμημάτων των γονιδιωμάτων έγινε *de novo*, με χρήση του MaSuRCA (Maryland Super Read Cabog Assembler) Genome Assembler (Zimin et al., 2013). Η ποιοτική εκτίμηση της συναρμολόγησης έγινε με το πρόγραμμα BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) (Simão et al., 2015). Ο εντοπισμός/ταυτοποίηση (annotation) γονιδίων και κωδικών περιοχών έγινε μέσω της πλατφόρμας NCBI PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) (Tatusova et al., 2016) και στο RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) (Aziz et al., 2008).

2.4.1. Πολυτοπική τυποποίηση αλληλουχίας

Η ανάλυση πολυτοπικής τυποποίησης αλληλουχίας (Multilocus sequence typing, MLST) βασίστηκε στη διαδικτυακή (Web-based) βάση αλληλουχιών PubMLST (<u>https://pubmlst.org/aeromonas/</u>) (Jolley et al., 2018; Martino et al., 2011). Η πλατφόρμα βασίζεται και περιλαμβάνει αλληλουχίες των έξι γονιδίων οικιακής οικονομίας: το γονίδιο για το ένζυμο DNA gyrase B (gyrB), για την 60 kDa σαπερόνη (60 kDa chaperonin, *groL*), για τη συνθάση κιτρικού (Citrate synthase, *gltA*), για τη μεθειονίνη-tRNA λιγάση (Methionine-tRNA ligase, *met*G), για τη συνθάση φωσφοενολο-πυρουβικού (Phosphoenolpyruvate synthase, *pps*A) και για την πρωτεΐνη RecA (πολλαπλούς ρόλους, *rec*A).

Αλληλόμορφα έξι γενετικών τόπων (gyrB, groL, gltA, metG, ppsA, and recA) εντοπίστηκαν στα δέκα γονιδιώματα υπό ανάλυση και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα στη βάση PUBMLST (<u>https://pubmlst.org/aeromonas/</u>) (Jolley et al., 2018; Martino et al., 2011). Οι τύποι αλληλουχίας (sequence type, ST) των αλληλομόρφων των έξι γενετικών τόπων που εξετάστηκαν συνέθεσαν το αλληλικό προφίλ (ST profile) κάθε στελέχους το οποίο συγκρίθηκε με άλλα 645 διαφορετικά προφίλ που ήταν διαθέσιμα στη βάση (Ιούλιος, 2019).

Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε η πλήρης (complete) γονιδιακή αλληλουχία των έξι γενετικών τόπων, όπως εντοπίστηκε στα γονιδιώματα για την α) εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των υπό ανάλυση *A. veronii* με το στέλεχος B565 και β) διεξαγωγή φυλογενετικής ανάλυσης σύνδεσης γειτόνων (Neighbor joining, NJ) μετά από συναλύσωση (concatenation). Η ανάλυση διεξήχθη με το πρόγραμμα MEGA X (Kumar et al., 2018) υπό το Tamura-Nei (Tamura and Nei, 1993) μοντέλο νουκλεοτιδικής υποκατάστασης. Η στατιστική υποστήριξη των κλάδων ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap με 1000 επαναλήψεις.

2.4.2. Σύγκριση ολικού γονιδιώματος

Η ομοιότητα των γονιδιωμάτων των δέκα στελεχών *Α. veronii* μεταξύ τους και με άλλα στελέχη *Aeromonas* spp. προσεγγίστηκε με τη χρήση μεθόδου σύγκρισης της αλληλουχίας ορθόλογων γονιδιωματικών τμημάτων και τον υπολογισμό της μέσης ομοιότητας γονιδιωμάτων: Average Nucleotide Identity by Orthology (Lee et al., 2016) με το πρόγραμμα Ortho-ANI. Συγκρίσεις έγιναν επίσης με άλλα γονιδιώματα *Α. veronii* από διαφορετικούς ξενιστές, περιοχές και πηγές απομόνωσης χρησιμοποιώντας τα στελέχη NS και VCK 1 από το λαβράκι ως τυχαία επιλεγμένους εκπροσώπους για κάθε γεωγραφική περιοχή (Ανατολικό/Δυτικό Αιγαίο). Από το είδος *Α. veronii* συγκρίσεις έγιναν μεταξύ άλλων και με το στέλεχος XU 1 που περιγράφεται εδώ, και περαιτέρω με άλλα είδη του γένους με τα στελέχη A449 για το είδος *Α. salmonicida* subsp. *salmonicida* και το τυπικό στέλεχος ATCC 7966 για το *Α. hydrophila* subsp. *hydrophila*.

2.4.3. Σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί

Η ανάλυση σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) έγινε σύμφωνα με τους Bartkova et al., 2017 στα εννέα στελέχη από λαβράκι. Τα SNPs προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CSI phylogeny (Kaas et al., 2014; Leekitcharoenphon et al., 2012) διαθέσιμο στη διαδικτυακή πλατφόρμα του Center for Genomic Epidemiology (<u>www.genomicepidemiology.org</u>). Τα γονιδιωματικά τμήματα (paired-end reads) των εννέα στελεχών λαβρακιού χαρτογραφήθηκαν (mapped) στο χρωμόσωμα αναφοράς του στελέχους B565.

Τα SNPs προσδιορίστηκαν εφόσον πληρούνταν τα ακόλουθα κριτήρια: (1) ελάχιστη απόσταση 10 bp μεταξύ κάθε SNP, (2) ελάχιστο 10% του σχετικού βάθους στις θέσεις SNP, (3) η ποιότητα χαρτογράφησης ήταν πάνω από 25, (4) η ποιότητα SNPs ήταν μεγαλύτερη από 30, και (5) αποκλείονταν οι διαγραφές/προσθήκες βάσεων (indels). Τα SNPs των εννέα γονιδιωμάτων υποβλήθηκαν μετά από συναλύσωση (κατ' αντιστοιχία της θέσης του γονιδιώματος αναφοράς) σε ανάλυση μέγιστης πιθανόφάνειας (maximum likelihood analysis, ML) χρησιμοποιώντας MEGA X.

2.4.4. Αντιγονική ποικιλότητα – Αντίστροφη εμβολιολογία

Το αντιγονικό προφίλ των δέκα στελεχών *Α. veronii* που μελετήθηκαν εδώ, βασίστηκε στον εντοπισμό γονιδίων πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (outer membrane proteins, OMPs). Μελετήθηκε αρχικά, το πρωτέωμα (όπως προβλέφθηκε από τη γονιδιωματική ανάλυση) ενός στελέχους από λαβράκι (VCK 1) που επιλέχθηκε τυχαία ανάμεσα στα άλλα. Η ανίχνευση μεμβρανικών πρωτεϊνών βασίστηκε σε μία σειρά αναλύσεων μέχρις ότου να καταλήξουμε σε ένα σύνολο πρωτεϊνών με αυξημένη πιθανότητα να τοποθετούνται στην εξωτερική μεμβράνη, οι οποίες τελικά συγκρίθηκαν μεταξύ όλων των υπό μελέτη στελεχών. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε βασίστηκε στις αρχές της αντίστροφης εμβολιολογίας (Reverse Vaccinology) και τη μεθοδολογία που έχει ακολουθηθεί για το *Ph. damselae* subsp. *piscicida* (Andreoni et al., 2016) με σκοπό στη συγκεκριμένη εργασία την επιλογή στελεχών (αντί πρωτεϊνών) για την ανάπτυξη εμβολίου.

Το πρωτέωμα του στελέχους VCK 1 αναλύθηκε αρχικά με το πρόγραμμα PSORTb v.3.0, ένα εργαλείο εντοπισμού της θέσης των πρωτεϊνών σε υποκυτταρικό επίπεδο (Yu et al., 2010). Ακολούθως, οι πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν στην εξωτερική μεμβράνη αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Signal IP v.5 (Almagro Armenteros et al., 2019) προκειμένου να ανιχνευθούν σε αυτές πεπτίδια σήματος (και θέσεις διάσπασης πρωτεϊνών) που στοχεύουν την εξωτερική μεμβράνη. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα TOPCONS2 για την πρόβλεψη της τοπολογίας διαμεμβρανικών πρωτεϊνών α-έλικας (alpha-helical) (Tsirigos et al., 2015) και το πρόγραμμα PRED-TMBB2 για την πρόβλεψη β-πτυχωτών επιφανειών (beta-barrel) (Tsirigos et al., 2016).

Το σύνολο των OMPs που ταυτοποιήθηκαν με την παραπάνω διαδικασία για το στέλεχος VCK 1, εντοπίστηκαν και στα υπόλοιπα στελέχη *A. veronii* από το λαβράκι καθώς και στα στελέχη XU 1 και B565 μέσω χαρτογράφησης στο πρόγραμμα Geneious v.9.1.6. Έγινε σύγκριση μεταξύ των πρωτεϊνών μορφής beta-barrel ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη. Επιλέχθηκαν για σύγκριση οι πρωτεΐνες με δομή beta-barrel δεδομένου ότι σε αντίθεση με τις alpha-helical, αυτές εντοπίζονται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη, σχετιζόμενη με αντιγονική ποιότητα. Η ομοιότητα των πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών στελεχών υπολογίστηκε στο Geneious με τη χρήση πρωτεϊνικής απόστασης μετά από στοίχιση (alignment) των αμινοξικών αλληλουχιών με τον αλγόριθμο MUSCLE (Edgar, 2004).

Έγινε επίσης προσπάθεια εντοπισμού της γονιδιακής συστάδας (gene cluster) που καθορίζει τους ορότυπους των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αναφερόμενης ως O-antigen. Ο εντοπισμός έγινε χειροκίνητα με τη χρήση πρότυπων αλληλουχιών του Oantigen, εκατέρωθεν των γονιδίων οικιακής οικονομίας acrB ή/και oprM όπως έχει περιγραφεί στο το είδος *A. hydrophila* (Cao et al., 2018; Hossain et al., 2013; Jimenez et al., 2008; Zhang et al., 2002). Και εδώ ο εντοπισμός έγινε αρχικά σε ένα από τα στελέχη από λαβράκι (VCK 1) και ακολούθως στα υπόλοιπα. Στην περίπτωση του cluster του Oantigen δεν ελέγχθηκαν οι γενετικές και αμινοξικές αποστάσεις αλλά η γονιδιακή σύσταση και συνταίνια (synteny). Οι αλληλουχίες O-antigen των στελεχών λαβρακιού συγκρίθηκαν μεταξύ τους και με άλλα στελέχη *Α. veronii*.

2.5. Μελέτη λοιμογονικότητας in vivo

Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης ότι μια ασθένεια οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό χρειάζεται να πληρωθεί το αξίωμα του Koch (Koch's postulate), πρέπει δηλαδή να:

1. απομονωθεί ο μικροοργανισμός από ασθενές άτομο

2. καλλιεργηθεί σε καθαρή καλλιέργεια στο εργαστήριο

 μολυνθούν άτομα υγιή με τον μικροοργανισμό, τα οποία πρέπει να εμφανίσουν τα συμπτώματα της ασθένειας και θνησιμότητα και

4. απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί, από τα πειραματικά μολυσμένα άτομα, ο ίδιος μικροοργανισμός.

Η λοιμογονικότητα κλινικών στελεχών αερομονάδων ελέγχθηκε με δοκιμές τεχνητής μόλυνσης (challenge test) σε λαβράκια προκειμένου να διαπιστωθεί ο ρόλος τους ως παθογόνα του είδους. Ακολούθως, η λοιμογονικότητα ελέγχθηκε σε ζεβροιχθύες (zebrafish, *D. rerio*) που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να ελεγχθεί το ενδεχόμενο να μπορούν να αντικαταστήσουν τα λαβράκια και ενδεχομένως και άλλα είδη της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας σε πειράματα μόλυνσης. Επιλέχθηκαν λόγω της ευκολίας εκτροφής τους και της δυνατότητας που προσφέρουν να ελεγχθεί ταυτόχρονα μεγάλος αριθμός παθογόνων.

Για τις μολύνσεις σε λαβράκια χρησιμοποιήθηκαν 2 βακτηριακά στελέχη ενώ για τις μολύνσεις σε zebrafish χρησιμοποιήθηκαν 9 στελέχη. Σε όλες τις δοκιμές, τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε TSB 0.5% για 16-18 h στους 25°C. Έγινε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 min. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ορό. Η συγκέντρωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε μέσω της οπτικής απορρόφησης (600 nm) και επιβεβαιώθηκε με άμεση μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με τη χρήση ειδικής πλάκας κυτταρομετρίας (Neubauer).

Όλα τα πειράματα λοιμογονικότητας *in vivo* διεξήχθησαν στις αδειοδοτημένες εγκαταστάσεις (αριθμός καταχώρησης: EL-BIOexp-10) του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων, Τμ. Βιολογίας, Παν. Κρήτης, σύμφωνα με τις Εθνικές Οδηγίες Πειραματισμού σε Ζωντανά Ζώα. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τη Γενική Διεύθυνση Περιφερειακής Αγροτικής Οικονομίας & Κτηνιατρικής, της Περιφέρειας Κρήτης (Αριθμός άδειας: 147115/17-07-2017).

53

Τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων (ημερήσια επιβίωση) αναλύθηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης επιβίωσης Kaplan Meier. Οι καμπύλες επιβίωσης παρήχθησαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism v.8.0.1. Οι στατιστικές αναλύσεις (σύγκριση καμπυλών) έγιναν στο πρόγραμμα IBM SPSS Stattistics v.23. Για την εκτίμηση της διαφοράς μεταξύ καμπυλών χρησιμοποιήθηκαν τα χ² τεστ Log Rank (Mantel-Cox) (LR) και Breslow (Generalized Wilcoxon), (B). Στις περιπτώσεις που οι καμπύλες δεν διέφεραν διεξήχθησαν αναλύσεις και ανά χρονική στιγμή (ημέρα).

2.5.1. Λαβράκι

Η εκτροφή των ιχθύων έγινε στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε, σε νερό γεώτρησης, σε δεξαμενές συνεχόμενης ροής, χωρητικότητας 500 L (ενήλικα) και 250 L (νεαρά), σε θερμοκρασία 19-20°C όπου ταΐζονταν καθημερινά με εμπορική ξηρή τροφή. Τα ψάρια μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων, Παν. Κρήτης, για τη διεξαγωγή των τεχνητών μολύνσεων. Η δοκιμασία μόλυνσης έγινε σε δοχεία 50-70 L με θαλασσινό νερό γεώτρησης και αερισμό και ακολούθως τα ψάρια μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές 250 L με αεριζόμενο, τεχνητό θαλασσινό νερό/ θαλασσινό νερό γεώτρησης σε θερμοκρασία 18-20°C. Τα ψάρια δεν ταΐζονταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν, 100 ενήλικα λαβράκια βάρους 35-70 g και δύο κλινικά βακτηριακά στελέχη (NS και PDB, Πίνακας 5) από την περιοχή που πρωτοεμφανίστηκε η ασθένεια. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ένα μόνο στέλεχος (NS) με το οποίο ελέγχθηκαν δύο μέθοδοι χορήγησης του βακτηρίου: ενδοπεριτοναϊκή ένεση (Intraperitoneal injection, IP) και εμβάπτιση (Immersion, IM). Δύο συγκεντρώσεις βακτηρίου (10⁴ και 10⁶ cfu/ψάρι) χορηγήθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (100 μl/ψάρι) και δύο συγκεντρώσεις (10⁵ και 10⁷ cfu ml⁻¹) χορηγήθηκαν με εμβάπτιση σε βακτηριακό διάλυμα για 3h. Έγιναν επίσης, δύο δοκιμές για το χρονικό διάστημα (3 h και 2,5 h) έκθεσης στο παθογόνο με εμβάπτιση σε διάλυμα βακτηρίου συγκέντρωσης 10⁵ cfu ml⁻¹. Η λοιμογονικότητα του στελέχους PDB ελέγχθηκε μόνο με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση βακτηρίου 10⁵ cfu ml⁻¹. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ψάρια για κάθε ομάδα χωρίς επαναλήψεις.

Για τις μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν επίσης 80 νεαρά λαβράκια βάρους ~2,5 g και όπως παραπάνω δύο κλινικά βακτηριακά στελέχη (NS και PDB). Η λοιμογονικότητα

των δύο στελεχών ελέγχθηκε με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση βακτηρίου 10⁵ cfu ml⁻¹. Χρησιμοποιήθηκαν 20 ψάρια για κάθε ομάδα χωρίς επαναλήψεις

Στην ομάδα ελέγχου (control) για τη μόλυνση με ένεση χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκώς 0.1 ml ορού, ενώ η ομάδα control για τη μόλυνση με εμβάπτιση δεν υπέστη κάποια μεταχείριση. Τα ψάρια που μολύνθηκαν με ένεση, αναισθητοποιήθηκαν πλήρως με Tricaine methanesulfonate (MS-222) πριν τη χορήγηση του παθογόνου.

Η θνησιμότητα και η κλινική εικόνα των ιχθύων καταγράφονταν καθημερινά σε σταθερή ώρα για μέχρι 10 ημέρες μετά τη μόλυνση και τα νεκρά ψάρια αφαιρούνταν από τις δεξαμενές. Τα νεκρά ψάρια εξετάστηκαν με ανατομία, και έγινε μακροσκοπική καταγραφή της κλινικής τους εικόνας. Συλλέχθηκαν ιστοί από νεφρό, ήπαρ και σπλήνα και συντηρήθηκαν σε μονιμοποιητικό διάλυμα για ιστολογική εξέταση. Βακτήρια απομονώθηκαν ασηπτικά από όλα τα νεκρά ψάρια, από το νεφρό, σε γενικό (TSA 2%) και εκλεκτικό (AIAA) θρεπτικό μέσο. Ακολούθησε επώαση για 48 h στους 25°C και έλεγχος της βακτηριακής αύξησης.

2.5.2. Zebrafish (Danio rerio)

Χρησιμοποιήθηκαν 500 ενήλικα zebrafish μέσου βάρους 0.3 g. Τα ψάρια αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για τουλάχιστον δέκα ημέρες πριν από το χειρισμό σε δεξαμενή 100 L με αεριζόμενο, νερό βρύσης, σε θερμοκρασία 25°C, όπου ταΐζονταν καθημερινά με εμπορική ξηρή τροφή. Για τη διεξαγωγή των τεχνητών μολύνσεων μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές των 5 L σε θερμοκρασία 25°C και παρέμειναν ατάιστα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Συνολικά, ελέγχθηκε η λοιμογονικότητα 9 κλινικών στελεχών *Aeromonas* λαβρακιού (NS, NS 2, NS 13, NS 22, PDB, NS 6.15.2, VCK 1, AG 5.28.6 και BIOO 50A) που επιλέχθηκαν ώστε να αντιπροσωπεύονται όσο το δυνατό περισσότερες περιοχές και χρόνοι δειγματοληψιών στις οποίες απομονώθηκαν αερομονάδες. Για κάθε στέλεχος ελέγχθηκαν πέντε συγκεντρώσεις βακτηρίου (10⁴-10⁸ cfu/ψάρι). Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν και η συγκέντρωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η χορήγηση έγινε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (10 μl/ψάρι) με μικρο-σύριγγα Hamilton αφότου τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με MS-222. Στην ομάδα του μάρτυρα (control) χορηγήθηκε αποστειρωμένος ορός. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν 10 ψάρια για κάθε ομάδα. Τα νεκρά ψάρια αφαιρούνταν και η θνησιμότητα καταγράφονταν

καθημερινά σε σταθερή ώρα για μέχρι 10 ημέρες. Η ανάλυση Kaplan Meier μεταξύ των στελεχών έγινε για τις συγκεντρώσεις 10⁴-10⁶ cfu/ψάρι μέχρι τη 2^η μέρα μετά τη μόλυνση. Υπολογίστηκε η μέση θανατηφόρος δόση (median lethal dose, LD₅₀) των εννέα στελεχών από το λαβράκι, στις 24 και 48 h μετά τη μόλυνση, με τη χρήση ανάλυσης Probit στο πρόγραμμα IBM SPSS Stattistics v.23.

2.6. Παρασκευή αυτεμβολίων

Η καλλιέργεια των βακτηρίων από το αρχικό βακτηριακό στοκ (-80°C) έγινε σε γενικό θρεπτικό μέσο χαμηλής αλατότητας (TSB 0.5%) (Πίνακας 1) για 16-18 ώρες (overnight) στους 25°C. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός υγρού θρεπτικού TSB 0.5% (αρχικά σε eppendorf) και επώαση στους 25°C για 16-18 h. Η βακτηρίνη του εμβολιασμού προέκυψε από δεύτερο ενοφθαλμισμό σε μεγαλύτερο όγκο (αναλόγως των αναγκών) υγρού θρεπτικού TSB 0.5%, από την υγρή καλλιέργεια του προηγούμενου βήματος σε αναλογία 1/100 και επώαση στους 25°C για 16-18 h.

Δείγμα της υγρής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για έλεγχο επιμόλυνσης σε στερεά γενικά θρεπτικά υποστρώματα (TSA 0.5-2%) και επώαση στους 25°C έως επτά ημέρες. Εφόσον δεν προέκυψε ανάπτυξη άλλου βακτηρίου, ακολούθησε αδρανοποίηση της βακτηρίνης με προσθήκη φορμόλης (37%) σε τελική συγκέντρωση 3% v/v, με ανάδευση για 30 min και αποθήκευση στους 4°C για 48 h. Για την επιβεβαίωση της αδρανοποίησης έγινε έλεγχος στειρότητας, σε στερεά γενικά θρεπτικά υποστρώματα (όπως παραπάνω) και επώαση στους 25°C για 48-72 h.

Εφόσον δεν προέκυψε βακτηριακή ανάπτυξη στον έλεγχο στειρότητας, έγινε φυγοκέντρηση της καλλιέργειας στις 4.000 rpm για 15 min και συλλογή του βακτηριακού ιζήματος. Ακολούθως το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε αποστειρωμένο ορό σε τελικό όγκο περίπου στο 1/10 του αρχικού όγκου καλλιέργειας. Το πυκνό (10X) υδατικό διάλυμα βακτηρίνης συντηρήθηκε στους 4°C μέχρι τη χρήση. Ο έλεγχος στειρότητας του πυκνού διαλύματος βακτηρίνης επαναλήφθηκε πριν από κάθε χρήση του.

Οι αραιώσεις βακτηρίνης για την παρασκευή των εμβολίων έγιναν σε αποστειρωμένο ορό μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση (κύτταρα ml⁻¹). Η συγκέντρωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε μέσω της οπτικής απορρόφησης (600 nm) και επιβεβαιώθηκε με άμεση μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με τη χρήση ειδικής πλάκας κυτταρομετρίας (Neubauer).

56

Ως ανοσοενισχυτικά χρησιμοποιήθηκαν τα βιομηχανικά έλαια: παραφινέλαιο και Montanide[™] ISA 763 A VG (Seppic). Το ελαιώδες διάλυμα παραφινέλαιου (STA) αποτελούνταν από παραφινέλαιο (94% v/v), Tween 80 (5% v/v) και Span 80 (1% v/v). Η αναλογία υδατικού διαλύματος βακτηρίνης και ελαιώδους διαλύματος ήταν 1:3 (Adams et al., 1988). Η αναλογία ελαίου Montanide και υδατικού διαλύματος βακτηρίνης ήταν 70:30 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ανάμιξη έγινε με ομογενοποιητή MICCRA GmbH MiniBatch D-9 με κεφαλή 20mm DS-20/PF EMR (για όγκους 0.1 to 20,000 ml)

2.7. Εμβολιασμός ιχθύων

Τα πειράματα εμβολιασμού έγιναν σε ανοιχτό κύκλωμα δεξαμενών στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Τα ψάρια μεταφέρθηκαν από την προπάχυνση και τοποθετήθηκαν σε δεξαμενές με θαλασσινό νερό γεώτρησης, συνεχόμενης ροής, χωρητικότητας 500 L, με μέση θερμοκρασία νερού 19-20°C. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων τα ψάρια ταΐζονταν μία φορά την ημέρα σε καθορισμένο χρονικό διάστημα με εμπορική ξηρή τροφή. Το διάστημα προσαρμογής μετά τη μεταφορά τους από την προπάχυνση στις πειραματικές δεξαμενές διήρκησε δύο εβδομάδες.

Παρασκευάστηκαν διαφορετικά εμβόλια βακτηρίνης με (ελαιώδη) ή χωρίς (υδατικά) ανοσοενισχυτικό. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα NS και PDB ξεχωριστά ή σε συνδυασμό (μονό/διπλό εμβόλιο). Συνολικά, έγιναν 4 πειράματα εμβολιασμού. Πριν την έναρξη των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε έλεγχος τοξικότητας μέσω ενδοπεριτοναϊκού εμβολιασμού 10 λαβρακιών με 0.1 ml από κάθε βακτηρίνη/έλαιο, συγκέντρωσης 10⁸ κύτταρα ml⁻¹ ή (10⁷ κύτταρα/ψάρι). Τα ψάρια παρακολουθήθηκαν για θνησιμότητες για χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων.

Όλοι οι εμβολιασμοί σε ενήλικα λαβράκια περιλάμβαναν μια μονή δόση κάθε εμβολίου που χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (0.1 ml) με σύριγγα του 1 ml. Στα νεαρά λαβράκια το εμβόλιο χορηγήθηκε με εμβάπτιση. Το βάρος των ιχθύων μετρήθηκε στην έναρξη του κάθε πειράματος εμβολιασμού και επαναλήφθηκε κάθε φορά στα άτομα που περιλάμβανε η κάθε δειγματοληψία. Τα στοιχεία των πειραμάτων εμβολιασμού παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακας 6.

57

Κατά τις δειγματοληψίες συλλέχθηκαν αίμα και δείγματα ιστών από τα βράγχια, το μεσονεφρικό ιστό και το σπλήνα. Το αίμα συλλέχθηκε με σύριγγα των 1-2 ml από την ουραία αρτηρία των ιχθύων και κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας συντηρήθηκε σε πάγο. Ακολούθως, αφέθηκε να πήξει στους 4°C για περίπου 16-18 h. Μετά από φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 15 min συλλέχθηκε ο υπερκείμενος ορός που συντηρήθηκε στους -80°C μέχρι την ανάλυσή του. Τα δείγματα ιστών, τοποθετήθηκαν μετά τη συλλογή τους σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια συντηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυσή τους.

Πείραμα 1.1

Στις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα λαβράκια μέσου βάρους 30 g που χωρίστηκαν σε εννέα δεξαμενές. Το πείραμα διήρκεσε 3 μήνες (99 ημέρες). Χορηγήθηκε διάλυμα αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης με το στέλεχος NS σε **α**) υδατοδιαλυτή (NS) και **β**) σε ελαιώδη (NS+STA) μορφή σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα ml⁻¹ (10⁷ κύτταρα/ψάρι). Οι αντίστοιχες ομάδες μάρτυρα (control) εμβολιάστηκαν με αποστειρωμένο ορό και ορό+STA. Έγιναν συνολικά 9 δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις hμέρες: 0, 1, 2, 6, 14, 30, 48, 76 και 99. Συλλέχθηκε αίμα και δείγματα ιστών από 5 ψάρια από κάθε ομάδα τη μέρα 0 (καμία μεταχείριση) και από κάθε ομάδα/δειγματοληψία για τις ομάδες control. Για τα εμβολιασμένα με βακτηρίνη ψάρια συλλέχθηκαν τα αντίστοιχα δείγματα από 10 ψάρια από κάθε ομάδα/δειγματοληψία.

Πείραμα 1.2

Στις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα λαβράκια μέσου βάρους 50 g που χωρίστηκαν σε τέσσερεις δεξαμενές. Το πείραμα διήρκεσε 30 ημέρες. Χορηγήθηκε διάλυμα αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης με το στέλεχος NS σε α) υδατοδιαλυτή (NS) και β) σε ελαιώδη (NS+STA) μορφή σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα ml⁻¹ (10⁷ κύτταρα/ψάρι). Οι αντίστοιχες ομάδες control εμβολιάστηκαν με αποστειρωμένο ορό και ορό+STA. Έγιναν συνολικά 3 δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημέρες: 0, 14 και 30. Συλλέχθηκε αίμα και δείγματα ιστών από 10 ανεμβολίαστα ψάρια τη ημέρα 0, από 7 ψάρια από κάθε ομάδα/δειγματοληψία για τις ημέρες 14 και 30.

Πείραμα 2

Στις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ενήλικα λαβράκια μέσου βάρους 60 g που χωρίστηκαν σε έξι δεξαμενές. Το πείραμα διήρκεσε 2 μήνες (60 ημέρες). Χορηγήθηκε διπλό ελαιώδες εμβόλιο αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης από τα στελέχη NS και PDB (NS + PDB + Montanide) σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα ml⁻¹ (10⁷ κύτταρα/ψάρι). Η ομάδα control εμβολιάστηκε με αποστειρωμένο ορό + Montanide. Έγιναν συνολικά 2 δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημέρες: 30 και 60. Συλλέχθηκε αίμα από 10 ψάρια από κάθε ομάδα την ημέρα 30 και από 5 ψάρια από κάθε ομάδα την ημέρα 60. Δεν συλλέχθηκαν ιστοί από τα εμβολιασμένα ψάρια.

Πείραμα 3

Στις πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν νεαρά λαβράκια μέσου βάρους 2,5 g που χωρίστηκαν σε τρείς δεξαμενές. Το πείραμα διήρκεσε 33 ημέρες. Χορηγήθηκε με εμβάπτιση, διπλό εμβόλιο αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης των στελεχών NS και PDB σε συγκέντρωση 10⁹ κύτταρα ml⁻¹. Η εμβάπτιση στο διάλυμα βακτηρίνης είχε διάρκεια 1 min. Η ομάδα control δεν υπέστη κάποια μεταχείριση. Δε συλλέχθηκαν οροί αίματος ή ιστοί από τα εμβολιασμένα ψάρια αυτού του πειράματος.

Σημέιωση: Το Πείραμα 2 έγινε σε συνεργασία και παράλληλα με τη Μεταπτυχιακή Διατριβή της της Ανδριάνας Τρίγκα: «Συγκριτική μελέτη λοιμογονικότητας του βακτηριακού παθογόνου ιχθύων, Aeromonas veronii bv. sobria. Γενετική βάση και in vivo μελέτη» όπου μελετήθηκε η λοιμογονικότητα αερομονάδων της συλλογής που έχει προκύψει στην παρούσα διατριβή.

Πίνακας 6. Αναλυτικά στοιχεία των παρασκευών εμβολίου, του πειραματικού σχεδιασμού και των ιχθύων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα εμβολιασμού λαβρακιών σε χερσαίες ανοιχτού κυκλώματος νερού δεξαμενές στις εγκαταστάσεις του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

# Πειράματος	1.1	1.2	2	3
Εμβόλιο				
Μέθοδος Χορήγησης	Ένεση	Ένεση	Ένεση	Εμβάπτιση
Τύπος εμβολίου	Υδατικό, Ελαιώδες	Υδατικό, Ελαιώδες	Ελαιώδες	Υδατικό
Βακτηριακά στελέχη	NS	NS	NS+PDB	NS+PDB
Συγκέντρωση βακτηρίνης	10 ⁸ κύτταρα ml ⁻¹	10 ⁸ κύτταρα ml ⁻¹	10 ⁸ κύτταρα ml ⁻¹	10 ⁹ κύτταρα ml ⁻¹
Ανοσοενισχυτικό	STA	STA	Montanide	-
Πειραματικός σχεδιασμός				
# Πειραματικών ομάδων	4	4	2	2
Ομάδες εμβολίου	NS, NS+STA	NS, NS+STA	NS+PDB+Montanide	NS+PDB
Ομάδες control	ορός, ορός+STA	ορός, ορός+STA	ορός+Montanide	καμία μεταχείριση
Διάρκεια Πειράματος	3 μήνες	1 μήνας	2 μήνες	1 μήνας
# Δειγματοληψιών	9	3	3	-
Χρόνος δειγμ/ας (ημέρες)	0, 1, 2, 6, 14, 30, 48, 76, 99	0, 14, 30	0, 30, 60	-
Στοιχεία ιχθύων				
Βάρος ιχθύων (αρχικό)	30 g	50 g	60 g	2,5 g
# Ιχθύων/δειγματοληψία	5/10	7/10	5/10	-
# Ιχθύων συνολικός	330	150	120	120

2.8. Εκτίμηση αποτελεσματικότητας εμβολίων

Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων ελέγχθηκε με: α) τεχνητή μόλυνση των εμβολιασμένων ιχθύων, β) εκτίμηση του τίτλου αντισωμάτων στον ορό του αίματος με τη διεξαγωγή ELISA και γ) εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος με την απομόνωση mRNA από τους ιστούς που συλλέχθηκαν και τη διεξαγωγή qPCR. Σύνοψη της πορείας των εργασιών ανά πείραμα παρουσιάζεται στον Πίνακας 7.

Πίνακας 7. Συνολική παράθεση των μεθόδων που εφαρμόστηκαν και της διεξαγωγής αντίστοιχων αναλύσεων για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων *Α. veronii* στο λαβράκι.

# Πειράματος εμβολιασμού	1.1	1.2	2	3
Τεχνητή μόλυνση-Εκτίμηση επιβίωσης	+	+	+	+
Συλλογή ορού αίματος εμβολιασμένων ατόμων	+	+	+	-
ELISA			+	
Συλλογή ιστών εμβολιασμένων ατόμων	+	+	-	-
qPCR		+		

(+): διεξήχθη/έχει ολοκληρωθεί, (-): δε διεξήχθη

2.8.1. Επιβίωση εμβολιασμένων ιχθύων

Τα ψάρια μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων, Παν. Κρήτης, για τη διεξαγωγή τεχνητών μολύνσεων. Η μόλυνση έγινε σε δοχεία 50-70L με θαλασσινό νερό γεώτρησης και αερισμό και ακολούθως τα ψάρια μεταφέρθηκαν σε δεξαμενές 250 L με αεριζόμενο, θαλασσινό νερό γεώτρησης σε θερμοκρασία 18-20°C. Τα ψάρια δεν ταΐζονταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Τα στοιχεία των πειραμάτων τεχνητής μόλυνσης των εμβολιασμένων ιχθύων παρουσιάζονται στον Πίνακας 8.

Η θνησιμότητα και η κλινική εικόνα των ιχθύων καταγράφονταν καθημερινά σε σταθερή ώρα για μέχρι 14 ημέρες μετά τη μόλυνση και τα νεκρά ψάρια αφαιρούνταν από τις δεξαμενές. Στα νεκρά άτομα έγινε μακροσκοπική καταγραφή της κλινικής τους εικόνας και πραγματοποιήθηκε νεκροτομή. Συλλέχθηκαν ιστοί από νεφρό, ήπαρ και σπλήνα και συντηρήθηκαν σε μονιμοποιητικό διάλυμα για ιστολογική εξέταση. Βακτήρια απομονώθηκαν ασηπτικά από όλα τα νεκρά ψάρια, από το νεφρό, σε γενικό (TSA 2%) και εκλεκτικό (AIAA) θρεπτικό μέσο. Ακολούθησε επώαση για 48 h στους 25°C και έλεγχος της βακτηριακής αύξησης. Τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων (ημερήσια θνησιμότητα/επιβίωση) αναλύθηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης επιβίωσης Kaplan Meier. Οι καμπύλες επιβίωσης παρήχθησαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism v.8.0.1. Οι στατιστικές αναλύσεις (σύγκριση καμπυλών) έγιναν στο πρόγραμμα IBM SPSS Stattistics v.23. Για την εκτίμηση της διαφοράς μεταξύ καμπυλών χρησιμοποιήθηκε το χ² τεστ Log Rank (Mantel-Cox) και συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων ανά δύο (pairwise) στις περιπτώσεις που εντοπίστηκαν διαφορές.

Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου εκτιμήθηκε από τη Σχετική Εκατοστιαία Επιβίωση (Relative Percent Survival, RPS) που υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: RPS = [1-(% θνησιμότητα των εμβολιασμένων ιχθύων / % θνησιμότητα των ιχθύων control)] × 100 (Amend, 1981). Υπολογίστηκε επίσης η τιμή του RPS₆₀ που αναφέρεται στο ποσοστό επιβίωσης των εμβολιασμένων ιχθύων όταν η θνησιμότητα των control είναι 60%. Το RPS₆₀ προορίζεται να εφαρμόζεται μόνο σε εμβόλια ενός αντιγόνου (monovalent) και υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο: [1-(% θνησιμότητα των εμβολιασμένων ιχθύων / 60% θνησιμότητα των ιχθύων control)] × 100.

# Πειράματος εμβολιασμού	1.1	1.2	2	3
Μέθοδος μόλυνσης	Ένεση	Εμβάπτιση	Εμβάπτιση	Εμβάπτιση
Χρόνος μόλυνσης μετά τον εμβολιασμό (ημέρες)	40	30	30	33
Βακτηριακά στελέχη	NS	NS	NS, PDB	NS, PDB
Συγκέντρωση (και διάρκεια)	10 ⁶	10 ⁵ cfu ml ⁻¹	10 ⁵ cfu ml ⁻¹	10 ⁵ cfu ml ⁻¹
μόλυνσης	cfu/ψάρι	(2 <i>,</i> 5 h)	(2,5 h)	(2 <i>,</i> 5 h)
# ιχθύων/ομάδα	10	10	10/20	20
Σύνολο ιχθύων/μόλυνση	40	40	60	80

Πίνακας 8. Μεθοδολογία τεχνητών μολύνσεων σε εμβολιασμένα λαβράκια, ανά πείραμα εμβολιασμού.

Πείραμα 1.1

Η τεχνητή μόλυνση διεξήχθη 40 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Πίνακας 6) των ιχθύων ώστε να εκτιμηθεί το ποσοστό επιβίωσης τους. Στις μολύνσεις με το στέλεχος NS χρησιμοποιήθηκαν 10 ψάρια από κάθε ομάδα (4 ομάδες). Η μόλυνση έγινε με ενέσιμο διάλυμα του στελέχους NS σε συγκέντρωση 10⁶ cfu/ψάρι.

Πείραμα 1.2

Η τεχνητή μόλυνση διεξήχθη 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Πίνακας 6) των ιχθύων. Στις μολύνσεις με το στέλεχος NS χρησιμοποιήθηκαν 10 ψάρια από κάθε ομάδα (4 ομάδες). Η μόλυνση έγινε με μπάνιο για 2,5 h του του στελέχους NS σε συγκέντρωση 10^5 cfu ml⁻¹.

Πείραμα 2

Η τεχνητή μόλυνση διεξήχθη 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Πίνακας 6) των ιχθύων. Τα ψάρια υποβλήθηκαν σε μόλυνση με το στέλεχος NS και PDB ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκαν 40 εμβολιασμένα με το διπλό εμβόλιο ψάρια (10 ψάρια για κάθε στέλεχος σε δύο επαναλήψεις) και 10 ψάρια control για κάθε στέλεχος (4 ομάδες). Η μόλυνση έγινε με μπάνιο για 2,5 h σε διάλυμα κάθε στελέχους σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹.

Πείραμα 3

Η τεχνητή μόλυνση διεξήχθη 33 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Πίνακας 6) των ιχθύων. Τα ψάρια κάθε ομάδας υποβλήθηκαν σε μόλυνση με το στέλεχος NS και PDB ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκαν 20 ψάρια από κάθε ομάδα (4 ομάδες). Η μόλυνση έγινε με μπάνιο για 2,5 h σε διάλυμα κάθε στελέχους σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹.

2.8.2. Τίτλος αντισωμάτων - Πείραμα 2

Ο προσδιορισμός του τίτλου αντισωμάτων έγινε σε συνεργασία με το εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Pasteur, Αθήνα. Οι αναλύσεις ELISA διεξήχθησαν κατά ένα μέρος στο εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας και συνεχίστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Υδατοκαλλιεργειών, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.

Για τον προσδιορισμό του τίτλου αντισωμάτων διεξήχθη έμμεση (Indirect) ELISA για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου. Η μέθοδος ELISA βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab) και το διαχωρισμό του συμπλόκου αυτών από τα υπόλοιπα ελεύθερα μόρια που περιέχονται σε ένα δείγμα.

Συνολικά, αναλύθηκαν και προσδιορίστηκε ο τίτλος αντισωμάτων σε 25 άτομα του Πειράματος 2 που αντιστοιχούν σε 15 της ομάδας των εμβολιασμένων με διπλό εμβόλιο βακτηρίνης (NS + PDB + Montanide) και 10 της ομάδας control (ορός + Montanide). Από τα εμβολιασμένα αναλύθηκαν 10 άτομα (V1 - V10) για την ημέρα 30 και 5 (V11 - V15) για την ημέρα 60 μετά τον εμβολιασμό. Από τα control, αναλύθηκαν 10 άτομα (C1 - C10) για την ημέρα 30 μετά τον εμβολιασμό. Χρησιμοποιήθηκαν τα δύο αντιγόνα που περιείχε το εμβόλιο (NS, PDB) σε συγκέντρωση 5 μg/ml. Τα δείγματα αναλύθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων για κάθε αντιγόνο ξεχωριστά με διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις από 1/50 έως 1/25600, σε δύο επαναλήψεις. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πείραμα για το IgM ήταν 1,5 μg ml⁻¹ (αραίωση 1/4 του στοκ) και για το IgG 0,75 μg ml⁻¹ (αραίωση 1/2000 του στοκ). Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το δείγμα V7 (NS + PDB + Montanide, ημέρα 30) και ως αρνητικό το δείγμα C1 (ορός + Montanide, ημέρα 30). Η ανάλυση έγινε στους 22°C. Ο υπολογισμός της τιμής cut-off έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω, από τις τιμές της οπτικής απορρόφησης δέκα (C1 - C10) «αρνητικών» δειγμάτων (αραίωση 1/50) από την ομάδα control (ορός + Montanide) για κάθε αντιγόνο ξεχωριστά.

Πρωτόκολλο ELISA

Διαλυτοποιημένο αντιγόνο (Ag, σε μορφή 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, BSA). Ακολούθως, προστίθεται ο υπό αξιολόγηση ορός που ενδεχομένως θα περιέχει τα αντισώματα (Ab-I) τα οποία αναγνωρίζουν ειδικά το συγκεκριμένο αντιγόνο.

Ακολούθως, προστίθεται δεύτερο αντίσωμα (Ab-II: anti-seabass IgM, IgM) που δεσμεύεται στο Ab-I. Το δεύτερο αντίσωμα συζευγνύεται ακολούθως με τρίτο αντίσωμα (Ab-III) που είναι συζευγμένο με ένζυμο (IgG + HRP, IgG). Τέλος, προστίθεται το υπόστρωμα του ενζύμου (TMB), το οποίο προκαλεί αλλαγή του χρώματος μετά την αντίδραση με το ένζυμο. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη θειικού οξέος και ακολουθεί φωτομέτρηση οπότε γίνεται η ποσοτικοποίηση της αλλαγής χρώματος. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται τελικά για την εκτίμηση του τίτλου των αντισωμάτων.

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 (Ab-I) με τα Ab-II και Ab-III. Η ένταση της αλλαγής του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος στον ορό (Ab-I). Τα διαλύματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της Indirect ELISA καθώς και η σύσταση τους παρατίθενται στον Πίνακας 9.

Οι δοκιμές και αναλύσεις της ELISA έγιναν σε δύο θερμοκρασίες: στους 22°C και 37°C. Αναλόγως της θερμοκρασίας που χρησιμοποιήθηκε έγιναν προσαρμογές στους χρόνους επώασης στα διάφορα στάδια της διαδικασίας. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση του τίτλου αντισωμάτων στον ορό εμβολιασμένων λαβρακιών βασίστηκε στο πρωτόκολλο που προτείνει ο κατασκευαστής του μονοκλωνικού αντισώματος Anti-European Seabass IgM. Αναλυτικά τα βήματα ήταν:

- Στρώση του αντιγόνου (lysate) σε επιλεγμένη συγκέντρωση (1-20 μg ml⁻¹), σε ρυθμιστικό διάλυμα (carbonate buffer) σε V_{τελ} = 100 μl/well. Επώαση 16-18 h (overnight, o.n.) στους 4°C.
- 2. Άδειασμα και ξέπλυμα 3 5 φορές με διάλυμα πλύσης*.
- Προσθήκη 200 μl/well διάλυμα δέσμευσης των μη-ειδικών θέσεων (PBS-BSA 1% w/v). Επώαση για 1,5 h στους 37°C/επώαση 2 h στους 22°C.
- 4. Άδειασμα και ξέπλυμα 3 5 φορές με διάλυμα πλύσης*.
- Προσθήκη ορού (αντίσωμα Ι), σε κατάλληλη αραίωση (σε PBS-BSA 1% w/v), σε
 V_{τελ} = 100 μI/well. Επώαση για 1 h στους 37°C/ επώαση ο.n. στους 4°C.
- 6. Άδειασμα και ξέπλυμα 3 5 φορές με διάλυμα πλύσης*.
- 7. Προσθήκη anti-seabass-IgM (αντίσωμα II) σε κατάλληλη αραίωση (σε PBS-BSA 1% w/v), σε $V_{τελ}$ = 100 μI/well. Επώαση για 45 min στους 37°C/επώαση 1 h στους 22°C.
- 8. Άδειασμα και ξέπλυμα 3 5 φορές με διάλυμα πλύσης*.
- Προσθήκη IgG-HRP (αντίσωμα III), σε κατάλληλη αραίωση (σε wash buffer), σε
 V_{τελ} = 100 μI/well. Επώαση για 45 min στους 37°C/επώαση 1 h στους 22°C.
- 10. Άδειασμα και ξέπλυμα 3 5 φορές με διάλυμα πλύσης*.
- Προσθήκη 100 μl/well χρωμογόνου (TMB + H₂O₂ σε αναλογία 1:1 μεταξύ τους, σύμφωνα με τον κατασκευαστή). Επώαση στο σκοτάδι για περίπου 10-15 min σε θερμοκρασία δωματίου/22°C.
- 12. Προσθήκη 50 μl/well θειικό οξύ 2Μ (χωρίς ξέπλυμα).
- 13. Φωτομέτρηση στα 450 nm και καταγραφή οπτικής απορρόφησης (optical density, OD).

*Επώαση για 5 min με το διάλυμα πλύσης πριν το τελευταίο ξέπλυμα.

Διάλυμα	Σύσταση	Συγκέντρωση	Ποσότητα	рН	Τελικός Όγκος (ml)
Carbonate buffer (ρυθμιστικό	NaHCO₃	35 mM	1,465 g	9.6	500
διάλυμα ανθρακικού/	Na ₂ CO ₃	15 mM	0.795 g		500
διττανθρακικού)	ddH2O				
DDS DSA (Διάλυμα δέσμουσρο	PBS	1X	100 ml		
μη ειδικών θέσεων)	Bovine Serum Albumin,	1% w/v	1 g		100
A. the second se	PBS	1X	9.995 ml		1000
Δίαλυμα πλυσης (Wash buller)	Tween 20	0.05% v/v	0.5 ml		1000
	NaCl		40 g		
PBS 10X (Phosphate buffered	KCl		1 g	7.2-	FOO
saline)	Na_2HPO_4		5,75 g	7.4	500
	KH_2PO_4		1 g		
Αςικό οξύ	H_2SO_4	2M	27,8 ml		250
	ddH ₂ O		222,2 ml		
Δισιατίνματα	Anti-European Sea bass IgM monoclonal antibody (IgM)				
	Peroxidase-Goat Anti-Mouse IgG (H+L)				
Υπόστρωμα ενζύμου (HRP)		Pierce TMB s	ubstrate kit		

Πίνακας 9. Διαλύματα και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο της Indirect-ELISA, για τον προσδιορισμό του τίτλου αντισωμάτων των εμβολιασμένων ιχθύων.

ddH2O: διπλά αποσταγμένο νερό

Διαλυτό αντιγόνο (lysate)

Η καλλιέργεια των βακτηρίων από το αρχικό βακτηριακό στοκ (- 80°C) των δύο αντιγόνων που χρησιμοποιήθηκαν για τους εμβολιασμούς (NS, PDB) έγινε σε γενικό θρεπτικό μέσο χαμηλής αλατότητας (TSB 0.5%) για 16 - 18 ώρες (overnight) στους 25°C. Συλλέχθηκε το βακτηριακό ίζημα και ακολούθως επαναδιαλύθηκε και ξεπλύθηκε τρεις φορές σε ψυχρό PBS με τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις στις 3500 rpm για 10 min. Η βακτηριακή καλλιέργεια συμπυκνώθηκε 10 φορές (10X) σταδιακά, στη διάρκεια των τριών φυγοκεντρήσεων. Αφού χωρίστηκε ισόποσα (1 ml) σε δοχεία (eppendorfs) του 1,5 ml, το βακτηριακό ίζημα υποβλήθηκε σε τρεις κύκλους εναλλασσόμενης ψύξης (- 80°C για ½ h) και θέρμανσης (37°C για ½ h).

Στη συνέχεια 1 ml του βακτηριακού ιζήματος λύθηκαν με 3 κύκλους υπερήχων (1 min) στον πάγο με ισόχρονες ενδιάμεσες διακοπές σε συσκευή υπερήχων (UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany). Το βακτηριδιακό λύμα φυγοκεντρήθηκε σε μικροφυγόκεντρο σταθερής γωνίας κλίσης στις 13.000 rpm για 60 min, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Το υπερκείμενο διαλυτό αντιγόνο φυλάχθηκε στους - 80°C. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του διαλυτού αντιγόνου έγινε με τη χρήση του Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL).

Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων-Θερμοκρασία

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή για το IgM, προτείνεται συγκέντρωση αντιγόνου μεταξύ 1-20 μg ml⁻¹ και συγκέντρωση IgM 6 μg ml⁻¹ (χωρίς αραίωση του ανασυσταμένου αντισώματος, total). Για το IgG η προτεινόμενη αραίωση από τον κατασκευαστή κυμαίνεται μεταξύ 1:2000-1:4000 που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,75-0,375 μg ml⁻¹. Υιοθετήθηκε ως θερμοκρασία επώασης αυτή των 22°C σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για το IgM.

Για την επιλογή του συνδυασμού των συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων έγινε μία σειρά δοκιμών με διαφορετικές αραιώσεις αυτών, χρησιμοποιώντας ένα «αρνητικό» (ημέρα Ο-καμία μεταχείριση ή control (ορός/ορός+έλαιο) αναλόγως της διαθεσιμότητας ανά πείραμα) και ένα «θετικό» (εμβολιασμένο) δείγμα ορού. Ακολουθούν ενδεικτικά παραδείγματα.

α) Επιλογή Συγκέντρωσης Αντιγόνου

Δοκιμάστηκαν ίδιες αραιώσεις του θετικού-εμβολιασμένου δείγματος V7 (Πείραμα 2), με ίδιες συγκεντρώσεις αντισωμάτων (αραιώσεις IgM ¼, IgG 1/2000) στους 22°C, με τα δύο αντιγόνα (NS, PDB) που χρησιμοποιήθηκαν στους εμβολιασμούς. Δοκιμάστηκαν δύο συγκεντρώσεις των αντιγόνων (5 και 10 μg ml⁻¹). Στο παράδειγμα της Εικόνα 5 επιλέχθηκε η χαμηλότερη συγκέντρωση (5 μg ml⁻¹) αντιγόνου εφόσον έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με την υψηλή (10 μg ml⁻¹).



Εικόνα 5. Καμπύλες οπτικής απορρόφησης για το δείγμα V7, στις δοκιμές για την επιλογή της συγκέντρωσης αντιγόνου των δύο στελεχών (NS, PDB) που χρησιμοποιήθηκαν στους εμβολιασμούς στις ίδιες συνθήκες (θερμοκρασία, συγκέντρωση αντισωμάτων).

β) Επιλογή συγκέντρωσης αντισωμάτων (IgM, IgG)

Δοκιμάστηκαν ίδιες αραιώσεις ενός θετικού-εμβολιασμένου (V7, Πείραμα 2) και ενός αρνητικού-ανεμβολίαστου (C1, πείραμα 2) ορού λαβρακιού, με το αντιγόνο NS σε συγκέντρωση 5 μg ml⁻¹, στους 22°C με διαφορετικές συγκεντρώσεις και αναλογίες συγκεντρώσεων των αντισωμάτων (IgM, IgG) (Πίνακας 10. Οι δοκιμές που έγιναν με τους διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων και αναλογιών συγκεντρώσεων των αντισωμάτων με τους διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων και αναλογιών συγκεντρώσεων των αντισωμάτων με τους διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων και αναλογιών συγκεντρώσεων συγκεντρώσεων των αντισωμάτων [gM και IgG. Η οπτική απορρόφηση που προέκυψε ανά συνδυασμό παρουσιάζεται σε φθίνουσα κατάταξη.Πίνακας 10). Προέκυψε έτσι, η τελική αναλογία συγκεντρώσεων Ag:IgM:IgG ήταν 5 μg ml⁻¹ (Ag) : 1,5 μg ml⁻¹ (IgM) : 0,75 μg ml⁻¹ (IgG) και αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των αναλύσεων των δειγμάτων του Πειράματος 2.

Πίνακας 10. Οι δοκιμές που έγιναν με τους διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων και αναλογιών συγκεντρώσεων των αντισωμάτων IgM και IgG. Η οπτική απορρόφηση που προέκυψε ανά συνδυασμό παρουσιάζεται σε φθίνουσα κατάταξη.

OD	lgN	Л	lg(3	Λόγος C	Вс
	Αραίωση	C lgM	Αραίωση	C lgG		
1 (max)	1/4	1,5	1/1000	1,5	1:1	0,372
2-3	1/2	3	1/1000	1,5	2:1	0,556
2-3	1/4	1,5	1/2000	0,75	2:1	0,246
4	tot	6	1/1000	1,5	4:1	0,763
5	1/2	3	1/2000	0,75	4:1	0,367
6-7	tot	6	1/2000	0,75	8:1	0,440
6-7	1/2	3	1/4000	0,375	8:1	0,226
8	1/4	1,5	1/4000	0,375	4:1	0,164
9	tot	6	1/4000	0,375	16:1	0,262

OD: οπτική απορρόφηση (450 nm), C: συγκέντρωση (μg ml⁻¹), Bc: Background control, max: μέγιστο

Για τον προσδιορισμό των μη-ειδικών αλληλεπιδράσεων των αντισωμάτων (Ab-II, Ab-III) χρησιμοποιήθηκαν κελιά μάρτυρες (Background control, Bc), 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. Στις περιπτώσεις που υπήρξαν επαναλήψεις των δειγμάτων, η απορρόφηση των Bc αφαιρέθηκε από κάθε επανάληψη ξεχωριστά.



Εικόνα 6. Οι καμπύλες οπτικής απορρόφησης για το δείγμα V7, στις δοκιμές για τη συγκέντρωση των αντισωμάτων (IgM, IgG) με σταθερή τη συγκέντρωση αντιγόνου (NS) στους 22°C.

Μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις και διακύμανση μεταξύ πλακών

Επιπλέον, σε όλες τις πλάκες συμπεριλήφθηκε ένα θετικό δείγμα ορού (από εμβολιασμένο λαβράκι, V7). Το δείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (Positive control, Pc) και σαν βαθμονομητής (calibrator) για την ομαλοποίηση της διακύμανσης μεταξύ των πλακών. Μετά την αφαίρεση του Bc, τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με τον ειδικό παράγοντα ρύθμισης της πλάκας (plate specific regulation factor, RF). Ο RF υπολογίστηκε ως ο λόγος της μέσης απορρόφησης του Pc από όλες τις πλάκες/την απορρόφηση του Pc κάθε πλάκας. Στη συνέχεια οι τιμές κάθε δείγματος πολλαπλασιάστηκαν με τον RF

Τίτλος αντισωμάτων

Συνολικά, τα δείγματα ορών αναλύθηκαν σε διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις από 1:25 έως 102.400. Έτσι κάθε δείγμα περιγράφεται από μια καμπύλη αραιώσεωνοπτικής 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 των «αρνητικών» δειγμάτων (ημέρα 0 - καμία μεταχείριση ή control (ορός/ορός + έλαιο) αναλόγως της διαθεσιμότητας ανά πείραμα). Ακολούθως, υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των απορροφήσεων που προέκυψαν. Το cut-off υπολογίστηκε από το μέσο όρο των απορροφήσεων προσθέτοντας 3 φορές την τυπική απόκλιση μεταξύ τους.

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

Στατιστικές αναλύσεις

Τα γραφήματα παρήχθησαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism v.8.0.1. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν στο πρόγραμμα IBM SPSS Stattistics v.23. Έγινε έλεγχος κανονικότητας και ομοιογένειας των διασπορών. Διεξήχθη μη παραμετρικός στατιστικός έλεγχος (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks) για τη σύγκριση του τίτλου αντισωμάτων (log₂) ανά αντιγόνο συναρτήσει του χρόνου (π.χ. NS, ημέρα 30 και 60) καθώς και ανά μονάδα χρόνου (ημέρα) μεταξύ των δύο αντιγόνων (π.χ. ημέρα 30, NS και PDB).

2.8.3. Γονιδιακή Έκφραση - Πείραμα 1.2

Οι αναλύσεις για την εκτίμηση της έκφρασης γονιδίων του ανοσοποιητικού των εμβολιασμένων λαβρακιών διεξήχθησαν στο εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Pasteur, Αθήνας. Μελετήθηκαν γονίδια για μόρια που σχετίζονται με την ανάπτυξη της ειδικής ανοσίας όπως την β-αλυσίδα (β-chain) του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης ΙΙ (major histocompatibility complex class II, MHC ΙΙ-β) που βρίσκονται στην επιφάνεια αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων και σχετίζονται με την έναρξη της ανοσολογικής αντίδρασης

Η έκφραση mRNA που κωδικοποιούν για τα γονίδια του ανοσοποιητικού του λαβρακιού που εξετάστηκαν, προσδιορίστηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) με χρήση του Kapa SYBR Fast Universal Master Mix kit (Kapa Biosystems). Οι εκκινητές της β-αλυσίδας (β-chain) του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης ΙΙ (major histocompatibility complex class II, MHC II-β), των διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών συμπλέγματος διαφοροποίησης 4 (cluster of differentiation 4, CD4) και 8, α-αλυσίδα (CD8-α), της βαλυσίδας του υποδοχέα αντιγόνου Τ-λεμφοκυττάρων (T-cell antigen receptor, TCR-β) και της διαμεμβρανικής ανοσοσφαιρίνης Μ (Immunoglobulin M, IgM) που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακας 11.

Αναλύθηκαν συνολικά 48 άτομα του Πειράματος 1.2. Αυτά αντιστοιχούν σε 3-4 δείγματα από κάθε ομάδα control (ορός, ορός + STA) και 4 - 5 από κάθε ομάδα εμβολιασμένων με βακτηρίνη ιχθύων (NS, NS + STA) τις ημέρες 14 και 30 μετά τον εμβολιασμό.

Ιστός (20 - 30 mg) από το μεσονεφρικό ιστό των εμβολιασμένων ιχθύων ζυγίστηκε και ακολούθως ομογενοποιήθηκε με χρήση σύριγγας σε διάλυμα RLT. Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του RNeasy Mini kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η ποιότητα του RNA προσδιορίστηκαν μετρώντας την απορρόφηση στα 260 και 280 nm σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific). Το αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA) υποβλήθηκε ακολούθως σε αντίστροφη μεταγραφή με χρήση του PrimeScript RT Reagent Kit (Takara) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η ποιότητα του συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) προσδιορίστηκαν μετρώντας την απορρόφηση στα 260 και 280 nm σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific).

Οι αντιδράσεις της PCR έγιναν με το σύστημα Stratagene Mx3005P PCR System (Agilent Technologies). Εφαρμόστηκαν οι ίδιες ακόλουθες συνθήκες σε όλα τα γονίδια: α) ενεργοποίηση πολυμεράσης στους 95°C για 10 min, β) 35 κύκλοι αποδιάταξης (denaturation) στους 95°C για 45 s, αναδιάταξης (annealing) στους 52°C για 45 s και επιμήκυνσης (extension) στους 72°C για 45 s και γ) τελική επιμήκυνση 100 κύκλοι στους 95°C για 15 s (Scapigliati et al., 2010).

Όλες οι αναλύσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν σε 2 επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Η γονιδιακή έκφραση υπολογίστηκε με τη μέθοδο ΔΔCt (Livak and Schmittgen, 2001). Το γονίδιο οικιακής οικονομίας της β-ισομορφής της ακτίνης (β-actin) χρησιμοποιήθηκε σαν γονίδιο αναφοράς-εσωτερικό control για την κανονικοποίηση της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων

71

Γονίδιο	Ζεύγη εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών (5'-3')	Πηγή
ß actin	RQACTFR	ATGTACGTTGCCATCC	(Ruonocoro et al. 2008)
p-actin	RQACTRV	GAGATGCCACGCTCTC	(Buoliocore et al., 2008)
CD4	RQCD4FW	GTGATAACGCTGAAGATCGAGCC	(Ruspectre et al. 2008)
CD4	RQCD4RW	GAGGTGTGTCATCTTCCGTTG	(Buoliocore et al., 2008)
	SBASS-CD8AF2	CTAAGATTCGGCAAAATAACTCGA	(Dischiptti at al. 2000)
CDo-u	SBASS-CD8AR1	GATGAGGAGTAGAAGAAGAAGGCC	(Piccilletti et al., 2009)
	RQTCRSBAFW	GACGGACGAAGCTGCCCA	(Piechiotti at al. 2000)
тск-р	RQTCRSBARW	TGGCAGCCTGTGTGATCTTCA	(Ficcilietti et al., 2009)
	RTMHCFR	CAGAGACGGACAGGAAG	(Ruopocoro et al. 2007)
мпс п-р	RTMHCRV	CAAGATCAGACCCAGGA	
la M	F	GAGCTGCAGAAGGACAGTG	(dos Santos et al., 2001a;
IRIAI	R	TCAGACTGGCCTCACAGCT	Scapigliati et al., 2010)

Πίνακας 11. Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για τον πολλαπλασιασμό γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος λαβρακιού, με τη μέθοδο της qPCR.

Τα γραφήματα παρήχθησαν με το πρόγραμμα GraphPad Prism v.8.0.1. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν στο πρόγραμμα IBM SPSS Stattistics v.23. Έγινε έλεγχος κανονικότητας και ομοιογένειας των διασπορών. Διεξήχθη μη παραμετρικός στατιστικός έλεγχος (Kruskal Wallis Analysis of Variance on Ranks) για τη σύγκριση της έκφρασης κάθε γονιδίου μεταξύ των ομάδων εμβολίου και για κάθε γονίδιο σε κάθε ομάδα εμβολίου συναρτήσει του χρόνου.
3. Αποτελέσματα

3.1. Στοιχεία Επιζωοτιολογίας

Συνολικά έγινε έρευνα για παρουσία αερομονάδων σε νοσούντα ψάρια από 11 διαφορετικές μονάδες εκτροφής, σε 10 διαφορετικές τοποθεσίες σε Ελλάδα και Τουρκία (Πίνακας 12). Συνολικά έγιναν 29 δειγματοληψίες, από τις οποίες οι 27 αντιστοιχούν σε μονάδες εκτροφής λαβρακιού σε θαλάσσιους κλωβούς και οι 2 σε εκτροφές σε ενυδρεία, με ψάρια γλυκού νερού. Το 94% των στελεχών Aeromonas από λαβράκι καθώς και τα στελέχη από τα ψάρια του γλυκού νερού ανήκαν στο είδος *A. veronii* σύμφωνα με το γονίδιο gyrB.

Το είδος *Α. veronii* ανιχνεύθηκε σε άρρωστα λαβράκια σε μια μεγάλη χρονική περίοδο, μεταξύ Μαρτίου-Δεκεμβρίου σε θερμοκρασίες > 15,5°C. Ωστόσο οι εξάρσεις της ασθένειας καταγράφηκαν σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες κυρίως > 21°C κατά τους θερινούς μήνες. Η γεωγραφική εξάπλωση του είδους όπως προκύπτει από τις περιοχές που εξετάστηκαν περιλαμβάνει περιοχές του ανατολικού και δυτικού κεντρικού Αιγαίου. Μετά την πρώτη επιβεβαιωμένη εμφάνιση του είδους το 2009 στον Αργολικό Κόλπο και την εξέλιξη της ασθένειας εκεί, αναφέρεται το 2011 στην Αρκαδία (Ν. Δουράλα, προσωπική επικοινωνία) που εκπροσωπείται εδώ από το στέλεχος NS 13 (δειγματοληψία 11, (Πίνακας 12). Από το 2014 εντοπίζεται το είδος στην Κάλυμνο (Ν. Δουράλα & Π. Βαρβαρήγος, προσωπική επικοινωνία) και από τότε και έπειτα απομονώνεται (παρούσα εργασία) στο Αγαθονήσι και την Κάλυμνο ενώ, η πρώτη έξαρση στο Σαρωνικό Κόλπο καταγράφεται το 2016 (Πίνακας 12).

Τα άρρωστα λαβράκια εμφάνισαν τα τυπικά κλινικά σημάδια της νόσου όπως αυτή έχει περιγραφεί συμπεριλαμβανομένων των: ικτερική εμφάνιση εξωτερικά, κοιλιακή διάταση, ερυθρότητα/πετέχειες και εσωτερικά, υπόλευκα οζίδια στα εσωτερικά όργανα και σπληνομεγαλία (Εικόνα 7 και Εικόνα 8). Αερομονάδες ανιχνεύθηκαν επίσης, σε ψάρια που παρουσίασαν ελάχιστα εξωτερικά σημάδια όπως απώλεια όρεξης και λήθαργο ή/και συνοδευόμενη από ήπια ερυθρότητα στο επικαλυματικό ή/και τα πτερύγια όπως και σε ψάρια με μειωμένη ανάπτυξη (Εικόνα 8 Δ-Ε) αλλά και σε νεαρότερα ψάρια των ~60 g (δειγματοληψία 4). Δεν ανιχνεύθηκαν αερομονάδες σε φαινομενικά υγιή ψάρια. Ο επιπολασμός (prevalence) των αερομονάδων στα νοσούντα ψάρια κυμάνθηκε μεταξύ 11% - 75% (Πίνακας 12). Σημειώνεται, ότι στις περιπτώσεις που παραλήφθηκαν βακτήρια απευθείας από τους κτηνιάτρους που παρακολουθούν τις μονάδες εκτροφής, κάθε στέλεχος που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε ένα άρρωστο ψάρι. Ωστόσο, στοιχεία όπως ο συνολικός αριθμός ιχθύων που εξετάστηκε δεν ήταν διαθέσιμα ώστε να μπορεί να εκτιμηθεί η συχνότητα του παθογόνου στα νοσούντα ψάρια. Μετά από προσωπική επικοινωνία γνωρίζουμε συγκεκριμένα περιστατικά που αντιστοιχούν σε περιόδους έξαρσης της νόσου (Πίνακας 12).



Εικόνα 7. Κλινική εικόνα νοσούντων λαβρακιών από *Α. veronii* σε κλωβούς της μονάδα εκτροφής 1 (δειγματοληψία 4). Α) Ικτερική εμφάνιση στα πτερύγια και ψάρια με μειωμένη ανάπτυξη. Β) Διάχυτες αιμορραγίες και ασκητικό υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα και υπόλευκα οζίδια στο σπλήνα. Γ) Αναιμικά βράγχια, ασκητικό υγρό και εσωτερικά, σπληνομεγαλία, κίτρινο χρώμα του ήπατος και υπόλευκα οζίδια στο σπλήνα. Οι εικόνες Α - Γ προέρχονται από τα ίδια ψάρια από τα οποία απομονώθηκε μόνο *Α. veronii*. Δ) Ερυθρότητα στο επικαλυματικό εξωτερικά και Ε) ασκητικό υγρό εσωτερικά και σπληνομεγαλία σε λαβράκι από το οποίο απομονώθηκε *Α. veronii* μαζί με *V. harveyi*. Όλες οι εικόνες προέρχονται από φυσική μόλυνση.



Εικόνα 8. Κλινική εικόνα νοσούντων λαβρακιών από *Α. veronii* σε κλωβούς ιχθύων προς εξαλίευση της μονάδα εκτροφής 4 (δειγματοληψία 18). Α) Τυπική ικτερική εικόνα και κοιλιακή διάταση. Β) Σπληνομεγαλία και πλήθος οζιδίων σε ήπαρ και σπλήνα. Γ) Οζίδια στο νεφρό. Οι εικόνες Α - Γ προέρχονται από το ίδιο ψάρι (200 g). Δ-Ε) Λαβράκια με μειωμένη ανάπτυξη από τον ίδιο κλωβό (63 και 70 g), Ζ) Καθαρή αύξηση *Α. veronii* σε εκλεκτικό θρεπτικό ΑΙΑΑ. Όλες οι εικόνες προέρχονται από ψάρια με φυσική μόλυνση.

Περιοχή	# Δειγμ/ίας	Τοποθεσία	Μονάδα εκτροφής	Ημ/νία	Θερμοκρασία (°C, μέση μηνιαία)	Είδος	Βάρος (g)	# Ιχθύων	Επιπολασμός Aeromonas spp.
	1*	Αργολικός	1	2008-6/2009	>21	D. labrax	250-400	≥3	-
	2-3	Αργολικός	1	9/2015		D. labrax	-	≥7	-
	4	Αργολικός	1	11/2015		D. labrax	50-200	33	33% (11/33)
	5	Αργολικός	1	3/2016		D. labrax	-	≥5	-
	6-7	Αργολικός	1	9/2016		D. labrax	-	≥3	-
Δυτικό Αιγαίο Πέλαγος	8*	Αργολικός	1	6/2018	>21	D. labrax	-	≥1	-
(W)	9	Αργολικός	1	9/2018		D. labrax	-	≥1	-
	10	Αργολικός	1	10/2018		D. labrax	-	≥9	-
	11	Αργολικός	2	12/2015		D. labrax	-	≥1	-
	12	Σαρωνικός	3	9/2016		D. labrax	-	≥3	-
	13*	Σαρωνικός	3	5/2018	>21	D. labrax	-	≥15	73% (8/11)
	14*	Σαρωνικός	3	6/2018	>21	D. labrax	-	≥10	-
	27	Αγαθονήσι	4	9/2014	25,5	D. labrax	32-320	18	0%
	15	Αγαθονήσι	4	4/2015	15,5	D. labrax	120-480	13	15% (2/13)
	16*	Αγαθονήσι	4	6/2015	20,5	D. labrax		≥1	-
	17	Αγαθονήσι	4	9/2015	22,5	D. labrax	60-1000	4	75% (3/4)
Ανατολικό Αιγαίο Πέλαγος,	18	Αγαθονήσι	4	11/2015	19,5	D. labrax	12-210	36	11% (3/26)
	19**	Αγαθονήσι	4	7/2016	22,5	D. labrax	430-1500	5	20% (1/5)
	20*	Κάλυμνος	5	6/2015	>21	D. labrax	-	≥8	-
	21-22	Κάλυμνος	5	9/2015	>21	D. labrax	-	≥9	-
	28	Χίος	6	8/2015		D. labrax	150-160	6	0%
	23*	Güllück	7	2010		D. labrax	-	≥2	-

Πίνακας 12. Γεωγραφικά (περιοχή, τοποθεσία, μονάδα εκτροφής) και χρονικά (ημερομηνία) στοιχεία των δειγματοληψιών, καθώς και στοιχεία για τα είδη, τον αριθμό και το εύρος βάρους (g) των νοσούντων ιχθύων που εξετάστηκαν και ο επιπολασμός (prevalence) των αερομονάδων σε αυτά.

Ανατολικό Αιγαίο Πέλαγος, Τουρκία (Ε)	24*	Bodrum	8	3/2019	D. labrax	-	≥2	-
Ιόνιο Πέλαγος	29	Κεφαλονιά	9	11/2014	D. labrax	610-960	4	0%
Γλυκό νερό, Ενυδρείο	25*	Ξάνθη	10	2/2015	Xiphophorus hellerii	-		-
	26*	Ηράκλειο	11	12/2018	Danio rerio	-		-

*: έξαρση ασθένειας, **: μεταφορά

3.2. Απομόνωση - Ανίχνευση - Ταυτοποίηση Aeromonas spp.

Επιλέχθηκαν αποικίες που μεγάλωσαν σε TSA 0.5-2%, είχαν πράσινο χρώμα (ξυλόζη) στο AIAA και παρουσίασαν πλήρη αύξηση έπειτα από επώαση 48 ωρών στους 25°C. Συνολικά επιλέχθηκαν 176 στελέχη για περαιτέρω ανάλυση. Τα στελέχη που μεγάλωσαν σε AIAA υποβλήθηκαν σε PCR με τη χρήση των ειδικών εκκινητών για *Aeromonas*, για το γονίδιο IGS (intergenic spacer 16S-23S rRNA). Από αυτά, 149 έδωσαν θετικό σήμα για το IGS (παραγωγή προϊόντος). Όπως φαίνεται παρακάτω από τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης 55 στελεχών από τα θετικά για IGS στελέχη, με τα γονίδια 16S και gyrB, η χρήση αυτού του εργαλείου ανίχνευσης απέδωσε 100% ταυτοποίηση αερομονάδων (κανένα άλλο γένος δεν ανιχνεύθηκε).

Η χρήση του γονιδίου GCAT για την ανίχνευση αερομονάδων δεν απέδωσε σε στελέχη που ταυτοποιούνταν ως *A. veronii* στο λαβράκι. Δοκιμάστηκε σε λίγα μόνο στελέχη που βρέθηκαν θετικά στην PCR-IGS, οδήγησε σε επιτυχή ανίχνευση των *A. salmonicida* (AG 2.13.2), *A. media* (AG 2.13.2), *A. bivalvium* (AG 4.2.11) και των τυπικών στελεχών *A. veronii* (LMG 3785 και LMG 9075) όπως φάνηκε από τις αλληλουχίσεις που ακολούθησαν, αλλά η αντίδραση ήταν αρνητική στα στελέχη *A. veronii* (NS, PDA, PDB, NS 2, NS 8, NS 10 και AG 2.6.1) από το λαβράκι. Το γονίδιο ανιχνεύθηκε στα 10 γονιδιώματα *A. veronii* που μελετήθηκαν (Πίνακας 5), ωστόσο ανιχνεύθηκαν 3 μεταλλάξεις σε κάθε μία από τις περιοχές πρόσδεσης των εκκινητών που μπορεί να σχετίζονται με την αρνητική αντίδραση που παρατηρήθηκε. Το γονίδιο αυτό δε χρησιμοποιήθηκε τελικά σε περισσότερα δείγματα και δε διερευνήθηκε περεταίρω η διαφοροποίηση του στα στελέχη από το λαβράκι.

Από το σύνολο Aeromonas spp. που ανιχνεύθηκαν, ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο είδους 53 συνολικά στελέχη από λαβράκι (1-7 ανά δειγματοληψία) και 2 στελέχη από τα είδη ιχθύων του γλυκού νερού. Συνολικά, προσδιορίστηκε η αλληλουχία του γονιδίου 16S σε 43 στελέχη και του γονιδίου gyrB σε 55. Το σύνολο των μοριακών και βιοχημικών τεστ που διεξήχθησαν για κάθε ένα από τα 55 αυτά στελέχη προκειμένου να επιτευχθεί η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός τους παρουσιάζονται στον Πίνακας 13.

78

Οι αλληλουχίες του γονιδίου *gyr*B κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank, NCBI με αριθμό πρόσβασης (Accession Number): MN193961-MN193984 και MN193987-MN194010. Τα στοιχεία των βακτηριακών στελεχών και αλληλουχιών gyrB που αναλύθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακας 14.

Μέσω της συσχέτισης με BLAST (p=99%) των αλληλουχιών 16S στη βάση δεδομένων GenBank, NCBI, ταυτοποιήθηκαν συνολικά τρία είδη *Aeromonas* από άρρωστα λαβράκια: *A. veronii, A. bivalvium* και *A. salmonicida*. Ανάμεσά τους, το είδος *A. veronii* ήταν το πιο κοινό. Από τα στελέχη που απομονώθηκαν από άρρωστα λαβράκια, 36/42 ταυτοποιήθηκαν ως *A. veronii*. Ακόμα δύο στελέχη από λαβράκι ταυτοποιήθηκαν ως *A. salmonicida* (AG 2.13.2) και *A. bivalvium* (AG 4.2.11). Το στέλεχος XU 1 από το *X. helleri* (γλυκού νερού) ταυτοποιήθηκε επίσης ως *A. veronii*. Τέσσερα στελέχη από λαβράκι ταυτοποιήθηκαν μόνο σε επίπεδο γένους (*Aeromonas* spp.).

#	Περιοχή	Στέλεχος	# Δειγματοληψίας	AIAA	IGS	МЮ	Χρωστική (TSA)	Χρωστική (MH)	16S	gyrB	Biolog	API	Cat	BA	Αντιβιοτικά	0/129
1	W	NS	1	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
2	W	PDA	1	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	ND	D
3	W	PDB	1	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
4	W	NS 2	2	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
5	W	NS 8	3	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
6	W	NS 10	3	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
7	W	NS 6.8.2	4	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
8	W	NS 6.15.2	4	D	D	D	D	D	D	A.veronii	D	D	D	D	D	D
9	W	NS 6.17.2	4	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
10	W	NS 6.25.1	4	D	D	D	D	D	D	A.veronii	D	D	D	D	D	D
11	W	NS 6.27.1	4	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
12	W	NS 6.29.1	4	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
13	W	NS 6.32.1	4	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
14	W	NS 15	5	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
15	W	NS 16	5	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	D	D
16	W	NS 17	5	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
17	W	NS 20	6	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
18	W	NS 21	6	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
19	W	NS 22	7	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
20	W	NS 30	8	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	D	D
21	W	NS 49	9	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	ND	D	D	D	D
22	W	NS 52	10	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	ND	D	D	D	D
23	W	NS 58	10	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	ND	D	D	D	D

Πίνακας 13. Το σύνολο των μοριακών και βιοχημικών τεστ που διενεργήθηκαν για κάθε στέλεχος που μελετήθηκε και περιλαμβάνεται στην παρούσα διατριβή, προκειμένου να ολοκληρωθεί η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός τους.

24	W	NS 13	11	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
25	W	NS 23	12	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
26	W	NS 24	12	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
27	W	NS 25	12	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
28	W	NS 29.1	13	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	D	D
29	W	NS 31.2.1	13	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	D	D
30	W	NS 32.1.2	14	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
31	W	NS 33.1	14	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	ND	D	D	D	ND
32	E-Gr	AG 2.6.1	15	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	D	D
33	E-Gr	AG 2.13.2	15	D	D	D	D	ND	D	A.salmonicida	D	D	D	D	D	D
34	E-Gr	AG 2.13.5	15	D	D	D	D	ND	D	A.media	D	D	D	D	D	D
35	E-Gr	VCA 1	16	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
36	E-Gr	AG 4.1.3	17	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
37	E-Gr	AG 4.2.5	17	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
38	E-Gr	AG 4.4.1	17	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
39	E-Gr	AG 4.2.11	17	D	D	D	D	D	D	A.bivalvium	D	ND	D	D	ND	D
40	E-Gr	AG 5.28.6	18	D	D	D	D	D	D	A.veronii	D	D	D	D	D	D
41	E-Gr	AG 5.33.7	18	D	D	D	D	D	D	A.veronii	D	D	D	D	D	D
42	E-Gr	AG 5.34.6	18	D	D	D	D	D	D	A.veronii	D	D	D	D	D	D
43	E-Gr	AG 9.3.1	19	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
44	E-Gr	NSK 1	20	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
45	E-Gr	NSK 3	20	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
46	E-Gr	NSK 7	20	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
47	E-Gr	NSK 9	21	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
48	E-Gr	NSK 11	21	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND
49	E-Gr	VCK 1	22	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
50	E-Gr	VCK 3.2	22	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	ND

51	E-Tur	BIOO50 A	23	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
52	E-Tur	BIOO50 B	23	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
53	E-Tur	T04-D	24	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	ND	D	ND	D	D
54	AQ	XU 1	25	D	D	D	D	D	D	A. veronii	D	D	D	D	D	D
55	AQ	Z 1	26	D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	ND	D	ND	D	D
56	Т	LMG 3785		D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	ND	D
57	Т	LMG 9075		D	D	D	D	D	ND	A. veronii	D	D	D	D	ND	D

W: Δ. Αιγαίο, Ελλάδα, E-Gr: Α. Αιγαίο, Ελλάδα, E-Tur: Α. Αιγαίο, Τουρκία, ΑQ: Γλυκό νερό, Ενυδρείο, Τ: Τυπικό στέλεχος συλλογής, LMG 3785: *Α. veronii* bv. sobria, LMG 9075: *Α. veronii* bv. veronii, D: Διεξήχθη, ND: Δεν διεξήχθη

Περιοχή	# Δειγματοληψίας	Τοποθεσία	# Στελεχών/ δειγματοληψία	Κωδικοί στελεχών	Κωδικός πρόσβασης (GenBank, NCBI)
	1*	Αργολικός	3	NS, PDA, PDB	KF636138, KR049227, MN193989
	2-3	Αργολικός	3	NS 2, 8, 10	KY310610-KY310612
	4	Αργολικός	7	NS 6	KY310608-KY310609, MN193978 - MN193982
	5	Αργολικός	3	NS 15-17	MN193961, MN193975 - MN193976
	6-7	Αργολικός	3	NS 20-22	MN193992-MN193994
14/	8*	Αργολικός	1	NS 30	MN193963
vv	9	Αργολικός	1	NS 49	MN193967
	10	Αργολικός	2	NS 52,58	MN193969, MN193968
	11	Αργολικός	1	NS 13	MN193987
	12	Σαρωνικός	3	NS 23-25	MN193977, MN193988, MN193995
	13*	Σαρωνικός	2	NS 29, 31	MN193962, MN193964
	14*	Σαρωνικός	2	NS 32-33	MN193965-MN193966
	15	Αγαθονήσι	3	AG-2	MN194005, MN194007-MN194008
	16*	Αγαθονήσι	1	VCA	MN194001
	17	Αγαθονήσι	4	AG-4	MN194003, MN194006, MN193970 - MN193971
E	18	Αγαθονήσι	3	AG-5	MN193972 - MN193974
	19**	Αγαθονήσι	1	AG-9	MN193990
	20*	Κάλυμνος	3	NSK 1-8	MN193983, MN193998, MN194000
	21-22	Κάλυμνος	4	NSK 9-12, VCK 1-5	MN193984, MN193991, MN193999, MN194002
r	23*	Güllück	2	BIOO50	MN193996 - MN193997
E	24*	Bodrum	1	T04-D	MN194004
Γλυκό νερό,	25*	Ξάνθη	1	XU 1	MN194010
Ενυδρείο	26*	Ηράκλειο	1	Z 1	MN194009

Πίνακας 14. Στοιχεία γεωγραφικής προέλευσης, δειγματοληψίας απομόνωσης, αριθμού των βακτηριακών στελεχών που αναλύθηκαν/δειγματοληψία, οι κωδικοί των στελεχών στο κείμενο και οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών τους για το γονίδιο gyrB στη GenBank, NCBI.

*: έξαρση ασθένειας, **: μεταφορά

3.2.1. Φυλογενετικές αναλύσεις

Στις φυλογενετικές αναλύσεις με το γονίδιο 16S συμπεριλήφθηκαν αλληλουχίες 930-1074 bp. Η αδυναμία ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους μέσω BLAST, αφορά αλληλουχίες <1030 bp. Η ανάλυση NJ (Εικόνα 9) με τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνει ελάχιστους μονοφυλετικούς ή/και στατιστικά υποστηριζόμενους κλάδους (π.χ. *Α. salmonicida*). Για το λόγο αυτό δε θα γίνει περεταίρω συζήτηση σε σχέση με αυτήν.

Μέσω της συσχέτισης με BLAST (p=99%) των αλληλουχιών gyrB στη βάση δεδομένων GenBank, NCBI, ταυτοποιήθηκαν συνολικά τέσσερα είδη Aeromonas από άρρωστα λαβράκια: *A. veronii, A. bivalvium, A. media* και *A. salmonicida*. Ανάμεσά τους, το είδος *A. veronii* ήταν το πιο κοινό. Από τα στελέχη που απομονώθηκαν από άρρωστα λαβράκια, 50/53 (94%) ταυτοποιήθηκαν ως *A. veronii*. Τα είδη *A. media* (AG 2.13.5) και *A. salmonicida* (AG 2.13.2) απομονώθηκαν από το ίδιο ψάρι (δειγματοληψία 15) ενώ το είδος *A. bivalvium* (AG 4.2.11) απομονώθηκε μαζί με ένα στέλεχος *A. veronii* από άλλο ψάρι (δειγματοληψία 17). Τα βακτήρια (XU 1 και Z 1) από τα ψάρια του γλυκού νερού ταυτοποιήθηκαν επίσης ως *A. veronii*.

Στις φυλογενετικές αναλύσεις με το γονίδιο gyrB συμπεριλήφθηκαν αλληλουχίες μήκους 1004 bp. Πενήντα (50/53) στελέχη από λαβράκι και τα δύο στελέχη από τα είδη X. helleri (XU 1) και D. rerio (Z 1) ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους και στον κλάδο του είδους A. veronii στην ανάλυση NJ (Εικόνα 10). Τα στελέχη από λαβράκι που περιγράφηκαν εδώ μαζί με το ιταλικό Ae4 ομαδοποιήθηκαν μεταξύ τους σε ένα μονοφυλετικό κλάδο (εσωτερικά του είδους A. veronii) που στηρίζεται στατιστικά. Η ομάδα της A. veronii είναι παραφυλετική (βλ. A. aquatilis) και δε στηρίζεται στατιστικά. Το στέλεχος AG 2.13.2 ομαδοποιήθηκε σε ένα μονοφυλετικό κλάδο με το είδος A. salmonicida, το στέλεχος AG 2.13.5 με τα είδη A. media και A. rivipollensis και το στέλεχος AG 4.2.11 με το είδος A. bivalvium.

84

A. veronii strains	CECT 4257	CECT 4246	NS	B565	AER39	AER397	XU 1
CECT 4257							
CECT 4246	0,013						
NS	0,019	0,010					
B565	0,002	0,014	0,020				
AER39	0,024	0,021	0,026	0,024			
AER397	0,002	0,014	0,020	0,000	0,024		
XU 1	0,005	0,009	0,015	0,007	0,023	0,007	
Z 1	0,018	0,021	0,019	0,019	0,031	0,019	0,018

Πίνακας 15. Γενετική απόσταση (%) για το γονίδιο gyrB, μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του είδους *Α. veronii* που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις.

Η μέση γενετική απόσταση των στελεχών που απομονώθηκαν από τα λαβράκια ήταν 0%. Η μέση γενετική απόσταση στον κλάδο του *Α. veronii* υπολογίστηκε στο 0.015%. Η γενετική απόσταση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών (περιοχή, ξενιστής) *Α. veronii* παρουσιάζεται στον Πίνακας 15 με το στέλεχος NS ως τυχαία επιλεγμένο εκπρόσωπο των στελεχών από το λαβράκι.



Εικόνα 9. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ στελεχών από λαβράκι και άλλων Aeromonas spp. σύμφωνα με την τοπολογία της ανάλυσης σύνδεσης γειτόνων (NJ) για το γονίδιο 16S. Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών από την NCBI, παρουσιάζονται πριν από τα ονόματα των ειδών ή/και τους κωδικούς των στελεχών. Οι αριθμοί στους κλάδους υποδεικνύουν τις τιμές στατιστικής υποστήριξης (bootstrap) τους. Το χρώμα (ροζ) υποδεικνύει τα στελέχη *A. veronii* από λαβράκι σύμφωνα με την ταυτοποίηση του γονιδίου gyrB.



Εικόνα 10. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ στελεχών από λαβράκι και άλλων Aeromonas spp. σύμφωνα με την τοπολογία της ανάλυσης σύνδεσης γειτόνων (NJ) για το γονίδιο gyrB. Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών από την NCBI, παρουσιάζονται πριν από τα ονόματα των ειδών ή/και τους κωδικούς των στελεχών. Οι αριθμοί στους κλάδους υποδεικνύουν τις τιμές στατιστικής υποστήριξης (bootstrap) τους. Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει τα στελέχη για τα οποία έγινε αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος.

3.3. Χαρακτηρισμός βακτηρίων

3.3.1. Μορφολογία αποικιών και χαρακτηριστικά αύξησης

Όλα τα 55 στελέχη *Aeromonas* spp. (Πίνακας 13) που μελετήθηκαν εμφανίστηκαν πράσινα στο AIAA (δεν παρήγαγαν οξύ από μεταβολισμό της ξυλόζης) χωρίς παρουσία μαύρου στίγματος το οποίο θα υποδήλωνε παραγωγή H₂S (Εικόνα 11 A). Όλα βρέθηκαν αρνητικά στη χρώση κατά Gram και όλα εκτός από δύο (NS και NS 13) ήταν κινητά όπως παρατηρήθηκε στο θρεπτικό μέσο MIO. Στο οπτικό μικροσκόπιο, παρατηρήθηκαν κυρίως μοναδιαία κύτταρα, αλλά και ζεύγη ή/και αλυσίδες κυττάρων σχετικά μικρού μήκους (3-10 κύτταρα). Όλα τα στελέχη *Aeromonas* spp. σχημάτισαν πλήρως αναπτυγμένες αποικίες μετά από 48 h επώασης στους 25°C στα θρεπτικά υποστρώματα AIAA, και TSA 0.5-2%.



Εικόνα 11. Αύξηση του στελέχους NS στο A) εκλεκτικό θρεπτικό AIA μετά από 48 h επώασης στους 25°C και B) στο γενικό θρεπτικό TSA 0.5% μετά από 48 h επώασης στους 25°C. Γ) Αύξηση και παραγωγή χρωστικής, του στελέχους PDB στο γενικό θρεπτικό TSA 0.5% μετά από 48 h επώασης στους 25°C. Η εικόνες B, Γ περιλαμβάνονται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).

Όλα τα στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι (50) σχημάτισαν λείες, κυκλικές, αδιαφανείς αποικίες, λευκού-υποκίτρινου χρώματος και δεν ήταν δυνατό να διακριθούν μεταξύ τους με γυμνό μάτι κατά τις πρώτες 24 h επώασης στους 25°C σε TSA 0.5%. Τα στελέχη *Α. veronii* από το Δ. Αιγαίο παρήγαγαν σκούρα καφέ χρωστική σε TSA 0.5% (Εικόνα 11 Γ) και MHA 0.5% μετά από 36-48 h επώασης στους 25°C. Τα στελέχη *Α. veronii* NS και NS 13 από το Δ. Αιγαίο δεν παρήγαγαν χρωστική. Τα στελέχη *Α. veronii* από το Α. Αιγαίο παρήγαγαν ανοιχτόχρωμη καφέ χρωστική, κυρίως ορατή στο MHA (Εικόνα 12). Αυτά καταγράφηκαν ως θετικά-ενδιάμεσα (Ι) για αυτό το χαρακτηριστικό. Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή χρωστικής στα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά μέσα TSB 0.5% και MHB 0.5% μετά από επώαση 7 ημερών. Τα στελέχη *A. veronii* XU 1 και Z 1 από τα είδη γλυκού νερού *X. helleri* και *D. rerio,* σχημάτισαν αδρές αποικίες, ήταν κινητά και δεν παρήγαγαν χρωστική σε TSA 0.5% και MHA 0.5%. Το ίδιο καταγράφηκε για τα τυπικά στελέχη LMG 3785 (*A. veronii* bv. *sobria*) και LMG 9075 (*A. veronii* bv. *veronii*). Παραγωγή χρωστικής εμφανίστηκε μόνο σε στερεά υποστρώματα. Τα αποτελέσματα για την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής παρουσιάζονται στον Πίνακας 16. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ξεχωριστά για μεμονωμένα στελέχη και σαν ποσοστό (%) των θετικών αντιδράσεων για τα στελέχη *A. veronii* από λαβράκι που μελετήθηκαν στην εργασία.



Εικόνα 12. Εικόνα αύξησης στελεχών ενδιάμεσης (Ι) παραγωγής χρωστικής σε TSA 0.5% (αριστερά) που γίνεται εμφανής κυρίως στο θρεπτικό MH (δεξιά) μετά από 48 h επώασης στους 25°C. Το στέλεχος XU 1 (πάνω αριστερά στα δύο πιάτα) παραμένει αρνητικό για παραγωγή χρωστικής και στα δύο θρεπτικά μέσα.

3.3.2. Μορφολογία κυττάρων-Ηλεκτρονική Μικροσκοπία

Με ηλεκτρονική μικροσκοπία μελετήθηκε η μορφολογία 9 στελεχών (Πίνακας 5) *Α. veronii* από λαβράκι. Τόσο η ανάλυση ΤΕΜ όσο και η ανάλυση SEM έδειξαν ότι τα κινητά στελέχη (Εικόνα 13 Α) διαθέτουν ένα πολικό μαστίγιο (Εικόνα 13 Γ-Δ) και επιβεβαίωσαν ότι τα μη κινητά στελέχη στερούνται μαστιγίου (Εικόνα 13 Β). Στα δείγματα που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκαν πλευρικά μαστίγια. Μια αδρή ασαφής στοιβάδα παρατηρήθηκε γύρω από το κύτταρο των κινητών στελεχών τόσο σε δείγματα ΤΕΜ όσο και σε δείγματα SEM (Εικόνα 13 Δ-Ε), μια δομή που μοιάζει με βακτηριακή κάψουλα.



Εικόνα 13. Α) Μικρογραφία SEM του κινητού στελέχους PDB και B) του μη κινητικού NS. Τα ίδια στελέχη όπως παρουσιάζονται στο TEM (Γ και Δ, αντίστοιχα). Η παρουσία πολικού μαστιγίου είναι εμφανής μόνο στο κινητό στέλεχος (PDB). Ε) Μεγαλύτερη μεγέθυνση του πολικού μαστιγίου του στελέχους PDB. Η εικόνα συμπεριλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2019).

3.3.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

Οι βιοχημικές ιδιότητες με το σύστημα ταυτοποίησης API 20E, ελέγχθηκαν για 49 στελέχη (Πίνακας 13) που αντιστοιχούν στα είδη *A. veronii* (46), *A. media* (1) και *A. salmonicida* (1) και. Τα αποτελέσματα των βιοχημικών αντιδράσεων του κιτ API 20^E και της καταλάσης παρουσιάζονται στον Πίνακας 16. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ξεχωριστά για μεμονωμένα στελέχη και σαν ποσοστό (%) των θετικών αντιδράσεων για τα στελέχη *A. veronii* από λαβράκι που απομονώθηκαν στα πλαίσια της διατριβής.

Όλα στελέχη *A. veronii* από το λαβράκι ήταν θετικά για την καταλάση (catalase) και οξειδάση (oxidase). Όλα ήταν αρνητικά για την παραγωγή ινδόλης (indole) και υδρόθειου (H₂S), δεν υδρόλυσαν την ουρία και δεν μεταβόλισαν την αμυγδαλίνη (amygdalin), αραβινόζη (arabinose), μελιβιόζη (melibiose), ινοσιτόλη (inositol), σορβιτόλη (sorbitol) και ραμνόζη (rhamnose). Όλα τα στελέχη ήταν ικανά να μεταβολίζουν τη D-γλυκόζη (D-glucose), μαννιτόλη (mannitol) και σουκρόζη (sucrose) και όλα εκτός από ένα (BIOO50A) ήταν αρνητικά για την αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (ornithine decarboxylase, ODC). Σε επίπεδο βιοποικιλίας τα στελέχη που αναλύθηκαν προσδιορίστηκαν ως *A. veronii* bv. *sobria*, δεδομένης της αρνητικής αντίδρασης για την ορνιθίνη (ODC). Εξαίρεση αποτελεί το στέλεχος BIOO 50A που ήταν θετικό για την ίδια αντίδραση. Για το στέλεχος Z 1 η ανάλυση δεν διεξήχθη.

Η πλειοψηφία των στελεχών *Α. veronii* του Δ. Αιγαίου ήταν αρνητικά για τη βγαλακτοσιδάση (β-galactosidase) ενώ η πλειοψηφία των στελεχών του Α. Αιγαίου ήταν θετικά στην αντίδραση αυτή. Οι αντιδράσεις για τη διυδρολάση της αργινίνης (arginine dihydrolase, ADH) και την αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (lysine decarboxylase, LDC) ήταν σχεδόν αποκλειστικά θετικές για τα στελέχη του Δ. Αιγαίου, ενώ στα στελέχη του Α. Αιγαίου παρατηρήθηκε ποικιλότητα στους χαρακτήρες αυτούς.

Οι βιοχημικές ιδιότητες με το σύστημα ταυτοποίησης Biolog, ελέγχθηκαν για όλα τα 55 στελέχη *Aeromonas* spp. που απομονώθηκαν στα πλαίσια της διατριβής (Πίνακας 13). Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων του Biolog παρουσιάζονται στον Πίνακας 17. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ξεχωριστά για μεμονωμένα στελέχη και σαν ποσοστό (%) των θετικών αντιδράσεων για τα στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι. Οι ενδιάμεσες αντιδράσεις δεν συμπεριλήφθηκαν στον υπολογισμό των ποσοστών αλλά αποδόθηκαν ως ενδιάμεσος (Intermediate, I) χαρακτήρας στην Ιεραρχική ανάλυση συστάδων.

Όλα τα στελέχη *A. veronii* από το λαβράκι αναπτύχθηκαν σε pH 6 και 1% NaCl, αλλά η αύξηση σε pH 5 παρουσίασε ποικιλότητα και λίγα μόνο στελέχη αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 4% NaCl. Τα στελέχη *A. veronii* από το λαβράκι εκτός τριών (AG-5.34.6, NS 31.2.1, and NS 33.1), δεν μεταβόλισαν τη D-αραβιτόλη (D-arabitol). Όλα τα στελέχη *A. veronii* του Δ. Αιγαίου ήταν θετικά στην αντίδραση μεταβολισμού β-μεθυλο-Dγλυκοζίτη (β-Methyl-D-Glucoside), ενώ όλα τα στελέχη *Α. veronii* του Α. Αιγαίου ήταν αρνητικά. Όλα τα στελέχη *Α. veronii* του Δ. Αιγαίου ήταν θετικά στην τρεχαλόζη (trehalose) και το D-γλουκονικό οξύ (D-Gluconic acid). Ωστόσο, μόνο δύο (TO4-D and AG-5.34.6) και τρία (BIOO50A, AG-2.6.1 και AG-5.34.6) αντίστοιχα, στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι του Α. Αιγαίου ήταν θετικά στις αντιδράσεις αυτές.

Αντίδραση/Στέλεχ	ος	а	b	с	d	е	f	g	W (%)	E (%)
β-galactosidase	(ONPG)	+	+	+	ND	NA	+	+	15 (4/27)	89 (16/18)
Arginine dihydrolase	(ADH)	+	-	+	ND	NA	+	+	100	44 (8/18)
Lysine decarboxylase	(LDC)	+	+	+	ND	NA	+	-	96 (26/27)	28 (5/18)
Ornithine decarboxylase	(ODC)	-	+	-	ND	NA	-	-	0	6 (1/18)
Citrate utilization	(CIT)	-	+	+	ND	+	+	+	85 (23/27)	67 (12/18)
H ₂ S production	(H₂S)	-	-	-	ND	NA	-	-	0	0
Urease	(URE)	-	-	-	ND	NA	+	-	0	0
Tryptophan deaminase	(TDA)	+	+	+	ND	NA	+	+	96 (26/27)	100
Indole production	(IND)	+	+	+	ND	-	+	+	0	0
Acetoin production	(VP)	+	+	-	ND	+	+	-	26 (7/27)	50 (9/18)
Gelatinase	(GEL)	+	+	+	ND	NA	+	+	81 (22/27)	100
glucose	(GLU)	+	+	+	ND	+	+	+	100	100
mannitol	(MAN)	+	+	+	ND	+	+	+	100	100
inositol	(INO)	-	-	-	ND	NA	-	-	0	0
sorbitol	(SOR)	-	-	-	ND	NA	+	-	0	0
rhamnose	(RHA)	-	-	-	ND	NA	-	-	0	0
sucrose	(SAC)	+	+	+	ND	+	+	+	100	100
melibiose	(MEL)	-	-	-	ND	NA	-	-	0	0
amygdalin	(AMY)	-	-	-	ND	NA	+	+	0	0
arabinose	(ARA)	-	-	-	ND	-	+	+	0	0
Oxidase	(OX)	+	+	+	ND	NA	+	+	100	100
Catalase	(CAT)	+	+	+	+	NA	ND	ND	100 (31/31)	100 (19/19)
β-αιμόλυση		+	+	+	ND	NA	+	+	100 (31/31)	100 (18/18)
Κινητικότητα		+	+	+	+	+	+	+	94 (29/31)	100 (19/19)
Παραγωγή χρωστικής		-	-	-	-	NA	-	-	94 (29/31)	100 (19/19)*
Ανθεκτικότητα σε Ο/129 (150 μg)		+	+	+	+	NA	+	+	100 (22/22)	100 (15/15)

Πίνακας 16. Φαινοτυπικοί (κινητικότητα, χρωστική) και βιοχημικοί χαρακτήρες που αναλύθηκαν με το σύστημα ΑΡΙ 20Ε, καθώς και τα αποτελέσματα για τη β-αιμόλυση και της ανθεκτικότητας στον παράγοντα Ο/129.

a: LMG 3785 *A. veronii* bv. *sobria*, b: LMG 9075 *A. veronii* bv. *veronii*, c: XU1 (*A. veronii*), d: Z 1 (*A. veronii*), e: Ae4 (Martino et al., 2011) (*A. veronii*), f: AG-2.13.2 (*A. salmonicida*), g: AG-2.13.5 (*A. media*), W: Δυτικό Aιγαίο, Ε: Ανατολικό Αιγαίο, (+): Θετική αντίδραση, (-): Αρνητική αντίδραση, (*) Ενδιάμεση παραγωγή χρωστικής, ND: Δεν διεξήχθη, NA: Η πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη

#	Υπόστρωμα	а	b	С	d	е	f	W (%)	E (%)
A1	Αρνητικό control	-	-	-	-	-	-	0%	0%
A2	Dextrin	+	+	+	+	+	+	100%	100%
A3	D-Maltose	+	+	+	+	+	+	100%	100%
A4	D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	100%	11% (2/19)
A5	D-Cellobiose	-	+	-	+	+	+	0%	0%
A6	Gentiobiose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
A7	Sucrose	+	+	+	+	+	+	100%	100%
A8	D-Turanose	-	+	-	-	-	-	0%	0%
A9	Stachyose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
A10	Θετικό control	+	+	+	+	+	+	100%	100%
A11	рН 6	+	+	+	+	+	+	100%	100%
A12	рН 5	-	-	+	+	-	-	55% (17/31)	42% (8/19)
B1	D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
B2	α-D-Lactose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
B3	D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
B4	β-Methyl-D-Glucoside	-	+	+	+	+	+	0%	100%
B5	D-Salicin	-	+	-	-	-	-	0%	5% (1/19)
B6	N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+	+	+	100%	95% (18/19)
B7	N-Acetyl-β-D-Mannosamine	-	-	-	-	-	-	3% (1/31)	0%
B8	N-Acetyl-D-Galactosamine	+	+	+	-	-	-	94% (29/31)	95% (18/19)
B9	N-Acetyl Neuraminic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
B10	1% NaCl	+	+	+	+	+	+	100%	100%
B11	4% NaCl	-	-	-	+	+	+	6% (2/31)	21% (4/19)
B12	8% NaCl	-	-	-	-	-	-	0%	0%
C1	α-D-Glucose	+	+	+	+	+	+	100%	100%
C2	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	100%	95% (18/19)
C3	D-Fructose	+	+	+	+	+	+	100%	100%
C4	D-Galactose	+	+	+	+	+	+	97% (30/31)	95% (18/19)
C5	3-Methyl Glucose	-	-	-	-	-	-	0%	5% (1/19)
C6	D-Fucose	-	Ι	-	+	-	-	3% (1/31)	5% (1/19)
C7	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
C8	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	0%	0%
C9	Inosine	+	+	+	+	+	+	100%	100%
C10	1% Sodium Lactate	+	+	+	+	+	+	100%	100%
C11	Fusidic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	11% (2/19)
C12	D-Serine	+	+	+	+	+	+	100%	95% (18/19)
D1	D-Sorbitol	-	-	-	-	+	-	0%	0%
D2	D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	100%	100%
D3	D-Arabitol	-	-	-	-	Ι	-	6% (2/31)	5% (1/19)
D4	myo-Inositol	-	-	-	-	-	-	0%	0%
D5	Glycerol	+	+	+	+	+	+	97% (30/31)	100%
D6	D-Glucose- 6-PO4	+	+	+	-	+	+	100%	95% (18/19)
D7	D-Fructose- 6-PO4	+	+	+	+	+	+	90% (28/31)	42% (8/19)

Πινακάς 17. Βιοχημικοί χαρακτήρες που αναλυθήκαν με το συστήμα Biolog GENIII IV

D8	D-Aspartic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
D9	D-Serine	+	+	Ι	+	+	+	100%	100%
D10	Troleandomycin	+	+	+	+	+	+	100%	100%
D11	Rifamycin SV	+	+	+	+	+	+	100%	100%
D12	Minocycline	-	-	-	-	Ι	-	0%	0%
E1	Gelatin	+	+	-	+	+	-	6% (2/31)	16% (3/19)
E2	Glycyl-L-Proline	+	Ι	+	+	+	+	97% (30/31)	100%
E3	L-Alanine	+	+	Ι	+	+	+	90% (28/31)	79% (15/19)
E4	L-Arginine	+	-	Ι	+	+	+	97% (30/31)	58% (11/19)
E5	L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+	97% (30/31)	95% (18/19)
E6	L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+	97% (30/31)	95% (18/19)
E7	L-Histidine	+	+	+	+	+	+	94% (29/31)	100%
E8	L-Pyroglutamic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
E9	L-Serine	+	+	+	+	+	+	100%	100%
E10	Lincomycin	+	+	-	+	+	+	87% (27/31)	100%
E11	Guanidine HCl	+	+	+	+	+	+	100%	100%
E12	Niaproof 4	+	+	+	+	+	+	100%	100%
F1	Pectin	+	+	+	Ι	Ι	-	35% (11/31)	21% (4/19)
F2	D-Galacturonic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
F3	L-Galactonic Acid Lactone	-	-	-	-	-	-	0%	0%
F4	D-Gluconic Acid	+	+	+	+	+	+	100%	16% (3/19)
F5	D-Glucuronic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
F6	Glucuronamide	-	-	-	-	-	-	3% (1/31)	16% (3/19)
F7	Mucic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
F8	Quinic Acid	-	-	-	-	-	-	3% (1/31)	0%
F9	D-Saccharic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
F10	Vancomycin	+	+	+	+	+	+	100%	100%
F11	Tetrazolium Violet	-	+	-	+	+	+	55% (17/31)	47% (9/19)
F12	Tetrazolium Blue	+	+	+	+	+	+	90% (28/31)	95% (18/19)
G1	p-Hydroxy- Phenylacetic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
G2	Methyl Pyruvate	+	+	+	+	+	+	87% (27/31)	32% (6/19)
G3	D-Lactic Acid Methyl Ester	-	-	-	-	-	-	0%	0%
G4	L-Lactic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	5% (1/19)
G5	Citric Acid	-	+	+	+	+	-	19% (6/31)	0%
G6	α-Keto-Glutaric Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
G7	D-Malic Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
G8	L-Malic Acid	+	+	+	+	+	+	100%	100%
G9	Bromo-Succinic Acid	+	Ι	+	-	-	-	0%	5% (1/19)
G10	Nalidixic Acid	-	-	+	+	+	-	0%	0%
G11	Lithium Chloride	-	+	-	-	+	-	0%	0%
G12	Potassium Tellurite	-	-	-	-	-	-	3% (1/31)	0%
H1	Tween 40	+	-	+	+	+	+	97% (30/31)	79% (15/19)
H2	γ-Amino-Butryric Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
H3	α-Hydroxy- Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
H4	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid	-	-	-	-	-	-	0%	0%
H5	α-Keto-Butyric Acid	-	-	-	I.	-	-	10% (3/31)	0%

H6	Acetoacetic Acid	-	-	+	Ι	Ι	+	29% (9/31)	16% (3/19)
H7	Propionic Acid	-	-	-	+	Ι	-	6% (2/31)	0%
H8	Acetic Acid	+	-	+	+	+	+	94% (29/31)	95% (18/19)
H9	Formic Acid	+	-	-	+	+	+	6% (2/31)	5% (1/19)
H10	Aztreonam	-	+	-	-	+	Ι	13% (4/31)	5% (1/19)
H11	Sodium Butyrate	+	+	-	+	-	Ι	77% (24/31)	26% (5/19)
H12	Sodium Bromate	-	-	-	-	-	-	32% (10/31)	21% (4/19)

a: LMG 3785 *A. veronii* bv. *sobria*, b: LMG 9075 *A. veronii* bv. *veronii*, c: XU1 (*A. veronii*), d: Z 1 (*A. veronii*), e: AG-2.13.2 (*A. salmonicida*), f: AG-2.13.5 (*A. media*), W: Δυτικό Αιγαίο, Ε: Ανατολικό Αιγαίο, (+): Θετική αντίδραση, (-): Αρνητική αντίδραση, (Ι) Ενδιάμεση αντίδραση, ND: Δεν διεξήχθη, NA: Η πληροφορία δεν είναι διαθέσιμη

3.3.4. Αιμολυτική ικανότητα σε στερεό θρεπτικό

Η ικανότητα πρόκλησης αιμόλυσης σε στερεό θρεπτικό εξετάστηκε για 53 στελέχη (Πίνακας 13) αερομονάδων που αντιστοιχούν στα είδη *A. veronii* (51), *A. media* (1) και *A. salmonicida* (1). Η πρόκληση β-αιμόλυσης, έγινε εμφανής στο ειδικό θρεπτικό ΒΑ με αίμα λαβρακιού μετά από επώαση για 24 - 48 h στους 25°C (Εικόνα 14). Αιμολυτική ικανότητα παρατηρήθηκε για όλα τα στελέχη *Aeromonas* spp. (Πίνακας 16). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ξεχωριστά για μεμονωμένα στελέχη και σαν ποσοστό (%) των θετικών αντιδράσεων για τα στελέχη *A. veronii* από λαβράκι που μελετήθηκαν στην εργασία.



Εικόνα 14. Εμφάνιση β-αιμόλυσης σε στερεό θρεπτικό με αίμα λαβρακιού Α) μετά από 24 h επώασης στους 25°C με το στέλεχος PDB και B) μετά από 48 h επώασης στους 25°C με το στέλεχος NS. Οι εικόνες περιλαμβάνονται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).

3.3.5. Ιεραρχική ανάλυση συστάδων

Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν μόνο στελέχη του είδους *Α. veronii* (52/55). Πέντε κύριες ομάδες αναγνωρίστηκαν (Εικόνα 15) αποτελούμενες από:

 στελέχη του Δ. Αιγαίου, κινητά-θετικά για χρωστική, από τον Αργολικό και το Σαρωνικό κόλπο,

 2) στελέχη του Α. Αιγαίου, κινητά-ενδιάμεσα για χρωστική, από το Αγαθονήσι, την Κάλυμνο και την παράκτια περιοχή Güllück της Τουρκίας,

3) το στέλεχος XU 1, από το ψάρι γλυκού νερού X. helleri,

4) τα δύο στελέχη του Δ. Αιγαίου (NS και NS 13), μη κινητά-αρνητικά για χρωστική, μαζί με το τυπικό του είδους *A. veronii* bv. *sobria* (LMG 3785).

5) το στέλεχος AG 5.34.6 (δειγματοληψία 18) του Α. Αιγαίου, κινητό-ενδιάμεσο για χρωστική, από το Αγαθονήσι, το πιο διαφοροποιημένο ανάμεσα στα στελέχη από το λαβράκι.

Το τυπικό του είδους *Α. veronii* bv. *veronii* (LMG 9075), ήταν το πιο απομακρυσμένο από όλα τα στελέχη που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση και χρησίμευσε ως εξωομάδα. Δεν ανιχνεύθηκαν εσωτερικά πρότυπα ομοιότητας/διαφοροποίησης εντός των ομάδων σύμφωνα με π.χ. την ημερομηνία απομόνωσης ή τη μονάδα εκτροφής. Όταν οι χαρακτήρες για την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής αποκλείστηκαν από το σύνολο των δεδομένων, η ομάδα των NS, NS 13 και LMG 3785, καθώς και το XU 1, ομαδοποιήθηκαν στην ομάδα του Δυτικού Αιγαίου (Εικόνα 16) αναπαριστώντας το πρότυπο Δυτικο/Ανατολικής γεωγραφικής καταγωγής όλων εκτός του τυπικού στελέχους.

Τέλος, τα στελέχη (NS 33.1, NS 49, NS 52, NS 58, TO4-D και Z 1) που δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση που παρουσιάζεται λόγω ατελών δεδομένων για τις βιοχημικές τους ιδιότητες, αναλύθηκαν σε χωριστό σύνολο δεδομένων, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτήρων του Biolog, της κινητικότητας και της παραγωγής χρωστικών ουσιών. Το στέλεχος Z 1 ομαδοποιήθηκε με το AG 5.34.6 και τα υπόλοιπα με την ομάδα του Δυτικού Αιγαίου. Αντίστοιχα, αφαιρώντας τους χαρακτήρες της κινητικότητας και της παραγωγής χρωστικής (μόνο Biolog), το στέλεχος Z 1 ομαδοποιήθηκε με τα δυτικής προέλευσης, ακίνητα και χωρίς χρωστική στελέχη NS και NS 13 και τα υπόλοιπα με την ομάδα του Δυτικού Αιγαίου. Τα δενδρογράμματα αυτά δεν παρουσιάζονται προς αποφυγή πλεονασμού.

97



Εικόνα 15. Δενδρόγραμμα της Ιεραρχική ανάλυσης συστάδων για 45 στελέχη *Α. veronii* που απομονώθηκαν από άρρωστα λαβράκια. Συμπεριλήφθηκαν επίσης, το στέλεχος XU 1 (*X. helleri*) και τα τυπικά στελέχη του είδους *Α. veronii* bv. *sobria* (LMG 3785) και *Α. veronii* bv. *veronii* (LMG 9075). Στους χαρακτήρες που αναλύθηκαν (119) περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις των API 20E, BIOLOG, καταλάσης, κινητικότητας, παραγωγής χρωστικής και βαιμόλυσης. Τα στελέχη του Δυτικού Αιγαίου συμβολίζονται με (W) και του Ανατολικού Αιγαίου με (Ε). Ο αστερίσκος (*) υποδεικνύει τα στελέχη για τα οποία διεξήχθη αλληλούχιση ολικού γονιδιώματος. Η εικόνα συμπεριλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2019).



Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)

Εικόνα 16. Δενδρόγραμμα της Ιεραρχική ανάλυσης συστάδων για 45 στελέχη *Α. veronii* που απομονώθηκαν από άρρωστα λαβράκια. Συμπεριλήφθηκαν επίσης, το στέλεχος XU 1 (*X. helleri*) και τα τυπικά στελέχη του είδους *Α. veronii* bv. *sobria* (LMG 3785) και *Α. veronii* bv. *veronii* (LMG 9075). Στους χαρακτήρες που αναλύθηκαν (117) περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις των API 20E, BIOLOG, καταλάσης, και β-αιμόλυσης ενώ έχουν αφαιρεθεί οι χαρακτήρες που σχετίζονται με την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής Τα στελέχη του Δυτικού Αιγαίου συμβολίζονται με (W) και του Ανατολικού Αιγαίου με (E). Η εικόνα συμπεριλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2019).

3.3.6. Ευαισθησία σε αντιβιοτικά

Οι δοκιμασίες χημικής ευαισθησίας διεξήχθησαν συνολικά για 53 στελέχη (Πίνακας 13) αερομονάδων, που αντιστοιχούν στα είδη *A. veronii* (51), *A. media* (1) και *A. salmonicida* (1). Όλα τα στελέχη *A. veronii* ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλλίνη. Όλα τα στελέχη *A. veronii* άταν ανθεκτικά στην αμπικιλλίνη, την τετρακυκλίνη, το οξιλινικό οξύ και την φλορφενικόλη. Όλα εκτός από ένα (NS 6.25.1, I) ήταν ευαίσθητα στη φλουμεκίνη και όλα εκτός από δύο (NS 6.25.1 και NS 6.27.1) στις ενισχυμένες σουλφοναμίδες. Τα στελέχη *A. veronii* XU 1 και Z 1, γλυκού νερού, ήταν ανθεκτικά στην οξυτετρακυκλίνη, την τετρακυκλίνη και το οξολινικό οξύ (XU 1, I). Το Z 1 ήταν επίσης ανθεκτικό στη φλουμεκίνη.

Τα στελέχη *A. salmonicida* (AG-2.13.2) και *A. media* (AG-2.13.5) από λαβράκι ήταν επίσης ανθεκτικά στην αμπικιλλίνη και το βιμπριοστατικό παράγοντα O/129. Το στέλεχος *A. salmonicida* (AG-2.13.2) παρουσίασε ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη, την τετρακυκλίνη, το οξολινικό οξύ και τη φλουμεκίνη (Ι). Το στέλεχος *A. media* (AG-2.13.5) παρουσίασε ευαισθησία στα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Η ευαισθησία των *A. veronii* στα αντιβιοτικά παρουσιάζεται ως μέση διάμετρος αναστολής (mm) για τα στελέχη κάθε περιοχής (Ανατολικό/Δυτικό Αιγαίο) και ως διάμετρος αναστολής για τα υπόλοιπα διακριτά/μοναδικά στελέχη *Aeromonas* spp. καθώς και όσα εμφάνισαν ακραίες τιμές στον Πίνακας 18.

Η δοκιμή ευαισθησίας στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 έδειξε μία μικρή ζώνη αναστολής (Δ. Αιγαίο) ή μικρή αμυδρή ζώνη αναστολής (Α. Αιγαίο) που κυμαίνονταν μεταξύ 7-9 mm για την πλειονότητα στελεχών *Α. veronii* που ελέγχθηκαν. Παρ' όλ' αυτά, βακτηριακή αύξηση ήταν επίσης εμφανής σε αυτή την περιοχή και η αναστολή δεν ήταν εμφανής μετά τις 48 h επώασης (πλήρης αύξηση). Για το λόγο αυτό, όλα τα στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι καταγράφηκαν (Πίνακας 18) ως ανθεκτικά στο βιμπριοστατικό παράγοντα O/129 συμπεριλαμβανομένων των στελεχών NS και PDB που αρχικά αναφέρθηκαν ως ευαίσθητα (Smyrli et al., 2017). Ανθεκτικότητα στον ίδιο παράγοντα παρατηρήθηκε επίσης για τα τυπικά του είδους *Α. veronii* στελέχη LMG 3785 και LMG 9075, για τα στελέχη XU 1 και Z 1, γλυκού νερού και τα στελέχη AG-2.13.2 (*Α. salmonicida*) και AG-2.13.5 (*Α. media*) από λαβράκι.

				Διάμετρος Αναστολής						
# Δειγματοληψίας	Περιοχή	Τοποθεσία	# Στελεχών/Τοποθεσία	OT (30 µg)	ТЕ (30 ця)	UB (30 µg)	SXT (25 µg)	ОА (2 ця)	FFC (30 ւտ)	AMP (10 µg)
1-10	W	Αργολικός	22	37±3	36±4	35±5	28±7	33±3	39±3	<u>(10 μg)</u> 0
		,	(NS 6.25.1)			19	11			
			(NS 6.27.1)				6			
11	W	Αργολικός	1	42	42	44	30	38	42	
12-14	W	Σαρωνικός	7	37±2	37±2	35±3	28±3	32±3	39±2	0
15-19	E	Αγαθονήσι	9	37±1	36±2	37±1	22±2	31±1	40±1	0
20-22	E	Κάλυμνος	7	35±1	36±2	36±1	20±3	30±2	38±2	0
23	E	Güllück	2	35±4	35±1	35±5	21±1	34±0	41±1	0
24	E	Bodrum	1	30	30	33	22	29	37	0
15	E	Αγαθονήσι	1 (a)	7	11	22	19	8	25	0
15	E	Αγαθονήσι.	1 (b)	25	25	36	16	30	29	0
25	Γλυκό νερό	Ξάνθη	1 (c)	7	11	0	24	0	34	0
26	Γλυκό νερό	Ηράκλειο	1 (d)	7	12	28	24	15	40	0

Πίνακας 18. Προφίλ ευαισθησίας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη Aeromonas spp. που μελετήθηκαν. Η απόκριση παρουσιάζεται ως μέση διάμετρος (mm) αναστολής για τα στελέχη κάθε τοποθεσίας και ως διάμετρος (mm) αναστολής για τα μοναδικά στελέχη και όσα παρουσίασαν ακραίες τιμές.

W: Δυτικό Αιγαίο, Ε: Ανατολικό Αιγαίο, OT: Oxytetracycline, TE: Tetracycline, UB: Flumequine, SXT: Sulphamethoxazole/Trimethoprim, OA: Oxolinic acid, FFC: Florfenicol, AMP: Ampicillin, a: AG-2.13.2 (*A. salmonicida*), b: AG-2.13.5 (*A. media*), c: Z 1, d: XU 1

3.4. Αλληλούχιση νέας γενιάς

Τα στελέχη που αλληλουχήθηκαν καλύπτουν ένα χρονικό διάστημα επτά ετών ξεκινώντας από την πρώτη απομόνωση (2009) στην οποία βασίστηκε η περιγραφή της ασθένειας. Η βασική χωρική διάκριση περιλαμβάνει τις δύο περιοχές του Αιγαίου (Ανατολικό και Δυτικό) και ακολούθως τις επιμέρους τοποθεσίες και ιχθυοτροφικές εκμεταλλεύσεις σε κάθε περιοχή. Στο σύνολο στελεχών που αλληλουχήθηκαν αντιπροσωπεύονται και οι τρεις διαφορετικοί φαινότυποι όσον αφορά την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής. Τέλος, εννέα από τα δέκα στελέχη προέρχονται από εκτρεφόμενα σε θαλασσινό νερό νοσούντα λαβράκια και από ένα ακόμα από περιστατικό ασθένειας σε εκτρεφόμενα σε γλυκό νερό ψάρια του είδους *Χ. helleri.* Τα γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος για κάθε στέλεχος παρουσιάζονται στον Πίνακας 5.

Τα δέκα γονιδιώματα που αλληλουχήθηκαν κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GenBank, NCBI με τους ακόλουθους αριθμούς πρόσβασης (Accession Number): NZ NMUR00000000.1 (NS), NZ NMUS00000000.1 (PDB), NZ NPKE00000000.1 (NS 2), NZ NPKC0000000.1 (NS 6.15.2), NZ NQMB0000000.1 (NS 13), NZ NQMC0000000.1 (NS 22), NZ NNSE0000000.1 (AG 5.28.6), NZ NNSF0000000.1 (VCK NZ NPKD0000000.1 1), (BIOO50A) και NZ SSUX0000000.1 (XU 1).

Μετά τη *de novo* συναρμολόγηση (assembly), ο αριθμός των συναρμολογημάτων DNA (contigs) στα γονιδιώματα των διαφορετικών στελεχών κυμάνθηκε μεταξύ 92-172. Το μήκος των επικαλυπτόμενων τμημάτων DNA κυμάνθηκε μεταξύ 27,5-52,8 kb. Το συνολικό μήκος των γονιδιωμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 4.607-4.804 kb. Τα πλήρη δεδομένα της γονιδιωματικής συναρμολόγησης παρουσιάζονται στον Πίνακας 19. Τα ποιοτικά δεδομένα της γονιδιωματικής συναρμολόγησης με την ανάλυση BUSCO παρουσιάζονται στον Πίνακας 20.

102

Strain	NS	PDB	NS 2	NS 6.15.2	NS 13	NS 22	AG 5.28.6	VCK 1	BIOO50 A	XU 1
# Contigs	140	141	143	149	139	172	98	120	109	92
Συνολικό μήκος (bp)	4.708.836	4.720.227	4.716.998	4.716.486	4.672.256	4.741.998	4.607.031	4.629.882	4.613.472	4.804.774
Μέσο μήκος (bp)	33.634,54	33.476,79	32.986	31.654,27	33.613,35	27.564,94	47.010,52	38.582,35	42.325,43	52.789
Κάτω τεταρτημόριο	3.962	4.234	3.394	3.056	3.234	3.117	8.445	6.298	7.046	289
Διάμεσος	19.933	16.770	16.833	19.178	18.735	16.050	33.913	22.192	30.924	723
Άνω τεταρτημόριο	50.855	51.929	54.849	51.778	50.524	40.085	65.758	53.620	59.952	49.193
Μικρότερο μέγεθος (bp)	402	313	375	325	335	321	562	349	369	204
Μεγαλύτερο μέγεθος (bp)	213.985	199.691	165.446	165.343	214.088	165.549	458.303	247.593	458.476	579.123
N50	67.042	72.590	69.902	66.300	72.418	61.224	85.872	68.239	73.700	206.195
Κάλυψη (coverage)	100.0x	190.0x								

Πίνακας 19. Δεδομένα γονιδιωματικής συναρμολόγησης για κάθε στέλεχος.

CDS: Κωδικές αλληλουχίες (coding sequences)

Στέλεχος	Πληρότητα %	Μονά αντίγραφα %	Διπλ/σμοί %	Κατακερμ/σμοί %	Ελλείψεις %	# Γονιδίων
NS	94.6	93.9	0.7	0.0	5.4	148
	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148
PDB	94.6	93.9	0.7	0.0	5.4	148
	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148
NS 2	94.6	93.9	0.7	0.0	5.4	148
	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148
NS 6.15.2	94.6	93.9	0.7	0.0	5.4	148
	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148
NS 13	93.9	93.2	0.7	0.7	5.4	148
	98.7	98.0	0.7	0.7	0.6	148
NS 22	94.6	93.9	0.7	0.0	5.4	148
	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148
AG 5.28.6	94.6	94.6	0.0	0.0	5.4	148
	99.3	99.3	0.0	0.0	0.7	148
VCK	94.6	93.2	1.4	0.0	5.4	148
	99.4	98.0	1.4	0.0	0.6	148
BIOO50 A	94.6	93.9	0.7	0.0	5.4	148
	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148
XU 1	99.3	98.6	0.7	0.0	0.7	148

Πίνακας 20. Ποιοτικά δεδομένα της γονιδιωματικής συναρμολόγησης με την ανάλυση BUSCO.

Άνω σειρά: γενική σύγκριση με βακτήρια, Κάτω σειρά: Ειδο-ειδική (Species specific) σύγκριση

3.4.1. Πολυτοπική τυποποίηση αλληλουχίας

Η σύγκριση των αλληλομόρφων των εννέα στελεχών *Α. veronii* από λαβράκια στη βάση δεδομένων PubMLST, έδειξε ότι όλα ανήκαν στον αλληλουχικό τύπο (sequence type, ST) 23 (τύπος αλληλίου για gyrB: 25, groL: 24, gltA: 25, metG: 24, ppsA: 22 και recA: 24). Το προφίλ αυτό αντιστοιχεί στα στελέχη *Α. veronii* Ae4 και Ae59, τα οποία απομονώθηκαν το 1999 από άρρωστα λαβράκια στην Ιταλία.

Το στέλεχος XU 1 δεν ταυτίστηκε με κανένα ST στη βάση δεδομένων. Η σύγκριση των αλληλομόρφων του ανέδειξε ένα μεταβλητό προφίλ (τύπος αλληλίου για το gyrB: 119, groL: 316, gltA: 227, metG: 175, ppsA: 145 και recA: 40) στο οποίο κάθε αλληλόμορφο ανήκε σε διαφορετικό ST (139, 438, 289, 201, 159 και 39 αντίστοιχα), ξενιστή/πηγή απομόνωσης.

Στην ανάλυση NJ, τα εννέα στελέχη από το λαβράκι και το στέλεχος XU 1 ομαδοποιήθηκαν και σχημάτισαν ένα μονοφυλετικό κλάδο με το στέλεχος *A. veronii* B565 (Εικόνα 17). Τα στελέχη από το λαβράκι παρουσίασαν 100% ομοιότητα (0% γενετική απόσταση) στις πλήρεις αλληλουχίες των γονιδίων gltA, groL, gyrB, metG και recA ενώ για το γονίδιο ppsA η απόσταση υπολογίστηκε στο 0,001%. Η μέση γενετική απόσταση σε όλο τον κλάδο του *Α. veronii* ήταν: 0,006% για το gltA, 0,011% για το groL, 0,006% για το gyrB, 0,011% για το metG, 0,019% για το ppsA και 0,012% για το recA.



Εικόνα 17. Φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ στελεχών από λαβράκι και άλλων Aeromonas spp. σύμφωνα με την τοπολογία της ανάλυσης σύνδεσης γειτόνων (NJ)-MLST, με πλήρεις αλληλουχίες των γονιδίων gyrB, groL, gltA, metG, ppsA και recA μετά από συναλύσωση. Οι αριθμοί στους κλάδους υποδεικνύουν τις τιμές στατιστικής υποστήριξης (bootstrap) τους. Η εικόνα συμπεριλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2019).

3.4.2. Σύγκριση ολικού γονιδιώματος

Τα γονιδιώματα από τα εννέα στελέχη από λαβράκι εμφάνισαν υψηλές μέσες τιμές ομοιότητας (Average Nucleotide Identity by Orthology, ANI) που κυμαίνονται μεταξύ 99,65%-99,99%, όπως υπολογίστηκαν στο Ortho-ANI. Μέγιστη ομοιότητα (≥99,97%) παρατηρήθηκε εσωτερικά των ομάδων στελεχών διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης (Ανατολικό/Δυτικό Αιγαίο) (Εικόνα 18 Α). Οι μέσες τιμές ANI των στελεχών NS και VCK 1 με 22 άλλα γονιδιώματα (μεταξύ αυτών και του XU 1) *Α. veronii* ήταν 96% ± 0,5% και για τα δύο. Περαιτέρω συγκρίσεις με άλλα *Aeromonas* spp. παρουσιάζονται στην Εικόνα 18 Β. Όλες οι τιμές ANI που εκτιμήθηκαν με την ανάλυση αυτή παρουσιάζονται στον Πίνακας 21. μέσης ομοιότητας γονιδιωμάτων:



Εικόνα 18. Α) Μέση γονιδιωματική ομοιότητα μεταξύ των εννέα στελεχών *Α. veronii* από λαβράκι. Β) Μέση γονιδιωματική ομοιότητα μεταξύ των στελεχών NS και VCK 1 από λαβράκι με άλλα στελέχη του είδους *Α. veronii* και *Aeromonas* spp. Η εικόνα συμπεριλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2019).

Πίνακας 21. Ομοιότητα των στελεχών από λαβράκι NS (Δ. Αιγαίο) και VCK 1 (Α. Αιγαίο) με άλλα στελέχι	η του είδους Α. veronii καθώς και άλλων ειδών Aeromonas εκφραζόμενη ως % ANI τιμές
όπως εκτιμήθηκαν στο πρόγραμμα Ortho-ANI.	

	Accession No Strain		Isolation Source	Species	Ortho-ANI %		
					NS	VCK	
1	CP012504	TH0426	Pelteobagrus fulvidraco	A. veronii	96,3	96,4	
2	CP015448	CB51	grass carp	A. veronii	96,2	96,2	
3	CP024930	X11	Megalobrama amblycephala	A. veronii	96,3	96,4	
4	CP024933	X12	Megalobrama amblycephala	A. veronii	96,3	96,3	
5	CP028133	17ISAe	Symphysodon discus	A. veronii	96,2	96,3	
6	NZ_PZKL00000000	XH.VA.1	Ictalurus punctatus	A. veronii	96,2	96,3	
7	NZ_RAWX00000000	MS 17-88	catfish	A. veronii	96,3	96,3	
8	NZ_CP033604	MS-18-37	catfish	A. veronii	96,4	96,5	
9	NZ_ATFB00000000	Hm21	Hirudo verbana-digestive tract	A. veronii	96,5	96,5	
10	RZII0000000	CQ-AV1	Andrias davidianus (Chinese giant salamander)	A. veronii	96,2	96,3	
11	NC_015424	B565	aquaculture pond sediment	A. veronii	96,4	96,5	
12	NZ_NJGB0000000	A29	surface water	A. veronii	96,3	96,4	
13	NZ_CDBU0000000	CECT 4486	surface water	A. veronii	96,2	96,2	
14	NZ_CDBQ0000000	LMG 13067	emvironmental	A. veronii	96,5	96,6	
15	CP014774	AVNIH1	Human-perirectal culture	A. veronii	96,3	96,3	
16	CP032839	FC951	Human-feces	A. veronii	96,2	96,3	
17	NZ_PPTE00000000	126-14	stool sample- Homo sapiens	A. veronii	96,4	96,4	
18	NZ_JH823256	AMC34	Human Microbiome Project (HMP)	A. veronii	93 <i>,</i> 8	93,9	
19	NZ_AGWT00000000	AER39	Human Microbiome Project (HMP)	A. veronii	96,4	96,4	
20	NZ_CDDK0000000	CECT 4257	sputum of drowning victim-human	A. veronii	96,4	96,5	
21	NZ_LKJN00000000	TTU2014-108AME	dairy cattle	A. veronii	96,3	96,4	
22	NZ_NXBU00000000	Z2-7	pork	A. veronii	96,2	96,3	
23	NZ_SSUX0000000	XU 1	Xiphophorus helleri	A. veronii	96,4	96,5	
24	NC_008570	ATCC 7966	tin of milk with a fishy odor	A. hydrophila subsp. hydrophila	84,5	85,8	
25	CP000644	A449	<i>Salmo trutta</i> (brown trout)	A. salmonicida subsp. salmonicida	84,5	86,0	

3.4.3. Σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης SNPs ομαδοποίησαν τα εννέα στελέχη από λαβράκια σε ομάδες που αντιπροσωπεύουν τη γεωγραφική τους προέλευση σε Ανατολικού (BIOO50A, VCK 1, AG 5.28.6) και Δυτικού (NS, NS 2, NS 13, NS 22, NS 6.15.2 και PDB) Αιγαίου (Εικόνα 19). Στην ομάδα του Δ. Αιγαίου διακρίθηκαν οι δύο φαινοτυπικές ομάδες: αρνητικά (NS, και NS 13) και θετικά (NS 2, NS 22, NS 6.15.2 και PDB) για την κινητικότητα και παραγωγή χρωστικής στελέχη.



Εικόνα 19. Εξελικτική σχέση των εννέα στελεχών *Α. veronii* από λαβράκι σύμφωνα με την ανάλυση ML σε σημειακούς νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNP). Η εικόνα συμπεριλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2019).

Η διαφοροποίηση των SNPs μεταξύ των στελεχών Ανατολικού-Δυτικού Αιγαίου ήταν >3700 (Πίνακας 22). Η διαφορά SNP μεταξύ των ανατολικών στελεχών ήταν 7-15 και μεταξύ των δυτικών στελεχών 6 - 168. Στην ομάδα των δυτικών στελεχών, τα αρνητικά για την κινητικότητα και παραγωγή χρωστικής στελέχη (NS και NS 13) διέφεραν σε 40 SNP και τα θετικά (NS 2, NS 22, NS 6.15.2 και PDB) για τους παραπάνω χαρακτήρες στελέχη σε 40 - 49 SNP.
	NS	PDB	NS 2	NS 6.15.2	NS 13	NS 22	AG 5.28.6	VCK 1	BIOO50A
NS									
PDB	119								
NS 2	146	49							
NS 6.15.2	137	40	11						
NS 13	40	139	168	159					
NS 22	139	40	15	6	159				
AG 5.28.6	3795	3836	3863	3854	3817	3856			
VCK 1	3797	3838	3856	3856	3819	3858	18		
BIOO50A	3794	3835	3862	3853	3816	3855	15	7	

Πίνακας 22. Σημειακοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στα εννέα στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι που αλληλουχήθηκαν.

3.4.4. Αντιγονική ποικιλότητα – Αντίστροφη εμβολιολογία

Συνολικά ανιχνεύθηκαν 65 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης με το πρόγραμμα PSORTb (βαθμολογία \ge 8/10). Μεταξύ αυτών, 43 προβλέφθηκαν μέσω του PRED-TMBB2 να περιέχουν διαμεμβρανικούς (transmembrane, TM) βήτα-κλώνους και συγκρίθηκαν περαιτέρω ανάμεσα σε διαφορετικά στελέχη (Πίνακας 23). Ανιχνεύθηκαν δεκαοκτώ πορίνες (παθητική μεταφορά θρεπτικών από το περιβάλλον) και μεμβρανικά στοιχεία όπως πρωτεΐνες του συστήματος TonB (ενεργή πρόσδεση και μεταφορά του σιδήρου και άλλων θρεπτικών από το περιβάλλον), του παράγοντα της εξωτερικής μεμβράνης TolC (μεταφορά τοξικών μορίων έξω από το κύτταρο), η πρωτεΐνη ShlB του εκκριτικού μονοπατιού TPS (two-partner secretion) που συμμετέχει στην ενεργοποίηση και έκκριση της αιμολυσίνης στον ξενιστή και η πρωτεΐνη προσκόλλησης (adhesin) filamentous hemagglutinin επίσης του μονοπατιού TPS. Εντοπίστηκαν επίσης, η πρωτεΐνη LptD που συμμετέχει στη συναρμολόγηση του λιποπολυσακχαρίτη (lipopolysaccharide, LPS) του κυτταρικού τοιχώματος και οι πρωτεΐνες MshL και pilQ του εκκριτικού συστήματος IV (type IV secretion system).

Τα προφίλ των ΟΜΡ ήταν παρόμοιο μεταξύ των εννέα στελεχών από λαβράκι. Όλες οι πρωτεΐνες που ανακτήθηκαν από το VCK 1 ανιχνεύθηκαν στα άλλα γονιδιώματα λαβρακιού. Στις περισσότερες περιπτώσεις υπήρξε υψηλή ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία (≥ 99%) των στελεχών από το λαβράκι και οι μικρές διαφορές που εντοπίστηκαν αντικατοπτρίζουν κατά κύριο λόγο τη γεωγραφική προέλευση (Δυτικό/Ανατολικό Αιγαίο) (Πίνακας 23).

Σημαντική διαφοροποίηση παρατηρήθηκε στη Maltoporin LamB (ομοιότητα 53%) μεταξύ των στελεχών του Δυτικού/Ανατολικού Αιγαίου. Επιπλέον, διαφορές εντοπίστηκαν στην αλληλουχία της πρωτεΐνης MshL των στελεχών PDB, NS 22 και AG 5.28.6 όπου βρέθηκαν κωδικόνια λήξης (όπως προέκυψε από τη μετάφραση του γονιδίου στο Geneious). Η αλληλουχία της BamA διέφερε σε 16 - 17 αμινοξέα (aa) μεταξύ των στελεχών Δυτικού/Ανατολικού Αιγαίου, ενώ τα πιο πρόσφατα δυτικά στελέχη διέφεραν σε 1 aa από τα παλαιότερα. Η πρωτεΐνη transporter CDS-1, διέφερε σε 2aa μεταξύ των τριών διαφορετικών φαινοτύπων: αρνητικά για χρωστική και κινητικότητα στελέχη του Δ. Αιγαίου (NS, NS 13), θετικά για χρωστική και κινητικότητα στελέχη του Δ. Αιγαίου (VCK 1, BIOO50A, AG 5.28.6).

Το γονίδιο για την πρωτεΐνη S-layer ανακτήθηκε ατελές (κάθε τμήμα που ανακτήθηκε αντιστοιχεί σε ένα contig) στα στελέχη NS, NS 2, PDB, VCK 1, and AG 5.28.6 (από τις δύο πλευρές του Αιγαίου). Επιπλέον στα στελέχη BIOO50A and NS 13, NS 22 και NS 6.15.2 όπου ανακτήθηκε η πλήρης αλληλουχία, παρά το υψηλό ποσοστό αμινοξικής ομοιότητας, η πρωτεΐνη διέφερε σε μήκος κατά 87 aa μεταξύ των στελεχών Δυτικού/Ανατολικού Αιγαίου. Το γονίδιο της filamentous hemagglutinin ανακτήθηκε με μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, συμπεριλαμβανομένων κωδικονίων λήξης στα στελέχη PDB, VCK 1 και AG 5.28.6 (από τις δύο πλευρές του Αιγαίου). Τα υπόλοιπα στελέχη Δυτικού/Ανατολικού Αιγαίου είχαν ίδιες πρωτεϊνικές αλληλουχίες.

Σε σύγκριση με στελέχη από άλλες πηγές απομόνωσης, οι αμινοξικές αλληλουχίες των στελεχών λαβρακιού παρουσίασαν μεγαλύτερη ομοιότητα με αυτές του στελέχους B565 σε σχέση με το XU 1 (Πίνακας 23). Η αμινοξική αλληλουχία της maltoporin LamB ήταν ταυτόσημη στα στελέχη από λαβράκι του Δ. Αιγαίου και στο στέλεχος B565. Σε λίγες περιπτώσεις όπως π.χ. της πρωτεΐνης TonB-dependent hemoglobin/transferrin/lactoferrin family receptor και της LPS-assembly protein LptD, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ομοιότητα των στελεχών από λαβράκι με το κλινικό στέλεχος XU 1. Τέλος, τα γονίδια των πρωτεϊνών PgaA, ShlB/FhaC/HecB hemolysin secretion/activation protein, S-layer και filamentous hemagglutinin δεν εντοπίστηκαν στα στελέχη B565 και XU 1 με τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε.

110

Πίνακας 23. Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs) όπως ανιχνεύθηκαν στα εννέα στελέχη *A. veronii* από λαβράκι. Το Locus tag αναφέρεται στο γονιδίωμα του στελέχους VCK 1. Παρουσιάζονται, η βαθμολογία για τον εντοπισμό στην εξωτερική μεμβράνη από το PSORTb, ο τύπος των πεπτιδίων σήματος (SPI και SPII) της γενικής οδού έκκρισης (Sec) που ανιχνεύτηκαν από το Signal IP, ο αριθμός των διαμεμβρανικών (TM) α-ελικών και β-κλώνων που ανιχνεύθηκαν από τα TOPCONS και το PRED-TMBB2 αντίστοιχα. Παρουσιάζεται επίσης η ομολογία της τρισδιάστατης δομή με πρωτεΐνες που έχουν κατατεθεί στην Protein Data Bank (PDB) όπως ανιχνεύθηκε μέσω της ανάλυσης στο TOPCONS. Οι αποστάσεις της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών παρουσιάζονται ως% ομοιότητα μεταξύ των στελεχών από λαβράκι (W/E) και μεταξύ των στελεχών λαβρακιού και των στελεχών B565 (*A. veronii*) και XU 1.

Οικογένεια πρωτεϊνών	OMPs	Locus tag (VCK 1)	Μέγεθος πρωτεΐνης (# aa)	Outer membrane score	Τύπος πεπτιδίου σήματος	# TM a helix		# beta strands	% Ομοιότη τα W/Ε	% Ομοιότη τα W/E vs B565	% Ομοιότη τα W/E vs XU 1
				PSORTb	(Signal IP)	(TOPCON S)	PDB	(PRED- TMBB2)			
OmpA	porin OmpA CDS-1	CHH34 RS04205	332	10	Sec/SPI	0		8	100	99	98
OmpA	hypothetical protein CDS-8	CHH34 RS04210	345	9,92	Sec/SPI	0		8	100	99	99
OmpA	porin OmpA CDS-2	CHH34 RS04195	339	9,93	Sec/SPI	0		8	100	>99	92
OmpA	porin OmpA CDS-3	CHH34 RS09970	345	10	Sec/SPI	0		8	>99	100	100
OmpA	porin OmpA CDS-4	CHH34 RS06330	364	10	Sec/SPI	0		8	>99	96	91
GBP-4	porin CDS-1	CHH34 RS07420	359	10	Sec/SPI	0		16	100	100	98
GBP-4	porin CDS-3	CHH34 RS01740	374	10	Sec/SPI	0		14	100	75	NF
GBP-1	porin CDS-2	CHH34 RS15860	363	10	Sec/SPI	0		14	100	99	90
OmpW	outer membrane protein W	CHH34 RS11385	198	10	Sec/SPI	0		10	100	80	78
FadL	long-chain fatty acid transporter	CHH34 RS11225	445	10	Sec/SPI	0		14	>99	75	80

FadL	transporter CDS-1	CHH34 RS02470	394	9,95	Sec/SPI	0	14	99	99	NF
SP	maltoporin LamB	CHH34 RS04820	412	10	Sec/SPI	0	16-18	53	100W/ 53E	>21
SP	carbohydrate porin	CHH34 RS00300	496	10	Sec/SPI	0	18	100	96	97
OprD	outer membrane porin OprD family	CHH34 RS20270	480	9,52	Sec/SPI	0	18	100	81	NF
OmpIP/Omp 85	bamA	CHH34 RS04745	843	10	Sec/SPI	0	16	≥98	>93	>90
OmpIP/Omp 85	outer membrane protein assembly factor	CHH34 RS00800	591	9,52	Sec/SPI	0	16	>99	>99	>99
PGA	pgaA	CHH34 RS10170	797	9,49	Sec/SPII	0	20	>99	NF	NF
Tsx	hypothetical protein CDS-7	CHH34 RS04955	280	9,93	Sec/SPI	0	12	100	73	76
OMR-TonB	TonB-dependent copper receptor	CHH34 RS03435	655	9,93	Sec/SPII	0	20	100	98	96
OMR-TonB	TonB-dependent receptor CDS-1	CHH34 RS16660	621	10	Sec/SPI	0	20	100	97	NF
OMR-TonB	TonB-dependent receptor CDS-2	CHH34 RS00850	650	10	Sec/SPI	0	22	100	99	92
OMR-TonB	TonB-dependent receptor CDS-3	CHH34 RS17715	851	10	Sec/SPI	0	24	>99	92	NF
OMR-TonB	TonB-dependent siderophore receptor CDS-1	CHH34 RS07450	680	10	Sec/SPI	0	22	>99	>99	72
OMR-TonB	TonB-dependent siderophore receptor CDS-2	CHH34 RS15735	698	10	Sec/SPI	0	20	>99	99	90
OMR-TonB	TonB-dependent hemoglobin/transferrin/l	CHH34 RS16045	686	10	Sec/SPI	0	22	100	58	95

	actoferrin family receptor										
OMR-TonB	ligand-gated channel protein	CHH34 RS11655	647	10	Sec/SPI	0		20	>99	97	96
OMF	outer membrane channel protein TolC	CHH34 RS03655	439	10	Sec/SPI	0	<u>4mt4</u> <u>C</u>	2	100	>99	>99
OMF	channel protein TolC	CHH34 RS08470	441	10	Sec/SPI	0		4	>99	>99	98
OMF	TolC family protein	CHH34 RS07835	449	9,49	other	0		2	100	98	94
OMF	efflux transporter outer membrane subunit	CHH34 RS00255	454	9,95	Sec/SPII	0	<u>4mt4</u> <u>C</u>	2	100	98	97
Imp/OstA/LP S-EP	LPS-assembly protein LptD	CHH34 RS07520	814	10	Sec/SPI	0		24	>99	94	98
TPS	ShIB/FhaC/HecB family hemolysin secretion/activation protein	CHH34 RS14970	475	9,98	other	0		12	100	NF	NF
TcfC	hypothetical protein CDS-9	CHH34 RS18685	770	9,99	Sec/SPI	0		22	100	88	NF
Secretin	pilus (MSHA type) biogenesis protein MshL	CHH34 RS12000	557	10	Sec/SPII	0		4	100	99	99
Secretin	pilQ	CHH34 RS15315	741	10	Sec/SPI	0		4	100	>99	>99
SspA	DUF481 domain- containing protein	CHH34 RS18430	329	10	Sec/SPI	0		14	≥94	>96	>95
	penicillin-binding protein	CHH34 RS03385	1027	9,49	other	1	<u>3fwlA</u>	20	>99	>99	>99
	murein transglycosylase A	CHH34 RS05305	383	8,28	Sec/SPII	0		2	>99	>99	>99
	beta-N- acetylhexosaminidase	CHH34 RS00690	887	9,93	Sec/SPI	0		2	>99	>99	>99

TIGR02099	TIGR02099 family protein	CHH34 RS16795	1288	9,49	other	3	18	99	>98	99
TPS-FHA	S-layer family protein				other			>99		
	VCK1	CHH34 RS20405	429	9,92		2	2		NF	NF
	BIOO50A	CIG15 20565	2592			2	6		NF	NF
	e.g. West: NS 13	CJF23_16 375	2679				8		NF	NF
	filamentous									
	hemagglutinin N-				Sec/SPI			100		
	terminal domain-				500/511			100		
	containing protein									
	VCK1	CHH34 RS20365	296	9,93		0	2		NF	NF
	e.g. total sequence: NS	CGZ72 RS22050	298			0	2		NF	NF

OmpA: Outer membrane protein A, GBP: General bacterial porin, FadL: FadL outer membrane, SP: Sugar porin, OprD: outer membrane porin OprD, OmpIP/Omp85: outer membrane insertion porin OmpIP/Omp85, PGA: poly-beta-1,6 N-acetyl-D-glucosamine, Tsx: Nucleoside-specific channel forming outer membrane porin, OMR-TonB: outer membrane receptor-TonB dependent receptor, OMF: outer membrane factor, Imp/OstA/LPS-EP: Lipopolysaccharide export porin family, TPS: Two-Partner secretion, TcfC: bacterial fimbrial proteins, SspA: Salt-stressed induced outer membrane, FHA: filamentous hemagglutinin, NF: Not found

Από τις πορίνες της οικογένειας OmpA, τρία ομόλογα γονίδια εντοπίστηκαν σε διαδοχική διάταξη στο γονιδίωμα: η υποθετική πρωτεΐνη CDS-8 (345 aa), η πρωτεΐνη porin OmpA CDS-1 (332 aa) και η πρωτεΐνη porin OmpA CDS-2 (339 aa) (Εικόνα 20). Η ομολογία αυτή στη διάταξη των γονιδίων (συντηρημένη συνταίνια) παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη από λαβράκι καθώς και στα XU 1 και B565 (Εικόνα 21).



Εικόνα 20. Διαδοχική διάταξη των τριών γονιδίων πορινών OmpA στο στέλεχος VCK 1 από λαβράκι.

	500 2,889	3,500	4,000 4	,500 5,000	5,500	6,000	6,500	7,000	7,500	8,000	8,500	9,000	9,500	10,000	10,500
NS	NAD-depen	dent malic ei	11 III 12 🚺	nypothetical p		porin OmpA (porin	I II OmpA C		hypot	X.		mino acid p	ermea
PDB	NAD-depen	dent malic ei	11. III	hypothetical p		porin OmpA	I	porin	OmpA C		hypot	Х.		nino acid p	ermea
NS 2	NAD-depen	dent malic ei	II III 1Z	hypothetical p		porin OmpA (porin	I II OmpA C		hypot	X.		mino acid p	ermea
NS 6.15.2	NAD-depend	dent malic ei	11 III 1Z	ypothetical p		porin OmpA (porin	OmpA C		hypot	Χ.		mino acid p	ermea
NS 13	NAD-depen	dent malic ei	1Z	ypothetical p		porin OmpA (porin	OmpA C		hypot	X.		mino acid p	ermea
NS 22	NAD-depend	dent malic ei	1Z	ypothetical p		porin OmpA (H I I	porin	OmpA C		hypot	X.		mino acid p	ermea
AG 5.28.6	NAD-depend	dent malic ei	1Z	ypothetical p		porin OmpA (H	porin	OmpA C		hypot	Х.	- II a	nino acid p	ermea
VCK 1	NAD-depen	dent malic ei	1Z	nypothetical p		porin OmpA (H C)	porin	OmpA C		hypot	Х.	- II a	mino acid p	ermea
BIOO50A	NAD-depen	dent malic ei	11 III 12	hypothetical p		porin OmpA (porin	OmpA C		hypot	t	- II a	mino acid p	ermea
XU 1	NAD-depen	dent malic ei	1Z	ypothetical p		ompA CD:	S I	hypo	thetical p		hypot	h.	- II	mino acid p	ermea
B565	NAD-depen	dent malic e	1Z	membrane pr		porin OmpA (C	porin	OmpA C		hypot	X.		mino acid p	ermea

Εικόνα 21. Συντηρημένη συνταίνια των τριών γονιδίων πορινών OmpA στα στελέχη από λαβράκαι, XU και B565.

Η αμινοξική ομοιότητα μεταξύ των πέντε πορινών OmpA στο στέλεχος VCK 1 κυμάνθηκε μεταξύ 34-64%. Η υψηλότερη ομοιότητα (64%) παρατηρήθηκε μεταξυ των OmpA CDS-1 και CDS-2, ακολούθως 61% μεταξύ των υποθετική πρωτεΐνη CDS-8 και OmpA CDS-1 και 60% μεταξύ των CDS-3 και CDS-4.

Η γονιδιακή συστάδα του O-antigen όπως εντοπίστηκε στο στέλεχος VCK 1 (Εικόνα 22) περιείχε 29 γονίδια ανάμεσα στα γονίδια οικιακής οικονομίας acrB και oprM (Πίνακας 24) από τα οποία τα 10 εντοπίστηκαν μέσω της στοίχισης των αλληλουχιών O-antigen του είδους *Α. hydrophila*. Αυτά περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά συστατικά του O-antigen όπως τα γονίδια rmlA,B, C και D, σύνθεσης νουκλεοτιδικών σακχάρων (nucleotide sugars), γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά σακχάρων και ρυθμιστικά γονίδια όπως το wzb που ελέγχει το μήκος της αλυσίδας O-antigen και waal που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση του λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharides, LPS).

Στα στελέχη του Α. Αιγαίου τα παραπάνω γονίδια εντοπίστηκαν σε μια συνεχή γονιδιακή συστάδα (Εικόνα 23) ενώ, στα στελέχη του Δ. Αιγαίου στοιχεία του Oantigen εντοπίστηκαν σε 3 τμήματα (4 για το NS 13), κατακερματισμός που οφείλεται σε τρασνποζάσες (Εικόνα 23 και Εικόνα 24). Με εξαίρεση την παρουσία/απουσία κατάτμησης, η γονιδιακή σύσταση και διάταξη στα αντίστοιχα τμήματα του cluster δε διέφερε ανάμεσα στα εννέα στελέχη από λαβράκι (Εικόνα 23). Τα γονίδια των πρωτεϊνών NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein και IS4 family transposase στο στέλεχος VCK 1 (CHH34_RS00110 και CHH34_RS00225 αντίστοιχα) αλλά και τα υπόλοιπα στελέχη από λαβράκι εντοπίστηκαν με αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης και εσωτερικά κωδικώνια λήξης. Στα στελέχη του Δ. Αιγαίου, το γονίδιο για την πρωτεΐνη efflux RND transporter permease subunit (acrB) βρέθηκε κατακερματισμένο από τρανσποζάση της οικογένειας IS3 και το γονίδιο για την πρωτεΐνη O-antigen chain length regulator βρέθηκε κατακερματισμένο από τρανσποζάση της οικογένειας IS4.

Η σύγκριση με άλλα στελέχη του είδους *Α. veronii* (Πίνακας 21) έδειξε υψηλή ομολογία στη γονιδιακή σύσταση, αλληλουχία και συντηρημένη συνταίνια του Oantigen από το λαβράκι με το ανθρώπινο στέλεχος 126-14 (Εικόνα 25). Η γονιδιακή συστάδα O-antigen του στελέχους 126-14 εντοπίστηκε σε δύο τμήματα και συνολικά 27 αλληλουχίες (συμπεριλαμβανομένων των acrB και oprM) ανιχνεύθηκαν μέσω στοίχισης με τις αλληλουχίες του VCK 1 (Πίνακας 25).

Η σύγκριση με τα τα στελέχη B565 και XU1 έδειξε διαφοροποίηση στη σύσταση, αλληλουχία και διάταξη των γονιδίων. Στο στέλεχος B565 ανιχνεύθηκαν 13 αλληλουχίες (συμπεριλαμβανομένων των acrB και oprM) μέσω στοίχισης με τις αλληλουχίες του VCK 1 (Εικόνα 26, Πίνακας 25). Σε ένα επιπλέον τμήμα εντοπίστηκαν 3 ακόμη γονίδια, αλλά η περιοχή αυτή δεν αναλύθηκε περεταίρω. Στο στέλεχος XU 1 εντοπίστηκαν συνολικά 9 γονίδια σε δύο τμήματα του γονιδιώματος (Εικόνα 27, Πίνακας 25).

116

Σε όλες τις περιπτώσεις, στα τμήματα που περιγράφονται παραπάνω, το ένα τους άκρο συμπίπτει με άκρο του contig. Δεν πρόκειται δηλαδή για περιοχές με διαφορετική γενετική πληροφορία που αγνοήθηκε, αλλά για διακεκομμένη γενετική πληροφορία όπως «διαβάστηκε» από την τεχνολογία αλληλούχισης που χρησιμοποιήθηκε.

6.000 22.763 ef	8.000 24.763 efflux RND	10,000 26,763	12,000 28,763 N N	14,000 30,763 L	16.000 32.763	18,000 34,763	20.000 36.763	22,000 38,763 N NZ_NNS	24,000 40,763 N by	26,000 42,763 a	28,000 44,763 asnB nated seque	30.000 46.763 ence 120)	32,000 48,763 polys.	34,000 50,763	36,000 52,763 d.	38,000 54,763	40.0 56.7	00 42,000 53 58,763	44.000 60.763	46,000 62,763
-	↑ acrB	*	*							*	-		*	*	*	*	* *	* *	1 c	prM *

Εικόνα 22. Γονιδιακή συστάδα (cluster) του O-antigen όπως εντοπίστηκε στο στέλεχος VCK 1. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν μέω της αναζήτης με τα γονίδια του είδους A. hydrophila σημειώνονται με αστερίσκο.



Εικόνα 23. Σύγκριση της γονιδιακής συστάδας (cluster) του O-antigen ανάμεσα στα εννέα στελέχη από λαβράκι από το Ανατολικό και Δυτικό Αιγαίο πέλαγος. Σημειώνονται με αστερίσκο τα σημεία που εντοπίστηκε τμήμα αλληλουχίας τρανσποζάσης.

VCK 1 Annotation: Protein (gene)	Gene Length (bp)	locus tag	protein ID	A. hydrophila Gene Acronym	A. hydrophila Source Strain (s)
efflux RND transporter permease subunit	3150	CHH34_RS00105	WP_115520832.1	acrB	MH449674, MH449684, MH449677, MH449686, ML09- 119
NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	1056	CHH34_RS00110	frameshifted; internal stop;	rmlB	AL06-06, PPD134/91, MH449686, MH449679, MH449673, MH449675, MH449676, AL97-91
NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	1194	CHH34_RS00115	WP_115520833.1		
LegC family aminotransferase	1143	CHH34_RS00120	WP_115520834.1		
UDP-N-acetylglucosamine 2- epimerase (hydrolyzing) (neuC)	1161	CHH34_RS00125	WP_005350280.1		
UDP-N-acetylglucosamine 2- epimerase (neuC/neuB)	1074	CHH34_RS00130	WP_103252175.1		
acetyltransferase (neuB)	630	CHH34_RS00135	WP_115520835.1		
CBS domain-containing protein	1053	CHH34_RS00140	WP_115520836.1		
gfo/Idh/MocA family oxidoreductase acylneuraminate cytidylyltransferase	978	CHH34_RS00145	WP_115520837.1		
family protein (gfo/Idh/MocA family oxidoreductase)	699	CHH34_RS00150	WP_115520941.1		
acylneuraminate cytidylyltransferase family protein (SDR family oxidoreductase)	762	CHH34_RS00155	WP_115520940.1		
imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH (hisH)	654	CHH34_RS00160	WP_103252171.1		
imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF (hisH)	810	CHH34_RS00165	WP_103252170.1		
N-acetyl sugar amidotransferase	1275	CHH34_RS00170	WP_103252169.1		
N-acetyl sugar amidotransferase	1107	CHH34_RS00175	WP_103252168.1		
hypothetical protein	1527	CHH34_RS00180	WP_115520838.1		

Πίνακας 24. Γονίδια της γονιδιακής συστάδας O-antigen στο στέλεχος από λαβράκι VCK 1 όπως ανιχνεύθηκαν μέσω στοίχισης με αλληλουχίες στελεχών του είδους A. hydrophila.

hypothetical protein (aldolase)	822	CHH34_RS00185	WP_103252166.1		
sugar transferase	555	CHH34_RS00190	WP_103252165.1	wbtB	AL06-06
asparagine synthase (glutamine- hydrolyzing) (asnB)	1785	CHH34_RS00195	WP_115520839.1		
hypothetical protein	1236	CHH34_RS00200	WP_115520840.1		
					MH449678, MH449684,
polysaccharide biosynthesis protein	1980	CHH34_RS00205	WP_103250565.1	wbgZ	MH449681, AL06-01, AL06-06, AL97-91
hypothetical protein	186	CHH34_RS00210	WP_115520841.1		
				-	MH449679, MH449678,
dTDP-glucose 4,6-dehydratase (rfbB)	1107	CHH34_RS00215	WP_115520942.1	rmIB	MH449680, MH449686, AL06-01,
dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	888	CHH34 RS00220	WP 1155208421	rmID	MH449675 AL06-01 AL06-06
(rfbB)	000		WI_113320012.1		AL97-91
	1075		frameshifted;		
154 family transposase	1275	CHH34_RS00225	internal stop;		
glucose-1-nhosnhate					ML09-119, PPD134/91,
thymidylyltransferase (rfbA)	912	CHH34_RS00230	WP_115520843.1	rmlA	MH449682, AL97-91, AL06-06,
					MH449674, MH449675
dIDP-4-dehydrorhamnose 3,5-	540	CHH34_RS00235	WP_115520844.1	rmlC	AL06-06, AL06-01, MH449678,
epimerase (ffbC)					MIN449680, MIL09-119
O-antigen chain length regulator	1176	CHH34_RS00240	WP_115520845.1	wzb	MH449683
					MH449684, MH449679,
ligase	1731	CHH34_RS00245	WP_115520846.1	waaL	MH449677, AL06-06, AL97-91
					MH449673, MH449674,
DNA-binding protein	411	CHH34_RS00250	WP_005344269.1	hns	MH449678, MH449682,
					MH449685
efflux transporter outer membrane	1365	CHH34 RS00255	WP 115520847.1	Mrqo	MH449673, MH449682,
subunit				- 1	MH449675

VCK 1	NS	PDB	NS 2	NS 6.15.2	NS 13	NS 22
efflux RND transporter permease subunit (3150 bp)	3174 (141)	3174	3174 (197)	3174 (159)	3174 (156)	3162 (134)
IS3 family transposase (fragmeneted)	IS3 (141 bp)		IS3 (197 bp)	IS3 (159 bp)	IS3 (156 bp)	IS3 (134 bp)
IS3 family transposase (fragmeneted)		IS3 (136 bp)	IS3 (164 bp)	IS3 (131 bp)		
NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein (1056 bp)	1061 bp	1061 bp	1061 bp	1061 bp	1061 bp	1061 bp
asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) (asnB) (1785 bp)						
IS630 family transposase (fragmented)	IS630 (151 bp)	IS630 (136 bp)				
hypothetical protein (1236 bp)					1227 bp	
O-antigen chain length regulator (1176 bp)	984 bp	984 bp	984 bp	984 bp	984 bp	984 bp
IS4 family transposase (fragmeneted)		IS4 (157 bp)	IS4 (120 bp)			
IS4 family transposase (fragmeneted)	IS4 (209 bp)	IS4 (195 bp)	IS4 (272 bp)	IS4 (269 bp)	IS4 (186 bp)	IS4 (174 bp)
O-antigen chain length regulator (fragmented-part II)	201	201	201	201	201	201
ligase (1731 bp)						
DNA-binding protein (411 bp) efflux transporter outer membrane subunit (1365 bp)						

Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων και της γονιδιακής διάταξης του Ο-antigen στα στελέχη του Δ. Αιγαίου σε σχέση με το στέλεχος VCK 1 (Α. Αιγαίου). Οι ομόλογες περιοχές έχουν συμπτυχθεί και δεν παρουσιάζονται αναλυτικά. Δόθηκε έμφαση στα σημεία κατακερματισμού.



Εικόνα 25. Σύγκριση της γονιδιακής συστάδας (cluster) του O-antigen ανάμεσα στο στέλεχος VCK 1 από λαβράκι και το στέλεχος 126-14 από άνθρωπο. Σημειώνονται με αστερίσκο τα σημεία που εντοπίστηκε τμήμα αλληλουχίας τρανσποζάσης.



Εικόνα 26. Η περιοχή του γονιδιώματος του στελέχους B565 στην οποία εντοπίστηκαν στοιχεία του O-antigen (με αστερίσκο) μέσω των αντίστοιχων αλληλουχιών του στελέχους VCK 1. Στο πλαίσιο φαίνεται ομόλογη περιοχή με την αντίστοιχη του VCK 1 παρά την αλληλουχική διαφοροποίηση.



Εικόνα 27. Τα τμήματα του γονιδιώματος του στελέχους XU 1 στα οποία εντοπίστηκαν στοιχεία του Ο-antigen (με αστερίσκο) μέσω των αντίστοιχων αλληλουχιών του στελέχους VCK 1.

		Sequenc	ces retriev VCK 1	ed through		
Annotation	VCK 1 Gene Length	B565	XU 1	126-14	126-14 Locus tag (# fragment)	126-14 Gene Length
efflux RND transporter permease subunit	3150	*	*	*	C2U29_RS16740 (1)	3150
NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	1056			*	C2U29_RS16735 (1)	1058
NAD-dependent epimerase/dehydratase family protein	1194	*		*	C2U29_RS16730 (1)	1194
LegC family aminotransferase	1143	*		*	C2U29_RS16725 (1)	1143
UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (hydrolyzing) (neuC)	1161	*		*	C2U29_RS16720 (1)	1161
UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (neuC/neuB)	1074	*		*	C2U29_RS16715 (1)	1074
acetyltransferase (neuB)	630	*		*	C2U29_RS16710 (1)	630
CBS domain-containing protein	1053			*	C2U29_RS16705 (1)	1053
gfo/Idh/MocA family oxidoreductase	978			*	C2U29_RS16700 (1)	978
acylneuraminate cytidylyltransferase family protein (gfo/ldh/MocA family oxidoreductase)	699			*	C2U29_RS16695 (1)	699
acylneuraminate cytidylyltransferase family protein (SDR family oxidoreductase)	762			*	C2U29_RS16690 (1)	762
imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH (hisH)	654			*	C2U29_RS16685 (1)	654
imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF (hisH)	810			*	C2U29_RS16680 (1)	810
N-acetyl sugar amidotransferase	1275			*	C2U29_RS16675 (1)	1275
N-acetyl sugar amidotransferase	1107			*	C2U29_RS16670 (1)	1107
hypothetical protein	1527			*	C2U29_RS16665 (1)	1527
hypothetical protein (aldolase)	822			*	C2U29_RS16660 (1)	822
sugar transferase	555			*	C2U29_RS16655 (1)	555
asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) (asnB)	1785			*	C2U29_RS16650 (1)	1785
acyltransferase					C2U29_RS16645 (1)	1089
DUF1153 domain-containing protein					C2U29_RS16640 (1)	315

Πίνακας 25. Γονίδια της συστάδας O-antigen που εντοπίστηκαν σε άλλα στελέχη *Α. veronii* μέσω των αλληλουχιών του VCK 1 από λαβράκι (σημειώνονται με αστερίσκο). Παρατίθενται αναλυτικά τα στοιχεία των γονιδίων του στελέχους 126-14 που παρουσίασε αυξημένη ομολογία με το στέλεχος VCK 1.

transnosase					C21120 R\$16635 (1)	585
transposase					02029_1010000 (1)	202
transposase					C2U29_RS01845 (2)	>246
hypothetical protein	1236			*	C2U29_RS01850 (2)	1272
polysaccharide biosynthesis protein	1980	*		*	C2U29_RS01855 (2)	1980
hypothetical protein	186					
dTDP-glucose 4,6-dehydratase (rfbB)	1107		*	*	C2U29_RS01860 (2)	1107
dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (rfbB)	888		*	*	C2U29_RS01865 (2)	888
four helix bundle protein					C2U29_RS01870 (2)	342
IS4 family transposase	1275					
glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (rfbA)	912		*	*	C2U29_RS01875 (2)	909
dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase (rfbC)	540		*	*	C2U29_RS01880 (2)	540
O-antigen chain length regulator	1176		*	*	C2U29_RS01885 (2)	1059
ligase	1731	*	*	*	C2U29_RS01890 (2)	1731
hypothetical protein					C2U29_RS01895 (2)	213
DNA-binding protein	411	*	*	*	C2U29_RS01900 (2)	411
efflux transporter outer membrane subunit	1365	*	*	*	C2U29_RS01905 (2)	1365

3.5. Μελέτη λοιμογονικότητας in vivo

3.5.1. Λαβράκι

Τα ενήλικα λαβράκια που μολύνθηκαν με υψηλής συγκέντρωσης (10⁶ cfu/ψάρι) ενέσιμο διάλυμα βακτηρίου (NS) παρουσίασαν νωθρή κολυμβητική συμπεριφορά και λήθαργο στις πρώτες 24 ώρες της μόλυνσης. Εξωτερικά δεν εμφάνισαν κλινικά σημάδια. Τα νεκρά ψάρια (7/10) εμφάνισαν ενδείξεις ασφυξίας (ανοιχτό στόμα και επικαλυματικό). Εσωτερικά, παρατηρήθηκαν διάχυτες αιμορραγίες και ασκητικό υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα και τα εσωτερικά όργανα (Εικόνα 28Εικόνα 28. Αιμορραγίες στην κοιλότητα του περιτόναιου και τα εσωτερικά όργανα τεχνητά μολυσμένων με ένεση λαβρακιών με το στέλεχος NS. A) σε συγκέντρωση 106 cfu/ψάρι, 1 ημέρα μετά τη μόλυνση και B) σε συγκέντρωση 104 cfu/ψάρι, 2 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Τα ενήλικα λαβράκια που μολύνθηκαν με χαμηλής συγκέντρωσης (10⁴ cfu/ψάρι) ενέσιμο διάλυμα βακτηρίου (NS) παρουσίασαν λήθαργο και ήπια ερυθρότητα στο δέρμα και τα πτερύγια μέσα στις πρώτες 24 ώρες. Παρατηρήθηκε συμπεριφορά ομαδοποίησης των ιχθύων με αργή πλεύση κάτω από την επιφάνεια του νερού και ανοιχτά τα θωρακικά πτερύγια. Τα νεκρά ψάρια (10/10) εμφάνισαν ενδείξεις ασφυξίας (ανοιχτό στόμα και επικαλυματικό) και αναιμική εικόνα στα βράγχια (αποχρωματισμός). Στην περιτοναϊκή κοιλότητα και τα εσωτερικά όργανα παρατηρήθηκαν διάχυτες αιμορραγίες και ασκητικό υγρό (Εικόνα 28 Β).

Τα ενήλικα λαβράκια που μολύνθηκαν με εμβάπτιση για 3 h σε διάλυμα του βακτηριακού στελέχους NS παρουσίασαν λήθαργο και ερυθρότητα στο δέρμα, τα πτερύγια και το στόμα (Εικόνα 29 Α-Β). Εσωτερικά, παρατηρήθηκαν διάχυτες αιμορραγίες και ασκητικό υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα σε μικρότερο όμως βαθμό σε σχέση με την εικόνα των ιχθύων που μολύνθηκαν με ένεση (Εικόνα 29 Γ).

Τα ενήλικα λαβράκια που μολύνθηκαν με εμβάπτιση για 2,5 h σε διάλυμα των στελεχών NS και PDB παρουσίασαν λήθαργο και ερυθρότητα στο δέρμα, τα πτερύγια και το στόμα (Εικόνα 30 Α). Στην περιτοναϊκή κοιλότητα παρατηρήθηκαν διάχυτες αιμορραγίες και ασκητικό υγρό. Στην επιφάνεια των εσωτερικών οργάνων παρατηρήθηκαν διάχυτες αιμορραγίες και αποστήματα κυρίως στο ήπαρ και τον σπλήνα (Εικόνα 30 Β-Γ) και πιο σπάνια στο νεφρό. Αποστήματα εμφανίστηκαν την 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση με το στέλεχος NS και 6^η ημέρα για το PDB. Τα αποστήματα

126

γενικά ήταν λιγότερα στα όργανα στην περίπτωση του στελέχους NS. Επίσης παρατηρήθηκε σπληνομεγαλία, μετά την 9^η μέρα μετά τη μόλυνση με το στέλεχος NS και μετά την 6^η μέρα για το στέλεχος PDB



Εικόνα 28. Αιμορραγίες στην κοιλότητα του περιτόναιου και τα εσωτερικά όργανα τεχνητά μολυσμένων με ένεση λαβρακιών με το στέλεχος NS. A) σε συγκέντρωση 10⁶ cfu/ψάρι, 1 ημέρα μετά τη μόλυνση και B) σε συγκέντρωση 10⁴ cfu/ψάρι, 2 ημέρες μετά τη μόλυνση. Η εικόνα Β περιλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).

Η ιστολογική παρατήρηση έδειξε ότι και τα δύο στελέχη που δοκιμάστηκαν προκάλεσαν παρόμοιες αλλοιώσεις στο σπλήνα και το ήπαρ. Πολυεστιακή υγροποιητική νέκρωση ήταν εμφανής στο σπλήνα και αποστήματα ήταν εμφανή στο ήπαρ (Εικόνα 31 Α-Β). Διάχυτα βακτήρια ήταν ορατά και στα δύο όργανα (Εικόνα 31 Γ-Δ).

Στα ενήλικα λαβράκια που μολύνθηκαν με υψηλής συγκέντρωσης (10⁶ cfu/ψάρι) ενέσιμο διάλυμα βακτηρίου (NS) η θνησιμότητα έφτασε το 100% των μολυσμένων ατόμων την 1^η ημέρα από την έναρξη της μόλυνσης ενώ σε αυτά που μολύνθηκαν με χαμηλής συγκέντρωσης (10⁴ cfu/ψάρι) ενέσιμο διάλυμα βακτηρίου (NS) η θνησιμότητα έφτασε το 90% τη 2^η ημέρα και το 100% των μολυσμένων ατόμων την 4^η ημέρα από την έναρξη της μόλυνσης (Εικόνα 32Εικόνα 32. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) τεχνητά μολυσμένων ενήλικων λαβρακιών. Α) Μόλυνση με ένεση δύο συγκεντρώσεων του στελέχους NS. B) Μόλυνση με εμβάπτιση τριών συγκέντρωση 105 cfu

ml-1 του στελέχους NS. Δ) Μόλυνση με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 με το στέλεχος NS και το στέλεχος PDB. Στην ανάλυση Kaplan Meier, οι καμπύλες επιβίωσης των λαβρακιών που μολύνθηκαν με ενέσιμο διάλυμα βακτηρίου (NS) διέφεραν (p<0,0001) μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων (10⁶ και 10⁴ cfu/ψάρι).



Εικόνα 29. Ερυθρότητα του δέρματος και των πτερυγίων μολυσμένων με εμβάπτιση λαβρακιών, για 3 h σε βακτηριακό διάλυμα με το στέλεχος NS. A) σε συγκέντρωση 10⁷ cfu ml⁻¹, 2 ημέρες μετά τη μόλυνση και B) σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹, 3 ημέρες μετά τη μόλυνση. Γ) Αιμορραγίες στην κοιλότητα του περιτόναιου και τα εσωτερικά όργανα μολυσμένων με εμβάπτιση λαβρακιών, για 3 h σε βακτηριακό διάλυμα με το στέλεχος NS σε συγκέντρωση 10⁷ cfu ml⁻¹, 2 ημέρες μετά τη μόλυνση.

Η θνησιμότητα για την ομάδα που μολύνθηκε με υψηλή συγκέντρωση βακτηρίου (NS) 10⁷ cfu ml⁻¹ ξεκίνησε τη 2^η ημέρα από την έναρξη της μόλυνσης και για την ομάδα που μολύνθηκε με 10⁵ cfu ml⁻¹ την 3^η ημέρα (Εικόνα 32. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) τεχνητά μολυσμένων ενήλικων λαβρακιών. Α) Μόλυνση με ένεση δύο συγκεντρώσεων του στελέχους NS. B) Μόλυνση με εμβάπτιση τριών συγκεντρώσεων του στελέχους NS. Γ) Μόλυνση με εμβάπτιση για δύο χρονικά διαστήματα σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 του στελέχους NS. Δ) Μόλυνση με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 με το στέλεχος NS και το στέλεχος PDB. Η θνησιμότητα έφτασε στο 100% των μολυσμένων ατόμων τη 4^η ημέρα από την έναρξη της μόλυνσης για την ομάδα που μολύνθηκε με συγκέντρωση βακτηρίου 10⁷ cfu ml⁻¹ και την 6^η ημέρα για την ομάδα που μολύνθηκε με 10⁵ cfu ml⁻¹. Οι καμπύλες επιβίωσης των λαβρακιών διέφεραν (p_{LR}=0,002 και p_B=0,001) μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων βακτηρίου (10⁵ και 10^7 cfu ml⁻¹).

Οι καμπύλες επιβίωσης (Εικόνα 32. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) τεχνητά μολυσμένων ενήλικων λαβρακιών. Α) Μόλυνση με ένεση δύο συγκεντρώσεων του στελέχους NS. B) Μόλυνση με εμβάπτιση τριών συγκεντρώσεων του στελέχους NS. Γ) Μόλυνση με εμβάπτιση για δύο χρονικά διαστήματα σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 του στελέχους NS. Δ) Μόλυνση με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 με το στέλεχος NS και το στέλεχος PDB. Γ) των ενήλικων λαβρακιών που μολύνθηκαν με εμβάπτιση σε διάλυμα βακτηρίου (NS) για δυο διαφορετικά χρονικά διαστήματα (2,5 και 3 h) διέφεραν οριακά (p_{LR}=0,046 και p_B=0,056) και οι διαφορές εντοπίστηκαν από την 6^η ημέρα μετά τη μόλυνση.



Εικόνα 30. Κλινική εικόνα λαβρακιών μολυσμένων με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση βακτηρίου 10⁵ cfu ml⁻¹. A) Ερυθρότητα του δέρματος και των πτερυγίων λαβρακιών μολυσμένων με το στέλεχος NS (5 ημέρες μετά τη μόλυνση). B) Αποστήματα στο σπλήνα και διάχυτες αιμορραγίες στο ήπαρ και την κοιλότητα του περιτόναιου λαβρακιών μολυσμένων με το στέλεχος PDB (6 ημέρες μετά τη μόλυνση). Γ) Αποστήματα στο ήπαρ (μεγάλα) και το σπλήνα (ελάχιστα ορατά) λαβρακιών μολυσμένων με το στέλεχος NS (8 ημέρες μετά τη μόλυνση). Η εικόνα περιλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).



Εικόνα 31. Τομές ιστών από λαβράκια με τεχνητή μόλυνση και χρώση Polychrome. Α) Αποστήματα στο ήπαρ. Β) Μεγέθυνση της εικόνας Α με εστίες βακτηρίων. Γ) Αποστήματα στο σπλήνα. Δ) Μεγέθυνση της εικόνας Γ με εστίες βακτηρίων εντός αποστήματος. Όλες οι εικόνες αντιστοιχούν σε δείγματα από την 6η μέρα μετά τη μόλυνση. Η εικόνα περιλαμβάνεται στη σχετική εργασία (Smyrli et al., 2017).

Η θνησιμότητα ξεκίνησε την 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση στα ενήλικα λαβράκια που μολύνθηκαν με εμβάπτιση (2,5 h) με το στέλεχος NS και την 5^η ημέρα σε αυτά που μολύνθηκαν με το PDB. Η θνησιμότητα έφτασε το 100% των μολυσμένων ατόμων τη 10^η μέρα για το στέλεχος NS και την 7^η ημέρα για το PDB (Εικόνα 32. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) τεχνητά μολυσμένων ενήλικων λαβρακιών. Α) Μόλυνση με ένεση δύο συγκεντρώσεων του στελέχους NS. B) Μόλυνση με εμβάπτιση τριών συγκεντρώσεων του στελέχους NS. Γ) Μόλυνση με εμβάπτιση για δύο χρονικά διαστήματα σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 του στελέχους NS. Δ) Μόλυνση με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση 105 cfu ml-1 με το στέλεχος NS και το στέλεχος PDB. Δ). Οι καμπύλες επιβίωσης των λαβρακιών δεν διέφεραν (p>0,05) μεταξύ των δύο στελεχών. Διαφορές ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση της επιβίωσης ανά ημέρα, και εντοπίστηκαν μέχρι την 5^η ημέρα μετά τη μόλυνση.

Τα νεαρά λαβράκια που μολύνθηκαν με εμβάπτιση για 2,5 h σε διάλυμα των στελεχών NS και PDB παρουσίασαν λήθαργο και ήπια ερυθρότητα στα πτερύγια και το στόμα (Εικόνα 33 A). Εσωτερικά παρατηρήθηκε παρουσία ασκητικού υγρού και αιμορραγίες στα όργανα των νεκρών ιχθύων (Εικόνα 33 B). Επίσης παρατηρήθηκε σπληνομεγαλία, και αποστήματα κυρίως στο σπλήνα και αυτή τη φορά στο νεφρό

(Εικόνα 33 Γ) από την 5^η ημέρα και έπειτα μετά τη μόλυνση. Και εδώ παρατηρήθηκαν ενδείξεις ασφυξίας (ανοιχτό στόμα και επικαλυματικό) και αναιμική εικόνα στα βράγχια (αποχρωματισμός) σε κάποια ψάρια.



Εικόνα 32. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) τεχνητά μολυσμένων ενήλικων λαβρακιών. Α) Μόλυνση με ένεση δύο συγκεντρώσεων του στελέχους NS. B) Μόλυνση με εμβάπτιση τριών συγκεντρώσεων του στελέχους NS. Γ) Μόλυνση με εμβάπτιση για δύο χρονικά διαστήματα σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹ του στελέχους NS. Δ) Μόλυνση με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹ με το στέλεχος NS και το στέλεχος PDB.

Η θνησιμότητα ξεκίνησε τη 2^η ημέρα μετά τη μόλυνση με το στέλεχος NS και την 3^η ημέρα με το PDB (Εικόνα 34 Α). Σε καμία από τις δύο ομάδες βακτηρίου η θνησιμότητα δεν έφτασε το 100% στις δέκα ημέρες που διήρκεσε το πείραμα και ήταν χαμηλότερη για το NS. Στην ανάλυση Kaplan Meier, οι καμπύλες επιβίωσης δεν διέφεραν (p>0,05) μεταξύ των δύο στελεχών παρά μόνο μέχρι την 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση (p=0,03).

Δεν διέφεραν (p>0,05) επίσης, οι καμπύλες επιβίωσης μεταξύ ενήλικων και νεαρών λαβρακιών στις μολύνσεις με εμβάπτιση για 2.5 h σε συγκέντρωση 10^5 cfu ml⁻¹ για τα δύο στελέχη (Εικόνα 34 Β-Γ).

Τέλος, δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα στα ψάρια των ομάδων ελέγχου σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Τα βακτήρια απομονώθηκαν από όλα τα νεκρά ψάρια.



Εικόνα 33. Κλινική εικόνα στη δοκιμασία με τα νεαρά λαβράκια. Α) Ερυθρότητα στο στόμα και το επικαλυματικό οστό. Β) Σπληνομεγαλία και νεκρωτικά οζίδια στην επιφάνεια του σπλήνα. Γ) Εκτεταμένες νεκρωτικές αλλοιώσεις σε όλο το νεφρικό παρέγχυμα.



Εικόνα 34. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) τεχνητά μολυσμένων νεαρών και ενήλικων λαβρακιών με εμβάπτιση για 2,5 h σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹ με τα στελέχη NS και PDB. A) Μόλυνση νεαρών λαβρακιών. B) Επιβίωση νεαρών και ενήλικων λαβρακιών μολυσμένων με το στέλεχος NS. Γ) Επιβίωση νεαρών και ενήλικων λαβρακιών μολυσμένων με το στέλεχος NS. Γ)

3.5.2. Zebrafish (Danio rerio)

Η θνησιμότητα στα ενήλικα zebrafish που μολύνθηκαν με ενέσιμο εναιώρημα διάλυμα των εννέα στελεχών που μελετήθηκαν προέκυψε μέσα στις πρώτες 24 - 48 h μετά τη μόλυνση και έμεινε στα ποσοστά αυτά καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων (10 ημέρες). Η θνησιμότητα κυμάνθηκε μεταξύ 0 - 10% για τη συγκέντρωση 10⁴ cfu/ψάρι, μεταξύ 0-40% για τη συγκέντρωση 10⁵ cfu/ψάρι, μεταξύ 80-100% για τη συγκέντρωση 10⁶ cfu/ψάρι, μεταξύ 70-100% για τη συγκέντρωση 10⁷ cfu/ψάρι και μεταξύ 80-100% για τη συγκέντρωση 10⁸ cfu/ψάρι. Η ημερήσια αθροιστική θνησιμότητα (%) που προέκυψε μέχρι τη δεύτερη μέρα μετά τη μόλυνση παρουσιάζεται για όλα τα στελέχη στον Πίνακας 26. Για 4/9 στελέχη που μελετήθηκαν η θνησιμότητα δεν ήταν αναλόγως κλιμακούμενη με την αύξηση της βακτηριακής συγκέντρωσης της μόλυνσης. Η ασυνέχεια εντοπίστηκε στις μεγάλες βακτηριακές συγκεντρώσεις (10⁷ - 10⁸ cfu/ψάρι).

Στην ανάλυση Kaplan Meier των καμπυλών επιβίωσης για τη συγκέντρωση 10⁵ cfu/ψάρι, στατιστικά σημαντικές διαφορές βρέθηκαν ανάμεσα στο στέλεχος NS και τα στελέχη AG 5.28.6 και VCK 1 (p=0,038 και p=0,029 αντίστοιχα). Στην ανάλυση των καμπυλών επιβίωσης για τις συγκεντρώσεις 10⁴ και 10⁶ cfu/ψάρι δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των στελεχών.

	Αθροιστική ημερήσια θνησιμότητα (%)									
Συγκέντρωση βακτηρίου (cfu/ψάρι)	10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶		10 ⁷		10^8	
Στέλεχος/Ημέρα	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
NS	0	0	40	40	100		90	90	100	
NS 2	0	0	0	9	90	100	90	90	80	80
NS 13	0	0	0	20	100		100		100	
NS 22	0	0	10	10	80	90	90	90	100	
NS 6.15.2	0	10	0	10	90	90	91	100	90	90
PDB	0	0	11	22	82	82	100		100	
VCK 1	0	0	0	0	100		100		100	
BIOO 50A	10	10	10	10	90	100	70	70	100	
AG 5.28.6	10	10	0	0	100		100		90	90

Πίνακας 26. Αθροιστική ημερήσια θνησιμότητα (%) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις (cfu/ψάρι) βακτηρίου που χορηγήθηκαν ενέσιμα στις τεχνητές μολύνσεις σε zebrafish.

Πίνακας 27. Τιμές LD50 (cfu/fish) εννέα στελεχών από λαβράκι σύμφωνα με την ανάλυση Probit τις 24 και 48 h μετά τη μόλυνση σε zebrafish.

Στέλεχος	LD50 (24h)	LD50 (48h)
NS	4.2×10^{5}	3.3 × 10 ⁵
PDB	2.4×10^{6}	1.4×10^{6}
NS 2	1.6×10^{6}	1.1×10^{6}
NS 6.15.2	1.1×10^{6}	5.4×10^{5}
NS 13	5.4×10^{5}	3.3×10^{5}
NS 22	10 ⁶	8.4×10^{5}
AG 5.28.6	7.1×10^{5}	6.9×10^{5}
VCK 1	7.9×10^{5}	7.8×10^{5}
BIOO50 A	1.3×10^{6}	10 ⁶

Η τιμή LD50-24 κυμάνθηκε από 4.2×10⁵ έως 2.4×10⁶ ενώ η τιμή LD50-48 από 3.3×10⁵ έως 1.4×10⁶ cfu/fish (Πίνακας 27). Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα εννέα στελέχη από λαβράκι (relative median potency table) ωστόσο παρατηρήθηκε μια τάση για χαμηλότερες τιμές LD50 στα ακίνητα στελέχη NS και NS13.

3.6. Εκτίμηση Αποτελεσματικότητας εμβολίων

Παρακάτω αναλύονται τα αποτελέσματα των 4 πειραμάτων εμβολιασμού σε λαβράκια με διαφορετικά εμβόλια *Α. veronii*, σε λαβράκια διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων εκτιμήθηκε με διαφορετικές μεθοδολογίες. Συνοπτικά εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα:

- στο Πείραμα 1.1. ενέσιμου εμβολίου αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης του στελέχους NS σε α) υδατοδιαλυτή (NS) και β) σε ελαιώδη (NS+STA) μορφή σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα ml⁻¹ (10⁷ κύτταρα/ψάρι), σε ενήλικα λαβράκια (30 g) μέσω μόλυνσης με ενέσιμο διάλυμα του NS σε συγκέντρωση 10⁶ cfu/ψάρι
- στο Πείραμα 1.2 ενέσιμου εμβολίου όπως του Πειράματος 1.1 σε ενήλικα λαβράκια (50 g), μέσω μόλυνσης με μπάνιο για 2,5 h σε διάλυμα του στελέχους
 NS σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹ και της μελέτης έκφρασης γονιδίων του ανοσοποιητικού συστήματος στο μεσονεφρικό ιστό
- στο Πείραμα 2 ενέσιμου διπλού ελαιώδους εμβολίου αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης από τα στελέχη NS και PDB (NS + PDB + Montanide) σε συγκέντρωση 10⁸ κύτταρα ml⁻¹ (10⁷ κύτταρα/ψάρι), σε ενήλικα λαβράκια (60 g) μέσω μόλυνσης με μπάνιο για 2,5 h σε διάλυμα κάθε στελέχους σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹ και της μελέτης των ειδικών αντισωμάτων στον ορό του αίματος
- στο Πείραμα 3 διπλού υδατικού εμβολίου αδρανοποιημένης με φορμόλη βακτηρίνης των στελεχών NS και PDB σε συγκέντρωση 10⁹ κύτταρα ml⁻¹ που χορηγήθηκε με εμβάπτιση σε ιχθύδια λαβρακιού (2,5 g), μέσω τεχνητής μόλυνσης με μπάνιο για 2,5 h σε διάλυμα κάθε στελέχους σε συγκέντρωση 10⁵ cfu ml⁻¹.

3.6.1. Επιβίωση εμβολιασμένων ιχθύων

Πείραμα 1.1

Η θνησιμότητα ξεκίνησε την 1^η ημέρα σε όλες τις ομάδες ιχθύων που μολύνθηκαν με ενέσιμο διάλυμα του στελέχους NS (Εικόνα 35). Η θνησιμότητα έφτασε το 100% στις πρώτες 24 - 48 h μετά τη μόλυνση στις δύο ομάδες control (ορός, ορός + STA) και την 3^η ημέρα μετά τη μόλυνση στις δύο ομάδες που εμβολιάστηκαν με βακτηρίνη NS και στις δύο παρασκευές εμβολίου (υδατοδιαλυτό/ελαιώδες).

Στην ανάλυση Kaplan Meier, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν μεταξύ των τεσσάρων ομάδων [χ^2 (3, N=40)=20.30, p=0.0001]. Συγκεκριμένα στατιστικά σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν μεταξύ κάθε τύπου εμβολίου (υδατικό/ελαιώδες) με την αντίστοιχη ομάδα control του δηλαδή μεταξύ των α) NS και control (ορός), (p=0,001) και β) NS+STA και control STA, (p=0,002). Δεν υπολογίστηκε η τιμή RPS σε αυτό το πείραμα.



Εικόνα 35. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) ενήλικων εμβολιασμένων λαβρακιών τεχνητά μολυσμένων με ένεση (NS, 10⁶ cfu/ψάρι). Α) Η επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων με υδατικό διάλυμα βακτηρίνης NS (10⁷ κύτταρα/ψάρι) και την αντίστοιχη ομάδα control (ορός) και Β) η επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων με ελαιώδες διάλυμα βακτηρίνης (NS + STA) και την αντίστοιχη ομάδα control (ορός + STA) (δεξιά).

Πείραμα 1.2

Με εξαίρεση την ομάδα που εμβολιάστηκε με το ελαιώδες εμβόλιο (NS + STA) για την οποία η θνησιμότητα ξεκίνησε την 5^η ημέρα, η θνησιμότητα στις υπόλοιπες ομάδες ξεκίνησε την 3 - 4^η ημέρα μετά τη μόλυνση με εμβάπτιση με το στέλεχος NS (Εικόνα 36). Η θνησιμότητα έφτασε το 100% την 7^η ημέρα για την ομάδα που εμβολιάστηκε με υδατικό εμβόλιο (NS), την 8^η ημέρα για την ομάδα control STA και τη 10^η ημέρα μετά τη μόλυνση για την ομάδα control (ορός) καθώς και για την ομάδα που εμβολιάστηκε με ελαιώδες εμβόλιο. Στην ανάλυση Kaplan Meier, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων ομάδων [χ² (3, N=40)=6.387, p=0.0942]. Ωστόσο, στις επί μέρους συγκρίσεις (pairwise) στατιστικά σημαντικές διαφορές [χ² (1, N=20)=8.228, p=0.004] ανιχνεύθηκαν στις καμπύλες επιβίωσης των δύο παρασκευών (υδατοδιαλυτό/ελαιώδες) εμβολίου δηλαδή μεταξύ των ομάδων NS και NS + STA. Η τιμή RPS₆₀ του εμβολίου NS+STA σε σχέση με την ομάδα control ήταν 83%. Η τιμή RPS₁₀₀ των δύο εμβολίων είναι 0%.



Εικόνα 36. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) ενήλικων εμβολιασμένων λαβρακιών τεχνητά μολυσμένων με εμβάπτιση (NS, 10⁵ cfu ml⁻¹) ενήλικων λαβρακιών. Α) Η επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων με υδατικό διάλυμα βακτηρίνης NS (10⁷ κύτταρα/ψάρι) και την αντίστοιχη ομάδα control (ορός) και B) η επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων με ελαιώδες διάλυμα βακτηρίνης (NS + STA) και την αντίστοιχη ομάδα control (ορός + STA) (δεξιά).

Πείραμα 2

Η θνησιμότητα στις ομάδες που μολύνθηκαν με το στέλεχος NS, (control NS και Vac NS), ξεκίνησε τη 6^η ημέρα μετά τη μόλυνση (Εικόνα 37 A). Η θνησιμότητα στις ομάδες που μολύνθηκαν με το στέλεχος PDB ξεκίνησε την 4^η ημέρα για την ομάδα των ανεμβολίαστων (control PDB) ιχθύων και την 9^η ημέρα μετά τη μόλυνση για την ομάδα των εμβολιασμένων με διπλό εμβόλιο (Vac PDB) (Εικόνα 37 B).

Η θνησιμότητα δεν έφτασε στο 100% του πληθυσμού σε καμία ομάδα κατά τη διάρκεια του πειράματος (14 ημέρες). Η υψηλότερη θνησιμότητα (90%) παρατηρήθηκε στην ομάδα των ανεμβολίαστων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος NS (control NS) και η χαμηλότερη (30%) στην ομάδα των εμβολιασμένων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB, (Vac PDB).

Στην ανάλυση Kaplan Meier, ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταξύ των τεσσάρων ομάδων [χ² (3, N=60)=20.39, p=0.0001]. Συγκεκριμένα από τις επί μέρους συγκρίσεις προέκυψε ότι η ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB διέφερε από όλες τις ομάδες. Πιο αναλυτικά, η ομάδα η ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB (Vac PDB) διέφερε α) από την ομάδα των εμβολιασμένων που μολύνθηκε με το στέλεχος NS (Vac NS), [χ^2 (1, N=40)=8.907, p=0.003], β) από την ομάδα των ανεμβολίαστων που μολύνθηκε με το PDB (control PDB), [χ^2 (1, N=30)=14.393, p=0.000] και γ) από την ομάδα των ανεμβολίαστων που μολύνθηκε με το NS (control NS), [χ^2 (1, N=30)=14.773, p=0.000]. Η τιμή RPS₆₀ για το διπλό εμβόλιο έναντι του στελέχους NS ήταν 38% και έναντι του στελέχους PDB ήταν 100%. Η τιμή RPS για το διπλό εμβόλιο έναντι του στελέχους (14 ημέρες).



Εικόνα 37. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) ενήλικων εμβολιασμένων λαβρακιών με διπλό (NS+PDB, 10⁷ κύτταρα/ψάρι), ελαιώδες (Montanide) εμβόλιο. Α) Η επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων και control (ορός + Montanide) ιχθύων που μολύνθηκαν τεχνητά με εμβάπτιση με το στέλεχος NS (10⁵ cfu ml⁻¹) και B) επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων και control (ορός + Montanide) ιχθύων που μολύνθηκαν τεχνητά με εμβάπτιση με το στέλεχος PDB (10⁵ cfu ml⁻¹).

Πείραμα 3

Η θνησιμότητα στις ομάδες που μολύνθηκαν με το στέλεχος NS ξεκίνησε τη 2ⁿ ημέρα στην ομάδα των ανεμβολίαστων (control NS) ιχθύων και την 3ⁿ ημέρα μετά τη μόλυνση στην ομάδα των εμβολιασμένων με διπλό εμβόλιο (Vac NS) (Εικόνα 38 A). Η θνησιμότητα στις ομάδες που μολύνθηκαν με το στέλεχος PDB ξεκίνησε την 3ⁿ ημέρα για την ομάδα των ανεμβολίαστων (control PDB) ιχθύων και την 5ⁿ ημέρα μετά τη μόλυνση για την ομάδα των εμβολιασμένων με διπλό εμβόλιο (Vac PDB) (Εικόνα 38 B).

Η θνησιμότητα δεν έφτασε στο 100% του πληθυσμού σε καμία ομάδα κατά τη διάρκεια του πειράματος (10 ημέρες). Η υψηλότερη θνησιμότητα (95%) παρατηρήθηκε στην ομάδα των ανεμβολίαστων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB, (control PDB) και η χαμηλότερη (10%) στην ομάδα των εμβολιασμένων που μολύνθηκε με το ίδιο στέλεχος (Vac PDB).



Εικόνα 38. Αθροιστική ημερήσια επιβίωση (%) νεαρών εμβολιασμένων λαβρακιών με διπλό (NS+PDB, 10⁹ κύτταρα ml⁻¹) εμβόλιο. Α) Η επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων και control **ιχθύων** που μολύνθηκαν τεχνητά με εμβάπτιση με το στέλεχος NS (10⁵ cfu ml⁻¹) και Β) επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων και control **ιχθύων** που μολύνθηκαν τεχνητά με το στέλεχος NS (10⁵ cfu ml⁻¹) και Β) επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων και control **ιχθύων** που μολύνθηκαν τεχνητά με το στέλεχος NS (10⁵ cfu ml⁻¹) και Β) επιβίωση για την ομάδα των εμβολιασμένων και control **ιχθύων** που μολύνθηκαν τεχνητά με εμβάπτιση με το στέλεχος PDB (10⁵ cfu ml⁻¹).

Στην ανάλυση Kaplan Meier, στατιστικά σημαντικές διαφορές ανιχνεύθηκαν μεταξύ των μεταξύ των τεσσάρων ομάδων [χ^2 (3, N=80)=23, p=0.0001]. Συγκεκριμένα από τις επί μέρους συγκρίσεις προέκυψε ότι η ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB διέφερε από όλες τις ομάδες. Πιο αναλυτικά, η ομάδα η ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB διέφερε από όλες τις ομάδες. Πιο αναλυτικά, η ομάδα η ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB διέφερε από όλες τις ομάδες. Πιο αναλυτικά, η ομάδα η ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων που μολύνθηκε με το στέλεχος PDB διέφερε α) από την ομάδα των εμβολιασμένων αυμολύνθηκε με το στέλεχος NS (Vac NS), [χ^2 (1, N=40)=15.343, p=0.000], β) από την ομάδα των ανεμβολίαστων που μολύνθηκε με το PDB (control PDB), [χ^2 (1, N=40)=30.368, p=0.000] και γ) από την ομάδα των ανεμβολίαστων που μολύνθηκε με το NS (control NS), [χ^2 (1, N=40)=12.001, p=0.001]. Η τιμή RPS₆₀ για το διπλό εμβόλιο έναντι του στελέχους NS ήταν 28% και έναντι του στελέχους PDB ήταν 88%. Η τιμή RPS για το διπλό εμβόλιο έναντι του στελός του πειράματος (10 ημέρες).

3.6.2. Τίτλος αντισωμάτων

Πείραμα 2

Αντισώματα για τα δύο αντιγόνα (NS, PDB) ανιχνεύθηκαν σε αραιώσεις 1:50-1:6.400 (τίτλος αντισωμάτων: 50 - 6400) για την ημέρα 30. Για την ημέρα 60 μετά τον εμβολιασμό, αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε αραιώσεις 1:50 - 1:1.600 (τίτλος αντισωμάτων: 50 - 1.600) για το αντιγόνο NS και σε αραιώσεις 1:100 - 1:6.400 (τίτλος αντισωμάτων: 100 - 6.400) για το PDB. Οι μέσοι όροι του τίτλου αντισωμάτων (log₂) για τον αντιγόνο NS ήταν 9,8 ± 2,4 την ημέρα 30 και 8,2 ± 2,5 την ημέρα 60 μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 39). Οι μέσοι όροι (log₂) για τον αντιγόνο PDB ήταν 10,8±2,3 την ημέρα 30 και 10,4±2,4 την ημέρα 60 μετά τον εμβολιασμό. Στην ομάδα control (ορός + Montanide) ο τίτλος αντισωμάτων ήταν μηδενικός. Δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων [χ^2 (3, N=30)=7.028, p=0.071].



Εικόνα 39. Τίτλος αντισωμάτων (log2) των εμβολιασμένων με διπλό ελαιώδες (NS + PDB + Montanide) εμβόλιο λαβρακιών για το κάθε αντιγόνο ξεχωριστά, τις ημέρες 30 (d30) και 60 (d60) μετά τον εμβολιασμό στα λαβράκια του πειράματος 2.

3.6.3. Γονιδιακή Έκφραση

Πείραμα 1.2

Σε γενικές γραμμές η ανοσολογική απόκριση όπως αντικατοπτρίζεται μέσω της γονιδιακής έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων στο μεσονεφρικό ιστό, παρουσιάστηκε αυξημένη την ημέρα 15 σε σχέση με την ημέρα 30 μετά τον εμβολιασμό σε όλες τις ομάδες εμβολίου εκτός του control-opóς σε όλα τα γονίδια εκτός του CD4 που σημείωσε αύξηση την ημέρα 30 (Εικόνα 40). Παρουσιάστηκε αυξητική τάση της έκφρασης των γονιδίων MHCII-β, IgM και κυρίως του TCR-β στις ομάδες control STA, NS και NS + STA.

Εντός των ομάδων, στατιστικά σημαντικές διαφορές (με αστερίσκο) στη γονιδιακή έκφραση μεταξύ των ημερών 15 και 30, εντοπίστηκαν στα γονίδια TCR-β (p=0.034) και CD8 (p=0.032) στην ομάδα control STA, στα γονίδια TCR (p=0.014), CD8 (p=0.014) και MHCII (p= 0.049) στην ομάδα εμβολίου NS και τέλος στα γονίδια CD4 (p=0.045) και TCR (p=0.014) στην ομάδα εμβολίου NS + STA.

Μεταξύ των ομάδων εμβολίου, δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση κανενός γονιδίου τη μέρα 15 μετά τον εμβολιασμό. Την ημέρα 30 στατιστικά σημαντικές διαφορές (ανοιχτό πράσινο) μεταξύ των ομάδων εντοπίστηκαν στα γονίδια CD4 (p=0.023) και CD8 (p=0.015). Συγκεκριμένα, το γονίδιο CD4 παρουσίασε αυξημένη έκφραση στην ομάδα που εμβολιάστηκε με NS+STA (Εικόνα 40) και στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν σχέση με τις ομάδες control: control (ορός) (p=0.005) και control STA (p=0.011). Το γονίδιο CD8 παρουσίασε μειωμένη έκφραση (p=0.22-0.24) στις ομάδες ορός+STA και NS σε σχέση με τις άλλες 2 ομάδες την ημέρα 30 μετά τον εμβολιασμό (Εικόνα 40).









Εικόνα 40. Σχετική (ως προς την ακτίνη-β) έκφραση των γονιδίων του ανοσοποιητικού από το μεσονεφρικό ιστό, που μελετήθηκαν στις ομάδες εμβολίου του πειράματος 1.2. Με ανοιχτό πράσινο χρώμα παρουσιάζονται οι ομάδες εμβολίου της ημέρας 30 που διαφέρουν στατιστικά από τις υπόλοιπες ομάδες της ίδιας μέρας. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές συναρτήσει του χρόνου μέσα στην ίδια ομάδα.

4. Συζήτηση

Ανίχνευση αερομονάδων - Στοιχεία παθολογίας και επιζωοτιολογίας

Αερομονάδες ανιχνευθήκαν σε επτά περιοχές που αντιστοιχούν σε οκτώ ιχθυοτροφικές μονάδες λαβρακιού στις δύο πλευρές (Ανατολικό/Δυτικό) του Αιγαίου. Ανάμεσα σε άλλα είδη του γένους που ανιχνεύθηκαν, το είδος *Α. veronii* ήταν το πιο κοινό σε όλα τα ύποπτα για *Aeromonas* spp. περιστατικά λοιμώξεων σε λαβράκι όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία τους. Το είδος *Α. veronii* εντοπίστηκε επίσης στα είδη *Χ. helleri* (XU 1) και *D. rerio* (Z 1) για τα οποία αποτελεί γνωστό παθογόνο (Chandrarathna et al., 2018; Das et al., 2020; Song et al., 2017).

Τα κλινικά σημάδια των λαβρακιών που βρέθηκαν με λοίμωξη από *Α. veronii* περιλάμβαναν τα τυπικά γνωρίσματα της νόσου όπως έχει περιγραφεί: λήθαργο, ικτερική εμφάνιση και εξωτερικές πετέχειες και εσωτερικά σπληνομεγαλία και οζίδια στον σπλήνα και τα νεφρά (Smyrli et al., 2017). Εξάρσεις της ασθένειας παρατηρήθηκαν τους θερινούς μήνες σε θερμοκρασίες > 21°C όπως και στην αρχική περιγραφή.

Όσον αφορά το Δ. Αιγαίο, στην περίπτωση της μονάδας εκτροφής 1 όπου αρχικά περιγράφηκε η ασθένεια (Smyrli et al., 2017), η ασθένεια φαίνεται να έχει εγκαθιδρυθεί. Απομονώθηκε μόνο το είδος *Α. veronii*, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Μάρτιος- Δεκέμβριος) εξαιρουμένων των χειμερινών μηνών (θερμοκρασία < 18°C, (Ν. Δουράλα, προσωπική επικοινωνία), με σταθερή παρουσία του προβλήματος τα τελευταία δέκα χρόνια. Επίσης, ενώ αρχικά η ασθένεια αναφέρθηκε σε μία μόνο περιοχή (δύο γειτονικές μονάδες εκτροφής) στον Αργολικό κόλπο, εντοπίστηκε σε μία ακόμα μονάδα εκτροφής (2), ενώ έχει επεκταθεί γεωγραφικά, στον γειτονικό Κόλπο του Σαρωνικού (μονάδα εκτροφής 3), όπου υπάρχει έντονη ιχθυοκαλλιεργητική δραστηριότητα.

Ενώ αρχικά επηρέαζε μόνο μεγάλα ψάρια (κυρίως εμπορεύσιμου μεγέθους, > 200 g), πλέον εντοπίζεται και σε μικρότερα των 35-60 g. Η θνησιμότητα στο πεδίο είναι αυξημένη σε σχέση με την αρχική περιγραφή και μπορεί να φτάνει το 80% της συνολικής παραγωγής σε επίπεδο έτους (Ν. Δουράλα, προσωπική επικοινωνία). Η ασθένεια φαίνεται να προκαλεί χρόνια νοσηρότητα, που μπορεί να επηρεάζει αρνητικά το ρυθμό αύξησης (όπως φάνηκε και στην παρούσα μελέτη) και τη γενική

143

κατάσταση της υγείας των ιχθύων που έχουν επιβιώσει της έξαρσης (προσωπική επικοινωνία).

Στο Α. Αιγαίο η κατάσταση δεν φαίνεται να είναι ανάλογης σοβαρότητας. Οι αναφορές εξάρσεων της ασθένειας δεν ήταν σταθερές στο χρόνο. Πέραν του *Α. veronii*, ανιχνεύθηκαν τρία ακόμα είδη (*A. bivalvium, A. media* και *Α. salmonicida*) τα οποία όμως αποτέλεσαν μόνο αποσπασματικές απομονώσεις. Τα ψάρια που εμφανίζουν τα τυπικά κλινικά σημάδια της νόσου *Α. veronii* εξακολουθούν να παρατηρούνται στο πεδίο τους θερινούς μήνες (Π. Βαρβαρήγος, προσωπική επικοινωνία) χωρίς ωστόσο να θεωρούνται απειλή προς το παρόν, καθώς οι επιπτώσεις είναι πολύ λιγότερες σε σχέση με το Δυτικό Αιγαίο. Όπως φάνηκε από τις δειγματοληψίες της παρούσας εργασίας, η ανίχνευση του Α. veronii ήταν εφικτή από ήδη από τους 15,5°C. Ωστόσο, μια πρόσφατη έξαρση στο Bodrum (δειγματοληψία 24) και οι ομοιότητες του στελέχους T04-D με τα υπόλοιπα ανατολικά στελέχη εφιστά την προσοχή σε ενδεχόμενο ρίσκο για την παραγωγή στην περιοχή του Α. Αιγαίου.

Το ίδιο είδος (*A. veronii* bv. *sobria*) έχει αναφερθεί σε άρρωστα λαβράκια και τσιπούρες στην Ιταλία (Martino et al., 2011), και στη Μαύρη Θάλασσα (Uzun and Ogut, 2015). Στη Μαύρη Θάλασσα, αναφέρθηκε ως το πιο κοινό είδος σε άρρωστα λαβράκια είτε μόνο του είτε σε μικτές λοιμώξεις με τα *Ph. damselae* subsp. *damselae*, *V. harveyi* και *V. rotiferianus*. Το περιστατικό παρουσιάστηκε στο ίδιο θερμοκρασιακό εύρος (20-26°C) με αυτά του Αιγαίου με παρόμοια συμπτωματολογία (ελκώδεις δερματικές αλλοιώσεις και αιμορραγίες, κοιλιακή διάταση, ασκητικό υγρό, οζίδια σε νεφρό και σπλήνα). Η αθροιστική θνησιμότητα χωρίς να διευκρινίζεται το χρονικό διάστημα φτάνει στο 70% του πληθυσμού. Σημειώνεται ότι στις μονάδες εκτροφής που αναφέρθηκε το είδος στη Μαύρη Θάλασσα, εκτρέφονταν (εποχιακά εναλλασσόμενα) επίσης πέστροφες (*Oncorhynchus mykiss*), όπου έχουν αναφερθεί λοιμώξεις *A. veronii* στο Αιγαίο και τη Μαύρη Θάλασσα (Onuk et al., 2012).

Σε ψάρια του γλυκού νερού όπως είδη γατόψαρων, κυπρινοειδή, χρυσόψαρο κ.α., όπου συνήθως αναφέρεται ως παθογόνο το *Α. veronii* κοινά εξωτερικά κλινικά σημάδια αποτελούν τα δερματικά έλκη (επιφανειακά ή εκτεινόμενα μέχρι το μυϊκό ιστό), συνοδευόμενα από πετέχειες, ερύθημα και αιμορραγίες (ουρά/ στόμα/ κεφαλή/ σώμα) (Cai et al., 2012; Hoai et al., 2019; Liu et al., 2016; Rahman et al., 2002; Sreedharan et al., 2011; Sun et al., 2016; Zhu et al., 2015). Κοιλιακή διάταση έχει
παρατηρηθεί στο γατόψαρο (*Ictalurus punctatus*) με ασκητικό υγρό εσωτερικά στο *Astronotus ocellatus* (Sreedharan et al., 2011) και στον κυπρίνο (*Carassius gibelio*) (Sun et al., 2016). Επίσης αιμορραγίες στο ήπαρ έχουν αναφερθεί στο γατόψαρο (*Leiocassis longirostris*) (Cai et al., 2012). Άλλα εσωτερικά συμπτώματα δεν αναφέρονται όπως και η αναιμία που είναι χαρακτηριστική στην περίπτωση της ασθένειας στο λαβράκι. Το χρονικό διάστημα δεν διευκρινίζεται γενικά, αλλά οι θνησιμότητες (αθροιστικές) αναφέρονται ως μαζικές και μπορεί να κυμαίνονται από 30-100% του εκτρεφόμενου πληθυσμού (Cai et al., 2012; Hoai et al., 2019; Liu et al., 2016; Zhu et al., 2015). Η εποχικότητα και η θερμοκρασία, σημαντικοί επιδημιολογικοί παράγοντες στις περισσότερες περιπτώσεις επίσης δεν παρατίθενται με εξαίρεση το εύρος μεταξύ 22-30°C στην περίοδο Ιουλίου-Οκτωβρίου . (Zhu et al., 2015).

Συγκριτική μελέτη – Χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των στελεχών λαβρακιού

Σε επίπεδο φαινοτύπου διακρίθηκαν τρεις ομάδες στελεχών *Α. veronii* από λαβράκι βάσει της κινητικότητας και παραγωγής χρωστικών σε γενικό στερεό θρεπτικό: α) στελέχη Δ. Αιγαίου, αρνητικά για κινητικότητα και παραγωγή χρωστικής, β) στελέχη Δ. Αιγαίου, θετικά για κινητικότητα και παραγωγή χρωστικής και γ) στελέχη Α. Αιγαίου, θετικά για κινητικότητα και μέτρια (Ι) για παραγωγή χρωστικής. Τα στελέχη XU 1 και Z 1, γλυκού νερού, διαφέρουν από τα στελέχη από λαβράκι, εμφάνισαν τον τυπικό φαινότυπο του είδους και ήταν θετικά για την κινητικότητα και αρνητικά για την παραγωγή χρωστικής.

Τυπικές βιοχημικές ιδιότητες του γένους *Aeromonas*, όπως θετική αντίδραση καταλάσης και οξειδάσης, ικανότητα ζύμωσης της D-γλυκόζης, αδυναμία παραγωγής οξέος από την ξυλόζη (AIA) και απουσία του ενζύμου ουρεάσης (Abbott et al., 2003) καταγράφηκαν σε όλα τα στελέχη *A. veronii*. Όλα στελέχη *A. veronii* από το λαβράκι αναπτύχθηκαν σε pH 6 και 1% NaCl, αλλά η αύξηση σε pH 5 παρουσίασε ποικιλότητα και λίγα μόνο στελέχη αναπτύχθηκαν σε αλατότητα 4% NaCl. Εκτός τριών (AG-5.34.6, NS 31.2.1, and NS 33.1), τα στελέχη *A. veronii* από το λαβράκι δεν μεταβόλισαν τη Dαραβιτόλη (D-arabitol).

Επί μέρους χαρακτήρες σε ομάδες στελεχών *Α. veronii* από λαβράκι όπως, η έλλειψη κινητικότητας (NS και NS 13, Δ. Αιγαίο), η παραγωγή χρωστικών ουσιών (Δ. Αιγαίο) και η αρνητική αντίδραση ινδόλης (όλα τα στελέχη) συσχετίζουν τα στελέχη

αυτά με το είδος *A. salmonicida* για το οποίο είναι ενδεικτικοί (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Ωστόσο, όλα τα στελέχη ήταν αρνητικά στη ζύμωση της L-αραβινόζης και της σαλικίνης (salicin) που είναι χαρακτηριστικά του συμπλέγματος ειδών *A. sobria* (Abbott et al., 2003). Στο σύμπλεγμα ειδών *A. sobria*, η ζύμωση σακχαρόζης (όλα τα στελέχη) είναι χαρακτηριστικό του είδους *A. veronii* και μεταξύ των δύο βιολογικών ποικιλιών (biovarieties) του είδους η αρνητική αντίδραση ODC (όλα εκτός του στελέχους BIOO50A) χαρακτηριστική της *A. veronii* bv. *sobria* (Abbott et al., 2014).

Από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, το μόνο κοινό μεταξύ των στελεχών *Α. veronii* από το λαβράκι ήταν η αρνητική αντίδραση ινδόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χαρακτήρας αυτός, έχει αναφερθεί και στις δύο άλλες περιπτώσεις του είδους σε άρρωστα λαβράκια στην Ιταλία (στελέχη Ae 4 και Ae 59) (Martino et al., 2011) και στη Μαύρη Θάλασσα (Uzun and Ogut, 2015). Η ινδόλη έχει συσχετιστεί με βασικές πτυχές της βακτηριακής φυσιολογίας όπως η αντοχή στα φάρμακα, ο σχηματισμός βιοφίλμ και η λοιμογόνος δράση (Lee and Lee, 2010). Για παράδειγμα, τα βακτήρια που δεν παράγουν ινδόλη χρησιμοποιούν διαφορετικές οξυγενάσες, οι οποίες αποικοδομούν την ινδόλη άλλων ειδών παράγοντας ουσίες που εμπλέκονται στον βακτηριακό ανταγωνισμό. Το κατά πόσο το χαρακτηριστικό αυτό αποτελεί μια προσαρμογή που δίνει πλεονέκτημα στα συγκεκριμένα στελέχη *Α. veronii* που περιγράφηκαν εδώ, σε σχέση με άλλες αερομονάδες ή άλλα κοινά παθογόνα του θαλασσινού νερού χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

Μεταξύ Ανατολικού-Δυτικού Αιγαίου, όλα στελέχη *Α. veronii* του Δ. Αιγαίου ήταν θετικά στην αντίδραση μεταβολισμού β-μεθυλο-D-γλυκοζίτη (β-Methyl-D-Glucoside), ενώ όλα τα στελέχη *Α. veronii* του Α. Αιγαίου ήταν αρνητικά. Όλα στελέχη *Α. veronii* του Δ. Αιγαίου ήταν θετικά στην τρεχαλόζη (trehalose) και το D-γλουκονικό οξύ (D-Gluconic acid). Ωστόσο, μόνο δύο (TO4-D and AG-5.34.6) και αντίστοιχα τρία (BIOO50A, AG-2.6.1 και AG-5.34.6) στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι του Α. Αιγαίου ήταν θετικά στις αντιδράσεις αυτές. Η πλειοψηφία των στελεχών *Α. veronii* του Δ. Αιγαίου ήταν αρνητικά για τη β-γαλακτοσιδάση (β-galactosidase) ενώ η πλειοψηφία των στελεχών του Α. Αιγαίου ήταν θετικά στην αντίδραση αυτή. Οι αντιδράσεις για τη διυδρολάση της αργινίνης (arginine dihydrolase, ADH) και την αποκαρβοξυλάση της λυσίνης (lysine decarboxylase, LDC) ήταν σχεδόν αποκλειστικά θετικές για τα στελέχη του Δ. Αιγαίου, ενώ στα στελέχη του Α. Αιγαίου παρατηρήθηκε ποικιλότητα στους χαρακτήρες αυτούς.

Όσον αφορά την παραγωγή της καφέ χρωστικής ουσίας από στελέχη του Δ. Αιγαίου, ο φαινότυπος αυτός έχει αναφερθεί επίσης σε στελέχη *Α. veronii* από άρρωστα λαβράκια στην Ιταλία (Martino et al., 2011). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρωστική παρατηρήθηκε μόνο σε καλλιέργειες σε στερεό υπόστρωμα. Δεν παρατηρήθηκε χρωματισμός του υγρού θρεπτικού ή κάποιο ίζημα. Αν και χρήζει περεταίρω διερεύνησης, η παρατήρηση αυτή μπορεί να σχετίζεται με τον μηχανισμό Quorum sensing (QS) όπως έχει παρατηρηθεί σε στελέχη *Α. salmonicida* subsp. *achromogenes* όπου μετάλλαξη που εμπόδισε τον μηχανισμό οδήγησε και σε μειωμένη παραγωγή χρωστικής (Schwenteit et al., 2011).

Οι μελανίνες, που ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες βάσει της χημικής τους σύνθεσης (ευμελανίνη, φαιομελανίνη, αλλομελανίνη και πυομελανίνη), έχουν συσχετιστεί μεταξύ άλλων με στοιχεία της μολυσματικότητας και παθογονικότητας των βακτηρίων όπως τη δυνατότητα αφομοίωσης σιδήρου ή την ανθεκτικότητα εντός των μακροφάγων του ξενιστή (Chatfield and Cianciotto, 2007; Nosanchuk and Casadevall, 2006). Στις αερομονάδες είναι κοινό και συντηρημένο το μονοπάτι βιοσύνθεσης της πυομελανίνης μέσω του ομογενοδικού οξέως (homogentisic acid, HGA) (Wang et al., 2015). Ο προσδιορισμός της φύσης και του μηχανισμού παραγωγής της χρωστικής αποτελούν αντικείμενο παράλληλης μελέτης της ομάδας του εργαστηρίου Μικροβιολογίας Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛΚΕΘΕ.

Στην παρούσα εργασία δύο γονίδια αλληλουχήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση . Το γονίδιο gyrB επειδή είναι το πλέον κοινό στην βάση NCBI GenBank για τις αερομονάδες και το γονίδιο 16S rRNA. Το τελευταίο, αν και αποτυγχάνει να διακρίνει στενά συγγενικά είδη των *Aeromonas* spp., χρησιμοποιείται ευρέως στην ταυτοποίηση βακτηρίων και αλληλουχήθηκε για λόγους σύγκρισης με άλλες μελέτες που εξακολουθούν να βασίζονται για λόγους ευκολίας σε ένα μόνο γενετικό δείκτη και στις περιπτώσεις αυτές συχνά επιλέγουν το συγκεκριμένο. Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης με το γονίδιο 16S rRNA έδειξαν ότι από ένα μέγεθος και κάτω (<1030 bp), οι αλληλουχίες δεν μπορούσαν να ταυτιστούν σε επίπεδο είδους, ενώ ταυτόχρονα πολλές μελέτες βασίζονται ακόμα και σε μικρότερα τμήματα για

ταυτοποίηση. Η αδυναμία αυτή εξηγεί και τις παραφυλίες που προέκυψαν στο φυλογενετικό δέντρο.

Η ιεραρχική ανάλυση συστάδων ανέδειξε τη φαινοτυπική και βιοχημική διαφοροποίηση των στελεχών *Α. veronii* από λαβράκι που αντιστοιχεί σε τρεις φαινοτύπους και αναδεικνύει το Ανατολικό/Δυτικό πρότυπο γεωγραφικής προέλευσης. Παρόλα αυτά, τα στελέχη ήταν πανομοιότυπα και με τους δύο γενετικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.

Οι αλληλουχίες και των δύο γονιδίων έδειξαν μηδενική διαφοροποίηση ανάμεσα στα στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι. Το τελευταίο έγινε εμφανές και στις φυλογενετικές αναλύσεις του γονιδίου *gyr*B, όπου το στέλεχος Ae4 που έχει απομονωθεί από άρρωστο λαβράκι στην Ιταλία έδειξε 0% διαφοροποίηση και ομαδοποιήθηκε με τα υπόλοιπα στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι. Διακρίθηκαν ωστόσο, τα υπόλοιπα στελέχη *Α. veronii* από διαφορετικούς ξενιστές και πηγές απομόνωσης (π.χ. XU 1 και Z 1). Ο προσδιορισμός της βιοποικιλίας δεν είναι εφικτός βάσει γονιδίων οικιακής οικονομίας (Silver et al., 2011). Για τον προσδιορισμό σε επίπεδο βιοποικιλίας χρησιμοποιήθηκε η βιοχημική αντίδραση της ODC που αναφέρθηκε παραπάνω.

Απόκριση σε αντιβιοτικά

Γενικά οι αερομονάδες παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη, την πενικιλλίνη, την καρβενικιλλίνη, και την τικαρκιλλίνη και ευαισθησία στις ενισχυμένες σουλφοναμίδες, στις 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς κεφαλοσπορίνες, τις αμινογλυκοσίδες, τις τετρακυκλίνες, κινολόνες και τις καρβαπενέμες (Aravena-Román et al., 2012; Baron et al., 2017; Kämpfer et al., 1999; Lamy et al., 2012; Martin-Carnahan and Joseph, 2005; Scarano et al., 2018). Η ανθεκτικότητα στην αμπικιλλίνη (πενικιλλίνες β-λακταμάσης) που παρατηρήθηκε για όλα τα στελέχη *Aeromonas* spp. που εξετάστηκαν κωδικοποιείται γενετικά στις αερομονάδες. Δύο γονίδια β-λακταμάσης έχουν εντοπιστεί στα γονιδιώματα των *Α. veronii* της συλλογής που παρουσιάζεται εδώ (Smyrli et al., 2019).

Τα στελέχη *Α. veronii* από το λαβράκι ήταν στη συντριπτική τους πλειοψηφία ευαίσθητα, σε όλα τα άλλα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν (SXT: τριμεθοπρίμησουλφαμεθοξαζόλη, OT-TE: τετρακυκλίνες, UB-OA: κινολόνες και FFC), μεταξύ αυτών και όσα έχουν αδειοδοτηθεί για χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες. Επίκτητη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (π.χ. τετρακυκλίνη, οξολινικό οξύ, τριμεθοπρίμη και φλουμεκίνη) έχει αναφερθεί σε αερομονάδες γενικά αλλά και στο *A. veronii* σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας (Nawaz et al., 2006; Odeyemi and Ahmad, 2017; Scarano et al., 2018; Uzun and Ogut, 2015; Yang et al., 2017). Το είδος έχει αναφερθεί στο λαβράκι περίπου την τελευταία δεκαετία και θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η πολλαπλή ευαισθησία σε εμπορικά αντιβιοτικά που παρατηρήθηκε εδώ για το *A. veronii* δείχνει τη σχετικά πρόσφατη εμφάνιση του είδους στο Αιγαίο ή/και μια σχετικά λελογισμένη χρήση αντιβιοτικών σύμφωνα με τις βέλτιστες πρακτικές για την ιχθυοκαλλιέργεια.

Αν και τα αντιβιογράμματα δείχνουν μία εύκολα αντιμετωπίσιμη ασθένεια (πολλαπλή ευαισθησία), σύμφωνα με τους κτηνιάτρους των μονάδων (προσωπική επικοινωνία), στην πράξη η χρήση αντιβιοτικών είχε πολύ χαμηλή αποτελεσματικότητα. Αυτό μπορεί να συσχετιστεί με την ανορεξία που παρουσιάζεται ως σύμπτωμα σε πολλές ασθένειες, και άρα την επακόλουθη επιδείνωση της γενικής υγείας των ιχθύων αλλά και την χαμηλή πρόσληψη της αντιβίωσης που συνήθως χορηγείται μέσω της τροφής.

Επιπλέον, στη συγκεκριμένη νόσο, σύμφωνα με ευρήματα των συνεργαζόμενων κτηνιάτρων, φαίνεται πως το πρώτο όργανο που επηρεάζεται είναι το ήπαρ. Οι πολλαπλές αντιβιοτικές θεραπείες που δοκιμάστηκαν αρχικά, είχαν τοξική επίδραση στον οργανισμό των ιχθύων και οδήγησαν σε μεγαλύτερη θνησιμότητα. Αυτό πιθανά εξηγείται από τη βλάβη του ήπατος εξαιτίας της συστημικής νόσου που όχι μόνο αποτυγχάνει να απομακρύνει μέσω της φαγοκυττάρωσης στο ενδοθήλιο τα βακτήρια αλλά και να αποτοξινώσει επαρκώς τον οργανισμό από τα αντιβιοτικά. Έτσι, η χρήση αντιβιοτικών στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν θα είχε κανένα νόημα.

Σε άλλες περιπτώσεις όπου αερομονάδες έχουν αναφερθεί ως παθογόνα στη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια, έδειξαν επίσης πολλαπλή ευαισθησία σε κοινά αντιβιοτικά. Η έλλειψη σαφών ορίων και κριτηρίων για τις αερομονάδες (Scarano *et al.* 2018; Lamy *et al.* 2012; Baron *et al.* 2017; Aravena-Roman *et al.* 2012) σε συνδυασμό με τις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στις διάφορες μελέτες δυσχεραίνει τη σύγκριση μεταξύ περιστατικών αλλά και τον εντοπισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

Με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων που χρησιμοποιήθηκε και εδώ, το είδος *Α. hydrophila* από λαβράκι και χιόνα στο Δ. Αιγαίο, ήταν ευαίσθητο στη φλουμεκίνη και την οξυτετρακυκλίνη (Doukas et al., 1998). Με την ίδια μέθοδο, το είδος *Α. salmonicida* subsp. masoucida/achromogenes από λαβράκι στη Μαύρη Θάλασσα έδειξε ευαισθησία στα αντιβιοτικά τριμεθοπρίμη, φλουμεκίνη, οξυτετρακυκλίνη, οξολινικό οξύ και στα περισσότερα από τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν, αλλά ήταν ανθεκτικό σε σουλφοναμίδια, αμοξικιλλίνη και αμπικιλλίνη (Karatas et al., 2005).

Με την ίδια μέθοδο, το είδος *Α. veronii* από λαβράκι στη Μαύρη Θάλασσα παρουσίασε ευαισθησία στα αντιβιοτικά φλορφενικόλη, οξυτετρακυκλίνη και ενροφλοξασίνη και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (Uzun and Ogut, 2015) που χρησιμοποιούνταν ευρέως στην περιοχή μελέτης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μονάδα εξέτρεφε επίσης πέστροφες και η ευαισθησία μπορεί να συσχετίζεται επίσης με την αλλαγή ξενιστή εποχιακά και άρα τον περιορισμό του πληθυσμού *Α. veronii*, αποτρέποντας και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αυτό ωστόσο, θα προϋπέθετε μια ειδική σχέση του είδους με το λαβράκι κάτι που δεν έχει αποδειχτεί προς το παρόν.

Με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ (agar diffusion), το είδος *A. salmonicida* subsp. salmonicida από λαβράκι στην Ισπανία, έδειξε ευαισθησία σε όλα τα αντιβιοτικά που εξετάστηκαν (αμπικιλλίνη, αμοξικιλλίνη, φλουμεκίνη, ενροφλοξασίνη, φλορφενικόλη, τριμεθοπρίμη, οξολινικό οξύ και πτεριδίνη) εκτός της οξυτετρακυκλίνης (Fernández-Álvarez et al., 2016). Τέλος, το ίδιο είδος από τσίπουρα που μεταφέρθηκε από την Ισπανία στα Κανάρια, βρέθηκε ευαίσθητο στα περισσότερα που εξετάστηκαν μεταξύ αυτών και τα κοινώς χρησιμοποιούμενα οξυτετρακυκλίνη και τριμεθοπρίμη (Real et al., 1994).

Συγκριτική γονιδιωματική

Σε επίπεδο γονιδιώματος, παρατηρήθηκε υψηλή ομοιότητα μεταξύ των στελεχών από λαβράκι όπως φαίνεται από τις τιμές ANI με όριο μέγιστης διαφοροποίησης μέσα στο ίδιο είδος το 96% (Colston et al., 2014). Ανεξάρτητα από τη φαινοτυπική απόκλιση και το πρότυπο βιοχημικής διαφοροποίησης Δύση/Ανατολής που προέκυψε από την ιεραρχική ανάλυση συστάδων, τα στελέχη του λαβρακιού παρέμειναν σχεδόν μη διαφοροποιήσιμα (μηδενική % γενετική απόσταση) από την πλειονότητα (gltA, groL, gyrB, metG και recA) των γενετικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν όπως φάνηκε και στην ανάλυση MLST. Όπως και στην ανάλυση NJ με το γονίδιο gyrB που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση όπου προέκυψε μηδενική διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών που μελετήθηκαν εδώ με το Ae4, και εδώ το σύνολο των αλληλουχιών που περιλαμβάνονται στην MLST κατέταξε τα στελέχη από το λαβράκι του Αιγαίου στον ίδιο αλληληλικό τύπο (ST) με τα στελέχη *A. veronii* (Ae4 και Ae59) που απομονώθηκαν το 1999 από άρρωστα λαβράκια στην Ιταλία.

Η ανάλυση SNP ήταν σύμφωνη με το πρότυπα διαφοροποίησης φαινοτυπικής και γεωγραφικής προέλευσης. Παρά τη χρονική απόσταση απομόνωσης, τα μη κινητικά στελέχη του Δ. Αιγαίου που δεν παράγουν χρωστική ουσία ήταν πιο κοντά μεταξύ τους σε σύγκριση με τα κινητά, που παράγουν χρωστική. Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε σχέση με τα ανατολικά στελέχη (κινητά, μη παραγωγή χρωστικής). Το μοτίβο Δύσης/Ανατολής κατέστη σαφές αφού η διαφοροποίηση μεταξύ στελεχών διαφορετικών περιοχών ήταν τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους υψηλότερη από ό, τι μεταξύ στελεχών της ίδιας περιοχής.

Η απόκλιση (SNPs) μεταξύ των στελεχών *Α. veronii* από λαβράκι ήταν τουλάχιστον μία τάξη μεγέθους υψηλότερη από εκείνη που αναφέρθηκε μεταξύ στελεχών *Α. salmonicida* subsp. *salmonicida* στη Δανία από διαφορετικά είδη πέστροφας, από εκτροφές γλυκού και αλμυρού νερού με χρονική απόσταση περίπου 30 ετών (Bartkova et al., 2017). Στην περίπτωση του *Α. salmonicida* η ομοιογένεια υποπληθυσμών στελεχών από τον ίδιο ξενιστή έχει προταθεί σε διάφορες μελέτες χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθοδολογίες (Menanteau-Ledouble et al., 2016) καθώς και η ομοιογένεια του υποείδους *Α. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Bartkova et al., 2017) αλλά και του είδους γενικότερα (Colston et al., 2014). Ωστόσο, η κατάσταση που περιγράφεται για το είδος *Α. veronii* είναι πιο περίπλοκη.

Παρά το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα στελέχη *Α. veronii* επηρέαζαν στο πεδίο μόνο το λαβράκι και όχι άλλα είδη που εκτρέφονται σε γειτονικά κλουβιά (Smyrli et al., 2017), το zebrafish αποτέλεσε ένα επιτυχημένο μοντέλο για τον προσδιορισμό της παθογένειας. Αν και σε υψηλότερη δόση από την αντίστοιχη για το λαβράκι η θνησιμότητα να έφτασε το 100% εντός 48 ωρών μετά τη μόλυνση (Smyrli et al., 2017).

Σε μελέτες MLST, πέραν μιας γενικής «προτίμησης» του είδους σε σχέση με άλλα σε θερμόφιλα ψάρια, η γενετική ποικιλότητα του είδους φαίνεται να είναι υψηλή

και δεν συσχετίζεται με συγκεκριμένο ξενιστή ή το περιβάλλον αυτού (θαλασσινό, υφάλμυρο, γλυκό νερό), (Martino et al., 2011; Roger et al., 2012). Επιπλέον, η οριζόντια μεταφορά γονιδίων φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη μη-συγκρότηση γενετικών υποομάδων παρά την προσαρμογή στελεχών σε ένα συγκεκριμένο οικολογικό θώκο (Silver et al., 2011).

Σε γονιδιωματικές μελέτες, ένας συγκεκριμένος τύπος στελεχών (pathotype) μπορεί να εντοπίζεται στον ίδιο ξενιστή σε απομακρυσμένες περιοχές (π.χ στελέχη από γατόψαρο στην Κίνα και στις ΗΠΑ) ενώ στελέχη από τον ίδιο ξενιστή και περιοχή να μην ομαδοποιούνται (Tekedar et al., 2019). Υψηλή γονιδιωματική ομοιότητα έχει αναφερθεί και σε μολυσματικά στελέχη του *Α. hydrophila* του ίδιου ST που έδειξαν 99,81% –100% ομοιότητα στις τιμές ANI παρά την απόμακρη γεωγραφική τους προέλευση (ΗΠΑ, Κίνα), πηγή απομόνωσης (ψάρια και έδαφος) και χρόνος απομόνωσης (1989-2010) (Pang et al., 2015).

Η απόκλιση μεταξύ των δυτικών-ανατολικών στελεχών μέσω της ανάλυσης SNPs υποδηλώνει ανεξάρτητες εξελικτικές οδούς του παθογόνου στις δύο πλευρές του Αιγαίου τουλάχιστον για την τελευταία δεκαετία που έχουν εντοπιστεί και απομονωθεί. Εάν υπάρχει ένας κοινός πρόγονος (αρνητικός για την ινδόλη), ή πρόκειται για συγκλίνουσα εξέλιξη με προσαρμοστικό πλεονέκτημα για το παθογόνο σε ένα νέο περιβάλλον, (π.χ. θαλάσσιο), χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Να σημειωθεί ότι οι μεσόφιλες αερομονάδες βρίσκονται κυρίως σε περιβάλλοντα χαμηλότερης αλατότητας (Martin-Carnahan and Joseph, 2005). Η προέλευση των *Α. veronii* που μελετήθηκαν εδώ δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί εφόσον δεν συμπεριλαμβάνονται δείγματα από γειτονικές περιοχές όπου έχει αναφερθεί το είδος στον ίδιο ή/και σε άλλους ξενιστές και το ζήτημα χρήζει περεταίρω διερεύνησης. Επιπλέον, το εύρος ξενιστή του παθογόνου δεν έχει διευκρινιστεί και η φυσιολογία του ξενιστή θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη για πιθανή ευπάθεια σε βακτηριακά παθογόνα ή τάξα παθογόνων.

Αντιγονική ποικιλότητα – Αντίστροφη εμβολιολογία

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης μελετήθηκαν εφόσον σχετίζονται με τη μολυσματικότητα και παθογονικότητα των βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των μηχανισμών προσκόλλησης και εισόδου στον ξενιστή. Ταυτόχρονα, λόγω θέσης είναι

τα πρώτα κυττραρικά στοιχεία που έρχονται σε επαφή τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Πολλές γνωστές OMPs έχουν δοκιμαστεί ως συστατικά εμβολίων καθώς έχουν ισχυρή ανοσογόνο επίδραση και η παρουσία διασταυρούμενης ανοσογονικής αντίδρασης μεταξύ OMPs από διαφορετικά είδη βακτηρίων δίνει δυνατότητες ανάπτυξης πολυδύναμων εμβολίων για μεγάλο εύρος παθογόνων (Xu et al., 2005).

Η πορίνη W (OmpW) της εξωτερικής μεμβράνης είναι συντηρημένη μεταξύ των Aeromonas spp., εμφανίζει επίσης ομολογία με την OmpW άλλων τάξων όπως V. cholerae ενώ η έκφραση της αυξάνεται ανάλογα με την αλατότητα (Maiti et al., 2009). Εμβόλιο ανασυνδυασμένης OmpW από το είδος A. hydrophila που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε κυπρίνο (Cyprinus carpio) και δια στόματος σε ινδικό κυπρίνο (Labeo rohita) παρήγαγε τίτλο αντισωμάτων και έδωσε υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (RPS%) σε δοκιμασία τεχνητής μόλυνσης στις εμβολιασμένες ομάδες έναντι των ομάδων ελέγχου (Dubey et al., 2016; Maiti et al., 2012). Σε άλλη μελέτη, η ανασυνδυασμένη πορίνη OmpC από το είδος A. hydrophila προκάλεσε ανοσοαπόκριση σε ποντίκια (Yadav et al., 2016). Η πορίνη (porin) CDS-2 που ανιχνεύθηκε στο στέλεχος VCK 1 έδειξε 84% ομοιότητα στην αλληλουχία γονιδίων (HF546053) και 87% ομοιότητα με πρωτεΐνη OmpC του A. hydrophila (EUS112) (Yadav et al., 2016). Τόσο η OmpW όσο και η OmpC εμφάνισαν υψηλό ποσοστό συντήρησης μεταξύ των στελεχών λαβρακιού και επομένως θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως καλοί υποψήφιοι για την ανάπτυξη εμβολίων.

Άλλες συντηρημένες μεμβρανικές πρωτεΐνες μεταξύ των στελεχών λαβρακιού ήταν οι πορίνες OmpA, μέλη της καλά μελετημένης οικογένειας πρωτεϊνών OmpA με βασικό ρόλο στην βακτηριακή παθογονικότητα συμπεριλαμβανομένων της προσκόλλησης (adhesion) και εισβολής στον ξενιστή, της αποφυγής της άμυνας του ξενιστή, στην ενδοκυτταρική επιβίωση αλλά και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Confer and Ayalew, 2013; Park et al., 2012; Smani et al., 2014). Στο είδος *A. veronii* από την εντερική οδό του κοινού κυπρίνου, έχουν αναφερθεί δύο διαδοχικά ομόλογα γονίδια (OmpAI και OmpAII) και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν φαίνεται να σχετίζονται με την προσκόλληση του βακτηρίου στην επιφάνεια του εντερικού σωλήνα του (Namba et al., 2008). Εδώ, τα ομόλογα αυτά γονίδια που αντιστοιχούν στις OmpA porins CDS-1 και CDS-2 και βρέθηκαν σε συστοιχία και με ένα τρίτο ομόλογο (υποθετική πρωτεΐνη CDS-8). Σε σύγκριση με τις αμινοξικές αλληλουχίες από τον κυπρίνο (AB290200), το OmpAI έδειξε 92% ομοιότητα με το OmpA porin-2 ενώ το OmpAII 99% ομοιότητα με το OmpA porin-1 από το λαβράκι. Αυτή ήταν η υψηλότερη ομοιότητα του OmpAI και του OmpAII από τον κυπρίνο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ομόλογα των πορινών OmpA από το λαβράκι. Η διάταξη αυτή έχει περιγραφεί και στο είδος *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (NCIMB 1102) με 64% ομοιότητα όπως και εδώ μεταξύ των OmpAI και OmpAII ενώ στο είδος *A. hydrophila* έχουν ταυτοποιηθεί τρία επίσης διαδοχικά γονίδια ompA (Costello et al., 1996; Namba et al., 2008). Στον κυπρίνο, ανασυνδυασμένο, δια στόματος χορηγούμενο εμβόλιο *Lactobacillus casei* που εκφράζει το OmpAI προκάλεσε ανοσοαπόκριση και προέφερε προστασία σε τεχνητή μόλυνση με *A. veronii* (Zhang et al., 2018).

Λίγες από τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης διέφεραν σημαντικά μεταξύ των στελεχών από λαβράκι στις δύο πλευρές του Αιγαίου όπως, η μαλτοπορίνη LamB και η πρωτεΐνη S-layer. Και οι δύο αυτές μεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν μελετηθεί ως αντιγόνα και είναι ικανές να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση και να παρέχουν προστασία έναντι μόλυνσης στα ψάρια (de Santana Lacerda Izabela et al., 2015; Khushiramani et al., 2012; Poobalane et al., 2010).

Οι πρωτεϊνικές αποστάσεις μεταξύ στελεχών από το λαβράκι και των στελεχών B565 και XU 1 έδειξαν ότι ορισμένες πρωτεΐνες όπως οι ompA ήταν σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες μεταξύ όλων των στελεχών. Αυτές οι πρωτεΐνες θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω, σε περισσότερα γονιδιώματα *Α. veronii* από διαφορετικούς ξενιστές και πηγές απομόνωσης, προκειμένου να ανιχνευθούν, πιθανές ομοιότητες π.χ. ανά ξενιστή ή/και συντηρημένες πρωτεΐνες στο είδος που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως αντιγόνα σε ανασυνδυασμένα εμβόλια έναντι του είδους *Α. veronii*.

Οι τροποποιήσεις του O-antigen του βακτηριακού πολυσακχαρίτη (LPS) παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μόλυνσης συμπεριλαμβανομένης της προσκόλλησης, του αποικισμού και της ικανότητας αποφυγής της μη ειδικής άμυνας του ξενιστή (Lüthje and Brauner, 2014; Reyes et al., 2012). Η ποικιλότητα του χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση μολυσματικών στελεχών ενώ θεωρείται ιδιαίτερα ανοσογονικό μόριο σε σχέση με τη ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας και παραγωγής αντισωμάτων και ακολούθως της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Στην πλειονότητα των βακτηρίων, τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του O-antigen βρίσκονται σε συστάδες (Reyes et al., 2012). Παρόλα

αυτά, σε άλλα παθογόνα όπως το *Helicobacter pylori* (παθογόνο βακτήριο του ανθρώπινου στομάχου), αυτά τα ένζυμα μπορεί να βρίσκονται κατανεμημένα σε όλο το χρωμόσωμά του.

Οι ορότυποι του *Α. veronii* είναι ελάχιστα μελετημένοι και οι σχετικές γενωμικές μελέτες εκλείπουν. Στα στελέχη από το λαβράκι, όπως και στα στελέχη *Α. hydrophila* όπου έχει μελετηθεί πρόσφατα η δομή του O-antigen, και χρησιμοποιήθηκαν σαν πρότυπο για τη διερεύνηση της δομής στα στελέχη *Α. veronii* από το λαβράκι, τα γονίδια φαίνεται πως οργανώνονται σε συστάδες (Cao et al., 2018; Hossain et al., 2013; Jimenez et al., 2008; Zhang et al., 2002). Είναι σημαντική η παρατήρηση ότι τα δέκα γονίδια που εντοπίστηκαν μέσω των αλληλουχιών *Α. hydrophila* στα στελέχη *Α.* veronii που μελετήθηκαν εδώ αποτελούν γνωστά δομικά συστατικά του O-antigen και ήταν συντηρημένα ανάμεσα στα δύο είδη. Αξιοσημείωτη είναι επίσης, η ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας, γονιδιακής σύστασης και η συνταίνια της γονιδιακής συστάδας του λαβρακιού με το ανθρώπινης προέλευσης (περιστατικό ασθενή με διάρροια) στέλεχος *Α. veronii* 126-14.

Γενικά στις αερομονάδες δεν παρατηρείται συσχέτιση ορότυπου-είδους (Janda et al., 1996; Sinha et al., 2004). Στο είδος *A. veronii* με τη χρήση ανοσολογικών τεχνικών, έχει περιγραφεί ετερογένεια ορότυπων (agglutination test) χωρίς να προκύπτει απαραίτητα συσχέτιση με συγκεκριμένο ξενιστή (Kozinska and Pekala, 2010). Η ετερογένεια αυτή, συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όπου εντοπίστηκαν δύο ομάδες στελεχών βάσει του O-antigen, στον ίδιο ξενιστή, που αντιστοιχούν στις διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές προέλευσης του Αιγαίου (Α/Δ).

Αν και η σχέση ορότυπου ξενιστή ποικίλει, οι ορότυποι συσχετίζονται με τη μολυσματική ικανότητα των βακτηρίων (Wang et al., 2010) και στις αερομονάδες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση μολυσματικών-μη μολυσματικών στελεχών (Kozinska and Pekala, 2010). Επιπλέον, η παρουσία κάποιων κλινικών σημαδιών μετά από τεχνητή μόλυνση στον κυπρίνο και την πέστροφα όπως, έλκη, υγροποίηση των εσωτερικών οργάνων, διόγκωση του σπλήνα, αναιμία ή/και αιμορραγίες στο ήπαρπάγκρεας έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένους ορότυπους των αερομονάδων καθώς και του *Α. veronii* (Kozińska and Pkala, 2012). Η παρουσία κοινών σακχάρων στην αλυσίδα του O-antigen μπορεί να εξηγεί τη διασταυρούμενη αντίδραση LPS από ένα είδος με αντι-ορό προερχόμενο από άλλο είδος όπως στην περίπτωση στελεχών *Α*. veronii και A. hydrophila (Dworaczek et al., 2019). Η ικανότητα του ανοσοποιητικού να αναγνωρίζει παρόμοιες δομές του εξωπολυσακχαρίτη σχετίζεται με την παραγωγή διασταυρούμενης προστασίας κάποιων εμβολίων έναντι στελεχών διαφορετικού ορότυπου. Αν και αυτό δεν αποτελεί κανόνα έχει παρατηρηθεί π.χ σε εμβόλια για *Leptospira* spp. (Rosario et al., 2012). Παρόμοια, ομοιότητες στα συστατικά της εξωτερικής μεμβράνης (πρωτεΐνη A-layer, πορίνες και LPS) μεταξύ τυπικών και μητυπικών στελεχών του *A. salmonicida* έχουν συσχετιστεί με διασταυρούμενη προστασία εμβολίων *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* έναντι λοιμώξεων που οφείλονται στο υποείδος *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* (Gudmundsdottir, 1998; Gudmundsdóttir and Gudmundsdóttir, 1997).

Δεν κατέστη δυνατό με την υπάρχουσα διαθέσιμη πληροφορία να προσδιοριστεί ο ορότυπος των στελεχών από το λαβράκι ούτε να προσδιοριστεί επαρκώς η μορφή και λειτουργικότητα του. Για παράδειγμα, στα στελέχη του Δ. Αιγαίου το γονίδιο που καθορίζει το μήκος της αλυσίδας του O-antigen (O-antigen chain length regulator) εντοπίστηκε κατακερματισμένο εξαιτίας της παρουσίας τρανσποζάσης. Αποτελεί λοιπόν αντικείμενο περεταίρω έρευνας η μελέτη του LPS των στελεχών *Α. veronii* που μελετήθηκαν π.χ. υπάρχουν στελέχη (rough) που δεν περιλαμβάνουν τις υπομονάδες του O-antigen και για το λόγο αυτό δεν ταξινομούνται ούτε με ανοσολογικές τεχνικές. Τέλος, το γονίδιο hns που εδώ βρέθηκε σε όλα τα στελέχη από λαβράκια έχει βρεθεί ότι επηρεάζει συνήθως αρνητικά τη γονιδιακή έκφραση γονιδίων του εξωπολυσακχαρίτη στο *V. cholerae* καθώς και το σχηματισμό biofilm (Wang et al., 2012).

Όσον αφορά την επιλογή στελεχών για την ανάπτυξη εμβολίου βακτηρίνης για το Αιγαίο Πέλαγος, αξίζει να δοκιμαστεί ένα πολυδύναμο παρασκεύασμα με στελέχη του Ανατολικού και Δυτικού Αιγαίου. Παρά τον υψηλό βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους εντοπίστηκαν διαφορές σε βασικά συστατικά της εξωτερικής μεμβράνης όπως το Oantigen, η μαλτοπορίνη LamB και η πρωτεΐνη S-layer, παρουσία/απουσία μαστιγίου. Η αξία αυτών των διαφορών σε επίπεδο αντιγονικότητας μένει να διευκρινιστεί, ωστόσο προς το παρόν τα στοιχεία συγκλίνουν προς ένα πολυδύναμο εμβόλιο για την περιοχή που μελετήθηκε.

Μολυσματικότητα

Τα αποτελέσματα των τεχνητών μολύνσεων έδειξαν ότι τα στελέχη *A. veronii* που μελετήθηκαν ήταν παθογόνα για το λαβράκι. Στην τεχνητή ενέσιμη μόλυνση, η πλειοψηφία των ιχθύων (λαβράκι και zebrafish) υπέκυψε εντός δύο ημερών από την έναρξη της μόλυνσης. Η μέθοδος δεν θεωρήθηκε αποτελεσματική και δεν προσομοιώνει τις συνθήκες του πεδίου καθώς η θνησιμότητα ξεκίνησε και εξελίχθηκε γρήγορα και δεν αναπαρήχθησαν τα κλινικά σημάδια που παρατηρούνται στο πεδίο. Παρόμοια, στην τιλάπια (*O. niloticus*) βάρους 6.7±4.1 g ενέσιμη δόση 8.9 x 10⁶ cfu/ψάρι και 8.9 x 10⁵ cfu/ψάρι προκάλεσε 100% και 50% θνησιμότητα αντίστοιχα μέσα σε 24 h (Dong et al., 2017). Σε άλλη περίπτωση όμως, στο γατόψαρο (*I. punctatus*) βάρους 200-250 g η εξέλιξη της θνησιμότητας ήταν πιο αργή. Η ενέσιμη δόση 1.0-1.5 × 10⁵ cfu/ψάρι που χρησιμοποιήθηκε είχε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της μόλυνσης με εμβάπτιση στο λαβράκια αφού η θνησιμότητα ξεκίνησε 4 ημέρες μετά τη μόλυνση και έφτασε σταδιακά στο 100% του πληθυσμού στις 10 ημέρες πειράματος (Hoai et al., 2019).

Οι μολύνσεις με τη μέθοδο της εμβάπτισης αναπαρήγαγαν με επιτυχία τα κλινικά σημάδια που παρατηρούνται στο πεδίο (λήθαργο, νωθρή κολυμβητική συμπεριφορά, ερυθρότητα των πτερυγίων και των βραγχιακών επικαλυμμάτων, διόγκωση του σπλήνα υπόλευκα οζίδια στα εσωτερικά όργανα και αιμορραγία στο ήπαρ). Παρατηρήθηκε επίσης, ασκητικό υγρό εσωτερικά και αιμορραγίες. Παρόμοια κλινικά σημάδια παρατηρήθηκαν σε ενέσιμη τεχνητή μόλυνση με στελέχη διαφορετικών οροτύπων A. veronii bv. sobria στον κυπρίνο (Cyprinus carpio). Η μόλυνση προκάλεσε διάταση της κοιλίας και της αμάρας, ασκητικό υγρό στην περιτοναϊκή κοιλότητα, αναιμία ή αιμορραγίες σε εσωτερικά όργανα (Kozińska and Pkala, 2012). Η θνησιμότητα εξελίχθηκε επίσης γρήγορα, με το σύνολο των μολυσμένων ατόμων να υποκύπτει στη μόλυνση μέσα σε 4 ημέρες μετά τη μόλυνση. Σε άλλη περίπτωση επίσης στον κυπρίνο, ενέσιμη τεχνητή μόλυνση (4×10⁵ cfu/ψάρι) με ετερόλογο (κλινικό στέλεχος διαφορετικού είδους ξενιστή ιχθύ) στέλεχος A. veronii προκάλεσε επιφανειακή αιμορραγία, κοιλιακό οίδημα, ασκίτη, συμφόρηση του ήπατος και σπληνομεγαλία (Song et al., 2018). Τέλος, στο Misgurnus anguillicaudatus ενέσιμη τεχνητή μόλυνση (2×10⁶ cfu/ψάρι) επίσης με ετερόλογο στέλεχος A. veronii προκάλεσε δερματικά έλκη, πετέχειες και κοιλιακό οίδημα (Zhang et al., 2020).

Αν και τα αποστήματα που παρατηρήθηκαν στα μολυσμένα με εμβάπτιση ψάρια υποδεικνύουν μία οξεία μόλυνση, εντοπίστηκαν στα ίδια όργανα με τα κοκκιώματα που παρατηρούνται στο πεδίο στη χρόνια μορφή της νόσου, και πιθανώς αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια μεγαλύτερης περιόδου και ηπιότερης μόλυνσης σε σχέση με τις τεχνητές. Το μη κινητό στέλεχος NS προκάλεσε θνησιμότητα ταχύτερα (σε λαβράκι και zebrafish) σε σχέση με το κινητό PDB, αν και παρά την καθυστέρηση στην έναρξη, το δεύτερο προκάλεσε ταχύτερα εξελισσόμενη θνησιμότητα στο λαβράκι. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει διαφορετικές μολυσματικές ιδιότητες μεταξύ των στελεχών που αντιστοιχούν σε δύο φαινοτυπικές ομάδες ως προς την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής, αλλά μοιράζονται τα ίδια εκκριτικά συστήματα και δεν διαφέρουν στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν (Smyrli et al., 2019). Το πολικό μαστίγιο των Aeromonas spp., πέραν της κολύμβησης σε υγρό μέσο έχει κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό biofilm και συμβάλλει στην προσκόλληση σε κύτταρα του ξενιστή συμβάλλοντας έτσι στη μολυσματικότητα του βακτηρίου όπως έχει προταθεί για τα είδη A. caviae και A. hydrophila σε πειράματα σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Fulton et al., 2015; Kirov et al., 2004; Merino et al., 2014). Ωστόσο, η μολυσματικότητα των αερομονάδων περιλαμβάνει ποικιλία εκκρινόμενων τοξινών με αιμολυτική, κυτταροτοξική και εντεροτοξική δράση και άλλων που τους επιτρέπουν να αντιπαρέρχονται των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή (Tomás, 2012).

Μελέτες δείχνουν ότι τουλάχιστον κάποια στελέχη των ειδών *Α. caviae* και *Α. hydrophila* είναι ικανά να επιβιώνουν μέχρι και 72 h σε μέσα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (dos Santos et al., 2015). Το ενδοκυτταρικό αυτό στάδιο έχει επισημανθεί και σε μακροφάγα κύτταρα από τον πρόνεφρο τιλάπιας για το *Α. hydrophila* και φαίνεται να σχετίζεται με γονίδια του εκκριτικού συστήματος Type VI (Wang et al., 2019) που όμως στην προκειμένη δεν έχει ανιχνευθεί στα στελέχη του Δ. Αιγαίου όπως τα NS και PDB που μελετήθηκαν εδώ (Smyrli et al., 2019).

Ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό για τη βακτηριακή αύξηση και πολλά παθογόνα βακτήρια όπως και μεσόφιλες αερομονάδες διαθέτουν διάφορους μηχανισμούς (χηλικοποιητές σιδήρου, αναγωγάσες σιδήρου, αιμολυτικά και κυτοτοξικά ένζυμα) δέσμευσης του σιδήρου από τον ξενιστή. Ο σίδηρος στη μορφή της αιμογλοβίνης (αίμη) είναι ένας κοινός στόχος βακτηριακών τοξινών. Η δέσμευση της αίμης μπορεί να απαιτεί ακόμα και ολοκληρωτική λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων συμβάλλοντας έτσι στη μολυσματικότητα (Massad et al., 1991). Παρά τη διαφοροποίηση στην ένταση της ασθένειας από το *A. veronii* στις διαφορετικές περιοχές του Αιγαίου, όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν είχαν την ικανότητα να προκαλέσουν β-αιμόλυση (πλήρης λύση της αιμοσφαιρίνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων) σε στερεό θρεπτικό με αίμα λαβρακιού. Γονίδια αιμολυτικών τοξινών (hemolysin III) και πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αιμολυτική δραστηριότητα ανιχνεύθηκαν στα γονιδιώματα όλων των στελεχών λαβρακιού που μελετήθηκαν (Smyrli et al., 2019). Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να συσχετιστεί με τον ηπατικό ίκτερο και την ικτερική εμφάνιση των ασθενών ιχθύων στη χρόνια μορφή της ασθένειας στο πεδίο. Εξηγεί επίσης, την αιμόλυση που προκλήθηκε από τα στελέχη NS και PDB στις *in vivo* δοκιμές λοιμογονικότητας σε λαβράκι.

Η τεχνητή μόλυνση με το στέλεχος NS στα ανεμβολίαστα ιχθύδια, προκάλεσε χαμηλότερη θνησιμότητα σε σχέση με το PDB. Αυτό μπορεί να συσχετίζεται με τη διαφοροποίηση που έχει προκύψει σε σχέση με την αρχική περιγραφή της ασθένειας και της εξέλιξής της στο πεδίο (Δ. Αιγαίο). Ενώ δηλαδή αρχικά η ασθένεια αφορούσε κυρίως ψάρια εμπορεύσιμου μεγέθους (>250 g) πλέον κλινικά σημάδια προκύπτουν και σε μικρότερα μεγέθη (50 g) ενώ παράλληλα τα ακίνητα, χωρίς χρωστική στελέχη δεν απομονώνονται πλέον στο πεδίο. Παράλληλα, η θνησιμότητα έχει αυξηθεί εφόσον προσβάλλεται μεγαλύτερο μέρος του εκτρεφόμενου πληθυσμού και σε κάθε περίπτωση πρόκειται για χρόνια εξελισσόμενη ασθένεια που επηρεάζει συνολικά την υγεία των προσβεβλημένων ατόμων.

Οι *in vivo* δοκιμές λοιμογονικότητας, έδειξαν ότι τα στελέχη *A. veronii* από λαβράκι ήταν ικανά να προκαλέσουν υψηλή θνησιμότητα σε zebrafish, με παρόμοια ικανότητα μολυσματικότητας για όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν. Σε άλλες μελέτες, το είδος *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* από λαβράκι βρέθηκε επίσης μολυσματικό στο καλκάνι και την πέστροφα (Fernández-Álvarez et al., 2016), ενώ «θαλασσινά» στελέχη *A. hydrophila* τσιπούρας προκάλεσαν μέτρια έως υψηλή θνησιμότητα σε τιλάπιες (El-Barbary, 2010; El-Barbary, 2017) εφιστώντας την προσοχή στους πιθανούς κινδύνους μετάδοσης μεταξύ ειδών ιχθύων που εκτρέφονται στην ίδια τοποθεσία ή/και άγριων πληθυσμών.

Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η λοιμογόνος δράση του *Α. veronii* στο λαβράκι ήταν πολύ υψηλότερη σε σχέση με το zebrafish. Στην ενέσιμη δοκιμή, μια

δόση της τάξης 10⁴ cfu ανά ψάρι προκάλεσε 100% θνησιμότητα στο λαβράκι μέσα σε 48 h (έναντι 0% στο zebrafish) και χρειάστηκε 100 φορές μεγαλύτερη δόση (10⁶ cfu/ψάρι) για αντίστοιχα ποσοστά θνησιμότητας στον ίδιο χρόνο στο zebrafish. Αυτό μαζί με το γεγονός ότι στο πεδίο, άλλα είδη ιχθύων που καλλιεργούνται σε παρακείμενους κλωβούς με λαβράκια δεν επηρεάζονται κατά τη διάρκεια εξάρσεων της νόσου, υποδηλώνει είτε προσαρμογή του παθογόνου στο λαβράκι, είτε αυξημένη ευαισθησία του λαβρακιού στο *A. veronii* κάτι που όμως χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να διευκρινιστεί. Σε άλλη μελέτη πάντως, στελέχη *A. veronii* διαφορετικών ορότυπων που δοκιμάστηκαν σε τεχνητή μόλυνση σε κυπρίνο και πέστροφα, οδήγησαν σε πρόκληση σηψαιμίας μόνο στον κυπρίνο ενώ τα στελέχη *Α. sobria* επηρέασαν περισσότερο την πέστροφα, κάτι που υποδηλώνει ευαισθησία κάποιων ξενιστών σε συγκεκριμένα παθογόνα, και στην προκειμένη προτείνεται ως καθοριστικός δείκτης μεταξύ των στελεχών η ικανότητα

Σε ενήλικα zebrafish, ενέσιμη τεχνητή μόλυνση με κλινικό στέλεχος *A. veronii* από zebrafish σε δόση 2×10⁶ cfu/ψάρι, προκάλεσε θνησιμότητα 55% και 67.5%, 24 h και 96 h μετά τη μόλυνση αντίστοιχα (Chandrarathna et al., 2018), χαμηλότερη δηλαδή σε σχέση με αυτήν που προκάλεσαν τα στελέχη από το λαβράκι. Σε άλλη περίπτωση, οι τιμές LD50 κλινικών (από zebrafish και άλλα είδη γλυκού νερού) στελεχών *A. veronii* κυμάνθηκαν σε εύρος συγκρίσιμο με τα αποτελέσματα που παρήχθησαν εδώ, από1.15×10⁴ cfu/ψάρι έως 3.94×10⁶ cfu/ψάρι σε διάστημα όμως 7 ημερών έναντι 2 στο λαβράκι (Song et al., 2017).

Σε άλλα είδη ιχθύων, οι τιμές LD50 μέσω ενέσιμης μόλυνσης για παθογόνα στελέχη *A. veronii* κυμαίνονται μεταξύ 10^4 - 10^6 cfu/ψάρι. Στο γατόψαρο (*Leiocassis longirostris*) βάρους 50±1.47 g ή τιμή LD50 υπολογίστηκε σε 3.47×10^4 cfu/ψάρι σε διάστημα δύο εβδομάδων (Cai et al., 2012),στο *Misgurnus anguillicaudatus* κυμάνθηκε μεταξύ $10^{5.1}$ και $10^{5.5}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* bv. *sobria* και > $10^{6.7}$ cfu/ψάρι για τα στελέχη *A. veronii* κυμάνθηκαν μεταξύ $10^{4.07}$ - $10^{5.35}$ cfu/ψάρι (Sreedharan et al., 2013).

Σε κάθε περίπτωση η εκτίμηση της LD50 έγινε σε διαφορετικό είδος από τον κύριο ξενιστή. Έτσι, για παράδειγμα στην τελευταία εργασία αν και η τιμή LD50 για τα

στελέχη από το χρυσόψαρο είναι χαμηλότερη από αυτήν των στελεχών λαβρακιού όπως αυτή υπολογίστηκε στα zebrafish (περισσότερο μολυσματικά τα στελέχη του χρυσόψαρου), στη σύγκριση της τελικής θνησιμότητας, η βακτηριακή συγκέντρωση 10⁴ cfu/ψάρι, που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, οδήγησε σε θνησιμότητα 50-58% στο χρυσόψαρο σε διάστημα 7 ημερών, έναντι θνησιμότητας 100% στο λαβράκι σε διάστημα 4 ημερών. Όπως και από τα παραπάνω προκύπτει ότι συμπεριλαμβάνοντας το χρόνο, τα στελέχη του λαβρακιού είναι ικανά να προκαλέσουν υψηλότερη ή/και ταχύτερα εξελισσόμενη θνησιμότητα από ότι στα παραπάνω παραδείγματα, στον κύριο ξενιστή τους αλλά και στο zebrafish.

Είναι σημαντικό να σχολιασθεί ότι η τιμή LD50 δεν είναι από μόνη της πληροφοριακή. Το χρονικό διάστημα υπολογισμού αυτής, δηλαδή το διάστημα μέχρι την τελική θνησιμότητα του 100% του πληθυσμού είναι ενδεικτικό της έντασης και εξέλιξης της μόλυνσης και τελικά των επιπέδων παθογονικότητας των διαφορετικών στελεχών. Επιπλέον, δεδομένα ημερήσιας θνησιμότητας συχνά δεν είναι διαθέσιμα σε μελέτες εκτίμησης μολυσματικότητας και αυτό τελικά δεν επιτρέπει ευρύτερες συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών ξενιστών και στελεχών του ίδιου είδους.

Η ευκολία χρήσης των zebrafish σε σχέση με τον αρχικό ξενιστή (λαβράκι) αλλά και τα άλλα είδη της μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας έγκειται στη συνεχή διαθεσιμότητα πληθυσμού, τη δυνατότητα διεξαγωγής πειραματικών μολύνσεων σε συνεχώς διαθέσιμο γλυκό νερό και μικρότερο χώρο (ενυδρεία αντί δεξαμενών) που διευκολύνει τις πολλαπλές ταυτόχρονες πειραματικές δοκιμές. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ενθαρρύνουν την χρήση των zebrafish και αξίζει να δοκιμαστούν στο μέλλον τεχνητές μολύνσεις και με τη μέθοδο της εμβάπτισης ενώ ο ρόλος τους σαν μοντέλο *in vivo* εκτίμησης μολυσματικών ιδιοτήτων των αερομονάδων αναδεικνύεται και αλλού. Πέραν της εκτίμησης της «γενικής» μολυσματικής ικανότητας βακτηριακών παθογόνων, τα zebrafish (εμβάπτιση σε λάρβες) έχουν επίσης προταθεί ως μοντέλο για τη μελέτη των επί μέρους λοιμογόνων χαρακτηριστικών της *Α. hydrophila* παρουσιάζοντας μεγαλύτερη «ευκρίνεια» σε σχέση με την ενέσιμη μόλυνση σε πέστροφα ή ποντίκι (Romero et al., 2016).

Αυτεμβόλια Aeromonas veronii στο λαβράκι

Η χρήση αυτεμβολίων για την πρόληψη ασθενειών, αφορά μόνο τις περιπτώσεις απουσίας εμπορικών εμβολίων. Οι αερομονάδες αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα στο σύνολο σχεδόν του γένους, εξαιτίας της πολυπαραγοντικής φύσης της μολυσματικότητας τους (Fernández-Bravo and Figueras, 2020) που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού εμβολίου ευρείας χρήσης έναντι κάποιου είδους παθογόνου ή ξενιστή. Η χρήση αυτεμβολίων προτείνεται ως βιώσιμη λύση βάσει κόστους και αποτελεσματικότητας για το χαρακτηριστικό μεταξύ των μεσόφιλων, είδος *Α. hydrophila* (Mzula et al., 2019). Η ασθένεια από το *Α. veronii* αποτέλεσε ιδανική περίπτωση για να εξεταστεί η χρήση πειραματικών αυτογενών εμβολίων για την πρόληψη της ασθενειών σε καλλιεργούμενα λαβράκια.

Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων στα ψάρια απαιτεί τη διεξαγωγή τεχνητών μολύνσεων στους εμβολιασμένους πληθυσμούς (challenge) και την εκτίμηση του σχετικού ποσοστού επιβίωσης έναντι ανεμβολίαστων για το συγκεκριμένο παθογόνο. Αυτό συμβαίνει γιατί σε αντίθεση με τα θηλαστικά, όπου η ανίχνευση αντισωμάτων είναι δείκτης της αποτελεσματικότητας των εμβολίων, στα ψάρια αυτή η προσέγγιση δεν είναι αξιόπιστη. Κάποια είδη όπως ο σολομός του Ατλαντικού ή οι ιππόγλωσσες παράγουν αντισώματα σαν απόκριση σε μολύνσεις ή στον εμβολιασμό ενώ άλλα, όπως τα γαδοειδή (gadidae), έχουν ποικίλη ή καθόλου απόκριση (Gudmundsdóttir et al., 2003; Magnadottir, 2010; Schrøder et al., 2009).

Στο λαβράκι η παραγωγή προστατευτικών αντισωμάτων είναι γνωστή από εμβόλια για άλλα παθογόνα όπως *V. anguillarum, P. damselae* subp. *piscicida, T. marinum,* και Betanodavirus (Bakopoulos et al., 2015; Galeotti et al., 2013; Spinos et al., 2017; Thiéry et al., 2006; Ziklo et al., 2018). Στην παρούσα εργασία, το διπλό ενέσιμο εμβόλιο (NS+PDB+ Montanide 763, 10⁸ κύτταρα ml-1) συσχετίστηκε με προστασία στα ενήλικα λαβράκια (Πείραμα 2) έναντι μόλυνσης (RPS=62,5%,) για το στέλεχος PDB. Ομοίως, στα ιχθύδια λαβρακιού (Πείραμα 3) το διπλό εμβόλιο (NS+PDB, 10⁹ κύτταρα ml-1) που χορηγήθηκε με εμβάπτιση προσέφερε προστασία έναντι μόλυνσης (RPS=89,4%) για το στέλεχος PDB. Η προστασία μετρήθηκε μόνο σε μολύνσεις με εμβάπτιση, αφού η ταχεία εξέλιξη της θνησιμότητας στην ενέσιμη μόλυνση (Πείραμα 1.1) δεν επέτρεψε την εξαγωγή συμπερασμάτων. Γενικά, οι

ενέσιμες μολύνσεις αναμένεται να δίνουν μικρότερες τιμές RPS από τις μολύνσεις που γίνονται μέσα στο νερό επειδή, με αυτή τη μέθοδο, οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί που βρίσκονται στο έντερο, το δέρμα και τη βλέννα παρακάμπτονται (Nordmo and Ramstad, 1997).

Παρόλο που ο τίτλος αντισωμάτων δεν διέφερε μεταξύ των δύο αντιγόνων (Πείραμα 2, ενήλικα), το εμβόλιο δεν προσέφερε προστασία έναντι μόλυνσης με το στέλεχος NS. Αν και στα ιχθύδια δεν μετρήθηκε ο τίτλος αντισωμάτων, το αποτέλεσμα σε σχέση με την προστασία επαναλήφθηκε και με τη διαφορετική μέθοδο χορήγησης (εμβάπτιση έναντι ένεσης). Ωστόσο, η εφαρμογή εμβολίου, είχε θετική επίδραση είτε μειώνοντας το ρυθμό (καθυστερημένη έναρξη/ πρόοδος) ή την ολική θνησιμότητα της ομάδας. Πιο αναλυτικά, στο Πείραμα 1.1 παρά την ταχεία εξέλιξη της θνησιμότητας μετά την ενέσιμη μόλυνση, η θνησιμότητα έφτασε στο 100% του πληθυσμού μία ημέρα αργότερα στα εμβολιασμένα ψάρια σε σχέση με τα ανεμβολίαστα. Στο Πείραμα 1.2 (εμβόλια όπως σε Πείραμα 1.1.), η θνησιμότητα στην ομάδα του ελαιώδους εμβολίου (NS+STA) ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες μέχρι την 5^η ημέρα μετά τη μόλυνση. Σε όλη σχεδόν τη διάρκεια του Πειράματος 2, η θνησιμότητα στην ομάδα των εμβολιασμένων ιχθύων παραμένει κατά 20% περίπου χαμηλότερη σε σχέση με αυτή των ανεμβολίαστων. Όπως έχει αναφερθεί και αλλού, ακόμα και αν ανιχνευθούν ειδικά αντισώματα ως απόκριση στον εμβολιασμό, όπως στην περίπτωση της A. salmonicida σε πέστροφες (Salmo trutta) αυτό, δε συνεπάγεται απαραίτητα προστασία ενάντια στη μόλυνση, τουλάχιστον όχι χωρίς επαναληπτικό εμβολιασμό (Thuvander ' et al., 1993).

Με τα αποτελέσματα που προκύπτουν εδώ, δεν υπάρχουν επίσης, ενδείξεις διασταυρούμενης ανοσίας (cross-protection) τουλάχιστον σε σχέση με το NS που δοκιμάστηκε και ως μονό αντιγόνο. Η επιβίωση δηλαδή των εμβολιασμένων ιχθύων έναντι μόλυνσης με το στέλεχος NS δεν αυξήθηκε από την προσθήκη του PDB, και την προσθήκη διαφορετικού ανοσοενισχυτικού (Montanide αντί STA). Να σημειωθεί βέβαια, ότι η επιμέρους συγκέντρωση για κάθε αντιγόνο ξεχωριστά ήταν χαμηλότερη (10⁶ κύτταρα/ψάρι). Επίσης, παρότι λόγω της υψηλής διακύμανσης ουσιαστικά δεν διαφέρουν, η ανοσολογική απόκριση βάσει του τίτλου αντισωμάτων για το NS φαίνεται να είναι ελαφρώς χαμηλότερη και με μικρότερη διάρκεια για το NS σε σχέση με το PDB για το οποίο παρέμεινε σταθερός στη διάρκεια του πειράματος.

Τα παραπάνω, παρά την υψηλή γενετική, γενωμική και αντιγονική τους ομοιότητα στις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και τις εκκρινόμενες τοξίνες (Smyrli et al., 2017), υποδεικνύουν διαφορετική αντιγονικότητα για τα δύο στελέχη που δοκιμάστηκαν, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές φαινοτυπικές ομάδες σε σχέση με την παρουσία/απουσία κινητικότητας και παραγωγής χρωστικής (Smyrli et al., 2019). Εφόσον το λαβράκι παράγει αντισώματα για το Α. veronii, προστατευτικά για κάποια (PDB) στελέχη, αλλά όχι για κάποια άλλα (NS), μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα στελέχη αυτά διαφέρουν ως προς τις ιδιότητες αναγνώρισης τους (π.χ. στα πρώτα στάδια της μόλυνσης) από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Η ανοσοαπόκριση δηλαδή που αναπτύσσεται με το εμβόλιο βακτηρίνης, δεν επαρκεί ώστε το ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίζει εγκαίρως το παθογόνο. Λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία (PDB)-απουσία (NS) μαστιγίου, έχει παρατηρηθεί ότι τα φαγοκύτταρα είναι ικανά να ανιχνεύουν και να αποκρίνονται στην κινητικότητα αυτή καθαυτή (Lovewell et al., 2011). Μάλιστα, κινητά βακτήρια όπως η Pseudomonas. aeruginosa αποχωρίζονται το μαστίγιο κατά τη μόλυνση γεγονός που τους προσδίδει αντοχή στη φαγοκυττάρωση. Με τον μηχανισμό αυτό είναι πιθανό τα ακίνητα στελέχη όπως το NS, να διαφεύγουν της άμυνας του οργανισμού, τουλάχιστον για ένα χρονικό διάστημα κρίσιμο για την πρόκληση βλάβης.

Όσον αφορά τα ιχθύδια, όπως φαίνεται από τις μολύνσεις και με τα δύο στελέχη, φαίνεται να επηρεάστηκαν λιγότερο από τα ενήλικα λαβράκια και παρουσίασαν υψηλότερη RPS (89,4 %) για το PDB σε σχέση με τα ενήλικα (62,5%) παρά το ότι εμβολιάστηκαν με εμβάπτιση. Αυτό δείχνει ότι σε αυτό το στάδιο το λαβράκι είναι ικανό να αναπτύξει προστατευτική ανοσία ενάντια σε λοίμωξη από το στέλεχος PDB, 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με μονή δόση αντιγόνου. Στο λαβράκι, τα λεμφικά όργανα (μεσονεφρικός ιστός και θύμος) είναι πλήρως ανεπτυγμένα, και ώριμα Β-λεμφοκύτταρα και ανοσοσφαιρίνες (IgM) εντοπίζονται 50 ημέρες μετά την εκκόλαψη του αυγού και από αυτό το στάδιο και έπειτα θεωρείται ανοσοεπαρκές (Breuil et al., 1997; Galindo-Villegas and Mulero, 2014) αν και τα επίπεδα, η κατανομή και η συμπεριφορά των Τ και Β λεμφοκυττάρων προσομοιάζει με αυτά των ενηλίκων από το διάστημα 137-145 ημέρες μετά την εκκόλαψη (dos Santos et al., 2000).

Εμβόλιο για το *V. anguillarum* έδωσε προστασία έναντι ενέσιμης μόλυνσης (233 ημέρες μετά την εκκόλαψη) μόνο μετά από διπλό εμβολιασμό με εμβάπτιση, με

την ανοσολογική απόκριση να μη διαφέρει από τα ανεμβολίαστα ψάρια μέχρι τις 165 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Galeotti et al., 2013). Η ανάγκη επαναληπτικού εμβολιασμού για το ίδιο παθογόνο έχει επισημανθεί και σε άλλες μελέτες (Gravningen et al., 1998; Viale et al., 2006). Ο επαναληπτικός εμβολιασμός δηλαδή αποτελεί κοινή τακτική ξεκινώντας στα δύο αυτά παραδείγματα από το 1 g με εμβάπτιση και να περιλαμβανουν τουλάχιστον ακόμα έναν, με ένεση ή εμβάπτιση στα 5 g ή 16 g. Το ίδιο έχει προταθεί και για μεγαλύτερα λαβράκια (40 g) σε εμβόλια για τα παθογόνα *V. alginolyticus* και *V. parahaemolyticus* (Abou-Okada et al., 2021). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν εδώ για το PDB, η εμφαρμογή ενός πρωτοκόλλου με επαναληπτικό εμβολιασμό παρουσιάζει προοπτικές υψηλής προστασίας και θα μπορούσε να απαντήσει και στο ερώτημα που συζητήθηκε παραπάνω για το NS.

Ειδικά αντισώματα (Πείραμα 2) και για τα δύο αντιγόνα (NS, PDB) ανιχνεύθηκαν στα ενήλικα λαβράκια μέχρι τουλάχιστον την ημέρα 60 μετά τον εμβολιασμό με ενδοπεριτοναϊκή ένεση του διπλού ελαιώδους (Montanide) εμβολίου αδρανοποιημένης βακτηρίνης σε δόση (ολικού αντιγόνου) 10⁸ κύτταρα/ψάρι. Για την ημέρα 30 μετά τον εμβολιασμό ο τίτλος κυμάνθηκε μεταξύ 50-6400. Σε προηγούμενο πείραμα (Σμυρλή, 2014), σε ενήλικα λαβράκια 100 g με ενέσιμο υδατικό εμβόλιο με το στέλεχος NS σε δόση 10⁸ κύτταρα/ψάρι, ειδικά αντισώματα ανιχνευθήκαν στο διάστημα 7-75 ημέρες μετά τον εμβολιασμό ενώ ο τίτλος αντισωμάτων αυξήθηκε σημαντικά και παρέμεινε σταθερός στο διάστημα 14-44 ημέρες. Στο ίδιο πείραμα, η επίδραση της δόσης αντιγόνου NS ήταν καθοριστικής σημασίας για τον τίτλο των ειδικών αντισωμάτων που ανιχνεύθηκαν. Για παράδειγμα την ημέρα 27, ο τίτλος αντισωμάτων για την ομάδα που εμβολιάστηκε με δόση 10⁶ κύτταρα/ψάρι ήταν 1.000 - 2.000 ενώ για την ομάδα που εμβολιάστηκε με δόση 10⁸ κύτταρα/ψάρι ήταν 4.000 -8.000. Εδώ, στο πείραμα 2, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο εύρος τιμών στον τίτλο μεταξύ των ατόμων, ωστόσο οι τιμές είναι συγκρίσιμες για την ίδια δόση (ολικού) αντιγόνου και με προσθήκη ανοσοενισχυτικού. Η συσχέτιση δόσης αντιγόνου - τίτλου αντισωμάτων και προστασίας από τον εμβολιασμό έχει επισημανθεί και σε άλλες μελέτες π.χ. σε εμβόλια έναντι της δοθηίνωσης του σολομού (Romstad et al., 2013) και μπορεί να εξεταστεί στο μέλλον για την αύξηση της αποτελεσματικότητας και των εμβολίων A. veronii στο λαβράκι.

Η μεθοδολογία εκτίμησης του τίτλου αντισωμάτων διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών μελετών στο λαβράκι και δεν είναι συχνά εφικτή η σύγκριση μεταξύ αυτών βάσει του ίδιου δείκτη π.χ. αραίωση ανίχνευσης/τίτλος/τίτλος (log2)/οπτική απορρόφηση, χωρίς να συμπεριλαμβάνονται οι διαφορές στο αναπτυξιακό στάδιο των ιχθύων, τα διαφορετικά αντιγόνα, δόσεις, ανοσοσενισχυτικά, κλπ. Ενδεικτικά, σε ενήλικά λαβράκια βάρους 220 g, ο μέγιστος τίτλος που καταγράφηκε, κυμάνθηκε μεταξύ 6.000 - 8.000, 14 ημέρες μετά από επαναληπτικό εμβολιασμό (συνολικό διάστημα 51 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό) με εμπορικό εμβόλιο αδρανοποιημένης βακτηρίνης *V. anguillarum-ordalii* (10¹⁰ κύτταρα/ψάρι) και προσθήκη Freund's complete adjuvant (FCA) που χορηγήθηκε ενδομυϊκά (dos Santos et al., 1997). Σε άλλη περίπτωση, σε λαβράκια 1-6 kg, ο τίτλος μετρήθηκε σε αραιώσεις μεταξύ 1/100 - 1/64.000 μετά από εμβολιασμό (με και χωρίς επαναληπτική δόση σε διάστημα ενός μήνα συνολικά) με αδρανοποιημένη βακτηρίνη V. anguillarum (10¹⁰ κύτταρα/ψάρι) και προσθήκη complete Freund's adjuvant (CFA) (Coeurdacier et al., 1997). Στην περίπτωση αυτή, ειδικά αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε ένα διάστημα που ξεκινάει 15 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό και έως τις 86 ημέρες στην ομάδα που εμβολιάστηκε άπαξ ή έως τις 118 ημέρες στην ομάδα που διεξήχθη επαναληπτικός εμβολιασμός. Σε λαβράκια 22 g και 66 g ειδικά αντισώματα για διαφορετικές ποσότητες πρωτεΐνης του καψιδίου στελέχους betanodavirus ανιχνεύθηκαν σε σταθερή αραίωση 1/8.000, 27-29 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Thiéry et al., 2006).

Ειδικά αντισώματα ως απόκριση σε εμβολιασμό με ένεση για το *Ph. damsela* subsp. *piscicida* ανιχνεύονται στο λαβράκι (80 g, 18-19°C) μετά την 8^η ημέρα (Bakopoulos et al., 1997). Σε λαβράκι 2,5 g ειδικά αντισώματα ως απόκριση σε εμβολιασμό με εμβάπτιση για το *V. anguillarum* ανιχνεύθηκαν μετά την πρώτη εβδομάδα (Spinos et al., 2017). Τα παραπάνω είναι σε συμφωνία με το προηγούμενο πείραμα (Σμυρλή, 2014) που αναφέρθηκε παραπάνω. Ο τίτλος αντισωμάτων, μεγιστοποιείται σε όλες τις περιπτώσεις μετά την 3^η εβδομάδα και εξελίσσεται διαφορετικά σε κάθε εμβόλιο. Σχετικά με τη διάρκεια της προστασίας, αν και δεν διεξήχθη δοκιμασία μόλυνσης μετά τις 30 ημέρες, το γεγονός ότι ο τίτλος αντισωμάτων στο εμβολιασμό δίνει πιθανότητες για μεγαλύτερη διάρκεια προστασίας από αυτή που ελέγχθηκε (30 ημέρες).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, από την πρώτη εβδομάδα μέχρι και τουλάχιστον ένα μήνα από τον εμβολιασμό αναμένεται να υπάρχει αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ειδική ανοσολογική απόκριση και την παραγωγή αντισωμάτων. Ο μεσονεφρικός ιστός είναι το κύριο όργανο οντογένεσης των Β λεμφοκυττάρων και μαζί με το σπλήνα είναι τα κύρια όργανα που εμπλέκονται στην παραγωγή ειδικών αντισωμάτων στο λαβράκι (Chistiakov et al., 2007; dos Santos et al., 2001b). Ο θύμος αδένας είναι το κύριο όργανο των συστατικών της κυτταρικής ανοσίας (CD4+, CD8+ και TCR-β+ Τ λεμφοκύτταρα) (Buonocore et al., 2008, 2006; Romano et al., 2007) ενώ αυξημένη έκφραση της MHC II-β αλυσίδας σε κανονικές συνθήκες παρατηρείται πρωτίστως στα βράγχια (Buonocore et al., 2007). Εδώ μελετήθηκε στο μεσονεφρικό ιστό, η γονιδιακή έκφραση, για τις ημέρες 15 και 30 μετά τον εμβολιασμό με αντιγόνο NS (Πείραμα 1.2) ο δείκτης αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (ανίχνευση παθογόνου/ενεργοποίηση ειδικής ανοσολογικής απόκρισης): MHC II-β, οι δείκτες των Τ λεμφοκυττάρων (κυτταρικής ανοσίας): CD4, CD8-α και TCRβ και ο δείκτης της ανοσοσφαιρίνης του ορού (χυμικής ανοσίας): IgM.

Η κυτταρική προσαρμοστική ανοσία εξαρτάται από τη σωστή ενεργοποίηση των Τ κυττάρων (κυτταροτοξικών και βοηθητικών). Η ενεργοποίηση τους βασίζεται στην ειδική αναγνώριση και σύνδεση του υποδοχέα των Τ κυττάρων (TCR) με το σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (MHC) στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APCs). Οι πρωτεΐνες MHC ΙΙ εκφράζονται σε συγκεκριμένα μόνο APCs και εμπλέκονται στην έκθεση οψονισμένων συστατικών του παθογόνου. Τα CD4+ Τ λεμφοκύτταρα δεσμεύουν τα APC μέσω των μορίων MHC ΙΙ και διεγείρονται για να γίνουν βοηθητικά T (Th) λεμφοκύτταρα ενώ τα CD8+ Τ λεμφοκύτταρα δεσμεύουν τα APC μέσω των μορίων MHC Ι και διεγείρονται για να γίνουν κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (CTLs). Τα Β λεμφοκύτταρα διεγείρονται από τα T (Th2) λεμφοκύτταρα.

Η απόκριση στο αντιγόνο NS αλλά και στο ανοσοενισχυτικό STA, της κυτταρικής ανοσίας έγινε ορατή στο γονίδιο TCR-β. Παρόλο που η έκφραση δε διαφέρει στατιστικά μεταξύ των ομάδων, τα επίπεδα είναι αυξημένα τη μέρα 15 σε όλες ομάδες πλην της ομάδας control (ορός) και διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με την ημέρα 30. Η αύξηση έκφρασης του TCR-β στο μεσονεφρικό ιστό και σπλήνα έχει αναφερθεί ξανά ως απόκριση σε εμβολιασμό με εμβάπτιση και ένεση (2 επαναληπτικοί εμβολιασμοί) λαβρακιών (αρχικό βάρος 0,5 g) για το *V. anguillarum* έως και 291 ημέρες μετά τη χορήγηση (Galeotti et al., 2013). Η απόκριση στο ανοσοενισχυτικό (ορός + STA) είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες όπου έχει παρατηρηθεί ότι ανοσοενισχυτικά όπως το Freunds incomplete adjuvant (FIA) και το Montanide™ ISA 763, είναι ικανά από μόνα τους να δώσουν ακόμα και προστασία στα ψάρια με RPS έως και 74% (Jaafar et al., 2015; Mikkelsen et al., 2004).

Τα επίπεδα έκφρασης των MHC ΙΙ γενικά δε διαφέρουν μεταξύ των ομάδων στη διάρκεια του πειράματος ωστόσο υπάρχει μια τάση αύξησης τους κυρίως την ημέρα 15 μετά τον εμβολιασμό. Στο σολομό εμβόλιο (*A. salmonicida, V. anguillarum* και *Moritella viscosa*) που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά και ενδομυϊκά δεν οδήγησε σε αλλαγή της έκφρασης των MHC ΙΙ στο μεσονεφρικό ιστό για ένα διάστημα 19 ημερών που διήρκησε το πείραμα. Στο αίμα παρατηρήθηκε μείωση των MHC ΙΙ μεταγράφων δύο ημέρες μετά τον εμβολιασμό πιθανά σχετιζόμενη με την εκροή των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στο σημείο της ένεσης (Haugland et al., 2005).

Η αυξητική τάση έκφρασης των TCR επάγει την ειδική κυτταρική ανοσία όπως φαίνεται στην έκφραση του CD4, την ημέρα 30 μετά τον εμβολιασμό μόνο στην ομάδα που εμβολιάστηκε με βακτηρίνη και ανοσοενισχυτικό (NS + STA). Ωστόσο, η δράση τους ως προς την ενεργοποίηση των Β λεμφοκυττάρων κυρίως στις ομάδες NS και NS + STA εμφανίζεται μόνο ως αυξητική τάση έκφρασης την ημέρα 15 και πιθανά διατηρείται στην ομάδα NS + STA μέχρι την ημέρα 30. Η απόκριση πάντως μέχρι και τη μέρα 15 γενικά συμφωνεί με το χρονικό διάστημα που περιγράφηκε παραπάνω για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στο λαβράκι μετά από εμβολιασμό.

Στα ίδια χρονικά σημεία με αυτά που μελετήθηκαν εδώ, ενέσιμο εμβόλιο Nodavirus σε λαβράκι (10 - 12 g) προκάλεσε στο μεσονεφρικό ιστό μείωση της έκφρασης των γονιδίων MHC I και MHC II την ημέρα 15 και 30 αντίστοιχα ενώ το ίδιο ισχύει και για τα γονίδια IgM και CD8 από τη 15^η ημέρα και μετά (Valero et al., 2018). Τα επίπεδα μεταγραφής των TCRb και CD4 δεν επηρεάστηκαν από τον εμβολιασμό (Valero et al., 2018) που όμως το ίδιο έχει περιγραφεί και σε μόλυνση με στέλεχος betanodavirous μέχρι τις 10 ημέρες από τη μόλυνση (Scapigliati et al., 2010). Ωστόσο, ανιχνεύθηκαν ειδικά αντισώματα στον ορό του αίματος και η επιβίωση των εμβολιασμένων ιχθύων ήταν αυξημένη σε σχέση με την ομάδα control (Valero et al., 2018). Σε κάθε περίπτωση το εμβόλιο που αναλύθηκε εδώ ως προς τη γονιδιακή έκφραση στο μεσονεφρικό ιστό (Πείραμα 1.2) δεν έδωσε προστασία στα λαβράκια μετά την τεχνητή μόλυνση με το ομόλογο στέλεχος NS σε αντίθεση με τα δισθενή (NS, PDB) εμβόλια των Πειραμάτων 2 και 3 που έδωσαν προστασία έναντι του PDB. Επίσης, στο πείραμα αυτό δεν μετρήθηκε ο τίτλος ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων ιχθύων που να επιτρέπουν περισσότερες συγκρίσεις και σχόλια. Επιπλέον ο χρόνος δειγματοληψίας και η επιλογή του ιστού είναι παράγοντες σημαντικοί στη διερεύνηση της ανοσολογικής απόκρισης και συχνά διαφέρουν μεταξύ των μελετών που ειδικά για το λαβράκι είναι προς το παρόν λίγες, κυρίως αφορούν ενδοκυτταρικά παθογόνα όπως στελέχη Nodavirus.

Συγκρίνοντας με άλλες μελέτες και εμβόλια *A. veronii* τα αποτελέσματα τους δείχνουν ανάπτυξη προστατευτικής ανοσίας έναντι μόλυνσης που κυμαίνεται αναλόγως της μορφής αντιγόνου και της μεθόδου χορήγησης ενώ σε όλες τις περιπτώσεις περιλαμβάνει επαναληπτικό εμβολιασμό. Στον κυπρίνο (*C. carprio*, 35 g), με επαναληπτικό εμβολιασμό (ημέρες 0,14), ενέσιμη αδρανοποιημένη βακτηρίνη $(2\times10^7 κύτταρα/ψάρι)$ έδωσε RPS 43%, έναντι 74% στην ομάδα που εμβολιάστηκε με ghost κύτταρα ($10^7 κύτταρα/ψάρι$), μετά από τεχνητή ενέσιμη μόλυνση με στέλεχος *A. veronii* (3×10^6 cfu/ψάρι) που διεξήχθη 42 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Jiang et al., 2019). Στον ίδιο ξενιστή (30 - 40 g), με επαναληπτικό εμβολιασμό (ημέρες 0, 14), ενέσιμη αδρανοποιημένη βακτηρίνη ($10^9 κύτταρα/ψάρι$, ΤΗ0426) με ανοσοενισχυτικό (Freund's), έδωσε RPS 70%, έναντι 75% στην ομάδα που εμβολιάστηκε με ECPs, μετά από τεχνητή ενέσιμη μόλυνση (4×10^5 cfu/ψάρι) που διεξήχθη 28 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Song et al., 2018).

Στο Misgurnus anguillicaudatus (6 g), με επαναληπτικό εμβολιασμό (ημέρες 0,14), ενέσιμο ζωντανό εξασθενημένο στέλεχος *A. veronii* σε δόση 2×10⁶ cfu/ψάρι έδωσε RPS 66% μετά από τεχνητή ενέσιμη μόλυνση με το στέλεχος αγρίου τύπου (TH0426), σε δόση ίση με τη δόση εμβολιασμού, που διεξήχθη 42 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Zhang et al., 2020). Στο είδος θαλασσινού νερού *Paralabrax maculatofasciatus* (10 g), ενέσιμο DNA εμβόλιο για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες Omp38 and Omp48 ανθρώπινου στελέχους (από περιστατικό διάρροιας), έδωσε RPS 54% και 60% αντίστοιχα, μετά από τεχνητή ενέσιμη μόλυνση (5×10⁶ cfu/ψάρι) 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (Vazquez-Juarez et al., 2005).

Η γαστρική οδός και η χορήγηση μέσω της τροφής έχει μελετηθεί στον κυπρίνο (50-65 g) με χρήση του ζωντανού Lactobacillus casei ανασυνδυασμένου για πρωτείνες (μεμβρανικές και εκκριτικές) στελέχους Α. veronii (TH0426). Εφαρμόστηκε διαφορετικό πρωτόκολλο χορήγησης και η αποτελεσματικότητα μετρήθηκε σε διαφορετικούς χρόνους. Το ανασυνδυδυασμένο εμβόλιο χορηγήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σε συγκέντρωση 10⁹ cfu/g και η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας έγινε με ενέσιμη μόλυνση (10⁷ cfu/ψάρι). Για την πρωτεΐνη OmpAl, το εμβόλιο χορηγήθηκε τις ημέρες 1-3, ακολούθησε επαναληπτικός εμβολιασμός τις ημέρες 32-35, η μόλυνση έγινε 66 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό και η τιμή RPS ήταν 67% (Zhang et al., 2018). Για την επίσης μεμβρανική πρωτείνη OmpW, το εμβόλιο χορηγήθηκε τις ημέρες 1-3, διεξήχθη επαναληπτικός εμβολιασμός τις ημέρες 18-20 και έδωσε RPS 50% μετά την τεχνητή μόλυνση 34 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Zhang et al., 2019). Για την FlaA (flagellin), εμβόλιο χορηγήθηκε για 56 συνεχόμενες ημέρες, η τεχνητή ενέσιμη μόλυνση διεξήχθη την ημέρα 58 και έδωσε RPS 70% (Tian et al., 2019). Για την flaB (flagellin) χορηγήθηκε τις ημέρες 0-2, διεξήχθη επαναληπτικός εμβολιασμός τις ημέρες 28-29, έδωσε RPS 67% μετά από μόλυνση που διεξήχθη 58 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό (Kong et al., 2019). Για την Malt (εκκριτική), το εμβόλιο χορηγήθηκε τις ημέρες 0-2 και επαναληπτικά τις ημέρες 14-15, η μόλυνση έγινε τη μέρα 34 και έδωσε RPS 53% (Ju et al., 2020). Για την επίσης εκκριτική AcrV το εμβόλιο χορηγήθηκε για 56 συνεχόμενες ημέρες και έδωσε RPS 67% (Kong et al., 2020).

Τα αποτελέσματα είναι παρόμοια παρά τη διαφορετική μεθοδολογία και δείχνουν τις προοπτικές της χορήγησης μέσω της τροφής δεδομένης της προστασίας που προσέφερε σε ενέσιμες μολύνσεις με το παθογόνο. Σημειώνεται βέβαια, ότι το κλινικό στέλεχος *A. veronii* TH0426 που χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα από τα εμβόλια που προαναφέρθηκαν (Ju et al., 2020; Kong et al., 2019, 2020; Song et al., 2018; Tian et al., 2019; Zhang et al., 2018, 2020, 2019) απομονώθηκε αρχικά από διαφορετικό ξενιστή (γατόψαρο, *Pelteobagrus fulvidraco*) (Kang et al., 2016) από αυτούς στους οποίους αξιολογήθηκαν τα εμβόλια. Ειδικά αντισώματα ανιχνεύθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις. Η γαστρική οδός σε δισθενές εμβόλιο για τα *A. veronii* και *A. hydrophila* έχει μελετηθεί και σε ποντίκι, με χρήση μικροσφαιρών PLGA, για την ενθυλάκωση φορέα που περιέχει τα γονίδια αιμολυτικής τοξίνης hly και της μεμβρανικής πρωτεΐνης ompA. Διεξήχθη επαναληπτικός εμβολιασμός (ημέρες 0,14) και το RPS ήταν 100% στην ενέσιμη τεχνητή μόλυνση που διεξήχθη 30 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό σε δόση παθογόνων: 10⁵ cfu/άτομο για το *A. veronii* και 10⁶ cfu/άτομο για το *A. hydrophila* (Gao et al., 2013).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ενθαρρύνουν τη χρήση αυτεμβολίων για την πρόληψη βακτηριακών ασθενειών σε εκτρεφόμενα λαβράκια. Η εφαρμογή μονού εμβολιασμού με το στέλεχος PDB, *A. veronii* έδωσε προστασία έναντι μόλυνσης στο λαβράκι συγκρινόμενη σε επίπεδα με εμβόλια για το ίδιο παθογόνο χορηγημένα με διπλό εμβολιασμό. Συνίσταται περεταίρω μελέτη με στρατηγική εφαρμογής διπλού εμβολιασμού και τη χρήση ανοσοενισχυτικών για τη μεγιστοποίηση των επιπέδων προστασίας.

5. Συμπεράσματα

- Η ασθένεια A. veronii επηρεάζει εκτρεφόμενα λαβράκια βάρους > 50 g στο Ανατολικό και Δυτικό Αιγαίο με τις εξάρσεις να λαμβάνουν χώρα σε Θερμοκρασίες > 21°C.
- Φαινοτυπικά τα κλινικά στελέχη *Α. veronii* από λαβράκι που αναλύθηκαν διακρίνονται σε τρεις ομάδες ως προς την κινητικότητα και την παραγωγή χρωστικής. Δεν διακρίνονται με τα γονίδια που εξετάστηκαν ενώ παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα και σε επίπεδο γονιδιωμάτων.
- Η διάκριση τους έγινε εφικτή μέσω των σημειακών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών που ομαδοποιοιούν τα στελέχη ανάλογα με τη γεωγραφική τους προέλευση (Ανατολικό/Δυτικό Αιγαίο) και τις φαινοτυπικές ομάδες που αναφέρθηκαν παραπάνω και στη διαφορετική γεωγραφική προέλευση των στελεχών.
- Αναπτύχθηκε πρωτόκολλο διάγνωσης ασθενειών Aeromonas spp. βάσει μοριακών και βιοχημικών χαρακτήρων και αύξησης.
- Τα συμπτώματα της ασθένειας αναπαρήχθησαν στις τεχνητές μολύνσεις σε λαβράκι, επιβεβαιώνοντας την παθογονικότητα του A. veronii.
- Ενθαρρύνεται η χρήση των zebrafish ως εναλλακτικό μοντέλο για τη μελέτη μολυσματικότητας βακτηρίων στα είδη της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας.
- Με τη μεθοδολογία της αντίστροφης εμβολιολογίας εντοπίστηκαν συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των στελεχών από το λαβράκι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά για εμβόλιο υπομονάδας ευρείας χρήσης στην εκτροφή λαβρακιού στο Αιγαίο πέλαγος.
- Ενθαρρύνεται επίσης η χρήση πολυσθενούς εμβολίου για το εκτρεφόμενο στο Αιγαίο λαβράκι αφού παρά την υψηλή ομοιότητα σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας των αντιγονικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης των στελεχών αυτά διέφεραν σε βασικά εξωκυτταρικά συστατικά όπως μαστίγιο, πρωτεΐνη S-layer, maltoporin LamB και O-antigen.
- Το δισθενές (NS, PDB) εμβόλιο έδωσε προστασία σε ενήλικα λαβράκια και ιχθύδια έναντι μόλυνσης με το στέλεχος PDB.

- Ο τίτλος αντισωμάτων για τα αντιγόνα NS και PDB διατηρήθηκε σταθερός για τουλάχιστον 60 ημέρες μετά τον εμβολιασμό με ένεση με το ελαιώδες δισθενές (NS+PDB+Montanide) εμβόλιο.
- Η κυτταρική ανοσία (CD4) στο μεσονεφρικό ιστό ενεργοποιείται την ημέρα 30
 στην ομάδα που εμβολιάστηκε με ενέσιμο ελαιώδες εμβόλιο με το στέλεχος
 NS.
- Ενθαρρύνεται η χρήση των αυτεμβολίων για την πρόληψη της ασθένειας από το *A. veronii* σε εκτρεφόμενο λαβράκι.
- Η εφαρμογή επαναληπτικών εμβολιασμών ή/και η αύξηση της δόσης αντιγόνου προτείνονται μελλοντικά για την αύξηση της αποτελεσματικότητας των εμβολίων.

6. Δημοσιέυσεις

- Smyrli, M., Prapas, A., Rigos, G., Kokkari, C., Pavlidis, M., Katharios, P., 2017. *Aeromonas veronii* infection associated with morbidity and mortality in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Pathol. 52, 68–81. <u>https://doi.org/10.3147/jsfp.52.68</u>
- Smyrli, M., Triga, A., Dourala, N., Varvarigos, P., Pavlidis, M., Quoc, V.H., Katharios, P., 2019. Comparative Study on A Novel Pathogen of European Seabass. Diversity of *Aeromonas veronii* in the Aegean Sea. Microorganisms 7, 504. <u>https://doi.org/10.3390/microorganisms7110504</u>
- Smyrli, M., Katharios, P., 2020. Aeromonas spp., In: Zrnčić, S. (Ed.), 2020. Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture, Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches n. 75, Zaragoza: CIHEAM. <u>http://om.ciheam.org/om/pdf/b75/b75.pdf</u>
- Triga, A., Smryli, M., Katharios, P., 2020. Aeromoniasis, In: Chong R. S. M. (Ed.), In press. Aquaculture Pathophysiology, Elsevier.

7. Βιβλιογραφία

- Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Janda, J.M., 2003. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. J Clin Microbiol 41, 2348–2357. doi:10.1128/JCM.41.6.2348-2357.2003
- Abbott, S.L., Seli, L.S., Catino M., J., Hartley, M.A., Janda, J.M., 1998. Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: A continuing problem. J Clin Microbiol 36, 1103–1104. doi:10.1128/jcm.36.4.1103-1104.1998
- Abolofia, J., Wilen, J.E., Asche, F., 2017. The cost of lice: Quantifying the impacts of parasitic sea lice on farmed salmon. Mar Resour Econ 32, 329–349. doi:10.1086/691981
- Abou-Okada, M., El-Gendy, N.M., Elhelw, R., 2021. Effect of booster vaccination on immunoprotection in European seabass vaccinated against vibriosis. Aquac Res 52, 736–748. doi:https://doi.org/10.1111/are.14930
- Abram, Q.H., Dixon, B., Katzenback, B.A., 2017. Impacts of low temperature on the teleost immune system. Biology (Basel) 6. doi:10.3390/biology6040039
- Adams, A., 2019. Progress, challenges, and opportunities in fish vaccine development. Fish Shellfish Immunol 90, 210–214. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.04.066
- Adams, A., Auchinachie, N., Bundy, A., Tatner, M.F., Horne, M.T., 1988. The potency of adjuvanted injected vaccines in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) and bath vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Aquaculture 69, 15–26. doi:10.1016/0044-8486(88)90182-2
- Adu-Bobie, J., Capecchi, B., Serruto, D., Rappuoli, R., Pizza, M., 2003. Two years into reverse vaccinology. Vaccine 21, 605–610. doi:https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00566-2
- Akova, Balci, S., 2015. Aquaculture and its distribution in Turkey. J Aquac Eng Fish Res 1, 160–190.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol 8, 251–9. doi:10.1038/nrmicro2312
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. Nat Biotechnol 37, 420–423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A.J., Ko, W.C., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., 2010a. *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. Int J Syst Evol Microbiol 60, 2048–2055. doi:10.1099/ijs.0.014621-0
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., 2010b. *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. Int J Syst Evol Microbiol 60, 72–77. doi:10.1099/ijs.0.011643-0
- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. Dev Biol Stand 49, 447–454.
- Andreoni, F., Amagliani, G., Magnani, M., 2016. Selection of vaccine candidates for fish pasteurellosis using reverse vaccinology and an in vitro screening approach, in: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., pp. 181–192. doi:10.1007/978-1-4939-3389-1_12
- Aravena-Román, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T.J.J., Riley, T. V., Martínez-Murcia, A.J., Chang, B.J., Figueras, M.J., 2013. *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water. Int J Syst Evol Microbiol 63, 2270–2276. doi:10.1099/ijs.0.040162-0
- Aravena-Román, M., Inglis, T.J.J., Henderson, B., Riley, T. V., Chang, B.J., 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* strains isolated from clinical and environmental sources to 26 antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 56, 1110–1112. doi:10.1128/AAC.05387-11

- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. Appl Anim Behav Sci 104, 199–235. doi:10.1016/j.applanim.2006.09.001
- Athanassopoulou, F., Prapas, T., Rodger, H., 1999. Short communication Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. J Fish Dis 22, 215–218.
- 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. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.099
- Aucouturier, J., Dupuis, L., Ganne, V., 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 19, 2666–2672. doi:https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00498-9
- Austin, B., 2011. Taxonomy of bacterial fish pathogens. Vet Res 42, 20. doi:10.1186/1297-9716-42-20
- Austin, B., Austin, D.A., 2012. Bacterial Fish Pathogens, 5th ed, Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer, Dordrecht, Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-4884-2
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O., 2008. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Bakopoulos, V., Nikolaou, I., Kalovyrna, N., Amirali, E., Kokkoris, G., Spinos, E., 2015. Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of intraperitoneally administered commercial and experimental vaccines. Mediterr Mar Sci Vol 16, No 2 (2015)DO 1012681/mms1051.
- Bakopoulos, V., Volpatti, D., Adams, A., Galeotti, M., Richards, R., 1997. Qualitative differences in the immune response of rabbit, mouse, and seabass, *Dicentrarchus labrax*, L. to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish pasteurellosis. Fish Shellfish Immunol 7, 161– 174. doi:https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0072
- Balebona, M.C., Zorrilla, I., Moriñigo, M.A., Borrego, J.J., 1998. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. Aquaculture 166, 19–35. doi:10.1016/S0044-8486(98)00282-8
- Baliga, P., Shekar, M., Venugopal, M.N., 2018. Potential outer membrane protein candidates for vaccine development against the pathogen *Vibrio anguillarum*: A reverse vaccinology based identification. Curr Microbiol 75, 368–377. doi:10.1007/s00284-017-1390-z
- Bally, M., Garrabou, J., 2007. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: A new case of emerging disease linked to climate change. Glob Chang Biol 13, 2078–2088. doi:10.1111/j.1365-2486.2007.01423.x
- Barazi-Yeroulanos, L., 2010. Synthesis of Mediterranean marine finfish aquaculture: A marketing and promotion strategy. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
- Barnes, A., 2017. Prevention of disease by vaccination.
- Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Bouquin, S. Le, Kempf,
 I., Chauvin, C., 2017. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater-An attempt
 to set generic epidemiological cut-off values. Front Microbiol 8, 503.
 doi:10.3389/fmicb.2017.00503
- Bartkova, S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Dalsgaard, I., 2017. Epidemiology of Danish *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in fish farms using whole genome sequencing. Front Microbiol.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Tech Bull Regist Med Technol Am Soc Clin Pathol Regist Med Technol 36, 49– 52.

- Bayliss, S.C., Verner-Jeffreys, D.W., Bartie, K.L., Aanensen, D.M., Sheppard, S.K., Adams, A., Feil, E.J., 2017. The promise of whole genome pathogen sequencing for the molecular epidemiology of emerging aquaculture pathogens. Front Microbiol. doi:10.3389/fmicb.2017.00121
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Buján, N., Romalde, J.L., Figueras, M.J., 2010. Comparison of phenotypical and genetic identification of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol 33, 149–153. doi:10.1016/j.syapm.2010.02.002
- Beaz-Hidalgo, R., Alperi, A., Figueras, M.J., Romalde, J.L., 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. Syst Appl Microbiol 32, 471–479. doi:10.1016/j.syapm.2009.06.004
- Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., 2012. Molecular detection and characterization of furunculosis and other *Aeromonas* fish infections, in: Carvalho, E.D. (Ed.), Health and Environment in Aquaculture. Intech, Rijeka, Croatia, pp. 97–132. doi:10.5772/29901
- Beaz-Hidalgo, Roxana, Hossain, M.J., Liles, M.R., Figueras, M.J., 2015. Strategies to avoid wrongly labelled genomes using as example the detected wrong taxonomic affiliation for *Aeromonas* genomes in the genbank database. PLoS One 10. doi:10.1371/journal.pone.0115813
- Beaz-Hidalgo, R., Latif-Eugenín, F., Hossain, M.J., Berg, K., Niemi, R.M., Rapala, J., Lyra, C., Liles, M.R., Figueras, M.J., 2015. Aeromonas aquatica sp. nov., Aeromonas finlandiensis sp. nov. and Aeromonas lacus sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. Syst Appl Microbiol 38, 161–168. doi:10.1016/j.syapm.2015.02.005
- Beaz-Hidalgo, R., Martínez-Murcia, A., Figueras, M.J., 2013. Reclassification of Aeromonas hydrophila subsp. dhakensis Huys et al. 2002 and Aeromonas aquariorum Martínez-Murcia et al. 2008 as Aeromonas dhakensis sp. nov. comb nov. and emendation of the species Aeromonas hydrophila. Syst Appl Microbiol 36, 171–176. doi:10.1016/J.SYAPM.2012.12.007
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., Mcneil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. Biotech Histochem 51, 71–97. doi:10.3109/10520297609116677
- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. Vet Parasitol 132, 249–272. doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.005
- Breuil, G., Vassiloglou, B., Pepin, J.F., Romestand, B., 1997. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Shellfish Immunol 7, 29–43. doi:http://dx.doi.org/10.1006/fsim.1996.0061
- Brudeseth, B.E., Wiulsrød, R., Fredriksen, B.N., Lindmo, K., Løkling, K.E., Bordevik, M., Steine, N., Klevan,
 A., Gravningen, K., 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised finfish farming 35, 1759–1768. doi:10.1016/j.fsi.2013.05.029
- Brummett, R.E., Alvial, A., Kibenge, F., Forster, J., Burgos, J.M., Ibarra, R., St-Hilaire, S., Chamberlain, G.C., Lightner, D. V, Khoa, L. Van, Hao, N. Van, Tung, H., Loc, T.H., Reantaso, M., Wyk, P.M. Van, Chamberlain, G.W., Towner, R., Villarreal, M., Akazawa, N., Omar, I., Josue, L., Ralaimarindaza, Baloi, A.P., Blanc, P.-P., Nikuli, H.L., 2014. Reducing disease risk in aquaculture (English). Agriculture and environmental services discussion paper; no. 9. World Bank Group, Washington, DC.
- Buonocore, F., Randelli, E., Bird, S., Secombes, C.J., Costantini, S., Facchiano, A., Mazzini, M., Scapigliati, G., 2006. The CD8α from seabass (Dicentrarchus labrax L.): Cloning, expression, and 3D modelling. Fish Shellfish Immunol 20, 637–646. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.08.006
- Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Costantini, S., Facchiano, A., Scapigliati, G., Stet, R.J.M., 2007. Molecular cloning, differential expression, and 3D structural analysis of the MHC class-II β chain from seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). Fish Shellfish Immunol 23, 853–866. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.013

- Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Guerra, L., Picchietti, S., Costantini, S., Facchiano, A.M., Zou, J., Secombes, C.J., Scapigliati, G., 2008. A CD4 homologue in seabass (*Dicentrarchus labrax*): Molecular characterization and structural analysis. Mol Immunol 45, 3168–3177. doi:10.1016/j.molimm.2008.02.024
- Burr, S.E., Goldschmidt-Clermont, E., Kuhnert, P., Frey, J., 2012. Heterogeneity of *Aeromonas* populations in wild and farmed perch, *Perca fluviatilis* L. J Fish Dis 35, 607–613. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01388.x
- Buschmann, A.H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M.A., Henríquez, L.A., Ivanova, L., Moy, F., Godfrey,
 H.P., Cabello, F.C., 2012. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. PLoS One 7, e42724. doi:10.1371/journal.pone.0042724
- Cabello, F.C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. Environ Microbiol 8, 1137–1144. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- Cai, S.-H., Wu, Z.-H., Jian, J.-C., Lu, Y.-S., Tang, J.-F., 2012. Characterization of pathogenic *Aeromonas* veronii bv. veronii associated with ulcerative syndrome from Chinese longsnout catfish (*Leiocassis* longirostris Günther). Braz J Microbiol 43, 382–388. doi:10.1590/S1517-838220120001000046
- Cao, H., Wang, M., Wang, Q., Xu, T., Du, Y., Li, H., Qian, C., Yin, Z., Wang, L., Wei, Y., Wu, P., Guo, X., Yang, B., Liu, B., 2018. Identifying genetic diversity of O antigens in *Aeromonas hydrophila* for molecular serotype detection. PLoS One 13, e0203445. doi:10.1371/journal.pone.0203445
- Carmen Fusté, Maria, Farfan, M., Albarral, V., Sanglas, A., Carmen Fusté, Ma, Farfán, M., Miñana-Galbis, D., Gaspar Lorén, J., 2012. Population Genetics of the *"Aeromonas hydrophila* Species Complex," in: Studies in Population Genetics. IntechOpen Limited, London. doi:10.5772/35584
- Chacon, M.R., Castro-Escarpulli, G., Soler, L., Guarro, J., Figueras, M.J., 2002. A DNA probe specific for *Aeromonas* colonies. Diagn Microbiol Infect Dis 44, 221–225.
- Chandrarathna, H.P.S.U., Nikapitiya, C., Dananjaya, S.H.S., Wijerathne, C.U.B., Wimalasena, S.H.M.P., Kwun, H.J., Heo, G.J., Lee, J., De Zoysa, M., 2018. Outcome of co-infection with opportunistic and multidrug resistant *Aeromonas hydrophila* and *A. veronii* in zebrafish: Identification, characterization, pathogenicity, and immune responses. Fish Shellfish Immunol 80, 573–581. doi:10.1016/j.fsi.2018.06.049
- Chatfield, C.H., Cianciotto, N.P., 2007. The Secreted Pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. Infect Immun 75, 4062 LP 4070. doi:10.1128/IAI.00489-07
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A., 2007. Review on the immunology of European seabass *Dicentrarchus labrax*. Vet Immunol Immunopathol 117, 1–16.
- CLSI, 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI documnet M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI, 2010. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline. CLSI document M45-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI, 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard—Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. Clinical and Laboratory Stand.
- Coeurdacier, J.L., Pepin, J.F., Fauvel, C., Legall, P., Bourmaud, A.F., Romestand, B., 1997. Alterations in total protein, IgM, and specific antibody activity of male and female seabass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) sera following injection with killed *Vibrio anguillarum*. Fish Shellfish Immunol 7, 151–160. doi:10.1006/fsim.1996.0071
- Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. Immunity. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.002

- Cole, D.W., Cole, R., Gaydos, S.J., Gray, J., Hyland, G., Jacques, M.L., Powell-Dunford, N., Sawhney, C., Au, W.W., 2009. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. Int J Hyg Environ Health 212, 369–77. doi:10.1016/j.ijheh.2008.08.003
- Colorni, A., 2004. Diseases of Mediterranean fish species: Problems, research, and prospects. Bull Eur Assoc Fish Pathol 24, 22–32.
- Colorni, A., Paperna, I., Gordin, H., 1981. Bacterial infections in gilt-head seabream *Sparus aurata* cultured at Elat. Aquaculture 23, 257–267. doi:10.1016/0044-8486(81)90019-3
- Colston, S.M., Fullmer, M.S., Beka, L., Lamy, B., Peter Gogarten, J., Graf, J., 2014. Bioinformatic genome comparisons for taxonomic and phylogenetic assignments using *Aeromonas* as a test case. MBio 5, e02136-14. doi:10.1128/mBio.02136-14
- Confer, A.W., Ayalew, S., 2013. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. Vet Microbiol 163, 207–222. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.019
- Costello, G.M., Vipond, R., Macintyre, S., 1996. *Aeromonas salmonicida* possesses two genes encoding homologs of the major outer membrane protein, OmpA. J Bacteriol 178, 1623–1630. doi:10.1128/jb.178.6.1623-1630.1996
- Costello, M.J., 2009. The global economic cost of sea lice to the salmonid farming industry, in: Journal of Fish Diseases. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 115–118. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x
- Danovaro, R., Fonda Umani, S., Pusceddu, A., 2009. PLoS ONE: Climate change and the potential spreading of marine Mucilage and microbial pathogens in the Mediterranean Sea. PLoS One 4, e7006.
- Das, S., Aswani, R., Jasim, B., Sebastian, K.S., Radhakrishnan, E.K., Mathew, J., 2020. Distribution of multivirulence factors among *Aeromonas* spp. isolated from diseased *Xiphophorus hellerii*. Aquac Int 28, 235–248. doi:10.1007/s10499-019-00456-5
- De Jagoda, S.S.S., Wijewardana, T.G., Arulkanthan, A., Igarashi, Y., Tan, E., Kinoshita, S., Watabe, S., Asakawa, S., 2014. Characterization and antimicrobial susceptibility of motile aeromonads isolated from freshwater ornamental fish showing signs of septicaemia. Dis Aquat Organ 109, 127–137. doi:10.3354/dao02733
- de Santana Lacerda Izabela, P., Gonçalves, Y., Leal de Oliveira Samira, T., Demarqui Fabio, N., C Krewer Cristina, da, Gouveia Gisele, V., Felix Wagner, P., Costa Mateus, M., 2015. Efficacy of *Aeromonas hydrophila* S-layer bacterins with different protein profiles as a vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). African J Microbiol Res 9, 1770–1777. doi:10.5897/AJMR2015.7586
- Demarta, A., Küpfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., Monera, A., José Saavedra, M., Martínez-Murcia, A., 2008. Aeromonas tecta sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. Syst Appl Microbiol 31, 278–286. doi:10.1016/j.syapm.2008.04.005
- Dincturk, E., Tanrikul, T.T., Culha, S.T., 2018. Fungal and bacterial co-Infection of seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) in a recirculating aquaculture system: *Saprolegnia parasitica* and *Aeromonas hydrophila*. Aquat Sci Eng 33, 67+.
- Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J., Scharsack, J.P., 2014. Heat and immunity: An experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). J Anim Ecol 83, 744–757. doi:10.1111/1365-2656.12175
- Dong, H.T., Techatanakitarnan, C., Jindakittikul, P., Thaiprayoon, A., Taengphu, S., Charoensapsri, W., Khunrae, P., Rattanarojpong, T., Senapin, S., 2017. *Aeromonas jandaei* and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J Fish Dis 40, 1395–1403. doi:10.1111/jfd.12617
- dos Santos, N.M.S., Hermsen, T., Rombout, J.H.W.M., Pilström, L., Stet, R.J.M., 2001a. Ig light chain variability in DNP494-KLH immunised seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): evidence for intra-

molecular induced suppression. Dev Comp Immunol 25, 387–401. doi:https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00002-7

- dos Santos, N.M.S., Romano, N., De Sousa, M., Ellis, A.E., Rombout, J.H.W.M., 2000. Ontogeny of B and T cells in seabass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Fish Shellfish Immunol 10, 583–596. doi:10.1006/fsim.2000.0273
- dos Santos, N.M.S., Taverne-Thiele, J.J., Barnes, A.C., Ellis, A.E., M. Rombout, J.H.W., 2001b. Kinetics of juvenile seabass (Dicentrarchus labrax, L.) systemic and mucosal antibody secreting cell response to different antigens (*Photobacterium damselae* spp. *piscicida, Vibrio anguillarum* and DNP). Fish Shellfish Immunol 11, 317–331. doi:https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0320
- dos Santos, N.M.S., Taverne, N., Taverne-Thiele, A.J., De Sousa, M., Rombout, J.H.W.M., 1997. Characterisation of monoclonal antibodies specific for seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) IgM indicates the existence of B cell subpopulations. Fish Shellfish Immunol 7, 175–191. doi:10.1006/fsim.1996.0073
- dos Santos, P.A., Pereira, A.C.M., Ferreira, A.F., de Mattos Alves, M.A., Rosa, A.C.P., Freitas-Almeida, A.C., 2015. Adhesion, invasion, intracellular survival, and cytotoxic activity of strains of *Aeromonas* spp. in HEp-2, Caco-2 and T-84 cell lines. Antonie Van Leeuwenhoek 107, 1225–1236. doi:10.1007/s10482-015-0416-4
- Doukas, V., Athanassopoulou, F., Karagouni, E., Dotsika, E., 1998. *Aeromonas hydrophila* infection in cultured seabass, *Dicentrarchus labrax* L., and *Puntazzo puntazzo* Cuvier from the Aegean Sea. J Fish Dis 21, 317–320. doi:10.1046/j.1365-2761.1998.00105.x
- Dror, M., Sinyakov, M.S., Okun, E., Dym, M., Sredni, B., Avtalion, R.R., 2006. Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. Vet Immunol Immunopathol 109, 279–287. doi:10.1016/j.vetimm.2005.08.022
- Dubey, S., Avadhani, K., Mutalik, S., Sivadasan, S.M., Maiti, B., Paul, J., Girisha, S.K., Venugopal, M.N., Mutoloki, S., Evensen, Ø., Karunasagar, I., Munang'andu, H.M., 2016. Aeromonas hydrophila ompW PLGA nanoparticle oral vaccine shows a dose-dependent protective immunity in rohu (Labeo rohita). Vaccines 4. doi:10.3390/vaccines4020021
- Duchêne, S., Holt, K.E., Weill, F.-X., Le Hello, S., Hawkey, J., Edwards, D.J., Fourment, M., Holmes, E.C., 2016. Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. Microb genomics 2, e000094–e000094. doi:10.1099/mgen.0.000094
- Dumontet, S., Krovacek, K., Svenson, S.B., Pasquale, V., Baloda, S.B., Figliuolo, G., 2000. Prevalence and diversity of *Aeromonas* and *Vibrio* spp. in coastal waters of southern Italy. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 23, 53–72.
- Dworaczek, K., Drzewiecka, D., Pękala-Safińska, A., Turska-Szewczuk, A., 2019. Structural and serological studies of the O6-related antigen of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* strain K557 isolated from *Cyprinus carpio* on a Polish fish farm, which contains L-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-L-mannose), a unique sugar characteristic for Ae. Mar Drugs 17, 399. doi:10.3390/md17070399
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- El-Barbary, M.I., 2017. Serum biochemical and histopathological changes associated with *Aeromonas hydrophila* isolated from *Oreochromis niloticus* and *Sparus aurata* with multiple antibiotic resistance index. J Biol Sci 17, 222–234. doi:10.3923/jbs.2017.222.234
- El-Barbary, M.I., 2010. Some clinical, microbiological, and molecular characteristics of *Aeromonas hydrophila* isolated from various naturally infected fishes. Aquac Int 18, 943–954. doi:10.1007/s10499-009-9315-x
- Evensen, Ø., 2009. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants, and formulations. Options Méditerranéennes Série A, Séminaires Méditerranéens 2009 177–186.
- FAO/OIE/WHO, 2006. Report of a joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance Seoul, Rep.
- FAO, 2019. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2017/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2017. Rome/Roma.
- FAO, 2018a. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 Meeting the sustainable development goals. Rome.
- FAO, 2018b. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2016.
- FAO, 2011a. World aquaculture 2010. FAO Fish Aquac Dep Technical.
- FAO, 2011b. Review of the state of world marine fishery resources. FAO Fish Aquac Dep Technical.
- FEAP, 2009. List of licensed veterinary medicines. Fed Eur Aquac Prod.
- 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).
- Fernández-Álvarez, C., Gijón, D., Álvarez, M., Santos, Y., 2016. First isolation of Aeromonas salmonicida subspecies salmonicida from diseased seabass, Dicentrarchus labrax (L.), cultured in Spain. Aquac Reports 4, 36–41. doi:10.1016/j.aqrep.2016.05.006
- Fernández-Bravo, A., Figueras, M.J., 2020. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity, Microorganisms. doi:10.3390/microorganisms8010129
- Figueras, M.J., Alperi, A., Beaz-Hidalgo, R., Stackebrandt, E., Brambilla, E., Monera, A., Martínez-Murcia, A.J., 2011. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. Int J Syst Evol Microbiol 61, 242–248. doi:10.1099/ijs.0.016139-0
- Figueras, M.J., Latif-Eugenin, F., Ballester, F., Pujol, I., Tena, D., Berg, K., Hossain, M.J., Beaz-Hidalgo, R., Liles, M.R., 2017. "Aeromonas intestinalis" and "Aeromonas enterica" isolated from human faeces, "Aeromonas crassostreae" from oyster and "Aeromonas aquatilis" isolated from lake water represent novel species. New microbes new Infect 15, 74–76. doi:10.1016/j.nmni.2016.11.019
- Floris, R., Manca, S., Fois, N., 2013. Microbial ecology of intestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) from two coastal lagoons of Sardinia (Italy), in: Transitional Waters Bulletin. pp. 4–12. doi:10.1285/i1825229Xv7n2p4
- Fulton, K.M., Mendoza-Barberá, E., Twine, S.M., Tomás, J.M., Merino, S., 2015. Polar glycosylated and lateral non-glycosylated flagella from *Aeromonas hydrophila* strain AH-1 (Serotype O11). Int J Mol Sci 16, 28255–28269. doi:10.3390/ijms161226097
- Galeotti, M., Romano, N., Volpatti, D., Bulfon, C., Brunetti, A., Tiscar, P.G., Mosca, F., Bertoni, F., Marchetti, M.G., Abelli, L., 2013. Innovative vaccination protocol against vibriosis in *Dicentrarchus labrax* (L.) juveniles: Improvement of immune parameters and protection to challenge. Vaccine 31, 1224–1230. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.041
- Galindo-Villegas, J., Mulero, V., 2014. Current knowledge on the development and functionality of immune responses in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*), in: Muñoz-Cueto, J.A., Vázquez, F.J. (Eds.), Biology of European seabass. CRC Press, Boca Raton, p. 39. doi:https://doi.org/10.1201/b16043
- Gao, S., Zhao, N., Amer, S., Qian, M., Lv, M., Zhao, Y., Su, X., Cao, J., He, H., Zhao, B., 2013. Protective efficacy of PLGA microspheres loaded with divalent DNA vaccine encoding the ompA gene of *Aeromonas veronii* and the hly gene of *Aeromonas hydrophila* in mice. Vaccine 31, 5754–5759. doi:https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.053
- Gauthier, J., Vincent, A.T., Charette, S.J., Derome, N., 2017. Strong genomic and phenotypic heterogeneity in the *Aeromonas sobria* Species Complex. Front Microbiol 8, 2434. doi:10.3389/fmicb.2017.02434

- Ghittino, C., Latini, M., Agnetti, F., Panzieri, C., Lauro, L., Ciappelloni, R., Petracca, G., 2003. Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. Vet Res Commun 27 Suppl 1, 471–479.
- Goharrizi, L.Y., Zorriehzahra, M.J., Adel, M., 2015. The study on effect of temperature stress on occurrence of clinical signs caused by *Aeromonas hydrophila* in *Capoeta damascina* in *in vitro* condition. Adv Anim Vet Sci 3, 406–412. doi:10.23959/sfnhj-1000002
- Graf, J., 1999. Diverse restriction fragment length polymorphism patterns of the PCR- amplified 16S rRNA genes in *Aeromonas veronii* strains and possible misidentification of *Aeromonas* species. J Clin Microbiol 37, 3194–3197. doi:10.1128/jcm.37.10.3194-3197.1999
- Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Rikardsen, K.S., Greger, E., Vigneulle, M., 1998. Bivalent vaccines for seabass (*Dicentrachus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. J Appl Ichthyol 14, 159–162. doi:https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1998.tb00635.x
- Gudding, R., Lillehauga, A., Evensen, O., 1999. Recent developments in fish vaccinology. Vet. Immunol. Immunopathol. Vet Immunol Immunopathol 72, 203–212.
- Gudding, R., Goodrich, T., 2014. The History of Fish Vaccination, in: Fish Vaccination. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–11. doi:10.1002/9781118806913.ch1
- Gudmundsdottir, B.K., 1998. Infections by atypical strains of the bacterium *Aeromonas salmonicida*. Buvisindi 12, 61–72.
- Gudmundsdóttir, B.K., Gudmundsdóttir, S., 1997. Evaluation of cross protection by vaccines against atypical and typical furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 20, 343–350. doi:10.1046/j.1365-2761.1997.00307.x
- Gudmundsdóttir, S., Lange, S., Magnadóttir, B., Gudmundsdóttir, B.K., 2003. Protection against atypical furunculosis in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.); comparison of a commercial furunculosis vaccine and an autogenous vaccine. J Fish Dis 26, 331–338. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00462.x
- Guo, S.L., Yang, Q.H., Feng, J.J., Duan, L.H., Zhao, J.P., 2016. Phylogenetic analysis of the pathogenic genus *Aeromonas* spp. isolated from diseased eels in China. Microb Pathog 101, 12–23. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.016
- Harf-Monteil, C., Le Flèche, A., Riegel, P., Prévost, G., Bermond, D., Grimont, P.A.D., Monteil, H., 2004. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. Int J Syst Evol Microbiol 54, 481–485. doi:10.1099/ijs.0.02786-0
- Hassan, M.A., Noureldin, E.A., Mahmoud, M.A., Fita, N.A., 2017. Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA. Egypt J Aquat Res 43, 161–167. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.06.001
- Hassan, M.A., Soliman, W.S., Mahmoud, M.A., Al-Shabeeb, S.S., Imran, P.M., 2015. Prevalence of bacterial infections among cage-cultured marine fishes at the Eastern Province of Saudi Arabia. Res J Pharm Biol Chem Sci 6, 1112–1126.
- Haugland, O., Torgersen, J., Syed, M., Evensen, O., 2005. Expression profiles of inflammatory and immune-related genes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at early time post vaccination. Vaccine 23, 5488–5499. doi:10.1016/j.vaccine.2005.07.034
- Hoai, T.D., Trang, T.T., Van Tuyen, N., Giang, N.T.H., Van Van, K., 2019. *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. Aquaculture 513, 734425. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734425
- Hossain, M.J., Waldbieser, G.C., Sun, D., Capps, N.K., Hemstreet, W.B., Carlisle, K., Griffin, M.J., Khoo, L., Goodwin, A.E., Sonstegard, T.S., Schroeder, S., Hayden, K., Newton, J.C., Terhune, J.S., Liles, M.R., 2013. Implication of lateral genetic transfer in the emergence of *Aeromonas hydrophila* isolates of epidemic outbreaks in channel catfish. PLoS One 8, e80943. doi:10.1371/journal.pone.0080943

- Hossain, S., De Silva, B.C.J., Dahanayake, P.S., Heo, G.J., 2018. Characterization of virulence properties and multi-drug resistance profiles in motile *Aeromonas* spp. isolated from zebrafish (*Danio rerio*). Lett Appl Microbiol 67, 598–605. doi:10.1111/lam.13075
- Hu, M., Wang, N., Pan, Z.H., Lu, C.P., Liu, Y.J., 2012. Identity and virulence properties of *Aeromonas* isolates from diseased fish, healthy controls, and water environment in China. Lett Appl Microbiol 55, 224–233. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03281.x
- Huntingford, F.A., Kadri, S., 2009. Taking account of fish welfare: lessons from aquaculture. J Fish Biol 75, 2862–2867. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02465.x
- Huys, G., Cnockaert, M., Swings, J., 2005. *Aeromonas culicicola* Pidiyar et al. 2002 is a later subjective synonym of *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner et al. 1987. Syst Appl Microbiol 28, 604–609. doi:10.1016/j.syapm.2005.03.012
- Huys, G., Pearson, M., Kämpfer, P., Denys, R., Cnockaert, M., Inglis, V., Swings, J., 2003. *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicaemic farmed frogs in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 53, 885–891. doi:10.1099/ijs.0.02357-0
- Jaafar, R.M., Chettri, J.K., Dalsgaard, I., Al-Jubury, A., Kania, P.W., Skov, J., Buchmann, K., 2015. Effects of adjuvant Montanide TM ISA 763 A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri*. Fish Shellfish Immunol 47, 797–806. doi:10.1016/j.fsi.2015.10.023
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. Clin Microbiol Rev 23, 35 LP – 73. doi:10.1128/CMR.00039-09
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H., Shimada, T., 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. J Clin Microbiol 34, 1930–1933.
- Jiang, N., Luo, L., Xing, W., Li, T., Yuan, D., Xu, G., Li, W., Ma, Z., Jin, L., Ji, M., 2019. Generation and immunity effect evaluation of biotechnology-derived *Aeromonas veronii* ghost by PhiX174 gene E-mediated inactivation in koi (*Cyprinus carprio* koi). Fish Shellfish Immunol 86, 327–334. doi:10.1016/j.fsi.2018.07.042
- Jimenez, N., Canals, R., Saló, M.T., Vilches, S., Merino, S., Tomás, J.M., 2008. The *Aeromonas hydrophila* wb*O34 gene cluster: Genetics and temperature regulation. J Bacteriol 190, 4198–4209. doi:10.1128/JB.00153-08
- Jolley, K.A., Bray, J.E., Maiden, M.C.J., 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome open Res 3, 124. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Ju, A.-Q., Yang, S., Zhang, H.-P., Ma, X., Zhang, D.-X., Kang, Y., Shi, Q., Wu, T., Wang, G.-Q., Qian, A.-D., Shan, X., Luan, W.-M., 2020. Construction and immune efficacy of recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing Malt from *Aeromonas veronii*. Microb Pathog 141, 103918. doi:https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103918
- Kaas, R.S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2014. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. PLoS One 9, e104984.
- Kämpfer, P., Christmann, C., Swings, J., Huys, G., 1999. In vitro susceptibilities of *Aeromonas* genomic species to 69 antimicrobial agents. Syst Appl Microbiol 22, 662–669. doi:10.1016/S0723-2020(99)80019-8
- Kang, Y., Pan, X., Xu, Y., Siddiqui, S.A., Wang, C., Shan, X., Qian, A., 2016. Complete genome sequence of the fish pathogen *Aeromonas veronii* TH0426 with potential application in biosynthesis of pullulanase and chitinase. J Biotechnol 227, 81–82. doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.009
- Karatas, S., Candan, A., Demircan, D., 2005. Atypical Aeromonas infection in cultured seabass (*Dicentrarchus labrax*) in the Black Sea. Isr J Aquac Bamidgeh 57, 255–263.

- Khalil, R.H., Diab, A.M., Shakweer, M.S., Ghetas, H.A., Khallaf, M.M., Omar, A.A.-D., 2018. New perspective to control of tenacibaculosis in seabass *Dicentrarchus labrax* L. Aquac Res 49, 2357–2365. doi:10.1111/are.13689
- Khor, W.C., Puah, S.M., Tan, J.A.M.A., Puthucheary, S., Chua, K.H., 2015. Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas* Species isolated from freshwater lakes in Malaysia. PLoS One 10, e0145933. doi:10.1371/journal.pone.0145933
- Khushiramani, R.M., Maiti, B., Shekar, M., Girisha, S.K., Akash, N., Deepanjali, A., Karunasagar, Iddya, Karunasagar, Indrani, 2012. Recombinant *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein 48 (Omp48) induces a protective immune response against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella tarda*. Res Microbiol 163, 286–291. doi:10.1016/j.resmic.2012.03.001
- Kim, Y.S., Yoon, N., Karisa, N., Seo, S., Lee, J., Yoo, S., Yoon, I., Kim, Y., Lee, H., Ahn, J., 2019. Identification of novel immunogenic proteins against *Streptococcus parauberis* in a zebrafish model by reverse vaccinology. Microb Pathog 127, 56–59. doi:https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.053
- Kirov, S.M., Castrisios, M., Shaw, J.G., 2004. Aeromonas flagella (polar and lateral) are enterocyte adhesins that contribute to biofilm formation on surfaces. Infect Immun 72, 1939–1945. doi:10.1128/IAI.72.4.1939-1945.2004
- Kong, R.Y., Pelling, A., So, C. L., Wu, R.S. S., 1999. Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA intergenic spacers for genus- and species-specific detection of aeromonads. Mar Pollut Bull 38, 802–808. doi:10.1016/S0025-326X(99)00044-2
- Kong, Y.-D., Kang, Y.-H., Tian, J.-X., Zhang, D.-X., Zhang, L., Tao, L.-T., Wu, T.-L., Li, Y., Wang, G.-Q., Shan, X.-F., 2019. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flaB confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio*. Fish Shellfish Immunol 87, 627–637. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.01.032
- Kong, Y., Li, M., Tian, J., Zhao, L., Kang, Y., Zhang, L., Wang, G., Shan, X., 2020. Effects of recombinant Lactobacillus casei on growth performance, immune response, and disease resistance in crucian carp, Carassius auratus. Fish Shellfish Immunol 99, 73–85. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.008
- Koppang, E.O., Bjerkås, I., Haugarvoll, E., Chan, E.K.L., Szabo, N.J., Ono, N., Akikusa, B., Jirillo, E., Poppe, T.T., Sveier, H., Tørud, B., Satoh, M., 2008. Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. J Immunol 181, 4807–14.
- Kozinska, A., Pekala, A., 2010. Serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria. Bull Vet Inst Puławy 54.
- Kozińska, A., Pkala, A., 2012. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish. Sci World J 2012. doi:10.1100/2012/949358
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Mol Biol Evol 35, 1547–1549.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M., 2015. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. Ann Rev Mar Sci 7, 471–496. doi:10.1146/annurev-marine-010814-015646
- Lamy, B., Marchandin, H., Lamy, B., Laurent, F., Lamy, B., Laurent, F., Kodjo, A., Lamy, B., Roger, F., Jumas-Bilak, E., Marchandin, H., Laurent, F., Laurent, F., Kodjo, A., Jumas-Bilak, E., 2012. Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using Enterobacteriaceae breakpoints. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31, 2369–2377. doi:10.1007/s10096-012-1578-x
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Stackebrandt E, Goodfellow M Nucleic Acids Tech Bact Syst pp 115–147 John Wiley Sons, Chichester.

- Le Morvan, C., Troutaud, D., Deschaux, P., 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. J Exp Biol 201, 165–168.
- Lee, I., Kim, Y.O., Park, S.C., Chun, J., 2016. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol 66, 1100–1103. doi:10.1099/ijsem.0.000760
- Lee, J.-H., Lee, J., 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. FEMS Microbiol Rev 34, 426–444. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x
- Leekitcharoenphon, P., Kaas, R.S., Thomsen, M.C.F., Friis, C., Rasmussen, S., Aarestrup, F.M., 2012. snpTree - a webserver to identify and construct SNP trees from whole genome sequence data. BMC Genomics 13, S6. doi:10.1186/1471-2164-13-S7-S6
- Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C.F., Pérez, T., 2010. Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. Trends Ecol Evol 25, 250–260. doi:10.1016/j.tree.2009.10.009
- Liu, D., Geng, Y., Wang, K., Chen, D., Huang, X.L., Ou, Y., He, C.L., Zhong, Z.J., Lai, W., 2016. *Aeromonas veronii* infection in cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in southwest China. Isr J Aquac Bamidgeh 68.
- Liu, P., Huang, D., Hu, X., Tang, Y., Ma, X., Yan, R., Han, Q., Guo, J., Zhang, Y., Sun, Q., Liu, Z., 2017. Targeting inhibition of SmpB by peptide aptamer attenuates the virulence to protect zebrafish against *Aeromonas veronii* infection. Front Microbiol 8, 1766. doi:10.3389/fmicb.2017.01766
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT method. Methods 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lorén Egea, J.G., Farfán Sellarés, M., Fusté Munné, M.C., 2014. Molecular phylogenetics and temporal diversification in the genus *Aeromonas* based on the sequences of five housekeeping genes. PLoS One 9, e88805.
- Lorén, J.G., Farfán, M., Fusté, M.C., 2018. Species delimitation, phylogenetic relationships, and temporal divergence model in the genus *Aeromonas*. Front Microbiol 9. doi:10.3389/fmicb.2018.00770
- Lovewell, R.R., Collins, R.M., Acker, J.L., O'Toole, G.A., Wargo, M.J., Berwin, B., 2011. Step-wise loss of bacterial flagellar torsion confers progressive phagocytic evasion. PLoS Pathog 7, e1002253. doi:10.1371/journal.ppat.1002253
- Lüthje, P., Brauner, A., 2014. Chapter Seven Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host, in: Poole, R.K.B.T.-A. in M.P. (Ed.), Advances in Bacterial Pathogen Biology. Academic Press, pp. 337–372. doi:https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006
- Ma, J., Bruce, T.J., Jones, E.M., Cain, K.D., 2019. A review of fish vaccine development strategies: Conventional methods and modern biotechnological approaches. Microorganisms 7. doi:10.3390/microorganisms7110569
- Magnadottir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. Mar Biotechnol 12, 361–379. doi:10.1007/s10126-010-9279-x
- Mahendran, R., Jeyabaskar, S., Sitharaman, G., Michael, R.D., Paul, A.V., 2016. Computer-aided vaccine designing approach against fish pathogens *Edwardsiella tarda* and *Flavobacterium columnare* using bioinformatics softwares. Drug Des Devel Ther 10, 1703–1714. doi:10.2147/DDDT.S95691
- Maiti, B., Dubey, S., Munang'andu, H.M., Karunasagar, Iddya, Karunasagar, Indrani, Evensen, Ø., 2020. Application of outer membrane protein-based vaccines against major bacterial fish pathogens in India. Front Immunol.
- Maiti, B., Raghunath, P., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2009. Cloning and expression of an outer membrane protein OmpW of *Aeromonas hydrophila* and study of its distribution in *Aeromonas* spp. J Appl Microbiol 107, 1157–1167. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04296.x

- Maiti, B., Shetty, M., Shekar, M., Karunasagar, Iddya, Karunasagar, Indrani, 2012. Evaluation of two outer membrane proteins, Aha1 and OmpW of *Aeromonas hydrophila* as vaccine candidate for common carp. Vet Immunol Immunopathol 149, 298–301. doi:10.1016/j.vetimm.2012.07.013
- Marana, M.H., Jørgensen, L. von G., Skov, J., Chettri, J.K., Holm Mattsson, A., Dalsgaard, I., Kania, P.W., Buchmann, K., 2017. Subunit vaccine candidates against *Aeromonas salmonicida* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. PLoS One 12, e0171944.
- Marana, M.H., Sepúlveda, D., Chen, D., Al-Jubury, A., Jaafar, R.M., Kania, P.W., Henriksen, N.H., Krossøy,
 B., Dalsgaard, I., Lorenzen, N., Buchmann, K., 2019. A pentavalent vaccine for rainbow trout in Danish aquaculture. Fish Shellfish Immunol 88, 344–351. doi:10.1016/j.fsi.2019.03.001
- Marques, D.S.C., Ferreira, D.A., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Araújo, J.M., Maciel Carvalho, E.V.M., Coelho, L.C.B.B., 2016. Impact of stress on *Aeromonas* diversity in tambaqui (*Colossoma macropomum*) and lectin level change towards a bacterial challenge. Environ Technol (United Kingdom) 37, 3030–3035. doi:10.1080/09593330.2016.1174313
- Marti, E., Balcázar, J.L., 2015. Aeromonas rivipollensis sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. J Basic Microbiol 55, 1435–1439. doi:10.1002/jobm.201500264
- Martin-Carnahan, A., Joseph, S.W., 2005. Genus I. Aeromonas Stanier 1943, 213AL. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2(part B), in: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York, pp. 557-578.
- Martinez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Navarro, A., Carvalho, M.J., Aravena-Roman, M., Correia, A., Figueras, M.J., Saavedra, M.J., 2016. *Aeromonas lusitana* sp. nov., isolated from untreated water and vegetables. Curr Microbiol 72, 795–803. doi:10.1007/s00284-016-0997-9
- Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Svec, P., Saavedra, M.J., Figueras, M.J., Sedlacek, I., 2013. *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. Curr Microbiol 66, 197–204. doi:10.1007/s00284-012-0253-x
- Martinez-Murcia, A.J., Figueras, M.J., Saavedra, M.J., Stackebrandt, E., 2007. The recently proposed species *Aeromonas sharmana* sp. nov., isolate GPTSA-6T, is not a member of the genus *Aeromonas*. Int Microbiol 10, 61–64.
- Martino, M.E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., Cardazzo, B., 2011. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of Multilocus Sequence Typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. Appl Environ Microbiol 77, 4986–5000. doi:10.1128/aem.00708-11
- Masignani, V., Pizza, M., Moxon, E.R., 2019. The development of a vaccine against *Meningococcus* B using reverse vaccinology. Front Immunol.
- Massad, G., Arceneaux, J.E., Byers, B.R., 1991. Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. J Gen Microbiol 137, 237–241. doi:10.1099/00221287-137-2-237
- Mateos, D., Anguita, J., Naharro, G., Paniagua, C., 1993. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. J Appl Bacteriol 74, 111–118. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb03003.x
- Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Saleh, M., El-Matbouli, M., 2016. *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. Dis Aquat Organ 120, 49–68. doi:10.3354/dao03006
- Merino-Contreras, M.L., Guzman-Murillo, M.A., Ruiz-Bustos, E., Romero, M.J., Cadena-Roa, M.A., Ascencio, F., 2001. Mucosal immune response of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) orally immunised with an extracellular lectin of *Aeromonas veronii*. Fish Shellfish Immunol 11, 115–126. doi:10.1006/fsim.2000.0299
- Merino, S., Wilhelms, M., Tomás, J.M., 2014. Role of *Aeromonas hydrophila* flagella glycosylation in adhesion to Hep-2 cells, biofilm formation and immune stimulation. Int J Mol Sci 15, 21935–21946. doi:10.3390/ijms151221935

- Miccoli, A., Saraceni, P.R., Scapigliati, G., 2019. Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. Fish Shellfish Immunol 94, 800–809. doi:10.1016/J.FSI.2019.09.065
- Midtlyng, P.J., 1996. A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. Fish Shellfish Immunol 6, 553–565. doi:10.1006/fsim.1996.0052
- Mikkelsen, H., Lund, V., Larsen, R., Seppola, M., 2011. Vibriosis vaccines based on various sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O2 induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. Fish Shellfish Immunol 30, 330–339. doi:10.1016/j.fsi.2010.11.007
- Mikkelsen, H., Lund, V., Martinsen, L.C., Gravningen, K., Schrøder, M.B., 2007. Variability among *Vibrio* anguillarum O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies. Aquaculture 266, 16–25. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.02.041
- Mikkelsen, H., Schrøder, M.B., Lund, V., 2004. Vibriosis and atypical furunculosis vaccines; efficacy, specificity, and side effects in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Aquaculture 242, 81–91. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.004
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M.C., Loren, J.G., 2007. *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. Int J Syst Evol Microbiol 57, 582–587. doi:10.1099/ijs.0.64497-0
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Fusté, M.C., Lorén, J.G., 2004. *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. Int J Syst Evol Microbiol 54, 2073–2078. doi:10.1099/ijs.0.63202-0
- Miñana-Galbis, D., Farfán, M., Gaspar Lorén, J., Carmen Fusté, M., 2010. Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. Syst Appl Microbiol 33, 15–19. doi:10.1016/j.syapm.2009.11.002
- Mohd-Aris, A., Muhamad-Sofie, M.H.N., Zamri-Saad, M., Daud, H.M., Ina-Salwany, M.Y., 2019. Live vaccines against bacterial fish diseases: A review. Vet world 12, 1806–1815. doi:10.14202/vetworld.2019.1806-1815
- Monfort, M.C., 2006. Marketing of Aquacultured finfish in Europe: Focus on seabass and seabream from the Mediterranean basin. Stud Rev Gen Fish Comm Mediterr No 82 Rome, FAO 2007 50 pp Globefish, 52.
- Munang'andu, H.M., Mutoloki, S., Evensen, Ø., 2015. An overview of challenges limiting the design of protective mucosal vaccines for finfish. Front Immunol 6, 542. doi:10.3389/fimmu.2015.00542
- Murray, A.G., Peeler, E.J., 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. Prev Vet Med 67, 223–235. doi:10.1016/j.prevetmed.2004.10.012
- Mzula, A., Wambura, P.N., Mdegela, R.H., Shirima, G.M., 2019. Current state of modern biotechnologicalbased *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: A systematic review. Biomed Res Int 2019, 3768948. doi:10.1155/2019/3768948
- Namba, A., Mano, N., Takano, H., Beppu, T., Ueda, K., Hirose, H., 2008. OmpA is an adhesion factor of *Aeromonas veronii*, an optimistic pathogen that habituates in carp intestinal tract. J Appl Microbiol 105, 1441–1451. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03883.x
- Navarrete, P., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J., 2008. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. J Aquat Anim Health 20, 177–183. doi:10.1577/H07-043.1
- Navarro, A., Martinez-Murcia, A., 2018. Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on housekeeping gene sequencing and its influence on systematics. J Appl Microbiol 125, 622–631. doi:10.1111/jam.13887
- Nawaz, M., Sung, K., Khan, S.A., Khan, A.A., Steele, R., 2006. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. Appl Environ Microbiol 72, 6461 LP 6466. doi:10.1128/AEM.00271-06

- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish Shellfish Immunol 29, 2–14. doi:10.1016/j.fsi.2010.02.017
- Nielsen, M.E., Høi, L., Schmidt, A.S., Qian, D., Shimada, T., Shen, J.Y., Larsen, J.L., 2001. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China? Dis Aquat Organ 46, 23–29. doi:10.3354/dao046023
- Nordmo, R., Ramstad, A., 1997. Comparison of different challenge methods to evaluate the efficacy of furunculosis vaccines in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 20, 119–126. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.d01-114.x
- Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. Antimicrob Agents Chemother 50, 3519–3528. doi:10.1128/AAC.00545-06
- Odeyemi, O.A., Ahmad, A., 2017. Antibiotic resistance profiling and phenotyping of *Aeromonas* species isolated from aquatic sources. Saudi J Biol Sci 24, 65–70.
- Onuk, E., Findik, A., N, T., Altun, S., Korun, J., Özer, S., Avsever, M., Ciftci, A., 2012. Molecular identification and determination of some virulence genes of *Aeromonas* spp. in fish and water from Turkish coastal regions. Rev Med Vet (Toulouse) 164.
- Öztürk, R.Ç.R.Ç., Altinok, İ., 2014. Bacterial and viral fish diseases in Turkey. Turkish J Fish Aquat Sci 14, 275–297. doi:10.4194/1303-2712-v14_1_30
- Pang, M., Jiang, J., Xie, X., Wu, Y., Dong, Y., Kwok, A.H.Y., Zhang, W., Yao, H., Lu, C., Leung, F.C., Liu, Y., 2015. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. Sci Rep 5, 9833. doi:10.1038/srep09833
- Párez-Sancho, M., Cerdá, I., Fernández-Bravo, A., Domínguez, L., Figueras, M.J., Fernández-Garayzábal, J.F., Vela, A.I., 2018. Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish Aeromonas isolates at species level. J Fish Dis 41, 1485–1493. doi:10.1111/jfd.12837
- Park, J.S., Lee, W.C., Yeo, K.J., Ryu, K., Kumarasiri, M., Hesek, D., Lee, M., Mobashery, S., Song, J.H., Kim, S. II, Lee, J.C., Cheong, C., Jeon, Y.H., Kim, H., 2012. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. FASEB J 26, 219–228. doi:10.1096/fj.11-188425
- Park, T.S., Oh, S.H., Lee, E.Y., Lee, T.K., Park, K.H., Figueras, M.J., Chang, C.L., 2003. Misidentification of Aeromonas veronii biovar sobria as Vibrio alginolyticus by the Vitek system. Lett Appl Microbiol 37, 349–353. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01410.x
- Pedonese, F., Nuvoloni, R., Forzale, F., Fratini, F., Evangelisti, S., D'Ascenzi, C., Rindi, S., 2012. Occurrence and antimicrobial susceptibility of aeromonads from maricultured gilthead seabream (*Sparus aurata*), in: EAAP Scientific Series. Springer, pp. 205–212.
- Picchietti, S., Guerra, L., Buonocore, F., Randelli, E., Fausto, A.M., Abelli, L., 2009. Lymphocyte differentiation in seabass thymus: CD4 and CD8-α gene expression studies. Fish Shellfish Immunol 27, 50–56. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.04.003
- Plant, K.P., LaPatra, S.E., 2011. Advances in fish vaccine delivery. Dev Comp Immunol 35, 1256–1262. doi:10.1016/j.dci.2011.03.007
- Poobalane, S., Thompson, K.D., Ardo, L., Verjan, N., Han, H.-J., Jeney, G., Hirono, I., Aoki, T., Adams, A., 2010. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. Vaccine 28, 3540–3547. doi:10.1016/j.vaccine.2010.03.011
- Pridgeon, J.W., Klesius, P.H., 2012. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. CAB Rev 7, 1–16. doi:10.1079/PAVSNNR20127048

- Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Huys, G., Swings, J., Möllby, R., 2002. Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with Epizootic Ulcerative Syndrome in fish in Bangladesh. Appl Environ Microbiol 68, 650–655.
- Rahman, M.H., Kawai, K., 2000. Outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila* induce protective immunity in goldfish. Fish Shellfish Immunol 10, 379–382. doi:10.1006/fsim.1999.0245
- Raitsos, D.E., Beaugrand, G., Georgopoulos, D., Zenetos, A., Pancucci-Papadopoulou, A.M., Theocharis,
 A., Papathanassiou, E., 2010. Global climate change amplifies the entry of tropical species into the eastern Mediterranean Sea. Limnol Oceanogr 55, 1478–1484. doi:10.4319/lo.2010.55.4.1478
- Ran, C., Qin, C., Xie, M., Zhang, J., Li, J., Xie, Y., Wang, Y., Li, S., Liu, L., Fu, X., Lin, Q., Li, N., Liles, M.R., Zhou, Z., 2018. Aeromonas veronii and aerolysin are important for the pathogenesis of motile aeromonad septicemia in cyprinid fish. Environ Microbiol 20, 3442–3456. doi:10.1111/1462-2920.14390
- Rappuoli, R., 2000. Reverse vaccinology. Curr Opin Microbiol 3, 445–450. doi:10.1016/s1369-5274(00)00119-3
- Rasmussen-Ivey, C.R., Figueras, M.J., McGarey, D., Liles, M.R., 2016. Virulence Factors of *Aeromonas hydrophila*: In the Wake of Reclassification. Front Microbiol 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01337
- Ravid-Peretz, S., Colorni, A., Sharon, G., Ucko, M., 2019. Vaccination of European seabass *Dicentrarchus labrax* with avirulent *Mycobacterium marinum* (iipA::kan mutant). Fish Shellfish Immunol 90, 317–327. doi:10.1016/j.fsi.2019.04.057
- Real, F., Acosta, B., Deniz, S., Oros, J., Rodríguez, E., 1994. *Aeromonas salmonicida* infection in *Sparus aurata* in the Canaries. Bull Eur Assoc Fish Pathol.
- Reyes, E.R., Romo, C., Coria, R., Ortiz, M., Aquino, A., 2012. Mechanisms of O-antigen structural variation of bacterial lipopolysaccharide (LPS), in: The Complex World of Polysaccharides. InTech. doi:10.5772/48147
- Rigos, G., Katharios, P., 2010. Pathological obstacles of newly-introduced fish species in Mediterranean mariculture: A review. Rev Fish Biol Fish 20, 47–70. doi:10.1007/s11160-009-9120-7
- Ringø, E., Erik Olsen, R., Gonzalez Vecino, J.L., Wadsworth, S., 2011. Use of Immunostimulants and Nucleotides in Aquaculture: A Review. J Mar Sci Res Dev 02, 22 pp. doi:10.4172/2155-9910.1000104
- Rodger, H.D., 2016. Fish disease causing economic impact in global aquaculture, in: Adams, A. (Ed.), Fish Vaccines. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Springer, Basel.
- Rodgers, C.J., Furones, M.D., 1998. Disease problems in cultured marine fish in the Mediterranean. Fish Pathol 33, 157–164. doi:10.3147/jsfp.33.157
- Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., Lamy, B., 2012. Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. BMC Microbiol 12, 1–23. doi:10.1186/1471-2180-12-62
- Romalde, J.L., Ravelo, C., Lopez-Romalde, S., Avendano-Herrera, R., Magarinos, B., Toranzo, A.E., 2005. Vaccination strategies to prevent emerging diseases for Spanish aquaculture. Dev Biol (Basel) 121, 85–95.
- Romano, N., Rossi, F., Abelli, L., Caccia, E., Piergentili, R., Mastrolia, L., Randelli, E., Buonocore, F., 2007. Majority of TcRβ+ T-lymphocytes located in thymus and midgut of the bony fish, *Dicentrarchus labrax* (L.). Cell Tissue Res 329, 479–489. doi:10.1007/s00441-007-0429-z
- Romero, A., Saraceni, P.R., Merino, S., Figueras, A., Tomás, J.M., Novoa, B., 2016. The animal model determines the results of *Aeromonas* virulence factors. Front Microbiol 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01574
- Romero, J., Gloria, C., Navarrete, P., 2012. Antibiotics in aquaculture Use, abuse and alternatives. Heal Environ Aquac. doi:10.5772/28157

- Romstad, A.B., Reitan, L.J., Midtlyng, P., Gravningen, K., Evensen, Ø., 2013. Antibody responses correlate with antigen dose and in vivo protection for oil-adjuvanted, experimental furunculosis (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*) vaccines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and can be used for batch potency testing of vaccines. Vaccine 31, 791–796. doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.069
- Rosario, L.A., Arencibia, D.F., Suarez, Y.E., Infante, J.F., Valdés, B.Y., Batista, N., 2012. Cross-protection among unrelated *Leptospira* pathogens serovars: an unfinished story. Adv Clin Exp Med 21, 581–589.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4, 406–25. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Salati, F., Cubadda, C., Viale, I., Kusuda, R., 2005. Immune response of seabass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. Fish Sci 71, 563–567. doi:10.1111/j.1444-2906.2005.01000.x
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquaculture 116, 111–120. doi:10.1016/0044-8486(93)90002-G
- Scapigliati, G., Buonocore, F., Randelli, E., Casani, D., Meloni, S., Zarletti, G., Tiberi, M., Pietretti, D., Boschi, I., Manchado, M., Martin-Antonio, B., Jimenez-Cantizano, R., Bovo, G., Borghesan, F., Lorenzen, N., Einer-Jensen, K., Adams, S., Thompson, K., Alonso, C., Bejar, J., Cano, I., Borrego, J.J., Alvarez, M.C., 2010. Cellular and molecular immune responses of the seabass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus. Fish Shellfish Immunol 28, 303–311. doi:10.1016/j.fsi.2009.11.008
- Scarano, C., Piras, F., Virdis, S., Ziino, G., Nuvoloni, R., Dalmasso, A., De Santis, E.P.L., Spanu, C., 2018. Antibiotic resistance of *Aeromonas* ssp. strains isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture farms. Int J Food Microbiol 284, 91–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.033
- Schrøder, M.B., Ellingsen, T., Mikkelsen, H., Norderhus, E.A., Lund, V., 2009. Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum, Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. Fish Shellfish Immunol 27, 112–119. doi:10.1016/j.fsi.2008.11.016
- Schwenteit, J., Gram, L., Nielsen, K.F., Fridjonsson, O.H., Bornscheuer, U.T., Givskov, M., Gudmundsdottir, B.K., 2011. Quorum sensing in *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* and the effect of the autoinducer synthase Asal on bacterial virulence. Vet Microbiol 147, 389–397. doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.020
- Sechi, L.A., Deriu, A., Falchi, M.P., Fadda, G., Zanetti, S., 2002. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. J Appl Microbiol 92, 221–227.
- Shefat, S.H.T., 2018. Vaccines for infectious bacterial and viral diseases of fish. J Bacteriol Infect Dis 2, 1– 5.
- Silver, A.C., Williams, D., Faucher, J., Horneman, A.J., Gogarten, J.P., Graf, J., 2011. Complex evolutionary history of the *Aeromonas veronii* group revealed by host interaction and DNA sequence data. PLoS One 6, e16751. doi:10.1371/journal.pone.0016751
- Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V, Zdobnov, E.M., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. Bioinformatics 31, 3210–3212. doi:10.1093/bioinformatics/btv351
- Sinha, S., Shimada, T., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nair, G.B., 2004. Prevalence, serotype distribution, antibiotic susceptibility, and genetic profiles of mesophilic *Aeromonas* species isolated from hospitalized diarrhoeal cases in Kolkata, India. J Med Microbiol 53, 527–534. doi:10.1099/jmm.0.05269-0

- Smani, Y., Fabrega, A., Roca, I., Sańchez-Encinales, V., Vila, J., Pachón, J., 2014. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 58, 1806–1808. doi:10.1128/AAC.02101-13
- Smyrli, M., Prapas, A., Rigos, G., Kokkari, C., Pavlidis, M., Katharios, P., 2017. *Aeromonas veronii* infection associated with morbidity and mortality in farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Pathol 52, 68–81.
- Smyrli, M., Triga, A., Dourala, N., Varvarigos, P., Pavlidis, M., Quoc, V.H., Katharios, P., 2019. Comparative study on a novel pathogen of European seabass. Diversity of *Aeromonas veronii* in the Aegean Sea. Microorganisms 7, 504. doi:10.3390/microorganisms7110504
- Soler, L., Yáñez, M.A., Chacon, M.R., Aguilera-Arreola, M.G., Catalán, V., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. Int J Syst Evol Microbiol 54, 1511–1519.
- Soliman, W.S., Samira, S.R., 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 Sci J 4, 6–14.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P., 2005. Vaccines for fish in aquaculture. Expert Rev Vaccines 4, 89–101. doi:10.1586/14760584.4.1.89
- Song, M.-F., Kang, Y.-H., Zhang, D.-X., Chen, L., Bi, J.-F., Zhang, H.-P., Zhang, L., Qian, A.-D., Shan, X.-F., 2018. Immunogenicity of extracellular products from an inactivated vaccine against *Aeromonas veronii* TH0426 in koi, *Cyprinus carpio*. Fish Shellfish Immunol 81, 176–181. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.004
- Song, Y., Hu, X., Lue, A.J., Sun, J., Yiksung, Y., Pei, C., Zhang, C., Li, L., 2017. Isolation and characterization of *Aeromonas veronii* from ornamental fish species in China. undefined.
- Spinos, E., Kokkoris, G.D., Bakopoulos, V., 2017. Prevention of seabass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. Aquaculture 471, 172–184. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.01.017
- Sreedharan, K., Philip, R., Singh, I.S.B., 2013. Characterization and virulence potential of phenotypically diverse *Aeromonas veronii* isolates recovered from moribund freshwater ornamental fishes of Kerala, India. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol 103, 53–57. doi:10.1007/s10482-012-9786-z
- Sreedharan, K., Philip, R., Singh, I.S.B., 2011. Isolation and characterization of virulent Aeromonas veronii from ascitic fluid of oscar Astronotus ocellatus showing signs of infectious dropsy. Dis Aquat Organ 94, 29–39. doi:10.3354/dao02304
- STECF, 2018. Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) Economic Report of the EU Aquaculture sector (STECF-18-19). Publications Office of the European Union. Luxembourg. doi:10.2760/45076, JRC114801
- Stevenson, R.M.W., 1988. Vaccination against *Aeromonas hydrophila*. Fish Vaccin (Ed by Ellis AE), Acad Press New York, 112–123.
- Subasinghe, R.P., 2005. Epidemiological approach to aquatic animal health management: Opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. Prev Vet Med 67, 117–124.
- Sudheesh, P.S., Al-Ghabshi, A., Al-Mazrooei, N., Al-Habsi, S., 2012. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. Int J Evol Biol 2012, 1–16. doi:10.1155/2012/457264
- Sun, J., Zhang, X., Gao, X., Jiang, Q., Wen, Y., Lin, L., 2016. Characterization of virulence properties of Aeromonas veronii isolated from diseased gibel carp (Carassius gibelio). Int J Mol Sci 17, 496. doi:10.3390/ijms17040496

- Swain, P., Behera, T., Mohapatra, D., Nanda, P.K., Nayak, S.K., Meher, P.K., Das, B.K., 2010. Derivation of rough attenuated variants from smooth virulent *Aeromonas hydrophila* and their immunogenicity in fish. Vaccine 28, 4626–4631. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.078
- Takeuchi, H., Namba, A., Hori, K., Kashiwada, S., Mano, N., 2018. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with mortalities of riverine ayu *Plecoglossus altivelis* in the Tama river. Fish Pathol 53, 86–89.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 10, 512–26. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E.P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K.D., Borodovsky, M., Ostell, J., 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res. doi:10.1093/nar/gkw569
- Tekedar, H.C., Kumru, S., Blom, J., Perkins, A.D., Griffin, M.J., Abdelhamed, H., Karsi, A., Lawrence, M.L., 2019. Comparative genomics of *Aeromonas veronii*: Identification of a pathotype impacting aquaculture globally. PLoS One 14, e0221018–e0221018. doi:10.1371/journal.pone.0221018
- Thiéry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M., Schneemann, A., 2006. Induction of a protective immune response against Viral Nervous Necrosis in the European seabass *Dicentrarchus labrax* by using Betanodavirus Virus-like particles. J Virol 80, 10201–10207. doi:10.1128/jvi.01098-06
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22, 4673–4680. doi:10.1093/nar/22.22.4673
- Tian, J.-X., Kang, Y.-H., Chu, G.-S., Liu, H.-J., Kong, Y.-D., Zhao, L.-H., Kong, Y.-X., Shan, X.-F., Wang, G.-Q., 2019. Oral Administration of *Lactobacillus casei* expressing flagellin A protein confers effective protection against *Aeromonas veronii* in common carp, *Cyprinus carpio*. Int J Mol Sci 21, 33. doi:10.3390/ijms21010033
- Tomás, J.M., 2012. The main *Aeromonas* pathogenic factors. ISRN Microbiol 2012, 1–22. doi:10.5402/2012/256261
- Topic Popovic, N., Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., 2007. Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: A review. Vet Med (Praha) 52, 49–53. doi:10.17221/2058-VETMED
- Toranzo, A.E., Magariños, B., Romalde, J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. Aquaculture 246, 37–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.01.002
- Toranzo, A.E., Novoa, B., Romalde, J.L., Núñez, S., Devesa, S., Mariño, E., Silva, R., Martínez, E., Figueras, A., Barja, J.L., 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. Aquaculture 114, 189–202. doi:10.1016/0044-8486(93)90295-A
- Tort, L., 2011. Stress and immune modulation in fish. Dev Comp Immunol 35, 1366–1375. doi:https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002
- Tsirigos, K.D., Elofsson, A., Bagos, P.G., 2016. PRED-TMBB2: improved topology prediction and detection of beta-barrel outer membrane proteins. Bioinformatics 32, i665–i671. doi:10.1093/bioinformatics/btw444
- Tsirigos, K.D., Peters, C., Shu, N., Kall, L., Elofsson, A., 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. Nucleic Acids Res 43, W401-7. doi:10.1093/nar/gkv485
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. Vet Med (Praha) 56, 486–503. doi:10.17221/3294-VETMED

- Uzun, E., Ogut, H., 2015. The isolation frequency of bacterial pathogens from seabass (*Dicentrarchus labrax*) in the southeastern Black Sea. Aquaculture 437, 30–37. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.11.017
- Valero, Y., Mokrani, D., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Oumouna, M., Meseguer, J., Esteban, M.Á., Cuesta, A., 2018. Vaccination with UV-inactivated nodavirus partly protects European seabass against infection, while inducing few changes in immunity. Dev Comp Immunol 86, 171–179. doi:https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.013
- Vávrová, A., Balážová, T., Sedláček, I., Tvrzová, L., Šedo, O., 2015. Evaluation of the MALDI-TOF MS profiling for identification of newly described *Aeromonas* spp. Folia Microbiol (Praha) 60, 375–383. doi:10.1007/s12223-014-0369-4
- Vazquez-Juarez, R.C., Gomez-Chiarri, M., Barrera-Saldaña, H., Hernandez-Saavedra, N., Dumas, S., Ascencio, F., 2005. Evaluation of DNA vaccination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) with two major outer-membrane protein-encoding genes from *Aeromonas veronii*. Fish Shellfish Immunol 19. doi:10.1016/j.fsi.2004.12.007
- Vega-Sánchez, V., Latif-Eugenín, F., Soriano-Vargas, E., Beaz-Hidalgo, R., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, M.G., Castro-Escarpulli, G., 2014. Re-identification of *Aeromonas* isolates from rainbow trout and incidence of class 1 integron and β-lactamase genes. Vet Microbiol 172, 528–533. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.012
- Vendramin, N., Zrncic, S., Padrós, F., Oraic, D., Le Breton, A., Zarza, C., Olesen, N.J., 2016. Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes, and future challenges. Bull Eur Assoc Fish Pathol 36, 38–45.
- Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D.G., Cerrano, C., 2010. *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. Environ Microbiol 12, 2007–2019. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02209.x
- Viale, I., Cubadda, C., Angelucci, G., Salati, F., 2006. Immunization of European seabass, *Dicentrarchus labrax* L. 1758, Fingerlings with a commercial vaccine against vibriosis. J Appl Aquac 18, 53–67. doi:10.1300/j028v18n03_04
- Wang, H., Ayala, J.C., Silva, A.J., Benitez, J.A., 2012. The histone-like nucleoid structuring protein (H-NS) Is a repressor of *Vibrio cholerae* exopolysaccharide biosynthesis (vps) genes. Appl Environ Microbiol. doi:10.1128/AEM.07629-11
- Wang, H., Qiao, Y., Chai, B., Qiu, C., Chen, X., 2015. Identification and molecular characterization of the homogentisate pathway responsible for pyomelanin production, the major melanin constituents in *Aeromonas media* WS. PLoS One 10, e0120923. doi:10.1371/journal.pone.0120923
- Wang, L., Wang, Q., Reeves, P.R., 2010. The variation of O antigens in gram-negative bacteria. Subcell Biochem 53, 123–152. doi:10.1007/978-90-481-9078-2_6
- Wang, S., Yan, Q., Zhang, Meimei, Huang, L., Mao, L., Zhang, Mengmeng, Xu, X., Chen, L., Qin, Y., 2019.
 The role and mechanism of icmF in *Aeromonas hydrophila* survival in fish macrophages. J Fish Dis 42, 895–904. doi:https://doi.org/10.1111/jfd.12991
- Wang, W., Liu, J., Guo, S., Liu, L., Yuan, Q., Guo, L., Pan, S., 2021. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* spp. specific outer membrane proteins by reverse vaccinology and surface proteome. Front Microbiol.
- Wilson-Welder, J.H., Torres, M.P., Kipper, M.J., Mallapragada, S.K., Wannemuehler, M.J., Narasimhan, B.,
 Wilson-Welder, J.H., Torres, M.P., Kipper, M.J., Mallapragada, S.K., Wannemuehler, M.J.,
 Narasimhan, B., 2009. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. J Pharm Sci 98, 1278–1316. doi:10.1002/jps.21523

- Xu, C., Wang, S., Zhaoxia, Z., Peng, X., 2005. Immunogenic cross-reaction among outer membrane proteins of Gram-negative bacteria. Int Immunopharmacol 5, 1151–1163. doi:10.1016/j.intimp.2005.02.008
- Yadav, S.K., Meena, J.K., Sharma, M., Dixit, A., 2016. Recombinant outer membrane protein C of *Aeromonas hydrophila* elicits mixed immune response and generates agglutinating antibodies. Immunol Res 64, 1087–1099. doi:10.1007/s12026-016-8807-9
- Yanez, M.A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M.J., Martínez-Murcia, A.J., 2003. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on gyrB gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 53, 875– 883. doi:10.1099/ijs.0.02443-0
- Yang, D., Liu, Q., Ni, C., Li, S., Wu, H., Wang, Q., Xiao, J., Zhang, Y., 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. Dev Comp Immunol 40, 132–141. doi:10.1016/j.dci.2013.01.014
- Yang, Q., Zhao, M., Wang, K.Y., Wang, J., He, Y., Wang, E.L., Liu, T., Chen, D.F., Lai, W., 2017. Multidrugresistant *Aeromonas veronii* recovered from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China: Prevalence and mechanisms of fluoroquinolone resistance. Microb Drug Resist 23, 473–479. doi:10.1089/mdr.2015.0296
- Yardımcı, E.R., Timur, G., 2015. Isolation and identification of *Tenacibaculum maritimum*, the causative agent of tenacibaculosis in farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) on the Aegean Sea coast of Turkey. Isr J Aquac Bamidgeh 67, 10.
- Yiagnisis, M., Athanassopoulou, F., 2012. Bacteria isolated from diseased wild and farmed marine fish in Greece, recent advances in fish farms. INTECH Open Access Publisher. doi:10.5772/27674
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., Dao, P., Sahinalp, S.C., Ester, M., Foster, L.J., Brinkman, F.S.L., 2010. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. Bioinformatics 26, 1608–1615. doi:10.1093/bioinformatics/btq249
- Zhang, D.-X., Kang, Y.-H., Chen, L., Siddiqui, S.A., Wang, C.-F., Qian, A.-D., Shan, X.-F., 2018. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing OmpAI confers protection against *Aeromonas veronii* challenge in common carp, *Cyprinus carpio*. Fish Shellfish Immunol 72, 552–563. doi:10.1016/j.fsi.2017.10.043
- Zhang, H., Chen, M., Xu, Y., Xu, G., Chen, J., Wang, Y., Kang, Y., Shan, X., Kong, L., Ma, H., 2020. An effective live attenuated vaccine against *Aeromonas veronii* infection in the loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). Fish Shellfish Immunol 104, 269–278. doi:https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.027
- Zhang, L., Li, Z., Li, Y., Tian, J., Jia, K., Zhang, D., Song, M., Abbas Raza, S.H., Garcia, M., Kang, Y., Zheng, W., Qian, A., Shan, X., Xu, Y., 2019. OmpW expressed by recombinant *Lactobacillus casei* elicits protective immunity against *Aeromonas veronii* in common carp. Microb Pathog 133, 103552. doi:https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103552
- Zhang, Y.L., Arakawa, E., Leung, K.Y., 2002. Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in Oantigen and capsule biosynthesis. Infect Immun 70, 2326–2335. doi:10.1128/IAI.70.5.2326-2335.2002
- Zhou, Q.L., Wang, Y.J., Xie, J., Ge, X.P., Xi, B.W., Liu, B., 2013. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment. Polish J Microbiol 62, 299–302. doi:10.33073/pjm-2013-039
- Zhu, M., Wang, X.R., Li, J., Li, G.Y., Liu, Z.P., Mo, Z.L., 2015. Identification and virulence properties of Aeromonas veronii bv. sobria isolates causing an ulcerative syndrome of loach Misgurnus anguillicaudatus. J Fish Dis 39, 777–781. doi:10.1111/jfd.12413

- Ziklo, N., Colorni, A., Gao, L.-Y., Du, S.J., Ucko, M., 2018. Humoral and cellular immune response of European seabass *Dicentrarchus labrax* vaccinated with heat-killed *Mycobacterium marinum* (iipA::kan mutant). J Aquat Anim Health 30, 312–324. doi:10.1002/aah.10042
- Zimin, A. V., Marçais, G., Puiu, D., Roberts, M., Salzberg, S.L., Yorke, J.A., 2013. The MaSuRCA genome assembler. Bioinformatics 29, 2669–2677. doi:10.1093/bioinformatics/btt476
- Zorrilla, I., Chabrillón, M., Balebona, M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Moriñigo, M., 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. Aquaculture 218, 11–20. doi:10.1016/s0044-8486(02)00309-5
- Σμυρλή, Μ., 2014. Ανάπτυξη πειραματικού αυτεμβολίου έναντι παθογόνων βακτηρίων σε εκτρεφόμενα λαβράκια (Dicentrarchus labrax).