



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΗΣ ΘΑΛΑΣΣΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*"Σύγκριση αποτελεσματικότητας διδύναμου εμπορικού και πειραματικών εμβολίων κατά της δονακίωσης και φωτοβακτηριδίασης στη τσιπούρα *Sparus aurata* (L.): διερεύνηση της ανοσολογικής αντίδρασης με τις μεθόδους *ELISA* και *Western Blot*"*



ΚΟΣΜΑ ΙΩΑΝΝΑ

Επιβλέπων

Επίκουρος Καθηγητής Βασίλειος Μπακόπουλος
Μυτιλήνη 2016

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract	4
1.Εισαγωγή	6
1.1. ΔΟΝΑΚΙΩΣΗ - <i>VIBRIO ANQUILLARUM</i>	6
1.2. ΦΩΤΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗ - <i>PHOTOBACTERIUM DAMSELA</i> SUBSP. <i>PISCICIDA</i>	10
Εμπορικά σκευάσματα εμβολίων	13
1.3 Μέθοδοι που χρησιμοποιούν ανοσολογικούς δείκτες για ποιοτικές αι ποσοτικές μελέτες αντιγόνων.	14
Η μέθοδος ELISA.....	14
Μέθοδος Western blot.....	14
1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	15
2.Υλικά και μέθοδοι	15
2.1. Δεξαμενές και ενυδρεία	15
2.2. Φυσικομετρικές παράμετροι	15
2.3. Ψάρια - Τροφή.....	16
2.4. Βακτήρια.....	16
2.5. Εμβόλια	16
2.6. Εμβολιασμοί.....	17
2.7. Πειραματική μόλυνση	17
2.8. Έλεγχος προστασίας: Υπολογισμός του RPS (Relative Percent Survival-Σχετικό Ποσοστό Επιβίωσης)	18
2.9. Συλλογή και επεξεργασία αίματος ψαριών για την απομόνωση ορού.....	18
2.10. Έλεγχος των χυμικών ανοσολογικών παραμέτρων	18
2.10.1. Διαδικασία ELISA	18
2.10.2. Διαδικασία Western Blot	19
2.11. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	20
3.Αποτελέσματα.....	20
3.1. Αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων.....	20
3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης ELISA	23
3.2.1. Ανάλυση δειγμάτων ορού στις ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν με εμβόλια που περιείχαν αντιγόνα του <i>V. anquillarum</i>	23
3.2.1.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R	24
3.2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΑΝ ΜΕ <i>VIBRIO ANQUILLARUM</i>	26
3.2.2.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R	27

3.2.3 Ανάλυση δειγμάτων ορού κατά τη διάρκεια του πειράματος στα εμβολιασμένα ψάρια έναντι του Phdp	28
3.2.3.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R	29
3.2.4. Ανάλυση δειγμάτων ορού εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με Phdp.....	32
3.2.4.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R	33
3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot.....	35
3.3.1. Σύγκριση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με τις μεμβράνες Western Blot για το <i>Vibrio anguillarum</i> και το Phdp. Καθορισμός της φύσης των αντιγόνων που υπάρχει αντίδραση.....	35
3.3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού κατά τη διάρκεια του πειράματος στις ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν έναντι του <i>Vibrio anguillarum</i>	37
3.3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με <i>Vibrio anguillarum</i> κατά τη διάρκεια του πειράματος	41
3.3.4.Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού κατά τη διάρκεια του πειράματος στις ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν έναντι του Phdp	43
3.3.5. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με το Phdp κατά τη διάρκεια του πειράματος	47
3.4. Εξωτερικά ευρήματα και ανατομία ψαριών	50
4.Συζήτηση	51
5.Συμπεράσματα	56
Παράρτημα 1	57
Παράρτημα 2	59
Παράρτημα 3	60
Βιβλιογραφία.....	63

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επόπτη μου Επίκουρο Καθηγητή Βασίλειο Μπακόπουλο για το θέμα που μου πρότεινε και την πολύτιμη βοήθειά του.

Τη φίλη μου Ευμορφία (Εβίτα) Λασπά για την ανεκτίμητη συμπαράσταση και τη βοήθειά της τους μήνες που δουλεύαμε μαζί στα πειράματα και το εργαστήριο. Επίσης, την Ευαγγελία Σμέτη για τη πολύτιμη βοήθειά της στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδελφό μου Μιχάλη και τους γονείς μου Μαρία και Θανάση, για τα πολλά χρόνια υπομονής κατά την διάρκεια τόσο της μαθητικής όσο και της φοιτητικής μου ζωής. Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη σε όλους αυτούς που άντεξαν την γκρίνια μου και με σήκωναν όταν 'έπεφτα'.

Περίληψη

Η φωτοβακτηριδίαση και η δονακίωση είναι δύο σημαντικές σηψιαμικές νόσοι των ψαριών που προκαλούνται από τα βακτήρια *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (εν συντομία Phdp, προηγουμένως *Pasteurella piscicida*) και *Vibrio anguillarum* (διάφοροι ορότυποι), αντίστοιχα. Προσβάλλουν σχεδόν όλα τα ευρύαλα εκτρεφόμενα και άγρια ψάρια με τη σοβαρότητα της εκδήλωσης των ασθενειών να εξαρτάται και από το είδος του ψαριού.

Η πρόληψη των ασθενειών αυτών γίνεται, εκτός των διαχειριστικών μέτρων, με εμβολιασμό χρησιμοποιώντας διαθέσιμα εμπορικά εμβόλια.

Η μελέτη αυτή έγινε με σκοπό τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας ενός εμπορικού και δύο πειραματικών εμβολίων κατά της φωτοβακτηριδίασης και της δονακίωσης, καθώς και την διερεύνηση της ανοσολογικής αντίδρασης ποσοτικά, με την μέθοδο ανάλυσης ELISA και ποιοτικά με Western Blot.

Τα εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Alpha Ject 2000 (AJ) και το Aqua Vac *Vibrio Pasteurella* (AV). Και τα δύο είναι διδύναμα εμβόλια ως προς τα είδη βακτηρίων που περιέχουν (το Aqua Vac *Vibrio Pasteurella* τριδύναμο γιατί περιέχει δύο ορότυπους του *V. anguillarum*) και περιέχουν αδρανοποιημένες καλλιέργειες του βακτηρίου *V. anguillarum* (ορότυπος O1 ή/και O2) και του Phdp. Τα πειραματικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν είχαν ως εξής: το ένα (Eph) ήταν μονοδύναμο και περιείχε αδρανοποιημένες με φορμόλη καλλιέργειες μόνο του Phdp. Το δεύτερο (Envir) ήταν διδύναμο και περιείχε αδρανοποιημένες με φορμόλη καλλιέργειες των βακτηρίων *V. anguillarum* (ορότυπος O1) και Phdp. Στη παρούσα πτυχιακή θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων και της ποσοτικής ανάλυσης των ορών μόνο για το εμπορικό εμβόλιο AV και των πειραματικών εμβολίων Envir & Eph (καθώς το εμπορικό εμβόλιο AJ αποτέλεσε αντικείμενο άλλης πτυχιακής εργασίας) και τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης όλων των ορών που συλλέχθηκαν από όλες τις πειραματικές ομάδες.

Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων μελετήθηκε με πειραματικές μολύνσεις που έγιναν δύο μήνες μετά τον εμβολιασμό. Η πρώτη πειραματική μόλυνση με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση έγινε με το βακτήριο *V. anguillarum* και η δεύτερη έγινε την ίδια περίοδο με το Phdp. Το σχετικό ποσοστό επιβίωσης (RPS), όσον αφορά τη μόλυνση με το *V. anguillarum*, ήταν μεγάλο σε όλα τα εμβόλια, με το AV να επιτυγχάνει ποσοστό 92% και το Envir ποσοστό 100%. Αντιθέτως, στη μόλυνση με το Phdp, τα ποσοστά επιβίωσης δεν ήταν ικανοποιητικά. Το AV έδωσε αρνητικό ποσοστό, ενώ τα Eph και Envir 0%, αφού η θνησιμότητα ήταν ίδια ακριβώς με τα ψάρια μάρτυρες.

Κατά τη διάρκεια ολόκληρου του πειράματος συλλέχθηκε αίμα από όλες τις ομάδες των εμβολιασμένων και εμβολιασμένων/μολυσμένων ψαριών και απομονώθηκε ο ορός. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντισωμάτων έγινε με την ένζυμο-συνδεδεμένη ανοσοπροσοροφητική δοκιμασία (ELISA). Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του εργαλείου στατιστικών υπολογισμών R μέσω εκτίμησης Karlain – Meier και με χρήση των τεστ ANOVA και LSD.

Στα εμβολιασμένα ψάρια με το *V. anguillarum*, τα εμβόλια AV και Envir προκάλεσαν τη παραγωγή τίτλων αντισωμάτων στα ίδια περίπου επίπεδα. Το ίδιο παρατηρήθηκε, στα εμβολιασμένα και κατόπιν μολυσμένα ψάρια με *V. anguillarum* για το κάθε εμβόλιο. Τα ψάρια μάρτυρες, όπως ήταν αναμενόμενο, είχαν τις χαμηλότερες τιμές τίτλων αντισωμάτων. Σημαντικά υψηλότερη στατιστική διαφορά στους τίτλους αντισωμάτων, μετρήθηκε για τις εμβολιασμένες ομάδες ψαριών που κατόπιν μολύνθηκαν σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ομάδες των απλά εμβολιασμένων ψαριών.

Αντίστοιχο μοτίβο παρατηρήθηκε και στα αποτελέσματα με το Phdp. Τα εμβόλια AV, Envir και Eph προκάλεσαν τίτλους αντισωμάτων περίπου στα ίδια επίπεδα. Στα εμβολιασμένα και κατόπιν μολυσμένα με Phdp ψάρια οι μάρτυρες είχαν τις χαμηλότερες τιμές τίτλων αντισωμάτων. Όπως και στην ανάλυση με το *V. anguillarum*, οι εμβολιασμένες ομάδες ψαριών που στη συνέχεια μολύνθηκαν με το Phdp, είχαν σημαντικά υψηλότερη στατιστική διαφορά στους τίτλους αντισωμάτων που μετρήθηκαν σε σχέση με τις αντίστοιχες απλά εμβολιασμένες ομάδες, με εξαίρεση την ομάδα εμβολίου Envir, όπου δεν διαπιστώθηκε στατιστική διαφορά. Οι αυξημένοι τίτλοι αντισωμάτων μετά την πειραματική μόλυνση πιθανά να συνδέονται με την ανάπτυξη ανοσολογικής μνήμης.

Η ποιοτική ανάλυση των αντισωμάτων έγινε με την ανοσοχημική μέθοδο Western Blot. Στα εμβολιασμένα ψάρια με το *V. anguillarum*, παρατηρήθηκε αντίδραση με αντιγόνα του βακτηριακού

κυττάρου με, κατά πάσα πιθανότητα, φυσικά αντισώματα που υπάρχουν στον ορό των ψαριών. Αυτό παρατηρήθηκε σε όλες τις δοκιμές WB και εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι αντιδράσεις ήταν ίδιες τόσο στα εμβολιασμένα όσο και στα ψάρια μάρτυρες, εύρημα που συνηγορεί με την ύπαρξη φυσικών αντισωμάτων ή με την επαφή των ψαριών με τον μικροοργανισμό, επιπλέον των εμβολιασμών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε έντονη αντίδραση με αντιγόνα λιποπολισακχαριδικής φύσης στο μοριακό βάρος των 54kD, με αμέσως επόμενο το μοριακό βάρος λίγο πιο πάνω από τα 15 kD. Στα εμβολιασμένα ψάρια παρατηρήθηκαν σε γενικές γραμμές ομοιόμορφες αντιδράσεις για όλες τις εμβολιακές ομάδες, αλλά και για τα ψάρια μάρτυρες, όμως το διδύναμο πειραματικό εμβόλιο EVIP στις ημέρες 65 και 72 ξεχωρίζει επειδή δίνει πιο αδύναμες αντιδράσεις σε συγκεκριμένα μοριακά βάρη (54-41kD, 27.5kD και 20.7kD) από τις υπόλοιπες ομάδες. Το ίδιο παρατηρείται και για την ομάδα των μαρτύρων αλλά και για το εμπορικό εμβόλιο AJ για την ημέρα 87 στο μοριακό βάρος 27.5kD. Στα εμβολιασμένα και κατόπιν μολυσμένα ψάρια με *V. anguillarum* παρατηρήθηκαν παρόμοιες αντιδράσεις με αυτές των εμβολιασμένων στις πρώτες μέρες της μόλυνσης, ενώ προς το τέλος του πειράματος υπήρξε διαφοροποίηση στα δύο εμπορικά εμβόλια. Συγκεκριμένα, για το εύρος ημερών 8-12 υπάρχει κλιμακωτή αύξηση της αντίδρασης των αντισωμάτων για το μοριακό βάρος λίγο πιο πάνω από 15kD και μεμονωμένες αντιδράσεις των εμβολίων AJ και AV για τα μοριακά βάρη 41kD – 27.5kD.

Στην ανάλυση Western Blot για τα εμβολιασμένα ψάρια με το Phdp υπήρξε πολύ έντονη αντίδραση αντιγόνων των βακτηριακών κυττάρων με φυσικά αντισώματα και σε αυτές τις αναλύσεις σε διαφορετικά όμως μοριακά βάρη σε σύγκριση με το προηγούμενο βακτήριο. Αξιοσημείωτη είναι η εικόνα που παρουσιάζει το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject 2000, όπου δίνει ξεχωριστές (σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εμβόλια) αντιδράσεις, κατά μήκος όλης της στήλης στις μεμβράνες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το ανοσοενισχυτικό που περιλαμβάνεται στο εμβόλιο δρα κατά επωφελή τρόπο προς την παραγωγή αυξημένων επιπέδων αντισωμάτων και αντισωμάτων έναντι περισσότερων αντιγόνων του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, υπήρξε έντονη αντίδραση με αντιγόνα λιποπολισακχαριδικής φύσης στα μοριακά βάρη 20.7-15kD. Το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject έδινε ξεχωριστές αντιδράσεις σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εμβολιακές ομάδες με εντονότερη να είναι αυτή στα 6.4kD. Αντιδράσεις παρατηρήθηκαν επίσης στα μοριακά βάρη 193-102kD (αντιγόνα λιποπολισακχαριδικής φύσης), 102-54kD και 27.5kD. Στα εμβολιασμένα και κατόπιν μολυσμένα ψάρια με Phdp υπήρξε παρόμοια εικόνα με αυτή των εμβολιασμένων. Αντιδράσεις δίνει και το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject 2000 ακολουθώντας μία φθίνουσα πορεία μέχρι το τέλος του πειράματος. Το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject έδωσε ξεχωριστές αντιδράσεις σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εμβολιακές ομάδες με πιο αξιοπρόσεκτη να είναι αυτή στα 6.4kD. Αχνές αντιδράσεις παρατηρούνται και στα μοριακά βάρη ανάμεσα σε 193-102kD (αντιγόνα λιποπολισακχαριδικής φύσης), 102-54kD και 27.5kD.

Η ύπαρξη και λειτουργία των φυσικών αντισωμάτων, έγινε εμφανής στην ανάλυση των δειγμάτων. Τα φυσικά αντισώματα έχουν την δυνατότητα να προσκολλώνται σε συγκεκριμένα αντιγόνα ή παθογόνα, ακόμα και αν ο ξενιστής δεν έχει εκτεθεί ποτέ σε περιβάλλον που να υπάρχει ο μικροοργανισμός.

Λέξεις κλειδιά: φωτοβακτηριδίαση, δονακίωση, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, εμβολιασμός ψαριών, ανοσολογική διερεύνηση, ανοσολογική μνήμη, μέθοδος ELISA, Alpha Ject 2000, Aqua Vac *Vibrio Pasteurella*, Western Blot, φυσικά αντισώματα.

Abstract

Photobacteriosis and vibriosis are two important septicemic fish diseases that are caused from the bacteria *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (formerly known *Pasteurella piscicida*) and *Vibrio anguillarum* (different serotypes), respectively. These bacteria infect almost all euryhaline farmed and wild fish and the seriousness of the outbreaks depend also on the fish species affected.

Prevention of the disease is carried out through application of hygiene measures and through vaccination with commercial vaccines.

The aim of this project was the comparison of the efficacy of one commercial and two experimental vaccines administered by intraperitoneal injection in preventing photobacteriosis and vibriosis in sea bream. In addition, to analyse the immune response elicited by these vaccines through measurement of specific antibody titres using ELISA techniques and detection of specific proteins through the Western Blot technique.

The commercial vaccines used were Alpha Ject 2000 (AJ) and Aquavac *Vibrio Pasteurella* (AV). Both of them are bivalent and contain inactivated cultures of *V.anguillarum* (serotypes O1 and O2) and Phdp (the Aquavac *Vibrio Pasteurella* vaccine is trivalent because it contains two serotypes of *V.anguillarum*). The experimental vaccines used were: the first (Eph) was monovalent, contained only inactivated cultures of Phdp. The second one (Evip) was bivalent, contained inactivated cultures of *V.anguillarum* (serotype O1) and Phdp. In this thesis, results of experimental infections will be presented and quantitative analysis only of the serum from the commercial vaccine AV and experimental vaccines Evip & Eph and the results of the qualitative analysis of all sera collected from all experimental groups.

Fish were experimentally infected by intraperitoneal injection two months after vaccination. During the experiment blood was collected from all the fish groups, vaccinated and infected, and the serum was isolated.

Quantitative determination of specific antibody titres was performed by an enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELISA). The results were analyzed with the statistical program R through the Kaplan – Meier estimate with the ANOVA and LSD tests.

In vaccinated fish, the AV and Evip vaccines had values at the same lower levels. In addition, at the vaccinated and infected fish with *V.anguillarum* AV and Evip vaccines were at the same but lower levels. Control fish had the lowest values of antibody titres. Also, significantly higher statistical significance had vaccinated and infected fish groups compared to the corresponding groups of only vaccinated fish.

The same pattern was seen also against Phdp. Vaccines AV, Evip, Eph were in the same lower level and controls had the lowest reaction values. Conversely, as the analysis with *V.anguillarum*, the vaccinated and infected with Phdp groups, had significantly higher statistical difference with just vaccinated groups, except the group of vaccine Evip.

Increased antibody titers after experimental infection are associated with the development of immunological memory. Immunological memory is considered a very important part of the immune response.

Qualitative determination of the proteins of the antibodies was performed by the biochemical Western Blot technique.

In vaccinated fish for the pathogen *V.anguillarum* there is a clear reaction of natural antigens that react with the antibodies present in the fish serum. This is observed in all the membranes and it is surprising that these reactions are the same both in the vaccinated groups as well as the control fish. More specifically there is a strong reaction of lipopolysaccharide nature at the molecular weight of 54 kD, with the next molecular weight slightly above 15 kD. The vaccinated fish showed similar responses with the rest vaccinal groups and with the control fish as well, but the bivalent EVIP experimental vaccine on days 65 and 72 stands out because it gives weaker reactions to specific molecular weight (54-41 kD, 27.5 kD and 20.7 kD) from the remaining groups. The same is observed for the control group and the commercial AJ vaccine on day 87 in the molecular weight of 27.5 kD. Vaccinated and infected fish with *V.anguillarum* showed a similar reaction at the early days of infection to that of only vaccinated fish, while towards the end of the experiment there were changes in the reaction of the commercial vaccines. More specifically, for the timeline of days 8-12 there is a steady increase of antibody response for the molecular weight slightly above 15 kD and individual vaccine reactions of the commercial vaccines AJinf D8, AVinf D12 and AJinf D12 for the molecular weights of 41 kD - 27.5 kD.

Western Blot analyses of the vaccinated fish for the pathogen Phdp showed a similar pattern with strong reactions of natural antigens that react with the antibodies present in the fish serum, but at different molecular weights compared to the previous bacterium. Noteworthy is the reactions that the

commercial vaccine Alpha Ject 2000 gives, which is individual (as compared to the other vaccines) reactions, all along the column in the membranes. This might be due to the fact that the immunostimulant that is present in the vaccine acts beneficially to the production of increased antibody titres. There is a strong reaction of lipopolysaccharide nature at the molecular weights 20.7-15 kD. The commercial vaccine Alpha Ject gave separate reactions compared to other vaccinal groups, with the strongest at 6.4 kD. Other observable reactions are in molecular weights 193-102 kD (lipopolysaccharide nature), 102-54 kD and 27.5 kD. Vaccinated and infected fish with Phdp followed a similar pattern to that of only vaccinated fish, with commercial vaccine Alpha Ject 2000 showing a declined reaction until the end of the experiment. The commercial vaccine Alpha Ject gave separate reactions compared with other vaccinal groups most notable being that at 6.4 kD. Faint bands observed in molecular weights between 193-102 kD (lipopolysaccharide nature), 102-54 kD and 27.5 kD.

The existence and function of natural antibodies, it apparent in the analysis of samples. Natural antibodies have the ability to bind with specific antigens or pathogens, even if the host has never been exposed to the environment which contains the microorganism.

Keywords: photobacteriosis, vibriosis, *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, fish vaccination, immunological investigation, immunological memory, ELISA method, Alpha Ject 2000, Aqua Vac *Vibrio Pasteurella*, Western Blot, natural antibodies.

1.Εισαγωγή

Οι ασθένειες των ψαριών βρέθηκαν στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος και ώθησαν στη δημιουργία ενός ολόκληρου εξειδικευμένου κλάδου της κτηνιατρικής, όταν ξεκίνησε να εφαρμόζεται η ιχθυοκαλλιέργεια, αρχικά με τη μορφή εκτατικής εκτροφής σε υδατοσυλλογές του γλυκού νερού και σε λιμνοθάλασσες, κατόπιν με την καλλιέργεια σολομοειδών και αργότερα με τη μορφή πιο εντατικών μορφών εκτροφής. Τότε διαπιστώθηκε και μελετήθηκε όλο το εύρος των αιτιών που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες στα ψάρια, οι οποίες μπορούν να οφείλονται και σε αβιοτικούς αλλά και βιοτικούς παράγοντες (Μπακόπουλος, 2010).

Η δονακίωση οφείλεται σε βακτήρια του γένους *Vibrio*. Για όλα τα περιστατικά των ασθενειών στα ψάρια που οφείλονταν σε *Vibrio*, η ασθένεια αποδιδόταν στο είδος *Vibrio anguillarum* (μετονομασία σε *Listonella anguillarum*) και είχαν αναφερθεί 10 ορότυποι. Ο ορότυπος που συνηθέστερα απομονώνονταν στα Μεσογειακά εκτρεφόμενα είδη ήταν ο ορότυπος O1. Ο ορότυπος O3 εμφανιζόταν σε νύμφες λαβρακιού.

Στοιχεία τελευταίων ετών δείχνουν ότι όλο και περισσότερα νέα είδη *Vibrio* προκαλούν δονακίωση στα ευρύαλα ψάρια. Σε αυτά τα είδη συμπεριλαμβάνονται τα *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. vulnificus* και άλλα (Μπακόπουλος, 2010).

Η φωτοβακτηριδίαση των ψαριών (περισσότερο γνωστή ως παστερέλλωση ή παστεριδίαση), αποδίδεται στο βακτήριο *Photobacterium damsela subspecies piscicida* (Phdp εν συντομία) και έχει περιγραφεί στην περιοχή της Μεσογείου για περισσότερο από δύο δεκαετίες.

Η ασθένεια, αν παρατηρηθεί μια φορά σε μια περιοχή, γίνεται ενδημική με δύσκολη έως αδύνατη την εξάλειψή της και επανεμφανίζεται κάθε φορά που οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευνοούν το παθογόνο. Η συνεχώς αυξανόμενη εντατικοποίηση των θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών (όσον αφορά τις τεχνικές καθώς και τα είδη των ψαριών) χωρίς αμφιβολία θα διατηρήσει την ασθένεια με επαναλαμβανόμενα κρούσματα τα οποία οδηγούν σε σημαντικές οικονομικές απώλειες.

Παρακάτω γίνεται αναλυτική περιγραφή αυτών των δύο βακτηριακών ασθενειών των ψαριών.

1.1. ΔΟΝΑΚΙΩΣΗ - *VIBRIO ANQUILLARUM*

Το 1893, ο Canestrini ανέφερε μία επιδημική ασθένεια στο μεταναστευτικό χέλι, *Anquilla anquilla* (L.), η οποία χρονολογείται από το 1817 και έγκειται στο παθογόνο βακτήριο, γνωστό τότε ως *Bacterium anquillarum* (Canestrini 1893). Μερικά χρόνια αργότερα, ο Bergman πρότεινε την

ονομασία *Vibrio anguillarum* για τον αιτιολογικό παράγοντα του «κόκκινου παράσιτου στα χέλια» στην Βαλτική Θάλασσα (Bergman 1909). Λόγω της μεγάλης ομοιότητας των κλινικών συμπτωμάτων και χαρακτηριστικών του παθογόνου βακτηρίου, που περιγράφηκε και στις δύο περιπτώσεις, προτάθηκε ότι οφείλεται στον ίδιο παθογόνο παράγοντα.

Το *Vibrio anguillarum* είναι κινητό, κατά Gram αρνητικό (-), με την μορφή δονακίου, μεσόφιλο, χημοοργανότροφο και προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο (Μπακόπουλος, 2010), το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Vibrionaceae*. Διαθέτει μαστίγιο στους πόλους (για την κίνησή του), είναι αλόφιλο (επιβιώνει σε υψηλή αλατότητα) και δεν σχηματίζει σπόρια (Madigan, Martinko & Parker 2000; Buller 2004). Το βακτήριο αναπτύσσεται ταχύτατα σε θερμοκρασία μεταξύ 25-30°C σε εμπλουτισμένα μέσα καλλιέργειας που περιέχουν 1,5-2% NaCl και σχηματίζει στρογγυλού σχήματος αποικίες με κρεμώδες χρώμα.

Θερμοκρασία εκδήλωσης της νόσου

Η νόσος εμφανίζεται ιδιαίτερα κατά την διάρκεια του φθινοπώρου και της άνοιξης, όταν η θερμοκρασία του νερού μεταβάλλεται από τους 20 στους 15°C και αντίστροφα. Τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα, η νόσος εμφανίζεται και κατά την διάρκεια του χειμώνα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 15°C (Μπακόπουλος 2010).



Εικόνα 1.1.1.: Απεικόνιση του παθογόνου βακτηρίου *Vibrio anguillarum* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση 10000x). Διακριτό είναι και το μαστίγιο στον πόλο του βακτηρίου (Frans *et al.*, 2011).

Μέχρι στιγμής, έχουν διακριθεί 23 ορότυποι για το *V. anguillarum* (O1-O23), όπου ο καθένας εμφανίζει διαφορετική παθογένεια και εξειδίκευση στον ξενιστή (Naka *et al.*, 2011). Από αυτούς τους ορότυπους, μόνο οι O1 και O2 (και σε μικρότερη επέκταση ο ορότυπος O3) σχετίζονται με την δονακίωση στα ψάρια (Pedersen *et al.* 1999). Οι υπόλοιποι ορότυποι του βακτηρίου, έχουν απομονωθεί από ιζήματα, πλαγκτόν ή θαλασσινό νερό και δεν είναι παθογόνοι. Η λοιμογόνος δράση και η εξειδίκευση του ξενιστή των βακτηριδίων υπαγορεύεται από τον ορότυπό τους. Έτσι, τα είδη σολομού είναι ευαίσθητα στους O1 και O2 ορότυπους, το λαβράκι και η τσιπούρα συχνά επηρεάζονται από τα βακτήρια του οροτύπου O2, ενώ τα χέλια από τους ορότυπους O2 και O3 (Larsen *et al.*, 1994).

Ευαίσθητα Είδη

Το *V. anguillarum* προκαλεί ασθένεια σε περισσότερα από 50 είδη ψαριών, τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού, συμπεριλαμβανομένων και ειδών με μεγάλη εμπορική και οικονομική σημασία στις υδατοκαλλιέργειες, όπως ο σολομός *Salmo salar* (L.), η ιριδίζουσα πέστροφα *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), το καλκάνι *Psetta maxima* (L.), το λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (L.), η τσιπούρα *Sparus aurata* (L.), ο γάδος *Gadus morhua* (L.), το χέλι *Anguilla anguilla* (L.) και το είδος *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel) (Buller 2004; Toranzo *et al.*, 2005). Τα δίθυρα και τα καρκινοειδή κατά καιρούς επηρεάζονται από το βακτήριο (Aguirre- Guzman *et al.*, 2004; Paillard *et al.*, 2004).

Παθογένεια της δονακίωσης

Η παθογένεια των θαλάσσιων παθογόνων *Vibrio* οφείλεται στην παραγωγή τοξικών εξωκυτταρικών προϊόντων που περιλαμβάνουν πρωτεάσες, καζεϊνάσες, λιπάσες, φωσφολιπάσες, αιμολυσίνες και σιδηροφόρα. Η τοξικότητά του έχει αποδοθεί και στις O αλυσίδες του λιποπολυσακχαριδίου τους. Τέλος, ως σημαντικός παράγοντας στην παθογένεια της δονακίωσης, θεωρείται η ικανότητα πολλών ειδών να παράγουν συγκολλητίνες, με τις οποίες προσκολλώνται στην βλέννα και τις βλεννώδεις επιφάνειες των ψαριών (Μπακόπουλος, 2010).

Κλινική εικόνα

Είναι μία κλασική βακτηριακή αιμορραγική σηψαιμική νόσος, όπου τα συμπτώματά της εξαρτώνται από την μορφή της νόσου. Τα συμπτώματα της δονακίωσης περιλαμβάνουν την απώλεια βάρους, ληθαργικότητα, την εμφάνιση κόκκινων στιγμάτων (κηλίδων) στις κοιλιακές και πλευρικές περιοχές του ψαριού και σκουρόχρωμες πρησμένες ελκωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα του ψαριού, όπου στην συνέχεια προκαλούν αιμορραγία. Τα μάτια μολύνονται επίσης, με αποτέλεσμα θολερότητα στην αρχή και αργότερα έλκος και εξόφθαλμο.

Πιο συγκεκριμένα, στην υπεροξεία μορφή (συνήθως σε ιχθύδια) εμφανίζεται μεγάλη θνησιμότητα, χωρίς κλινικά σημάδια, εκτός από ανορεξία και σκουροχρωμία. Στην οξεία μορφή, εξωτερικά παρατηρούνται ερυθρότητα της περιστοματικής περιοχής, εξόφθαλμος, ερυθρότητα στη βάση των πτερυγίων και της έδρας και υποδερμικές κύστεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρούνται ελκωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα σε διάφορα σημεία του σώματος. Μακροσκοπικά κατά την νεκροψία παρατηρούνται αιμορραγίες και νεκρώσεις στα περισσότερα όργανα, χαρακτηριστικές της σηψαιμίας. Ο σπλήνας είναι διογκωμένος και το έντερο παρουσιάζει έντονη υπεραίμια, εντερίτιδα, διάταση, νεκρώσεις και εξελκώσεις με χαρακτηριστική εικόνα αυτή στην περιοχή της έδρας. Στις μολύνσεις από *Vibrio ordalii* παρατηρούνται μικροαποικίες του βακτηρίου στους σκελετικούς μύες και τη καρδιά, τα βράγχια και το έντερο και στο αίμα λευκοπενία. Το παθογόνο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα και στους αιμοτοποιητικούς ιστούς. Εσωτερικά τα έντερα παρουσιάζουν διάταση και είναι γεμάτα με ένα διαυγές και ιξώδες υγρό. Λόγω του εύρους του pH στον γαστρεντερικό σωλήνα, η παθολογία είναι πιο σοβαρή στο οπίσθιο τμήμα του και του ορθού, σε σύγκριση με το πρόσθιο τμήμα (Actis *et al.*, 1999; Toranzo *et al.*, 2005; Austin & Austin 2007). Η θνησιμότητα στην υπεροξεία μορφή μπορεί να ανέλθει στο 80%. Στην οξεία μορφή έχουν παρατηρηθεί θνησιμότητες έως και 40% του προσβεβλημένου πληθυσμού. Συνήθως όμως στα περιστατικά που εμφανίζονται στην Ελλάδα, ακόμη και αν χορηγηθούν έγκαιρα αντιβιοτικά η θνησιμότητα κυμαίνεται μεταξύ 10 και 20% (Μπακόπουλος, 2010).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες που ευνοούν την δονακίωση

Η ασθένεια εμφανίζεται όταν το περιβαλλοντικό ισοζύγιο είναι ασταθές. Το χημικό στρες (ποιότητα νερού, ρύπανση, σύνθεση της διαίτας, αποφάγια), το βιολογικό στρες (πυκνότητα πληθυσμού, παρουσία άλλων μικρο- και μακρο- οργανισμών) και το φυσικό στρες (θερμοκρασία νερού), αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για την εμφάνιση της νόσου. Για τον τελευταίο παράγοντα ιδίως, όταν η θερμοκρασία του νερού υπερβεί τους 15°C, τότε μπορεί να παρατηρηθεί κρούσμα δονακίωσης (Austin & Austin 2007).

Οι Larsen, Blackburn, Larsen & Olsen (2004), δημοσίευσαν ότι η χημειοτακτική απόκριση του *Vibrio anguillarum* προς την βλέννα των ψαριών επηρεάζεται τόσο από την θερμοκρασία όσο και από την αλατότητα του νερού. Το *Vibrio anguillarum* μπορεί να εντοπιστεί και σε περιβάλλοντα γλυκού νερού, όπως η Λίμνη Biwa στην Ιαπωνία, καθώς αναφέρθηκαν θνησιμότητες του ψαριού Ayu, ένα από τα σημαντικότερα είδη στις ιαπωνικές υδατοκαλλιέργειες φρέσκου νερού.

Το σκοτάδι, το κρύο, η μικροαεροβίωση και η υψηλή κυτταρική πυκνότητα, ενισχύουν την επιβίωση του παθογόνου στο περιβάλλον που διαβιεί, καθώς διατηρεί την ικανότητα ανάπτυξης και παθογένειας (Eguchi, Fujiwara & Miyamoto 2000; Eguchi, Fujiwara-Nagata & Miyamoto 2003). Οι Fujiwara-Nagata & Eguchi (2003) πρότειναν ότι η επιβίωση αυτού του παθογόνου σε ιζήματα του πυθμένα της Λίμνης Biwa μπορεί να ερμηνευτεί από την δημιουργία ενός βιοφίλμ, ενός θώκου, το οποίο συχνά συνδέεται με την αυξημένη επιβίωση των βακτηρίων. Η πολυμερής μήτρα του βιοφίλμ

προστατεύει επίσης το παθογόνο ενάντια στους περιβαλλοντικούς ρύπους και του παρέχει ένα σύστημα για την απόκτηση σημαντικών θρεπτικών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων.

Μετάδοση της νόσου

Οριζόντια μέσω του νερού από μολυσμένα άγρια ψάρια, εξοπλισμό, από παθογόνα που επιζούν στο ίζημα του πυθμένα κάτω από τους ιχθυοκλωβούς και από ασπόνδυλους οργανισμούς του νερού. Κατά την εγκατάσταση της νόσου, η μετάδοση γίνεται από τα νοσούντα στα υγιή ψάρια (Μπακόπουλος, 2010).

Η άμεση επαφή μεταξύ ασθενών και υγιών ψαριών διευκολύνει την μόλυνση (Muroga and Delacruz, 1987, Kanno *et al.*, 1989). Τα άρρωστα ψάρια απελευθερώνουν λοιμογόνα βακτήρια στο γύρω νερό με τα περιττώματα ή μέσω πληγών του δέρματός τους.

Πρόσφατα, ο Teliouis (2011) απέδειξε, με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό, ότι η κύρια πύλη εισόδου του *V. anguillarum* ήταν το δέρμα, κατά τη διάρκεια μιας πειραματικής μόλυνσης νεαρών ατόμων του λαβρακιού (*D. labrax*) με εμβάπτιση. Η είσοδος στον οργανισμό είναι πολύ εύκολη όταν υπάρχουν τραυματισμοί στο δέρμα ή στα βράγχια (Kanno *et al.*, 1989).

Έλεγχος της δονακίωσης

Η θεραπεία με χορήγηση αντιβιοτικών είναι συνήθως αποτελεσματική. Η εμφάνιση όμως ανθεκτικών στελεχών απαιτεί τη διενέργεια αντιβιογράμματος πριν τη θεραπεία και την κατ'εναλλαγή χρήση των αντιβιοτικών σε επαναλαμβανόμενα περιστατικά. Συνήθως η νόσος υποτροπιάζει (Μπακόπουλος, 2010).

Η νόσος είναι ενδημική, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι παρόντες παντού στο θαλάσσιο περιβάλλον και για αυτό δεν γίνεται λόγος αποφυγής εισόδου του παθογόνου μέσα σε μία εκτροφή. Προκειμένου να αποτραπούν οι λοιμώξεις από *V. anguillarum* και οι εστίες λοιμώξεων, πρέπει να διατηρηθούν κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας ψαριών. Η μεταφορά ψαριών συνιστάται να γίνεται τις εποχές που δεν υπάρχει έξαρση της νόσου. Τα ψάρια μπορούν συχνά να είναι φορείς του παθογόνου και ως εκ τούτου το παθογόνο μπορεί εύκολα να εισαχθεί σε μία άλλη περιοχή κατά τη μεταφορά. Οι χειρισμοί των ψαριών από τους καλλιεργητές θα πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά ώστε να αποφευχθεί το στρες. Σε γενικές γραμμές, όλες οι διαδικασίες παραγωγής (ποιότητα ζωοτροφών, ρυθμός σίτισης, συχνότητα διαλογής, καθαρισμός κλουβιού, αντιρρυπαντικές θεραπείες, συνωστισμός, απομάκρυνση νεκρών ψαριών, έλεγχος πτηνών) πρέπει να γίνονται με προσεκτική διαχείριση. Αν ακατέργαστη τροφή (ψάρια) διανέμεται στο στοκ των ψαριών εκτροφής, αυτή πρέπει να είναι βρασμένη. Αυτοί οι περιβαλλοντικοί παράγοντες και οι πρακτικές εκτροφής δεν επηρεάζουν μόνο την έκφραση της βακτηριακής λοιμογόνου δύναμης αλλά και την αντίδραση των ψαριών στη μόλυνση.

Για την ενεργητική προστασία των ψαριών από τη μόλυνση του *V. anguillarum*, έχουν αναπτυχθεί εμβόλια με επιτυχία και χωρίς ανεπιθύμητες παρενέργειες. Τα εγκεκριμένα εμβόλια έναντι του *V. anguillarum* έχουν αποδειχθεί επιτυχή [σχετικό ποσοστό επιβίωσης (RPS)>80%] (Angelidis *et al.*, 2014). Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της προστασίας του εμβολίου έναντι της δονακίωσης που προκαλείται από διάφορους ορότυπους, χρησιμοποιούνται πολυδύναμα εμβόλια. Περιέχουν αντιγόνα από δύο ή περισσότερους ορότυπους, συνήθως *V. anguillarum* ορότυπος O1 και O2 (Angelidis *et al.*, 2006). Από την άλλη πλευρά, ο συνδυασμός δύο διαφορετικών παθογόνων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο ίδιο εναιώρημα εμβολίου (π.χ. ένας συνδυασμός εμβολίου κατά του *V. anguillarum* και Phdp). Η αποτελεσματικότητα του εμβολίου εξαρτάται από την ποιότητά του (των αντιγόνων που περιέχει), αλλά και το είδος των ψαριών που χορηγείται, την ηλικία των ψαριών και την υγεία τους, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και την οδό χορήγησης (Angelidis, 2014). Εμβόλια μπορούν να χορηγηθούν με έγχυση, συνήθως ενδοπεριτοναϊκά (IP), με εμβάπτιση (dip ή bath) ή δια του στόματος με ενσωμάτωσή τους στις ιχθυοτροφές.

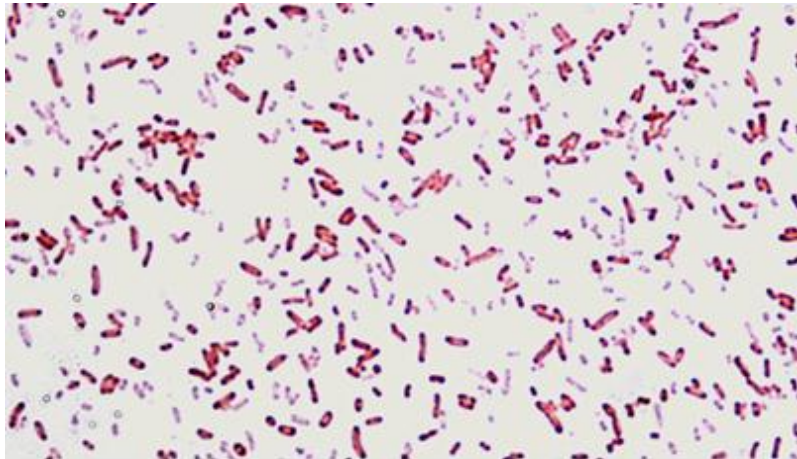
Εμβόλια έναντι του *V. anguillarum* μπορεί επίσης να χορηγηθούν σε ιχθύδια μέσω της *Artemia salina*, που έχει επωαστεί στο εναιώρημα του εμβολίου (Campbell, 1993). Η χορήγηση με έγχυση είναι η πιο αποτελεσματική οδός (Dec *et al.*, 1990), αλλά αυτό δεν ισχύει για τα ψάρια μικρού μεγέθους. Η εμβάπτιση χρησιμοποιείται ευρέως για την ανοσοποίηση των νεαρών ψαριών (Angelidis,

2006). Για τον αποτελεσματικό έλεγχο των κρουσμάτων δονακίωσης συνιστάται να ξεκινήσει ο εμβολιασμός όταν τα ψάρια έχουν βάρος σώματος περίπου 1g με εμβάπτιση, και στη συνέχεια να εμβολιαστούν με αναμνηστική IP έγχυση περίπου 45 ημέρες πριν από την αναμενόμενη περίοδο ξεσπάσματος δονακίωσης. Αυτό το πρόγραμμα εμβολιασμού συνήθως οδηγεί σε ένα υψηλό επίπεδο ανοσοποίησης. Η χρήση πολυδύναμων εμβολίων συνιστάται. Το σχήμα εμβολιασμού πρέπει να καλύπτει αποτελεσματικά όλες τις ηλικιακές ομάδες των ψαριών στην καλλιέργεια (Angelidis, 2014).

1.2. ΦΩΤΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑΣΗ - *PHOTOBACTERIUM DAMSELA* SUBSP. *PISCICIDA*

Η φωτοβακτηριδίαση των ψαριών (παλαιότερα γνωστή ως παστερέλωση), αποδίδεται στο παθογόνο βακτήριο *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* (προηγούμενη ονομασία *Pasteurella piscicida*) (Phdp για συντομία από εδώ και πέρα) και έχει περιγραφεί στην περιοχή της Μεσογείου για περισσότερο από δύο δεκαετίες.

Η ασθένεια, αν παρατηρηθεί μία φορά σε μια περιοχή, γίνεται ενδημική και η εξάλειψη της θεωρείται από δύσκολη έως απίθανη. Επανεμφανίζεται κάθε φορά που οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ευνοούν τον παθογόνο. Η συνεχώς αυξανόμενη εντατικοποίηση των θαλάσσιων υδατοκαλλιεργειών (όσον αφορά τις πτυχές της τεχνικής καθώς και τα είδη των ψαριών) χωρίς αμφιβολία θα διατηρήσει την ασθένεια με επαναλαμβανόμενα κρούσματα τα οποία οδηγούν σε σημαντικές οικονομικές απώλειες.



Εικόνα 1.2.1: Το παθογόνο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* σε οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 1250x (Joana Revez, www.wikipedia.org)

Αιτιολογία

Ο αιτιολογικός παράγοντας της φωτοβακτηριδίασης των ψαριών είναι ένα Gram αρνητικό, μη κινητό, διπολικό, βακτήριο με σχήμα κοντό ραβδοειδές. Τα φωτοβακτήρια ανήκουν στην οικογένεια *Vibrionaceae* και είναι κοινά βακτήρια στο θαλάσσιο περιβάλλον και στις επιφάνειες, όπως επίσης και στο περιεχόμενο των εντέρων των θαλάσσιων ζώων. Μερικά επίσης βρέθηκαν ως συμβιωτικά σε ειδικά όργανα φωτισμού των θαλάσσιων ζώων (Baumann & Baumann, 1984). Οι αποικίες του Phdp σε Άγαρ είναι τακτικές, κυρτές και γλοιώδεις (Snieszko *et al* 1964; Janssen & Surgalla 1968; Kusuda & Yamaoka 1972; Koike *et al*, 1975; Simidu & Egusa 1972). Είναι αδιαφανείς σε άγαρ εκχυλίσματος καρδιάς (Janssen & Surgalla 1968), ημιδιαφανείς σε άγαρ εκχυλίσματος εγκεφάλου καρδιάς (Koike *et al* 1975; Simidu & Egusa 1972), λαμπερές, ολόκληρες με χρώμα γκρι-κίτρινο (Kusuda & Yamaoka 1972). Το Phdp παράγει ομοιόμορφη θολερότητα στο ζωμό. Το χρώμα των αποικιών είναι κάπως πιο λευκό από αυτό των περισσότερων Gram αρνητικών θαλάσσιων βακτηρίων και οι Baumann & Baumann (1984) πρότειναν ότι αυτό οφείλεται πιθανώς στη σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε κυτοχρώματα που συχνά καταδεικνύεται από φωτοβακτήρια. Το Phdp μπορεί εύκολα να καλλιεργηθεί και να απομονωθεί σε άγαρ γενικών χρήσεων όπου έχει προστεθεί (χλωριούχο νάτριο) NaCl. Η ανάπτυξη έχει αναφερθεί ότι είναι καλύτερη σε αιματούχο άγαρ και άγαρ εκχυλίσματος εγκεφάλου καρδιάς από ότι σε άγαρ τρυπτόνης σόγιας (Tung, *et al*, 1985). Παρόλα

αυτά, η ανάπτυξη του παθογόνου είναι αργή και οι Kusuda & Yamaoka (1972) ανέφεραν ότι οι αποικίες του Phdp ήταν 1 – 2mm σε διάμετρο μετά από 72 ώρες επώασης στους 25°C.

Επιδημιολογία

Από τη στιγμή που η νόσος είναι ενδημική, όπως συμβαίνει στη Μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια, πρέπει να θεωρήσουμε ότι το περιβάλλον και τα έμβια όντα που βρίσκονται μέσα σε αυτό, είναι μολυσμένο και ανά πάσα στιγμή μπορεί να μολύνει τους ευαίσθητους οργανισμούς. Η ασθένεια υφίσταται από τα τέλη της άνοιξης μέχρι τα μέσα φθινοπώρου όταν το εύρος της θερμοκρασίας είναι 18–29° C (Matsubato 1975; Bullock 1978; Egusa 1983; Hawke *et al* 1987; Toranzo *et al* 1991; Balebona *et al* 1992). Ωστόσο, έχουν καταγραφεί κρούσματα της ασθένειας και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (<18°C μέχρι και τους 15°C).

Ευαισθησία

Όλες οι αναφορές για κρούσματα παστερέλλωσης δείχνουν μια αρνητική σχέση μεταξύ ηλικίας ψαριού και ασθένειας. Τα νεότερα ψάρια είναι περισσότερο ευάλωτα από τα μεγαλύτερα ψάρια (Bullock 1978; Yasunaga *et al* 1983; Toranzo *et al* 1991). Το ιαπωνικό μαγιάτικο όταν μολύνθηκε πειραματικά με Phdp που είχε απομονωθεί από κόκκινο λαβράκι, βρέθηκε να είναι περισσότερο ευαίσθητο (Yasunaga *et al* 1983). Πειραματικά, ενδοπεριτοναϊκά μολυσμένο καλκάνι ήταν πιο ευαίσθητο απ' ό,τι η τσιπούρα (Toranzo *et al* 1991, Magarinos, *et al* 1995).

Τρόπος μετάδοσης

Ο Bullock (1978) υπέθεσε ότι από τη στιγμή που ο πληθυσμός μολύνεται, η ασθένεια μεταφέρεται με την επαφή από ψάρι σε ψάρι και ότι μπορεί να υπάρχουν ασυμπτωματικοί φορείς υπεύθυνοι για την εξάπλωση της ασθένειας. Σε μέρη όπου η ασθένεια έχει γίνει ενδημική, πολλά άγρια ψάρια γύρω από τις εγκαταστάσεις των καλλιεργειών, φέρουν τον παθογόνο. Περιστασιακά, κατά τη διάρκεια ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών, υποφέρουν από θνησιμότητα από το Phdp. Αυτά τα άγρια ψάρια μπορούν αναμφίβολα να λειτουργήσουν ως αποθήκη και ως πηγή μόλυνσης για τα καλλιεργούμενα ψάρια, οποία είναι πολύ δύσκολο να εξαλειφθεί.

Κλινικά σημάδια και ιστοπαθολογικά ευρήματα

Ως σηψαιμική νόσος έχει υπεροξεία, οξεία και χρόνια μορφή. Στην υπεροξεία μορφή παρατηρούνται αιφνίδιοι θάνατοι χωρίς κανένα άλλο σύμπτωμα. Στην οξεία μορφή παρατηρούνται αποχρωματισμός ή σκούρος χρωματισμός, ανορεξία (Matsubato 1975, Muroga *et al* 1977, Hawke *et al* 1987, Ceschia *et al* 1991, Baudin-Laurencin *et al* 1991) και διόγκωση της κοιλιακής κοιλότητας (Balebona *et al* 1992), ενώ ακολουθεί θνησιμότητα. Στην χρόνια μορφή παρατηρείται μία συνεχής χαμηλή θνησιμότητα.

Η νεκροψία των ψαριών που έχουν πεθάνει ή είναι ετοιμοθάνατα κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της ασθένειας, συνήθως, αποκαλύπτει ωχρό ήπαρ και νεφρό (Balebona *et al* 1992), μεγέθυνση του σπλήνα και των νεφρών (Hawke *et al* 1987, Baudin-Laurencin *et al* 1991), μικρο-ερυθήματα με πετέχιες στα όργανα και τους ιστούς (Ceschia *et al* 1991) και περιστασιακά, υπόλευκα οζίδια στο σπλήνα, συνήθως, 1 – 2 mm σε διάμετρο (Hawke *et al* 1987, Ceschia *et al* 1991, Toranzo *et al* 1991). Αυτά τα οζίδια χαρακτηρίζουν τη χρόνια μορφή της νόσου (Bullock 1978, Egusa 1983, Baudin-Laurencin *et al* 1991, Toranzo *et al* 1991).

Η ιστοπαθολογία κατά τη διάρκεια της οξείας μορφής της φωτοβακτηριδίασης αποκαλύπτει οξείες νεκρωτικές αλλαγές, κυρίως στον σπλήνα και το νεφρό, συνοδευόμενες από διείσδυση κυττάρων του αίματος μαζί με μάζες από βακτηριακές συστάδες, εσωτερικά και εξωτερικά μακροφάγα, συνδεδεμένα μέσα σε τριχοειδή και σε ενδιάμεσους χώρους. Θα μπορούσε επίσης να παρατηρηθεί μια μέτρια πολυεστιακή νέκρωση των υπατοκυττάρων (Hawke *et al* 1987, Toranzo *et al* 1991, Galleotti *et al* 1995, Bakopoulos *et al* 1999). Οι Hawke *et al* (1987) επίσης παρατήρησαν οξεία πολυεστιακή νέκρωση στο πάγκρεας από τεθνεόντα λαβράκια, η οποία συνοδεύεται από απώλεια ή μείωση του μεγέθους των ζυμογόνων κοκκίων.

Η χρόνια μορφή της ασθένειας χαρακτηρίζεται από υπόλευκα οζίδια στον σπλήνα και τα νεφρά, τα οποία είναι κοκκιοματώδεις βλάβες που περιλαμβάνουν μάζες κυττάρων Phdp, επιθηλιοειδή κύτταρα, μακροφάγα σε ποικίλα εκφυλιστικά στάδια (μερικά γεμάτα με άθικτα βακτήρια) και ινοβλάστες (Bullock 1978, Toranzo *et al* 1991, Galleotti *et al* 1995).



Εικόνα 1.2.2: Νεκροσκοπικά μακροσκοπικά ευρήματα φωτοβακτηριδίασης σε νεαρή τσιπούρα (4g) με σπληνομεγαλία και κιτρινωπό υγρό στο έντερο (Varvarigos, www.vetcare.gr).

Έλεγχος της Φωτοβακτηριδίασης

Όλα τα στελέχη του παθογόνου ήταν ασθενώς ευαίσθητα σε erythromycin, leucomycin, mikamycin, oleandomycin, spiramycin. Οι Bakoroulos *et al.* (1995) μελέτησαν και σύγκριναν την ευαισθησία Ελληνικών στελεχών και άλλων στελεχών από Ευρώπη και Ιαπωνία. Καταγράφηκε τελικά παρόμοια ευαισθησία σε όλα τα Ευρωπαϊκά στελέχη, ενώ τα Ιαπωνικά στελέχη έδειξαν μεγαλύτερους βαθμούς ανθεκτικότητας.

Ο Bullock (1978) πρότεινε ότι γενικά μέτρα, όπως καλή υγιεινή και διαδικασίες διαχείρισης της ιχθυοκαλλιέργειας, θα έπρεπε να χρησιμοποιούνται για αποφυγή υπερπληθυσμού και άλλων στρεσογόνων παραγόντων, οι οποίοι μπορούν να δημιουργήσουν προδιάθεση της νόσου στα ψάρια.

Λαμβάνοντας υπόψη τους τρόπους με τους οποίους το Phdp μπορεί να εισβάλει στα ψάρια σε μια θαλασσοκαλλιέργεια, φαίνεται ότι οι προτάσεις του Bullock (1978), για διαδικασίες αποφυγής υπερπληθυσμού μαζί με την μειωμένη σίτιση των εκτρεφόμενων ψαριών με υπολείμματα άλλων νεκρών ψαριών και τη χρήση ψαριών, τα οποία προέρχονται από υγιή εκκολαπτήρια, υποδεικνύουν τα κατάλληλα μέτρα για επιχειρήσεις που βρίσκονται σε περιοχές όπου η φωτοβακτηριδίαση δεν είναι ενδημική. Τέτοια μέτρα, τα οποία είναι εφαρμόσιμα σε όλες τις ασθένειες, είναι καλή πρακτική αποφυγής ασθενειών σε τέτοιες περιοχές (παρόλο που η νόσος μπορεί να μεταφερθεί σε μια περιοχή μέσω της μετανάστευσης). Ομοίως, βοηθούν την ανακούφιση της πίεσης των βακτηριακών φορτίων σε καλλιέργειες τοποθετημένες σε περιοχές που η νόσος είναι ενδημική, αλλά δεν προσφέρουν κανένα είδος προστασίας. Τέτοια προστασία μπορεί να προσφερθεί μέσω εμβολιασμού και ανοσοδιέγερσης.

Όλα τα εμβόλια που έχουν αναπτυχθεί μέχρι σήμερα, έχουν χρησιμοποιήσει είτε ολόκληρα κύτταρα είτε συστατικά κυττάρων καλλιεργημένα σε κανονικά εργαστηριακά μέσα. Ωστόσο, τα αντιγόνα που εκφράζονται από ένα παθογόνο κατά τη διάρκεια της *in vitro* ανάπτυξης μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν τα αντιγόνα τα οποία παράγουν τα βακτήρια *in vivo* (Davies, *et al* 1992, Bakoroulos *et al* 2004). Επιπλέον, τα βακτήρια που είναι καλλιεργημένα σε κανονικά εργαστηριακά μέσα μπορεί να μην παράγουν αντιγονικούς παράγοντες για την τοξικότητα που είναι υπεύθυνη για την επιτυχία τους κατά τη διάρκεια φυσικών μολύνσεων. Το γεγονός ότι συγκολλητικοί τίτλοι αντισωμάτων ενάντια σε αντιγόνα Phdp που έχουν εισαχθεί στο ψάρι με έγχυση μπορούν να αναπτυχθούν, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι αυτά τα αντισώματα προστατεύουν ενάντια σε φυσική ή πειραματική μόλυνση. Αυτό έχει δειχθεί σε πολλές μελέτες όπου τα εμβόλια απέτυχαν να προστατεύουν ενάντια σε πειραματικές ή φυσικές μολύνσεις.

Οι Bakoroulos, *et al* (1997a) κατέδειξαν ότι ορός λαβρακιού ανεπτυγμένος ενάντια σε βακτήρια αδρανοποιημένα με θέρμανση και σε ζωντανά βακτήρια Phdp, αναγνώρισε περισσότερο αντιγονικό υλικό σε κύτταρα ανεπτυγμένα σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Αντισώματα κατά των IROMPs (Iron regulated outer membrane proteins) δεν φαίνεται να παράγονται.

Προηγούμενη έρευνα για το εμβόλιο έχει επίσης δείξει ότι η ένεση με ζωντανά βακτήρια Phdp παρέχει καλύτερη προστασία από ένεση με βακτήρια που αδρανοποιήθηκαν με θέρμανση ή θανατώθηκαν με φορμόλη. Σαφώς, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αδρανοποίηση του παθογόνου είχαν ένα επιβλαβές αποτέλεσμα στην αντιγονικότητα. Επομένως, προτείνεται ότι τα συστατικά των κυττάρων του παθογόνου πρέπει να καλλιεργούνται σε κατάλληλα μέσα, (περιορισμός σιδήρου, εμπλουτισμός γλυκόζης) να παρασκευάζονται με το ελάχιστο των διαδικασιών μετουσίωσης και να δοκιμάζονται, καθότι ένα εξασθενημένο ζωντανό βακτηριακό εμβόλιο μπορεί να είναι δύσκολο να πάρει άδεια χρήσης. Τέτοια συστατικά κυττάρου θα μπορούσαν επίσης να παραχθούν με τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA (συστατικά πρωτεϊνών).

Οι Arijo *et al.* (2005) πραγματοποίησαν μελέτη, στην οποία έλεγξαν την αποτελεσματικότητα ενός διδύναμου πειραματικού εμβολίου ενάντια στα βακτήρια Phdp ($4 \cdot 10^3$ και $4 \cdot 10^4$ βακτηριακά κύτταρα) και *Vibrio harveyi* ($7 \cdot 10^4$ και $7 \cdot 10^5$ βακτηριακά κύτταρα) σε εκτρεφόμενη γλώσσα *Solea senegalensis* (Kaup). Το εμβόλιο περιείχε ολόκληρα βακτηριακά κύτταρα, που ήταν αδρανοποιημένα με φορμόλη και εξωκυτταρικά προϊόντα και από τα δύο βακτήρια, τα οποία χορηγήθηκαν με εμβάπτιση στα ψάρια. Δύο εμβλαπτίσεις σε ψάρια 5-10g με απόσταση 1 μήνα έδωσαν υψηλά επίπεδα προστασίας, παρόμοια με αυτά που δίνουν τα μονοδύναμα εμβόλια, με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση (RPS > 70%), γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως πρόκειται για μία χρήσιμη στρατηγική χορήγησης σε μικρά ψάρια. Η διάρκεια παροχής προστασίας του δισθενούς εμβολίου για την γλώσσα κράτησε 4 μήνες, μετά την οποία το ποσοστό RPS και για τα δύο παθογόνα μειώθηκε σημαντικά.

Εμπορικά σκευάσματα εμβολίων

Τα εμβόλια, τα οποία έχουν αδειοδοτηθεί και εγκριθεί για την χρήση στην Ελλάδα, είναι τα ακόλουθα (βλ. Παράρτημα 1 και Ε.Ο.Φ., Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, <https://www.eof.gr/>):

Εμβόλια/ Όνομα	Αδριανοποιημένο	Χρήση	Είδος	Οδός Χορήγησης	Εταιρία	Αρ. Έγκρισης ΕΟΦ
ALPHA DIP 2000	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Δονακίωση, Παστεριδίωση	Λαβράκι, Τσιπούρα	Εμβάπτιση	AQUAVET/ KAKABOYΛΗΣ	0115501
ALPHA DIP VIBRIO	<i>Vibrio anguillarum</i>	Δονακίωση	Λαβράκι	Εμβάπτιση	AQUAVET/ KAKABOYΛΗΣ	0188601
ALPHA JECT 2000	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Δονακίωση, Παστεριδίωση	Λαβράκι	Ενέσιμο	AQUAVET/ KAKABOYΛΗΣ	0115601
AQUAVAC TM ERM ORAL	<i>Yersinia ruckeri</i> (Hagerman strain)	Ερυθροστομα- τίτιδα	Πέστροφα	Στόμα με τροφή	INTERVET	0160501
AQUAVAC PHOTOBAC BOOST	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Παστεριδίωση	Λαβράκι, Τσιπούρα	Στόμα με τροφή	INTERVET	0148401
AQUAVAC TM PHOTOBAC PRIME	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Παστεριδίωση	Λαβράκι, Τσιπούρα	Εμβάπτιση	INTERVET	0148501
AQUAVAC VIBRIO ORAL	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Vibrio ordalii</i>	Δονακίωση	Πέστροφα	Στόμα με τροφή	INTERVET	0163701
AQUAVAC VIBRIO PASTEURELLA	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Παστεριδίωση	Λαβράκι, Τσιπούρα	Ενέσιμο	INTERVET	0158901
AQUAVAC TM	<i>Yersinia ruckeri</i>	Ερυθροστομα-	Πέστροφα	Εμβάπτιση	INTERVET	0158701

ERM	(Hagerman strain)	τίτιδα				
ERMOGEN	<i>Yersinia ruckeri</i> (Hagerman strain)	Εντερική ερυθροστομα- τίτιδα	Πέστροφα	Εμβάπτιση	AQUA HEALTH/ BARBARHΓΟΣ	0099301
ICTHIOVAC PD	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Παστεριδίαση	Τσιπούρα	Εμβάπτιση	HIPRA ΕΛΛΑΣ	0215101
ICTHIOVAC VR/PD	<i>Vibrio anguillarum</i>	Δονακίωση	Λαβράκι	Εμβάπτιση	HIPRA ΕΛΛΑΣ	0223001
ICTHIOVAC LG LACTOCOCOSI S-TRUCA	<i>Lactococcus garvieae</i>	Λακτοκοκκικός εξόφθαλμος πέστροφας	Πέστροφα	Ενέσιμο	HIPRA ΕΛΛΑΣ	0192901
ICTHIOVAC STR	<i>Streptococcus parauberis</i>	Στρεπτοκό- κκωση	Καλκάνι	Ενέσιμο	HIPRA ΕΛΛΑΣ	0158301
VIBRIO FISHVAX	<i>Vibrio anguillarum</i>	Δονακίωση	Πέστροφα, Λαβράκι, Τσιπούρα	Εμβάπτιση, Ενέσιμο	AVICO	0076601
VIBROGEN-2	<i>Vibrio anguillarum</i>	Δονακίωση	Πέστροφα	Εμβάπτιση, Ενέσιμο	AQUA HEALTH/ BARBARHΓΟΣ	0091101
YERSI- FISHVAX	<i>Yersinia ruckeri</i> (Hagerman strain)	Ερυθροστομα- τίτιδα	Πέστροφα	Εμβάπτιση, Ενέσιμο	AVICO	0078401

Το Aquavac Photobac Boost και το Aquavac Photobac Prime χρησιμοποιούνται σαν βοήθημα για την πρόληψη της παστερέλλωσης, ενώ τα εμβόλια Alpha Dip 2000, Aquavac *Vibrio Pasteurella* και το Alpha Ject 2000 χρησιμοποιούνται για την διέγερση της ενεργητικής ανοσίας ενάντια στο *Vibrio anguillarum* και στο *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

1.3 Μέθοδοι που χρησιμοποιούν ανοσολογικούς δείκτες για ποιοτικές αι ποσοτικές μελέτες αντιγόνων.

Η μέθοδος ELISA

Η ένζυμο-συνδεδεμένη ανοσοπροσοφορική δοκιμασία (ELISA), είναι μια βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται κυρίως στην ανοσολογία για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή αντιγόνου σε ένα δείγμα. Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική, κτηνιατρική και στην παθολογία των φυτών, καθώς και ως έλεγχος ποιότητας σε διάφορες βιομηχανίες, όπως στη βιομηχανία τροφίμων. Περιληπτικά, στην ELISA, μια άγνωστη ποσότητα αντιγόνου στερεώνεται σε μία επιφάνεια, και στη συνέχεια ένα ειδικό αντίσωμα εφαρμόζεται πάνω στην επιφάνεια, έτσι ώστε να μπορεί να συνδεθεί με το αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο, και στην τελική βαθμίδα μια ουσία προστίθεται για να μπορεί το ένζυμο να μετατραπεί σε κάποιο ανιχνεύσιμο σήμα, συνήθως μια χρωματική αλλαγή σε ένα χημικό υπόστρωμα (<http://www.elisa-antibody.com/>), Μπορούν να εφαρμοστούν διάφορες παραλλαγές του βασικού μοντέλου που προαναφέρθηκε, όπως επιγραμμικά, άμεση, έμμεση ή «σάντουιτς» ELISA, η ανταγωνιστική και η πολλαπλή ELISA.

Μέθοδος Western blot

Όπως και η τεχνική ELISA, έτσι και η μέθοδος Western blot είναι μία βιοχημική μέθοδος, που χρησιμοποιείται ευρέως στην μοριακή βιολογία/ βιοχημεία/ ανοσογενετική για την ανίχνευση πρωτεϊνών. Μετά την σύνταξη πρωτοκόλλου από τον Towbin (1979), για την μεταφορά πρωτεϊνών από ένα ηλεκτρικά αγώγιμο τζελ σε μία μεμβράνη, η «πρωτεϊνική κηλίδωση» έχει εξελιχθεί ραγδαία (Kurien, 2006). Η μέθοδος Western blot, μπορεί να ανιχνεύσει μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη μέσα σε ένα διάλειμμα, το οποίο περιέχει πολλά είδη πρωτεϊνών και να δώσει πληροφορίες για αυτήν (Dechend, 2006; Ma, 1994; 2004; Peter- Katalinic, 2005; Sakudo, 2006; Westermeier, 2005). Η μέθοδος συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με αντισώματα υψηλής ποιότητας, τα οποία εξειδικεύονται προς μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σύμφωνα με βιβλιογραφική έρευνα, υπάρχει μικρή σχετική πληροφορία για την αποτελεσματικότητα και την ανοσολογική αντίδραση σε τσιπούρα που εμβολιάστηκε με εμπορικά μονοδύναμα ή/και με πολυδύναμα εμβόλια. Για αυτόν τον λόγο, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η σύγκριση της αποτελεσματικότητας εμπορικών διδύναμων εμβολίων (AquaVacTM *Vibrio pasteurella*) με πειραματικά διδύναμα και μονοδύναμα εμβόλια έναντι της φωτοβακτηριδίασης και της δονακίωσης στη τσιπούρα, η ποσοτική ανάλυση της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης έναντι του φωτοβακτηριδίου και δονακίου με την ανοσολογική μέθοδο ELISA και η ποιοτική ανάλυση (αντιδράσεις ορών ανοσοποιημένων τσιπυρών με αντιγόνα των βακτηρίων) της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης με Western blot. Τα κυριότερα ερωτήματα που αυτή η έρευνα προσπαθεί να απαντήσει είναι: α) Εάν η πληθώρα αντιγόνων έναντι διαφορετικών μικροοργανισμών επηρεάζει και πως την αποτελεσματικότητά τους, β) Εάν η πληθώρα αντιγόνων έναντι διαφορετικών μικροοργανισμών επηρεάζει και πως τους ειδικούς τίτλους αντισωμάτων έναντι των δύο μικροοργανισμών των οποίων τα αντιγόνα περιέχονται στα εμβολιακά μίγματα σε σύγκριση με μονοδύναμα σκευάσματα και γ) Εάν η πληθώρα αντιγόνων έναντι διαφορετικών μικροοργανισμών και η ύπαρξη ανοσοενισχυτικού επηρεάζει και πως τα αντιγόνα που αναγνωρίζονται από τα ειδικά αντισώματα σε σύγκριση με πολυδύναμα και υδατικά εμβόλια.

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1. Δεξαμενές και ενυδρεία

Τα ψάρια που έλαβαν μέρος στα πειράματα παραλήφθηκαν, μεγάλωσαν, εμβολιάστηκαν και παρέμειναν σε δεξαμενές, που συνδέονταν με κλειστό, πλήρως ανακυκλούμενο σύστημα παροχής νερού. Οι δεξαμενές ήταν 5 κυλινδρικού σχήματος και η χωρητικότητά τους ήταν 2m³ έκαστη, με μέγιστη συνολική χωρητικότητα όλου του συστήματος τα 16 m³. Το νερό περνούσε από φίλτρο άμμου, μία μονάδα αποστείρωσης UV 110W και ένα βιολογικό φίλτρο. Τέλος, σε κάθε δεξαμενή, ήταν τοποθετημένα ένας σωλήνας με ελαφρόπετρα, από όπου και διοχετεύονταν συνεχώς αέρας.

Για τις μελέτες της αποτελεσματικότητας των εμβολίων χρησιμοποιήθηκαν 15 πλαστικά ενυδρεία των 50L έκαστο. Ο τρόπος λειτουργίας ήταν στατικός και το νερό ανανεωνόταν κατά το ½ ημερησίως, χειροκίνητα. Τέλος, σε κάθε ενυδρείο, ήταν τοποθετημένα ένας σωλήνας με ελαφρόπετρα, από όπου και διοχετεύονταν συνεχώς αέρας. Και τα δύο συστήματα ελέγχονταν καθημερινά και νεκρά ψάρια, περιττώματα και τροφή που δεν είχε καταναλωθεί, απομακρύνονταν από αυτά.

2.2. Φυσικομετρικές παράμετροι

Καθημερινά καταγραφόταν η θερμοκρασία του νερού των δεξαμενών και η τιμή του οξυγόνου (WTW, Oxi 315i).

Πίνακας 2.2.1: Μέγιστες και ελάχιστες τιμές θερμοκρασίας νερού (°C) για τους μήνες του πειράματος

Μήνας	Ελάχιστη T (°C)	Μέγιστη T (°C)
Μάιος	18,5	23
Ιούνιος	20,6	25,5
Ιούλιος	24,3	27,1

Μέσος όρος T: 22,39 °C

Πίνακας 2.2.2: Μέγιστες και ελάχιστες τιμές οξυγόνου (mg/L) για τους μήνες του πειράματος

Μήνας	Ελάχιστη (mg/L)	Μέγιστη (mg/L)
Μάιος	5,2	6,45
Ιούνιος	4,9	6
Ιούλιος	5,15	6,1

Μέσος όρος οξυγόνου: 5,17 mg/L

Τέλος, υπολογίστηκε και το συνολικό αμμωνιακό άζωτο, με τη δοκιμή των εταιρειών Sera και API NH_4/NH_3 , του οποίου οι τιμές δεν υπερέβησαν τα 0,5 mg/L (διακύμανση τιμών από 0-0,5 mg/L) για τους μήνες του πειράματος. Το pH κυμαινόταν μεταξύ 7,7 και 7,9 (WTW, pH 315i).

2.3. Ψάρια - Τροφή

Τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μη εμβολιασμένες τσιπούρες υδατοκαλλιέργειας, οι οποίες παραλήφθηκαν από το ιχθυοτροφείο ΣΕΛΟΝΤΑ Α.Ε., των Λουτρών Λέσβου. Η μεταφορά στο Υγρό εργαστήριο του Τμήματος Επιστημών της Θάλασσας έγινε με ελαφριά νάρκωση και τα ψάρια τοποθετήθηκαν σε 5 διαφορετικές δεξαμενές μετά την άφιξή τους.

Οι τσιπούρες είχαν αρχικό μέσο βάρος περίπου 2,5g και στο τέλος του πειράματος το μέσο βάρος έφτασε έως τα 30g.

Η τροφή που χρησιμοποιήθηκε ήταν βιομηχανοποιημένη ξηρή τροφή σε μορφή πέλετ σε ποσοστό 3% του σωματικού τους βάρους, δύο φορές την ημέρα.

Τέλος, πριν από τον εμβολιασμό και τις πειραματικές μολύνσεις, τα ψάρια για τουλάχιστον 24 ώρες έμεναν ατάιστα. Για τον εμβολιασμό χρησιμοποιήθηκαν μόνο υγιή ιχθύδια κατόπιν αναισθητοποίησης με 0,2% φαινοζεθανόλη.

2.4. Βακτήρια

Το πρώτο βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική μόλυνση ήταν το *Photobacterium damsela subsp. piscicida*, το οποίο και απομονώθηκε από καλλιεργούμενο λαβράκι στην Νότια Εύβοια, το καλοκαίρι του 2012. Το στέλεχος λήφθηκε από τις ιχθυοκαλλιέργειες ΝΗΡΕΑΣ Α.Ε. Το δεύτερο βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το δονάκιο *Vibrio anguillarum* (ορότυπος O1), απομονωμένο στο Ιόνιο Πέλαγος, χορηγία του Εργαστηρίου Αναφοράς- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης.

Τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία petri με αποστειρωμένο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Tryptone Soya Agar-Άγαρ Τρυπτόνης Σόγιας) με 2% NaCl. Για τις πειραματικές μολύνσεις, τα βακτήρια αναπτύσσονταν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό Brain Heart Infusion Broth (ζωμός εκχυλίσματος εγκεφάλου καρδιάς) με 2% NaCl. Μετά τον ενοφθαλμισμό, τα βακτήρια επώαστηκαν με ανάδευση για 48 ώρες στους 22 °C. Η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας των βακτηρίων μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο στα 605nm με τη μέτρηση 1 να αντιστοιχεί σε 10^9 βακτηριακά κύτταρα/ml.

2.5. Εμβόλια

Εμπορικά εμβόλια: Τα εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Alpha Ject 2000 (AJ) και το AquaVac *Vibrio Pasteurella* (AV). Το AJ είναι ενέσιμο γαλάκτωμα που περιέχει ορυκτό έλαιο. Η ποιοτική του σύνθεση είναι αδρανοποιημένες με φορμόλη βακτηριακές καλλιέργειες των *V. anguillarum* (ορότυπος O1) και Phdp. Το AV είναι υδατικό εναιώρημα για ένεση. Η ποιοτική και ποσοτική του σύνθεση είναι αδρανοποιημένα κύτταρα *V. anguillarum* 78SKD με όχι λιγότερα από $9,0 \times 10^8$ κύτταρα/ml, αδρανοποιημένα κύτταρα *V. anguillarum* MSC275 με όχι λιγότερα από $1,0 \times 10^9$ κύτταρα/ml, αδρανοποιημένα κύτταρα Phdp (στέλεχος Pr85) με όχι λιγότερα από $2,0 \times 10^9$ κύτταρα/ml.

Και τα δύο εμβόλια διεγείρουν την ενεργητική ανοσία ενάντια στη δονακίωση και την φωτοβακτηριδίαση, που προκαλούνται από τα βακτήρια *V. anguillarum* (ορότυπος O1) και Phdp. (Varvarigos, <http://www.vetcare.gr>)

Πειραματικά εμβόλια: Τα πειραματικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα μονοδύναμο κατά της φωτοβακτηριδίασης και ένα διδύναμο κατά της φωτοβακτηριδίασης και δονακίωσης ταυτόχρονα. Και τα δύο εμβόλια περιέχουν αδρανοποιημένες με φορμόλη καλλιέργειες Phdp ενώ το διδύναμο περιέχει και αδρανοποιημένες με φορμόλη καλλιέργειες *V. anguillarum* O1.

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των παθογόνων ήταν τα εξής: **α)** O.YPE + O.Salts + EDDA + glucose: εκχύλισμα μαγιάς, βακτηριακή πεπτόνη, EDDA, 2% γλυκόζη + KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl + $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 άλατα, **β)** 2xO.YPE + O.Salts: εκχύλισμα μαγιάς, βακτηριακή πεπτόνη, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl + $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 + $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ άλατα, **γ)** 2xYFP + O.Salts + EDDA + glucose: εκχύλισμα μαγιάς, πεπτόνη ψαριού, EDDA, 2% γλυκόζη + KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl + $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 άλατα, **δ)** TSA (στερεό θρεπτικό υπόστρωμα): 2%NaCl, άγαρ τρυπτόνης σόγιας. Όπου δημιουργούνταν συνθήκες έλλειψης σιδήρου με τη προσθήκη EDDA, δεν χρησιμοποιούνταν το διάλυμα αλάτων Fe. Η γλυκόζη αποστειρώθηκε χωριστά και προστέθηκε μετά την αποστείρωση των άλλων διαλυμάτων υλικών καλλιέργειας.

Τα βακτηριακά κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε O.YPE + O.Salts + EDDA + glucose, 2xO.YPE + O.Salts και 2xYFP + O.Salts + EDDA + glucose συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση μίας ώρας στα 300g στους 4°C και ακολούθησε πλύση με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Ακολούθησε αδρανοποίηση με 0,5% φορμόλη στους 4°C για μία νύχτα. Έπειτα πλύθηκαν με θαλασσινό νερό, αναμίχθηκαν ισόποσα για τη παραγωγή του μονοδύναμου πειραματικού εμβολίου Eph. Η ποσοτική σύσταση του μονοδύναμου εμβολίου ήταν $6,24 \times 10^7$ βακτηριακά κύτταρα/ml.

Η ποσοτική σύσταση του διδύναμου εμβολίου Evip ήταν $5,36 \times 10^9$ βακτηριακά κύτταρα (Phdp + Vibrio)/ml. Το *V. anguillarum* O1 καλλιεργήθηκε σε υλικό καλλιέργειας BHIB (ζωμός εκχυλίσματος εγκεφάλου καρδιάς) + 2% NaCl.

Οι συνθήκες καλλιέργειας και για τα δύο βακτήρια ήταν 72 ώρες, σε θερμοκρασία 22°C, με ήπια ανάδευση.

2.6. Εμβολιασμοί

Εμβολιάστηκαν 4 ομάδες (συνολικά 740 ψάρια) ψαριών με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση: 200 με το AJ, 200 με το AV, 200 με το πειραματικό διδύναμο Phdp – Vibrio (Evip), 140 με το πειραματικό μονοδύναμο Phdp (Eph). Τέλος έμειναν ανεμβολίαστα 700 ψάρια ως μάρτυρες (control - έλαβαν IP έγχυση με αποστειρωμένο διάλυμα 2% NaCl). Η διαδικασία διενεργήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των παρασκευασμάτων. Η δόση για κάθε άτομο ήταν 50μL.

Μετά τον εμβολιασμό, τα ψάρια και οι μάρτυρες τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές δεξαμενές. Ακολούθησε παρακολούθηση και καταγραφή των ατόμων για όποια τυχόν τοξική παρενέργεια από τα εμβόλια. Νεκρά ψάρια απομακρύνονταν από τις δεξαμενές και μεταφέρονταν στο εργαστήριο Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιέργειών. Εκεί πραγματοποιούνταν ανατομία στην κοιλιακή περιοχή και μακροσκοπική παρακολούθηση, για τον εντοπισμό πιθανών παθολογικών αιτιών, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τα εμβόλια.

2.7. Πειραματική μόλυνση

Πενήντα τρεις ημέρες μετά τους εμβολιασμούς, ψάρια από τις εμβολιακές ομάδες EVip, AV και Control επιμολύνθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και δοσολογία ανά άτομο 100μL με το βακτήριο *V. anguillarum* (ορότυπος O1). Το βακτήριο, αναπτύχθηκε με ενοφθαλμισμό σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό Brain Heart Infusion Broth (BHIB) με 2% NaCl για 48 ώρες στους 22 °C. Έπειτα η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε (HERMLE Z200A, Labnet) για μία ώρα στις 4750 στροφές (rpm). Μετά από απομάκρυνση του υπερκείμενου, το εναπομείναν ίζημα βακτηριακών κυττάρων αραιώθηκε με αποστειρωμένο 2% NaCl, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη οπτική πυκνότητα του βακτηρίου, για να ακολουθήσει η μόλυνση. Παράλληλα με την αραιώση, πραγματοποιούνταν και μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο (U-2900, HITACHI) στα 605nm.

Η βακτηριακή δόση που καθορίστηκε για κάθε άτομο ήταν $7,1 \times 10^9$ βακτηριακά κύτταρα/mL για το *V. anguillarum* (ορότυπος O1). Μετά την επιμόλυνση τα ψάρια τοποθετήθηκαν ανά 20 άτομα σε 3 ξεχωριστά ενυδρεία για κάθε πειραματική ομάδα. Το πείραμα διήρκησε συνολικά 12 ημέρες. Οι θνησιμότητες παρακολουθούνταν και καταγράφονταν

καθημερινά και το πείραμα σταμάτησε, όταν για δύο συνεχόμενες ημέρες δεν υπήρχε θνησιμότητα.

Ομοίως, εξήντα έξι ημέρες μετά τον εμβολιασμό, 60 άτομα από κάθε εμβολιακή ομάδα επιμολύνθηκαν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση και δοσολογία ανά άτομο 100μL με το βακτήριο Phdp, το οποίο επίσης αναπτύχθηκε με ενοφθαλμισμό σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό Brain Heart Infusion Broth (BHIB) με 2% NaCl για 48 ώρες στους 22 °C. Με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, η βακτηριακή δόση που καθορίστηκε για κάθε άτομο ήταν $9,2 \times 10^9$ βακτηριακά κύτταρα/mL. Μετά την επιμόλυνση τα ψάρια τοποθετήθηκαν ανά 20 άτομα σε 3 ξεχωριστά ενυδρεία για κάθε πειραματική ομάδα. Το πείραμα διήρκεσε συνολικά 28 ημέρες. Οι θνησιμότητες παρακολουθούνταν και καταγράφονταν καθημερινά και το πείραμα σταμάτησε, όταν για δύο συνεχόμενες ημέρες δεν υπήρχε θνησιμότητα.

Νεκρά ψάρια απομακρύνονταν από τα ενυδρεία και μεταφέρονταν στο εργαστήριο Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, όπου και πραγματοποιούνταν ανατομία στην κοιλιακή περιοχή για τον προσδιορισμό των αιτιών του θανάτου και μικροβιολογικός έλεγχος για την επιβεβαίωση του μολυσματικού αιτίου που προκάλεσε θνησιμότητα.

2.8. Έλεγχος προστασίας: Υπολογισμός του RPS (Relative Percent Survival-Σχετικό Ποσοστό Επιβίωσης)

Το αποτέλεσμα του εμβολιασμού αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό του «σχετικού ποσοστού επιβίωσης» (RPS).

Το σχετικό ποσοστό επιβίωσης, όπως περιγράφεται από τον Amend (1981), υπολογίζεται με τον εξής τύπο:

$$RPS = 1 - \frac{\% \text{ θνησιμότητας ανοσοποιημένων ατόμων}}{\% \text{ θνησιμότητας μη ανοσοποιημένων ατόμων}} * 100$$

Το RPS εκφράζει το ποσοστό των ψαριών, τα οποία δεν πέθαναν από την ασθένεια επειδή προστατεύθηκαν από τα εμβόλια. Ένας οικονομικά αποδεκτός, επιτυχής εμβολιασμός πρέπει να χαρακτηρίζεται από RPS τουλάχιστον 70%, γεγονός που σημαίνει ότι σε περίπτωση κρούσματος της νόσου, τα μη εμβολιασμένα ψάρια θα υποστούν τουλάχιστον 3 φορές μεγαλύτερες απώλειες από αυτά που έχουν εμβολιαστεί. (Varvarigos, www.vetcare.gr).

2.9. Συλλογή και επεξεργασία αίματος ψαριών για την απομόνωση ορού

Μετά από ελαφριά αναισθητοποίηση, γίνονταν λήψη αίματος από την ουραία αρτηρία από 3 ψάρια κάθε ομάδας, το οποίο φυλάσσονταν ξεχωριστά για κάθε άτομο. Το αίμα αφήνονταν να πήξει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και τοποθετούνταν στο ψυγείο (4°C) για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα γινόταν φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 7 λεπτά και απομόνωση του ορού. Τέλος οι οροί αποθηκεύθηκαν στη κατάψυξη (-20°C) μέχρι τη στιγμή που χρησιμοποιήθηκαν. Αιμοληψία για τα εμβολιασμένα ψάρια πραγματοποιούνταν ανά 7 ημέρες, από την μέρα 0 έως την ημέρα 94.

Αίμα και ορός απομονώθηκε και μετά τις πειραματικές μολύνσεις από εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν αλλά επιβίωσαν της μόλυνσης για να διαπιστωθεί τυχόν διέγερση της ανοσολογικής αντίδρασης. Σε αυτή την περίπτωση, αιμοληψία γινόταν ανά 4 ημέρες και διήρκεσε 12 μέρες για τη μόλυνση με *V. anguillarum* O1 και 28 ημέρες για τη μόλυνση με Phdp.

2.10. Έλεγχος των χυμικών ανοσολογικών παραμέτρων

2.10.1. Διαδικασία ELISA

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν μια παραλλαγή της μεθόδου που περιγράφεται από τους Bakoroulos *et al* (2003). Τα φρεάτια στις πλάκες ELISA καλύφθηκαν με 50μl ανά φρεάτιο με 0,001% poly_L lysine (Sigma) σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/διττανθρακικών

(Sigma), pH 9,6 και αφέθηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πλάκες πλύθηκαν με ελαφρύ αλατούχο διάλυμα πλύσης (LSWB) και στη συνέχεια καλύφθηκαν με τα βακτήρια έναντι των οποίων διερευνάται η παραγωγή των ειδικών αντισωμάτων [είτε *V. anguillarum* (ορότυπος O1) ή Phdp], 50μl/φρεάτιο και οπτική πυκνότητα $OD_{605}=1$. Οι πλάκες αφέθηκαν για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 25μl/φρεάτιο 0,05% γλουταραλδεύδη (Polysciences) σε 0,02M PBS (αλατούχο φωσφορικό διάλυμα) με pH 7,4 και αφέθηκαν για 20 λεπτά. Αφού πλύθηκαν οι πλάκες με τον ίδιο τρόπο, καλύφθηκαν με 15% BSA (αλβουμίνη βόειου ορού) (Applichem Panreac, ITW Companies) σε LSBW, με ποσότητα 100μl/πηγάδι και τοποθετήθηκαν για όλη τη νύχτα στους 4°C (ψυγείο). Την επόμενη μέρα οι πλάκες πλύθηκαν και προστέθηκαν τα δείγματα των ορών των ψαριών με 1:100 αραιώση σε 0,02M PBS + 0,1% Tween-20, ποσότητα 50μl/φρεάτιο και αφέθηκαν για μια ώρα. Στον αρνητικό μάρτυρα δεν προστέθηκε ορός τσιπούρας. Μετά την πλύση, οι πλάκες γέμισαν με διάλυμα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού έναντι της ανοσοσφαιρίνης IgM της τσιπούρας (anti-sea bream IgM MAb) (Aquatic Diagnostics Ltd) (1:33 αραιώση) με ποσότητα 50μl/φρεάτιο και αφέθηκαν για μια ώρα. Αφού πλύθηκαν, στα φρεάτια της πλάκας προστέθηκε διάλυμα με αντισώματα ενάντια στην ανοσοσφαιρίνη G του ποντικού συζευγμένα με υπεροξειδάση (anti-mouse IgG HRP) (Sigma) με αραιώση 1:1000 σε 5% ορό κατσίκας σε LSBW, με ποσότητα 50μl/φρεάτιο και αφέθηκαν για μια ώρα. Μετά τη τελευταία πλύση προστέθηκαν 50μl/φρεάτιο χρωμογόνου διαλύματος TMB (tetramethylbenzidine) (Alfa Aesar) για 2 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη 25μl 2M H₂SO₄. Τέλος η ανάπτυξη χρώματος σε κάθε πλάκα μετρήθηκε σε ένα φωτόμετρο μικροπλακών MR-96A (MINDRAY) σε μήκος κύματος 450nm. Στην διαδικασία της ELISA οι αναλύσεις και οι συγκρίσεις γίνονται με βάση «τριπλέτες» ορών (ατομικά δείγματα ορών από τρία ψάρια ανά εμβολιακή ομάδα και δειγματοληψία). Με αυτόν τον τρόπο τα αποτελέσματα είχαν επαναληπτικό χαρακτήρα.

2.10.2. Διαδικασία Western Blot

Η ανάλυση των αντιγόνων έναντι των οποίων αντιδρούν οι οροί που απομονώθηκαν έγινε με τη χρήση της μεθόδου Western Blot. Αρχικά, τα αντιγόνα των βακτηριακών κυττάρων και των δύο βακτηρίων διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας το μη-συνεχές μετουσιωτικό σύστημα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα 12% πολυακρυλαμίδης [SodiumDodecylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)] (Bio-Rad, Mini protein Tetra System) (Laemmli, 1970), για τον διαχωρισμό των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες ταξινομούνται κατά μοριακό βάρος. Οι πρωτεΐνες στην συνέχεια μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PolyVinylidene Fluoride - PVDF) (Bio-Rad), μέσω ηλεκτρομεταφοράς (transblotting-electric transfer) (Bio-Rad, Trans-Blot Cell) (Towbin, 1979).

Η ανάλυση Western Blot που εφαρμόστηκε ήταν παραλλαγή της μεθόδου που αναπτύχθηκε από τους Bakopoulos *et al* (1997). Η μεμβράνη πάνω στην οποία είχαν μεταφερθεί τα αντιγόνα των βακτηρίων επώαστηκε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 1% BSA (αλβουμίνη βόειου ορού) (Applichem Panreac, ITW Companies), διαλυμένο σε Tween – Tris buffered Saline (TTBS) (ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο χρησιμοποιείται για το ξέπλυμα της μεμβράνης). Ακολούθησε επώαση αυτής για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με τα δείγματα των ορών των ψαριών (πρώτο αντίσωμα) σε 1:100 αραιώση σε TTBS. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε πολυκάναλη συσκευή Western Blot και διαφορετικός ορός τοποθετήθηκε σε κάθε κανάλι. Μετά το πλύσιμο των καναλιών η μεμβράνη επώαστηκε να για 90 λεπτά με μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού, έναντι ανοσοσφαιρίνης IgM της τσιπούρας (anti-sea bream IgM MAb) (Aquatic Diagnostics Ltd) σε 1:300 αραιώση σε TTBS (δεύτερο αντίσωμα). Αφού πλύθηκαν, στα κανάλια προστέθηκε αντιορός ενάντια στην ανοσοσφαιρίνη IgG του ποντικού (A-mouse IgG biotin conjugate) (Chemicon), αναπτυγμένος σε κατσίκια σε 1:1000 αραιώση σε TTBS, με τα αντισώματα να είναι συζευγμένα με βιοτίνη και αφέθηκε να επωαστεί για 45 λεπτά. Ακολουθεί ομοίως, πλύσιμο και προσθήκη αντιδραστηρίου στρεπταβιδίνης συζευγμένης με υπεροξειδάση (HRP streptavidin conjugate) (Jena Bioscience) σε 1:250 αραιώση σε TTBS και αφήνεται να επωαστεί για 45 λεπτά. Μετά τη τελευταία πλύση προστέθηκε χρωμογόνο διάλυμα (4-chloro-naphthol) στην μεμβράνη, η οποία αφέθηκε να επωαστεί

σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, έως ότου αναπτυχθούν επαρκώς χρωματισμένες αντιδράσεις. Η αντίδραση σταμάτησε με την βύθιση της μεμβράνης σε απιονισμένο νερό για 5 λεπτά. Έπειτα, η μεμβράνη στεγνώθηκε και αμέσως φωτογραφήθηκε. Για την διαδικασία του Western Blot οι τριάδες ορών ενώνονταν σε ένα δείγμα.

2.11. Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του εργαλείου στατιστικών υπολογισμών R μέσω εκτίμησης της επιβίωσης με καμπύλες Kaplan-Meier και με χρήση των τεστ ANOVA και LSD. Η τιμή p δείχνει κατά πόσο διαφέρουν τα εμβόλια μεταξύ τους, καθώς και τη διαφορά του κάθε εμβολίου σε σύγκριση με τους μάρτυρες σε ότι αφορά την επιβίωση των ψαριών και τη χυμική ανοσολογική απόκριση. Όταν η τιμή αυτή είναι μικρότερη από τη τιμή 0,05 που ορίστηκε, τότε υπάρχει μεγάλη στατιστική διαφορά, ενώ όταν η τιμή $p > 0,05$ τότε δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων αποτελεσμάτων. (Γναρδέλλης, 2003).

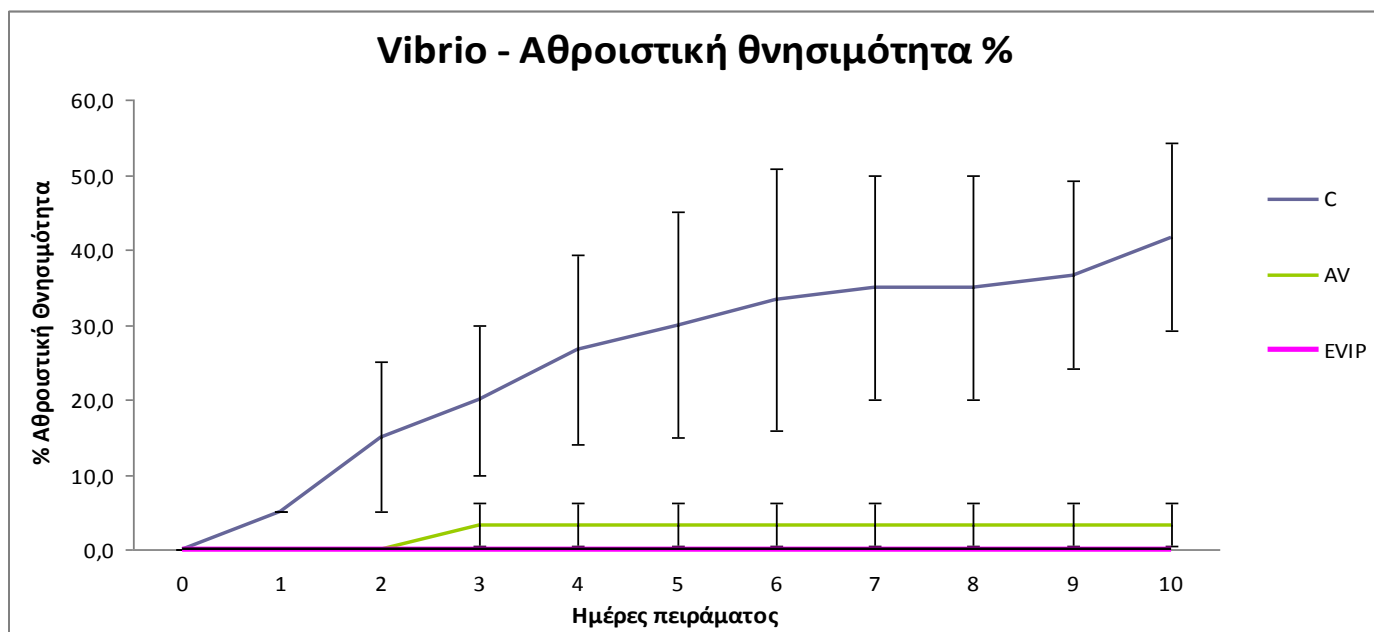
3. Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων

Τα αποτελέσματα της πειραματικής μόλυνσης με *V. anguillarum* 53 ημέρες από τον εμβολιασμό των ψαριών φαίνονται στον πίνακα 3.1 και απεικονίζονται στο διάγραμμα 3.1.

Πίνακας 3.1: Ποσοστά αθροιστικής θνησιμότητας των ψαριών ανά ημέρα, μόλυνση με *V. anguillarum* (C=control/μάρτυρες, AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, EVIP= διδύναμο πειραματικό)

<i>V.anguillarum</i> - Αθροιστική θνησιμότητα %			
Ημέρες μετά τη μόλυνση	C	AV	EVIP
0	0,0	0,0	0,0
1	5,0	0,0	0,0
2	15,0	0,0	0,0
3	20,0	3,3	0,0
4	26,7	3,3	0,0
5	30,0	3,3	0,0
6	33,3	3,3	0,0
7	35,0	3,3	0,0
8	35,0	3,3	0,0
9	36,7	3,3	0,0
10	41,7	3,3	0,0



Διάγραμμα 3.1: Εξέλιξη των ποσοστών αθροιστικής θνησιμότητας ψαριών ανά ημέρα, μετά από μόλυνση με *V. anguillarum* (C=control/μάρτυρες, AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, EVIP= διδύναμο πειραματικό).

Το πείραμα διήρκησε συνολικά 12 μέρες. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι η ομάδα των ψαριών με τη μεγαλύτερη αθροιστική θνησιμότητα να καταγράφεται στην ομάδα των μαρτύρων. Το ποσοστό αθροιστικής θνησιμότητας στην ομάδα που εμβολιάστηκε με το AV χαμηλό. Στην ομάδα των ψαριών που ήταν εμβολιασμένα με το δίδυμο πειραματικό εμβόλιο Evip δεν παρατηρήθηκε θνησιμότητα.

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα R:

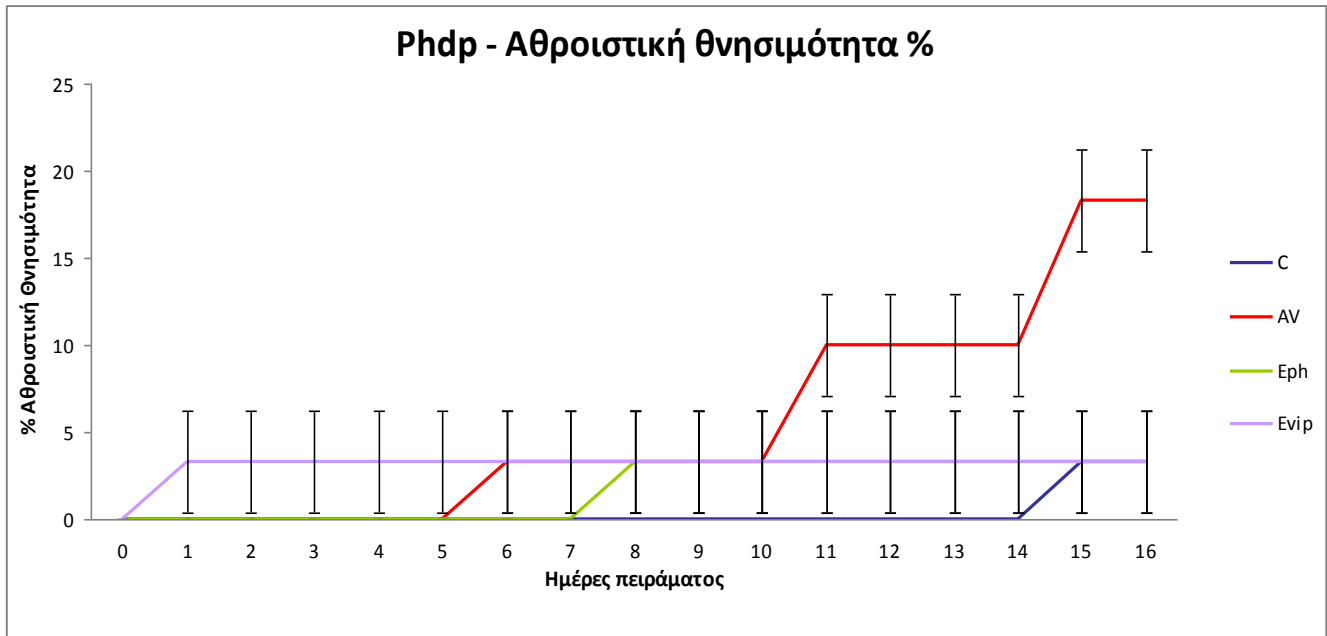
- Υπολογίστηκε σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ της θνησιμότητας των μαρτύρων (C) σε σύγκριση με τις θνησιμότητες στις υπόλοιπες ομάδες: $p = < 0,002 \times 10^{-13}$
- Τα υπόλοιπα εμβόλια μεταξύ τους δεν είχαν σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα (AV–Evip: $p = 0,0978$).

Στον πίνακα 3.2 και διάγραμμα 3.2 δίνονται τα αθροιστικά ποσοστά θνησιμότητας των ψαριών κατά τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης με το Phdp, 65 ημέρες από τον εμβολιασμό τους.

Πίνακας 3.2: Ποσοστά αθροιστικής θνησιμότητας των ψαριών ανά ημέρα, μόλυνση με Phdp (C=control/μάρτυρες, AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, Evip= δίδυμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό)

Phdp - Αθροιστική θνησιμότητα %				
Ημέρες μετά τη μόλυνση	C	AV	Eph	Evip
0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	0,0	0,0	0,0	3,3
2	0,0	0,0	0,0	3,3
3	0,0	0,0	0,0	3,3
4	0,0	0,0	0,0	3,3
5	0,0	0,0	0,0	3,3
6	0,0	3,3	0,0	3,3
7	0,0	3,3	0,0	3,3
8	0,0	3,3	3,3	3,3
9	0,0	3,3	3,3	3,3

10	0,0	3,3	3,3	3,3
11	0,0	10,0	3,3	3,3
12	0,0	10,0	3,3	3,3
13	0,0	10,0	3,3	3,3
14	0,0	10,0	3,3	3,3
15	3,3	18,3	3,3	3,3
16	3,3	18,3	3,3	3,3



Διάγραμμα 3.2: Εξέλιξη των ποσοστών αθροιστικής θνησιμότητας ψαριών ανά ημέρα, μετά από μόλυνση με Phdp (C=control/μάρτυρες, AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, Evip= διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό).

Το πείραμα συνολικά διήρκεσε 16 μέρες. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι η ομάδα των ψαριών με τη μεγαλύτερη αθροιστική θνησιμότητα ήταν του εμβολίου AV, αν και η πρώτη θνησιμότητα παρατηρείται την 6η μέρα του πειράματος. Αντιθέτως η ομάδα του διδύναμου πειραματικού εμβολίου Evip έδωσε θνησιμότητα την 2η μέρα και μέχρι το τέλος του πειράματος το ποσοστό παρέμεινε το ίδιο. Στην ομάδα του μονοδύναμου πειραματικού εμβολίου Eph, αν και μικρό ποσοστό, παρατηρήθηκε θνησιμότητα από την 8η μέρα του πειράματος. Τα ψάρια μάρτυρες έδωσαν πολύ χαμηλή θνησιμότητα μόνο προς τις τελευταίες μέρες του πειράματος και έτσι δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή αποτελέσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των εμβολίων που δοκιμάσθηκαν.

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα R:

- Υπολογίστηκε στατιστική διαφορά μεταξύ της θνησιμότητας των ψαριών που εμβολιάστηκαν με το AV σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες: $p = 0,0161$

Το σχετικό ποσοστό επιβίωσης (RPS) υπολογίστηκε και στις δύο περιπτώσεις την τελευταία μέρα του πειράματος στις ομάδες των ψαριών που υπήρχαν θνησιμότητες. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Σχετικό ποσοστό επιβίωσης (RPS) των εμβολιασμένων ομάδων μετά τις πειραματικές μολύνσεις με *V. anguillarum* και Phdp.

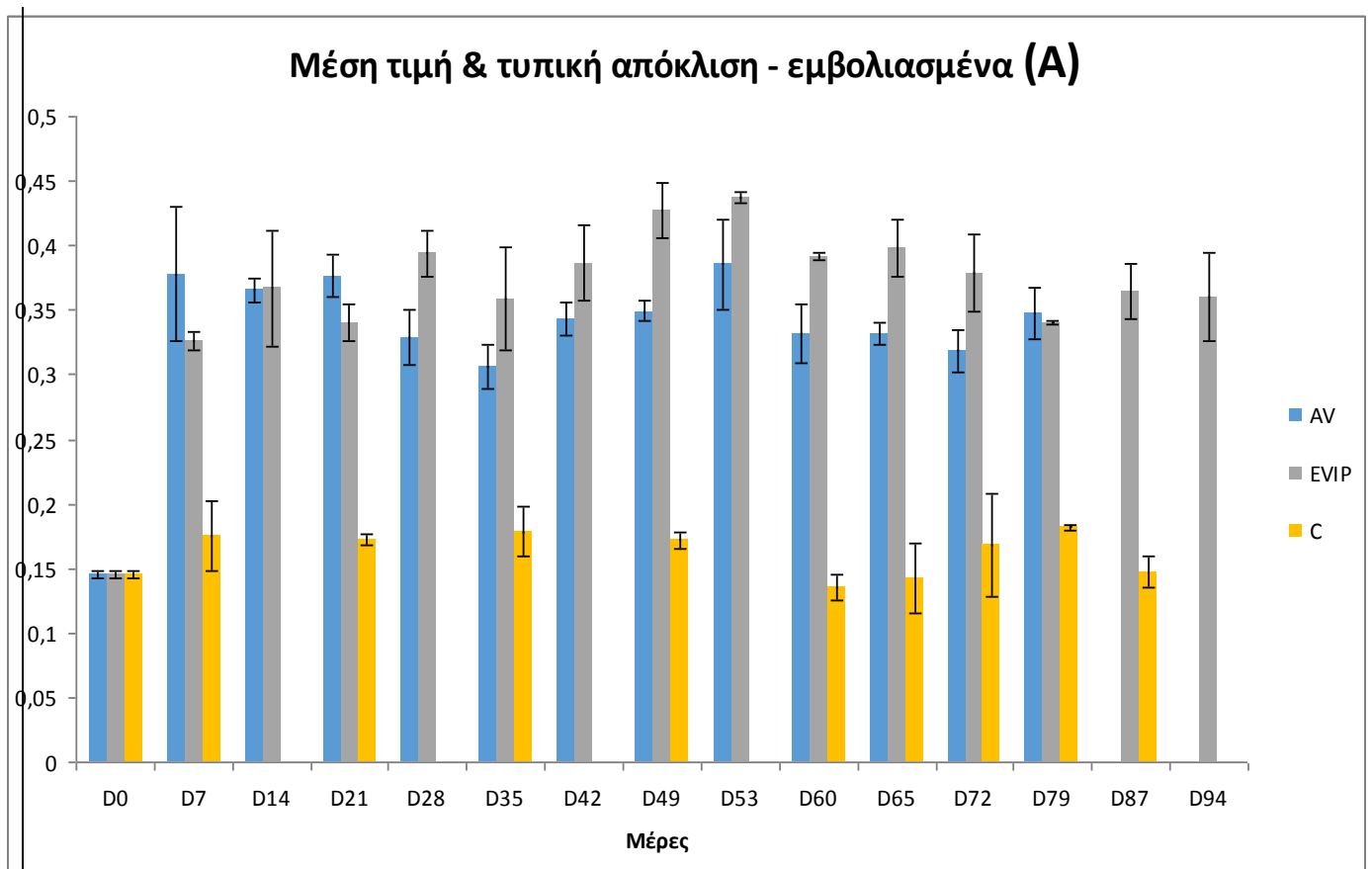
RPS = 1 - (% θνησιμότητα ανοσοποιημένων ατόμων / %θνησιμότητα μαρτύρων)*100					
<i>V. anguillarum</i>			<i>Phdp</i>		
	AV	Evip	AV	Eph	Evip
	92,0	100	-445,0	0,0	0,0

Στην περίπτωση με τη μόλυνση με το *V. anquillarum* και τα δύο εμπορικά εμβόλια έδωσαν μεγάλο ποσοστό επιβίωσης, ενώ το πειραματικό Ενίρ πέτυχε 100% προστασία. Στην περίπτωση με τη μόλυνση με το Rhδρ το εμβόλιο AV παρουσίασε αρνητικό ποσοστό επιβίωσης λόγω της μεγαλύτερης θνησιμότητας σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Τα άλλα δύο πειραματικά εμβόλια δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά όσον αφορά την επιβίωση σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Στα εμβόλια Erh και Ενίρ το ποσοστό θνησιμότητας ήταν ακριβώς το ίδιο με το ποσοστό θνησιμότητας με τους μάρτυρες.

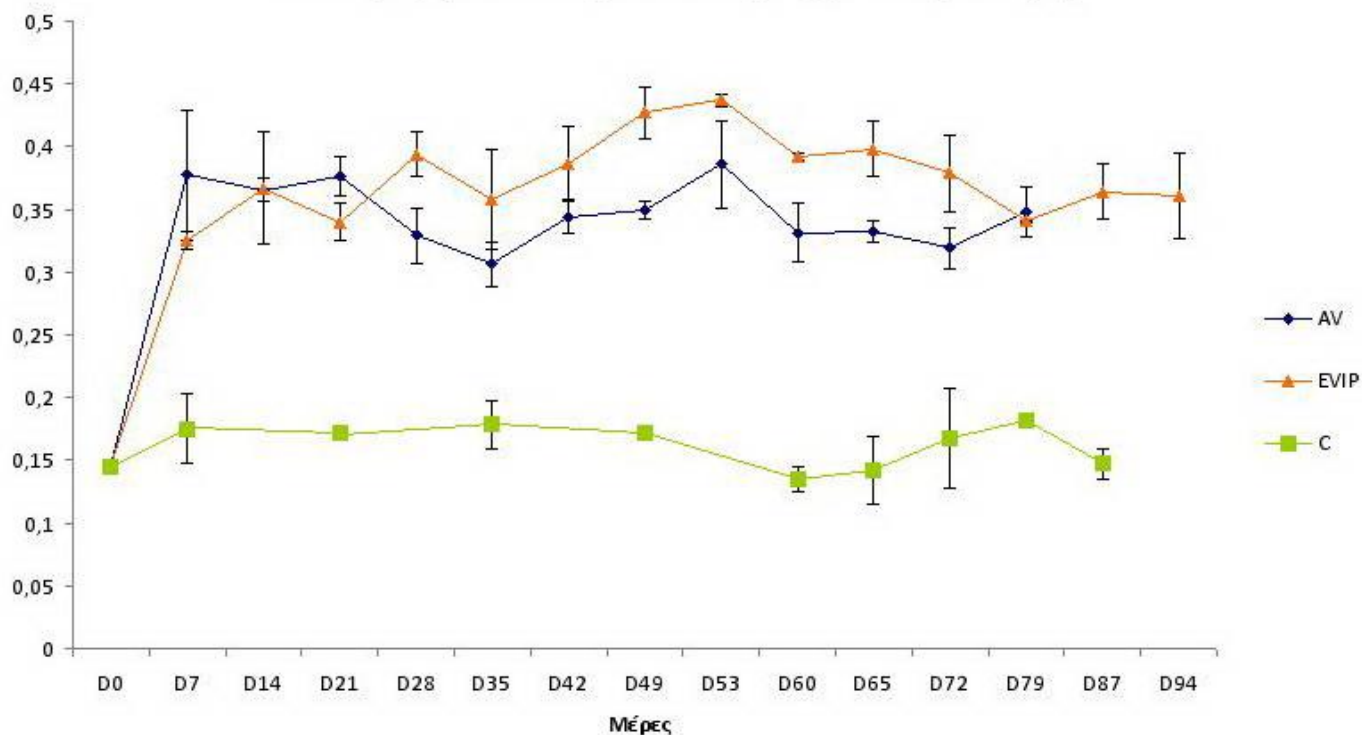
3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης ELISA

3.2.1. Ανάλυση δειγμάτων ορού στις ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν με εμβόλια που περιείχαν αντιγόνα του *V. anquillarum*

Στα διαγράμματα 3.2.1 που ακολουθούν δίνονται οι τιμές του επιπέδου των ειδικών αντισωμάτων των ορών των εμβολιασμένων ψαριών έναντι του *V. anquillarum*.



Μέση τιμή & τυπική απόκλιση - εμβολιασμένα (B)



Διάγραμμα 3.2.1. Εξέλιξη των ειδικών τίτλων αντισωμάτων έναντι του *V. anguillarum*. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες). Παρουσίαση σε: (A) ράβδους & (B) γραμμές

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.2.1 (A) μεγαλύτερες τιμές τίτλων ειδικών αντισωμάτων έναντι του *V. anguillarum*, προκάλεσε το διδύναμο πειραματικό εμβόλιο Evip ακολουθούμενο από το εμπορικό εμβόλιο AV. Συγκεκριμένα υπάρχει αύξηση, με μικρές διακυμάνσεις από την ημέρα D7 μέχρι την ημέρα D53 και μετά ακολουθεί πτώση έως το τέλος του πειράματος, με μικρές διακυμάνσεις. Το εμπορικό εμβόλιο AV σημειώνει αύξηση στις τιμές από την ημέρα D7 έως την ημέρα D21, μετά ακολουθεί μία πτώση μέχρι την ημέρα D35 και μετά ξανά παρατηρείται άνοδος ως την ημέρα D53 και έπειτα φαίνεται μία πτωτική πορεία με μικρές διακυμάνσεις ως την ημέρα D72 και άνοδος στο τέλος του πειράματος. Αντιθέτως χαμηλότερες τιμές τις έδωσε η ομάδα των μαρτύρων (C) με μικρές διακυμάνσεις.

3.2.1.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των τιμών της ELISA για τα εμβολιασμένα ψάρια έναντι του *V. anguillarum*, όπως υπολογίστηκαν με βάση το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας R.

I. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μεταξύ των ομάδων για όλη τη χρονική περίοδο

Η σύγκριση μεταξύ των αντιδράσεων της ανάλυσης ELISA με το βακτήριο *V. anguillarum* για τα εμβολιασμένα ψάρια, έδειξε πως δεν παρουσιάζεται στατιστική διαφορά μεταξύ του εμπορικού εμβολίου AV με το πειραματικό διδύναμο Evip (AV-Evip: $p = 0,174$). Η σύγκριση όμως τόσο του εμπορικού AV όσο και του πειραματικού διδύναμου Evip με τα ψάρια μάρτυρες παρουσιάζει στατιστική διαφορά. Πιο συγκεκριμένα AV-C : $p=0,012 \times 10^{-7}$ και Evip- C : $p=0,02 \times 10^{-5}$.

II. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μεταξύ τους μέσα σε κάθε ομάδα

Στον πίνακα 3.4 στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο AV, παρατηρείται μια αύξηση των τίτλων ειδικών αντισωμάτων τις ημέρες 8, 12 και 21. Τα αποτελέσματα αυτών των ημερών ανήκουν σε ομάδα R τα οποία αλληλοκαλύπτονται και ταυτόχρονα δείχνουν αύξηση στις τιμές των αντιδράσεων σε σύγκριση με τη προηγούμενη ομάδα R που ανήκει η μέρα 0. Στην πορεία παρατηρείται μια πτώση των τιμών οι οποίες αντιστοιχούν στις ημέρες 28 και 35. Στην συνέχεια υπάρχει πάλι μια αύξηση των τίτλων ειδικών αντισωμάτων που αντιστοιχεί στις ημέρες 42, 49 και 53 με τα αποτελέσματα της ημέρας 53 να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με της ημέρας 35 και 42. Τέλος στις ημέρες 60, 65 και 72 παρατηρείται μείωση των τιμών και μια μικρή αύξηση ξανά την τελευταία μέρα του πειράματος, την 79η αλλά χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

Στον πίνακα 3.5 στα ψάρια που εμβολιάστηκαν με το διδύναμο πειραματικό εμβόλιο Evip, παρατηρείται μια πρώτη αύξηση, με σημαντική στατιστική διαφορά, την 8η ημέρα του πειράματος και εν συνεχεία την 12η μέρα. Στην πορεία υπάρχει μια διακύμανση των τιμών με μικρές διαφορές. Η επόμενη μεγάλη αύξηση των τίτλων ειδικών αντισωμάτων παρατηρείται την 49η και 53η ημέρα, με σημαντική στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τις προηγούμενες ημέρες. Από την 60η ημέρα και μέχρι το τέλος του πειράματος οι διακυμάνσεις στις τιμές γίνονται με μικρές διαφορές μεταξύ τους, γι' αυτό και οι ομάδες R που ανήκουν οι τιμές, αλληλοκαλύπτονται.

Πίνακας 3.4: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το *V. anguillarum*- εμπορικό εμβόλιο AV - εμβολιασμένα ψάρια.

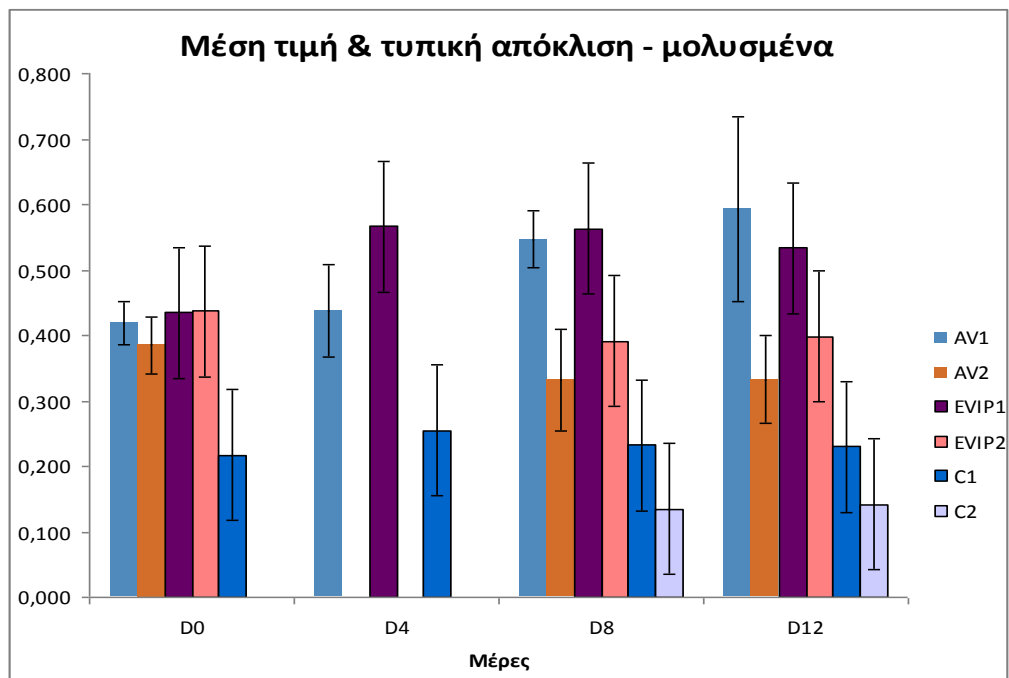
(modvib)	means AV non infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv AV
1	0	0,145000	f	0,003000
2	8	0,377667	ab	0,051926
3	12	0,365667	abc	0,009018
4	21	0,376667	ab	0,016073
5	28	0,329000	cde	0,021517
6	35	0,306333	e	0,017388
7	42	0,343333	bcde	0,012583
8	49	0,349333	abcd	0,007506
9	53	0,385667	a	0,035233
10	60	0,331667	cde	0,023029
11	65	0,332000	cde	0,008718
12	72	0,319000	de	0,016371
13	79	0,347667	bcd	0,020133

Πίνακας 3.5: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το *V. anguillarum*- πειραματικό εμβόλιο Evip (διδύναμο)- εμβολιασμένα ψάρια.

(modvib)	means EVIP non infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv EVIP
1	0	0,145000	g	0,003000
2	8	0,325667	f	0,007234
3	12	0,367000	cde	0,044508
4	21	0,340000	ef	0,014422
5	28	0,394000	bcd	0,018193
6	35	0,358333	def	0,039829
7	42	0,386667	cd	0,028868
8	49	0,427000	ab	0,021071
9	53	0,437000	a	0,004583
10	60	0,391667	bcd	0,002517
11	65	0,398333	abc	0,022368
12	72	0,379000	cde	0,030348
13	79	0,340333	ef	0,001155
14	87	0,364333	cdef	0,021733
15	94	0,361000	cdef	0,034117

3.2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΟΡΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΠΟΥ ΜΟΛΥΝΘΗΚΑΝ ΜΕ *VIBRIO ANQUILLARUM*

Στο διάγραμμα 3.2.2 που ακολουθεί δίνονται οι τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των ορών των εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με *V. anguillarum*. Η μόλυνση έγινε 53 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Η μέρα μηδέν (D0) είναι η αντίστοιχη μέρα 53 (D53) των εμβολιασμένων.



Διάγραμμα 3.2.2: Εξέλιξη των ειδικών τίτλων αντισωμάτων έναντι του *V. anguillarum* στα εμβολιασμένα ψάρια (νούμερα 2) μετά τη μόλυνση (νούμερα 1) με *V. anguillarum*. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, Evip= διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες)

Στο διάγραμμα 3.2.2 απεικονίζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών των τίτλων των ειδικών αντισωμάτων των ορών αίματος εμβολιασμένων ψαριών και εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με *V. anguillarum*. Τα αποτελέσματα αυτά είναι 53 ημέρες αφούτου

εμβολιάστηκαν. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα υψηλότερες αντιδράσεις παρουσιάζουν οι ομάδες των εμβολιασμένων/μολυσμένων (AV1, Evip1, C1) ψαριών σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των εμβολιασμένων (AV2, Evip2, C2). Όπως φαίνεται, η μόλυνση στα εμβολιασμένα ψάρια που επιβίωσαν μάλλον λειτούργησε ως αναμνηστικός εμβολιασμός.

3.2.2.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των τιμών της ELISA των εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με το βακτήριο *V. anguillarum*.

I. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν και εμβολιασμένων για όλη την περίοδο

Στον πίνακα 3.5 καταγράφονται οι στατιστικές διαφορές των αποτελεσμάτων από τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με *V. anguillarum* και εμβολιασμένων ψαριών.

Πίνακας 3.6: Στατιστική διαφορά τιμών των αντιδράσεων της ανάλυσης ELISA με το βακτήριο *V. anguillarum* και σύγκριση ομάδων εμβολιασμένων – εμβολιασμένων/μολυσμένων ψαριών την ίδια περίοδο

Ομάδα ψαριών	Μέση τιμή	Group R	P
C inf	0.2308333	a	p=0.03x10 ^{-3****}
C	0.1385000	b	
AV vac/inf	0.5194444	a	p=0.03x10 ^{-3****}
AV vac	0.3497778	b	
Evip vac/inf	0.5106667	a	p=0.006x10 ^{-2****}
Evip vac	0.4090000	b	

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα έναντι του *V. anguillarum*, οι τίτλοι ειδικών αντισωμάτων στις ομάδες εμβολιασμένων και εν συνεχεία μολυσμένων ψαριών, είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότεροι σε σύγκριση με τους τίτλους ειδικών αντισωμάτων των αντίστοιχων εμβολιασμένων ομάδων.

II. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μόνο μεταξύ των εμβολιασμένων και κατόπιν μολυσμένων ομάδων

Κατόπιν στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων από τη σύγκριση μεταξύ των τιμών των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των ομάδων των εμβολιασμένων ομάδων που μολύνθηκαν με το *V. anguillarum*, για όλη τη χρονική περίοδο, προκύπτει πως η σύγκριση των εμβολίων AV και Evip δεν είναι σημαντική (AV_{vac/inf} – Evip_{vac/inf} : p = 0,667)

III. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μεταξύ τους μέσα σε κάθε ομάδα

Τα αποτελέσματα του εμβολίου AV στα εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια (βλ. πιν. 3.7) δείχνουν στατιστικώς σημαντική διαφορά τις μέρες 0 και 12, καθώς είναι οι μόνες που ανήκουν σε διαφορετική ομάδα R. Στη συγκεκριμένη ομάδα εμβολίου παρατηρείται μια συνεχόμενη αύξηση στις τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων με τη μεγαλύτερη τιμή την 12η και τελευταία μέρα του πειράματος.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα στο δίδυμο πειραματικό εμβόλιο Evip στα εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια (βλ. πιν. 3.8), δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ τους με εξαίρεση μόνο τη μέρα μηδέν. Όλες οι τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων, εκτός της μέρας 0, ανήκουν στην ίδια ομάδα R, παρόλο που παρατηρείται μια μικρή μείωση στη τιμή της αντίδρασης.

Πίνακας 3.7: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το *V. anguillarum* - εμπορικό εμβόλιο AV – εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια.

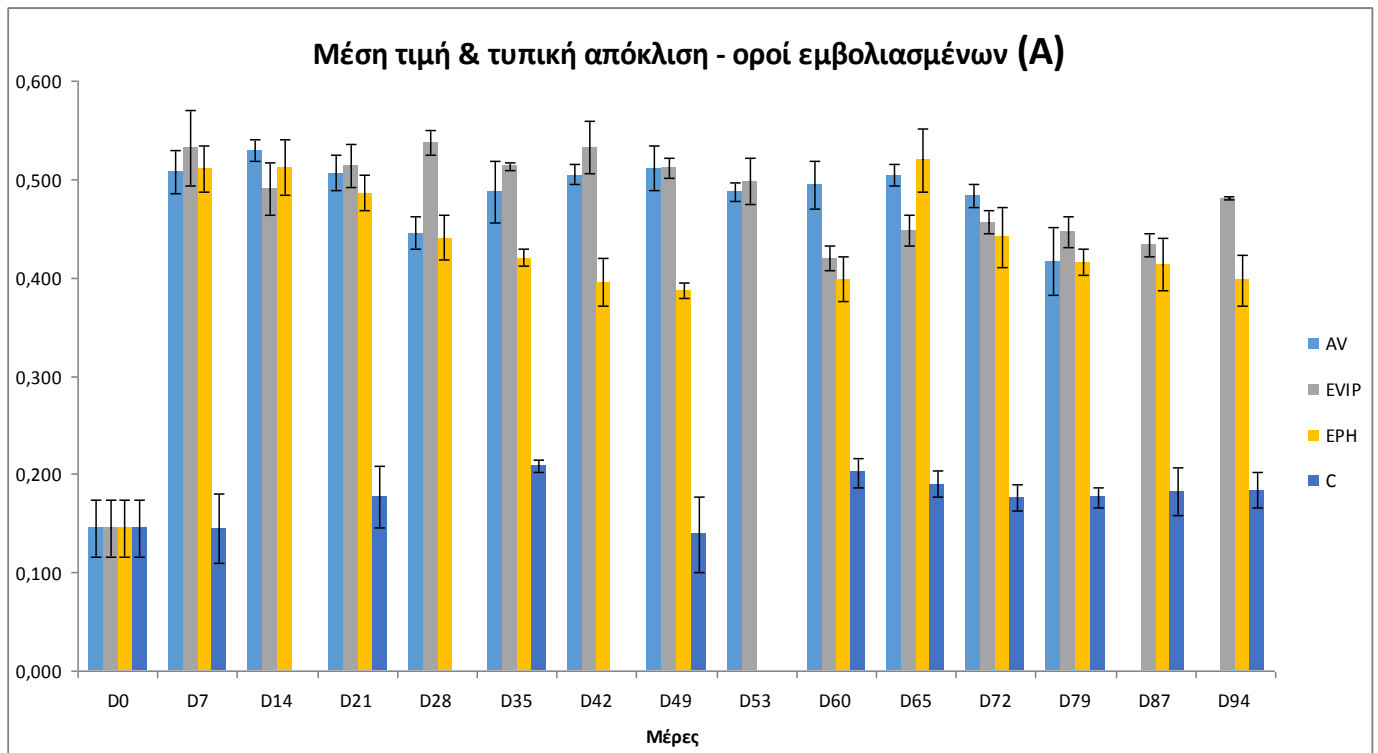
(modvib)	means AV infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv AV
1	0	0,418667	b	0,032624
2	4	0,438000	ab	0,070534
3	8	0,547000	ab	0,043139
4	12	0,592667	b	0,140785

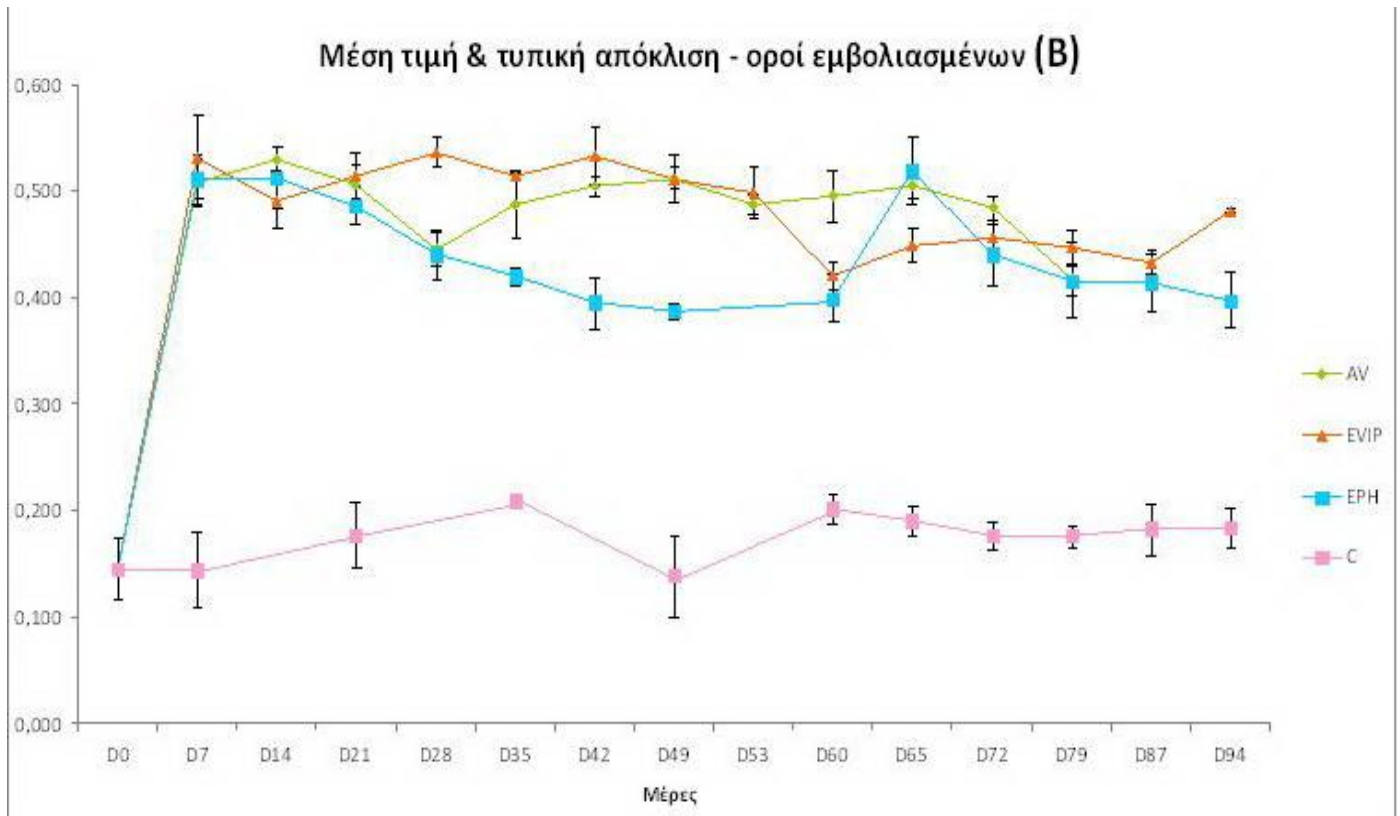
Πίνακας 3.8: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το *V. anguillarum* - πειραματικό εμβόλιο Evip (δίδυμο) – εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια.

(modvib)	means Evip infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv Evip
1	0	0,435000	b	0,031953
2	4	0,566000	a	0,021932
3	8	0,563000	a	0,057940
4	12	0,534000	a	0,021656

3.2.3 Ανάλυση δειγμάτων ορού κατά τη διάρκεια του πειράματος στα εμβολιασμένα ψάρια έναντι του Phdρ

Στα διαγράμματα 3.2.3 δίνονται οι τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών έναντι του Phdρ.





Διάγραμμα 3.2.3.: Εξέλιξη των ειδικών τίτλων αντισωμάτων έναντι του Phdp μετά τον εμβολιασμό. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες). Παρουσίαση σε: (A) ράβδους & (B) γραμμές

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 3.2.3 (A), υψηλές τιμές τίτλων ειδικών αντισωμάτων έναντι του Phdp κατά τη διάρκεια του πειράματος μετρήθηκαν για όλα εμβόλια, με διαφορετική εικόνα το καθένα. Πιο συγκεκριμένα, το εμπορικό εμβόλιο AV δείχνει μία σχετικά σταθερή πορεία, με όχι τόσο έντονες διακυμάνσεις, μία πτώση στους τίτλους την ημέρα D28 και άλλη μία στο τέλος του πειράματος. Το πειραματικό μονοδύναμο εμβόλιο Eph έχει έναν πιο έντονο χαρακτήρα, καθώς σημειώνει αύξηση από την ημέρα D0 ως D7 και έπειτα πτώση ως την ημέρα D49. Στην συνέχεια μία μικρή άνοδο από την ημέρα D60 ως D65 και μετά πάλι πτώση μέχρι το τέλος του πειράματος. Το πειραματικό διδύναμο εμβόλιο Evip έχει μικρές διακυμάνσεις κατά την διάρκεια του πειράματος με μία πτώση στις τιμές την ημέρα D60, ενώ μετά παρουσιάζει μία ανοδική πορεία μέχρι το τέλος του πειράματος. Τις χαμηλότερες τιμές όπως αναμενόταν, κατέγραψε η ομάδα των μαρτύρων.

3.2.3.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των τίτλων ειδικών αντισωμάτων έναντι του Phdp. Όπως και για το *V. anguillarum*, η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το Phdp.

I. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μεταξύ των ομάδων για όλη τη χρονική περίοδο

Το εμπορικό εμβόλιο AV και τα πειραματικά εμβόλια Eph (μονοδύναμο) και Evip (διδύναμο) δεν διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (AV-Evip: $p = 0,104$ και AV- Eph: $p = 0,426$). Αντιθέτως, σημαντικά υψηλότερη στατιστική διαφορά παρατηρείται ανάμεσα στις ομάδες των εμβολίων AV, Eph και Evip σε σύγκριση με τους μάρτυρες (control) ($p < 0,002 \times 10^{-13}$ για όλα τα συγκρινόμενα ζεύγη).

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται στη σύγκριση μεταξύ των δύο πειραματικών εμβολίων, με το Evip να υπερτερεί του Eph. (Evip- Eph: $p = 0,034$). Τόσο από τα παραπάνω

αποτελέσματα, όσο και από την στατιστική επεξεργασία φαίνεται ότι στα συγκεκριμένα διδύναμα σκευάσματα δεν παρατηρείται κάποιο φαινόμενο ανοσοκαταστολής με πρόκληση μικρότερης παραγωγής ειδικών αντισωμάτων έναντι των μικροοργανισμών για τους οποίους προορίζονται, αλλά μάλλον η ύπαρξη πολλαπλών αντιγόνων και από τους δύο μικροοργανισμούς δρα ευεργετικά, όπως φαίνεται από τη σύγκριση με το μονοδύναμο σκευάσμα.

II. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μεταξύ τους μέσα σε κάθε ομάδα

Στα εμβολιασμένα με το AV ψάρια (βλ. πιν. 3.9), οι μέρες που οι τίτλοι ειδικών αντισωμάτων διαφέρουν στατιστικά είναι οι μέρες 0, 14 και 28, όπως και οι μέρες 72, 79 σε σύγκριση με τις ημέρες 0 και 14. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα η πρώτη σημαντική διαφορά και αύξηση τιμής των τίτλων ειδικών αντισωμάτων παρατηρείται την 8η και 14η μέρα του πειράματος. Στη συνέχεια από την 21η μέρα παρατηρείται πτώση των τιμών της αντίδρασης όπως και την 28η μέρα με σημαντική στατιστική διαφορά. Οι τιμές δείχνουν άνοδο ξανά από την ημέρα 35 μέχρι και την ημέρα 49 χωρίς σημαντική στατιστική διαφορά. Από την ημέρα 53 μέχρι και την ημέρα 72 υπάρχει μια διακύμανση τιμών, αλλά χωρίς σημαντική διαφορά. Τέλος, την 79η και τελευταία μέρα του πειράματος υπάρχει μείωση ξανά αλλά αυτή τη φορά με σημαντικά στατιστική διαφορά, εφόσον διαφέρουν και οι ομάδες R που ανήκουν.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα στα εμβολιασμένα ψάρια με το διδύναμο πειραματικό εμβόλιο Enip (βλ. πιν. 3.10), παρατηρείται η πρώτη σημαντική αύξηση των τίτλων ειδικών αντισωμάτων την 8η μέρα του πειράματος. Από την 8η και μέχρι και την 53η μέρα υπάρχει μια διακύμανση στις τιμές αλλά χωρίς σημαντικές στατιστικές διαφορές. Το ίδιο συμβαίνει και με τις τιμές των ημερών 60 μέχρι και την 94η και τελευταία μέρα του πειράματος. Μικρές διακυμάνσεις στους τίτλους ειδικών αντισωμάτων, αλλά χωρίς στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Αντιθέτως διαφέρουν στατιστικώς με τα αποτελέσματα των προηγούμενων ημερών εφόσον οι ομάδες R που ανήκουν είναι διαφορετικές.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα στα εμβολιασμένα ψάρια με το μονοδύναμο πειραματικό εμβόλιο Eph (βλ. πιν. 3.11), παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στους τίτλους ειδικών αντισωμάτων των ημερών 8 και 14. Την 21η μέρα υπάρχει μικρή πτώση χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά με τις προηγούμενες ημέρες. Στην πορεία παρατηρείται πτώση στις τιμές των αντιδράσεων από την ημέρα 28 μέχρι και την 49η μέρα του πειράματος, με σημαντική στατιστική διαφορά να παρουσιάζεται την 28η μέρα. Την 60η ημέρα υπάρχει μια μικρή αύξηση χωρίς όμως στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τις προηγούμενες. Την 65η μέρα του πειράματος εμφανίζεται υψηλή τιμή τίτλων ειδικών αντισωμάτων η οποία στατιστικώς συμπίπτει με τις ημέρες 8 και 12. Τέλος από την 72η μέρα μέχρι και την 94η και τελευταία μέρα του πειράματος παρατηρείται μείωση στις τιμές των αντιδράσεων και με σημαντική στατιστική διαφορά μόνο μεταξύ της ημέρας 72 και 94 καθώς ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες R.

Πίνακας 3.9: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το Phdp - εμπορικό εμβόλιο AV – εμβολιασμένα ψάρια

(modphdp)	means AV non infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv AV
1	0	0,145000	d	0,029206
2	8	0,508000	ab	0,021932
3	12	0,529667	a	0,011015
4	21	0,506333	ab	0,017954
5	28	0,445667	c	0,015822
6	35	0,487333	b	0,030989
7	42	0,504667	ab	0,010017
8	49	0,511000	ab	0,022605
9	53	0,487667	b	0,009292
10	60	0,494667	ab	0,024542
11	65	0,504333	ab	0,011015
12	72	0,483667	b	0,011846
13	79	0,416667	c	0,034704

Πίνακας 3.10: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το Phdp – πειραματικό εμβόλιο EVIP – εμβολιασμένα ψάρια

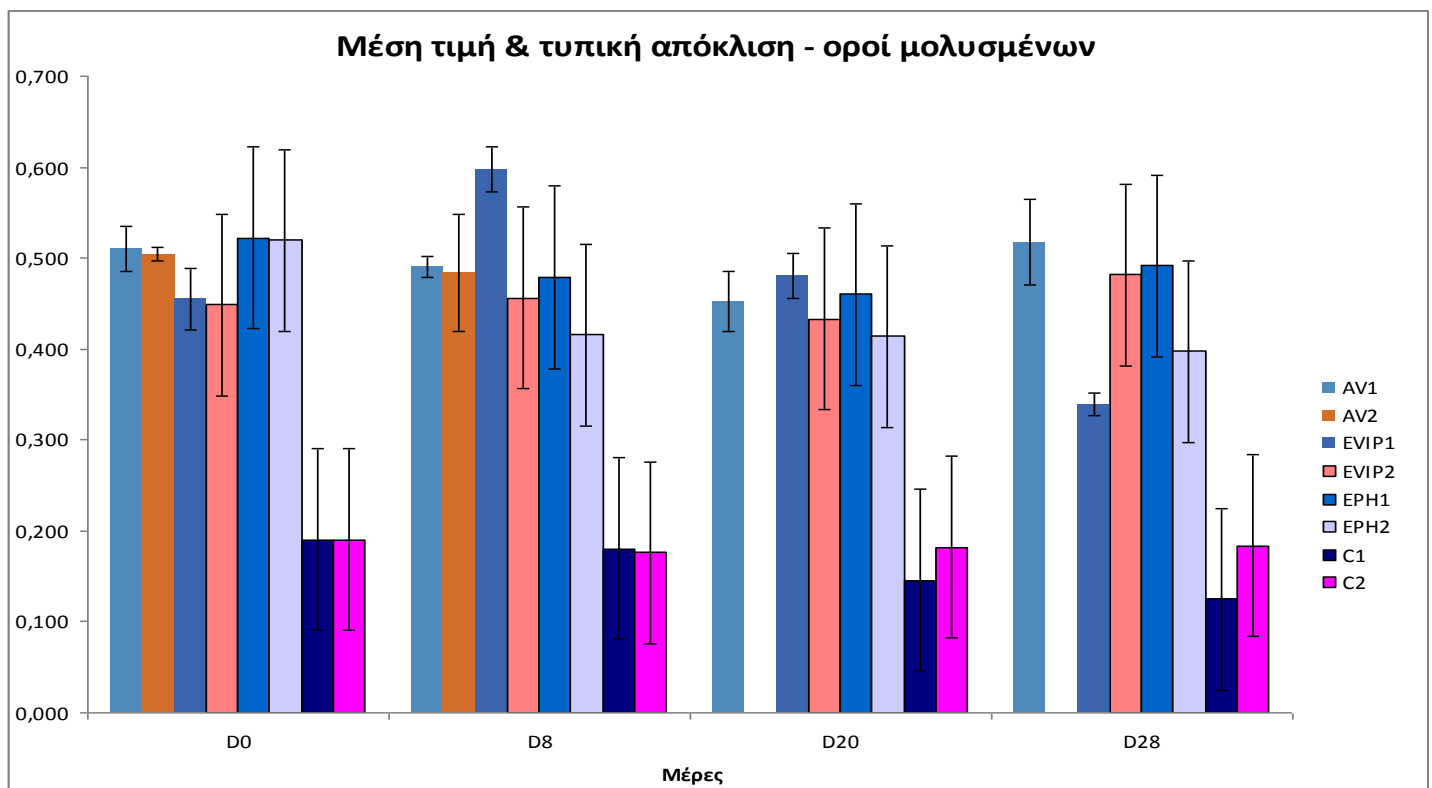
(modphdp)	means EVIP non infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv EVIP
1	0	0,145000	f	0,029206
2	8	0,532000	a	0,039000
3	12	0,490000	b	0,026458
4	21	0,513667	ab	0,022008
5	28	0,536667	a	0,012583
6	35	0,513667	ab	0,003786
7	42	0,533333	a	0,026690
8	49	0,511667	ab	0,010786
9	53	0,498000	b	0,023302
10	60	0,419667	e	0,012503
11	65	0,448333	cde	0,015535
12	72	0,456333	cd	0,012097
13	79	0,446667	de	0,015373
14	87	0,433333	de	0,012055
15	94	0,481333	bc	0,001528

Πίνακας 3.11: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το Phdp – πειραματικό εμβόλιο Eph – εμβολιασμένα ψάρια

(modphdp)	means Eph non infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv Eph
1	0	0,145000	d	0,029206
2	8	0,510333	a	0,023459
3	12	0,512667	a	0,028042
4	21	0,486333	a	0,018230
5	28	0,440333	b	0,022811
6	35	0,420000	bc	0,008544
7	42	0,395000	c	0,024331
8	49	0,387000	c	0,007211
9	53	0,398667	c	0,022679
10	60	0,519333	a	0,031533
11	65	0,441333	b	0,030892
12	72	0,415667	bc	0,013429
13	79	0,413667	bc	0,026539
14	87	0,397333	c	0,026102

3.2.4. Ανάλυση δειγμάτων ορού εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με Phdp

Στο διάγραμμα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με Phdp. Η μόλυνση έγινε 65 μέρες μετά τον εμβολιασμό. Η μέρα μηδέν (D0) είναι η αντίστοιχη με τη μέρα 65 (D65) των εμβολιασμένων.



Διάγραμμα 3.2.4: Εξέλιξη των ειδικών τίτλων αντισωμάτων στα εμβολιασμένα (νούμερα 2) ψάρια που μολύνθηκαν (νούμερα 1) με Phdp. Μέση τιμή και τυπική απόκλιση (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες)

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3.2.4 την όγδοη ημέρα (D8), οι τίτλοι ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων/μολυσμένων (AV1, Evip1, Eph1, C1) αρχίζουν να είναι υψηλότεροι των απλά εμβολιασμένων (AV2, Evip2, Eph2, C2) ψαριών. Την 20η μέρα παρατηρείται αλλαγή στην ομάδα του διδύναμου πειραματικού εμβολίου Evip, η αντίδραση των εμβολιασμένων/μολυσμένων είναι υψηλότερη από αυτή των εμβολιασμένων. Τέλος, την 28η μέρα (D28) παρατηρείται ξανά αλλαγή στις τιμές των αντιδράσεων του διδύναμου πειραματικού Evip με τις τιμές των εμβολιασμένων να είναι υψηλότερες από αυτές των εμβολιασμένων/μολυσμένων.

3.2.4.1. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων ELISA με το πρόγραμμα R

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των τιμών των τίτλων ειδικών αντισωμάτων έναντι του Phdp.

I. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων εμβολιασμένων/μολυσμένων και εμβολιασμένων για όλη τη χρονική περίοδο

Στον πίνακα 3.12 δίνονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας από τη σύγκριση μεταξύ των εμβολιασμένων και κατόπιν μολυσμένων ομάδων με τις απλά εμβολιασμένες ομάδες, την ίδια περίοδο.

Πίνακας 3.12: Στατιστική διαφορά τιμών των τίτλων ειδικών αντισωμάτων έναντι του Phdp, σύγκριση ομάδων εμβολιασμένων – εμβολιασμένων/μολυσμένων ψαριών για όλη τη περίοδο

Ομάδα ψαριών	Μέση τιμή	Group R	P
C vac/inf	0.1591333	b	p=0.01775 *
C vac	0.1817333	a	
AV vac/inf	0.5156667	a	p=0.029 *
AV vac	0.4682222	b	
Evip vac/inf	0.4888667	a	p=0.06345 .
Evip vac	0.4532000	a	
Eph vac/inf	0.5301333	a	p=0.001896 **
Eph vac	0.4374667	b	

Οι τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων και κατόπιν μολυσμένων ψαριών, παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερη στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τις αντίστοιχες απλά εμβολιασμένες ομάδες ψαριών (εκτός των ομάδων Evip). Όπως φαίνεται, και στην περίπτωση των ειδικών τίτλων αντισωμάτων έναντι του φωτοβακτηριδίου η μόλυνση λειτούργησε σαν αναμνηστική ανοσοποίηση στα ψάρια που επιβίωσαν αλλά κρίνοντας και από την υψηλότερη στατιστική διαφορά μεταξύ των ομάδων Eph vac/inf και Eph vac σε σχέση με τις άλλες ομάδες, φαίνεται ότι στη περίπτωση του φωτοβακτηριδίου το μονοδύναμο σκεύασμα φαίνεται να προκαλεί καλύτερα φαινόμενα ανοσολογικής μνήμης.

II. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων για όλη τη χρονική περίοδο μεταξύ των εμβολιασμένων/μολυσμένων ομάδων

Δεν υπάρχει στατιστική διαφορά ανάμεσα στη σύγκριση των εμβολίων AV με E_{ph} ($AV_{vac/inf} - E_{ph\ vac/inf} : p = 0,298$), AV με E_{vip} ($AV_{vac/inf} - E_{vip\ vac/inf} : p = 0,884$) και E_{vip} με E_{ph} ($E_{vip\ vac/inf} - E_{ph\ vac/inf} : p = 0,352$).

III. Σύγκριση τίτλων ειδικών αντισωμάτων μεταξύ τους μέσα σε κάθε ομάδα

Στα αποτελέσματα του εμβολίου AV για τα εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια (βλ. πιν. 3.13), οι μόνες μέρες στις οποίες παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ των τίτλων ειδικών αντισωμάτων, είναι οι μέρες 4 και 12. Σε όλες τις υπόλοιπες μέρες δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ τους αφού τα αποτελέσματα ανήκουν στην ίδια ομάδα R. Την 4η ημέρα παρατηρείται μείωση των τίτλων ειδικών αντισωμάτων, η οποία όμως δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά με την ημέρα 0 και 8. Τις ημέρες 8 και 12 υπάρχει αύξηση τιμών χωρίς όμως να παρατηρείται και στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Από την 16η μέρα μέχρι και την 28η και τελευταία μέρα του πειράματος υπάρχει μια διακύμανση στις τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων οι οποίες όμως δεν παρουσιάζουν σημαντική στατιστική διαφορά μεταξύ τους.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του διδύναμου πειραματικού εμβολίου E_{vip} (βλ. πιν. 3.14), οι μέρες που τα αποτελέσματα τους εμφανίζουν στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους είναι οι μέρες 8, 12 και 16. Από την ημέρα 0 μέχρι και την ημέρα 8 οι τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων αυξάνονται, με σημαντική στατιστική διαφορά να υπάρχει την 8η μέρα. Από την 12η μέρα μέχρι και την 28η και τελευταία ημέρα του πειράματος υπάρχει διακύμανση στις τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων. Σημαντική στατιστική διαφορά παρατηρείται μόνο μεταξύ της 12ης και της 16ης μέρας. Οι υπόλοιπες ημέρες δεν παρουσιάζουν στατιστική διαφορά αφού οι τιμές τους ανήκουν σε ομάδες R που αλληλοκαλύπτονται.

Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα του μονοδύναμου πειραματικού εμβολίου E_{ph} (βλ. πιν. 3.15), στατιστική σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ των ημερών 0, 8 και 12. Από την ημέρα 0 μέχρι την μέρα 8 παρατηρείται μείωση στις τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων, όμως σημαντική στατιστική διαφορά υπάρχει μόνο μεταξύ των ημερών 0 και 8. Την 12η μέρα του πειράματος παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στην τιμή της αντίδρασης και η οποία παρουσιάζει και σημαντική στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων ημερών του πειράματος. Τέλος, από την 16η μέρα μέχρι και την 28η παρατηρούνται διακυμάνσεις στις τιμές των τίτλων ειδικών αντισωμάτων χωρίς όμως να υπάρχει και στατιστική διαφορά.

Πίνακας 3.13: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το Phdp - εμπορικό εμβόλιο AV – εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια.

(modphdp)	means AV infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv AV
1	0	0,510333	abc	0,024132
2	4	0,440333	c	0,012342
3	8	0,490333	abc	0,032624
4	12	0,546333	a	0,047501
5	16	0,527000	ab	0,047286
6	20	0,452333	bc	0,022811
7	24	0,513000	abc	0,050269
8	28	0,517333	abc	0,087272

Πίνακας 3.14: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το Phdp - πειραματικό εμβόλιο E_{vip} (διδύναμο) – εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια.

(modphdp)	means EVIP infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv EVIP
1	0	0,455000	cd	0,026458
2	4	0,499667	bc	0,013503

3	8	0,597333	a	0,067649
4	12	0,421667	d	0,015011
5	16	0,528000	b	0,028160
6	20	0,480333	bc	0,012583
7	24	0,451333	cd	0,021079
8	28	0,490000	bc	0,034395

Πίνακας 3.15: Ομαδοποιημένες μέσες τιμές ορών για το Phdp - πειραματικό εμβόλιο Eph (μονοδύναμο) – εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια.

(modphdp)	means Eph infected			
Δείγμα	Ημέρες	means	Group R	stdv Eph
1	0	0,522000	b	0,026458
2	4	0,488000	bc	0,019925
3	8	0,478667	c	0,023438
4	12	0,698667	a	0,026026
5	16	0,491333	bc	0,007572
6	20	0,460000	c	0,012288
7	24	0,472667	c	0,017388
8	28	0,491333	bc	0,027062

3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot

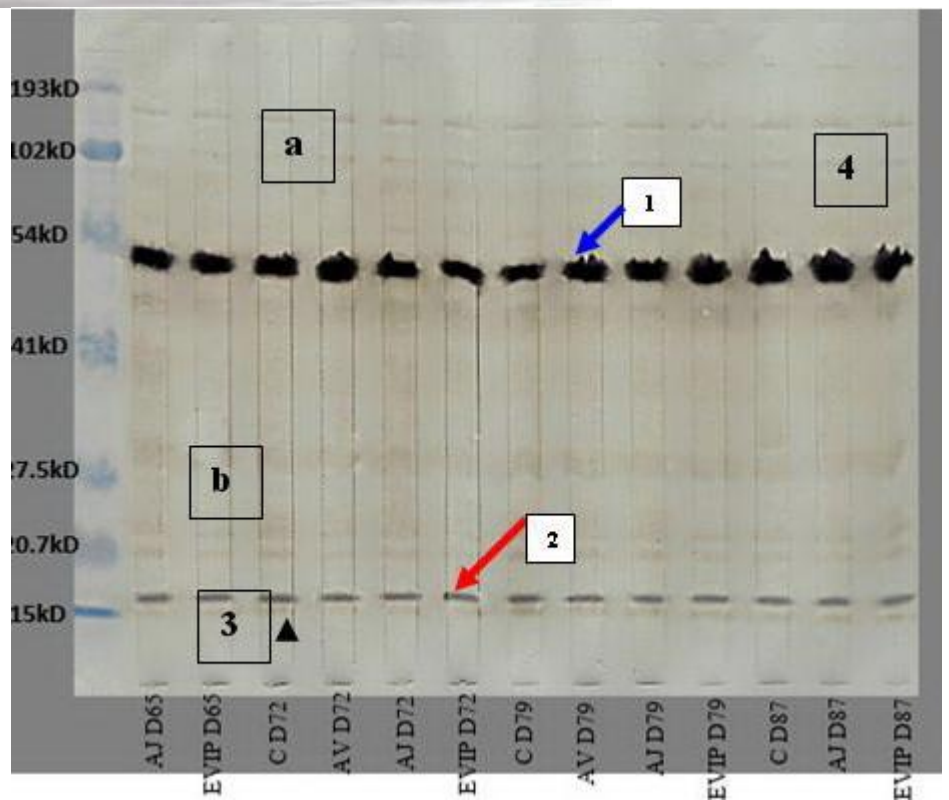
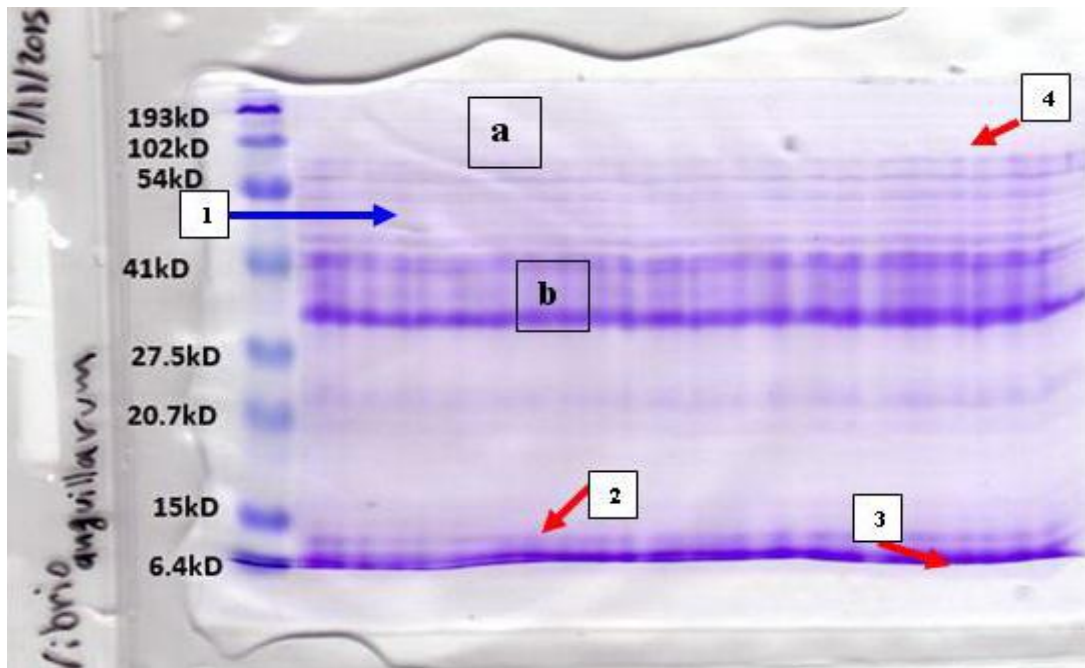
Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται η ειδική αντίδραση των ορών αίματος των εμβολιασμένων ψαριών στη διάρκεια ολόκληρου του πειράματος, χωρισμένα σε δύο κύριες ομάδες: ανάλογα με το βακτήριο και για κάθε ομάδα υπάρχουν δύο υποομάδες, εμβολιασμένων μόνο και εμβολιασμένων που μετέπειτα μολύνθηκαν ψαριών. Η κάθετη στήλη αντιπροσωπεύει τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών και η οριζόντια τον κωδικό του εκάστοτε δείγματος στις απεικονιζόμενες μεμβράνες.

3.3.1. Σύγκριση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου με τις μεμβράνες Western Blot για το *Vibrio anguillarum* και το Phdp. Καθορισμός της φύσης των αντιγόνων που υπάρχει αντίδραση.

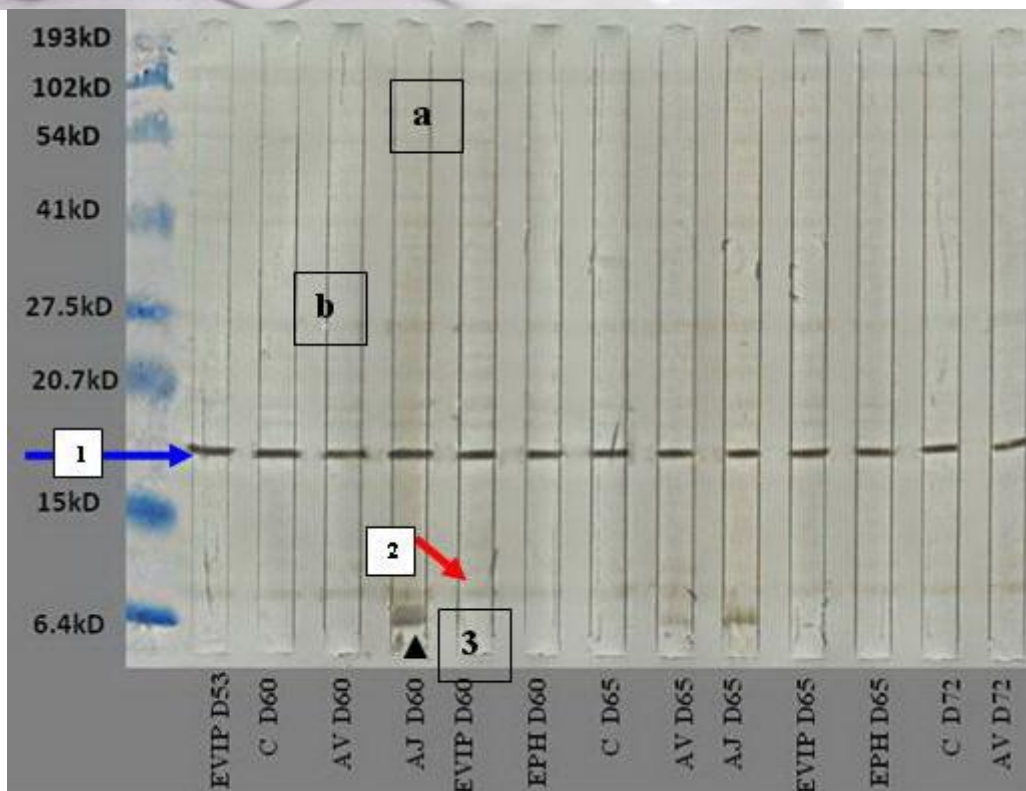
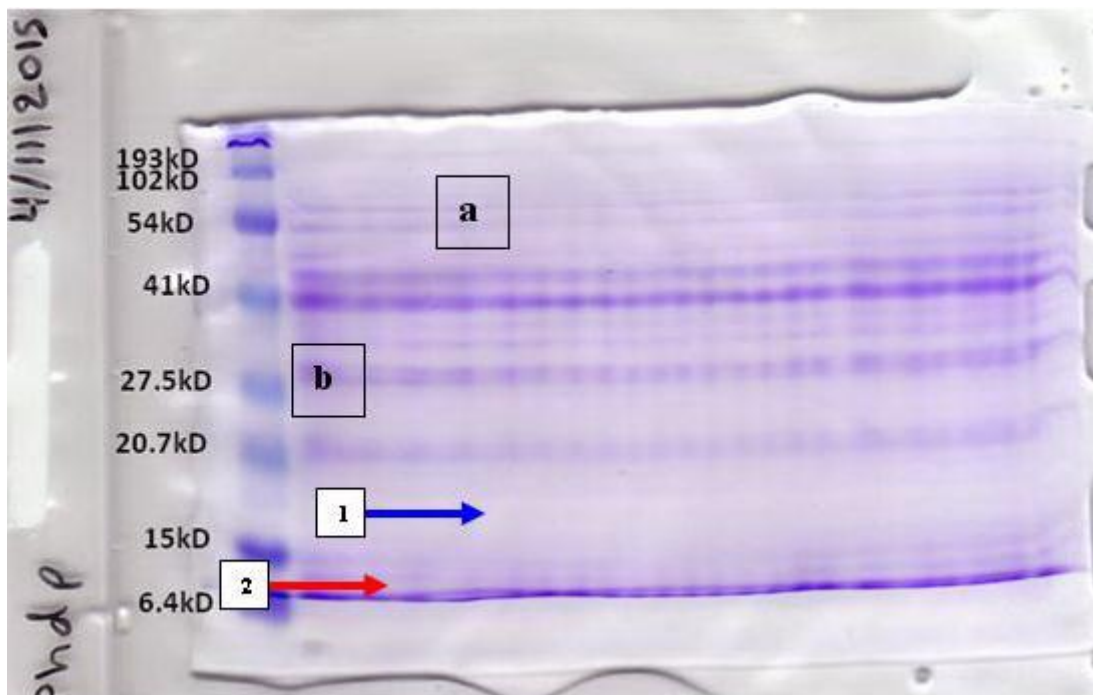
Η σύγκριση του χρωσμένου με Coomassie Blue πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με την μεμβράνη Western Blot, κάνει εμφανές ποιες από τις αντιδράσεις της μεμβράνης είναι πρωτεϊνικής φύσεως. Αντιδράσεις που δεν αντιστοιχούν με χρωσμένα βακτηριακά προϊόντα στα πηκτώματα δεν είναι πρωτεϊνικής φύσης.

Στην περίπτωση του βακτηρίου *Vibrio anguillarum* τα χρωσμένα προϊόντα του πηκτώματος ταυτίζονται με τις αντιδράσεις της μεμβράνης. Οπότε, όλα τα ειδικά αντισώματα που παρήχθησαν ως αντίδραση στην ανοσοποίηση αντιδρούν με πρωτεϊνικά αντιγόνα (κόκκινα βέλη στην εικόνα 3.3.5.1.). Εξάιρεση αποτελεί η αντίδραση λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD, που είναι λιποπολισακχαριδικής φύσης. Στο αντίστοιχο κομμάτι του πηκτώματος υπάρχει ασθενής χρώση (μπλε βέλος, εικόνα 3.3.5.1.).

Στην περίπτωση του βακτηρίου Phdp υπάρχουν διαφορές στην χρώση των βακτηριακών προϊόντων στο πηκτώμα και στις αντιδράσεις της μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των μοριακών βαρών 102kD και 20.7-15kD παρατηρούνται αντιδράσεις, που δεν αντιστοιχούν με χρωσμένα βακτηριακά προϊόντα στο πηκτώμα. Αυτό δείχνει πως τα αντιγόνα αυτά αντιπροσωπεύουν λιποπολισακχαρίδια και όχι πρωτεΐνες (μπλε βέλη, εικόνα 3.3.5.2.). Φυσικά υπάρχουν και χρωσμένα κομμάτια του πηκτώματος που ταυτίζονται με αντιδράσεις στη μεμβράνη. Εκεί γίνεται λόγος για πρωτεΐνες (κόκκινα βέλη εικόνα 3.3.5.2.).



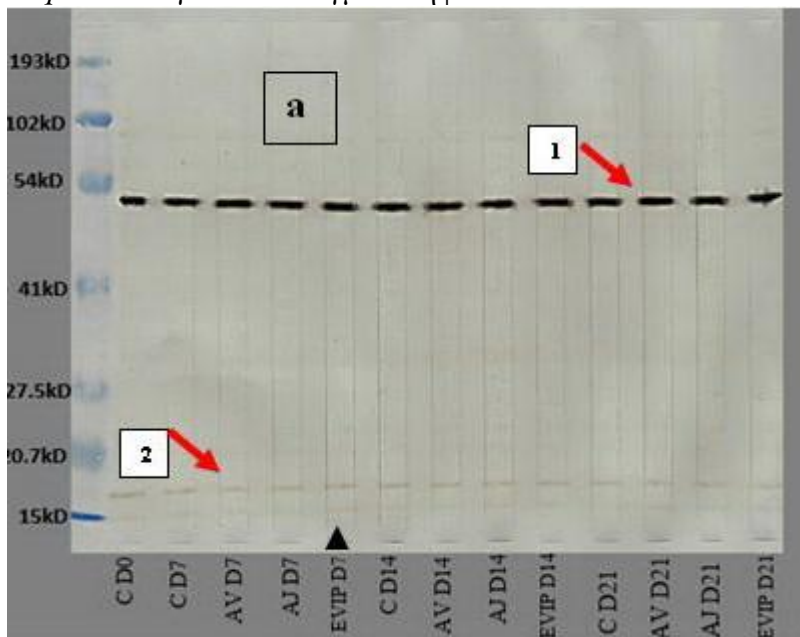
Εικόνα 3.3.5.1: Παράθεση χρωσμένου ηκτώματος πολυακρυλαμίδης (πάνω) με την μεμβράνη Western Blot (κάτω) για το βακτήριο *Vibrio anguillarum*. Τα κόκκινα αριθμημένα βέλη υποδεικνύουν τα αντιγόνα που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες. Το μπλε βέλος υποδεικνύει παρουσία λιποπολισακχαριδίων.



Εικόνα 3.3.5.2: Παράθεση χρωσμένου πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με την μεμβράνη Western Blot για το βακτήριο Phdp. Τα μπλε βέλη υποδεικνύουν τα σημεία της απουσίας στο πήκτωμα και παρουσίας στην μεμβράνη. Τα κόκκινα υποδεικνύουν αντιγόνα που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες.

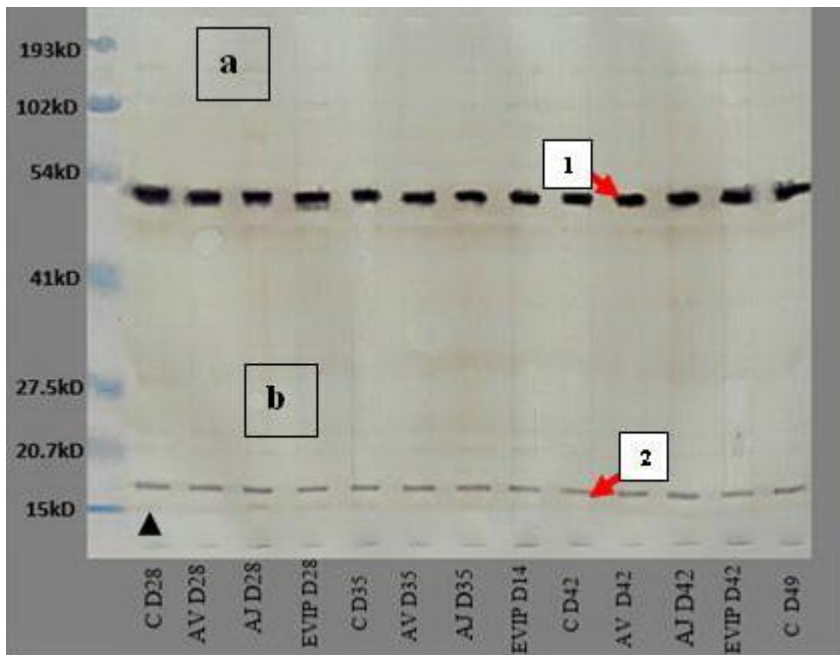
3.3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού κατά τη διάρκεια του πειράματος στις ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν έναντι του *Vibrio anquillarum*

Παρακάτω σε σειρά μεμβρανών WB δίνονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης των αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot των εμβολιασμένων ψαριών έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum* για κάθε δειγματοληψία.



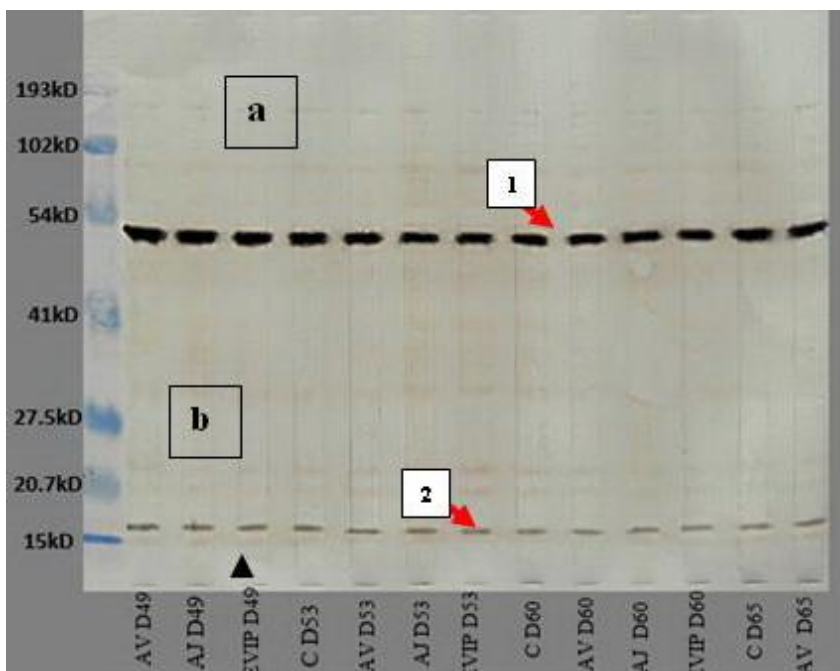
Εικόνα 3.3.1.1: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum*. (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Όπως φαίνεται στην μεμβράνη, υπάρχει πολύ έντονη αντίδραση λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD λιποπολισακχαριδικής φύσης (κόκκινο βέλος 1) έναντι του *V. anguillarum*. Για τις ημέρες 0-21 μετά τον εμβολιασμό δεν παρατηρούνται έντονες αντιδράσεις με άλλα αντιγόνα. Τόσο τα ψάρια μάρτυρες (προς έκπληξή μας), όσο και τα εμβολιασμένα ψάρια έδωσαν τις ίδιες αντιδράσεις, λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος των 15 kD (πρωτεϊνικής φύσεως-κόκκινο βέλος 2) και πολύ αχνή αντίδραση στο μοριακό βάρος 15 kD (μαύρη αιχμή- πρωτεϊνικής φύσης). Αδύνατες αντιδράσεις φαίνονται και μεταξύ 102 και 54kD (πρωτεϊνικής φύσεως- περιοχή a).



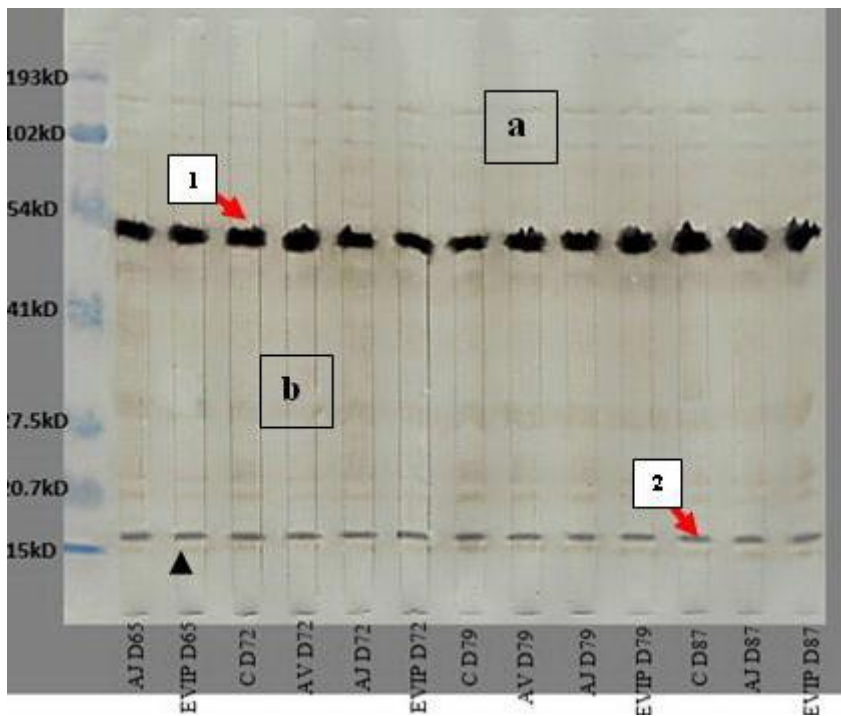
Εικόνα 3.3.1.2: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum* για τις μέρες 28-49(μόνο Control) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Σε αντίθεση με τις ημέρες 0-21 μετά τον εμβολιασμό, τις επόμενες ημέρες μετά τον εμβολιασμό υπάρχουν πιο έντονες αντιδράσεις και στους μάρτυρες και στα εμβολιασμένα ψάρια έναντι του *V. anguillarum*, λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2). Αντίστοιχα παρατηρείται μία αχνή αντίδραση στο μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή) και μία πολύ έντονη αντίδραση λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος 54kD (λιποπολισακχαρίδιο- κόκκινο βέλος 1) έναντι του *V. anguillarum*. Πολύ αχνές επίσης αντιδράσεις παρατηρούνται και στα μοριακά βάρη 102 kD (πρωτεΐνες- περιοχή a), ενδιάμεσα των 54-41kD, 27.5kD και 20.7kD (πρωτεΐνες- περιοχή b).



Εικόνα 3.3.1.3: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum* για τις μέρες 49-65 (C-AV) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

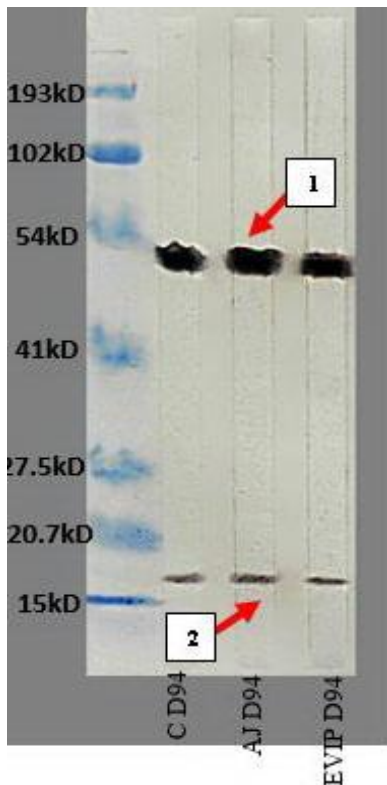
Ομοίως με τις ημέρες 28-49 (μόνο control), υπάρχει έντονη αντίδραση λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος 54kD (λιποπολιστακχαρίδιο - κόκκινο βέλος 1), αντιδράσεις λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2) και μία αχνή αντίδραση στο μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή). Οι πολύ αχνές αντιδράσεις, που παρατηρούνταν στις περιοχές a και b, γίνονται ολοένα και πιο ευδιάκριτες, αλλά χωρίς κάποια σημαντική διακύμανση ανάμεσα στα διαφορετικά εμβόλια.



Εικόνα 3.3.1.4: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum* για τις μέρες 65 (AJ-EVIP) - 87

(AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Τις επόμενες ημέρες στις ομαδοποιημένες αντιδράσεις στις περιοχές a και b παρατηρούνται διακυμάνσεις ανάμεσα στα εμβόλια. Παραμένουν η έντονη αντίδραση λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD (λιποπολιστακχαρίδιο - κόκκινο βέλος 1), οι αντιδράσεις λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος 15 kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2) και η αχνή αντίδραση στο μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή).



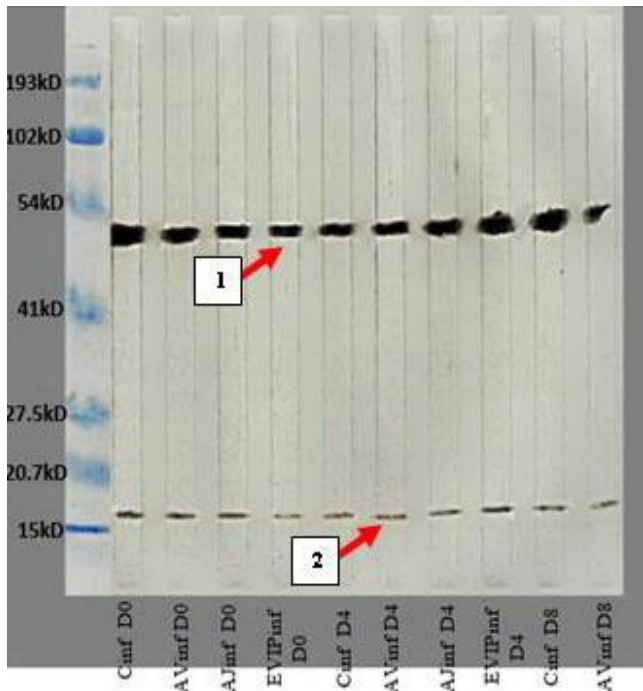
Εικόνα 3.3.1.5: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum* για την ημέρα 94 (AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Ενενήντα τέσσερις ημέρες μετά τον εμβολιασμό παρατηρούνται μόνο οι αντιδράσεις λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD (λιποπολισακχαρίδιο - κόκκινο βέλος 1) και αντιδράσεις λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος 15 kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2).

Η συνολική εικόνα που φαίνεται από τις WB αναλύσεις των ορών των εμβολιασμένων ψαριών έναντι του *V. anguillarum* O1 είναι ότι υπάρχουν αντισώματα στον ορό της τσιπούρας που αντιδρούν πάρα πολύ έντονα με βακτηριακά λιποπολισακχαριδικά προϊόντα στο μοριακό βάρος των 54kD, με αμέσως επόμενο το μοριακό βάρος λίγο πιο πάνω από τα 15kD και λιγότερο στα 15kD. Αυτά τα αντισώματα υπήρχαν και την ημέρα 0 του εμβολιασμού στα ψάρια μάρτυρες, παρατήρηση που μπορεί να συνηγορεί με την ύπαρξη φυσικών αντισωμάτων στα ψάρια. Στα εμβολιασμένα ψάρια παρατηρήθηκαν σε γενικές γραμμές ομοίμορφες αντιδράσεις για όλες τις εμβολιακές ομάδες, αλλά και για τα ψάρια μάρτυρες, όμως το διδύναμο πειραματικό εμβόλιο EVIP τις ημέρες 65 και 72 ξεχωρίζει επειδή δίνει πιο αδύναμες αντιδράσεις σε συγκεκριμένα μοριακά βάρη (περιοχή b) από τις υπόλοιπες ομάδες. Ο εμβολιασμός φαίνεται ότι το μόνο που προκάλεσε ήταν η αύξηση των ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τα ίδια αντιγόνα με αυτά που αναγνωρίζουν τα πιθανά φυσικά αντισώματα.

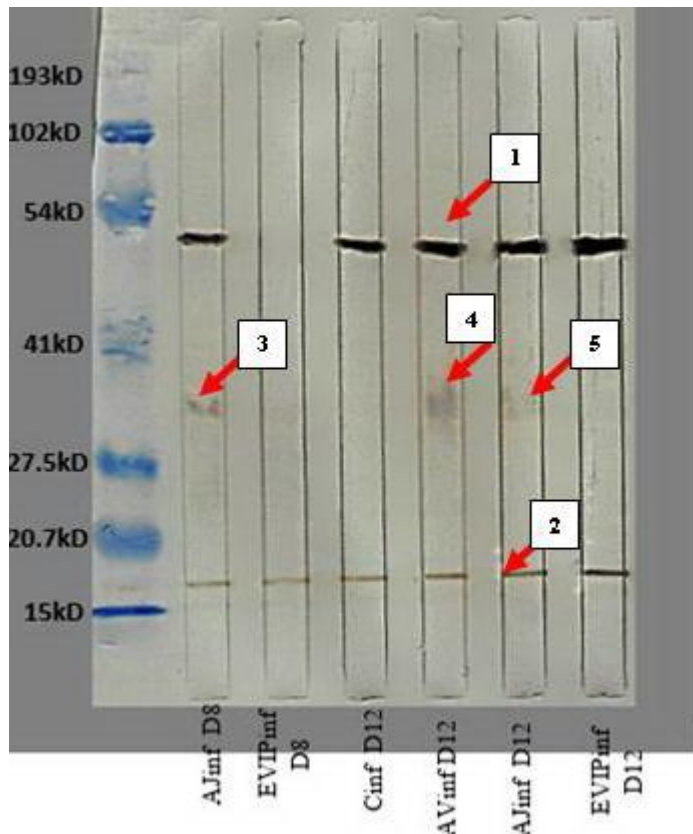
3.3.3. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με *Vibrio anguillarum* κατά τη διάρκεια του πειράματος

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης των αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με το βακτήριο *V. anguillarum*. Η μόλυνση έγινε 53 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Η μέρα μηδέν (D0) είναι η αντίστοιχη μέρα 53 (D53) των εμβολιασμένων.



Εικόνα 3.3.2.1: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν με το *V. anguillarum* για τις μέρες 0-8 (Cinf-AVinf) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Παρόλο που τα εμβολιασμένα ψάρια μολύνθηκαν με το βακτήριο, η ανοσολογική διέγερση που προκλήθηκε οδήγησε σε παραγωγή αντισωμάτων που αντιδρούν με τα ίδια όπως και για τα εμβολιασμένα ψάρια αντιγόνα. Παρατηρούνται δηλαδή μόνο οι αντιδράσεις λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD (λιποπολισακχαρίδιο - κόκκινο βέλος 1) και αντιδράσεις λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2).



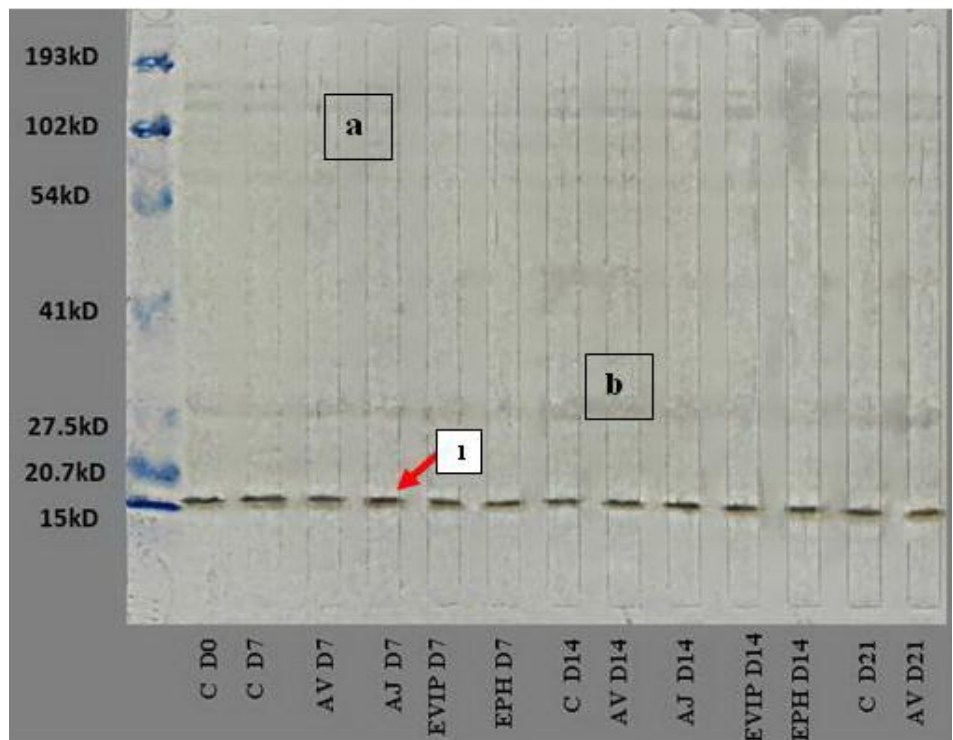
Εικόνα 3.3.2.2: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν με το *V. anguillarum* για τις μέρες 8 (AJinf-EVIPinf) -12 (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Μία διαφορετική εικόνα παρατηρείται μετά την 8^η ημέρα από τη μόλυνση, καθώς, παρόλο που υπάρχουν αντιδράσεις λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD (λιποπολισακχαρίδιο - κόκκινο βέλος 1) και αντιδράσεις λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2), εμφανές είναι πως υπάρχει μία κλιμακωτή αύξηση της αντίδρασης των αντισωμάτων με βακτηριακά προϊόντα στα μοριακά βάρη 41 – 27.5kD στα δείγματα των ομάδων AJinf D8 (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 3), AVinf D12 (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 4) και AJinf D12 (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 5).

Η συνολική εικόνα που φαίνεται από τις WB αναλύσεις των ορών των εμβολιασμένων/μολυσμένων ψαριών έναντι του *V. anguillarum* O1 είναι ότι εκτός της έντονης αντίδρασης έναντι των αντιγόνων που αναγνωρίζονται στα μοριακά βάρη των 54kD και λίγο πιο πάνω από τα 15kD, για το εύρος ημερών 8-12 υπάρχει κλιμακωτή αύξηση της αντίδρασης των αντισωμάτων για το μοριακό βάρος λίγο πιο πάνω από 15kD και μεμονωμένες αντιδράσεις των εμβολίων AJ και AV στα μοριακά βάρη 41– 27.5kD.

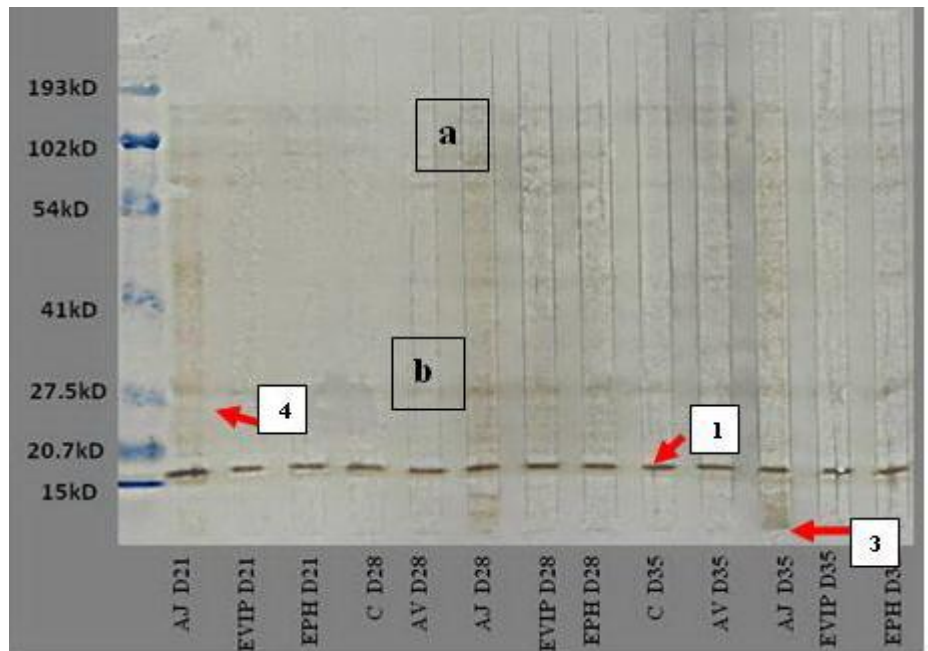
3.3.4.Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού κατά τη διάρκεια του πειράματος στις ομάδες ψαριών που εμβολιάστηκαν έναντι του Phdp

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης των ορών των εμβολιασμένων ψαριών έναντι του βακτηρίου Phdp με την μέθοδο Western Blot για κάθε δειγματοληψία.



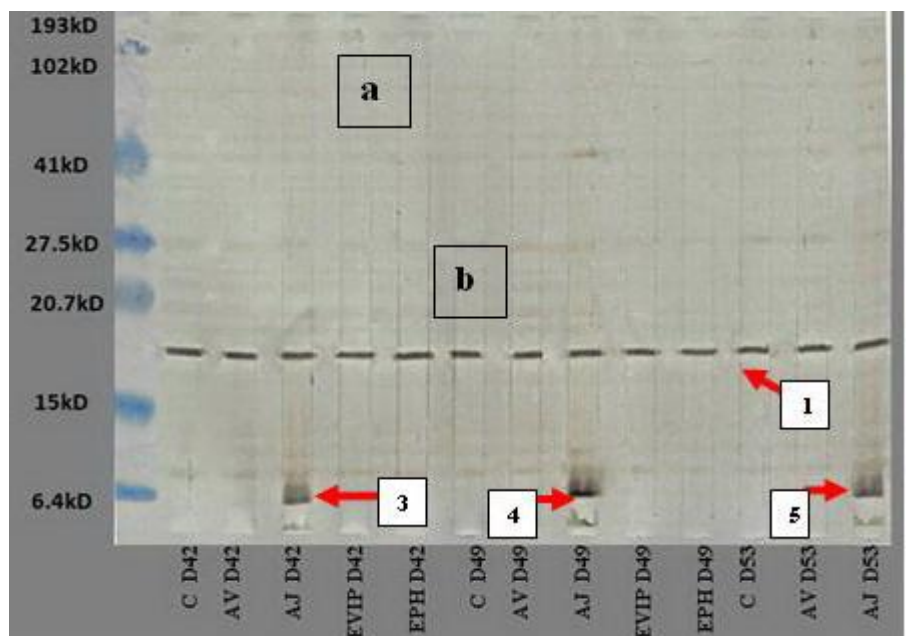
Εικόνα 3.3.3.1: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου Phdp για τις μέρες 0-21(C-AV) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Όπως φαίνεται στην μεμβράνη, υπάρχει πολύ έντονη αντίδραση ανάμεσα στα μοριακά βάρη 20.7-15kD έναντι του Phdp (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) και όπως και για τις αντιδράσεις έναντι του *V. anguillarum*, παρατηρούνται από την ημέρα 0 και τους μάρτυρες. Εμφανείς είναι επίσης αχνές αντιδράσεις, χωρίς όμως κάποια διαφορά ή διακύμανση ανάμεσα στα εμβόλια στα μοριακά βάρη ανάμεσα στα 193 -102kD, 102-54kD (λιποπολισακχαριδικής φύσης- περιοχή a) και 27.5 kD (πρωτεΐνη- περιοχή b). Για το εύρος των ημερών 0-21 μετά τον εμβολιασμό δεν παρατηρούνται πολύ έντονες αντιδράσεις. Τόσο τα ψάρια μάρτυρες, όσο και τα εμβολιασμένα ψάρια έδωσαν παρόμοιες αντιδράσεις.



Εικόνα 3.3.3.2: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου Phdr για τις μέρες 21(AJ- Eph)- 35 (AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, AJ=Alpha Ject 2000, Ενίρ=διδύναμο πειραματικό, Eρh=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

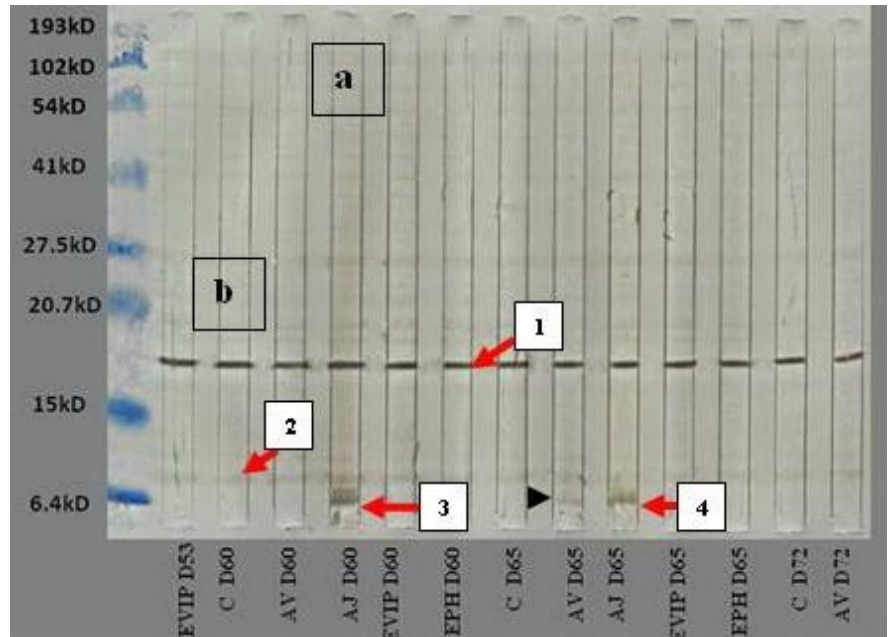
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίδραση που δίνει το εμβόλιο AJ στις ημέρες 21, 28 και 35, καθώς τα αντισώματα που παράχθηκαν μετά την ανοσοποίηση των ψαριών φαίνεται να αναγνωρίζουν μεγάλο αριθμό αντιγόνων με διαφορετικά μοριακά βάρη. Οι αντιδράσεις μοιάζουν εντονότερες για την ημέρα 21 και 35 (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 4&3). Στις περιοχές a και b οι αντιδράσεις είναι ίδιες. Υπάρχει πολύ έντονη αντίδραση ανάμεσα στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1).



Εικόνα 3.3.3.3: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου Phdr για τις μέρες 42- 53(C- AJ) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, AJ=Alpha Ject 2000, Ενίρ=διδύναμο πειραματικό, Eρh=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

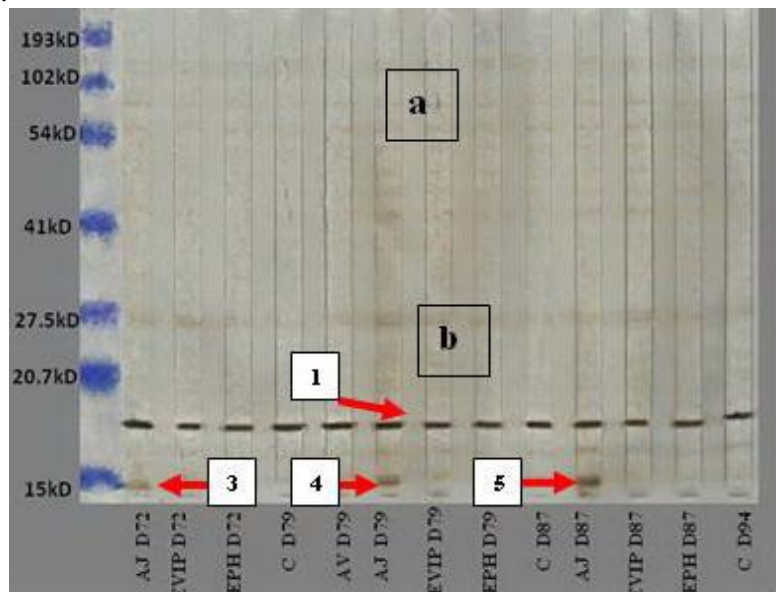
Τις επόμενες ημέρες υπάρχει πολύ έντονη αντίδραση ανάμεσα στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) έναντι του Phdr. Επίσης υπάρχουν πολύ αγνές

αντιδράσεις, χωρίς όμως κάποια διαφορά ή διακύμανση ανάμεσα στα εμβόλια, στις περιοχές a και b. Για ακόμα μία φορά το εμβόλιο Alpha Ject 2000 για τις ημέρες 42, 49 και 53 (πρωτεΐνη- κόκκινα βέλη 3, 4 & 5) παρουσιάζει σχεδόν για όλα τα μοριακά βάρη ομοιόμορφη εικόνα αντίδρασης, με εντονότερη να είναι στα 6.4kD, όπου και συγκεντρώνεται η μεγαλύτερη ποσότητα αντισωμάτων έναντι του Phdp.



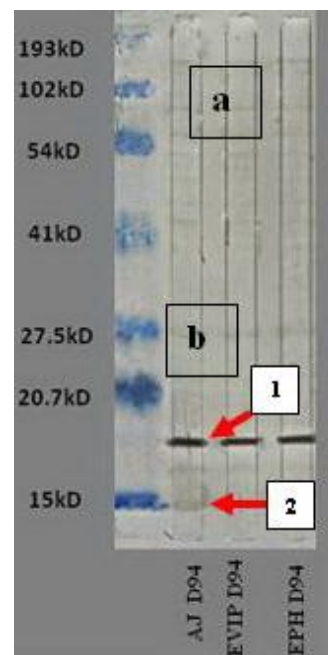
Εικόνα 3.3.3.4: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου Phdp για τις μέρες 53(Envip - Eph)-72(C- AV) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurella*, AJ=Alpha Ject 2000, Envip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D καινούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Ομοίως με τις ημέρες 42-53 (C-AJ), υπάρχει πολύ έντονη αντίδραση ανάμεσα στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) έναντι του Phdp. Ακολουθούν, το εμβόλιο Alpha Ject 2000 για τις ημέρες 60, το οποίο δίνει ομοιόμορφη αντίδραση σε όλα τα μοριακά βάρη και ημέρες 65 (πρωτεΐνη- κόκκινα βέλη 3&4), στο μοριακό βάρος 6.4kD, αμέσως μετά μία μεμονωμένη αντίδραση του εμβολίου AquaVac για την ημέρα 65 (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή) στο μοριακό βάρος 6.4kD και τέλος μία ενιαία αντίδραση λίγο πιο πάνω από το μοριακό βάρος 6.4kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2). Τέλος, πολύ αγχές αντιδράσεις, χωρίς όμως κάποια διαφορά ή διακύμανση ανάμεσα στα εμβόλια υπάρχουν στις περιοχές a και b.



Εικόνα 3.3.3.5: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου Phdp για τις μέρες 72(AJ- Eph)- 94 (μόνο Control) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Συγκριτικά με τις προηγούμενες ημέρες, 72-94 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, οι αντιδράσεις στις περιοχές a και b είναι πιο ευδιάκριτες, χωρίς όμως κάποια διαφορά ή διακύμανση ανάμεσα στα εμβόλια. Υπάρχει πολύ έντονη αντίδραση ανάμεσα στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολιστακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) έναντι του Phdp. Τέλος, το εμβόλιο Alpha Ject 2000 για τις ημέρες 72, 79 και 87 (πρωτεΐνη- κόκκινα βέλη 3, 4 & 5) δίνει ευδιάκριτα πιο έντονη αντίδραση με μεγαλύτερη αυτή στην ημέρα 79, η οποία είναι και ομοιόμορφη κατά μήκος της μεμβράνης για όλα τα μοριακά βάρη.



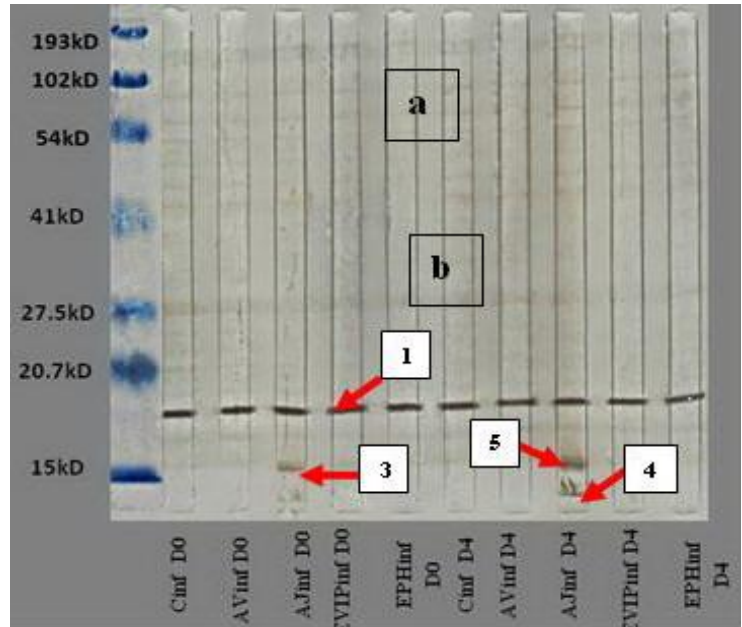
Εικόνα 3.3.3.6: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου Phdp για την ημέρα 94 (AJ- Eph) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Στις τελευταίες δειγματοληψίες παρατηρείται πολύ έντονη αντίδραση στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολιστακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) έναντι του Phdp. Το εμβόλιο Alpha Ject 2000 αντέδρασε έντονα στο μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 2). Αχνές αντιδράσεις παρατηρούνται στις περιοχές a και b.

Η συνολική εικόνα που φαίνεται από τις WB αναλύσεις των ορών των εμβολιασμένων ψαριών έναντι του Phdp είναι ότι υπάρχει έντονη αντίδραση με αντιγόνα λιποπολιστακχαριδικής φύσης στα μοριακά βάρη 20.7-15kD. Το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject προκάλεσε ξεχωριστές αντιδράσεις σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εμβολιακές ομάδες με εντονότερη να είναι αυτή στα 6.4kD. Ακολουθούν παρατηρήσιμες αντιδράσεις στα μοριακά βάρη 193-102kD (αντιγόνα λιποπολιστακχαριδικής φύσης- περιοχή a), 102-54kD και 27.5kD (περιοχή b).

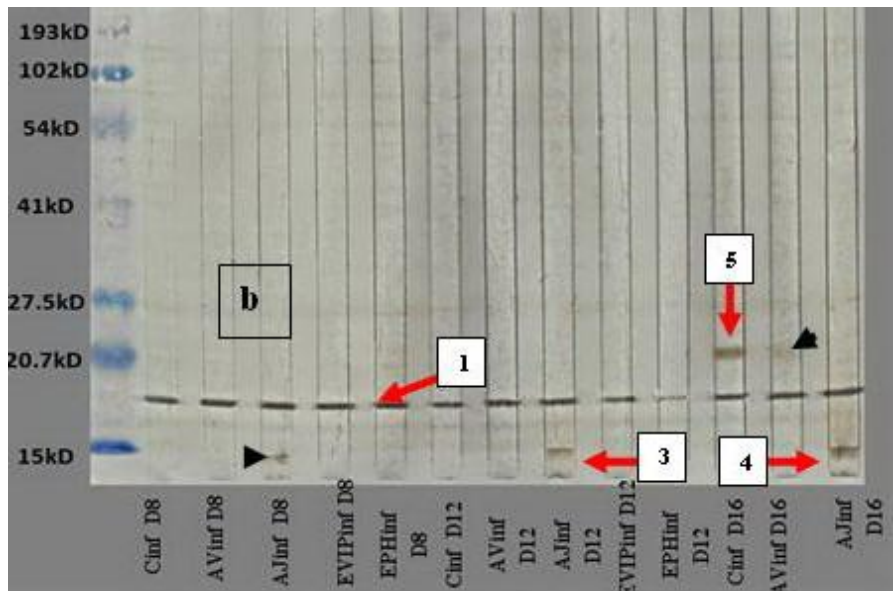
3.3.5. Αποτελέσματα ανάλυσης Western Blot δειγμάτων ορού εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με το Phdp κατά τη διάρκεια του πειράματος

Παρακάτω δίνονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης των αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών που μολύνθηκαν με το βακτήριο Phdp σε βάθος χρόνου. Η μόλυνση έγινε 65 μέρες μετά τον εμβολιασμό. Η μέρα μηδέν (D0) είναι η αντίστοιχη με τη μέρα 65 (D65) των εμβολιασμένων.



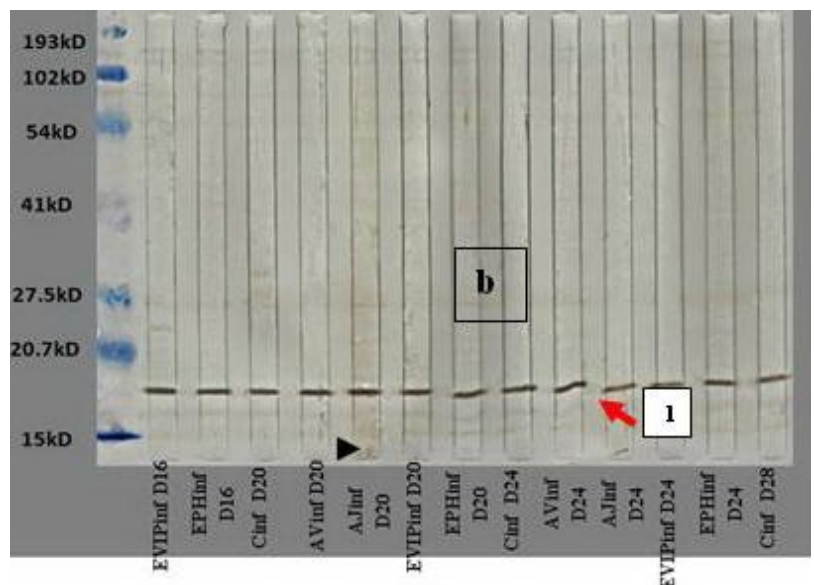
Εικόνα 3.3.4.1: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν με το Phdp για τις μέρες 0 - 4 (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Enip=διδύναμο πειραματικό, Eri=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Παρόλο που τα εμβολιασμένα ψάρια μολύνθηκαν με το βακτήριο δεν παρατηρήθηκαν αντιδράσεις με διαφορετικά αντιγόνα. Παρατηρούνται οι αντιδράσεις στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) και αχνές αντιδράσεις στις περιοχές a και b. Οι οροί από την ομάδα Alpha Ject 2000 για την ημέρα 0 και στο μοριακό βάρος 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 3) προκαλούν ευδιάκριτη αντίδραση και για την ημέρα 4 ομοιόμορφη αντίδραση κατά μήκος της μεμβράνης για όλα τα μοριακά βάρη, με εντονότερη αυτή στα 15kD και πιο κάτω (κόκκινα βέλη 5 & 4).



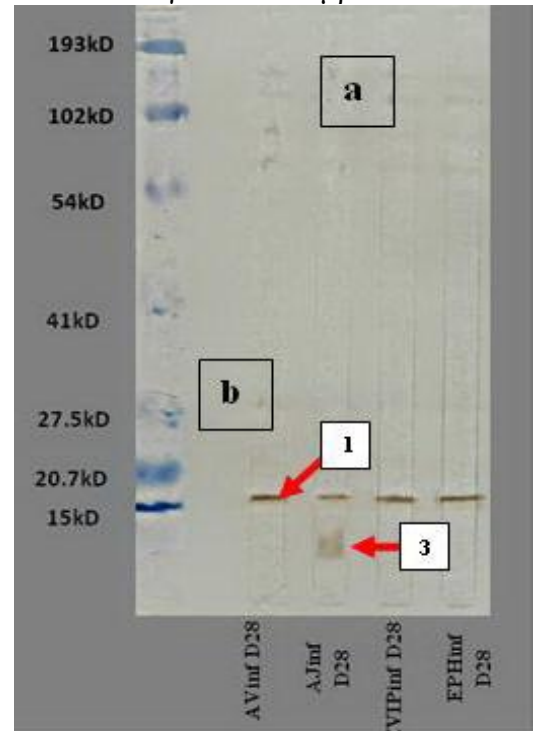
Εικόνα 3.3.4.2: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν με το Phdr για τις μέρες 8 – 16 (Cinf-AJinf) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Τις επόμενες ημέρες υπάρχουν οι αντιδράσεις στα μοριακά βάρη 20.7-15kD (λιποπολυσακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1). Το εμβόλιο Alpha Ject 2000 την ημέρα 8 από την μόλυνση δίνει ασθενή αντίδραση, λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος 15kD, λίγο εντονότερη αντίδραση στο ίδιο μοριακό βάρος για την ημέρα 12 και ομοιόμορφη αντίδραση κατά μήκος της μεμβράνης και για όλα τα μοριακά βάρη για την ημέρα 16 (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή και κόκκινα βέλη 3 & 4). Τέλος, την ημέρα 16 πολύ έντονη αντίδραση δίνει το δείγμα των μαρτύρων (Cinf D16) (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 5) για το βακτηριακό προϊόν στο μοριακό βάρος των 20.7 kD και λιγότερο εμφανή αντίδραση το εμβόλιο AV (AVinf D16) (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή) για την ίδια ημέρα στο ίδιο μοριακό βάρος.



Εικόνα 3.3.4.3: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν με το Phdr για τις μέρες 16 (Evipinf- Ephininf) – 28 (Cinf) (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Evip=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Όπως και τις προηγούμενες ημέρες, υπάρχουν οι αντιδράσεις στα μοριακά βάρη των 20.7-15 kD έναντι του Phdp (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1). Το εμβόλιο Alpha Ject 2000 δίνει ομοιόμορφη αντίδραση κατά μήκος της μεμβράνης για την ημέρα 20 μονάχα (πρωτεΐνη- μαύρη αιχμή). Αχνή αντίδραση φαίνεται επίσης στην περιοχή b, η οποία είναι ίδια για όλα τα εμβόλια.



Εικόνα 3.3.4.4: Αποτελέσματα αντίδρασης ειδικών αντισωμάτων με την μέθοδο Western Blot για εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν με το Phdp για την ημέρα 28 (AV=AquaVac *Vibrio pasteurilla*, AJ=Alpha Ject 2000, Epir=διδύναμο πειραματικό, Eph=μονοδύναμο πειραματικό, C=control/μάρτυρες) D και νούμερο αφορούν ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες ημέρες, οι τελευταίες δειγματοληψίες την ημέρα 28 μετά τη μόλυνση αντέδρασαν με τα μοριακά βάρη των 20.7-15kD (λιποπολισακχαριδικής φύσης- κόκκινο βέλος 1) έναντι του Phdp λιγότερο έντονα. Το εμβόλιο Alpha Ject 2000 δίνει μεμονωμένη αντίδραση λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 15kD (πρωτεΐνη- κόκκινο βέλος 3). Αχνές αντιδράσεις παρατηρούνται και στις περιοχές a και b.

Η συνολική εικόνα που φαίνεται από τις WB αναλύσεις των ορών των εμβολιασμένων/μολυσμένων ψαριών έναντι του Phdp είναι ότι εκτός της έντονης αντίδρασης των αντισωμάτων στα μοριακά βάρη των 20.7-15kD (αντιγόνα λιποπολισακχαριδικής φύσης), τα μολυσμένα ψάρια δεν δείχνουν διαφορετικές ανοσολογικές αντιδράσεις. Το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject προκάλεσε ξεχωριστές αντιδράσεις σε σύγκριση με τις υπόλοιπες εμβολιακές ομάδες με πιο αξιοπρόσεκτη να είναι αυτή στα 6.4kD. Αχνές αντιδράσεις παρατηρήθηκαν στις περιοχές a και b.

3.4. Εξωτερικά ευρήματα και ανατομία ψαριών

Τόσο το εμπορικό όσο και τα πειραματικά εμβόλια δεν προκάλεσαν θνησιμότητα ή άλλες αξιοσημείωτες επιπτώσεις στα εμβολιασμένα ψάρια. Εσωτερικά, οι ομάδες δεν εμφάνισαν συμφύσεις ή τις εμφάνισαν σε πολύ ήπια μορφή στα σπλάχνα.

Στις τσιπούρες που νόσησαν και από τα δύο βακτήρια, παρατηρήθηκαν εξωτερικές αλλαγές και αλλοιώσεις όπως : αποχρωματισμός, σκούρο χρώμα, πετέχειες. Εξόφθαλμος παρατηρήθηκε στα ψάρια που νόσησαν από το *V. anguillarum* (εικ.1). Επίσης, παρατηρήθηκαν ορισμένες αλλαγές και αλλοιώσεις στα εσωτερικά όργανά τους: συμφύσεις (ινώδης ιστός που αναπτύσσεται λόγω φλεγμονής)

στα ψάρια που νόσησαν από το *V. anguillarum*, διόγκωση σπλήνας και χολής, έκκριση βλέννας, διψάση και υπεραιμία εντέρου κυρίως στα ψάρια που νόσησαν από το *V. anguillarum*.

Λευκά κοκκιώματα παρατηρήθηκαν στα ψάρια που ήταν εμβολιασμένα με το εμπορικό εμβόλιο AJ που όσο περνούσε ο καιρός μειώνονταν σε μέγεθος (εικ.2). Ο λόγος εμφάνισής τους είναι το γεγονός ότι το συγκεκριμένο εμβόλιο περιέχει ελαιώδεις ανοσοενισχυτικό.

Οι πιο συχνές αλλοιώσεις ήταν οι συμφύσεις, η βλέννα και η διόγκωση χολής και σπλήνας (ψάρια που είχαν νοσήσει και από τα δύο βακτήρια).



Εικόνα 1: Εξόφθαλμος, ένα εύρημα δονακίωσης στα ψάρια



Εικόνα 2 : Λευκά κοκκιώματα λόγω του εμβολίου AJ. Αριστερά: διόγκωση εντέρου λόγω μόλυνσης με το *V. anguillarum*. Δεξιά: υγιές ψάρι με μικρά λευκά κοκκιώματα λόγω του εμβολίου AJ.

4.Συζήτηση

Η εντατική ιχθυοκαλλιέργεια προϋποθέτει τη διαβίωση των ψαριών σε ένα περιβάλλον όπου, πολλές φορές, επικρατούν συνθήκες καταπόνησης και υψηλές ιχθυοπυκνότητες, κάτι που διευκολύνει τη μετάδοση και διασπορά των παθογόνων βακτηρίων μέσα στους εκτρεφόμενους ιχθυοπληθυσμούς. Ένα από τα σημαντικότερα μέσα μετάδοσης των βακτηριακών νοσημάτων είναι το θαλασσινό νερό. Τα παθογόνα βακτήρια, που κυρίως προσβάλλουν τα μεσογειακά ευρύαλα εντατικά καλλιεργούμενα είδη ψαριών είναι τα: διάφοροι ορότυποι *Listonella (Vibrio) anguillarum*, *Photobacterium damsela subsp piscicida* (Phdp), *Tenacibaculum maritimum*, *Piscirickettsia salmonis*, καθώς και διάφορα είδη του γένους *Vibrio*, *Aeromonas*, *Streptococcus* και *Mycobacterium* (Vatsos & Georgiadis, 2008).

Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός σε τσιπούρες, τόσο με εμπορικά όσο και με πειραματικά εμβόλια ενάντια στην δονακίωση και την φωτοβακτηριδίαση, με σκοπό να μελετηθεί η αποτελεσματικότητά τους και να αναλυθεί η ανοσολογική αντίδραση που προκαλείται έναντι των παθογόνων βακτηρίων που ευθύνονται για αυτές τις ασθένειες.

Το εμπορικά εμβόλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το διδύναμο AlphaJect 2000 (*Photobacterium – V. anguillarum* O1) και το τριδύναμο (δύο ορότυποι *V. anguillarum*) Aqua Vac *Vibrio Pasteurella* (AV). Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας σε αυτή την εργασία έγινε μόνο για το εμπορικό εμβόλιο AV και δύο πειραματικά (μονοδύναμο Phdp και διδύναμο Phdp-*V. anguillarum* O1) καθώς και η ποσοτική ανάλυση της ανοσολογικής αντίδρασης, ενώ η ποιοτική ανάλυση αφορούσε όλες

τις εμβολιακές ομάδες. Η ποσοτική ανοσολογική διερεύνηση έγινε με την μέθοδο ELISA και η ποιοτική με τη μέθοδο Western Blot.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΜΒΟΛΙΩΝ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική έρευνα, μέχρι σήμερα έχουν υπάρξει πολύ λίγες σχετικές μελέτες για την αποτελεσματικότητα και την ανοσολογική αντίδραση σε τσιπούρα που εμβολιάστηκε με εμπορικά ή/και πειραματικά πολυδύναμα εμβόλια, όσον αφορά τα παθογόνα βακτήρια *V.anquillarum* και Phdp. Οι Arijo *et al.* (2005) έλεγξαν την αποτελεσματικότητα ενός διδύναμου πειραματικού εμβολίου ενάντια στο Phdp (κάνοντας πειραματικές μολύνσεις με 4×10^3 και 4×10^4 βακτηριακά κύτταρα) και το *Vibrio harveyi* (κάνοντας πειραματικές μολύνσεις με 7×10^4 και 7×10^5 βακτηριακά κύτταρα), μέσω εμβάπτισης σε εκτρεφόμενη γλώσσα *Solea senegalensis* (Kaup). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ως προς το επίπεδο προστασίας ήταν παρόμοια με αυτά των μονοδύναμων εμβολίων στη παρούσα μελέτη, γεγονός που συνηγορεί στο ότι η πολυπλοκότητα των αντιγόνων που εμπεριέχονται στα διδύναμα εμβόλια δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητά τους σε σύγκριση με μονοδύναμα σκευάσματα για την γλώσσα.

Στη πειραματική μόλυνση με το *V. anquillarum*, το εμπορικό εμβόλιο AV πέτυχε μεγάλο ποσοστό προστασίας ενώ το πειραματικό Enip πέτυχε προστασία 100%. Οι Gravningen *et al.*, (1998) σε μελέτη σύγκρισης αποτελεσματικότητας δύο εμπορικών διδύναμων εμβολίων κατά του δονακίου και του φωτοβακτηριδίου στο λαβράκι, σε συμφωνία με τη παρούσα μελέτη, κατέγραψαν ικανοποιητική προστασία στη μόλυνση με *V. anquillarum* 7 και 26 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό.

Τα αποτελέσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της προστασίας που παρέχεται από τα εμβόλια δεν ήταν ικανοποιητικά για το Phdp. Στη μόλυνση με το Phdp, το εμβόλιο AV είχε αρνητικό RPS και τα δύο πειραματικά εμβόλια μηδενικό ποσοστό επιτυχίας, εφόσον οι θνησιμότητες ήταν ίδιες σε αριθμό με τους μάρτυρες. Το δεύτερο πείραμα δεν θεωρείται επιτυχές και συνεπώς δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι οι τσιπούρες είναι περισσότερο ανθεκτικές απέναντι στη μόλυνση με το Phdp σε σύγκριση με τη μόλυνση με το *V. anquillarum* στο συγκεκριμένο πείραμα ή (κατά πάσα πιθανότητα) ότι απέτυχε η πειραματική μόλυνση. Συγκριτικά, στη μελέτη των Bakoroulos *et al.*, (2015), όπου μολύνθηκαν εμβολιασμένα λαβράκια [ίδιο εμπορικό εμβόλιο (AV) και δύο πειραματικά] με Phdp, με δύο δόσεις βακτηρίου, μέση ($3,25 \times 10^4$ βακτηριακά κύτταρα-49 ημέρες μετά τον εμβολιασμό) και υψηλή ($1,75 \times 10^5$ βακτηριακά κύτταρα-34 ημέρες μετά τον εμβολιασμό), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, οι ομάδες που εμβολιάστηκαν με το εμπορικό εμβόλιο AV δεν είχαν κάποια διαφορά σε ποσοστό επιβίωσης σε σύγκριση με τα άλλα πειραματικά εμβόλια. Στην μόλυνση με την υψηλή βακτηριακή πίεση, που προκάλεσε 90% θνησιμότητα στους μάρτυρες, στις ομάδες των ψαριών που χορηγήθηκαν το εμπορικό εμβόλιο AV, επιτεύχθηκε πολύ μικρό ποσοστό επιβίωσης και τα δύο πειραματικά εμβόλια απέτυχαν να παρέχουν οποιαδήποτε προστασία. Αντιθέτως, στην μόλυνση με την μέση βακτηριακή πίεση, που προκάλεσε θνησιμότητα 45% στους μάρτυρες, το ποσοστό επιβίωσης των ψαριών ήταν αρκετά υψηλό σε όλες τις ομάδες των εμβολίων, χωρίς στατιστική διαφορά. Συγκριτικά με την παρούσα μελέτη, η δόση του Phdp που χρησιμοποιήθηκε στη πειραματική μόλυνση των τσιπουρών ($9,2 \times 10^9$ βακτηριακά κύτταρα/mL) ήταν σχεδόν 4.000 φορές υψηλότερη σε σχέση με την δόση που προκάλεσε 90% θνησιμότητα στο λαβράκι και τη μελέτη των Bakoroulos *et al* (2015), αλλά παρόλα αυτά δεν επιτεύχθηκε κάποια ανάλογη θνησιμότητα. Αυτό και πάλι συνηγορεί με το ότι η τσιπούρα είναι πολύ περισσότερο ανθεκτική στη μόλυνση με το φωτοβακτηρίδιο σε σχέση με το λαβράκι.

Επιπλέον, πέραν της ανθεκτικότητας των τσιπουρών, δεν θα πρέπει να παραβλέπεται και κάποια αστοχία είτε στη μέθοδο παρασκευής των μολυσματικών διαλυμάτων ή στην μολυσματική ικανότητα του στελέχους Phdp που χρησιμοποιήθηκε. Η αποθήκευση ή *in vitro* καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια απώλεια στη μολυσματικότητά τους στερώντας από αυτά σημαντικά παθογόνα στοιχεία (Pedersen *et al*, 1999; Sørensen *et al*, 2005; Crisafi *et al*, 2013) και κάτι τέτοιο μπορεί να συνέβη και σε αυτή τη μελέτη σε σχέση με το Phdp.

Τίτλοι ειδικών αντισωμάτων

Εμβολιασμένα ψάρια

Στα εμβολιασμένα ψάρια, έναντι του βακτηρίου *V. anguillarum*, τα εμβόλια AV και Enip (διδύναμο πειραματικό) δεν προκάλεσαν αντιδράσεις με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους. Την μεγαλύτερη πρόκληση αντισωμάτων την προκάλεσε το πειραματικό εμβόλιο και έπειτα ακολούθησε το εμπορικό. Όσον αφορά την ανάλυση ELISA έναντι του Phdp, τα εμβόλια AV, Enip, Eph (μονοδύναμο πειραματικό) δεν προκάλεσαν αντιδράσεις με ιδιαίτερες αποκλίσεις μεταξύ τους. Οι τίτλοι ειδικών αντισωμάτων στις ομάδες των εμβολιασμένων ψαριών με AV σε σύγκριση με την εμβολιασμένη με Enip ομάδα ψαριών, δεν είχαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχε και η στατιστική ανάλυση για την ELISA έναντι του Phdp. Οι τίτλοι ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων ψαριών AV σε σύγκριση με τις ομάδες των εμβολίων Enip και Eph δεν παρουσίασαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Παρόμοια αποτελέσματα κατέγραψαν και οι Bakoroulos *et al.*, (2015a), όπου στην ανάλυση ELISA για το Phdp, σημειώθηκαν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων έναντι του Phdp, από το εμπορικό εμβόλιο AV, τις ημέρες 24-49 μετά τον εμβολιασμό, ενώ ακολουθούν τα δύο πειραματικά εμβόλια. Η έλλειψη διαφοράς στους τίτλους ειδικών αντισωμάτων έναντι του Phdp που καταγράφηκε μεταξύ μονοδύναμων και διδύναμων (AV & Enip V Eph) εμβολίων υποδεικνύει ότι η ύπαρξη πολλαπλών αντιγόνων και από διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς δεν επηρέασε το ύψος των τίτλων ειδικών αντισωμάτων που παρήχθησαν.

Εμβολιασμένα/Μολυσμένα ψάρια

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης μεταξύ των ομάδων των εμβολιασμένων και εν συνεχεία μολυσμένων με *V. anguillarum* και των απλά εμβολιασμένων ψαριών έδειξαν ότι τα εμβόλια AV και Enip στις μολυσμένες ομάδες έχουν σημαντικά υψηλότερη στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τις αντίστοιχες απλά εμβολιασμένες ομάδες. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων και κατόπιν μολυσμένων με Phdp ψαριών ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότεροι για όλα τα εμβόλια σε σύγκριση με τις αντίστοιχες απλά εμβολιασμένες ομάδες. Αξιοσημείωτη όμως είναι η πολύ υψηλότερη διαφορά που παρατηρήθηκε για το μονοδύναμο πειραματικό εμβόλιο. Το γεγονός ότι τα εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια του μονοδύναμου πειραματικού εμβολίου Eph εμφανίζουν την πιο σημαντική στατιστική διαφορά με την αντίστοιχη ομάδα των απλά εμβολιασμένων, μπορεί να οφείλεται στα αντιγόνα που περιέχει το εμβόλιο, τα οποία είναι αποκλειστικά ενάντια στο βακτήριο Phdp και εδώ καταγράφεται μία πιθανή αρνητική επίπτωση από την ύπαρξη πολλαπλών αντιγόνων και από διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς στο εμβολιακό μίγμα. Φαίνεται ότι οι υψηλότερες αντιδράσεις των ορών, σε ορισμένες περιπτώσεις, από τα εμβολιασμένα ψάρια που μολύνθηκαν μπορεί να σχετίζονται με την ανάπτυξη ανοσολογικής μνήμης. Η μόλυνση πρέπει να λειτούργησε ως ένα βαθμό ως επαναληπτικός εμβολιασμός. Το γεγονός ότι οι μολυσμένες ομάδες έχουν σημαντικά υψηλότερη στατιστική διαφορά σε σύγκριση με τις αντίστοιχες απλά εμβολιασμένες ομάδες και για τα δύο βακτήρια στους τίτλους αντισωμάτων τους, υποδηλώνει πως τα αντισώματα που αναπτύχθηκαν από τον εμβολιασμό, αναγνώρισαν και τα δύο παθογόνα και τα καταπολέμησαν αντίστοιχα. Η έντονη ανοσολογική αντίδραση από συγκεκριμένες εμβολιακές ομάδες μετά την μόλυνση και το πέρας του χρόνου, μπορεί να ερμηνευτεί ως διέγερση ανοσολογικής μνήμης, δηλαδή οι εμβολιασμένες ομάδες που είχαν την μεγαλύτερη αντίδραση αντισωμάτων, είναι και αυτές που ανέπτυξαν και ανοσολογική μνήμη.

Μια άλλη μελέτη που θα μπορούσε να συγκριθεί με την συγκεκριμένη είναι αυτή των Arijo *et al.* (2004) η οποία διερεύνησε την ανοσολογική αντίδραση της τσιπούρας σε αντιγόνα από το Phdp. Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστούν τα ανοσοκυρίαρχα αντιγόνα του Phdp αξιολογώντας την αντιγονική ειδικότητα της χυμικής απόκρισης σε τσιπούρα που εμβολιάστηκε με αντιγόνα σε ανοσοενισχυτικό έλαιο και η δυναμική μιτογόνο επίδραση των διαφορετικών βακτηριακών αντιγόνων στα λευκοκύτταρα αυτού του ψαριού. Στην ομάδα των ψαριών που έλαβαν αναμνηστικό εμβολιασμό τέσσερις εβδομάδες μετά την πρώτη ανοσοποίηση, σημαντικές αυξήσεις των τίτλων αντισωμάτων ορού στο βακτηριακό εμβόλιο, παρατηρήθηκαν για τα ECPs (εξωκυτταρικά

προϊόντα), OM (εξωτερική μεμβράνη) και LPS (λιποπολυσακχαρίτης) σε σχέση με τους τίτλους που ανιχνεύονται με ένα μόνο εμβολιασμό. Αυτές οι σημαντικές αυξήσεις εντοπίστηκαν τρεις και τέσσερις εβδομάδες μετά τον αναμνηστικό εμβολιασμό. Αντιθέτως, οι τίτλοι αντισωμάτων στον ορό για EM (εξωκυτταρικές ουσίες) και CM (κυτταροπλασματική μεμβράνη) δεν ήταν υψηλότεροι από εκείνους που λήφθηκαν στην πρώτη ανοσοποίηση. Στον αναμνηστικό εμβολιασμό βελτιώθηκαν σημαντικά οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι LPS, αλλά όχι εκείνα που ανιχνεύονται κατά EM. Τα ευρήματα των Magarinos *et al.* (1999), επίσης συμφωνούν με την παρούσα εργασία ως προς την αύξηση των τίτλων ειδικών αντισωμάτων μετά από ένα αναμνηστικό εμβολιασμό. Στην παρούσα έρευνα η πειραματική μόλυνση με τα βακτήρια φαίνεται να λειτούργησε σαν αναμνηστικός εμβολιασμός.

Δεν υπάρχει συμφωνία σχετικά με τη συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου των ορών αντισωμάτων και την προστασία έναντι στη φωτοβακτηριδίαση. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα αντισώματα στον ορό παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία και τα χαμηλά επίπεδα των συγκολλητικών αντισωμάτων έχουν συσχετιστεί με παρατεταμένη επιζωοτία της παστερέλλωσης στον ιαπωνικό μαγιάτικο (*Seriola quinqueradiata*) (Sato *et al.*, 1995). Αντιθέτως, οι Magarinos *et al.* (1994) δεν βρήκαν καμία συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου των συγκολλητικών αντισωμάτων και προστασία στις εμβολιασμένες τσιπούρες. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα των αντισωμάτων εναντίον της εξωτερικής μεμβράνης (OM) έχουν συσχετιστεί με την προστασία έναντι αρκετών παθογόνων των ψαριών όπως *Cytophaga* (Al-Habri *et al.*, 1993) και *Flavobacterium psychrophilum* (Rahman *et al.*, 2002). Οι τίτλοι που ελήφθησαν με διαλυτά και σωματιδιακά αντιγόνα μετά την αναμνηστική είναι παρόμοιοι, και τα αποτελέσματα αυτά δεν βρίσκονται σε συμφωνία με τα λοιπά στοιχεία που ανέφεραν ότι η ανοσοαπόκριση είναι πιο έντονη κατά των διαλυτών από τα σωματιδιακά αντιγόνα (Al-Habri *et al.*, 1993).

Αναλύσεις Western Blot

Εμβολιασμένα ψάρια

Οι οροί των εμβολιασμένων ψαριών αντέδρασαν έντονα με αντιγόνα *V. anguillarum* λίγο πιο κάτω από το μοριακό βάρος των 54kD και πιο πάνω από το μοριακό βάρος των 15kD. Αξιοσημείωτη όμως είναι η αντίδραση με τα ίδια αντιγόνα και από τους μάρτυρες καθώς και πολύ νωρίς από όλες τις εμβολιακές ομάδες. Μία εξήγηση για αυτές τις αντιδράσεις θα μπορούσε να είναι η ύπαρξη φυσικών αντισωμάτων, τα οποία αντιδρούν με τα συγκεκριμένα αντιγόνα του βακτηρίου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην μελέτη των Schroder *et al* (2009), όπου σε ορό μπακαλιάρου (*Gadus morhua* L.), στον οποίο γινόταν ανοσολογική διερεύνηση για παρουσία αντισωμάτων ενάντια στο *V. anguillarum*, σημειώθηκε αντίδραση από όλες τις ομάδες, ακόμα και από τα ψάρια μάρτυρες κοντά στο μοριακό βάρος των 75kD. Ο συγγραφέας το ερμήνευσε ως ότι υπάρχουν αντισώματα, ακόμα και στους μάρτυρες που δεν έχουν εμβολιαστεί, τα οποία αναγνωρίζουν και αντιδρούν με το συγκεκριμένο βακτήριο.

Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνεται και από τους Ardó *et al.* (2010) στην μελέτη τους για τον έλεγχο της ανοσολογικής απόκρισης σε ανθεκτικές και ευάλωτες οικογένειες κοινού κυπρίνου, μετά από μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *Aeromonas hydrophila*. Αυτό που προέκυψε ήταν πως τα επίπεδα φαγοκυττάρωσης, λυσοζύμης και ειδικών αντισωμάτων ενάντια στο βακτήριο, ήταν υψηλότερα στις ανθεκτικές οικογένειες. Ωστόσο, τα επίπεδα φυσικών αντισωμάτων δεν είχαν κάποια σημαντική διαφορά ανάμεσα στις οικογένειες. Αυτό οδήγησε την επιστημονική ομάδα στο συμπέρασμα, πως τα φυσικά αντισώματα έχουν την δυνατότητα να προσκολλώνται σε συγκεκριμένα αντιγόνα ή παθογόνα, ακόμα και αν ο ξενιστής δεν έχει εκτεθεί ποτέ σε περιβάλλον που να υπάρχει ο μικροοργανισμός.

Οι οροί των εμβολιασμένων ψαριών αντέδρασαν έντονα με αντιγόνα του βακτηρίου Phdp, στα μοριακά βάρη των 20.7-15kD. Αξιοσημείωτη όμως είναι και σε αυτή τη περίπτωση, η αντίδραση με τα ίδια αντιγόνα και από τους μάρτυρες καθώς και πολύ νωρίς από όλες τις εμβολιακές ομάδες. Σταδιακά και με το πέρας των ημερών οι αντιδράσεις είναι πιο εμφανείς, με αξιοσημείωτη την εικόνα που παρουσιάζει το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject 2000, όπου από τις ημέρες 21 έως το τέλος του πειράματος δίνει ξεχωριστές (σε σύγκριση με τα υπόλοιπα εμβόλια) αντιδράσεις, κατά μήκος όλης της στήλης στην μεμβράνη αλλά και σε πολύ χαμηλά μοριακά βάρη με αντιγόνα λιποπολυσακχαριδικής

φύσεως. Αν γίνει σύγκριση μεταξύ των ορών που προέκυψαν από τα υδατικά εμβόλια και των ορών του εμβολίου που περιείχε ανοσοενισχυτικό κατά την ανάλυση Western Blot του Phdp, προκύπτει ότι το ελαιώδες εμπορικό εμβόλιο AJ αναγνώρισε μεγαλύτερη γκάμα αντιγόνων. Η κύρια διαφορά μεταξύ του AJ και των άλλων εμβολίων είναι η ύπαρξη του μη ορυκτού ανοσοενισχυτικού στο εμβόλιο AJ. Τα ανοσοενισχυτικά προκαλούν μια έντονη έλξη των διαφόρων τύπων των λευκοκυττάρων στη θέση που εισήλθε το εμβόλιο και μπορεί να έχουν παρατεταμένη δράση λόγω της βραδύτερης απελευθέρωσης αντιγόνου (Afonso *et al.*, 2005). Αυτά μπορούν να έχουν θετική ποσοτική επίδραση στην διέγερση της ανοσοαπόκρισης.

Εμβολιασμένα/Μολυσμένα ψάρια

Η ανάλυση Western Blot για εμβολιασμένα και στην συνέχεια μολυσμένα με *V. anguillarum* ψάρια έδειξε παρόμοια εικόνα με αυτή των εμβολιασμένων στις πρώτες μέρες της μόλυνσης, ενώ προς το τέλος του πειράματος υπήρξε διαφοροποίηση στα εμβόλια. Συγκεκριμένα, το εμπορικό εμβόλιο AV έδωσε έντονη αντίδραση (ημέρα 12) μαζί με το ελαιώδες με ανοσοενισχυτικό εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject 2000, γεγονός που δείχνει ότι η μόλυνση προκάλεσε αναμνηστική διέγερση του ανοσοποιητικού, όπως φάνηκε και από τους υψηλότερους τίτλους αντισωμάτων που μετρήθηκαν.

Η ανάλυση Western Blot για εμβολιασμένα και στην συνέχεια μολυσμένα με το βακτήριο Phdp ψάρια, έδειξε παρόμοια εικόνα με αυτή των εμβολιασμένων, ως προς την έντονη αντίδραση που προκύπτει με συγκεκριμένα αντιγόνα του βακτηρίου. Αντιδράσεις δίνει και το εμπορικό εμβόλιο Alpha Ject 2000, από την ημέρα 0 κιόλας, ακολουθώντας μία φθίνουσα πορεία μέχρι το τέλος του πειράματος. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί ως ότι καταναλώθηκαν στην πορεία τα αντισώματα και έτσι δεν παρατηρούνται και τόσο έντονες ενδείξεις.

Φυσικά Αντισώματα

Η ύπαρξη των αντιδράσεων που καταγράφηκαν σε αυτή την μελέτη τόσο στα ψάρια μάρτυρες όσο και πολύ νωρίς μετά τον εμβολιασμό έναντι και των δύο μικροοργανισμών και κατά την ποσοτική αλλά και κατά την ποιοτική ανάλυση της χυμικής ανοσολογικής αντίδρασης, αποδόθηκαν στην ύπαρξη φυσικών ανοσοσφαιρινών, δεδομένου ότι οι τσιπούρες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα δεν είχαν εμβολιαστεί. Το γεγονός ότι υπάρχουν φυσικά αντισώματα στον ορό των ψαριών, τα οποία είναι ικανά να αναγνωρίσουν και στην συνέχεια να καταπολεμήσουν μία βακτηριακή νόσο όπως η φωτοβακτηριδίαση, μπορεί να εξηγήσει και την αποτυχία της πειραματικής μόλυνσης των ψαριών με τον συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό. Τα φυσικά αντισώματα έχουν την δυνατότητα να προσκολλώνται σε συγκεκριμένα αντιγόνα ή παθογόνα, ακόμα και αν ο ξενιστής δεν έχει εκτεθεί ποτέ σε περιβάλλον που να υπάρχει ο μικροοργανισμός (Ardó *et al.* 2010).

Σε μελέτη για την διερεύνηση του επιπέδου και της κατανομής των φυσικών αντισωμάτων σε εκτρεφόμενους κυπρίνους (*Carassius auratus* L.) που μολύνθηκαν με το βακτήριο *Aeromonas salmonicida*, οι Sinyakov *et al.* (2002) επίσης προσπάθησαν να αξιολογήσουν την επιρροή τους στην ικανότητα των ψαριών να παράγουν ειδικά αντισώματα ως απόκριση σε ενεργητική ανοσοποίηση και να εμφανίσουν ανθεκτικότητα σε αντίστοιχες βακτηριακές λοιμώξεις. Η μελέτη επικεντρώθηκε στην δράση των φυσικών αντισωμάτων ενάντια στην εξωκυτταρική A-layer πρωτεΐνη (A-πρωτεΐνη) και από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε η διαίρεση της ομάδας των ψαριών σε δύο υπό-ομάδες. Μία ομάδα για τα άτομα που παρατηρήθηκε υψηλή δραστηριότητα από φυσικά αντισώματα (HNA) και μία ομάδα που παρατηρήθηκε χαμηλή δραστηριότητα από φυσικά αντισώματα (LNA). Η HNA ομάδα ήταν σε μεγάλο βαθμό προστατευμένη ενάντια στην πειραματική μόλυνση με λοιμογόνο άτυπο στέλεχος βακτηρίου *Aeromonas salmonicida*, ενώ η ομάδα LNA σημείωσε 100% νοσηρότητα. Έπειτα από ανοσολογική διερεύνηση, οι μελετητές έφτασαν στο συμπέρασμα ότι η γενετική μεταβολή στην ικανότητα των ψαριών να παράγουν ειδικά αντι-A-πρωτεΐνη αντισώματα και οι γενετικές συσχετίσεις από μέτριες σε υψηλές, μεταξύ τίτλων φυσικών αντισωμάτων σε αποκρίσεις πρώτου και δεύτερου αντισώματος είχε αποδειχθεί.

Το συμπέρασμα αυτό, συγκλίνει με την δημοσίευση των Strømsheim *et al.* (1994), όπου προτείνει πως τα γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τα επίπεδα φυσικών αντισωμάτων, είναι επίσης υπεύθυνα (έως ένα ορισμένο σημείο) και για το επίπεδο των αντισωμάτων που παράγονται μετά από ενεργητική ανοσοποίηση. Βρίσκοντας υψηλά θετική συσχέτιση μεταξύ απόκρισης πρώτου με δεύτερου αντισώματος και το καθένα από αυτά με τα φυσικά αντισώματα, η μελέτη των Sinyakov *et al.* ενισχύεται ισχυρά. Τέλος, θεωρείται πως η δραστηριότητα των αντισωμάτων στην ομάδα HNA μπορεί να οφείλεται σε φυσική ανοσοποίηση που συνέβη με το συγκεκριμένο παθογόνο, το οποίο πιθανόν να ήταν παρόν στο περιβάλλον που διαβιούσαν τα ψάρια, κάτι που μπορεί να υφίσταται και για τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτή τη μελέτη και δεν πρέπει να αποκλειστεί.

5.Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη εργασία είναι:

- | ✓ Το σχετικό ποσοστό επιβίωσης που προέκυψε από η πειραματική μόλυνση με το *V. anguillarum*, έδειξε ότι και τα δύο εμβόλια (AV, Enip) παρείχαν ισχυρή προστασία στα εμβολιασμένα ψάρια έναντι του βακτηρίου, με το Enip να προστατεύει με 100% επιτυχία. Η πειραματική μόλυνση με το Phdp δεν μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής αφού δεν υπήρξε θνησιμότητα στους μάρτυρες.
- | ✓ Τα υδατικά εμβόλια AV και Enip, στη μόλυνση με το *V. anguillarum* είχαν μεγάλο RPS, αλλά οι τίτλοι ειδικών αντισωμάτων δεν είχαν στατιστική διαφορά μεταξύ τους.
- ✓ Η πληθώρα αντιγόνων έναντι διαφορετικών μικροοργανισμών δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα των εμβολίων και αυτό μπορεί να διασταυρωθεί από τα αποτελέσματα.
- ✓ Το μονοδύναμο πειραματικό εμβόλιο Eph στα εμβολιασμένα και κατόπιν μολυσμένα με Phdp ψάρια, είχε υψηλότερους τίτλους ειδικών αντισωμάτων σε σύγκριση με την αντίστοιχη ομάδα των απλά εμβολιασμένων ψαριών. Το γεγονός ότι το εμβόλιο αυτό περιέχει αντιγόνα αποκλειστικά ενάντια στο βακτήριο Phdp, ευθύνεται πιθανώς για την σημαντική στατιστική διαφορά των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των εμβολιασμένων και κατόπιν μολυσμένων ψαριών σε σύγκριση με τα απλά εμβολιασμένα.
- | ✓ Στην ανάλυση Western Blot, τα αντισώματα και για τα δύο βακτήρια αντέδρασαν έντονα με συγκεκριμένα αντιγόνα για το κάθε βακτήριο. Έντονη αντίδραση στην μόλυνση με το *V. anguillarum* και σε όλα τα δείγματα με το Phdp δίνει το εμπορικό εμβόλιο AJ και αυτό φαίνεται να οφείλεται στο ότι το εμβολιακό μίγμα περιέχει ελαιώδες ανοσοενισχυτικό, το οποίο έχει θετική επίδραση στην διέγερση της ανοσοαπόκρισης και αυτό το κάνει να υπερτερεί των υπολοίπων εμβολιακών μιγμάτων (υδατικά) προς το παρόν.
- ✓ Η ερμηνεία για τις στατιστικά σημαντικά υψηλότερες αντιδράσεις των τίτλων ειδικών αντισωμάτων των ορών από τα εμβολιασμένα/μολυσμένα ψάρια σε σύγκριση με τις αντίστοιχες απλά εμβολιασμένες ομάδες, είναι ότι έχει αναπτυχθεί ανοσολογική μνήμη. Η πειραματική μόλυνση δηλαδή λειτούργησε ως ένα βαθμό ως επαναληπτικός εμβολιασμός.
- ✓ Η αναγνώριση μόνο τόσο λίγων αντιγόνων από την τσιπούρα, για τα εμβολιακά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν και για τους μάρτυρες, ενάντια στα δύο βακτήρια, όπως φάνηκε σε αυτή την μελέτη, δημιουργεί προβληματισμούς για την αποτελεσματικότητά τους στο πεδίο και πώς αυτή μπορεί δυσμενώς να επηρεαστεί.
- ✓ Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη βελτίωση του ρεπερτορίου των αντιγόνων που αναγνωρίζονται, μιας και η αναγκαιότητα για πολυδύναμα εμβόλια έχει αυξηθεί (π.χ. να περιλαμβάνονται αντιγόνα από τον ιό εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας ψαριών ή άλλων αναδυόμενων παθογόνων βακτηρίων), και για αυτό τον λόγο θα πρέπει να αξιολογηθούν και οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των αντιγόνων.

Παράρτημα 1

➤ Εμπορικά εμβόλια κατά της φωτοβακτηριδίασης και της δονακίωσης που χρησιμοποιήθηκαν

❖ **ALPHA JECT™ 2000:** : Είναι το μόνο διδύναμο ελαιώδες εμβόλιο που περιέχει ένα μη ορυκτό ενισχυτικό και αδρανοποιημένες καλλιέργειες των βακτηρίων *Vibrio anguillarum* O1 και *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. Το εμβόλιο αυτό χρησιμοποιείται για εμβολιασμό με ένεση. Σχεδιάστηκε αποκλειστικά για την προστασία των καλλιεργούμενων λαβρακίων και τσιπούρας από τη δονακίωση και τη φωτοβακτηριδίαση (<http://www.aquavet.gr>).

Ποιοτική και ποσοτική σύνθεση: Μία δόση (0.1ml) περιέχει: αδρανοποιημένες με φορμόλη βακτηριακές καλλιέργειες των βακτηρίων *V.anguillarum* (ορότυπος O1) και Phdp. Έκδοχο: μη ορυκτό έλαιο.

Φαρμακολογικές ιδιότητες: Διεγείρει την ενεργητική ανοσία ενάντια στο *V. anguillarum* (ορότυπος O1) και στο Phdp.

Κλινικά στοιχεία: Τα λαβράκια εμβολιάζονται σε μέγεθος 15 γραμμαρίων και μεγαλύτερα. Το εμβόλιο αυτό προλαμβάνει τη θνησιμότητα και τα κλινικά συμπτώματα που προκαλούνται από τα 2 αυτά βακτήρια.

Εξαιτίας του stress από τους χειρισμούς, ο εμβολιασμός μπορεί να ακολουθηθεί από πρόσκαιρη μείωση της όρεξης που είναι δυνατόν να οδηγήσει σε παροδική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης.

Ιδιαίτερες προφυλάξεις κατά τη χρήση: Ο εξοπλισμός που θα χρησιμοποιηθεί κατά τον εμβολιασμό πρέπει να απολυμαίνεται πριν τη χρήση. Να μην χορηγείται αυτό το προϊόν σε ψάρια που έχουν ήδη εμβολιαστεί. Ψάρια με κλινικά συμπτώματα ασθένειας δεν πρέπει να εμβολιάζονται. Σε κάθε πληθυσμό θα υπάρχει και ένας μικρός αριθμός ατόμων, που θα αποτυγχάνει να ανταποκριθεί στον εμβολιασμό. Περιστασιακή θνησιμότητα μπορεί να παρατηρηθεί σε ιχθύδια τα οποία απέτυχαν να ανταποκριθούν ή το ανοσοποιητικό τους σύστημα έχει κατασταλεί από άλλες ταυτόχρονες μολύνσεις, φτωχό επίπεδο θρέψης, γενετικούς παράγοντες ή άλλες στρεσογόνες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Αλληλεπίδραση με άλλα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα και άλλες μορφές αλληλεπίδρασης: Δεν είναι γνωστή καμία. Δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα στην παράλληλη χρήση του εμβολίου με άλλα προϊόντα. Συστήνεται όπως κανένα άλλο εμβόλιο δεν πρέπει να χορηγηθεί για διάστημα 14 ημερών πριν ή μετά τον εμβολιασμό με αυτό το προϊόν.

Δοσολογία και τρόπος χορήγησης: Συστήνεται το ακόλουθο εμβολιακό πρόγραμμα. Ο πρώτος και ο δεύτερος εμβολιασμός διενεργούνται με εμβάπτιση (Alpha Dip 2000) σε ψάρια με μέσο βάρος 1 και 5 γραμμάρια περίπου. Ο τρίτος εμβολιασμός διενεργείται με ένεση (Alpha Ject 2000) σε ψάρια με ελάχιστο βάρος 15 γραμμάρια.

Ενέσιμος εμβολιασμός: Η προτεινόμενη δόση είναι 0.1ml ανά ψάρι και χορηγείται με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Συστήνεται η διακοπή χορήγησης τροφής για τουλάχιστον 24 ώρες και τα ψάρια πρέπει να αναισθητοποιούνται πριν από την ένεση. Το εμβόλιο πρέπει να αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία 15 – 20°C και να ανακινείται καλά πριν τη χρήση. Είναι σημαντικό ολόκληρη η δόση να εναποτεθεί στη κοιλιακή κοιλότητα. Το συνολικό μήκος της βελόνας θα πρέπει να εισαχθεί στη μέση γραμμή, περίπου ένα με ενάμισι μήκος κοιλιακού πτερυγίου, εμπρός από τη βάση των κοιλιακών πτερυγίων. Η βελόνα πρέπει να διαπεράσει το κοιλιακό τοίχωμα κατά 1 – 2 χιλιοστά.

Υπερδοσολογία: δεν είναι καμία γνωστή

Ειδικές προειδοποιήσεις για κάθε είδος – στόχο: καμία

Χρόνος αναμονής: μηδέν ημέρες

Φαρμακευτικά στοιχεία: Δεν πρέπει να αναμειγνύεται με άλλα προϊόντα. Η διάρκεια ζωής του εμβολίου είναι 2 έτη, όμως μετά το άνοιγμα του περιέκτη όλο το περιεχόμενο θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια εργάσιμη μέρα. Το προϊόν πρέπει να φυλάσσεται στους 2 – 8°C, να μην

καταψύχεται, να μην εκτίθεται στο ηλιακό φως. Η μεταφορά πρέπει να διεκπεραιώνεται κάτω από τις συνιστώμενες συνθήκες.

Φύση και συστατικά του περιέκτη: φιάλη 500ml από πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (HDPE) που σφραγίζεται με ελαστικό πώμα και καπάκι από αλουμίνιο.

Κάτοχος άδειας κυκλοφορίας: PHARMAQ AS Skogmo Industriomrade N – 7863 Overhalla, NORWAY.

Διανομέας: AQUA VET A.E. Αντιοχείας 48, Ν. Φιλαδέλφεια 143 41 Αθήνα. (Ε.Ο.Φ.)

❖ **AQUA VAC™ *Vibrio Pasteurella*:** διδύναμο υδατικό εναιώρημα για ένεση που περιέχει αδρανοποιημένες καλλιέργειες των βακτηρίων *Vibrio anguillarum* O1 και O2 και το *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (<http://aqua.merck-animal-health.com/>)

Ποιοτική και ποσοτική σύνθεση:

Δραστικά συστατικά: Αδρανοποιημένα κύτταρα βακτηρίου Phdp (στέλεχος Pr85), όχι λιγότερα από 2×10^9 κύτταρα ανά ml, όχι λιγότερα από 2×10^8 κύτταρα ανά ml δόσης.

Έκδοχα: Υπολειμματική Φορμαλδεύδη, όχι περισσότερη από 0.5mg ανά ml, όχι περισσότερη από 0.05mg ανά 0.1ml δόσης.

Ανοσολογικές ιδιότητες: Για την ενεργητική ανοσοποίηση στο λαυράκι ενάντια στη δονακίωση και στη φωτοβακτηριδίαση, που προκαλούνται από τους μικροοργανισμούς *V.anguillarum* και Phdp.

Κλινικά στοιχεία: Για τη μείωση της θνησιμότητας από το Phdp στο λαβράκι. Ο χρόνος ανάπτυξης προστατευτικής ανοσίας θα εξαρτηθεί από τη θερμοκρασία του νερού. Σε θερμοκρασία νερού 12 – 15°C, θα πρέπει να επιτραπεί χρόνος τουλάχιστον 28 ημερών μεταξύ του εμβολιασμού και της αναμενόμενης έκθεσης στη λοίμωξη για την ανάπτυξη πλήρους ανοσίας.

Να μην πραγματοποιείτε εμβολιασμό σε ψάρια για τα οποία υπάρχει η υποψία πως έχουν ήδη επιμολυνθεί με τον μικροοργανισμό Phdp.

Ιδιαίτερες προφυλάξεις κατά τη χρήση: Ανακινήστε καλά πριν τη χρήση. Να εμβολιάζετε μόνο υγιή ψάρια.

Δοσολογία και τρόπος χορήγησης: Λαβράκι – ελάχιστο βάρος 25 γραμμάρια. Δόση 0.1ml.

Χορήγηση: Τα ψάρια θα πρέπει να αναισθητοποιούνται, πριν από τον εμβολιασμό. Με ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε μήκος μισό με ένα πτερύγιο απόσταση μπροστά από τα πυελικά πτερύγια.

Να μην πραγματοποιείτε εμβολιασμό σε ψάρια για τα οποία υπάρχει η υποψία πως έχουν ήδη φωτοβακτηριδίαση.

Ιδιαίτερες προφυλάξεις κατά τη φύλαξη του προϊόντος: Αποθηκεύεται μεταξύ 2 – 8°C, να μην καταψύχεται και να προστατεύεται από το φως.

Φύση και συστατικά του περιέκτη: Το εμβόλιο παρέχεται μέσα σε μια φιάλη 500ml από υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο, με ελαστικό πώμα φαρμακευτικής χρήσης που διατηρείται στη θέση του με στεγανοποιητικό κάλυμμα από πλαστικό και αλουμίνιο. (Ε.Ο.Φ.)

Παράρτημα 2

➤ Τρόποι εμβολιασμού

1. Ενδοπεριτοναϊκή έγχυση: είναι η πιο αποδοτική μέθοδος σε ότι αφορά συστημακή ανάπτυξη αντισωμάτων και επιπλέον επιτρέπει τη χρήση ανοσοενυσηχτικών για τη βελτίωση της προστασίας. Όμως, απαιτεί υψηλά εργατικά και χρόνο, προκαλεί στρες και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μικρού μεγέθους ψάρια. Επιπλέον σημαντικό είναι το γεγονός ότι αυτή η μέθοδος δεν προκαλεί την έκκριση αντισωμάτων στα επιθήλια με συνέπεια ο ξενιστής να μην προστατεύεται κατά τη μόλυνση μέσω του νερού.

2. Υπεροσμωτική εμβάπτιση: έχει αποδειχθεί ότι είναι αποδοτική μέθοδος χορήγησης του εμβολίου στα ψάρια. Βασίζεται στην αύξηση της διαπερατότητας των βραγχίων στα αντιγόνα. Δεν χρησιμοποιείται όμως, διότι μπορεί να προκληθούν βλάβες στα ψάρια και γιατί η απευθείας εμβάπτιση μπορεί να έχει παρόμοια αποτελέσματα.

3. Απευθείας εμβάπτιση: έκθεση των ψαριών στο εμβολιακό μείγμα (αραίωση 1:10) για 20-30 μόνο δευτερόλεπτα είναι αρκετή για πρόσληψη των αντιγόνων. Όμως, αν και προκαλεί λιγότερο στρες, η μέθοδος περιορίζεται από τον αριθμό των ψαριών που μπορούν να εμβολιαστούν ανά μονάδα όγκου του εμβολίου και είναι αρκετά ακριβή όταν πρέπει να εμβολιαστούν σχετικά μεγάλα ψάρια. Σε αυτή τη μέθοδο δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική παραγωγή συστημακών αντισωμάτων, επομένως τα ψάρια ενώ προστατεύονται καλύτερα από τις μολύνσεις μέσω του νερού, σε περίπτωση που ο παθογόνος εισέλθει στο εσωτερικό του σώματος, τα ψάρια παραμένουν απροστάτευτα.

4. Μπάνιο και ψεκάσμός: παραλλαγές της απευθείας εμβάπτισης. Τα ψάρια εκτίθενται σε αραιωμένα διαλύματα αντιγόνου (1:500) για μακρές περιόδους (30-60 λεπτά), στις οποίες αυξάνεται η πρόσληψη αντιγόνου και μπορούν να αντισταθμίσουν την υψηλή αρραίωση του εμβολίου ή απλά ψεκάζονται με το εμβόλιο.

Μερικά μειονεκτήματα της εμβάπτισης και του μπάνιου: δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική παραγωγή συστημακών αντισωμάτων, παρά μόνο η ανάπτυξη τους σε τοπικό επίπεδο στα επιθήλια. Έτσι, σε περίπτωση που ο μικροοργανισμός εισέλθει στο εσωτερικό του σώματος, τα ψάρια μένουν απροστάτευτα.

5. Δια του στόματος χορήγηση: θεωρητικά η ιδανικότερη μέθοδος για μεγάλο αριθμό ατόμων, δεν προκαλεί στρες, δεν διακόπτει τον κύκλο εργασιών της παραγωγής, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα μεγέθη ψαριών. Χρησιμοποιείται κυρίως σαν ενισχυτικό και δεν πραγματοποιείται πολύ καλή πρωτογενής ανοσολογική ανταπόκριση. Επιπλέον, δεν είναι εγγυημένη η ίση ποσότητα τροφής που λαμβάνει κάθε ψάρι μέσα σε έναν πληθυσμό. Νέα συστήματα χορήγησης διά του στόματος έχουν αναπτυχθεί, τα οποία προστατεύουν τα αντιγόνα από το χαμηλό pH του στομάχου.

Παράρτημα 3

➤ Φωτογραφικό υλικό



Τα ψάρια μέσα στη δεξαμενή αποθήκευσης

Το αυτόκαυστο. Η συσκευή αποστείρωσης των θρεπτικών υλικών και άλλων σκευών του εργαστηρίου



Αριστερά: Το οξυγονόμετρο WTW, Oxi 315i. Καθημερινά καταγραφόταν η θερμοκρασία του νερού των δεξαμενών και η τιμή του οξυγόνου

Δεξιά: Το pHμετρο WTW, pH 315i.





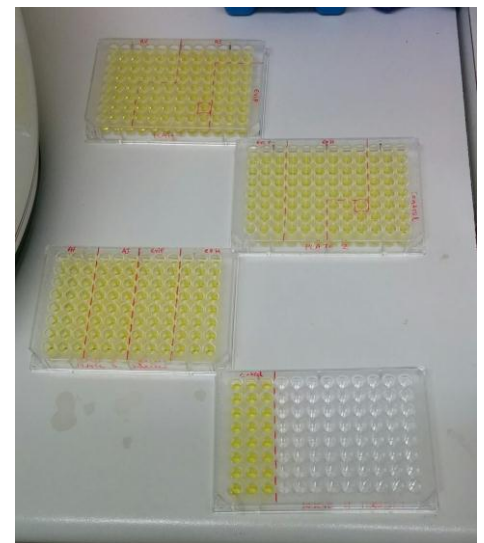
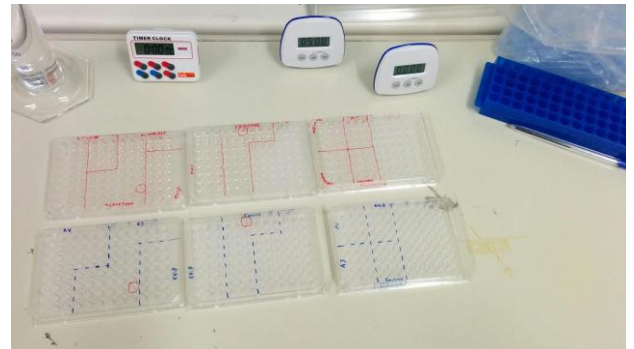
Μέτρηση συνολικού αμμωνιακού αζώτου, με τη δοκιμή των εταιρειών Sera και API NH₄/NH₃

Το φασματοφωτόμετρο U-2900 spectrophotometer manual, HITACHI. Η συσκευή στην οποία γίνονται μετρήσεις στα 605nm, για την επίτευξη της κατάλληλης οπτικής πυκνότητας, ώστε να ακολουθήσει μόλυνση



Αριστερά: Η φυγόκεντρος όπου φυγοκεντρούνταν τα δείγματα αίματος από τα ψάρια.
Δεξιά: Πλάκες του συστήματος βιοχημικού προφίλ και ταυτοποίησης βακτηρίων API.

Οι σύριγγες του 1ml με τις οποίες έγινε ο εμβολιασμός και η μόλυνση των ψαριών



Αριστερά Πάνω: Προετοιμασία πλακών για ELISA.

Αριστερά Κάτω φαίνονται οι οροί των ψαριών προς χρήση.

Δεξιά Πάνω / Κάτω: η πλάκες ELISA πριν και μετά την ολοκλήρωση του πειράματος μέτρησης τίτλων ειδικών αντισωμάτων.

Βιβλιογραφία

Ξενογλώσση

- Actis, L.A., Tomalsky, M.E. and Crosa, J.H., (1999). Vibriosis, in P.T.K. Woo and E.W. Bruno (Eds.), Fish diseases and disorders, vol. 3: viral, bacterial and fungal infections. Cab International Publishing, Wallingford, United Kingdom, pp. 523-557.
- Afonso A., Gomes S., da Silva J., Marques F. & Henrique M. (2005). Side effects in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) due to intraperitoneal vaccination against vibriosis and pasteurellosis. Fish & Shellfish Immunology. 19, 1-16.
- Aguirre-Guzma'n G., Rui'z H.M. & Ascencio F. (2004) A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. Aquaculture Research 35, 1395–1404.
- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. In: International Symposium on Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines. *Developments in Biological Standardisation*, 49, 447-454.
- Angelidis P. (2014) Chapter 11: *Vibrio anguillarum*-associated vibriosis in the Mediterranean aquaculture. Blue Crab PC Publication, Chalastra, Greece, 243-264.
- Angelidis, P., Karagiannis, D., Crump, E.M., (2006). Efficacy of a *Listonella anguillarum* (syn. *Vibrio anguillarum*) vaccine for juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax*. Diseases of Aquatic Organisms. 71, 19–24
- Ardó, L., Jeney, Z., Adams, A., Jeney, G., (2010). Immune responses of resistant and sensitive common carp families following experimental challenge with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology, 29, 111-116
- Arijo S., Rico R., Chabrillon M., Diaz-Rosales P., Martinez-Manzanares E., Balebona M.C., Magarinos B., Tonanzo A.E. and Morinigo M.A., (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. J. Fish Dis. 28, 33-38.
- Arijo S., Balebona C., Martinez-Manzanares E., Angel Moringo M., (2004). Immune response of gilt-head seabream (*Sparus aurata*) to antigens from *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*.
- Austin B. & Austin D.A. (2007) Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish, 4th edn. Springer-Praxis Publishing, New York-Chichester.
- Bakopoulos V., Nikolaou I., Kalovirna N., Amirali E., Kokkoris G., Spinos E. (2015). Prevention of fish photobacteriosis. Comparison of the efficacy of commercially available and experimental vaccines. Mediterranean Marine Science, <http://dx.doi.org/10.12681/mms.1051>
- Bakopoulos, V., Nikolaou, I., Laspa, E., Kosma, I. and Spinos, E. (2015a). Humoral response of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. after intraperitoneal immunization with commercial and experimental vaccines. 11th PanHellenic Symposium of Oceanography & Fisheries « Aquatic Horizons: Challenges & Perspectives » 13-17 May 2015, University of the Aegean, Mytilene, Lesvos island, Greece.
- Bakopoulos V., Pearson M., Volpatti D., Gousmani L., Adams A., Galeotti M. & Dimitriadis G.J. (2003). Investigation of media formulations promoting differential antigen expression by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and recognition by sea bass, *Dicentrarchus labrax*, (L.), immune sera. J. Fish Dis. 26, 1-13.

- Bakopoulos V., Peric Z., Rodger H., Adams A. & Richards R.H. (1997). First report of fish Pasteurellosis from Malta. *Journal of Aquatic Animal Health* 9, 26-33.
- Bakopoulos V., Adams A. & Richards R.H. (1997a). The effect of iron limitation growth conditions on the cell and extracellular components of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J. Fish Diseases*. 20, 297-305.
- Bakopoulos V., Hanif A., Poulos K., Galeotti M., Adams A. & Dimitriadis G.J. (2004). The effect of *in vivo* growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 27, 1-13.
- V. Bakopoulos, D. Volpatti, M. Galeotti & A. Adams (1999). Fish Pasteurellosis: An electron microscopic study of the course of the disease. European Association of Fish Pathologists, 9th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", September 1999, Rhodes, Greece
- Balebona M.C., Morinigo M.A., Sedano J., Martinez-Manzanares E., Vidaureta A., Borrego J.J. & Toranzo A.E. (1992). Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in south-western Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12, 168-170.
- Baumann P. & Baumann L. (1984). Genus II. *Photobacterium* Beijerinck 1889. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. N.R. Krieg & J.G. Holt (eds). Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore / London, pp 539-545.
- Baudin-Laurencin F., Pepin J.F. & Raymond J.C. (1991). First observation of an epizootic of Pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts. Book of Abstracts. 5th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary
- Bergman A.M. (1909) Die roten Beulenkrankheit ds Aales. *Berichte aus der Koniglichen Bayerischen Biologischen Versuchsstation* 2, 10–54.
- Buller N.B. (2004) *Bacteria from Fish and other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Bullock G.L. (1978). Pasteurellosis of fish. US department of interior. Fish and Wildlife Service. Division of Fishery Research, Washington DC. Fish Disease Leaflet 54.
- Campbell, R., Adams, A., Tatner, M.F., Chair, M., Sorgeloos, P., (1993). Uptake of *Vibrio anguillarum* by *Artemia salina* as a potential oral delivery system to fish fry. *Fish and Shellfish Immunology* 3, 451-459.
- Canestrini G. (1893) La malattia dominate delle anguille. *Atti 1st Veneto Sci Lett Arti Cl Sci Mat Nat* 7, 809–814.
- Ceschia G., Quaglio F., Giorgetti G., Bertoja G. & Bovo G. (1991). Serious outbreak of Pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts. Book of Abstracts. 5th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary, 25-29 August.

- Crisafi, F., Denaro, R., Genovese, M., Yakimov, M., Genovese, L., (2013). Application of relative real-time PCR to detect differential expression of virulence genes in *Vibrio anguillarum* under standard and stressed growth conditions. *J. Fish Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12158>.
- Davies R.L., Parton R., Coote J.G., Gibbs H.A. & Freer J.H. 1992. Outer membrane protein and lipopolysaccharide variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *Journal of General Microbiology* 138, 909-922.
- Dec, C., Angelidis, P., Baudin Laurencin, F., (1990). Effects of oral vaccination against vibriosis in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases* 13, 369–376.
- Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Muller DN, Krause M, Dudenhausen J, Haller H, Luft FC. Agonistic antibodies directed at the angiotensin II, AT1 receptor in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2006;13(2):79-86.
- Egusa S. (1983). Disease problems in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, culture : a review. In: J.E. Stewart (ed), *Diseases of Commercially Important Marine Fish & Shellfish*. Conseil International pour l' Exploration de la Mer, Copenhagen, pp. 10-18.
- Eguchi M., Fujiwara E. & Miyamoto N. (2000) Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environment: adaptation or debilitation? *Journal of Infection and Chemotherapy* 6, 126– 129.
- Eguchi M., Fujiwara-Nagata E. & Miyamoto N. (2003) Physiological state of *Vibrio anguillarum*, a fish pathogen, under starved and low-osmotic environments. *Microbes and Environments* 18, 160–166.
- Frans I, Michiels C. W., Bossier P., Willems K. A., Lievens B. and Rediers H. (2011). *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases* 34, 643-661.
- Galleotti M., Volpelli L.A., Volpatti D., Del Grano N., Ceschia G., Giorgetti G., Adams A. & Randolph R.H. (1995). Pasteurellosis experimentally induced in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): II. Histological and Immunohistochemical Evaluation. Book of Abstracts. 7th International Conference, "Diseases of Fish and Shellfish", European Association of Fish Pathologists, Palma de Mallorca, 10-15 September, Spain, p. 51.
- Gravningen, K., Thorarinsson, R., Johansen, L.H., Nissen, B., Rikardsen, K.S. *et al.*, 1998. Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. *Journal of Applied Ichthyology* 14, 159-162.
- Hawke J.P., Plakas S.M., Minton R.V., McPhearson R.M., Sneider T.G. & Guarino M. (1987). Fish Pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquaculture* 65, 193-294.
- Janssen W.A. & Surgalla M.J. (1968). Morphology, physiology and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *Journal of Bacteriology* 96, 1606-1610
- Kanno, T., Nakai, T., Muroga, K., (1989). Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1, 2-6.

- Koike Y., Kuwahara A. & Fujiwara H. 1975. Characterisation of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail. Japanese Journal of Microbiology 19(4), 241-247.
- Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. Methods. 2006;38(4):283-93.
- Kusuda R. & Yamaoka M. (1972). Etiological studies of bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. On the morphological and biochemical properties. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 38, 1325-1332.
- Larsen, J.L., Pedersen, K. and Dalsgaard, I., (1994). *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish. Journal of Fish Diseases 17, 259-267.
- Larsen M.H., Blackburn N., Larsen J.L. & Olsen J.E. (2004) Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. Microbiology 150, 1283–1290.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.
- Ma H. The Structure and Function of Metallothionein. Ph.D. Dissertation of Peking University. 1994:37-46.
- Madigan M.T., Martinko J.M. & Parker J. (2000) Brock Biology of Microorganisms, 9th edn. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Magarinos B, Romalde JL, Barja JL, Nunez S, Toranzo AE., (1999). Protection of gilthead bream against pasteurellosis at the larval stages. Bull Eur Ass Fish Pathology. 19, 159–61.
- Magarinos B., Romalde J.L., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1995). Ribotyping analysis of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. Book of Abstracts. 7th International Conference, “Diseases of Fish and Shellfish”, European Association of Fish Pathologists, Palma de Mallorca, 10-15 September 1995, Spain, p.59.
- Magarinos B., Romalde J.L., Lemos M.L., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1994b). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. Applied & Environmental Microbiology. 60, 2990-2998.
- Magarinos B, Romalde JL, Santos Y, Casal JF, Barja JL, Toranzo AE., (1994). Vaccination trials on gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*. Aquaculture 120, 201–8.
- Matsubato T. (1975). Bacterial tuberculoidosis of culture yellowtail. Proceedings of the 3rd US-Japan meeting on Aquaculture, Tokyo, Japan.
- Muroga, K. and De La Cruz, M., (1987). Fate and location of *Vibrio anguillarum* in tissues of artificially infected ayu (*Plecoglossus altivelis*). Fish Pathology 22, 99-103.
- Muroga K., Sugiyama T. & Ueki N. (1977). Pasteurellosis in cultured black sea bream (*Mylio macrocephalus*). Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University 16, 17-21.
- Naka, H., Crosa, J.H., (2011). Genetic Determinants of Virulence in the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. Fish Pathology 46, 1–10.

- Naka, H., Dias, G.M., Thompson, C.C., Dubay, C., Thompson, F.L., Crosa, J.H., (2011). Complete Genome Sequence of the Marine Fish Pathogen *Vibrio anguillarum* Harboring the pJM1 Virulence Plasmid and Genomic Comparison with Other Virulent Strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*. *Infected Immunology*. 79, 2889-2900.
- Paillard C., Leroux F. & Borrego J.J. (2004) Bacterial disease in marine bivalves: review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic Living Resources* 17, 477–498.
- Pedersen, K., Grisez, L., van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., Larsen, F., Lau-ritz, J., (1999). Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology*. 38, 183–189.
- Peter-Katalinic J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol*. 2005;405:139-71.
- Rahman MH, Kuroda A, Dijistra JM, Kiryu I, Nakanishi T, Ototake M., (2002). The outer membrane fraction of *Flavobacterium psychrophilum* induces protective immunity in rainbow trout and ayu. *Fish Shellfish Immunology*. 12, 169–79.
- Sakudo A, Suganuma Y, Kobayashi T, Onodera T, Ikuta K. Near-infrared spectroscopy: promising diagnostic tool for viral infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(2):279-84.
- Satoh K, Fukuda Y, Nakaro S., (1995). Changes in agglutinin titer against *Pasteurella piscicida* in cultured yellowtail during the epizootics of pseudotuberculosis in 1993 and 1994. *Fish Pathology* 30, 291–2.
- Schroder M.B., Ellingsen T., Mikkelsen H., Norderhus E.A. and Lund V. (2009). Comparison of antibody responses in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) to *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* and *Francisella* sp. *Fish Shellfish Immunology* 27, 112-119.
- Simidu U. & Egusa S. 1972. A re-examination of the fish pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* sp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38(8), 803-812.
- Sinyakov M. S., Dror M., Zhevelev H. M., Margel S. and Avtalion R. R. (2002). Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine* 20, 3668-3674.
- Snieszko S.F., Bullock G.L., Hollis E. & Boone J.G. (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*), in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology* 88, 1814-1815.
- Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N., Wuertz, S., (2005). Study in gplasmid horizontal gene transfer in situ: a critical review. *Nature Review of Microbiology* 3, 700–710.
- Strømsheim A, Eide DM, Hofgaard PO, Larsen HJS, Refstie T, Røed KH. Genetic variation in the humoral immune response against *Vibrio salmonicida* and in antibody titre against *Vibrio anguillarum* and total IgM in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Vet Immunol Immunopathol* 1994;44:85–95.

Teliouisis, K., (2011). Contribution in the pathlogoanatomic study of the vibriosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). PhD dissertation, Veterinary Medicine School of Thessaloniki, Greece. P. 108, (in greek).

Toranzo A.E., Magarinos B. & Romalde J.L. (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37–61.

Toranzo A.E., Barreiro S., Casal J.F., Figueras A., Magarinos B. & Barja J.L. 1991. Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99, 1-15.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 (9): 4350–54.

Tung M.C., Tsai L.F., Ho L-F. & Chen S.C. 1985. An acute septicaemic infection of *Pasteurella* organism in pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacepede) in Taiwan. *Fish Pathology* 20(2/3), 143-148.

Vatsos N.I., Georgiadis M., (2008). Transmission through the water of the bacterial diseases for euryaline fish cultured in the Mediterranean. Elements of epidemiology and risk factors which concern their spread and transmission of the respective pathogens. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 59(3), 213-224.

Wakabayashi H., Toyota H. & Egusa S. (1977). Artificial infection of yellowtail with a gastral administration of cultured *Pasteurella piscicida* cells. *Fish Pathology* 11, 207-211.

Yasunaga N., Hatai K. & Tsukahara J. 1983. *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red sea bream. *Fish Pathology* 18(2), 107-110.

Ελληνική

B. Μπακόπουλος, Σημειώσεις μαθήματος: «Ασθένειες Ιχθύων», Πανεπιστήμιο Αιγαίου, 2010

Γναρδέλλης Χαράλαμπος, «Εφαρμοσμένη στατιστική», Εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα, 2003

Ε.Ο.Φ., Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων. <https://www.eof.gr/>

Διαδοκτακή

Varvarigos, VETERINARY SERVICES TO AQUACULTURE, FISH HEALTH PRODUCTS, WINE YEASTS. <http://www.vetcare.gr/>

ELISA encyclopedia, Sino Biological Inc., <http://www.elisa-antibody.com/>