

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ  
ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

**ΣΥΜΒΟΛΗ**  
**ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ**  
**ΤΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ (*Dicentrarchus labrax*)**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Χ. ΤΕΛΙΟΥΣΗΣ**  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012

© ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΕΛΙΟΥΣΗΣ

© Α.Π.Θ.

ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ (*Dicentrarchus labrax*)

ISBN

*«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Κτηνιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέως.»*  
(N. 5343/1932, άρθρο 202, παρ. 2)

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ  
ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

**ΣΥΜΒΟΛΗ**  
**ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**  
**ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ**  
**ΤΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ (*Dicentrarchus labrax*)**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Χ. ΤΕΛΙΟΥΣΗΣ**

ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ομότιμος Καθηγητής Στέφανος Λέκκας (Επιβλέπων)

Καθηγητής Ιωάννης Βλέμμας

Αναπληρωτής Καθηγητής Παναγιώτης Αγγελίδης

**Εξεταστική Επιτροπή**

Καθηγητής Ιωάννης Βλέμμας

Καθηγήτρια Φωτεινή Αθανασοπούλου

Αναπληρωτής Καθηγητής Βασίλειος Ψύχας

Αναπληρωτής Καθηγητής Παναγιώτης Αγγελίδης

Επίκουρος Καθηγητής Θεόφιλος Πουταχίδης

Επίκουρη Καθηγήτρια Ευανθία Πετρίδου

Λέκτορας Ιωάννης Βάτσος

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2012**



*Στον πατέρα μου*



“Έντολή σου, είπε, αυτός ο κόσμος  
και γραμμένος μες στα σπλάχνα σου είναι  
Διάβασε και προσπάθησε  
και πολέμησε”

Οδυσσέα Ελύτη  
ΤΟ ΑΕΙΟΝ ΕΣΤΙ





## ΑΝΤΙ ΠΡΟΛΟΓΟΥ

Το θέμα της διατριβής, στο οποίο ως είθισται εισαγάγει ο πρόλογος, αναπτύσσεται στην εισαγωγή του γενικού μέρους αυτής της μελέτης. Έτσι στο κείμενο αυτό απομένει να απευθυνθούν ευχαριστίες. Ευχαριστίες σε ανθρώπους που με καθοδήγησαν, με στήριξαν ή και συμμετείχαν σε αυτήν την επίπονη προσπάθεια, σε όλη τη διαδρομή και χωρίς τους οποίους, ενδεχόμενα, δεν θα είχε ολοκληρωθεί αυτή η διατριβή.

Ευχαριστώ τον ομότιμο καθηγητή κ. Στέφανο Λέκκα, επιβλέποντα της διατριβής. Οι πολύτιμες συμβουλές του, πέραν της καθοδήγησης και της εκπαίδευσής μου, αποτέλεσαν για μένα διδασκαλία.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Ιωάννη Βλέμμα που ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου παρείχε πλήρη στήριξη από την αρχή έως το τέλος αυτής της πορείας.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Παναγιώτη Αγγελίδη, επίσης μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, που με υποδέχθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας, στο οποίο εργάστηκα ικανό χρόνο, και ο οποίος με καθοδήγησε στο επιστημονικό του πεδίο.

Πρέπει να επισημάνω ότι για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης ήταν απαραίτητη η συνεργασία του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής με το Εργαστήριο Ιχθυολογίας, συνεργασία που υπήρξε απρόσκοπτη και για το λόγο αυτό οφείλω να ευχαριστήσω το σύνολο του προσωπικού και των δύο εργαστηρίων. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον λέκτορα κ. Ιωάννη Βάτσο για τις σημαντικές υποδείξεις του.

Ευχαριστώ την επίκουρη καθηγήτρια κ. Παπαβέργου Αικατερίνη για την πραγματοποίηση της μεθόδου της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Άμπα Ζαφείρη για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της διατριβής.

Ευχαριστώ τη Δρ. Καλαμάκη Μαίρη. Η κ. Καλαμάκη με εκπαίδευσε στις τεχνικές της μοριακής μικροβιολογίας, πραγματοποίησε ή επιμελήθηκε το σύνολο των αντίστοιχων τεχνικών της διατριβής και επιμελήθηκε των αντίστοιχων κειμένων. Η συμβολή της στην πραγματοποίηση της διατριβής ήταν καίρια και την ευχαριστώ θερμά.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κ. Θεόφιλο Πουταχίδη. Ο κ. Πουταχίδης συνέβαλε ουσιαστικά στο σχεδιασμό της διατριβής, πραγματοποίησε τον φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό και παρακολούθησε την μελέτη σε όλα της τα στάδια. Τον ευχαριστώ για τη μεθοδικότητα και την επιμονή με την οποία αντιμετώπισε τη μελέτη.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου.

Τους γονείς μου Χρήστο και Αγγελική που μου έδωσαν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτήν την προσπάθεια, που πίστεψαν σε μένα και με στήριξαν με όλες τους τις δυνάμεις. Στον πατέρα μου, που δεν πρόλαβα να τη δείξω, αφιερώνεται αυτή η διατριβή.

Τη σύντροφό μου Νατάσα που δημιούργησε το κατάλληλο περιβάλλον, για να ολοκληρωθεί αυτή η μελέτη.

Και την αδελφή μου Σταματία η οποία είχε και την ουσιαστικότερη συμβολή, πρακτικά, αφού επιμελήθηκε επιστημονικά, συντακτικά και γραμματικά τα κείμενα, αλλά κυρίως ηθικά, όντας δίπλα μου σε όλες εκείνες τις στιγμές που είναι κανείς έτοιμος να τα παρατήσει. Σ' ευχαριστώ.

	ΣΕΛΙΔΑ
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	1
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ</b> .....	7
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
<b>ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ</b> .....	10
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΔΟΝΑΚΙΩΣΗ</b> .....	10
Ιστορική αναδρομή της νόσου.....	10
Επιζωοτιολογία.....	11
Διάγνωση.....	14
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. <i>Vibrio anguillarum</i></b> .....	15
Ιστορική αναδρομή.....	15
Περιγραφή.....	16
Ταξινόμηση.....	16
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ. ΛΑΒΡΑΚΙ (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</b> .....	19
Ταξινόμηση.....	19
Περιγραφή.....	19
Ιχθυοκαλλιέργεια λαβρακιού στην Ελλάδα.....	19
<b>ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΝΟΤΗΤΑ</b> .....	20
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ</b>	
<b>ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ</b> .....	20
<b>ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΙ ΧΥΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ</b> .....	20
Αναστολείς της βακτηριδιακής ανάπτυξης.....	21
Τρανσφερίνη.....	21
Αντιπροτεάσες.....	21
Λεκτίνες.....	21
Λυσίνες.....	22
Λυσοζύμη.....	22
Αντιβακτηριδιακές πεπτίδες.....	22
Πρωτεάσες.....	22
C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP).....	23
Σύστημα του συμπληρώματος.....	23

	ΣΕΛΙΔΑ
ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ.....	24
ΕΙΔΙΚΟΙ ΧΥΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ.....	25
Αντισώματα κατά της προσκόλλησης.....	25
Αντισώματα κατά της εισβολής.....	25
Αντιτοξίνες.....	25
Ενεργοποίηση της κλασικής οδού του συμπληρώματος (CCP).....	26
ΕΙΔΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ.....	26
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ</b>	
<b>ΤΟΥ <i>V. anguillarum</i></b> .....	27
Σύστημα δέσμευσης σιδήρου.....	27
Πρωτεάση.....	34
Αντοχή στη μικροβιοκτόνο δράση των ορών των ιχθύων.....	35
Αιμοσυγκολλητίνες.....	35
Παραγωγή εξωτοξίνης.....	36
Λιποπολυσακχαρίτης.....	36
Μαστίγια.....	36
Μείζον αντιγόνο επιφανείας.....	37
Αιμολυτική τοξίνη.....	38
 <b>ΤΡΙΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ</b> .....	39
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ</b>	
<b>ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ</b> .....	39
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ζ. ΠΥΛΕΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ <i>V. anguillarum</i></b> .....	45
Δέρμα.....	45
Πεπτικό Σύστημα.....	45
Βράγχια.....	47
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Η. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ <i>V. anguillarum</i></b> .....	48
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Θ. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ</b> .....	49

	ΣΕΛΙΔΑ
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ.....</b>	<b>51</b>
Υπεροξεία μορφή.....	51
Οξεία μορφή.....	52
Δέρμα.....	52
Καρδιά.....	53
Νεφροί.....	53
Σπλήνας.....	54
Ήπαρ.....	54
Γαστρεντερικός σωλήνας.....	54
Περιτόναιο.....	55
Μήνιγγες.....	55
Χρόνια μορφή.....	55
Δέρμα.....	55
Βράγχια.....	55
Καρδιά.....	56
Σπλήνας.....	56
Νεφροί.....	56
Αιμοποιητικό σύστημα.....	56
Περιτοναϊκή κοιλότητα.....	56
Οφθαλμοί.....	56
 <b>ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ</b>	
<b>ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....</b>	<b>57</b>

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	59
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	60
Διαχείριση πειραματόζωων.....	60
Μικροβιολογικός έλεγχος τροφής και νερού.....	61
Παθογόνο αίτιο.....	61
Καλλιέργειες, μικροβιολογικές – βιοχημικές δοκιμές.....	61
Μοριακή ταυτοποίηση του φυσικού στελέχους <i>V. anguillarum</i> , Van1.....	62
Έλεγχος παρουσίας πλασμιδίου στο Van1.....	63
Αφαίρεση του πλασμιδίου του Van1 – Δημιουργία του Van731.....	63
Επιβεβαίωση της γενετικής τροποποίησης του στελέχους Van1.....	64
Έλεγχος σύνθεσης σιδηροφόρου μορίου από τα στελέχη Van1 και Van731.....	65
Έλεγχος παραγωγής ισταμίνης από τα στελέχη Van1 και Van731.....	66
Προετοιμασία των εναιωρημάτων των βακτηριδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές μολύνσεις.....	67
Προπειραματικές μολύνσεις.....	67
Νεκροψία – Νεκροτομή των ιχθυδίων.....	68
Μικροβιολογικές εξετάσεις ιχθύων.....	68
Μοριακές εξετάσεις ιχθύων.....	69
Ιστοπαθολογικές εξετάσεις ιχθύων.....	69
Πρώτη πειραματική μόλυνση – Μελέτη κινητικής του Van1.....	70
Φθορίζων <i>in situ</i> υβριδισμός.....	70
Δεύτερη πειραματική μόλυνση – Μελέτη θνησιμότητας από τα Van1 και Van731.....	72
Τρίτη πειραματική μόλυνση – Παθολογοανατομική μελέτη της Δονακίωσης από Van1 και Van731.....	72
Ειδικές ιστοχημικές χρώσεις.....	73
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	74

<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	75
Καλλιέργειες, μικροβιολογικές – βιοχημικές δοκιμές.....	75
Μοριακή ταυτοποίηση του Van1.....	75
Έλεγχος παρουσίας πλασμιδίου στο Van1.....	75
Αφαίρεση του πλασμιδίου του Van1 – Δημιουργία του Van731.....	76
Επιβεβαίωση της γενετικής τροποποίησης του στελέχους Van1.....	77
Έλεγχος παραγωγής σιδηροφόρου μορίου από τα στελέχη Van1 και Van731.....	78
Έλεγχος παραγωγής ισταμίνης από τα στελέχη Van1 και Van731.....	79
Κλινικές παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των πειραματισμών.....	80
Μελέτη κινητικής του Van1.....	80
Θνησιμότητα που προκλήθηκε από τα Van1 και Van731.....	82
Παρατηρήσεις κατά τη νεκροψία και νεκροτομή των πειραματόζωων.....	83
Ιστολογικές παρατηρήσεις με τη χρήση μικροσκοπίου κοινού φωτισμού.....	87
Καρδιά.....	87
Σπλήνας.....	90
Ήπαρ.....	94
Νεφρός.....	98
Κεφαλικός νεφρός.....	98
Σωματικός νεφρός.....	101
Ενδοκρινείς αδένες.....	104
Στόμαχος.....	104
Έντερο.....	105
Εγκέφαλος.....	107
Νηκτική Κύστη.....	108
Πάγκρεας.....	109
Δέρμα και υποκείμενος γραμμωτός μυϊκός ιστός.....	110
Βράγχια.....	111
Περιτόναιο.....	112
Γονάδες.....	112

	ΣΕΛΙΔΑ
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	113
Μικροβιολογικές, μοριακές και ιστοπαθολογικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν.....	114
Πειραματόζωα, πειραματικές μολύνσεις και μέθοδοι δειγματοληψίας.....	116
Πειραματικό πρότυπο για την παθολογοανατομική μελέτη νοσημάτων των ιχθύων.....	118
Μελέτη της πύλης εισόδου και της κινητικής του Van1 στο λαβράκι.....	118
Μελέτη θνησιμότητας που προκλήθηκε από τα στελέχη Van1 και Van731.....	124
Παθολογοανατομική μελέτη της Δονακίωσης από τα στελέχη Van1 και Van731.....	125
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	129
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b> .....	131
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	163
<b>SUMMARY</b> .....	166
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	169



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

<b>ACP</b>	εναλλακτική οδός του συμπληρώματος
<b>ADH</b>	διυδρολάση της αργινίνης
<b>AMY</b>	αμυγαλίνη
<b>ARA</b>	αραβινόζη
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>B-H</b>	χρώση Brown and Hopps
<b>CAS</b>	Chrome azurol S άγαρ
<b>CCP</b>	κλασσική οδός του συμπληρώματος
<b>CIT</b>	κιτρικά άλατα
<b>CRP</b>	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
<b>EDTA</b>	αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>FISH</b>	φθορίζων <i>in situ</i> υβριδισμός
<b>GEL</b>	ζελατίνη
<b>GLU</b>	γλυκόζη
<b>HB</b>	ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού
<b>H-E</b>	χρώση αιματοξυλίνης – εωσίνης
<b>HPLC</b>	υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
<b>HPW</b>	υπερκαθαρό νερό
<b>HR</b>	άγαρ υπόστρωμα πλούσιο σε ιστιδίνη
<b>IND</b>	ινδόλη
<b>INO</b>	ινοσιτόλη
<b>LD<sub>50</sub></b>	μέση θανατηφόρος δόση
<b>LDC</b>	δεκαρβοξυλάση της λυσίνης
<b>LPS</b>	λιποπολυσακχαρίτης
<b>M</b>	πειραματική ομάδα μαρτύρων
<b>MAN</b>	μανιτόλη
<b>MEL</b>	μελιβιόζη
<b>MPO</b>	μυελοϋπεροξειδάση

<b>ODC</b>	δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης
<b>OPA</b>	ορθοφθαλκική διαλδεύδη
<b>P-</b>	Πειραματική ομάδα που μολύνθηκε με το Van731
<b>P+</b>	Πειραματική ομάδα που μολύνθηκε με το Van1
<b>PBS</b>	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
<b>PCR</b>	αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης
<b>PFA</b>	παραφορμαλδεύδη
<b>pKTP</b>	πλασμίδιο 67Kb του Van1
<b>RHA</b>	ραμνόζη
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>RT</b>	θερμοκρασία δωματίου
<b>S</b>	αλατότητα
<b>SAC</b>	σακχαρόζη
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>SOR</b>	σορβιτόλη
<b>T</b>	θερμοκρασία
<b>TAE</b>	tris acetate EDTA
<b>TCBS</b>	thiosulfate citrate bile salt agar
<b>TDA</b>	δεαμινάση της τρυπτοφάνης
<b>TSAS</b>	tryptic soy agar με προσθήκη 1,5% NaCl
<b>TSBS</b>	tryptic soy broth με προσθήκη 1,5% NaCl
<b>TSBSf</b>	TSBS με προσθήκη 0,3% άγαρ
<b>URE</b>	ουρεάση
<b>Van1</b>	Φυσικό στέλεχος <i>V. anguillarum</i>
<b>Van731</b>	Γενετικά τροποποιημένο στέλεχος <i>V. anguillarum</i>
<b>VP</b>	ακετοΐνη

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Δονακίωση είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα των υδρόβιων οργανισμών. Γνωστή ως παθολογική οντότητα για περισσότερα από διακόσια χρόνια, εμφανίζει παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση και προσβάλλει πλήθος οργανισμών, άγριων και εκτρεφόμενων, που διαβιούν σε θαλάσσια, υφάλμυρα και γλυκά νερά. Το *Vibrio anguillarum* αναγνωρίζεται στη διάρκεια όλων αυτών των ετών μέχρι και σήμερα, ως ο σημαντικότερος αιτιολογικός παράγοντας της Δονακίωσης.

Στην πρώτη ενότητα του γενικού μέρους της παρούσας μελέτης καταγράφονται στοιχεία της ιστορίας και της επιζωοτιολογίας του νοσήματος, με έμφαση σε αυτά που αφορούν στη Δονακίωση που οφείλεται στο *V. anguillarum*. Περιγράφεται το βακτηρίδιο και δίνονται στοιχεία για την ταξινόμηση και την ταυτοποίησή του καθώς και για τις μακρόχρονες και ποικίλες προσπάθειες κατάταξης των στελεχών ενός είδους που χαρακτηρίζεται από σημαντική ετερογένεια. Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η παθολογοανατομική διερεύνηση του νοσήματος. Με βάση τα παραπάνω η πραγματοποίηση πειραματικών μολύνσεων για την προσέγγιση του νοσήματος και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων ήταν αναπόφευκτη. Η πρώτη ενότητα κλείνει με την ταξινόμηση, τα χαρακτηριστικά και την σημασία του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) ως εκτρεφόμενου είδους στην Ελλάδα και ευρύτερα στη Μεσόγειο θάλασσα, δεδομένο που οδήγησε στην επιλογή του ως πειραματόζωο στην παρούσα ερευνητική εργασία.

Στη δεύτερη ενότητα περιγράφονται σε συντομία οι αμυντικοί μηχανισμοί του ψαριού έναντι νοσογόνων βακτηριδίων και οι παράγοντες λοιμογόνου ικανότητας που διαθέτει το *V. anguillarum*. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται σε μηχανισμούς ή παράγοντες που αποτελούν το ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

Η αλληλεπίδραση του αμυντικού συστήματος του ψαριού και των παραγόντων παθογόνου δράσης του βακτηριδίου οδηγεί τελικά στην εκδήλωση της παθογένειας του νοσήματος, δεδομένα της οποίας παρατίθενται στην τρίτη ενότητα. Η παρουσίαση των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών αλλοιώσεων της Δονακίωσης, σε φυσικά περιστατικά και πειραματικές μολύνσεις σε διάφορα είδη, και με ιδιαίτερη έμφαση σε αυτές που αποδίδονται στο *V. anguillarum*, ολοκληρώνει την ενότητα αυτή και το γενικό μέρος της παρούσας εργασίας.

## ΠΡΩΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ Α. ΔΟΝΑΚΙΩΣΗ

Η Δονακίωση (Vibriosis) είναι ένα από τα σημαντικότερα νοσήματα των ιχθύων και προκαλείται από βακτηρίδια του γένους *Vibrio*. Η Δονακίωση από *V. anguillarum* είναι ιδιαίτερα καταστροφική για τις θαλάσσιες καλλιέργειες των σαλμονιδών (Actis και συν. 1999α). Οι απώλειες από τη νόσο είναι τόσο σημαντικές, ώστε το *V. anguillarum* να θεωρείται ο σημαντικότερος ανασταλτικός παράγοντας για τις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες (Schiewe. 1983, Winton και συν. 1983, Trust. 1986). Εκτός από το *V. anguillarum* άλλα είδη του γένους *Vibrio*, που απομονώθηκαν ως αιτιολογικοί παράγοντες της Δονακίωσης, είναι τα: *V. ordalii* (Schiewe και συν. 1981), *V. salmonicida* (που προκαλεί τη “Hitra disease” ή “cold water Vibriosis”) (Egidius και συν. 1986), *V. damsela* (Love και συν. 1981), *V. vulnificus* βιότυπος II (Tison και συν. 1982), *V. tubiashii* (Hada και συν. 1984), *V. carchariae* (Grimes και συν. 1984), *V. cholerae* non-O1 (Muroga και συν. 1979, Yamanoi και συν. 1980), *V. alginolyticus* (Colorni και συν. 1981), *V. harveyi*, *V. viscosus* (Lunder και συν. 1995) *V. splendidus* (Lupiani και συν. 1989), *V. ichthyoenteri* (Ishimura και συν. 1996), *V. pelagius* και άτυπα στελέχη *V. anguillarum* (Toranzo και Barja. 1990). Η λίστα εμπλουτίζεται συνεχώς με νέα είδη όπως τα *Vibrio brasiliensis* και *V. neptunius* (Thompson και συν. 2003α), *V. coralliilyticus* (Ben-Haim και συν. 2003), *V. ezurae* (Sawabe και συν. 2004β), *V. fortis* (Thompson και συν. 2003γ), *V. kanaloae* (Thompson και συν. 2003β), *V. rotiferianus* (Gomez-Gill και συν. 2003α) τα οποία δυνητικά προκαλούν το νόσημα (Austin και συν. 2005).

Ο όρος Δονακίωση χρησιμοποιείται κυρίως για να περιγράψει μολύνσεις που σχετίζονται με το *V. anguillarum*, αλλά και το *V. ordalii* και άλλα είδη *Vibrio* μπορούν να προκαλέσουν παρόμοια κλινικά συμπτώματα νόσου σε άγρια και εκτρεφόμενα ψάρια σε όλο τον κόσμο.

### Ιστορική αναδρομή της νόσου

Η εξαιρετική περιγραφή μίας επιζωοτίας του νοσήματος, που ιστορικά αναφερόταν ως *pestis rubra anguillarum* σε χέλια το 1718, είναι αναμφισβήτητα η πρώτη αναφορά βακτηριδιακού νοσήματος ψαριών στην Ευρωπαϊκή βιβλιογραφία (Bonaveri. 1761). Μία θαυμάσια ανασκόπηση του Drouin de Bouville (1907) περιλαμβάνει λεπτομερή θεώρηση

πρώιμων αφηγήσεων της εποχής για το νόσημα. Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου απομονώθηκε αρχικά από τον Canestrini (1893) και ονομάστηκε *Bacillus anguillarum* από τον ξενιστή του, το χέλι *Anguilla anguilla*. Ο Bergman το 1909 περιγράφει νόσημα στη Βαλτική Θάλασσα με την ονομασία “red pest of eels”. Το σύγχρονο όνομα *V. anguillarum* προέρχεται από τη λεπτομερή περιγραφή της παθολογίας και της βακτηριολογίας του νοσήματος, που έγινε από τον Bergman ( αναφέρονται στους Austin και Austin, 1993). Έτσι, η πρώτη αναλυτική περιγραφή της Δονακίωσης συμπίπτει με αυτή του *V. anguillarum*. Μετά τον Bergman (1909,1912) το βακτηρίδιο απομονώνεται από τον Schaperclaus (1927, 1928) και ακολουθεί πλήθος δημοσιεύσεων, στις οποίες το *V. anguillarum* αποδεικνύεται το αίτιο επιζωοτιών σε διάφορα είδη ψαριών σε θαλάσσια, υφάλμυρα και γλυκά νερά (Brunn και Heiberg. 1932, Nybelin. 1935, Bagge και Bagge. 1956, Berner και Mattheis. 1959, Mattheis. 1960, και άλλοι). Σύγχυση προκαλείται με την ποικιλία των ονομάτων που έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της νόσου, όπως ‘salt-water furunculosis’ (Rucker. 1963), ‘boil-disease’ (Kubota και Takakuwa. 1963), ‘ulker-disease’ (Bagge και Bagge. 1956) και ‘hitra-disease’ (Egidius και συν. 1981) (αναφέρονται στους Austin και Austin. 1993). Με την ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών, οι απώλειες που οφείλονταν σε δονάκια αναδείχθηκαν ως ιδιαίτερης σημασίας και έγιναν σοβαρή απειλή για την ιχθυοπαραγωγή (Rucker και συν. 1954, Rucker. 1959, Hoshina. 1956, Hayashi. 1964, Muroga και Egusa 1967, Ross και συν. 1968, και άλλοι) (αναφέρονται στον Schaperclaus. 1991). Έκτοτε το νόσημα έγινε ένα από τα πιο εντατικά μελετημένα βακτηριδιακά νοσήματα.

### **Επιζωοτιολογία**

Η Δονακίωση προσβάλλει τα άγρια και καλλιεργούμενα θαλάσσια ψάρια των αλμυρών και υφάλμυρων υδάτων, κυρίως στα ρηχά νερά κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου (Roberts. 1989).

Το *V. anguillarum* αποτελεί τμήμα της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του υδάτινου περιβάλλοντος (West και Lee. 1982, Muroga και συν. 1986), σε ιδιαίτερη συσχέτιση με τα τροχόζωα (Tatani και συν. 1985, Muroga και Yasunobu. 1987) και παρουσιάζει μέγιστους και ελάχιστους πληθυσμούς το καλοκαίρι και το χειμώνα αντίστοιχα (Larsen. 1982). Αποδείχθηκε πειραματικά ότι μπορεί να επιβιώσει για παρατεταμένες χρονικές περιόδους στο θαλασσινό νερό. Ο Hoff (1989) χαρακτηριστικά αναφέρει επιβίωση πάνω από 50 μήνες. Το βακτηρίδιο μπορεί επίσης να αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας των θαλάσσιων ιχθύων (Oppenheimer. 1962, Mattheis. 1964β).

Φυσική δεξαμενή για το *V. anguillarum* πιστεύεται ότι αποτελούν τα άγρια ψάρια, που σιτίζονται γύρω από τις ιχθυοκαλλιέργειες. Η επαφή των ψαριών μεταξύ τους φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εξάπλωση του βακτηριδίου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι το *V. anguillarum* ανευρίσκεται επίσης φυσιολογικά και στην τροφή των καλλιεργούμενων και άγριων υγιών ιχθύων (Roberts. 1989). Έτσι το ψάρι είναι συνεχώς εκτεθειμένο στην παρουσία του βακτηριδίου και με την επικράτηση ειδικών συνθηκών ο κύκλος της ασθένειας ξεκινάει.

Στο ερώτημα για την προέλευση του μολυσματικού παράγοντα στην περίπτωση της Δονακίωσης, έχουν διατυπωθεί δύο θεωρίες. Η πρώτη υποστηρίζει ότι η ασθένεια ξεκινά από μια μεταβολή στην ισορροπία μεταξύ ξενιστή και βακτηριδίου, το οποίο φυσιολογικά υπάρχει συμβιωτικά ως μέλος της ενδογενούς μικροχλωρίδας, αλλά είναι ικανό να εκμεταλλευτεί την εξασθένηση του αμυντικού συστήματος του ξενιστή. Μεγάλος αριθμός διαφορετικών στελεχών βακτηριδίων, από είδη γνωστά για τη σημασία τους στην πρόκληση ασθενειών, έχουν απομονωθεί κατά την περιγραφή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου και του δέρματος υγιών ιχθύων. Μόνο μία μικρή αναλογία από τα στελέχη αυτά ανήκουν αναμφίβολα στα *V. anguillarum* και *V. ordalii*. Αυτό όμως το μικρό ποσοστό μπορεί να αποτελεί αποθήκη δυνητικά παθογόνων βακτηριδίων. Προσπάθειες πρόκλησης νόσου με τη χρήση συμβιωτικών στελεχών απέβησαν άκαρπες. Από την άλλη, όταν χρησιμοποιήθηκαν βακτηρίδια που είχαν απομονωθεί από περιστατικά ενζωτίας Δονακίωσης προκλήθηκε νόσος στο ίδιο είδος ξενιστών, ενώ η κατάσταση ήταν διάφορη όταν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά είδη ψαριών, καταδεικνύοντας κάποιου βαθμού ειδικότητας του ξενιστή. Από τη μία η ειδικότητα μπορεί να λειτουργεί ως φραγμός στη μόλυνση, που μειώνει την πιθανότητα τα καλλιεργούμενα είδη να μολύνονται από άγριους πληθυσμούς, από την άλλη τα συμβιωτικά για ένα είδος στελέχη μπορεί να είναι παθογόνα για άλλο.

Η δεύτερη υποστηρίζει ότι τα στελέχη που προκαλούν ασθένεια είναι περισσότερο ειδικοί μολυσματικοί παράγοντες, που μεταδίδονται από ένα μολυσμένο πληθυσμό σε άλλο και μολονότι σχετίζονται στενά είναι διάφορα από τα αντίστοιχα συμβιωτικά. Κάθε επαφή με το θαλάσσιο περιβάλλον εκθέτει τους πληθυσμούς των ψαριών στα θαλάσσια δονάκια που βρίσκονται παντού, συμπεριλαμβανομένου και του δυνητικά παθογόνου τμήματός τους. Η έναρξη της μόλυνσης από το φυσικό περιβάλλον συμπληρώνεται από διάφορες πηγές, όπως το τάισμα με ελλιπώς επεξεργασμένα νεκρά από Δονακίωση ψάρια σε ιχθυοκαλλιέργειες, μετάδοση μέσω πουλιών από μολυσμένη σε υγιή εκτροφή ή μη επιτήρηση της καθιερωμένης διαδικασίας απομόνωσης.

Είναι πιθανό ότι τόσο η διάσπαση της συμβίωσης βακτηριδίου – ξενιστή, όσο και η μολυσματική εξάπλωση ειδικών παθογόνων στελεχών, αποτελούν τμήματα της επιζωοτιολογίας

της Δονακίωσης. Τα περιστατικά μπορεί να εκκινούν, είτε από την τυχαία συνεύρεση ενός ευαίσθητου ξενιστή με ένα παθογόνο στέλεχος στο περιβάλλον, είτε από την αποτυχία ενός ξενιστή να καταστείλει ένα συμβιωτικό στέλεχος που μπορεί να είναι δυνητικά παθογόνο (Horne. 1982).

Ο τρόπος μετάδοσης επίσης από ένα άτομο σε άλλο δεν είναι ξεκάθαρος (Horne. 1982). Όταν κάποια άτομα σε μία εγκατάσταση εκτροφής ψαριών μολυνθούν, το περιβάλλον γίνεται ταχύτατα έντονα μολυσμένο οπότε το νερό, η λάσπη και ειδικά τα φίλτρα είναι πλούσια πηγή δονακίων. Τα μολυσμένα άτομα εκκρίνουν ζωντανά βακτηρίδια στα κόπρανά τους και πιθανά διαμέσου και των πόρων του δέρματος της κοιλιακής κοιλότητας. (George και συν. 1982). Η πρόσληψη μολυσμένων υλικών, ειδικά κοπράνων, και η είσοδος των βακτηριδίων από διάφορες θέσεις της επιφάνειας του σώματος είναι οι δύο προφανείς οδοί μετάδοσης (Horne. 1982).

Η θερμοκρασία (άνω των 10° C) και η ποιότητα του νερού, η μεγάλη ιχθυοπυκνότητα, η παρουσία δερματικών αλλοιώσεων, η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους και η επίδραση παραγόντων καταπόνησης στα ψάρια, αποτελούν σημαντικές συνιστώσες, που επηρεάζουν την έναρξη της εκδήλωσης μιας επιζωοτίας (Horne. 1982).

Ένα σημαντικό ευρύ φάσμα τροπικών και εύκρατων καλλιεργούμενων ψαριών προσβάλλεται από την ασθένεια. Στην Ιαπωνία και σε περιοχές της Νοτίου Αμερικής και της Ευρώπης είναι η πλέον καταστροφική οικονομικά, μολυσματική νόσος στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες (Rucker και συν. 1953, Mattheis. 1964α, Kusuda. 1966, Muroga. 1975), ενώ προσβάλλει ευρέως και καλλιεργούμενα σε γλυκά νερά είδη (Hacking και Budd. 1971, Muroga και Egusa. 1970, Muroga και συν. 1976). Αν και ταξινομικά το *V. anguillarum* ανήκει στα αλλόφιλα δονάκια και θεωρείται γενικά θαλάσσιος οργανισμός, πειραματικές έρευνες πραγματοποιήθηκαν συχνά σε ιριδίζουσα πέστροφα σε γλυκά ή υφάλμυρα ύδατα (Saito και συν. 1964, Baudin-Laurencin και Tangtrongpiros. 1980, Agius και συν. 1982). Καμία σημαντική διαφορά δε διαπιστώθηκε στην παθολογία της νόσου ή τη λοιμογόνο δύναμη του βακτηριδίου κατά τη σύγκριση μοντέλων σε θαλάσσια και γλυκά νερά (Horne. 1982, Wertheimer και συν. 1994).

Η Δονακίωση από *V. anguillarum* προσβάλλει στη Νότια Ευρώπη κυρίως το λαβράκι (*D. labrax*) και το καλκάνι (*Scophthalmus maximus L.*) (Vigneulle και Baudin-Laurencin. 1991).

Σε διάφορες χώρες, τόσο στις Ακτές του Ειρηνικού, όσο και στις Ατλαντικές Ακτές και στη Μεσόγειο έχουν αναφερθεί επιζωοτίες, κατά τις οποίες προσβλήθηκαν περί τα 50 είδη ιχθύων του γλυκού νερού και της θάλασσας από τη νόσο (Anderson και Conroy. 1970, Strout και συν. 1978, Tolmasky και συν. 1985, Tolmasky και συν. 1988β). Οι Toranzo και Barja (1990)

καταγράφουν όλες τις αναφορές για Δονακίωση από *V. anguillarum* σε καλλιεργούμενους ιχθείς, μαλάκια και καρκινοειδή σε διάφορες χώρες (Πίνακας 1, τροποποιημένος).

**Πίνακας 1: Δημοσιεύσεις περιστατικών Δονακίωσης από *V. anguillarum* σε διάφορα είδη υδρόβιων οργανισμών. (Toranzo και Barja, 1990, τροποποιημένος)**

ΕΙΛΟΣ	ΧΩΡΑ	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	ΕΙΛΟΣ	ΧΩΡΑ	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	USA	Rucker et al (1953)	<i>Pagrus major</i>	Japan	Muroga & Tatani (1982)
		Fryer et al (1972)	<i>Anguilla anguilla</i>	Norway	Rodseather et al (1977)
		Harrell et al (1976a)	<i>Anguilla japonica</i>	Japan	Kitao et al (1983)
		Strout et al (1978)			Tajima et al (1985)
	Japan	Tajima et al (1981, 1985)	<i>Pollachius virens</i>	Norway	Egidius & Andersen (1978)
	Spain	Toranzo et al (1987)	<i>Sparus aurata</i>	Israel	Paperna et al (1977)
<i>O. keta, O. nerka, O. gorboscha</i>	Canada	Evelyn (1971)	<i>Mugil cephalus</i>	Scotland	Rodgers & Burke (1981)
<i>O. masou, O. rhodurus</i>	Japan	Tajima et al (1985)	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japan	Jo et al (1979)
<i>O. tshawytscha</i>	USA	Cisar & Fryer (1969)			Tajima et al (1985)
	Canada	Evelyn (1971)	<i>Ictalurus punctatus</i>	USA	Lewis (1985)
<i>Salmo salar</i>	Norway	Hastein & Holt (1972)	<i>Chanos chanos</i>	Taiwan	Huang (1977)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	USA	Ross et al (1968)			Chen et al (1985)
	Japan	Muroga & Egusa (1973)	<i>Plecoglossus altivelis</i>	Japan	Muroga & Egusa (1967, 1970)
		Kitao et al (1983)			Mifuchi et al (1983)
		Tajima et al (1985)			Tajima et al (1985)
	Italy	Giorgetti & Ceschia (1982)		Taiwan	Kuo et al (1976)
	Norway	Holt (1970)	<i>Oreochromis aureus</i>	Kuwait	Tareen (1984)
		Egidius & Andersen (1977)	<i>Ostrea edulis</i>	USA	DiSalvo et al (1978)
	Denmark	Larsen (1983)		Great Britain	Jeffries (1982)
		Larsen & Mellergaard (1984)		Spain	Bolinches et al (1986)
		Sorensen & Larsen (1986)			Lodeiros et al (1987)
	Spain	Toranzo et al (1987)	<i>Crassostrea gigas</i>	USA	DiSalvo et al (1978)
<i>Salmo trutta</i>	Scotland	Smith (1961)		Australia	Garland et al (1983)
		Hastein & Smith (1977)		Great Britain	Jeffries (1982)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Scotland	Horne et al. (1977)	<i>Crassostrea virginica</i>	USA	Tubiash et al (1965, 1970)
	Spain	Devesa et al (1985)			Elston (1979)
		Toranzo et al (1987)			Elston et al (1981)
<i>Morone saxatilis</i>	USA	Toranzo et al (1983a)			Brown & Losee (1978)
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	USA	Levin et al (1972)			Brown (1981)
<i>Gadus morhua</i>	Norway	Egidius & Andersen (1984)	<i>Mercenaria mercenaria</i>	USA	Tubiash et al (1965, 1970)
	Denmark	Larsen (1983)	<i>Homarus americanus</i>	USA	Bowser et al (1981)
		Larsen & Jensen (1979)	<i>Penaeus sp.</i>	USA	Lewis (1979)
		Larsen & Mellergaard (1984)	<i>Atherina boyeri</i>	Greece	Yiagnis et al (2007)
		Sorensen & Larsen (1986)			

## Διάγνωση

Η διάγνωση της Δονακίωσης επιτυγχάνεται με την απομόνωση και ταυτοποίηση του παθογόνου στελέχους. Για την ταυτοποίηση του *V. anguillarum* έχουν χρησιμοποιηθεί ειδικά καλλιεργητικά υποστρώματα (Alsina και συν. 1994), η δοκιμή ευαισθησίας στον παράγοντα O/129, σειρές βιοχημικών δοκιμών (Grisez και συν. 1991), ορολογικές μέθοδοι (Cirriano και συν. 1985), μονοκλωνικά αντισώματα (Chen και συν.1992, Adone και συν.1996), υβριδισμός με ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για την 5S και την 16S υπομονάδα του ριβοσωμικού ριβοζονουκλεϊκού οξέος (rRNA) (Rehnstam και συν. 1989, Martinez-Picado και συν. 1994) και τέλος η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) (Hirono και συν. 1996).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Β. *Vibrio anguillarum*

### Ιστορική αναδρομή

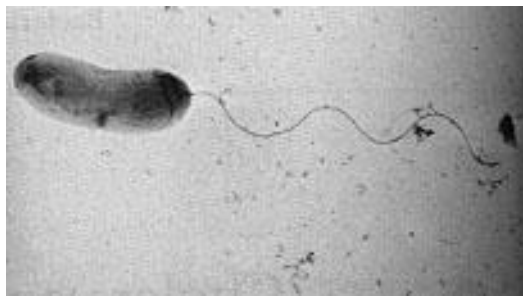
Το *Vibrio anguillarum*, όπως προαναφέρθηκε, περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1909 από τον Bergman. Στις επόμενες δεκαετίες, πολλά είδη, όπως τα *V. piscum* (David. 1927), *V. anguillacida* (Brunn και Heiberg. 1932), *Achromobacter ichthyodermis* (Wells και Zobell. 1934), *Pseudomonas ichthyodermis* (Zobell και Upham. 1944), *V. piscum* var. *Japonicus* (Hoshina. 1957) και *V. ichthyodermis* (Shewan και συν. 1960) περιγράφηκαν επίσης, ως αιτιολογικοί παράγοντες της Δονακίωσης. Μετά από λεπτομερείς συγκριτικές έρευνες, τα είδη αυτά συμπεριλήφθηκαν στο είδος *V. anguillarum*, Bergman 1909, στο Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Shewan και Veron. 1974) (αναφέρονται στον Schaperclaus. 1991). Το 1976 οι Harrell και συν. αποδεικνύουν ότι στελέχη του *V. anguillarum*, που απομονώθηκαν, εμφανίζουν σαφή ετερογένεια, γεγονός που οδηγεί στο διαχωρισμό τους σε δύο διαφορετικούς βιότυπους, 1 και 2 (Schiewe και συν. 1977). Οι Baumann και συν. (1978) προτείνουν εκ νέου κατάταξη του είδους σε *Beneckea anguillara* βιότυπος 1 και 2 για να ανακαλέσουν έπειτα από δύο χρόνια (Baumann και συν. 1980). Οι Schiewe και συν. το 1981 προτείνουν ένα νέο είδος για το βιότυπο 2 του *V. anguillarum* το οποίο ονομάζουν *V. ordalii*. Σήμερα η διάκριση μεταξύ των δύο ειδών έχει εδραιωθεί. (Schiewe και Crosa. 1981, Kaper και συν. 1983, Egidius και συν. 1986, Grisez και συν. 1991, Pazos και συν. 1993, Alsina και συν. 1994, Alsina και Blanch, 1994a, Alsina και Blanch, 1994b, Tiainen και συν. 1995, Mutharia και Amor. 1994).

Πλήρη ταξινομική σύγκριση προκάλεσε η επαναταξινόμηση των *V. anguillarum*, *V. pelagius* και *V. damsela* σε νέο γένος με το όνομα *Listonella* από τους McDowell και Colwell (1985). Οι Nearhos και Fuerst (1987) δεν κατάφεραν να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα αυτά. Οι Austin και συν. (1995,1997) επίσης δεν κατάφεραν να υποστηρίξουν τη δημιουργία του γένους *Listonella*. Στην παρούσα μελέτη θα διατηρηθεί η αρχική ονομασία, δηλ. *Vibrio anguillarum*, τόσο για ιστορικούς λόγους, όσο, και κυρίως, εξαιτίας της στενής συγγένειας του βακτηριδίου με τα υπόλοιπα βακτηρίδια του γένους *Vibrio* (Crosa. 1989, Tolmasky και συν. 1994, Wertheimer και συν. 1994).

## Περιγραφή

Το *V. anguillarum* είναι ένα Gram – αρνητικό, δυνητικά αναερόβιο, ευθύ ή ελαφρώς κυρτό βακτηρίδιο. (Buller. 2004, Baumann και συν. 1984). Το μήκος του είναι 1,4-2,6μ και η διάμετρος του 0,5-0,8μ. Διαθέτει ένα ή περισσότερα πολικά μαστίγια με τα οποία κινείται. Η περιεκτικότητά του σε γουανίνη και κυτοσίνη (G + C) είναι 43-46%. Αναπτύσσεται γρήγορα στους 25-30<sup>0</sup> C σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα, όπως στα brain – heart infusion και tryptic soy ζωμό ή άγαρ με προσθήκη 1,5 % χλωριούχου νατρίου. Σε στερεό υπόστρωμα σχηματίζει στρόγγυλες υπόλευκες αποικίες. Είναι θετικό στη δοκιμή της καταλάσης και της οξειδάσης. Διαθέτει οξειδωτικό και αναγωγικό μεταβολισμό.

Το *V. anguillarum* ανήκει στα αλλόφυλα δονάκια, αφού επιβιώνει σε ποικίλες αλατότητες. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξής του είναι: pH 7, αλατότητα 2% και θερμοκρασία 25°C (Larsen. 1984).



Εικόνα 1: *Vibrio anguillarum*

## Ταξινόμηση

Η ταξινόμηση του *V. anguillarum* έχει ως εξής:

Υπερβασιλείο: *Bacteria*

Φύλο: *Proteobacteria*

Κλάση: *Gammaproteobacteria*

Σειρά: *Vibrionales*

Οικογένεια: *Vibrionaceae*

Γένος: *Vibrio*

Είδος: *anguillarum*

Για την ταξινόμηση και κατάταξη των διαφόρων παθογόνων ή/και περιβαλλοντικών στελεχών του *V. anguillarum* έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες μελέτες. Στις μελέτες αυτές για την κατάταξη των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σχήματα, που βασίζονταν στα

βιοχημικά χαρακτηριστικά των στελεχών. Από αυτές προκύπτει, ότι δεν υπάρχει κανένα διακριτό πρότυπο στο βιοχημικό προφίλ του *V. anguillarum*. Έτσι, ενώ είναι σχετικά απλό να ταυτοποιηθεί και να διαχωριστεί από άλλα είδη *Vibrio* (Alsina και Blanch. 1994a, Alsina και Blanch. 1994b), η παραλλακτικότητα στα βιοχημικά χαρακτηριστικά μεταξύ των στελεχών του είδους δεν επιτρέπει το διαχωρισμό τους σε ομάδες.

Μεταγενέστερα, προτάθηκαν διαχωρισμοί με βάση το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) του τοιχώματος του βακτηριδίου. Ανοσολογικές μελέτες οδήγησαν σε νέα ταξινομικά σχήματα με κυριότερο το διαχωρισμό των στελεχών σε ορότυπους. Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ οροτύπων του *V. anguillarum*, της γεωγραφικής κατανομής τους και των ειδών που προσβάλλουν έχει διερευνηθεί. (Toranzo και συν. 1987, Larsen και συν. 1988, Myhr και συν. 1991, Larsen και συν. 1994, Bolinches και συν. 1990, Kitao και συν. 1983, Song και συν. 1988) Οι σαλμονίδες φαίνεται να προσβάλλονται σχεδόν αποκλειστικά από τους ορότυπους O1 και O2. Το λαβράκι και η τσιπούρα συχνότερα προσβάλλονται από τον ορότυπο O1, ενώ τα χέλια από τους ορότυπους O2 και O3 (Larsen και συν. 1994). Αρκετές εμπορικές δοκιμές είναι διαθέσιμες για την ορολογική ταυτοποίηση του *V. anguillarum* (Bionor® agglutination kit, AquaRapid-Va® και Aqua-Eia-Va® kits), όμως με τις δοκιμές αυτές δεν είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των οροτύπων O1 και O2 (Romalde και συν. 1995, Gonzalez και συν. 2004).

Οι Crosa και συν. (1977) διαπίστωσαν την παρουσία ενός μεγάλου πλασμιδίου, που το ονόμασαν pJM1, σε λοιμογόνο στέλεχος του O1 ορότυπου. Στελέχη του O1 ορότυπου φαίνεται να διαθέτουν παρόμοια πλασμίδια μεγέθους 67 Kb (Wiik και συν. 1989β, Larsen και Olsen. 1991, Myhr και συν. 1991, Pedersen και Larsen. 1995, Pedersen και συν. 1999β) αν και διαπιστώθηκαν και στελέχη χωρίς πλασμίδιο ή με περισσότερα του ενός πλασμίδια (Olsen και Larsen. 1993) Οι Austin και συν. (1995) διαπίστωσαν το ίδιο πλασμίδιο στην VaNT1 ομάδα στελεχών, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι δύο ομάδες σχετίζονται γενετικά. Ο ορότυπος O2 διαπιστώθηκε αρχικά χωρίς πλασμίδιο (Toranzo και συν. 1987, Wiik και συν. 1989β) για να αναιρεθεί αυτό στη συνέχεια, αφού βρέθηκαν στελέχη του με ένα ή και περισσότερα πλασμίδια (Myhr και συν. 1991, Tiainen και συν. 1995, Austin και συν. 1995, Pedersen και συν. 1996, Austin και συν. 1997, Pedersen και συν. 1999β) Οι υπόλοιποι ορότυποι κατά κανόνα δε διαθέτουν πλασμίδια (Austin και συν. 1995, Pedersen και συν. 1996) Από τα παραπάνω συνάγεται ότι η ανάλυση της παρουσίας πλασμιδίων στα διάφορα στελέχη δε συμβάλλει ικανά στη διάκριση υποομάδων μεταξύ των οροτύπων. (Austin και συν. 1995)

Τέλος, η χρήση μοριακών μεθόδων (υβριδισμός, PCR), φαίνεται να αποτελεί λύση στο πρόβλημα της ταυτοποίησης του *V. anguillarum* επιτείνοντας όμως το ταξινομικό χάος, που επικρατεί τόσο στην οικογένεια των *Vibrionaceae*, όσο και στο ίδιο το *V. anguillarum*, εξαιτίας

της σημαντικής ετερογένειας που παρατηρείται μεταξύ των στελεχών του είδους. Στον πίνακα εμφανίζονται ενδεικτικά δημοσιευμένες προσπάθειες ταξινόμησης και κατάταξης των στελεχών αυτών.

**Πίνακας 2: Ενδεικτικές δημοσιεύσεις που αφορούν στην κατάταξη και ταξινόμηση των στελεχών του *V. anguillarum* με βάση διάφορα χαρακτηριστικά του βακτηριδίου**

<b>Βιοχημικά Χαρακτηριστικά</b>	<b>LPS</b>	<b>16S rRNA, 5S rRNA, PCR</b>
Nybelin, 1935	Nomura and Aoki, 1985	Dorsch et al. 1992
Smith, 1961	Grisez and Ollevier, 1995	Rehnstam et al., 1989
Larsen and Jensen, 1979	Austin et al., 1995	Martinez-Picado et al., 1994
Evelyn 1971	Austin et al., 1997	Ruimy et al., 1994
Kaper et al., 1983	Tiainen et al., 1997a	Thompson et al., 2005
Egidius and Andersen, 1977	Pedersen et al., 1999a	Ben-Haim et al., 2003
Hastein and Smith, 1977	Santos et al., 1995	Gomez-Gil et al., 2004
Bryant et al. 1986b	Banoub et al., 1987	Thompson et al., 2004
West et al. 1986	Rasmussen, 1987b	Mikkelsen et al., 2007
Myhr et al., 1991	<b>Ανοσολογικά Χαρακτηριστικά</b>	Urbanczyk et al., 2007
Larsen, 1983	Pacha and Kiehn, 1969	Hirono et al., 1996
Bryant et al. 1986a	Sorensen and Larsen, 1986	Gonzalez et al., 2003
Lee et al., 1981	Harrell et al., 1976b	Ji et al., 2004
West et al., 1983	Strout et al., 1978	Sparagano et al., 2002
Lee and Bryant, 1984	Gould et al., 1979	<b>Ribotyping, PP, PFGE, RAPD</b>
MacDonell et al. 1982	Kitao et al., 1983	Pedersen and Larsen, 1995
Kent, 1982	Ezura et al., 1980	Pedersen and Larsen, 1993
Santos et al., 1993	Tassin et al., 1983	Tiainen et al. 1997b
Buller, 2004	Austin et al. 1995	Austin et al. 1995
Pedersen and Larsen, 1995	Pedersen et al. 1999a	Pedersen et al., 1999b
Tiainen et al., 1997b	Bolinches et al. 1990	Skov et al. 1995
Wiik et al., 1989β	Santos et al., 1995	Martinez et al. 1994
Grisez et al., 1991	Tiainen et al., 1997b	Pedersen et al. 1994
Austin et al. 1995	Toranzo et al., 1987	Montes et al., 2003
Pedersen et al. 1999b	Myhr et al., 1991	<b>ISH</b>
Larsen and Mellergaard. 1984	Larsen et al., 1994	Rehnstam et al., 1989
	Wiik et al., 1989β	Aoki et al., 1989
	Rasmussen, 1987a	Martinez-Picado et al., 1994
		Ito et al., 1995
		Hirono et al., 1996

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Γ. ΛΑΒΡΑΚΙ (*Dicentrarchus labrax*)

### Ταξινόμηση

Η ταξινομική σειρά του λαβρακιού έχει ως εξής:

Υπερβασίλειο : Eukaryota

Φύλο : Chordata

Κλάση : Actinopterygii

Σειρά : Perciformes

Οικογένεια : Moronidae

Γένος : *Dicentrarchus*

Είδος : *labrax*

Στη διεθνή βιβλιογραφία το λαβράκι αναφέρεται συνήθως με τις κοινές ονομασίες European seabass (En), Bar commun (Fr), Branzino (It), Lubina (Sp). Επίσημες ονομασίες, συνώνυμες του *D.labrax* είναι οι *Morone labrax* και *Labrax lupus* (Tortonese. 1986).

### Περιγραφή

Το λαβράκι είναι ψάρι μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους με μήκος, το ενήλικο, περί τα 50 εκ. (μπορεί να φτάσει και τα 100εκ.) και σώμα μάλλον επίμηκες. Το στόμα του αιχμηρό προεξέχει ελαφρά. Το ραχιαίο πτερύγιο είναι διπλό ενώ το ουραίο μέτρια διχαλωτό. Η πλάγια γραμμή είναι εκτεταμένη, αλλά δεν εκτείνεται μέχρι την ουρά. Είναι είδος ευρύαλο, ευρύθερμο και διατρέφεται με δίθυρα μαλάκια, ψάρια και γαρίδες (FAO, Tortonese. 1986).

### Ιχθυοκαλλιέργεια λαβρακιού στην Ελλάδα

Τα τελευταία τριάντα χρόνια ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών εμφάνισε σημαντική ανάπτυξη στην Ελλάδα με κατακόρυφη αύξηση, τόσο του αριθμού των μονάδων ιχθυοπαραγωγής, όσο και της συνολικής παραγωγής ιχθύων σε αυτές. Η τσιπούρα (79.000 τ.) και το λαβράκι (48.000 τ.) αποτελούν τα σημαντικότερα εκτρεφόμενα είδη στη χώρα, με την παραγωγή τους να υπερβαίνει το 97% της συνολικής εγχώριας θαλάσσιας ιχθυοπαραγωγής και το άθροισμά τους να προσεγγίζει το 48% της παραγωγής λαβρακιού και τσιπούρας στη Μεσόγειο (Barazi-Yeroulanos, L. 2010 (στοιχεία 2007)).

## **ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΝΟΤΗΤΑ**

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Δ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ ΤΩΝ ΙΧΘΥΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΩΝ**

Τα ψάρια διαθέτουν αρκετούς μη ειδικούς και ειδικούς χυμικούς και κυτταρικούς μηχανισμούς, προκειμένου να αντισταθούν στα βακτηριδιακά νοσήματα (Ellis. 1999, Scapigliati και συν. 2002). Την τελευταία εικοσαετία εντάθηκε η μελέτη αυτών των μηχανισμών, με βάση κυρίως τους αντίστοιχους των ανώτερων θηλαστικών, σε μία προσπάθεια εύρεσης αναλογικότητας και σε είδη ιχθύων με εμπορικό ενδιαφέρον (Cammarata και συν. 2000, Arnesen και συν. 2002 κ.α.). Στο πλαίσιο αυτό ανέκυψε επιτακτικά η ανάγκη να περιγραφούν τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών πληθυσμών των ιστών και οργάνων των ιχθύων, μέσω των οποίων εκδηλώνονται οι μηχανισμοί αυτοί (Romano και συν. 1997, Reite. 1997, 1998, Esteban και συν. 2000, Tierney και συν. 2004 κ.α.).

Η μη ειδική άμυνα συγκροτείται στα ψάρια από το φραγμό του δέρματος και του επιθηλίου των βραγχίων και του πεπτικού σωλήνα (επιθηλιακά κύτταρα και βλέννη), τα λευκοκύτταρα και τα μονοκύτταρα του αίματος και το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα) που διαπιστώνεται κυρίως στον νεφρό και λιγότερο στο σπλήνα αλλά και στην καρδιά και το ήπαρ (σε ορισμένα είδη ιχθύων) (Dalmo και συν. 1997).

Η ειδική άμυνα εκτελείται κυρίως από το λεμφικό ιστό του οποίου η ανατομική οργάνωση στους τελεόστεους περιλαμβάνει το θύμο, τον κεφαλικό νεφρό, το σπλήνα και το σχετιζόμενο με βλεννογόνους λεμφοειδή ιστό καθώς και κυτταρικά στοιχεία που εκδηλώνουν χυμικές και κυτταρικές ανοσολογικές αντιδράσεις (Scapigliati και συν. 2002).

### **ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΙ ΧΥΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ**

Στους μη ειδικούς χυμικούς μηχανισμούς άμυνας συγκαταλέγονται ουσίες – αναστολείς της βακτηριδιακής ανάπτυξης όπως η τρανσφερρίνη, αντιπροτεάσες και λεκτίνες, λυσίνες όπως η λυσοζύμη, αντιβακτηριδιακές πεπτίδες, πρωτεάσες και η C- αντιδρώσα πρωτεΐνη, και το σύστημα του συμπληρώματος.

## Αναστολείς της βακτηριδιακής ανάπτυξης

### Τρανσφερίνη

Ο σίδηρος είναι στοιχείο για την εγκατάσταση λοίμωξης από τα περισσότερα παθογόνα βακτηρίδια, όμως η διαθεσιμότητά του στα υγρά των ιστών είναι εξαιρετικά χαμηλή λόγω της δέσμευσής του με ισχυρούς δεσμούς στην τρανσφερίνη του πλάσματος. Μόνο βακτηρίδια, που διαθέτουν ισχυρά συστήματα πρόσληψης σιδήρου, είναι ικανά να προσλάβουν αποτελεσματικά σίδηρο για την ανάπτυξή τους *in vivo* (Bullen και Griffiths. 1987). Η τρανσφερίνη εμφανίζει μεγάλο βαθμού γενετικό πολυμορφισμό και η ικανότητα κάποιων βακτηριδίων να προσλάβουν σίδηρο από αυτή ενδεχόμενα περιορίζεται σε συγκεκριμένους γενότυπους της (Winter και συν. 1980, Yano. 1996).

### Αντιπροτεάσες

Το πλάσμα του αίματος των ψαριών περιέχει ένα αριθμό αναστολέων των πρωτεασών, κυριότερες των οποίων είναι η  $\alpha 1$ -αντιπροτεϊνάση και η  $\alpha 2$ -μακρογλοβουλίνη ( $\alpha 2M$ ). Πολλά βακτηρίδια παράγουν πρωτεολυτικές τοξίνες, οι οποίες πέπτουν τις πρωτεΐνες των ιστών του ψαριού προκειμένου να τις χρησιμοποιήσουν ως πηγή αμινοξέων. Οι βακτηριδιακές αυτές πρωτεάσες εμφανίζουν διαφόρου βαθμού ανθεκτικότητα στις αντιπροτεάσες των ψαριών (Ellis. 1987, Freedman. 1991).

### Λεκτίνες

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες ικανές να δεσμεύονται με συγκεκριμένα σάκχαρα (Arason. 1996). Έχουν διαπιστωθεί στα ωάρια, τη βλέννη και τον ορό πολλών ειδών ψαριών. Η λεκτίνη του αυγού του σολωμού Chinook αναστέλλει την ανάπτυξη των *V. anguillarum*, *Y. ruckeri*, *A. hydrophila* και *E. tarda* (Voss και συν. 1978). Η λεκτίνη του αυγού του σολωμού Coho συγκολλά την *A. salmonicida* (Yousif. 1994). Στο ψάρι 'ayu' η λεκτίνη της βλέννης του δέρματος εμφανίζει ισχυρή έλξη για τον LPS του *V. anguillarum* (Itami και συν. 1993). Μία λεκτίνη συνδεδεμένη με μαννάνη απομονώθηκε από τον ορό του Ιαπωνικού χελιού (Gercken και Renwranz. 1994) και του σολωμού του Ατλαντικού (Arason και συν. 1994). Οι αμυντικές λειτουργίες των λεκτινών του ορού των ψαριών, είναι κατά βάση άγνωστες, ωστόσο στα θηλαστικά εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος (Ohta και συν. 1990).

## Λυσίνες

### Λυσοζύμη

Η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που υδρολύει το N-ακετυλμουραμικό οξύ και τη N-ακετυλγλυκοζαμίνη που είναι συστατικά της στιβάδας πεπτιδογλυκάνης του βακτηριδιακού κυτταρικού τοιχώματος. Λυσοζύμη έχει ανεβρεθεί στη βλέννη, στον ορό και στους ιστούς των ψαριών που είναι πλούσιοι σε λευκοκύτταρα. Στο ψάρι γλώσσα, λυσοζύμη ταυτοποιήθηκε ιστοχημικά στα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα (Murray και Fletcher. 1976), τα οποία αποτελούν πιθανά, την πηγή της λυσοζύμης του ορού. Ο Grinde το 1989 μελέτησε την αντιβακτηριδιακή επίδραση δύο τύπων λυσοζύμης (Τύπος I και II), που απομόνωσε από κεφαλικό νεφρό πέστροφας, σε επτά είδη Gram-αρνητικών παθογόνων βακτηριδίων των ψαριών. Ο τύπος I, εκπληκτικά δραστικά, θανάτωσε όλα τα βακτηρίδια. Η λυσοζύμη των θηλαστικών μπορεί να δράσει άμεσα στα Gram-θετικά βακτηρίδια, αλλά απαιτείται η δράση του συμπληρώματος για να διαρρήξει αρχικά το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηριδίων, ώστε να επιτραπεί στη λυσοζύμη η πρόσβαση στην εσωτερική στιβάδα πεπτιδογλυκάνης. Όμως, ο τύπος I της λυσοζύμης της πέστροφας, φαίνεται να δρα στα Gram-αρνητικά παθογόνα βακτηρίδια των ψαριών άμεσα (Villamil και συν. 2003).

### Αντιβακτηριδιακές πεπτίδες

Πρόκειται για μικρού μοριακού βάρους πεπτίδες με ικανότητα να διαρρηγνύουν τις βακτηριδιακές μεμβράνες. Αντιβακτηριδιακές πεπτίδες όπως η παρδαξίνη, η πλευροσιδίνη, η παρασίνη I κ.α. απομονώθηκαν αρχικά από το δέρμα διαφόρων ειδών ψαριών ( Lazarovici και Loew. 1986, Lemaitre και συν. 1996, Oren και Shai. 1996, Cole και συν. 1997, Park και συν. 1998, Cole και συν. 2000). Η πλευροσιδίνη και νεότερες πεπτίδες όπως η μορονεσιδίνη, οι χρυσοψίνες κ.α. διαπιστώθηκαν στη συνέχεια στο έντερο και τα βράγχια ορισμένων ειδών ψαριών (Cole και συν. 2000, Ellis. 2001, Lauth και συν. 2002, Iijima και συν. 2003, Murray και συν. 2003). Η σημασία των αντιβακτηριδιακών πεπτιδών στην προστασία των ψαριών έναντι παθογόνων βακτηριδίων δεν έχει ακόμη επαρκώς μελετηθεί.

### Πρωτεάσες

Η βλέννη του δέρματος πολλών ειδών ψαριών εμφανίζει δραστηριότητα όμοια με τη θρυψίνη (Braun και συν. 1990). Η πρωτεάση της βλέννης της ιριδίζουσας πέστροφας είναι ικανή να λύσει νεκρά βακτηριδιακά κύτταρα *V. anguillarum* (Hjelmeland και συν. 1983), υποδεικνύοντας ότι μπορεί να παίζει ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς.



### **C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP)**

Η CRP είναι μία πρωτεΐνη που αντιδρά με τη φωσφορυλχολίνη, η οποία αποτελεί ευρέως διαδεδομένο συστατικό των επιφανειακών δομών βακτηριδίων, μυκήτων και παρασίτων. Έχει ανεβρεθεί σε πολλά είδη ζώων συμπεριλαμβανομένων των ασπόνδυλων (Yano. 1996). Ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και μέσω αυτού, τη λύση και τη φαγοκύτωση. Στα θηλαστικά ανιχνεύεται στο φυσιολογικό ορό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ τα επίπεδά της αυξάνονται ακαριαία σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Έτσι, η CRP θεωρείται πρωτεΐνη της οξείας φάσης. Ωστόσο, στο φυσιολογικό ορό πολλών ειδών ψαριών ανιχνεύεται σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις οι οποίες αυξάνονται πάνω από 20 φορές σε θερμική καταπληξία ή χορήγηση φλεγμονωδών παραγόντων (Winkelhake και Chang. 1982, Kodama και συν. 1989, Szalai και συν. 1994). Από την ευρεία κατανομή της και την υψηλή συγκέντρωσή της στον ορό, η CRP αναμένεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα, αν και λίγες ακόμη μελέτες το αποδεικνύουν. Στην ιριδίζουσα πέστροφα η CRP φάνηκε να ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και να επιτείνει τη φαγοκύτωση του *V. anguillarum* (Nakanishi και συν. 1991), ενώ το επίπεδό της αυξάνεται τρεις φορές μετά από χορήγηση του βακτηριδίου (Murai και συν. 1990).

### **Σύστημα του συμπληρώματος**

Το συμπλήρωμα είναι ένα σύστημα, αποτελούμενο από 35 πρωτεΐνες διαλυτές στον ορό ή δεσμευμένες σε μεμβράνες, κομβικό σε πολλούς αμυντικούς μηχανισμούς, αφού έχει λυτική, «προφλεγμονώδη», χημειοτακτική και οηονική δράση, δημιουργώντας έτσι ένα σύνδεσμο με τη μη ειδική φαγοκυτταρική αντίδραση. Οι τελεόστεοι διαθέτουν την κλασσική (CCP) και την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος (ACP) (Yano. 1996), καθώς και την οδό του συμπληρώματος της λεκτίνης (LCP) (Claire και συν. 2002). Η ενεργοποίηση της ACP, που είναι ανεξάρτητη από αντισώματα, είναι πολύ εντονότερη στον ορό των ψαριών σε σχέση με αυτή των θηλαστικών και άρα εμφανίζεται σημαντικότερη στα ψάρια από ότι στα θηλαστικά (Yano. 1996). Ο λιποπολυσακχαρίτης του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-αρνητικών βακτηριδίων ενεργοποιεί άμεσα την ACP και οδηγεί σε λύση του βακτηριδιακού κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του συμπληρώματος στο βακτηριδιακό κυτταρικό τοίχωμα δύο συστατικά είναι σημαντικά για την προσέλκυση των φαγοκυττάρων: το συστατικό C5a που είναι ισχυρά χημειοτακτικό για τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα και το C3b, το οποίο παραμένει προσκολλημένο στα βακτηρίδια, έτσι ώστε τα τελευταία, είναι πιο εύκολο να φαγοκυτταρωθούν (Ellis. 1999, 2001, Claire και συν. 2002).

## ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ

Οι μη ειδικοί κυτταρικοί μηχανισμοί άμυνας επιτελούνται κυρίως από τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα/μακροφάγα (Secombes. 1996, Ellis. 1999). Τα μακροφάγα ανευρίσκονται σε όλους τους ιστούς των τελεόστεων συμπεριλαμβανομένων των βραγχίων (Lin και συν. 1998) και της σωματικής κοιλότητας (Afonso και συν. 1998β). Κυρίως όμως εντοπίζονται ως δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα στο νεφρό, στο σπλήνα και σε ορισμένα είδη στον κόλπο της καρδιάς (Press και Evensen. 1999). Τα μονοκύτταρα εντοπίζονται στο νεφρό και σε μικρότερους αριθμούς στο αίμα. Τα μακροφάγα του λαβρακιού εμφανίζουν ισχυρή φαγοκυτταρική δράση έναντι βακτηριδίων (Esteban και Meseguer. 1997). Τα ουδετερόφιλα εντοπίζονται στο νεφρό, το σπλήνα και το αίμα.

Τα φαγοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιβακτηριδιακή άμυνα (Ellis. 1999, do Vale. 2002). Μπορούν να εγκυστώσουν και να θανατώσουν βακτηρίδια κυρίως με την παραγωγή reactive oxygen species (ROS) κατά τη διάρκεια της αποκαλούμενης «αναπνευστικής έκρηξης». Τα παράγωγα αυτά περιλαμβάνουν ανιόντα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  και ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ( $OH^-$ ) που έχουν ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση (Secombes. 1996). Επιπλέον τα ουδετερόφιλα περιέχουν μυελοϋπεροξειδάση (MPO) στα κυτταροπλασματικά κοκκία τους (Afonso και συν. 1997). Η MPO, παρουσία ιόντων αλογόνου και  $H_2O_2$ , μπορεί να θανατώσει βακτηρίδια με αλλογόνωση των βακτηριδιακών κυτταρικών τοιχωμάτων και με παραγωγή βακτηριοκτόνων ανιόντων αλογόνων (Klebanoff και Clark 1978).

Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα περιέχουν λυσοζύμη και άλλα υδρολυτικά ένζυμα στα λυσοσώματά τους. Τα μακροφάγα των ψαριών παράγουν και οξείδιο του αζώτου, το οποίο στα θηλαστικά μπορεί να σχηματίσει βακτηριοκτόνους παράγοντες όπως νιτρικά υπεροξείδια και ρίζες υδροξυλίου (Secombes. 1996, Acosta και συν. 2003). Το οξείδιο του αζώτου έχει και άμεση αντιμικροβιακή δράση (Villamil και συν. 2003).

Την ενδοπεριτοναϊκή μόλυνση της ιριδίζουσας πέστροφας με *Y. ruckeri* ακολουθεί άμεση φλεγμονώδης αντίδραση που ξεκινά με προσέλευση μεγάλου αριθμού ουδετεροφίλων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τα βακτηρίδια. Τα εγκατεστημένα μακροφάγα, τα οποία επίσης φαγοκυτταρώνουν βακτηρίδια, παρατηρήθηκε ότι φαγοκυτταρώνουν και ουδετερόφιλα που περιέχουν βακτηρίδια. Επιπλέον ουδετερόφιλα έρχονται σε στενή επαφή με μακροφάγα και φαίνεται να μεταφέρουν κοκκία που περιέχουν MPO σε αυτά (Afonso και συν. 1998), γεγονός που επιτείνει τη βακτηριοκτόνο δράση των μακροφάγων.

## **ΕΙΔΙΚΟΙ ΧΥΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ**

Οι ειδικοί μηχανισμοί άμυνας του ψαριού έχουν ως τελικούς παράγοντες έκφρασης και δράσης τα αντισώματα. Στα ψάρια έχει διαπιστωθεί ότι αντισώματα εμποδίζουν την προσκόλληση βακτηριδίων στους βλεννογόνους, την είσοδο βακτηριδίων σε κύτταρα των ξενιστών, λειτουργούν ως αντιτοξίνες και τέλος ενεργοποιούν την κλασική οδό του συμπληρώματος.

### **Αντισώματα κατά της προσκόλλησης**

Τα βακτηρίδια πρέπει αρχικά να προσκολληθούν στα επιφανειακά επιθήλια των ψαριών και διαθέτουν διάφορες δομές στο κυτταρικό τους τοίχωμα για να το επιτύχουν. Τα αντισώματα, που αντιδρούν με αυτές τις προσκολλητίνες, εμποδίζουν πιθανά τα βακτηρίδια να αποκτήσουν πρόσβαση στους ιστούς. Τα ψάρια παράγουν αντισώματα στους βλεννογόνους, όπως στο έντερο (Davidson και συν. 1993) και στα βράγχια (Davidson και συν. 1997, Joosten και συν. 1997) και αντισώματα έχουν ανιχνευθεί στη βλέννη των βραγχίων (Lumsden και συν. 1995) και στο δέρμα (Rombout και συν. 1993) Όμως τα ψάρια στερούνται εκκριτικών αντισωμάτων, όμοιων με τα IgA των θηλαστικών, που είναι ανθεκτικά στην πρωτεολυτική αποδόμηση στο έντερο. Αναφορές για Ig στην εντερική βλέννη είναι ελάχιστες και πολλές προσπάθειες για ανίχνευσή τους έχουν αποτύχει (Ellis. 1998). Ο ρόλος των αντισωμάτων στην προστασία από την προσκόλληση των βακτηριδίων στο έντερο απουσιάζει στα ψάρια, ενώ είναι μέρος της άμυνας στα βράγχια και το έντερο. (Lumsden και συν. 1995)

### **Αντισώματα κατά της εισβολής**

Ορισμένα παθογόνα βακτηρίδια, όπως το *Photobacterium damsela ssp piscisida* (Magarinos και συν. 1996), είναι ικανά να εισβάλλουν σε κύτταρα του ξενιστή, όπου μπορούν να αποφύγουν πολλούς αμυντικούς μηχανισμούς του ψαριού. Αντισώματα που αποτρέπουν αυτή την είσοδο λειτουργούν προστατευτικά, αφού ωθούν τα παθογόνα να εκτεθούν σε ποικίλους τρόπους εξουδετέρωσης.

### **Αντιτοξίνες**

Αρκετά παθογόνα βακτηρίδια παράγουν ισχυρές τοξίνες και τα αντισώματα που τις αδρανοποιούν παίζουν προστατευτικό ρόλο. Άτυπα στελέχη *Aeromonas salmonicida* παράγουν μία ισχυρή θανατηφόρο μεταλλοπρωτεϊνάση και αντισώματα που ανταποκρίνονται έναντι της

τοξίνης αυτής προσφέρουν καλή προστασία μετά από πειραματική μόλυνση (Gudmundsdottir και Magnadottir. 1997).

### **Ενεργοποίηση της κλασικής οδού του συμπληρώματος (CCP)**

Ένα αντίσωμα που δεσμεύεται στην επιφάνεια του βακτηριδίου ενεργοποιεί τη CCP. Με αυτό τον τρόπο μεγαλύτερη ποσότητα συμπληρώματος ενεργοποιείται σε σχέση με την ACP ή τα αντισώματα μπορούν να οδηγήσουν τη CCP σε θέσεις στο βακτηριδιακό τοίχωμα, όπου το συμπλήρωμα μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερη βλάβη. Αυτός ο μηχανισμός φαίνεται να είναι σημαντικός για την προστασία έναντι των στελεχών του ορότυπου O1 του *V. anguillarum* (Boesen και συν. 1999).

### **ΕΙΔΙΚΟΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΜΥΝΑΣ**

Οι ειδικοί μηχανισμοί άμυνας (ειδική κυτταρική και χυμική άμυνα, και ανοσολογική μνήμη) ενεργοποιούνται και επιτελούνται σε σημαντικό βαθμό από τα λεμφοκύτταρα. Στα ψάρια έχει πλέον διαπιστωθεί η παρουσία δύο διαφορετικών πληθυσμών λεμφοκυττάρων, λειτουργικά ανάλογων των T- και B- λεμφοκυττάρων των ανώτερων σπονδυλωτών (Miller και συν. 1987). Τα λεμφοκύτταρα εντοπίζονται στην αιματική και λεμφική κυκλοφορία και στα λεμφοειδή όργανα των ψαριών, το θύμο, το νεφρό και το σπλήνα, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι το δέρμα τα βράγχια και το έντερο αποτελούν επίσης ενεργά ανοσολογικά όργανα (Davidson και συν. 1997, Lin και συν. 1998).

Στους ειδικούς κυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας περιλαμβάνεται κυρίως η δράση των ενεργοποιημένων μακροφάγων. Η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορεί να προκληθεί μέσω διαφόρων οδών (Secombes. 1996), αλλά κυρίως μέσω του παράγοντα ενεργοποίησης των μακροφάγων (που πιστεύεται ότι είναι η ιντερφερόνη γάμμα), ο οποίος παράγεται από T- λεμφοκύτταρα, που διεγείρονται από αντιγόνα ή μιτογόνα (Ellis. 2001). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εμφανίζουν υψηλότερη παραγωγή ROS και αυξημένη βακτηριοκτόνο δράση.

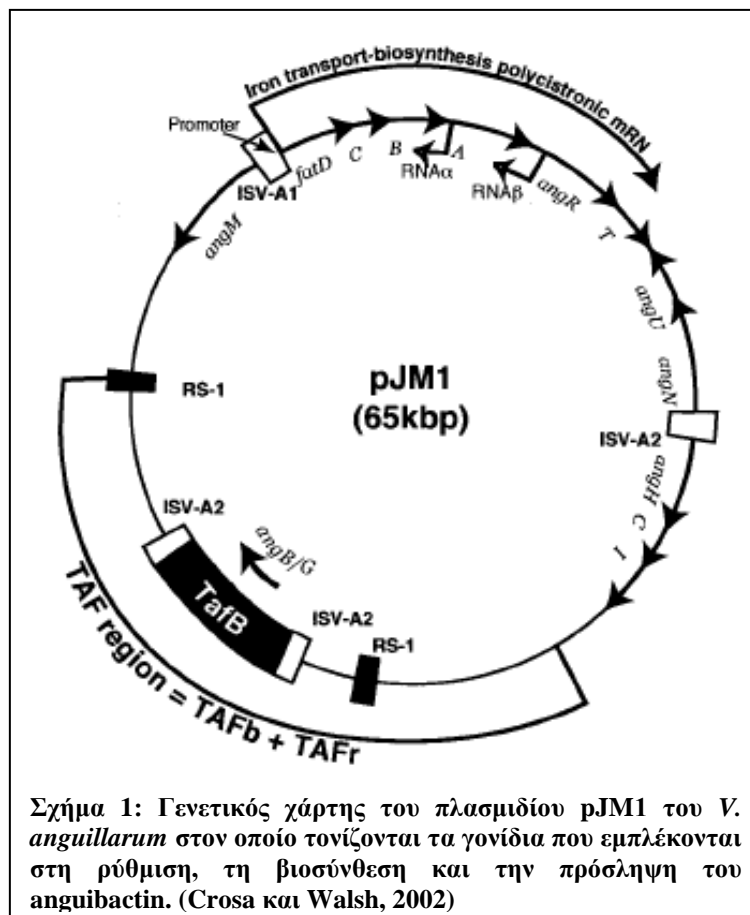
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ε. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΥ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ *V. anguillarum*

Διάφοροι παράγοντες λοιμογόνου ικανότητας έχουν προσδιοριστεί για το *V. anguillarum*.

### Σύστημα δέσμευσης σιδήρου

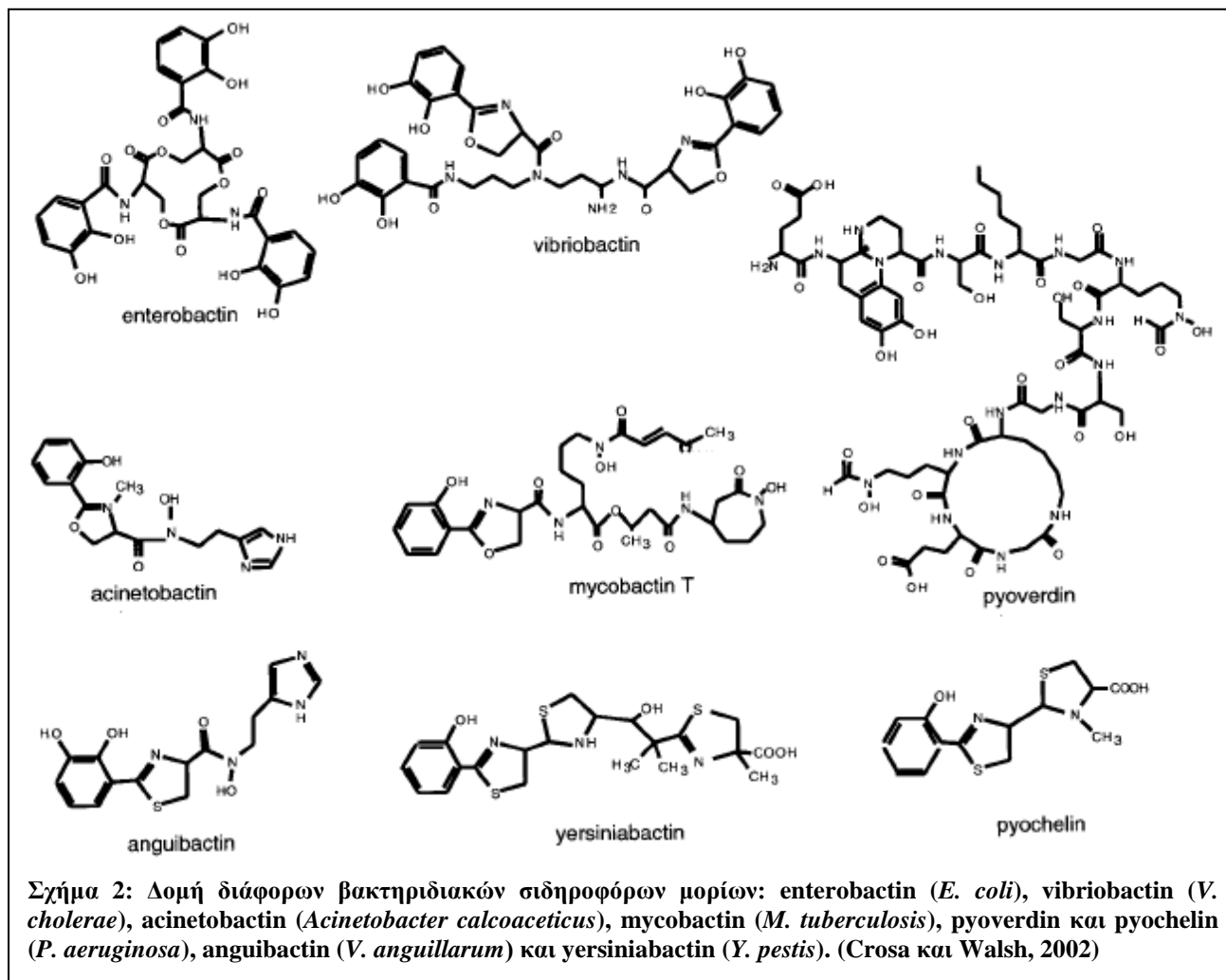
Ο σημαντικότερος από αυτούς είναι ένα πολύ αποτελεσματικό σύστημα δέσμευσης σιδήρου που αρχικά περιγράφηκε στο πρωτότυπο στέλεχος *V. anguillarum* 775 στο οποίο και κωδικοποιείται από ένα πλασμίδιο με 65 ζεύγη κιλοβάσεων (Kb) , το pJM1 (Crosa και συν. 1977, Crosa. 1984, 1987, Tolmasky και Crosa. 1990, 1991). Το σύστημα αποτελείται από ένα σιδηροφόρο μόριο, που καλείται *anguibactin* (Crosa και Walsh. 2002), και ένα σύμπλεγμα μεμβρανοϋποδοχέων. Τα σιδηροφόρα είναι μικρού μοριακού βάρους χηλικές (οργανομεταλλικές) ενώσεις που παράγονται από βακτηρίδια , μύκητες και ορισμένα φυτά και χρησιμεύουν στη μεταφορά σιδήρου μέσα στα βακτηριδιακά κύτταρα, αποτελώντας σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες (Neilands. 1993, Drechsel και Jung. 1998). Το *anguibactin* απεκκρίνεται από το βακτηριδιακό κύτταρο και ανταγωνίζεται τις υψηλής συγγένειας σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες, που υπάρχουν στους ιστούς του ψαριού για τη δέσμευση σιδήρου. Οι μεμβρανοϋποδοχείς του βακτηριδιακού κυττάρου αναγνωρίζουν ειδικά το σύμπλεγμα του τρισθενούς σιδήρου (Fe(III)) με το *anguibactin* και το μεταφέρουν στο κυταρόπλασμα του. Η βιοσύνθεση των συστατικών αυτού του συστήματος δέσμευσης σιδήρου επάγεται όταν το βακτηρίδιο αναπτύσσεται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Η αφαίρεση του pJM1, όπως και η απενεργοποίηση των γονιδίων στο τμήμα πρόσληψης του σιδήρου στο pJM1 (μέσω *TnI* παρεμβολής), σχετίζονται με σημαντική μείωση της ικανότητας του *V. anguillarum* να προσλαμβάνει σίδηρο από τα καλλιεργητικά μέσα και με εξασθένηση της λοιμογόνου του δύναμης (Crosa. 1980, Crosa και συν. 1980, 1983, 1985, Walter και συν. 1983). Ο ρόλος αυτού του συστήματος πρόσληψης σιδήρου επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την εισαγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, που περιείχαν τη γενετικά προσδιορισμένη περιοχή της πρόσληψης σιδήρου, που βρίσκεται στο pJM1, σε απαθογόνα στελέχη *V. anguillarum*. Στα ανασυνδυασμένα αυτά πλασμίδια ένα ή περισσότερα γονίδια, που κωδικοποιούν τις λειτουργίες του συστήματος πρόσληψης σιδήρου, είχαν τροποποιηθεί, είτε με παρεμβολή είτε με εξάλειψη. Τα διασυζευγμένα βακτηρίδια (*transconjugant*) ανέκτησαν την ικανότητα να προσλαμβάνουν σίδηρο αποτελεσματικά και έγιναν παθογόνα (Tolmasky και Crosa. 1984). Η έκφραση, *in vivo*, του συστήματος πρόσληψης σιδήρου, που κωδικοποιείται από το pJM1, προσδιορίστηκε με την πραγματοποίηση μικτών πειραματικών μολύνσεων, όπου χρησιμοποιήθηκαν το φυσικό στέλεχος 775 και ένα γενετικά τροποποιημένο με παρεμβολή στέλεχος, στο οποίο τροποποιήθηκε η

βιοσύνθεση του anguibactin, αλλά όχι και η δραστηριότητα των υποδοχέων για το σιδηροφόρο μόριο (Wolf και Crosa, 1986). Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος, με εξασθενημένη τη δυνατότητα σύνθεσης anguibactin, μπορούσε να απομονωθεί από νεκρά ψάρια μόνο αν συνχορηγούνταν με το φυσικό στέλεχος 775. Έτσι αποδείχθη ότι το anguibactin πράγματι παράγεται και εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος του φυσικού ξενιστή κατά τη διαδικασία της μόλυνσης. Μόλις βρεθεί στην κυκλοφορία το anguibactin δεσμεύει το σίδηρο από τον ξενιστή και τον αποδίδει στο κυτταρόπλασμα του βακτηριδίου. Τα πειράματα αυτά απέδειξαν ότι, αφενός το anguibactin παράγεται *in vivo*, και αφετέρου ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα παθογόνου δράσης του βακτηριδίου (Actis και συν. 1999α).



Το σιδηροφόρο μόριο anguibactin καθαρίστηκε από υπερδιήθημα καλλιεργειών *V. anguillarum* 775, που αναπτύχθηκε σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Actis και συν. 1986) και προσδιορίστηκε ως ω-*N*-υδροξυ-ω-*N*-((2'-(2'',3''-διυδροξυφενυλ) θιαζολιν-4'-υλ)καρβοξυ) ισταμίνη (Jatal και συν. 1989). Αν και τα περισσότερα σιδηροφόρα μόρια μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες ομάδες τις κατεχόλες και τις υδροξαμάτες (Neilands. 1993), το anguibactin ανήκει σε μία μοναδική δομική κατηγορία μόνο του, αφού διαθέτει ένα τμήμα

κατεχόλης ταυτόχρονα με ένα υπόλειμα υδροξαμάτης. Η στοιχειομετρία του anguibactin στην υποκατάσταση προσδιορίστηκε *in vitro*, με τη χρήση Ga(III), και αποδείχθηκε ότι είναι 1:1 (Jatal και συν. 1989).



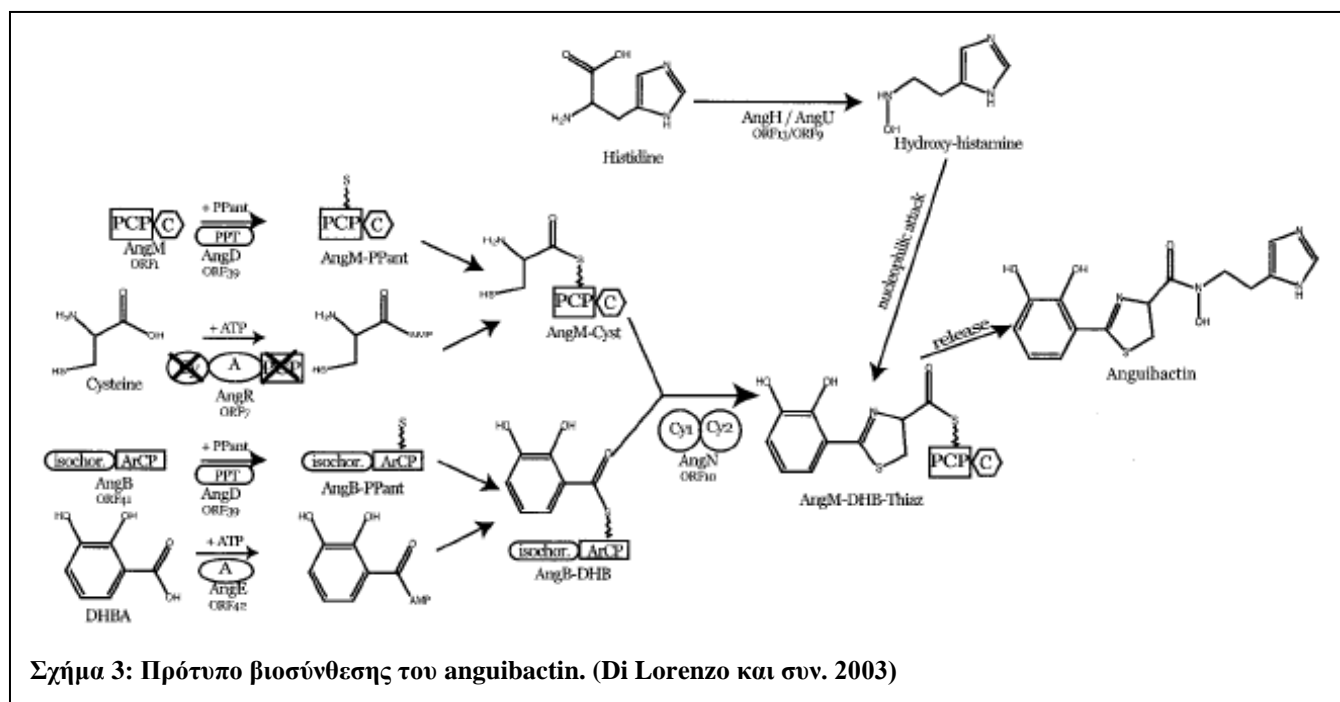
Στελέχη του γένους *Acinetobacter* εκκρίνουν acinetobactin, ένα στενής συγγένειας σιδηροφόρο μόριο σε σχέση με το anguibactin (Yamamoto και συν. 1994). Ανάλυση της δομής του έδειξε ότι πρόκειται για χηλική ένωση του σιδήρου, που περιλαμβάνει ένα αμινοξύ συνδεδεμένο με το διυδροξυβενζοϊκό οξύ και την υδροξυσταμίνη. Η μόνη διαφορά ανάμεσα στα δύο μόρια είναι ότι το anguibactin περιέχει κυστεΐνη, ενώ η λειτουργική ομάδα για το acinetobactin είναι η θρεονίνη. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν, ότι το acinetobactin ενισχύει την ανάπτυξη του *V. anguillarum* σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Τα παραπάνω δείχνουν ότι το σχετιζόμενο με το anguibactin σύστημα δέσμευσης σιδήρου, που διαθέτει το *V. anguillarum*, έχει ένα ομόλογο σύστημα σε ένα διαφορετικό βακτηριδιακό γένος. Αν και τα γονίδια που

κωδικοποιούν αυτά τα συστήματα στα δύο διαφορετικά είδη βακτηριδίων δεν παρουσιάζουν ομολογία, ενδέχεται οι αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων να απέκλιναν, μετά τη μεταφορά τους μεταξύ των δύο ειδών, με κάποιο μηχανισμό που μένει να προσδιοριστεί. Μετασηματισμός, σύζευξη και ενδομετάθεση συμβαίνουν και στο *Acinetobacter* (Vivian. 1991) και τα γονίδια πρόσληψης σιδήρου, που περιέχονται στο pJM1 περιβάλλονται από αλληλουχίες παρεμβολής σε μία σύνθετη δομή όμοια με τρανσποζόνιο (Tolmasky και Crosa. 1995). Το *Acinetobacter* είναι επίσης μέρος της βακτηριδιακής χλωρίδας των σαλμονιδών (Cahill. 1990). Έτσι, η βακτηριδιακή σύζευξη, ο μετασηματισμός ή /και η ενδομετάθεση μπορεί να έπαιξαν ρόλο στη μεταφορά αυτών των σημαντικών γονιδίων μεταξύ των δύο μη συγγενικών βακτηριδιακών στελεχών που είναι παρόντα στη μικροβιακή χλωρίδα του σολωμού και της πέστροφας.

Τα συστατικά της μεμβράνης του βακτηριδιακού κυττάρου που εμπλέκονται στην αναγνώριση και την είσοδο του συμπλέγματος Fe(III) – anguibactin στο κύτταρο περιλαμβάνουν τουλάχιστον τέσσερις πρωτεΐνες, τις FatA, FatB, FatC, και FatD, που φαίνεται να κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο πλασμίδιο pJM1 (Actis και συν. 1988, Koster και συν. 1991). Ανάλυση της αλληλουχίας των περιοχών του pJM1 που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες, έδειξε αναλογίες ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες μεταφοράς και τις αντίστοιχες που περιγράφηκαν στην *E. coli* για τη μεταφορά Fe(III) – citrate, Fe(III)- hydroxamates και Fe(III)- catecholates και της βιταμίνης B<sub>12</sub> (Koster και συν. 1991). Το καλύτερα χαρακτηρισμένο από τα τέσσερα συστατικά είναι η 86 kDa FatA πρωτεΐνη που ανιχνεύεται μόνο σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Crosa και Hodges. 1981). Η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη και εκτίθεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Actis και συν. 1985). Ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων της FatA έδειξε ότι διαθέτει ομόλογες περιοχές με επτά πρωτεΐνες – υποδοχείς της *E. coli* που εμπλέκονται στην πρόσληψη σιδηροφόρων μορίων και βιταμίνης B<sub>12</sub> (Koster και συν. 1991). Το εύρημα αυτό υποστηρίζει την υπόθεση της ύπαρξης κοινού προγονικού γονιδίου για αυτές τις πρωτεΐνες – υποδοχείς. Ανάλυση της αλληλουχίας της FatA έδειξε επίσης την παρουσία ενός TonB box σε αυτή. Η Ton-B πρωτεΐνη είναι πιθανά υπεύθυνη για τη χορήγηση ενέργειας στην εξωτερική μεμβράνη. (Heller και συν. 1988, Pressler και συν. 1988). Το μοριακό μοντέλο και η λειτουργική δραστηριότητα της FatA έχει προσφάτως διευκρινιστεί (Lopez και συν. 2007, Lopez και Crosa. 2007). Η FatB πρωτεΐνη είναι αυτή που θεωρείται ότι δεσμεύει το anguibactin. Είναι μία λιποπρωτεΐνη που εδράζεται στην εσωτερική μεμβράνη επενδύοντας τον περικυτταροπλασματικό χώρο (Actis και συν. 1995), ενώ οι FatD και FatC είναι εσωτερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης (Koster και συν. 1991). Με βάση την ομολογία τους με άλλα συστήματα μεταφοράς σιδήρου, οι δύο τελευταίες



φαίνεται να εμπλέκονται στη μεταφορά των συμπλεγμάτων Fe(III) – anguibactin διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Koster και συν. 1991).



Για να μελετηθεί η γενετική και η μοριακή βιολογία του συστήματος πρόσληψης σιδήρου που κωδικοποιείται από το pJM1, η περιοχή του DNA που κωδικοποιεί όλα τα στοιχεία του συστήματος κλωνοποιήθηκε στο κοσμίδιο pVK102, το οποίο έχει ευρύ φάσμα ξενιστών και απαντάται σε μικρό αριθμό αντιγράφων (Knauff και Nester. 1982). Έτσι, οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι που δημιουργήθηκαν σε στελέχη *E. coli* μπορούσαν να μεταφερθούν σε παθογόνα στελέχη του *V. anguillarum* με βακτηριδιακή σύζευξη (Tolmasky και Crosa. 1984). Ένας από τους κλώνους αυτούς, ο pJHC-T2612, μπορούσε να προάγει τη βιοσύνθεση όλων των συστατικών του συμπλέγματος υποδοχής, όπως και του anguibactin, με τη μεταφορά του στο χωρίς πλασμίδιο παθογόνο στέλεχος H775-3 του *V. anguillarum*. Όμως το σιδηροφόρο μόριο στο ανασυνδυασμένο H775-3 παραγόταν σε χαμηλότερες ποσότητες σε σχέση με αυτές του φυσικού στελέχους 775. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το pJM1 διαθέτει επίσης γενετικά καθορισμένα τμήματα, για ένα παράγοντα απαραίτητο για την πλήρη έκφραση των γονιδίων, που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του anguibactin. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτό τον παράγοντα κλωνοποιήθηκαν με χρήση, είτε του pJHC-T00181 (Tolmasky και συν. 1986), είτε του pBR325 (Bolivar. 1978) ως φορέων. Μερικοί από τους κλώνους, που δημιουργήθηκαν, μεταφέρθηκαν σε *V. anguillarum*, που διέθετε ήδη το pJHC-T2612 και το τροποποιημένο στέλεχος ελέγχθηκε για

την ικανότητά του να παράγει φυσιολογικά επίπεδα *anguibactin*. Η ποσότητα *anguibactin*, που παρήγαγε, ήταν υψηλότερη σε σχέση με το *V. anguillarum*, που διαθέτει μόνο το pJHC-T2612, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη ενός ρυθμιστή που κωδικοποιείται από το pJM1 και μπορεί να δράσει *in trans* (trans acting factor, TAF) (Tolmasky και συν. 1988α). Αργότερα αποδείχθηκε ότι αυτός ο ρυθμιστής δρα συνεργικά με έτερο ρυθμιστή, την *AngR*, που κωδικοποιείται εντός της περιοχής δέσμευσης του σιδήρου για να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων, που εμπλέκονται στο σύστημα πρόσληψης σιδήρου (Salinas και συν. 1989).

Η γενετική ανάλυση της περιοχής πρόσληψης σιδήρου πραγματοποιήθηκε με μετάλλαξη παρεμβολής, με τη χρήση του Tn3-HoHo1. Η ένθεση αυτού του τρανσποζόνιου προκαλεί πλέον της μετάλλαξης και σύντηξη των οπερονίων της β-γαλακτοσιδάσης (Stachel και συν. 1985). Μία συλλογή μεταλλαγμένων στελεχών, που δημιουργήθηκε με αυτή τη διαδικασία, αναλύθηκε στη συνέχεια για την παραγωγή των συστατικών του συστήματος δέσμευσης σιδήρου, επιτρέποντας τον καθορισμό έξι γενετικών μονάδων και την ταυτοποίηση της κατεύθυνσης της μεταγραφής (Actis και συν. 1988, Tolmasky και συν. 1988α, 1988β). Οι γενετικές ομάδες I, IV και VI συμμετέχουν μόνο στην παραγωγή του *anguibactin*. Η γενετική ομάδα V φαίνεται ότι είναι μια αλληλουχία ένθεσης και μάλλον δε συμμετέχει στη βιοσύνθεση του *anguibactin* ή των συστατικών του συμπλέγματος υποδοχής (Tolmasky και Crosa. 1995). Ένα γονίδιο (*angH*) που κωδικοποιεί το ένζυμο δεκαρβοξυλάση της ιστιδίνης, σημαντικό για τη σύνθεση του *anguibactin*, εντοπίζεται στη γενετική μονάδα VI (Tolmasky και συν. 1995). Έτερο γονίδιο σημαντικό για τη σύνθεση του 2,3-διυδροξυβενζοϊκού οξέος, προδρόμου του *anguibactin*, βρέθηκε στο χρωμόσωμα του *V. anguillarum* (Chen και συν. 1994). Η γενετική ομάδα II φέρει τα γονίδια μεταφοράς *fatA*, *fatB*, *fatC* και *fatD* και η γενετική ομάδα III φέρει το γονίδιο *angR*. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *AngR* που έχει διπλή λειτουργία: αφενός είναι ρυθμιστής της έκφρασης άλλων γονιδίων (Salinas και συν. 1989, Farrell και συν. 1990) και αφετέρου εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του *anguibactin* (Tolmasky και συν. 1993). Μοριακές και γενετικές αναλύσεις έδειξαν ότι η ρύθμιση της έκφρασης αυτού του συστήματος πρόσληψης σιδήρου είναι πολύπλοκη και συμπεριλαμβάνει την έκφραση ενός σιδηρο-ρυθμιζόμενου αντινοσηματικού RNA (Waldbeser και Crosa. 1991, Salinas και συν. 1993) και μίας πρωτεΐνης όμοιας με τον αναστολέα *Fur* που περιγράφηκε αρχικά στην *E. coli* (Waldbeser και συν. 1993, Tolmasky και συν. 1994, Wertheimer και συν. 1994). Οι Di Lorenzo και συν. δημοσίευσαν τελικά, το 2003, την πλήρη αλληλουχία του πλασμιδίου pJM1 που διαθέτει το στέλεχος *V. anguillarum* 775 για να ακολουθήσουν άμεσα οι Wu και συν. (2004) με την αντίστοιχη ακολουθία του pE1B1, πλασμιδίου όμοιου με το pJM1, που βρίσκεται στο στέλεχος *V. anguillarum* MVM425.

Πολλά στελέχη *V. anguillarum*, που απομονώθηκαν από διάφορες γεωγραφικές περιοχές, περιέχουν πλασμίδια που παρουσιάζουν υψηλού βαθμού ομολογία με το pJM1 (Mitoma και συν. 1984, Tolmasky και συν. 1988b). Μερικά από αυτά τα πλασμίδια, κυρίως στελεχών που απομονώθηκαν από τον Ατλαντικό, προσδιορίζουν αυξημένη παραγωγή anguibactin, σε σχέση με τα επίπεδα anguibactin, που ανευρίσκονται σε στελέχη του Ειρηνικού, που περιέχουν το πλασμίδιο pJM1. Το γονίδιο *angR* ενός από αυτά, τα ομόλογα με το pJM1 πλασμίδια, προσδιορίστηκε ως το υπεύθυνο στοιχείο για την ενισχυμένη βιοσύνθεση του anguibactin στο στέλεχος 531A (Tolmasky και συν. 1988b, Salinas και συν. 1989). Επίσης παρατηρήθηκαν πολυμορφισμοί στα ομόλογα με το pJM1 πλασμίδια σε πολλά στελέχη *V. anguillarum* που ανήκουν στον ορότυπο O1 (Wiik και συν. 1989a, 1989b, Olsen και Larsen, 1990).

Έχουν απομονωθεί αρκετά παθογόνα στελέχη *V. anguillarum* που δε διαθέτουν πλασμίδιο. Τα στελέχη αυτά φαίνεται να κατέχουν ένα σύστημα πρόσληψης σιδήρου που κωδικοποιείται χρωμοσωμικά (Lemos και συν. 1988, Conchas και συν. 1991). Το σύστημα αυτό δε σχετίζεται με το σύστημα, που κωδικοποιείται από το pJM1 ή και ομόλογά του πλασμίδια. Τα βιοχημικά χαρακτηριστικά του σιδηροφόρου μορίου, που κωδικοποιείται χρωμοσωμικά, αποδεικνύουν ότι ανήκει στις κατεχόλες και πιθανά συγγενεύει λειτουργικά με το enterobactin (Actis και συν. 1999a). Η παρουσία του συστήματος αυτού διαπιστώθηκε και στους τρεις παθογόνους ορότυπους του *V. anguillarum* αλλά και σε περιβαλλοντικά στελέχη (Muino και συν. 2001). Το σιδηροφόρο μόριο ονομάστηκε vanchrobactin (Soengas και συν. 2006). Οι Balado και συν. (2008) προσδιόρισαν τα βιοσυνθετικά και ρυθμιστικά στοιχεία που εμπλέκονται στην παραγωγή του vanchrobactin από στελέχη του *V. anguillarum*.

Τα στελέχη του *V. anguillarum* μπορούν να προσλάβουν σίδηρο από διάφορες πηγές, όπως η αίμη, η αιμοσφαιρίνη και το σύμπλεγμα απογλοβίνης – αιμοσφαιρίνης ανεξάρτητα από το είδος του σιδηροφόρου μορίου που παράγουν (Mazouy και Lemos. 1991). Έχει αποδειχθεί, ότι υπάρχουν ειδικοί υποδοχείς για την ομάδα της αίμης στην κυτταρική μεμβράνη του *V. anguillarum* (Mazouy και Lemos. 1996). Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές εξαρτώνται από την παρουσία σιδήρου στο βακτηριδιακό κύτταρο, ενώ άλλες εκφράζονται ανεξάρτητα. Η πρώτη για την οποία αποδείχτηκε ότι επηρεάζει τη λοιμογόνο ικανότητα του *V. anguillarum*, είναι η HuvA, πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριδίου, μεγέθους 79kDa, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *huvA* (Mazouy και συν. 2003). Το γονίδιο *huvA* είναι συνδεδεμένο με οκτώ επιπλέον γονίδια στο χρωμόσωμα του *V. anguillarum*. Το σύνολο των γονιδίων αυτών κωδικοποιεί αντίστοιχες πρωτεΐνες της μεμβράνης που συναποτελούν το σύστημα πρόσληψης και χρησιμοποίησης της αίμης (Mourino και συν. 2004, 2006). Ο μηχανισμός αποτελείται από ένα υποδοχέα της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριδίου που μεταφέρει τα μόρια της αίμης

στον περιπλασμικό χώρο μέσω μίας Ton-B εξαρτώμενης διαδικασίας και πρόσθετες πρωτεΐνες που ολοκληρώνουν τη μεταφορά στο κυτταρόπλασμα (Lemos και Osorio. 2007). Αυτό το ανεξάρτητο από σιδηροφόρα μόρια σύστημα πρόσληψης σιδήρου φαίνεται να ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του βακτηριδίου σε ιστούς με διαθέσιμη μη δεσμευμένη αίμη. Ο μηχανισμός διευκολύνεται από την παραγωγή αιμολυσινών ή κυτταροτοξινών που μπορούν να λύσουν κύτταρα του ξενιστή και να ελευθερώσουν ενδοκυτταρική αίμη (Garcia και συν. 1997). Η δέσμευση αίμης και αιμογλοβίνης από το *V. anguillarum* περιγράφηκε αρχικά στους O1 και O2 ορότυπους (Mazoy και Lemos. 1996) για να αποδειχθεί στη συνέχεια ανεξάρτητη από τον ορότυπο (Mourino και συν. 2005).

### Πρωτεάση

Οι Norqvist και συν. (1990) και οι Farrell και Crosa (1991) περιέγραψαν την παραγωγή μίας πρωτεάσης, η οποία αποτελεί δυνητικό παράγοντα λοιμογόνου δύναμης του *V. anguillarum*. Στο στέλεχος *V. anguillarum* NB10 περιγράφηκε μία ελαστολυτική μεταλλοπρωτεάση (36kDa) που απαιτεί  $Zn^{+2}$  για την ενεργοποίησή της και  $Ca^{+2}$  για την σταθεροποίησή της και η οποία βρέθηκε να σχετίζεται με τη δυνατότητα εισόδου του στελέχους στον ξενιστή. Μελέτες λοιμογόνου ικανότητας, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν στελέχη με τροποποιημένη πρωτεολυτική δραστηριότητα, έδειξαν, ότι αυτά παρουσιάζουν αύξηση της μέσης θανατηφόρου δόσης ( $LD_{50}$ ) κατά 1000 φορές, όταν η μόλυνση πραγματοποιείται με εμβάπτιση και κατά 10 φορές, όταν χορηγούνται με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (Norqvist και συν. 1990). Επιπρόσθετα οι Farrell και Crosa (1991) απομόνωσαν μία μεταλλοπρωτεάση από το στέλεχος *V. anguillarum* 514, η οποία φαίνεται να είναι, είτε συγγενής, είτε ταυτόσημη με αυτή του στελέχους NB10. Το μοριακό βάρος της υπολογίστηκε στα 38kDa. Η δραστηριότητά της είναι ευαίσθητη στο αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) αλλά μπορεί να ανακτηθεί με την ταυτόχρονη προσθήκη  $Ca^{+2}$  και  $Zn^{+2}$ . Βιοχημικές αναλύσεις αλλά και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης δείχνουν ότι η πρωτεάση του *V. anguillarum* έχει υψηλό βαθμό συγγένειας, τόσο με πρωτεάσες που έχουν περιγραφεί σε άλλα είδη *Vibrio*, όπως στα *V. cholerae* και *V. vulnificus*, όσο και με την ελαστάση της *Pseudomonas aeruginosa* και την πρωτεάση της *Legionella pneumophila* (Norqvist και συν.1990, Farrell και Crosa. 1991). Το γονίδιο *empA*, υπεύθυνο για την παραγωγή της μεταλλοπρωτεάσης, κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε από τους Milton και συν. (1992). Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε η παρουσία δύο επιπλέον πρωτεασών, μεγέθους 70- και 30-kDa, σε απουσία της μεταλλοπρωτεάσης, γεγονός που δεν αποκλείει την πιθανότητα ύπαρξης ενός περισσότερο σύνθετου συστήματος πρωτεασών

που εμπλέκονται στην πρόκληση βλάβης στους ιστούς από το *V. anguillarum*. Η παραγωγή της *empA* μεταλλοπρωτεάσης επάγεται από τη βλέννη του γαστρεντερικού σωλήνα των ιχθύων, έτσι η πρωτεολυτική της δράση μπορεί να υποβοηθάει στον αποικισμό του εντέρου από το βακτηρίδιο (Denkin και Nelson. 1999). Πρόσφατα διαπιστώθηκε και επιβεβαιώθηκε η παρουσία του γονιδίου *vanT*, ανάλογου του *luxR* γονιδίου του *V. harveyi*, στο *V. anguillarum*. Το *vanT* ρυθμίζει θετικά την παραγωγή σερίνης, μεταλλοπρωτεάσης, χρωστικής και biofilm αποτελώντας τμήμα του συστήματος ενδοεπικοινωνίας του βακτηριδιακού πληθυσμού (Croxatto και συν. 2002, Denkin και συν. 2004).

### **Αντοχή στη μικροβιοκτόνο δράση των ορών των ιχθύων**

Έχει αποδειχθεί ότι οι οροί των ιχθύων μπορούν να θανατώσουν στελέχη *V. anguillarum*. Δοκιμές θερμικής ανοχής και κατεργασίας με EDTA ή EGTA, απέδειξαν ότι ο μηχανισμός θανάτωσης των βακτηριδίων από τον ορό της ιριδιζουσας πέστροφας είναι η εναλλακτική οδός του συμπληρώματος (Trust και συν. 1981). Η ανθεκτικότητα σε αυτή τη μικροβιοκτόνο δράση του φυσιολογικού, μη άνοσου, ορού φαίνεται να συμβάλλει στη λοιμογόνο δύναμη των παθογόνων στελεχών του *V. anguillarum* (Trust και συν. 1981, Toranzo και συν. 1983α, Toranzo και συν. 1983β). Παθογόνα στελέχη, που απομονώθηκαν από striped bass (*Morone saxatilis*) ήταν ανθεκτικά στη λυτική δράση μη θερμασμένου ορού ψαριού, ενώ άλλα μη παθογόνα ήταν ευαίσθητα, γεγονός που αποδεικνύει ότι αυτός ο παράγοντας παίζει πιθανά σημαντικό ρόλο στη λοιμογόνο δύναμη του βακτηριδίου (Toranzo και συν. 1983α). Στελέχη από τα οποία αφαιρέθηκε το πλασμίδιο pJM1 παρέμειναν ανθεκτικά στη βακτηριοκτόνο δράση του ορού γεγονός που αποδεικνύει, ότι το χαρακτηριστικό αυτό κωδικοποιείται μάλλον χρωμοσωμικά και όχι από το πλασμίδιο pJM1 (Trust και συν. 1981).

### **Αιμοσυγκολλητίνες**

Η αιμοσυγκολλητική δράση είναι ένας επιπλέον παράγοντας, που φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη μολυσματική ικανότητα των παθογόνων στελεχών. Παθογόνα στελέχη *V. anguillarum*, που απομονώθηκαν από την ανατολική ακτή των Η.Π.Α., παράγουν ισχυρές αιμοσυγκολλητίνες για τα ερυθροκύτταρα των ψαριών, ενώ τέτοια δραστηριότητα δε διαπιστώθηκε στα απαθογόνα στελέχη (Toranzo και συν. 1983β). Έχουν περιγραφεί δύο τύποι συγκόλλησης ανάλογα με το είδος των ερυθροκυττάρων που συγκολλούνται. Η αιμοσυγκολλητική δράση αναστέλεται από τη D-μαννόζη γεγονός που αποδεικνύει ότι ο υδρογονάνθρακας αυτός ή κάποιος ομόλογός του αποτελεί τμήμα του υποδοχέα του ερυθροκυττάρου, που σχετίζεται με την αιμοσυγκόλληση. Αν και διαπιστώθηκε

αιμοσυγκολλητική δράση και σε στέλεχη *V. anguillarum* που απομονώθηκαν από το βορειοδυτικό Ειρηνικό δεν επιβεβαιώθηκε καμία σχέση ανάμεσα στην ιδιότητα αυτή και στη λοιμογόνο ικανότητα των στελεχών (Trust και συν. 1981).

### **Παραγωγή εξωτοξίνης**

Οι Kodama και συν. (1985) περιέγραψαν την έκκριση εξωκυτταρικής τοξίνης από το *V. anguillarum*. Η τοξίνη αυτή καθαρίστηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και ο μοριακός χαρακτηρισμός του ενεργού της κλάσματος έδειξε, ότι η τοξική της δράση σχετίζεται με δύο πρωτεΐνες μεγέθους 44-kDa και μία πρωτεΐνη μεγέθους 34-kDa. Αυτές οι πρωτεΐνες ήταν θανατηφόρες για την ιριδίζουσα πέστροφα και τον μυ μετά από ενδοπεριτοναϊκή και ενδοφλέβια έγχυση αντίστοιχα. Η τοξική τους δράση επέδρασε στον εντερικό σωλήνα και στο αγγειακό σύστημα των παραπάνω πειραματόζωων, ενώ μπορούσε να αδρανοποιηθεί με ειδικό αντιγόνο που αναπτύχθηκε σε κόνικλο. Χημική ανάλυση των συστατικών της τοξίνης έδειξε ότι κάποια από αυτά σχετίζονται με υδρογονάνθρακες. Η τοξική δράση ήταν ευαίσθητη στη θερμότητα και το potassium periodate και ανθεκτική στη θρυψίνη και την ακετόνη. Επιπλέον, η τοξίνη δε σχετίστηκε με αιμολυτική ή πρωτεολυτική δραστηριότητα. Αυτή η εξωκυτταρική τοξίνη είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας λοιμογόνου ικανότητας των δονακίων αφού η αιμορραγική, κυτταροτοξική και θανατηφόρος δράση της μπορεί να οδηγήσει στις παθολογικές μεταβολές που παρατηρούνται στα μολυσμένα ψάρια.

### **Λιποπολυσακχαρίτης**

Στέλεχος *V. anguillarum* έγινε περισσότερο λοιμογόνο μετά από δίοδό του σε γλώσσα (*Plecoglossus altivelis*) (Aoki και συν. 1985). Η αύξηση της λοιμογόνου του δύναμης συσχετίστηκε με την αύξηση της παραγόμενης ποσότητας του λιποπολυσακχαρίτη του και με μία μεταβολή στο μέγεθός του. Το λοιμογόνο στέλεχος είχε ένα υψηλού μοριακού βάρους συστατικό, το οποίο απουσίαζε στο χαμηλής λοιμογόνου δύναμης στέλεχος.

### **Μαστίγια**

Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της λοιμογόνου δύναμης του *V. anguillarum* και της παρουσίας περισσότερων του ενός μαστιγίων (Chart. 1983, Norqvist και Wolf-Watz. 1993). Οι Milton και συν. (1996) κλωνοποίησαν και χαρακτήρισαν ένα γονίδιο του

μαστιγίου του *V. anguillarum*, το *flaA*. Μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο οδήγησαν σε μερικώς κινητά βακτηρίδια. Μελέτες λοιμογόνου ικανότητας με εμφάνιση κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι το προϊόν του γονιδίου *flaA* είναι απαραίτητο για την διείσδυση του βακτηριδίου, μέσω του δέρματος του ψαριού και παίζει, πιθανά, ρόλο στη λοιμογόνο ικανότητά του (Milton και συν. 1996). Σε συνέχεια της έρευνας αυτής, οι McGee και συν. (1996) χαρακτήρισαν τέσσερα επιπλέον γονίδια, τα *flaB*, *flaC*, *flaD* και *flaE* που κωδικοποιούν αντίστοιχες πρωτεΐνες του μαστιγίου. Οι πρωτεΐνες FlaD και FlaE, όμοια με την FlaA, επηρεάζουν, πιθανά, τη λοιμογόνο ικανότητα του βακτηριδίου.

Η παρουσία του πολικού μαστιγίου του *V. anguillarum* και της χημειοτακτικής κίνησης που αυτό καθορίζει, αυξάνουν τη λοιμογόνο ικανότητα του βακτηριδίου σε πειραματική μόλυνση με εμφάνιση, ενώ δε φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη του νοσήματος σε μόλυνση με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (O'Toole και συν. 1996). Το συμπέρασμα αυτό εδραιώθηκε με τον έλεγχο της λοιμογόνου δύναμης γενετικά τροποποιημένων στελεχών του βακτηριδίου. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν γονίδια όπως το *cheR*, που ρυθμίζει τη χημειοτακτική ικανότητα του βακτηριδίου (O'Toole και συν. 1996), τα *rpoN* και *motY*, τα οποία ρυθμίζουν αντίστοιχα την παρουσία (O'Toole και συν. 1997) και την κινητικότητα του μαστιγίου (Ormonde και συν. 2000), και οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το μαστίγιο και η χημειοταξία παίζουν σημαντικό ρόλο μόνο στο στάδιο της προσκόλλησης και της εισόδου του βακτηριδίου στο ψάρι και όχι στην εξέλιξη της νόσου.

### **Μείζον αντιγόνο επιφανείας**

Μεταλλαξιγένεση ενδομετάθεσης απέδειξε την παρουσία δύο γονιδίων, των *virA* και *virB*, που κωδικοποιούν ένα μείζον αντιγόνο επιφανείας, σημαντικό για τη λοιμογόνο δύναμη του *V. anguillarum* (Norqvist και Wolf-Watz. 1993). Το επιφανειακό αυτό αντιγόνο είναι λιποπολυσακχαρίτης, που εντοπίζεται στην εξωτερική στιβάδα του μαστιγίου και εκφράζεται *in vivo* μαζί με το μαστίγιο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του ψαριού.

Μεταγενέστερα ταυτοποιήθηκε και το γονίδιο *virC* επίσης ουσιώδες για την λοιμογόνο δύναμη του *V. anguillarum* (Milton και συν. 1995). Αν και μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο οδήγησαν σε στελέχη που έχασαν τη λοιμογόνο τους ικανότητα, η λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου *virC* παραμένει άγνωστη.

### Αιμολυτική τοξίνη

Η αναιμία, που παρατηρήθηκε στα ψάρια ως επακόλουθο της Δονακίωσης, οδήγησε στην υπόθεση, ότι κάποια αιμολυτική τοξίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του νοσήματος (Roberts. 1976, Wolke. 1975). Τα περισσότερα στελέχη του *V. anguillarum* προκαλούν αιμόλυση, όταν αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ. Ο Munn (1978) απομόνωσε την αιμολυσίνη αυτή του βακτηριδίου και περιέγραψε τις κυριότερες ιδιότητές της. Χέλια που ενέθηκαν με υψηλότερη δόση της τοξίνης κατέληξαν εντός 20 λεπτών με βίαιες σπασμωδικές συσπάσεις του σώματος. Ο θάνατος ήταν ξαφνικός και χαρακτηριζόταν από τέλεια χάλαση των μυών του σώματος. Σε μικρότερες δόσεις ο θάνατος επήλθε σε 2-4 ώρες. Τα συμπτώματα που παρατηρήθηκαν οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι το παρασκεύασμα τοξίνης που χρησιμοποιήθηκε είχε πιθανά νευροτοξική δράση (Munn. 1980).

Η αιμόλυση, που προκαλεί η τοξίνη, είναι διαδικασία δύο σταδίων που συνίσταται σε μία πρώτη «προ-λυτική» φάση, που ακολουθείται από τη φάση στην οποία πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων και η απελευθέρωση της αιμογλοβίνης. Τόσο η διάρκεια της πρώτης φάσης, όσο και ο ρυθμός απελευθέρωσης της αιμογλοβίνης εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της τοξίνης και τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 10° C δεν διαπιστώθηκε αιμόλυση σε διάστημα 4 ωρών. Η βέλτιστη θερμοκρασία για αιμόλυση (~ 37° C) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της ανάπτυξης του βακτηριδίου (~20-22° C). Ο χρόνος αιμόλυσης είναι ταχύτατος (~5-10 min) ενώ η τοξίνη δεν μπορεί να επαναδράσει, είτε διότι αδρανοποιείται, είτε διότι δεσμεύεται μη αντιστρεπτά κατά τη διάρκεια της «προ-λυτικής» φάσης (Munn. 1980).

Συγγενή είδη του *V. anguillarum*, όπως το *V. cholerae* και το *V. parahaemolyticus* παράγουν τοξίνες, οι οποίες φαίνεται να δεσμεύονται σε γλυκολιπίδια των μεμβρανών, γνωστά ως γαγγλιοσίδες (Holmgren. 1978, Takeda και συν. 1976). Η αιμολυσίνη του *V. anguillarum* αδρανοποιείται από γαγγλιοσίδες, όπως οι προαναφερθείσες τοξίνες. Η συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της αιμολυσίνης και της συγκέντρωσης των γαγγλιοσιδών, που απαιτούνται για την αδρανοποίησή της, είναι γραμμική. Επώαση ερυθροκυττάρων με γαγγλιοσίδες οδήγησε σε σημαντική μείωση της δεκτικότητάς τους σε λύση. Πιθανή εξήγηση είναι η συνάφεια των γαγγλιοσιδών με τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και ο ανταγωνισμός τους με την τοξίνη για τις θέσεις πρόσφυσής τους σε αυτή.

Ο ρόλος της αιμολυσίνης στην παθογένεια της Δονακίωσης δεν έχει διευκρινιστεί. Η παραγωγή αιμολυσίνης δεν κωδικοποιείται από γονίδια που εδράζουν σε πλασμίδιο. Η αιμολυτική τοξίνη του *V. anguillarum* είναι πιθανά ένας από τους πολλούς παράγοντες που καθορίζουν την παθογένεια του νοσήματος (Munn. 1980).



## ΤΡΙΤΗ ΕΝΟΤΗΤΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΣΤ. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ

Αν και τα συμπτώματα της Δονακίωσης στα ψάρια έχουν περιγραφεί ικανοποιητικά, οι μηχανισμοί της παθογένειας του *V. anguillarum* και τα γεγονότα που οδηγούν στη είσοδο, επέκταση της μόλυνσης και το θάνατο του ψαριού – ξενιστή, φαίνεται να είναι εν πολλοίς άγνωστα. (Chart και Munn. 1980).

Η παθογένεια των λοιμώξεων από πολλά γένη των οικογενειών *Enterobacteriaceae* και *Vibrionaceae*, ειδικά της *Escherichia* και του *Vibrio* έχει εκτεταμένα μελετηθεί στα θηλαστικά και, λαμβάνοντας υπόψη τη στενή συγγένεια και τα κοινά γονίδια που μοιράζονται οι δύο ομάδες, αξίζει να αναλογιστούμε σε τι έκταση αυτές οι πληροφορίες είναι προσαρμόσιμες στη Δονακίωση του ψαριού (Horne. 1982).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην παθογένεια των εντεροβακτηριοειδών παρουσιάζει η ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης σιδήρου στους ζωικούς ιστούς (Bullen και συν. 1978). Η ικανότητα του ξενιστή να μην παρέχει σίδηρο στα βακτηρίδια ή των βακτηριδίων να προσλαμβάνουν αυτό το απαραίτητο συστατικό, είναι σημαντική στην ανάπτυξη των βακτηριδίων *in vivo* και στην εκδήλωση ειδικών παραγόντων παθογόνου δράσης (Weinberg. 1978).

Το μεγαλύτερο τμήμα του σιδήρου στους ζωντανούς ιστούς δεν είναι διαθέσιμο στα βακτηρίδια, καθώς είναι δεσμευμένο στη φερριτίνη, την αιμοσιδηρίνη, τη μυογλοβίνη και την αιμογλοβίνη (Lanzkowsky. 1976). Η υπόλοιπη ποσότητα ελεύθερου σιδήρου είναι ελάχιστη για την ανάπτυξη των βακτηριδίων και οι σιδηροδεσμευτικές πρωτεΐνες τρανσφερρίνη και λακτοφερρίνη, συγκρατούν ακόμη και αυτό το ποσό σε ισορροπία, ενώ οι ίδιες παραμένουν ακόρεστες. Τα βακτηρίδια, που είναι ικανά να αναπτύσσονται παθογενετικά σε τέτοια περιβάλλοντα, έχουν μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να ανταγωνίζονται με επιτυχία για τον ελεύθερο σίδηρο (Weinberg. 1978). Ως γνωστόν, υπάρχει ένα υψηλής αποτελεσματικότητας, χρωμοσωμικά καθορισμένο σύστημα πρόσληψης σιδήρου (Horne. 1982, Bullen και Wallis. 1977). Για παράδειγμα ένα μεγάλο ποσοστό παθογόνων στελεχών *E. coli* φέρει το πλασμίδιο colicin V (Col V), εμφανίζοντας σημαντικά αυξημένη λοιμογόνο δύναμη σε σχέση με τα στελέχη τα ελεύθερα πλασμιδίων (Smith. 1974, Smith και Huggins. 1976). Το εν λόγω πλασμίδιο, όπως αποδείχθηκε, κωδικοποιεί γονίδια υπεύθυνα για τη λειτουργία ενός συστήματος διαχωρισμού του σιδήρου (Williams. 1979), στο οποίο ένα μικρού μοριακού βάρους εξωκυττάριο σύστημα

προσρόφησης (chelating) σιδήρου ανταγωνίζεται με επιτυχία την τρανσφερρίνη *in vivo* (Saunders. 1981). Ένα παρόμοιο πλασμιδιακά καθορισμένο σύστημα, που έχει τη δυνατότητα να καθορίζει τη λοιμογόνο δύναμη του βακτηριδίου έχει περιγραφεί σε πολλά στελέχη του ορότυπου 1 του *V. anguillarum* (Crosa. 1980, Crosa και Hodges. 1981) που απομονώθηκαν από επιζωοτίες και η αφαίρεση του εξασθενεί σημαντικά τη λοιμογόνο τους δύναμη σε πειραματικές μολύνσεις (Crosa και συν. 1977, 1980, Crosa και Hodges. 1981). Σε αυτή την περίπτωση νέες εξωμεμβρανικές πρωτεΐνες παράγονται σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου (Munro. 1982).

Η ανάπτυξη ενός πολύ λοιμογόνου στελέχους και του, μετά την αφαίρεση του πλασμιδίου, παραγώγου του μελετήθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε ίχνη ποσότητας σιδήρου επαρκή για φυσιολογική ανάπτυξη. Αμφότερα τα στελέχη αναπτύχθηκαν καλά στο υπόστρωμα, όταν όμως προστέθηκαν 2,3μM τρανσφερρίνης μόνο το στέλεχος με πλασμίδιο αναπτύχθηκε. Αυτή η διαφορά εκμηδενίστηκε με την προσθήκη 0,2μM χλωριούχου σιδήρου. Επίσης, όταν χρησιμοποιήθηκαν βακτηρίδια χωρίς πλασμίδιο (απαθογόνα) και προστέθηκε σίδηρος στο εναιώρημα της μεταχείρισης (86μg κιτρικού αμμωνιούχου σιδήρου), 300 φορές μειωμένος ζωντανός πληθυσμός αρκούσε για φτάσει την ίδια τιμή LD<sub>50</sub> που παρατηρούνταν απουσία σιδήρου. Το ίδιο πείραμα όταν έγινε με τη χρήση στελέχους με πλασμίδιο (παθογόνου) οδήγησε σε αύξηση μόνο 1,3 φορές (Horne. 1982).

Ένας δεύτερος παράγοντας αποφασιστικός στην εγκατάσταση της λοίμωξης είναι η ικανότητα του βακτηριδίου να συνδέεται σε ένα υπόστρωμα, στο οποίο να μπορεί να πολλαπλασιαστεί (Smith. 1977). Οι μηχανισμοί προσκόλλησης του γένους *Vibrio*, ειδικά του *V. cholerae*, έχουν γίνει αντικείμενο έρευνας (Freter και Jones. 1976, Jones και συν. 1976, Nelson και συν. 1976) και έχει περιγραφεί, επίσης, ο ρόλος τους στην παθογένεια του *V. anguillarum* και η χρησιμότητά τους ως εργαλείο για τη μελέτη της Δονακίωσης στα ψάρια. (Horne. 1982). Ένας σημαντικός παθογενετικός μηχανισμός του *V. cholerae* είναι η παραγωγή μιας ισχυρής εξωτοξίνης, που έχει δύο υποομάδες. Η πρώτη είναι μία συγκολλητική υποομάδα αποτελούμενη από ένα σύμπλεγμα πέντε μικρότερων υποομάδων που συνδέονται ισχυρά στις θέσεις των υποδοχέων της G<sub>m</sub> γαγγλιοσίδης στο τοίχωμα των κυττάρων του βλεννογόνου και η δεύτερη είναι υπεύθυνη για την τοξική δράση της εξωτοξίνης (Heyningen και συν. 1971, King και Heyningen. 1973). Η κυτταροτοξική δράση της τοξίνης αυτής έχει επαρκώς κατανοηθεί (Holmgren. 1981), αν και ο ακριβής ρόλος της στην έναρξη της μόλυνσης δεν είναι ξεκάθαρος (Horne. 1982).

Παρουσία παρόμοιας εξωτοξίνης δεν έχει αποδειχθεί στα αλλόφιλα δονάκια αν και περιέχουν μία μεμβρανική ενδοτοξίνη. Το *V. anguillarum*, για παράδειγμα έχει μία ενδοτοξίνη θανατηφόρα για τα ποντίκια (Abe. 1972), σε ενδομυϊκή ωστόσο ένεση σε σολωμό chinook

(*Oncorhynchus tshawytscha*) προκαλεί μόνο επιφανειακή αιμορραγία και κανένα κλινικό σημείο αν χορηγηθεί ενδοπεριτοναϊκά. Άλλοι συγγραφείς σημειώνουν τη σχετικά υψηλή αντίσταση των ψαριών σε εκχύλισμα ενδοτοξίνης του *V. anguillarum* (Wedemeyer και συν. 1969, Harbell και συν. 1979) αν και μπορεί να υπάρχει ποικιλία στην αντίσταση μεταξύ διαφόρων ειδών ψαριών, αφού για παράδειγμα το χρυσόψαρο (*Carassius spp.*) φαίνεται να είναι ευαίσθητο (Umbreit και Ordal. 1972, Umbreit και Tripp. 1975).

Στα πλαίσια της έρευνας για εξωτοξίνες πολλοί ερευνητές απέδειξαν επίσης, ότι τα αλλόφιλα δονάκια παράγουν εξωκυτταρικά προϊόντα που είναι αιμολυτικά (Yanagase και συν. 1970 για το *V. parahaemolyticus*, Munn. 1980, Moustafa και συν. 1984 για το *V. anguillarum*). Κάποια στελέχη του *V. parahaemolyticus* (Miyamoto και συν. 1969, Miwatani και συν. 1974) και του *V. anguillarum* (Horne και συν. 1977) εμφανίζουν τη μορφή της αιμόλυσης, που περιγράφεται ως το «φαινόμενο Kanagawa», όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα Wagatsuma's (Wagatsuma. 1968) και κάποιοι συγγραφείς το χρησιμοποίησαν αυτό για να διαχωρίσουν τα παθογόνα από τα μη παθογόνα στελέχη (Kato και συν. 1965, Sakazaki και συν. 1968, Horne. 1982).

Ο ρόλος ωστόσο των αιμολυσινών στην παθογένεια των βακτηριδιακών νόσων συχνά αμφισβητείται. Βακτηριδιακά είδη, που έχουν παθογόνα στελέχη, συχνά εμφανίζουν αιμολυτική δραστηριότητα, που είναι ένα από τα κριτήρια διάκρισης μεταξύ παθογόνων και απαθογόνων στελεχών (Cook και Ewins. 1975, Minishew και συν. 1978). Όμως πολλά μη παθογόνα βακτηρίδια, ως τμήμα του φυσιολογικού σαπροφυτικού μεταβολισμού τους, παράγουν εξωκυττάρια ένζυμα που είναι ικανά να προκαλέσουν λύση των ερυθροκυττάρων. Η διάκριση αυτών από τις αιμολυσίνες, που αποτελούν πιο ειδικό τμήμα της παθογόνου ικανότητας των βακτηριδίων, είναι δύσκολη (Smith και Taylor. 1964). Οι Welch και συν. το 1981 απέδειξαν στην *E. coli*, ότι η ικανότητα για αιμόλυση, παρουσία αιμολυσίνης, παίζει πρωταρχικό ρόλο στην εγκατάσταση μόλυνσης. Η σημασία που έχουν οι συγκολλητίνες, οι αιμολυσίνες ή πιθανά και οι μη χαρακτηρισμένες τοξίνες στην παθογένεια του *V. anguillarum* δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί, όμως τα αποτελέσματα του Welch και άλλων ερευνητών οδηγούν στο συμπέρασμα, ότι οι αιμολυσίνες μπορεί να είναι κάτι παραπάνω από απλώς ένα τμήμα του βακτηριδιακού σαπροφυτικού μεταβολισμού του (Horne. 1982).

Η παθογένεια της Δονακίωσης από *V. anguillarum* δεν είναι καλά μελετημένη αλλά από κλινικά και ιστοπαθολογικά ευρήματα συμπεραίνεται ότι οφείλεται σε επίδραση τοξίνης, με αποτέλεσμα την ακινητοποίηση και καταστροφή των λευκοκυττάρων και των ερυθροκυττάρων, την υπερβολική βακτηριδιαίμια (Munro. 1982) και την ακόλουθη αιμορραγική σηψαιμία.

Η ενδοτοξίνη ή λιποπολυσακχαρίτης (LPS) των Gram-αρνητικών βακτηριδίων είναι τοξική για τα περισσότερα ομοιόθερμα ζώα προκαλώντας ποικιλία παθολογικών καταστάσεων, όπως καταπληξία, αιμορραγία, πυρετό και θάνατο, όμως, παρά τη σημαντική έρευνα, οι σχετικοί μηχανισμοί παραμένουν αδιευκρίνιστοι. Στα ψάρια δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα ότι ο LPS είναι τοξικός (Bercz και συν. 1966, Wedemeyer και συν. 1969, Paterson και Fryer. 1974). Όμως οι Reynolds και συν. το 1978 απέδειξαν πυρετική αντίδραση σε χρυσόψαρα που ενέθηκαν με LPS από *A. salmonicida* και *Escherichia coli*. Ως γνωστόν, σε υψηλές συγκεντρώσεις ο LPS είναι μιτογόνος για τα B κύτταρα, τα μακροφάγα και τα κοκκιοκύτταρα των ομοιόθερμων ζώων και συνεπώς προκαλεί πολυκλωνική διέγερση των B κυττάρων (Moller. 1972). Σε χαμηλές, ωστόσο, συγκεντρώσεις, προκαλεί αντίδραση των αντιγονικών ειδικών T-κύτταρων, ανεξάρτητη από τα μακροφάγα του «σωστού» B-κυτταρικού πληθυσμού. Έτσι, στην ιριδίζουσα πέστροφα οι Etlinger και συν. (1976) έδειξαν ότι ο LPS είναι μιτογόνος για ορισμένα λεμφοκύτταρα, ενώ αρκετές αναφορές δείχνουν ότι είναι αντιγονικός σε χαμηλότερες από τις μιτογόνες συγκεντρώσεις, στα ψάρια (Munro. 1982).

Τα παθογόνα βακτηρίδια έχουν αναπτύξει πολλούς τρόπους υπονόμησης των αμυντικών μηχανισμών του ψαριού. Σε αυτούς περιλαμβάνεται η παραγωγή *in vivo* συστημάτων πρόσληψης σιδήρου (π.χ. σιδηροφόρων μορίων και των επιφανειακών τους υποδοχέων στα *A. salmonicida*, *V. anguillarum*). Ορισμένα βακτηρίδια, όπως στελέχη του ορότυπου O1 του *V. anguillarum*, ενώ εμφανίζονται ανθεκτικά στην ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος σε φυσιολογικό ορό, θανατώνονται σε άνοσο ορό. Σε άλλα βακτηρίδια επιφανειακές στιβάδες, κάψες και επιμηκισμένα λιποπολυσακχαριδικά (LPS) O-αντιγόνα προστατεύουν από το θάνατο που σχετίζεται με το κλασσικό συμπλήρωμα (π.χ. *A. salmonicida*, *Photobacterium piscicida*, *V. anguillarum* ορότυπος O2 αντίστοιχα). Ενώ κάποια σημαντικά παθογόνα (*P. piscicida*) θανατώνονται άμεσα από τα μακροφάγα, άλλα (*A. salmonicida*) είναι τα ίδια τοξικά για τα μακροφάγα, ενώ το *Renibacterium salmoninarum* πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτά λειτουργώντας ως ενδοκυτταρικό παθογόνο. Και τα δύο τελευταία βακτηρίδια θανατώνονται όμως από ενεργοποιημένα μακροφάγα, γεγονός που αποδεικνύει ότι για την ανοσία του ψαριού απαιτείται συνδυασμένη δράση, τόσο των ειδικών όσο και των μη ειδικών χυμικών και κυτταρικών μηχανισμών ανοσολογικής αντίδρασης, που διαθέτει (Ellis. 1999).

Λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς ανοσίας έναντι του *V. anguillarum*, εκτός από το γεγονός ότι τα αντισώματα αποδείχθηκε ότι συμβάλλουν στην προστασία έναντι του βακτηριδίου μέσω της παθητικής ανοσοποίησης (Harrell. 1975, Viele και συν. 1980) και ότι ο άνοσος ορός είναι βακτηριοκτόνος για το βακτηρίδιο (Harrell. 1976b). Λοιμογόνα στελέχη *Vibrio* είναι ανθεκτικά στο φυσιολογικό ορό (Trust και συν. 1981, Toranzo και συν. 1983a). Ενώ

η θανάτωση O1 στελεχών από άνοσο ορό επιβεβαιώθηκε τα O2 στελέχη είναι ανθεκτικά (Boesen και συν. 1999). Και οι δύο ορότυποι καταναλώνουν συμπλήρωμα στον ορό της πέστροφας απουσία ειδικών αντισωμάτων και η θανάτωση των O1 στελεχών, η σχετιζόμενη με αντισώματα, συνοδεύεται από αυξημένη κατανάλωση του συμπληρώματος μέσω ενεργοποίησης της CCP. Όμως τα ανθεκτικά στον άνοσο ορό O2 στελέχη δεν καταναλώνουν αυξημένο συμπλήρωμα παρουσία αντισωμάτων (Boesen και συν. 1999). Όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με γλυκόζη πολλά από τα O2 στελέχη, που ελέγχθηκαν, αποδείχθηκαν ευαίσθητα στη θανάτωση από άνοσο ορό και αυτό σχετίζεται με την παραγωγή κοντύτερων πλευρικών αλυσίδων O-αντιγόνων (Boesen και συν. 1999). Έτσι ο μηχανισμός ανοσίας έναντι των O1 στελεχών μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της ενεργοποίησης του CCP από τα αντισώματα, που οδηγεί στη θανάτωση των βακτηριδίων. Στην περίπτωση των O2 στελεχών τα αντισώματα δεν αυξάνουν την κατανάλωση του συμπληρώματος. Αφού αυτά τα στελέχη δε θανατώνονται από το CCP, η προστασία μπορεί να εξαρτάται από την οψονοποίηση των βακτηριδίων από τα αντισώματα και το συμπλήρωμα, που διευκολύνει την καταστροφή τους από τα φαγοκύτταρα δρώντας μέσω των Fc και C3 υποδοχέων (Ellis. 1999).

Η αναιμία, που χαρακτηρίζεται από χαμηλές τιμές αιματοκρίτη, είναι τυπικό εύρημα σε πολλά βακτηριδιακά νοσήματα των ψαριών. Εάν ωστόσο οφείλεται σε ειδικές αιμολυσίνες, μη ειδικές αιμολυσίνες (κυτοκίνες) ή άλλους παράγοντες, όπως η αιμορραγία ή η αιμόλυση δεν είναι πάντα ξεκάθαρο. Στη Δονακίωση, που οφείλεται στο *V. anguillarum*, η παρουσία σημαντικών εναποθέσεων σιδήρου στο σπλήνα και το νεφρό είναι πιθανή απόδειξη (Richards. 1980) αιμολυτικής δραστηριότητας (Munro. 1982). Ο Munn το 1978 καθάρισε μερικώς, εξωκυττάρια προϊόντα αποικιών του *V. anguillarum*, που ήταν ταυτοχρόνως αιμολυτικά για τα ερυθροκύτταρα των χελιών και τοξικά για τα ίδια τα χέλια. Σε συσχέτιση με το *V. cholerae* και το *V. parahaemolyticus*, η αιμολυσίνη του *V. anguillarum* αδρανοποιείται από την παρουσία συγκεκριμένων γαγγλιοσιδών (Munn. 1980).

Το *V. anguillarum* δεν αναπτύσσεται σε όξινο περιβάλλον, ως εκ τούτου η παθογένεια της νόσου εκφράζεται πιο έντονα στο οπίσθιο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και στο απευθυσμένο σε σχέση με το πρόσθιο έντερο, λόγω της βαθμιαίας μετάπτωσης του pH από όξινο σε αλκαλικό. Μόλις ένα βακτηρίδιο διαπεράσει το επιθήλιο των βραγχίων ή του εντέρου και περάσει τη λευκοκυτταρική άμυνα αυτών των οργάνων ή εισδύσει διαμέσου του δέρματος του ψαριού, μπορεί να υποθεθεί ότι έχει πλέον διεισδύσει στο αίμα, ή στη λέμφο του ψαριού ή και στα δύο. Οι φλεγμονώδεις δε αντιδράσεις, εάν δεν είναι αποτελεσματικές, μπορεί να συμβάλλουν στην εξάπλωση της μόλυνσης με την ταχύτερη διείσδυση του βακτηριδίου στα παραπάνω υγρά (Munro. 1982).

Ο θάνατος τέλος, σε ενζωοτίες Δονακίωσης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα τοξικής βλάβης των παρεγχυματικών οργάνων (Umbreit και Tripp. 1975) ή αναιμίας (Tanaka. 1974). Είναι επίσης εξαιρετικά πιθανό, σύμφωνα με μια άλλη εκδοχή, ο θάνατος να οφείλεται σε ωσμωτική διαταραχή λόγω της εκτεταμένης εξέλκωσης και απώλειας μεγάλης επιφάνειας δέρματος (Richards. 1980).

Ο Horne το 1982 επισημαίνει ότι η έρευνα για τη Δονακίωση είχε εστιασθεί στην ακριβή διάγνωση και στην περιγραφή του νοσήματος ακολουθούμενη από μελέτες που στόχευαν στην αντιβιοτική θεραπεία και τα εμβόλια. Ως αποτέλεσμα, η γνώση μας για αυτόν τον καλά μελετημένο οργανισμό δεν περιλαμβάνει σχεδόν καμία πληροφορία για την παθογένειά του. Πράγματι μεγάλο τμήμα της έρευνας προσανατολίστηκε, υπό την πίεση της ραγδαίας ανάπτυξης των ιχθυοκαλλιεργειών, στην πρόληψη του νοσήματος με την παρασκευή εμβολίων (Dec και συν. 1990, Bogwald και συν. 1994, Whittington και συν. 1994, Joosten και συν. 1995, Joosten και συν. 1996 κ.α.). Ο Horne συνεχίζει υποστηρίζοντας ότι οι περιεκτικές περιγραφές της παθολογίας του νοσήματος πρέπει να εμπλουτιστούν με καλύτερη γνώση των μηχανισμών της δράσης του ίδιου του βακτηριδίου – πώς παρακάμπτει του προστατευτικούς μηχανισμούς του ξενιστή, και πώς επηρεάζει ο επακόλουθος πολλαπλασιασμός του τη φυσιολογία του ψαριού για να οδηγήσει τελικά στο θάνατό του. Την τελευταία δεκαετία άρχισαν να πραγματοποιούνται μελέτες προκειμένου να διευκρινιστούν αυτά τα πεδία (Williams και συν. 2000, Deane και συν. 2001, κ.α.). Καταλήγει δε ότι τα αποτελέσματα από τη μελέτη συστημάτων μοντέλων, όπως αυτό της ιριδίζουσας πέστροφας και του *V. anguillarum*, δε θα προσφέρουν μόνο μία βάση για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του νοσήματος, αλλά θα παρέχουν, με κατάλληλες πειραματικές διαδικασίες, πληροφορίες για τη σχέση ξενιστή – ασθένειας που θα έχουν πολύ ευρύτερη εφαρμογή από το πεδίο της ασθένειας του ψαριού.

Ο Munro την ίδια χρονιά διατυπώνει την πεποίθηση ότι μόνο με την μελέτη της μοριακής βάσης της λοιμογόνου δύναμης του *V. anguillarum* και των φαινοτυπικών και γενοτυπικών συστημάτων ελέγχου που ρυθμίζουν την εκδήλωση των παραγόντων λοιμογόνου δύναμης μπορούμε να αρχίσουμε να κατανοούμε το σύμπλεγμα αλληλεπίδρασης μεταξύ ξενιστή και παθογόνου βακτηριδίου (Munro. 1982).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ζ. ΠΥΛΕΣ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΟΥ *V. anguillarum*

Αν και έχει πραγματοποιηθεί εκτεταμένη έρευνα στους παράγοντες παθογόνου δράσης του *V. anguillarum* ο τρόπος εισόδου του βακτηριδίου στον οργανισμό του ψαριού παραμένει αδιευκρίνιστος (Toranzo και Barja. 1993). Περιλαμβάνει ωστόσο αναμφίβολα, τον αποικισμό ή την προσκόλλησή του στον ξενιστή και εν συνεχεία τη διείσδυσή του στους ιστούς (Actis και συν. 1999α).

Η πύλη εισόδου του *V. anguillarum* στον οργανισμό του ψαριού έχει διερευνηθεί για αρκετά χρόνια. Έχουν αναφερθεί αρκετές διαφορετικές οδοί εισόδου, όπως διαμέσου του δέρματος (Svendsen και Bogwald. 1997), μέσω των βραγχίων (Baudin-Laurencin και Germon. 1987), ή μέσω της γαστρεντερικής οδού (Olsson και συν. 1996, Grisez και συν. 1996). Οι Chart και Munn (1980), Baudin-Laurencin και Germon (1987), και Kanno και συν. (1989, 1990) συμπεραίνουν ότι το βακτηρίδιο εισβάλλει στον οργανισμό του ψαριού διαμέσου του δέρματος, των βραγχίων και του πρωκτού.

### Δέρμα

Με τη χρησιμοποίηση της εμβάπτισης ως μεθόδου μόλυνσης, παρουσία του βακτηριδίου διαπιστώθηκε στο δέρμα του ψαριού 'ayu' 12 ώρες μετά τη μόλυνση, για να ακολουθήσουν οι μύες, ο σπλήνας και το ήπαρ στις 24 ώρες, ενώ η άμεση επαφή μεταξύ των ψαριών οδήγησε στο υψηλότερο επίπεδο μετάδοσης (Muroga και De La Cruz. 1987, Kanno και συν. 1989). Οι Kanno και συν. (1989) παρατήρησαν ότι ο βαθμός της μόλυνσης αυξάνεται σε τραυματισμένο δέρμα, συμπεραίνοντας παράλληλα ότι ο φυσικός και χυμικός φραγμός της βλέννης και της επιδερμίδας παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία από το *V. anguillarum*.

### Πεπτικό Σύστημα

Οι Campbell και Bushwell (1983) και Muroga και συν. (1987) προτείνουν ότι η μόλυνση εγκαθίσταται κυρίως μέσω της τροφικής αλυσίδας. Ο Ransom (1978) προτείνει ότι η μόλυνση πιθανώς ξεκινά με τον αποικισμό του οπισθίου τμήματος του γαστρεντερικού σωλήνα και του απευθυσμένου. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την παρατήρηση ότι το *V. anguillarum* διαπιστώθηκε αρχικά σε αυτές τις θέσεις. Πιθανή πύλη εισόδου λοιπόν αποτελεί και ο πεπτικός σωλήνας, αλλά είναι ίσως λιγότερο σημαντική από το δέρμα σύμφωνα με τους Funahashi και συν. (1974), Kawai και συν. (1981), Evelyn (1984) και Kanno και συν. (1989). Έτσι, σε

πειραματικές μελέτες με χέλια, που μολύνθηκαν μέσω του απευθυσμένου, κανένα από αυτά δε νόσησε, ούτε πέθανε, πριν από την πάροδο 15–16 ημερών (Chart και Munn. 1980). Καταδεικνύεται όμως το γεγονός, ότι το βακτηρίδιο (ενδεχόμενα ένα στέλεχος του) παραμένει βιώσιμο στο απευθυσμένο και περιστασιακά, επί ικανού μεγέθους πληθυσμού, εισβάλλει στους ιστούς (Chart και Munn. 1980). Όπως έχει αποδειχθεί σε διάφορα είδη ψαριών, πολλοί από τους ιστούς που παράγουν βλέννη (δέρμα, βράγχια, έντερο), προσελκύουν το *V. anguillarum* (Chen και Hanna. 1992, Bordas και συν. 1996, Bordas και συν. 1998, Knudsen και συν. 1999, Larsen και συν. 2001), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιεί την εντερική βλέννη και ως μοναδική πηγή άνθρακα, όπως αναφέρουν οι Olsson και συν. (1992) σε μελέτη με καλκάνια. Μάλιστα η χημειοτακτική κίνηση που εκδηλώνει το βακτηρίδιο είναι σημαντικότερη στην εντερική βλέννη σε σχέση με αυτή του δέρματος (O'Toole και συν. 1999). Η υπόθεση ότι η γαστρεντερική οδός αποτελεί πύλη εισόδου ενισχύεται επίσης με την ανάκτηση του *V. anguillarum* από το σπλήνα, μετά από ενδοστομαχική και μέσω του πρωκτού, μόλυνση (Olsson και συν. 1996), ή από το έντερο και περίτονο πέταλο του μεσεντερίου σε ιριδίζουσα πέστροφα (Horne και Baxendale. 1983, Nelson και συν. 1985b). Οι Horne και Baxendale (1983) αναφέρουν χαρακτηριστικά, αποικισμό όλων των περιοχών του εντέρου (κατά προσέγγιση  $10^3$  κύτταρα/cm<sup>2</sup>) με τη μέγιστη προσκόλληση του βακτηριδίου να συμβαίνει εντός των πρώτων 100 λεπτών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει και η μόλυνση από το στόμα, αφού έχει προταθεί από αρκετούς συγγραφείς ως σημαντική στη φυσική νόσο (Roberts. 1973, Ross και συν. 1968), όμως σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, όπως σε χέλια (Chart και Munn. 1980), δεν παρουσιάστηκαν κλινικά συμπτώματα Δονακίωσης, ούτε προκλήθηκαν θάνατοι σε διάστημα τριών εβδομάδων, σε ψάρια που έλαβαν μεγάλες ποσότητες ενοφθαλμίσματος από αυτή την οδό. Το γεγονός προκαλεί έκπληξη δεδομένου ότι, όπως έχει αποδειχθεί, δονάκια εισβάλλουν στους ιστούς του ξενιστή διαμέσου δερματικών αλλοιώσεων, που προκαλούνται ακόμη και από επικόλληση ετικετών (Roberts. 1973) και προσκόλληση θαλάσσιων ψειρών (Hastein και Bergsjø. 1976, Chart και Munn. 1980). Ωστόσο οι O'Toole και συν. (2004) με τη χρησιμοποίηση transparent zebrafish και φθόριο-σεσημασμένων βακτηριδίων παρατήρησαν είσοδο του βακτηριδίου από το στόμα (πιθανά μέσω κατάποσης νερού) και εγκατάσταση στη συνέχεια στην πεπτική οδό, πριν από την ανάπτυξή του στην επιφάνεια του δέρματος των ψαριών.

Η μόλυνση με κατάποση βακτηριδίων είναι δύσκολο να αποδειχθεί πειραματικά και ο πολύ υψηλός αριθμός βακτηριδίων που μπορεί να χορηγηθεί χωρίς να προκληθεί λοίμωξη, αφήνει αμφιβολίες για το εάν αυτή η οδός εισόδου είναι σημαντική στη φυσική εξάπλωση της νόσου. Σε έρευνες για την αποτελεσματικότητα εμβολίων πραγματοποιήθηκαν και χορηγήσεις από το στόμα ζωντανών βακτηριδίων. Αυτές ήταν, σταθερά, λιγότερο αποτελεσματικές από



άλλες μεθόδους χορήγησης που λάμβαναν χώρα ταυτόχρονα. Για παράδειγμα οι Baudin-Laurencin και Tangtrongpiros (1980) βρήκαν ότι  $6,7 \times 10^{10}$  ζωντανά βακτηρίδια, που χορηγήθηκαν από το στόμα με την τροφή, καθημερινά για 5 ημέρες, σκότωσαν μόνο 4 ψάρια (*Salmo gairdneri*) επί συνόλου 142 ψαριών. Προηγουμένως  $1,3 \times 10^4$  βακτηρίδια, που ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά, σκότωσαν το 34% των ψαριών εντός 15 ημερών. Διαπιστώθηκε επίσης, ότι καμία ένδειξη ασθένειας δεν παρατηρήθηκε με την εισαγωγή κατευθείαν στο στόμαχο με καθετήρα, δόσης παθογόνων δονακίων τριάντα φορές ισχυρότερης, από αυτή που προκάλεσε 80% θνησιμότητα σε 2 ημέρες, όταν χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά. Η οξύτητα του στομάχου μπορεί να είναι ένας παράγοντας μείωσης του αριθμού των ζωντανών βακτηριδίων που περνούν στο έντερο, όμως οι Chart και Munn (1980) χορήγησαν ζωντανά βακτηρίδια κατευθείαν στο πρόσθιο έντερο και το απευθυμένο χελιών, αποτυγχάνοντας και πάλι να εγκαταστήσουν μόλυνση. Εν αντιθέσει, βακτηρίδια του ιδίου στελέχους, όταν χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά ή ενδομυϊκά οδήγησαν σε ταχεία και υψηλού βαθμού θνησιμότητα (Horne. 1982).

### **Βράγχια**

Ορισμένες έρευνες αναφέρουν πολύ χαμηλή ή ανεπιτυχή μόλυνση μέσω των βραγχίων (Kanno και συν. 1989, Olsson και συν. 1996), πολλές ωστόσο μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι άλλη πιθανή πύλη εισόδου είναι τα βράγχια (Baudin-Laurencin και Germon. 1987, Horne. 1982), ενώ η λήψη από το στόμα ή η μόλυνση διαμέσου μικρών δερματικών αμυχών δεν είναι οι κύριες οδοί μόλυνσης (Horne. 1982).

Πολλοί ερευνητές σε μια προσπάθεια να αποφύγουν στα πειράματά τους την αμιγώς τεχνητή μόλυνση με εγχύσεις, χωρίς να καταφύγουν ωστόσο και στην απρόβλεπτη φυσική μόλυνση εφάρμοσαν επιτυχώς μεταχειρίσεις με λουτρά, όπου τα ψάρια εμβαπτίζονταν σε διαλύματα, που περιείχαν εναιωρήματα ζωντανών βακτηριδιακών κυττάρων (Croy και Amend. 1977, Schiewe και Hodgins. 1977, Gould και συν. 1979, Harbell και συν. 1979, Amend και Eshenour. 1980). Ο δρόμος εισόδου των κυττάρων στα λουτρά αυτά ή και των αντιγόνων, που χορηγήθηκαν παρομοίως, κατά τη διάρκεια εμβολιασμών, έχει ευρέως μελετηθεί. Οι Ament και Fender (1977) χρησιμοποιώντας μία μέθοδο υπεροσμωτικής διήθησης για να χορηγήσουν αλβουμίνη βόιου ορού συμπέραναν, ότι η κύρια πύλη εισόδου ήταν το σύστημα της πλευρικής γραμμής των ψαριών. Η άλλη πιθανά ικανή προσροφητική επιφάνεια, τα βράγχια, δε θεωρήθηκε σημαντική αν και η χρήση της υπεροσμωτικής μεθόδου (Amend και Fender. 1976, Fender και Amend. 1978), η οποία προκάλεσε μικρές αιμορραγίες στην επιφάνεια των βραγχίων, ενίσχυσε την πρόσληψη. Για να διαφοροποιηθεί η πρόσληψη από το σύστημα της πλευρικής γραμμής από

αυτή των βραγχιών, οι Alexander και συν. (1981) εμβάπτισαν μόνο το πρόσθιο (κεφαλή και βράγχια) ή μόνο το οπίσθιο τμήμα των ψαριών (σώμα και πλευρική γραμμή), σε ξεχωριστά πειράματα. Συμπέραναν λοιπόν, ότι τα βράγχια και όχι η πλευρική γραμμή είναι η κύρια πύλη εισόδου για την *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης. Όταν τα βραγχιακά νημάτια αφαιρέθηκαν από το ψάρι και εξετάστηκαν χωριστά *in vitro*, τα βακτηρίδια φάνηκε να προσροφώνται από αυτά και να περνούν στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τμήματα δέρματος. Αποδείχθηκε επίσης ότι η πρόσληψη από το στόμα βακτηριδίων, κατά τη διάρκεια της εμβάπτισης της κεφαλής, δεν ήταν σημαντική για τα αποτελέσματα (Home. 1982).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Η. ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ *V. anguillarum*

Διάφορες θεωρίες έχουν διατυπωθεί για τη διαδρομή του βακτηριδίου μετά την είσοδό του στον οργανισμό κυρίως με τη λήψη μολυσμένης τροφής, ή μέσω μολυσμένου νερού (Roberts. 1973, Ross και συν. 1968).

Ο Egusa (1982) αναφέρει ότι η Δονακίωση μπορεί να ξεκινά ως εντερίτιδα. Οι Nelson και συν. (1985α, β) με ιστολογικές εξετάσεις μολυσμένης ιριδίζουσας πέστροφας καταδεικνύουν την εντόπιση του *V. anguillarum* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Οι Muroga και De La Cruz (1987) αναφέρουν επέκταση της μόλυνσης στο ήπαρ, το σπλήνα, τους μυς, τα βράγχια και το έντερο και οι Nelson και συν. (1985β) αρχικά εντοπισμό στο σπλήνα και στη συνέχεια, με την αύξηση του αριθμού των βακτηριδίων και στο νεφρό. Άλλες περιγραφές για την παθογένεια της Δονακίωσης (Bullock και συν. 1971) καταδεικνύουν μια αρχική αλλοίωση στο έντερο, με την προσκόλληση του βακτηριδίου στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, και την ενεργοποίηση τοξίνης κατ' αντιστοιχία με το *V. cholerae* και το *V. parahaemolyticus* (Munro. 1982).

Οι Masumura και συν. (1989) και Muroga και συν. (1990) πρώτοι απέδειξαν ότι η νεκρωτική εντερίτιδα των γλωσσών μπορεί να προκληθεί στο ψάρι 'Japanese flounder' με, από του στόματος χορήγηση, *Vibrio* sp. ενσωματωμένων σε τροχόζωα ή γαρίδα. Αυτό το πειραματικό μοντέλο προσαρμόστηκε σε καλκάνια και *V. anguillarum* από τους Chair και συν. (1994). Σε αυτό το πείραμα ο Chair πέτυχε αθροιστική θνησιμότητα 61%, μέσα σε 12 ημέρες από την πρώτη χορήγηση *artemia* με *V. anguillarum*, στα ψάρια.

Το ίδιο πειραματικό μοντέλο με δειγματοληψίες σε διαφορετικούς χρόνους, εφάρμοσαν και οι Grisez και συν. (1996) προκειμένου να διερευνήσουν την οδό μόλυνσης του *V. anguillarum* και την εξέλιξη της Δονακίωσης. Το *V. anguillarum* δεν απελευθερώθηκε στο

στόμαχο αλλά στο πρόσθιο έντερο, όπου αναγνωρίστηκε, τόσο ελεύθερο στον αυλό, όσο και προσκολλημένο στην ψηκτροειδή παρυφή του επιθηλίου, 2 ώρες μετά την μόλυνση. Τα βακτηρίδια εμφανίστηκαν περιστασιακά στα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου και ελεύθερα στο χόριο. Τα ενδοκυτταρικά βακτηρίδια φαίνονταν να μεταφέρονται με ενδοκύττωση και να απελευθερώνονται στο χόριο, χωρίς το εντερικό τοίχωμα να εμφανίζει στοιχεία βλάβης. Η μεταφορά διαμέσου του επιθηλίου έγινε ταχύτατα (εντός 2 ωρών). Από την 6η ώρα και μετά εμφανίστηκαν ελεύθερα κυκλοφορούντα βακτηρίδια στα κολπώδη τριχοειδή του ήπατος. Στην περίπτωση αυτή το βακτηρίδιο μεταφέρθηκε μέσω του επιθηλίου με ενδοκύττωση, μάλλον παθητικά, στη βασική μεμβράνη του βλεννογόνου του οπίσθιου εντέρου. Από εκεί, πιθανώς μέσω της πυλαίας φλέβας, μεταφέρθηκε στο ήπαρ και στα υπόλοιπα όργανα. Σηψαιμία εγκαταστάθηκε στα περισσότερα ψάρια 48 ώρες μετά τη μόλυνση, ενώ οι θάνατοι ολοκληρώθηκαν δύο 24ωρα αργότερα.

Η μεταφορά διαμέσου του επιθηλίου του εντέρου «νεκρών» βακτηριδιακών κυττάρων με ενδοκύττωση έχει ήδη περιγραφεί σε μελέτες που αφορούν στην πρόσληψη βακτηριδιακών αντιγόνων από το επιθήλιο του εντέρου (Vigneulle και Baudin-Laurencin. 1991, Olafsen και Hansen. 1992).

Η ενεργητική δέσμευση του *V. anguillarum* στην ψηκτροειδή παρυφή των επιθηλιακών κυττάρων, σε αντίθεση με τη φαινομενικά παθητική μεταφορά του, διαμέσου αυτών, στους άλλους ιστούς, μπορεί να είναι ένας χαρακτήρας, που προσδιορίζει την λοιμογόνο δύναμη του στελέχους, όπως καταδείχθηκε από τους Horne και Baxendale (1983).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Θ. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ**

Τα κλινικά σημεία της Δονακίωσης περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε χέλια, στη Νορβηγία από τον Bergman (1909) και αργότερα από τον McCarthy (1974) στη Βρετανία, οι οποίοι αναφέρουν την εμφάνιση μακροσκοπικής αιμορραγίας με ταυτόχρονη παρουσία οιδήματος και δοθιήνων στο δέρμα.

Στο βακαλάο του Ατλαντικού, που είναι ένα από τα πρώτα είδη ψαριού, στο οποίο έχει περιγραφεί η Δονακίωση (Bergman. 1912), οι πρώτες αναφορές των κλινικών ευρημάτων της νόσου περιγράφουν μόλυνση των οφθαλμών με προσβολή του κερατοειδούς χιτώνα (Bergman. 1912), διάβρωση των πτερυγίων και αιμορραγία στην περιοχή της κεφαλής (Baumann και συν. 1984, Egidius και Andersen. 1984).

Οι Bagge και Bagge (1956) αναφέρουν μια ελαφρώς διαφορετική κλινική εικόνα, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ελκών και φυσαλίδων σε όλη την επιφάνεια του δέρματος του ψαριού, αλλοιώσεις, οι οποίες παρουσιάστηκαν σε μεταγενέστερο χρόνο. Η Δονακίωση ωστόσο στην περίπτωση αυτή θεωρήθηκε δευτεροπαθής μόλυνση.

Όπως είναι πλέον γνωστό, η κλινική συμπτωματολογία της νόσου σχετίζεται άμεσα με την ηλικία του ψαριού, τη θερμοκρασία και το είδος αυτού (Richards. 1980), όπως, για παράδειγμα, στα χέλια, όπου, ως αρχικά κλινικά σημεία, αναφέρονται η αδράνεια και η ερυθρότητα της ουράς και των πτερυγίων (Brunn και Heiberg. 1932).

Σε υπεροξείες και σφοδρές επιζωοτίες η νόσος εξελίσσεται ταχύτατα και τα περισσότερα από τα μολυσμένα ψάρια πεθαίνουν χωρίς να εμφανίσουν κανένα κλινικό σύμπτωμα (Actis και συν. 1999α) με εξαίρεση το σκούρο χρωματισμό του δέρματος (Richards. 1980).

Ψάρια με οξεία προσβολή από τη νόσο εμφανίζουν λήθαργο (Richards. 1980), παρουσιάζουν μειωμένη όρεξη και εμφανίζουν ωχρά βράγχια και περιστασιακά περιοφθάλμιο οίδημα, συμπτώματα που σχετίζονται με αιφνίδια αύξηση της θνησιμότητας (Bruno και Porpe. 1996). Η πιο χαρακτηριστική ωστόσο, κλινική ένδειξη της Δονακίωσης είναι η παρουσία ερυθρών κηλίδων στην κοιλιακή και στις πλάγιες χώρες του ψαριού και υπεργερμένων και σκουρόχρωμων δερματικών αλλοιώσεων που εξελκώνονται και εκκρίνουν αιμορραγικό εξίδρωμα (Actis και συν. 1999α).

Σε χρονιότητα της νόσου προέχει η παρουσία υπεργερμένων και σκουρόχρωμων δερματικών αλλοιώσεων οι οποίες εξελκώνονται και εκκρίνουν αιμορραγικό εξίδρωμα. Επίσης παρατηρούνται αλλοιώσεις και στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού, ο οποίος αρχικά εμφανίζει θολερότητα και εν συνεχεία εξέλκωση και απώλεια του περιεχομένου της οφθαλμικής κόγχης όπως χαρακτηριστικά αναφέρεται ( Actis και συν. 1999α).

### **Εργαστηριακά ευρήματα**

Πολυάριθμα βακτηρίδια απομονώνονται από το αιμορραγικό εξίδρωμα των ελκών (Bruno και Porpe. 1996), από το αίμα και τους αιμοποιητικούς ιστούς (Actis και συν. 1999α, Bergman. 1912). Στα προσβεβλημένα ψάρια ο αριθμός των λευκοκυττάρων είναι μειωμένος (Ransom και συν. 1984).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υπάρχουν λίγες πληροφορίες για την επίδραση της νόσου στους ιστούς των ψαριών και οι αμιγώς ιστοπαθολογικές μελέτες της Δονακίωσης είναι ελάχιστες, όπως αυτή των Ransom και συν. (1984), οι οποίοι μελέτησαν και συνέκριναν την ιστοπαθολογική εικόνα της Δονακίωσης που προκλήθηκε από *V. anguillarum* και *Vibrio ordalii* σε πέστροφα και σολωμό. Συνεπώς, δημοσιευμένα δεδομένα που αφορούν στην παθολογία των θηλαστικών πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν για να γίνουν παραλληλισμοί, όπου αυτό είναι εφικτό, μεταξύ γνωστών παθολογικών καταστάσεων, που αφορούν στα θηλαστικά, με αντίστοιχες των ιχθύων.

Από την παθογένεια της νόσου προκύπτει ότι η Δονακίωση προκαλεί ένα είδος φλεγμονής, η οποία λαμβάνει χώρα στα ψάρια και είναι αρκετά συγκρίσιμη με αυτή των θηλαστικών (Finn και Nielson. 1971, Chart και Munn. 1980). Για παράδειγμα, η μη αντιστρεπτή κυτταρική νέκρωση που παρατηρείται στο έντερο των ψαριών με Δονακίωση έχει ισχυρή συσχέτιση με τη διαπύηση και καταρροϊκή φλεγμονή που εμφανίζεται στην παθολογία των θηλαστικών (Muir. 1964).

Από την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας οι μακροσκοπικές και μικροσκοπικές αλλοιώσεις της Δονακίωσης ποικίλουν ανάλογα με το είδος του ψαριού, την ηλικία, τη θερμοκρασία και τη μορφή της νόσου (Richards. 1980) και έχουν περιγραφεί περιστασιακά σε διάφορα είδη ψαριών, όπως στα καλκάνια, τα χέλια και το Dover sole, κυρίως μετά από φυσική μόλυνση.

### Υπεροξεία μορφή

Ο θάνατος συχνά επέρχεται χωρίς καμία ορατή μακροσκοπική αλλοίωση, με εξαίρεση το σκούρο χρωματισμό του δέρματος (Richards. 1980), αν και μπορεί επίσης να παρατηρηθεί περιοφθάλμιο και κοιλιακό οίδημα (Richards. 1980, Roberts. 2001, Horne και συν. 1977)

Σε νεαρά καλκάνια και dover sole, μετά από φυσική μόλυνση, παρατηρήθηκε περιοφθάλμιο οίδημα και τυπικοί λευκοί δακτύλιοι ιστού γύρω από τα μάτια ενώ χαρακτηριστική στις περιπτώσεις αυτές ήταν η απουσία δερματικών αλλοιώσεων. Στις περιπτώσεις αυτές διαπιστώθηκε μικροσκοπικά οίδημα στο χόριο, μυϊκό, και ινώδη ιστό της περιοφθάλμιας χώρας καθώς και αλλοιώσεις σπογγίωσης της επιδερμίδας με επέκταση γύρω από τις νευρικές αποφυάδες. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του οφθαλμού εμφάνιζε καταρχήν οίδημα και εν

συνεχεία αποκόλληση στην περιοχή σύνδεσης των νευρικών στιβάδων με το χρωμοφόρο επιθήλιο.

Μακροσκοπικά το έντερο ήταν ερυθρό και κατά την ιστοπαθολογική του εξέταση διαπιστώθηκε η παρουσία βλεννογόνιου και υποβλεννογόνιου οιδήματος, διάταση των τριχοειδών αγγείων και αιμορραγική διήθηση του βλεννογόνου. Πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα εξέλειπαν χαρακτηριστικά και το επιθήλιο δεν παρουσίαζε αξιόλογες αλλοιώσεις (Richards. 1980).

Σε μόλυνση ωστόσο *via artemia* αναφέρεται πλήρης απόπτωση του εντερικού επιθηλίου με παρουσία πολυάριθμων βακτηριδίων, τα οποία κάλυπταν την πλευρά της βασικής μεμβράνης προς την εντερική κοιλότητα, καθώς επίσης και παρουσία μεγάλου αριθμού βακτηριδίων στον παγκρεατικό πόρο, ενώ το παγκρεατικό παρέγχυμα εμφανιζόταν φυσιολογικό (Grisez και συν. 1996).

Η καρδιά, στην υπεροξεία μορφή, είναι υπερτροφική και το περικάρδιο παρουσιάζει αιμορραγικές διηθήσεις. Ιστολογικά το σαρκόπλασμα είναι κενοτοπιώδες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα διογκωμένα (Roberts. 2001).

### **Οξεία μορφή**

Η οξεία Δονακίωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία μακροσκοπικών και μικροσκοπικών αλλοιώσεων, τόσο στο δέρμα, όσο και στα εσωτερικά όργανα, ως αποτέλεσμα της καταπληξίας και του σηπτικού shock. Οι αλλοιώσεις, ωστόσο, των εσωτερικών οργάνων συναντώνται σπανιότερα και σχετίζονται με την έκθεση σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

#### **Δέρμα**

Οι δερματικές αλλοιώσεις είναι οι πλέον συνήθεις αν και αναφέρονται περιπτώσεις Δονακίωσης χωρίς σημαντικά μακροσκοπικά ευρήματα στο δέρμα (Richards. 1980).

Οι πλέον χαρακτηριστικές μακροσκοπικές αλλοιώσεις του δέρματος είναι ο σκούρος χρωματισμός (Richards. 1980, Roberts. 2001) και οι στικτές αιμορραγίες- πετέχειες σε διάφορες περιοχές του σώματος, κυρίως στη βάση των πτερυγίων, αλλά και στις κοιλιακές επιφάνειες περιλαμβανομένης της κάτω γνάθου (Chart και Munn. 1980, Richards. 1980, Roberts. 2001). Οι αλλοιώσεις του δέρματος συχνά χαρακτηρίζονται από υπερέκκριση βλέννης (Richards. 1980). Σε περιπτώσεις ενδομυϊκής ή ενδοφλέβιας μόλυνσης, ως συνέπεια τριχοειδικών αιμορραγιών, προκαλούνται εξελκώσεις και ρευστοποίηση του υποκείμενου μυϊκού ιστού στο σημείο της έγχυσης (Chart και Munn. 1980, Roberts. 2001). Ανάλογες εξελκώσεις παρατηρούνται επίσης

συχνά, ως πρόιμη μακροσκοπική δερματική αλλοίωση, στις σιαγόνες καλκανιών με οξεία Δονακίωση (Richards. 1980).

Οι ιστολογικές αλλοιώσεις της επιδερμίδας χαρακτηρίζονται από σπογγίωση (μεσοκυττάριο οίδημα), αποκόλληση και τελικά νέκρωση αυτής. Σε κυτταρικό επίπεδο, τα κύτταρα υφίστανται καρυορηξία, ρήξη κυτταρικής μεμβράνης και κυτταρόλυση, ενώ αναγνωρίζονται και πυρηνικά αποτρίμματα (συσσωματώματα έντονα βασίφιλων νουκλειικών οξέων) (Richards. 1980, André και συν. 1972, Roberts και Bullock. 1976).

Στην επιδερμίδα και στο χόριο παρατηρούνται αλλοιώσεις μη ειδικής φλεγμονής που χαρακτηρίζεται από υπεραιμία, οίδημα, αιμορραγικές και φλεγμονώδεις διηθήσεις μικτού κυτταρικού τύπου και τελικά εξέλκωση. Η φλεγμονώδης αντίδραση και η αιμορραγία επεκτείνονται και στους υποκείμενους μυϊκούς ιστούς προκαλώντας μεσομυϊκό οίδημα (Roberts. 2001), έντονη μυοφαγία και εκτεταμένη σαρκοπλασματική νέκρωση. Η νέκρωση αυτή εκτείνεται και στη μεσομυϊκή ζώνη και χαρακτηρίζεται από την παρουσία συσσωματωμάτων από σαρκοπλασματικά συγκρίμματα, μακροφάγα, βασεόφιλα υπολείμματα πυρήνων, ινική και βακτηρίδια (Bergman. 1912, Richards. 1980, Roberts. 2001, Yiagnisis και συν. 2007).

### **Καρδιά**

Σε οξεία φλεγμονή η καρδιά είναι διατεταμένη και σε διατομή το μυοκάρδιο είναι ερυθρό με λευκωπές εστίες, ενώ η καρδιακή κοιλότητα πληρούται από διαυγές, ιξώδες υγρό (Cisar και Fryer. 1969, Harbell. 1976, Anderson και Conroy. 1970, Roberts. 2001). Κατά την ιστολογική εξέταση και εδώ, όπως και στην υπεροξεία μορφή, παρατηρούνται αρχικά κενотоπίωση του σαρκοπλάσματος των καρδιακών μυϊκών ινών, διόγκωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, υπεραιμία ή/και αιμορραγία του περικαρδίου και στο τελικό στάδιο, ινομυώδης νέκρωση και αποκόλληση του ενδοθηλίου του κόλπου (Roberts. 2001, Richards. 1980, Chart και Munn. 1980, Baumann και συν. 1984, Ransom και συν. 1984, Lamas και συν. 1994).

### **Νεφροί**

Μακροσκοπικά ο νεφροί είναι διογκωμένοι και παρουσιάζουν ωχρές κηλίδες με αιμορραγικές παρυφές. Ιστολογικά στα αρχικά στάδια τα επιθηλιακά κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων είναι κενотоπιώδη, ενώ αιμορραγικές διηθήσεις παρατηρούνται στο νεφρικό παρέγχυμα. Με την εξέλιξη της νόσου τα νεφρικά σπειράματα, τα ουροφόρα σωληνάρια και τα ενδοκρινή κύτταρα του μεσονεφρικού ιστού νεκρώνονται, ενώ στα μελανομακροφάγα κέντρα διαπιστώνεται αυξημένη εναπόθεση σιδήρου.

Ο κεφαλικός νεφρός αρχικά παρουσιάζει ελάττωση της αιμοποίησης και εν συνεχεία νέκρωση (Roberts. 1989, Richards. 1980, Chart και Munn. 1980, Baumann και συν.1984, Ransom και συν.1984, Lamas και συν. 1994, Yiagnisis και συν. 2007).

### **Σπλήνας**

Μακροσκοπικά παρατηρείται σπληνομεγαλία και οι πρώτες ιστολογικές αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται από οίδημα και αιμορραγικές διηθήσεις του σπληνικού παρεγχύματος, και αυξημένη εναπόθεση σιδήρου στα μελανομακροφάγα κέντρα. Ο αιμοποιητικός ιστός ελαττώνεται, φλεγμονώδεις διηθήσεις παρατηρούνται στο τοίχωμα των ελλειψοειδών αγγείων και μεγάλος αριθμός μελανομακροφάγων στα σπληνικά αγγεία. Τελικά τα σπληνικά ελλειψοειδή και ο αιμοποιητικός ιστός υφίστανται ρευστοποιό νέκρωση (Agius. 1979, Bruno και Poppe. 1996, Hjeltne και Roberts. 1993, Baumann και συν. 1984, Ransom και συν. 1984, Lamas και συν. 1994, Yiagnisis και συν. 2007).

### **Ήπαρ**

Μακροσκοπικά το ήπαρ είναι διογκωμένο σκοτεινού ερυθρού χρώματος ή/και με πετέχειες. Ιστολογικά παρατηρούνται αιμορραγικές διηθήσεις, λιπώδης εξαλλαγή των ηπατικών κυττάρων και προοδευτικά εστιακές και εκτεταμένες νεκρώσεις με χαρακτηριστικές καρυορρηξίες (Bruno και Poppe. 1996, Roberts. 2001, Richards. 1980, Chart και Munn. 1980, Baumann και συν. 1984, Ransom και συν. 1984, Lamas και συν. 1994, Bowser και συν. 2004).

### **Γαστρεντερικός σωλήνας**

Προσβάλλεται κυρίως η οπίσθια μοίρα του εντέρου και πρώιμο μακροσκοπικό εύρημα είναι η υπεραιμία και η αγγειοδιαστολή. Διαπιστώνεται επίσης η παρουσία πρωκτικού εκκρίματος (Chart και Munn. 1980), ενώ ο εντερικός αυλός πληρούται από βλέννη (Richards. 1980, Rucker. 1959), αιμορραγικό έκκριμα (Novotny. 1975) ή διαυγές, ιξώδες υγρό (Cisar και Fryer. 1969, Harbell. 1976, Anderson και Conroy. 1970). Ακολουθεί εκτεταμένη νέκρωση του βλεννογόνου και της υποβλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας και αποκόλληση του εντερικού επιθηλίου από τη βασική μεμβράνη, το οποίο όμως είναι ακέραιο. Σε μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (H/M) διαπιστώθηκε πως το πρωκτικό έκκριμα, που πληροί τον εντερικό αυλό, αποτελείται από τμήματα του εντερικού επιθηλίου και λευκοκύτταρα (Grisez και συν. 1996, Chart και Munn. 1980).



### **Περιτόναιο**

Χαρακτηριστικές πετέχειες αναγνωρίζονται στο σπλαχνικό και τοιχωματικό περιτόναιο (Bruno και Poppe. 1996, Chart και Munn. 1980), ενώ συχνά διαπιστώνεται και η παρουσία αχυρόχρωμου ή αιμορραγικού ασκίτικού υγρού (Richards. 1980, Baumann και συν. 1984, Ransom και συν. 1984, Lamas και συν. 1994).

### **Μήνιγγες**

Το μόνο ιστολογικό εύρημα που αναφέρεται είναι η παρουσία οιδήματος (Richards. 1980).

### **Χρόνια μορφή**

#### **Δέρμα**

Επί χρονιότητας της νόσου, ειδικά σε περιπτώσεις ενδοπεριτοναϊκής, ενδομυϊκής ή ενδοφλέβιας πειραματικής μόλυνσης, λόγω της επανειλημμένης αιμορραγίας, παρατηρείται αποκόλληση του δέρματος (Chart και Munn. 1980). Οι δερματικές αλλοιώσεις οργανώνονται με τη δημιουργία βαθέων ελκών, με σημαντική αιμορραγία και εναποθέσεις ινικής (Richards. 1980, Actis και συν. 1999α). Τα έλκη αυτά, μπορεί, περιστασιακά, να εξελιχθούν σε ελκώδη συρίγγια προκαλώντας εκσπλάχνωση. Οι σκουρόχρωμες νεκρωτικές αλλοιώσεις αποκτούν τυπική μορφολογία γνωστή ως «νόσος των μαύρων κηλίδων» (“black patch disease”) (Richards. 1980).

Στα ιστοπαθολογικά ευρήματα, συγκαταλέγονται και οι φλεγμονώδεις διηθήσεις που επεκτείνονται με επικράτηση λεμφοκυττάρων. Αναγνωρίζονται βαθιές διαβρωτικές εξεργασίες ελκώδους μορφής και βαθμιαία ανάπτυξη κοκκιώδους ιστού, σε μία προσπάθεια επούλωσης, και με πολλαπλασιασμό του καλυπτήριου επιθηλίου της επιδερμίδας. Τα ελλείμματα, όμως, δεν καλύπτονται όταν συνυπάρχει βαριά μικροβιακή μόλυνση (Richards. 1980). Εκτεταμένες νεκρώσεις παρουσιάζουν επίσης και οι μύες (Richards. 1980, Bruno και Poppe. 1996).

#### **Βράγχια**

Τα βράγχια λόγω ισχαιμίας είναι ωχρά και μικροσκοπικά παρατηρείται υποεπιθηλιακό οίδημα, που οδηγεί σε προοδευτική αποκόλληση του επιθηλίου (Bruno και Poppe. 1996).

**Καρδιά**

Χαρακτηριστικά αναφέρεται υποστροφή των αλλοιώσεων σε χρονιότητα της νόσου (Richards. 1980).

**Σπλήνας**

Μακροσκοπικά παρατηρείται σπληνομεγαλία, πιθανόν λόγω αύξησης της αιμοποίησης, ενώ η παρατεταμένη αιμόλυση έχει ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στα μελανομακροφάγα του εναπομείναντος σπληνικού αιμοποιητικού ιστού (έντονη θετικότητα στην Perl' s Prussian blue) (Agius. 1979, Roberts. 2001, Richards. 1980, Bruno και Poppe. 1996).

**Νεφροί**

Οι νεφροί είναι επίσης διογκωμένοι, ενώ ιστολογικά διαπιστώνεται η παρουσία εκσεσημασμένης ρευστοποιού νέκρωσης (Richards. 1980, Baumann και συν. 1984, Ransom και συν. 1984, Lamas και συν. 1994) καθώς και, όπως και στο σπλήνα, άφθονης αιμοσιδηρίνης στα μελανομακροφάγα του εναπομείναντος νεφρικού αιμοποιητικού ιστού.

**Αιμοποιητικό σύστημα**

Μεταστατικός αιμοποιητικός ιστός αναγνωρίζεται στο ήπαρ και στο επικάρδιο, ενώ στο αίμα παρατηρούνται ανώριμα αιμοκύτταρα. (Roberts. 2001, Richards. 1980, Bruno και Poppe. 1996).

**Περιτοναϊκή κοιλότητα**

Η παρατεταμένη παραμονή περιτοναϊκού υγρού οδηγεί στη δημιουργία περιτοναϊκών συμφύσεων (Richards. 1980).

**Οφθαλμοί**

Η προσβολή των οφθαλμών οδηγεί σε θόλωση του κερατοειδούς, εξέλκωση, εξόφθαλμο και απώλεια του οφθαλμού (Richards. 1980).

## ΣΚΕΠΤΙΚΟ ΕΠΙΛΟΓΗΣ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Από την ανάπτυξη των επιμέρους θεμάτων που πραγματεύεται το γενικό μέρος προκύπτουν δύο κυρίως σημαντικά συμπεράσματα τα οποία και οδήγησαν στην επιλογή του αντικειμένου της παρούσας διατριβής.

Η Δονακίωση αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα, που αντιμετωπίζουν οι σύγχρονες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο, όσο και κατ' αναλογία στη χώρα μας. Αυτή δε που προκαλείται από *V. anguillarum* έχει τις καταστροφικότερες συνέπειες αν δεν προληφθεί, διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί έγκαιρα. Επιπλέον, η φύση του βακτηριδίου με την ποικιλία των μηχανισμών παθογόνου δράσης που, κατά περίπτωση, εμφανίζει, αλλά και το πλήθος των παραγόντων που επηρεάζουν την εμφάνιση και την εξέλιξη του νοσήματος, δεν επιτρέπουν να θεωρείται η Δονακίωση ένα καλά μελετημένο σε βάθος νόσημα.

Το λαβράκι μαζί με την τσιπούρα είναι τα συχνότερα καλλιεργούμενα είδη στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες. Η οικονομική σημασία του όπως προκύπτει από τα μεγέθη που παρατέθηκαν είναι τεράστια. Επιπλέον η ευαισθησία του στο νόσημα και τα προληπτικά μέτρα που λαμβάνονται για το λόγο αυτό αυξάνουν το κόστος παραγωγής.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερή η ανάγκη της μελέτης της Δονακίωσης από *V. anguillarum* σε λαβράκι, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω το νόσημα και να εξαχθούν συμπεράσματα, που θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση και κατά συνέπεια πρόληψή του.

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τις αλλοιώσεις που προκαλεί η Δονακίωση στα διάφορα θαλάσσια είδη δεν υπάρχει μια εκτενής και εις βάθος συστηματική περιγραφή αυτών, ειδικά στο λαβράκι και σε συνθήκες πειραματικής μόλυνσης, οι οποίες δεν επιτρέπουν την αλλοίωση της καθαυτό ιστοπαθολογικής εικόνας του νοσήματος από παράγοντες πέραν του ίδιου του βακτηριδίου. Η συστηματική περιγραφή των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων της νόσου τέθηκε ως πρώτος στόχος της παρούσας έρευνας.

Η διερεύνηση της πύλης εισόδου του βακτηριδίου και της κινητικής του στους ιστούς του ψαριού αποτέλεσε τον επόμενο στόχο της μελέτης αυτής, στη λογική ότι συνδέονται άμεσα με τις αρχόμενες αλλοιώσεις της νόσου.

Ο τρίτος στόχος ήταν να αποδειχθεί ο ρόλος σε επίπεδο αλλοιώσεων του σημαντικότερου, κατά την βιβλιογραφία, παράγοντα λοιμογόνου ικανότητας που διαθέτει το *V. anguillarum*, του συστήματος δέσμευσης σιδήρου. Αυτό εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όχι μόνο για την μελέτη της Δονακίωσης αλλά και για την εξαγωγή συμπερασμάτων και σε άλλα νοσήματα που προκαλούνται από βακτηρίδια που διαπιστωμένα διαθέτουν ανάλογους μηχανισμούς.

Τέλος τέθηκε ως στόχος ο έλεγχος αυτής καθαυτής της διαδικασίας της πειραματικής μόλυνσης και της μεθοδολογίας εξαγωγής των αποτελεσμάτων της έρευνας, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η δυνατότητα του λαβρακιού να χρησιμοποιείται ως πειραματόζωο σε ανάλογες μελέτες άλλων νοσημάτων ή άλλων παραγόντων παθογένειας βακτηριδίων.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Για την επίτευξη των στόχων που προαναφέρθηκαν στο γενικό μέρος πραγματοποιήθηκαν τρεις προπείραματικές και τρεις πειραματικές μολύνσεις.

Οι τρεις προπείραματικές μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με σκοπό:

α) Να ελεγχθεί η λοιμογόνος δύναμη του φυσικού στελέχους που χρησιμοποιήθηκε στους πειραματισμούς, η δυνατότητά του να προκαλέσει λοίμωξη με τη μέθοδο της εμβάπτισης και να επιλεγθεί μολύνουσα δόση τέτοια, ώστε να προκληθεί η οξεία ή υποξεία κλινική μορφή της νόσου.

β) Να τυποποιηθούν οι εργαστηριακές συνθήκες υπό τις οποίες θα πραγματοποιούνταν οι κύριοι πειραματισμοί και η διαχείριση των πειραματόζωων.

γ) Να επιλεγούν οι βέλτιστες μέθοδοι για τη διενέργεια των νεκροτομών των ιχθύων και τη λήψη και επεξεργασία των ιστοτεμαχίων των υπό εξέταση ιστών και οργάνων.

Ακολούθησαν τρεις πειραματικές μολύνσεις:

Σκοπός της πρώτης πειραματικής μόλυνσης ήταν να μελετηθούν οι πιθανές πύλες εισόδου του βακτηριδίου και η κινητική του στους ιστούς και τα όργανα των ιχθύων σε σχέση με την εμφάνιση των πρώτων αλλοιώσεων κατά την πορεία εκδήλωσης της νόσου.

Στη δεύτερη πειραματική μόλυνση ελέγχθηκε η συσχέτιση της παρουσίας πλασμιδίου στο βακτηρίδιο με την, προκαλούμενη από το βακτηρίδιο, θνησιμότητα.

Η τρίτη πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε προκειμένου:

α) Να αναπαραχθεί το νόσημα σε εργαστηριακές συνθήκες.

β) Να μελετηθεί το σύνολο των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται στο νόσημα.

γ) Να μελετηθεί, σε επίπεδο αλλοιώσεων και εξέλιξης του νοσήματος, ο ρόλος του συστήματος δέσμευσης σιδήρου που διαθέτει το βακτηρίδιο, σύστημα που εμφανίζεται ως ένας από τους σημαντικότερους, αν όχι ο πιο σημαντικός, παράγοντας παθογόνου δράσης του βακτηριδίου.

Πρέπει να σημειωθεί ότι στο σύνολο του Ειδικού Μέρους της παρούσας έρευνας επιλέχθηκε ένας ενιαίος τρόπος παρουσίασης των τεχνικών, των μεθόδων και των πειραματισμών, αλλά και των αντίστοιχων αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων, έτσι ώστε να αποφευχθούν, κατά το δυνατό, επαναλήψεις των ιδίων αντικειμένων. Η αλληλουχία στην καταγραφή μεθόδων και πειραματισμών είναι διάφορη του πραγματικού χρόνου εφαρμογής τους και υπηρετεί την πιο εύληπτη παρουσίαση της παρούσας μελέτης.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Διαχείριση πειραματόζωων

Όλες οι πειραματικές μολύνσεις έλαβαν χώρα στις, εγκεκριμένες για πειραματισμούς, εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Ιχθυολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής. Τα ιχθύδια λαβρακιού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό απαλλαγμένο από νοσήματα. Η μεταφορά τους γινόταν με ειδικό όχημα, που έφερε δεξαμενές θαλασσινού νερού, το οποίο εμπλουτιζόταν με οξυγόνο από αντίστοιχες φιάλες.

Τα ιχθύδια κατά την άφιξή τους στο εργαστήριο τοποθετούνταν σε δεξαμενές με θαλασσινό νερό χωρητικότητας 70 L, που διέθεταν σύστημα αερισμού, καθώς και βιολογικό και μηχανικό φίλτρο. Η ανακύκλωση του νερού γινόταν με ρυθμό 0.3 m<sup>3</sup>/h, ενώ η ανανέωσή του έφθανε στο 50% ημερησίως.

Στα ιχθύδια δεν χορηγούνταν τροφή τις πρώτες δύο ημέρες μετά την άφιξή τους. Στη συνέχεια, λάμβαναν τροφή σε pellets μία φορά ημερησίως σε ποσότητα ίση με το 3% του υπολογιζόμενου βάρους τους. Σε αυτές τις συνθήκες τα ιχθύδια παρέμεναν για ένα μήνα κατ' ελάχιστον προκειμένου να προσαρμοστούν. Πρέπει να σημειωθεί, ότι οι απώλειες των ιχθυδίων από την καταπόνηση κατά την μεταφορά δεν υπερέβησαν το 3% στη διάρκεια αυτής και τα πρώτα εικοσιτετράωρα μετά την άφιξή τους. Κατά τη διάρκεια του σταδίου προσαρμογής τα ιχθύδια δεν παρουσίασαν κλινικά συμπτώματα νόσου.

Η χορήγηση τροφής διακοπτόταν 48 ώρες πριν από κάθε προγραμματισμένη πειραματική μόλυνση. Η χαμηλή θερμοκρασία νερού, στην οποία προσαρμόστηκαν τα ιχθύδια προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι κύριες πειραματικές μολύνσεις, οδήγησε σε μείωση της πρόσληψης τροφής (ποσότητα <0,5% του υπολογιζόμενου βάρους τους) και αναστολή της κατά τη διάρκεια των κύριων πειραματικών μολύνσεων. Η θανάτωση των ιχθυδίων στους χρόνους των κατά περίπτωση δειγματοληψιών πραγματοποιούνταν με την τοποθέτησή τους σε λουτρό περιεκτικότητας 0,6mL 2-Phenoxyethanole/L θαλασσινού νερού και στη συνέχεια με εγκάρσια τομή στο ύψος της αυχενικής μοίρας του νωτιαίου μυελού.

### **Μικροβιολογικός έλεγχος τροφής και νερού**

Παρά το γεγονός ότι σε κάθε πειραματισμό συμμετείχε ομάδα μαρτύρων, πριν τις πειραματικές μολύνσεις γινόταν έλεγχος της χορηγούμενης τροφής και του θαλάσσιου νερού των δεξαμενών για την πιθανή παρουσία δονακίου. Δείγματα νερού και ομογενοποιημένης τροφής επωάζονταν σε TSBS (βλ. στη συνέχεια) στους 23°C για 24 ώρες. Από το εναίωρημα γινόταν ενοφθαλμισμός τριβλίων petri με TCBS (βλ. στη συνέχεια) τα οποία επωάζονταν στην ίδια θερμοκρασία για 48 ώρες. Καμία προσπάθεια απομόνωσης δονακίου από τα δείγματα δεν ήταν επιτυχής.

### **Παθογόνο αίτιο**

Στις πειραματικές μολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη:

α) Φυσικό στέλεχος *V. anguillarum* (Van1) που απομονώθηκε από περιστατικό Δονακίωσης σε εμπορική ιχθυοκαλλιέργεια.

β) Γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *V. anguillarum* (Van731) που δημιουργήσαμε στην παρούσα έρευνα από το προηγούμενο φυσικό στέλεχος.

### **Καλλιέργειες, μικροβιολογικές – βιοχημικές δοκιμές**

Για την καλλιέργεια των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα Tryptic Soy Broth (Fluka) με προσθήκη χλωριούχου νατρίου (NaCl)1,5% (TSBS), Tryptic Soy Agar με προσθήκη άγαρ 1,5% στο TSBS (TSAS), και Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (Fluka) (TCBS) ως εκλεκτικό υπόστρωμα για τα δονάκια.

Στα στελέχη πραγματοποιήθηκε σειρά μικροβιολογικών – βιοχημικών δοκιμών προκειμένου να ταυτοποιηθούν και να καταγραφεί ο φαινότυπός τους (Barrow και Feltham. 1993, Woodland. 2004). Στο σύνολο των δοκιμών χρησιμοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες εικοσιτεσσάρων ωρών των στελεχών σε TSBS, οι οποίες προήλθαν από μεμονωμένες αποικίες σε TSAS, με εξαίρεση τις κατά περίπτωση επισημάνσεις. Η σειρά περιέλαβε τις εξής δοκιμές:

- Gram,
- Οξειδάση (Oxidase Test, Fluka),
- Καταλάση,
- OF (OF Test Nutrient Agar, Fluka),

-Κινητικότητα: ελέγχθηκε σε μαλακό άγαρ (TSBS με προσθήκη 0.3% άγαρ (TSBSf)) και με απευθείας μικροσκόπηση σταγόνας υγρής καλλιέργειας βακτηριδίου σε TSBS, σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων,

-Ευαισθησία στο δονακιοστατικό Vibriostatic 0/129(150mg) (Oxoid) και τη

-Σειρά δοκιμών που περιλαμβάνονται στο ari20E (bioMerieux), και πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή:

-παρουσία: β-γαλακτοσιδάσης (ONPG), διυδρολάσης της αργινίνης (ADH), δεκαρβοξυλάσης της λυσίνης (LDC), δεκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης (ODC),

-χρήση κιτρικών αλάτων (CIT),

-παραγωγή H<sub>2</sub>S (H<sub>2</sub>S),

-παρουσία: ουρεάσης (URE), δεαμινάσης της τρυπτοφάνης (TDA),

-παραγωγή: ινδόλης (IND), ακετοΐνης (VP),

-παρουσία ζελατινάσης (GEL),

-ζύμωση και οξείδωση: γλυκόζης (GLU), μανιτόλης (MAN), ινοσιτόλης (INO), σορβιτόλης (SOR), ραμνόζης (RHA), σακχαρόζης (SAC), μελιβιόζης (MEL), αμυγδαλίνης (AMY), αραβινόζης (ARA)

-αναγωγή νιτρικών σε νιτρώδη (NO<sub>2</sub>)).

Το σύνολο των στελεχών, που χρησιμοποιήθηκαν, αποθηκεύθηκαν σε TSBS με 20% γλυκερόλη στους -80°C.

### **Μοριακή ταυτοποίηση του φυσικού στελέχους *V. anguillarum*, Van1**

Το Van1 ταυτοποιήθηκε μοριακά με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε 1mL καθαρής καλλιέργειας 12 ωρών του βακτηριδίου σε TSBS. Η εκχύλιση του DNA του βακτηριδίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin Tissue Kit (Macherey – Nagel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Για την ταυτοποίηση επιλέχθηκε το ζεύγος εκκινητών van-ami8 και van-ami417 (Hong και συν. 2007), των οποίων οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων εμφανίζονται στον Πίνακα 1. Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι να ενισχύουν τμήμα μεγέθους 429bp του γονιδίου *amiB* που κωδικοποιεί την αμιδάση της N-ακετυλομουραμούλ-L-αλανίνης. Η σύνθεση του μίγματος αντίδρασης της PCR ήταν (για 50μL μίγματος): 5μL 10X PCR buffer με 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25μL dNTPs (10mM), 1μL van-ami8 (10mM), 1μL van-ami417 (10mM), 0,5μL DNA πολυμεράση (2u/μL, DyNAzyme<sup>TM</sup> II, FINNZYMES, Espoo, Finland), 5μL DNA και 36,25μL υπερκαθαρό νερό. Οι παράμετροι λειτουργίας του θερμικού κυκλοποιητή (T-Cy,



Creacon, Emmen, The Netherlands) ήταν: αποδιάταξη στους 95°C για 10min, 25 κύκλοι: στους 95°C για 30sec, 56°C για 30sec, 72°C για 30sec και ένα τελευταίο βήμα στους 72°C για 7min. Το προϊόν της PCR ηλεκτροφορήθηκε στα 120V για 1h σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris Acetate EDTA (TAE) με την προσθήκη βρωμιούχου εθιδίου. Η ανάγνωση του αποτελέσματος έγινε με υπεριώδη ακτινοβολία μεγάλου μήκους κύματος (High Performance UV Transilluminator, UVP) και φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Canon PS1Si) σε σκοτεινό θάλαμο (UVP Biolimaging Systems, UVP).

### **Έλεγχος παρουσίας πλασμιδίου στο Van1**

Ο έλεγχος της παρουσίας πλασμιδίου στο Van1 πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των Kado και Liu (1981). 5mL καθαρής καλλιέργειας του βακτηριδίου σε TSBS φυγοκεντρήθηκε (HERMLE Z300K) στα 5.700 rpm για 10min. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL ρυθμιστικού διαλύματος E (2% TAE, 0,2% EDTA). Προστέθηκαν 2mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (pH 12,6, 3% SDS, 50mM Tris base, αποστειρωμένου με φίλτρο 0,22μm (Millex GP, Millipore)). Το δείγμα θερμάνθηκε στους 65°C για 30min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και το εκχύλισμα του DNA (υπερκείμενη υδατική φάση) καθαρίστηκε με διάλυμα φαινόλης – χλωροφόρμιου 1:1 και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 0,7% σε TAE στα 120V για 2h. Η ανάγνωση του αποτελέσματος έγινε όπως προαναφέρθηκε.

### **Αφαίρεση του πλασμιδίου του Van1 – Δημιουργία του Van731**

Για την αφαίρεση του πλασμιδίου του Van1 επιλέχθηκε η μέθοδος της θερμικής καταπόνησης (Trevors. 1986). 9mL καθαρής καλλιέργειας του βακτηριδίου σε TSBS (το ποσοστό της προσθήκης του NaCl ανήλθε στη συγκεκριμένη περίπτωση στο 3%) επώαστηκε στους 37<sup>0</sup> C για 24 ώρες. 1mL από αυτή ανακαλλιεργήθηκε σε 9mL TSBS στους 37<sup>0</sup> C για επιπλέον 24 ώρες. Η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές προκειμένου να αυξηθεί κατά το δυνατό το ποσοστό βακτηριδίων που θα απέβαλλαν το πλασμίδιό τους (Crosa και συν. 1980). Από την τελευταία ανακαλλιέργεια και έπειτα από διαδοχικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο αλατούχο νερό (SWs: αποστειρωμένο νερό με προσθήκη 1,5%NaCl), πραγματοποιήθηκαν σπορές με επίστρωση σε TSAs για να ληφθούν μεμονωμένες αποικίες. Από τις αποικίες αυτές γινόταν ανασπορά σε Chrome azurol S (CAS) άγαρ (βλ. στη συνέχεια) και επικουρικά, σε υπόστρωμα πλούσιο σε ιστιδίνη (HR άγαρ) (βλ. στη συνέχεια), υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες για την απώλεια του πλασμιδίου. Οι κλώνοι που υπέστησαν τη θερμική καταπόνηση,

ελέγχθηκαν στα δύο αυτά υποστρώματα για την παραγωγή σιδηροφόρου μορίου και για τη δυνατότητα σύνθεσης ισταμίνης, αντίστοιχα. Έλεγχος για την απώλεια του πλασμιδίου από τους κλώνους πραγματοποιήθηκε επίσης με την μέθοδο των Kado και Liu, που προαναφέρθηκε. Ο πρώτος κλώνος που διαπιστώθηκε ότι απώλεσε το πλασμιδίό του, ονομάστηκε Van731 και χρησιμοποιήθηκε στη δεύτερη και τρίτη πειραματική μόλυνση.

**Πίνακας 3: Αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών και ιχνηθετών που χρησιμοποιήθηκαν στις μοριακές τεχνικές.**

Εφαρμογή	Εκκινητής / ιχνηθέτης	αλληλουχία	Βιβλιογραφική αναφορά
Ταυτοποίηση Van	Van-ami 8	5' -ACATCATCCATTTGTTAC- 3'	Hong και συν. 2007
Ταυτοποίηση Van	Van-ami 417	5' -CCTTATCACTATCCAAATTG- 3'	Hong και συν. 2007
Παρουσία <i>angR</i>	AngR1	5' -GCTCAGTGACGACTTCTACC- 3'	Stork και συν. 2007
Παρουσία <i>angR</i>	AngR2	5' -CTTGCGGACTCAAGATCAAC- 3'	Stork και συν. 2007
Παρουσία <i>angH</i>	AngH1	5' -GTGGTGA CTGGCGAGAAGAG- 3'	Barancin και συν. 1998
Παρουσία <i>angH</i>	AngH2	5' -GTGTGCCACACTGCCCG- 3'	Barancin και συν. 1998
Ανίχνευση και ταυτοποίηση Van με FISH	VaV3	5' -TGATGCTGCTATTAACAACACCAC- 3' - Fluorescein	Martinez-Picado και συν. 1994
Ανίχνευση βακτηριδίων με FISH	Eub 338	CY3 - 5' -GCTGCCTCCCGTAGAAGT- 3'	Amann και συν. 1990

### Επιβεβαίωση της γενετικής τροποποίησης του στελέχους Van1

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η προκληθείσα στο Van1 γενετική τροποποίηση, ελέγχθηκε με PCR η παρουσία τριών γονιδίων στα στελέχη Van1 και Van731: α) Του γονιδίου *amiB*, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμοσωμικό DNA και είχε ήδη χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση του Van1. β) Του γονιδίου *angR*, που εντοπίζεται στο πλασμιδιακό DNA και, όπως προαναφέρθηκε, είναι μεταξύ άλλων θετικός ρυθμιστής για την παραγωγή του σιδηροφόρου μορίου *anguibactin* (Farrell και συν., 1990) και γ) του γονιδίου *angH*, το οποίο επίσης εντοπίζεται στο πλασμιδιακό DNA και ρυθμίζει την παραγωγή της δεκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης, που καταλύει την μετατροπή της ιστιδίνης σε ισταμίνη. Η τελευταία, όπως επίσης προαναφέρθηκε, υπεισέρχεται στο τελευταίο στάδιο σύνθεσης του *anguibactin* από τα βακτηρίδια. (Tolmasky και συν., 1995).

Χρησιμοποιήθηκε 1mL καθαρής καλλιέργειας σε TSBS των στελεχών Van1 και Van731. Η εκχύλιση του χρωμοσωμικού DNA των βακτηριδίων έγινε, όπως προαναφέρθηκε, με το Nucleospin Tissue Kit (Macherey – Nagel). Για την εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA των

βακτηριδίων χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρίας. Πλέον του ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο *amiB*, που έχουν αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών *angR1* και *angR2*, που ενισχύουν τμήμα μεγέθους 372bp του γονιδίου *angR* (Stork και συν. 2007), και *angH1* και *angH2*, που ενισχύουν τμήμα μεγέθους 899bp του γονιδίου *angH* (Barancin και συν. 1998). Αμφότερα τα γονίδια φέρονται να εμφανίζονται αποκλειστικά στο πλασμιδιακό DNA (Alice και συν., 2005). Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων των εκκινητών, που επιλέχθηκαν, εμφανίζονται επίσης στον Πίνακα 1. Η σύνθεση του μίγματος αντίδρασης, στο οποίο εφαρμόστηκε η PCR για το γονίδιο *angR* ήταν (για 50μL μίγματος): 5μL 10X PCR buffer με  $MgCl_2$ , 1μL dNTPs (10mM), 1μL *angR1* (10mM), 1μL *angR2* (10mM), 1μL DNA πολυμεράση (2u/μL), 4μL DNA και 37μL υπερκαθαρό νερό, ενώ για το γονίδιο *angH* ήταν (για 50μL μίγματος): 5μL 10X PCR buffer με  $MgCl_2$ , 1μL dNTPs (10mM), 1μL *angH1* (10mM), 1μL *angH2* (10mM), 2μL DNA πολυμεράση (2u/μL), 4μL DNA και 36μL υπερκαθαρό νερό. Οι παράμετροι λειτουργίας του θερμικού κυκλοποιητή για το τμήμα του γονιδίου *angR* ήταν: αποδιάταξη στους 95°C για 10min, 45 κύκλοι: στους 95°C για 45sec, 55°C για 1min, 72°C για 1min και ένα τελευταίο βήμα στους 72°C για 7min ενώ για το τμήμα του γονιδίου *angH* ήταν: αποδιάταξη στους 95°C για 10min, 34 κύκλοι: στους 94°C για 1min, 65°C για 1.5min, 72°C για 3min και ένα τελευταίο βήμα στους 72°C για 7min. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε TAE με τη διαδικασία που προαναφέρθηκε.

### **Έλεγχος σύνθεσης σιδηροφόρου μορίου από τα στελέχη Van1 και Van731**

Η δυνατότητα σύνθεσης σιδηροφόρου μορίου από τα στελέχη Van1 και Van731 ελέγχθηκε σε CAS (Chrome azurol S) άγαρ (blue agar) (Schwyn και Neilands. 1987 τροποποιημένη). Για την παρασκευή του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά υπερκαθαρό νερό (HPW) και το σύνολο του γυάλινου υλικού που χρησιμοποιήθηκε καθαρίστηκε με διάλυμα 6M HCl πριν τη χρήση του. Για την προετοιμασία 1 λίτρου CAS άγαρ, 60,5mg CAS (Fluka) διαλύθηκε σε 50mL HPW και αναμείχθηκε με 10mL διαλύματος τρισθενούς σιδήρου (1mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 10mM HCl). Το διάλυμα προστέθηκε αργά με ανάδευση σε 72,9mg HDTMA διαλυμένου σε 40mL HPW. Το συνολικό διάλυμα (σκούρου μπλε χρώματος) αποστειρώθηκε (121°C, 10min). Προετοιμάστηκε και αποστειρώθηκε επίσης, διάλυμα 100mL 10X M9 minimal salts, 15gr άγαρ, 30,24gr Pipes και 12gr 50%(w/w) διαλύματος NaOH (για να ανέβει το pH του  $pK_a$  του Pipes στο 6,8) σε 750mL HPW, στο οποίο, αφού αφέθηκε να κρυώσει στους 50°C, προστέθηκαν, επίσης αποστειρωμένα: 30mL διαλύματος casamino acids 10%, 10mL

διαλύματος γλυκόζης 20%, 1mL διαλύματος  $MgCl_2$  1mol/L, και 1mL διαλύματος  $CaCl_2$  0,1mol/L. Τελευταίο προστέθηκε αργά το αρχικό μπλέ διάλυμα και το άγαρ διανεμήθηκε σε τριβλία petri.

### **Έλεγχος παραγωγής ισταμίνης από τα στελέχη Van1 και Van731**

Η δυνατότητα παραγωγής ισταμίνης από τα δύο στελέχη ελέγχθηκε αρχικά με την καλλιέργειά τους σε ένα υπόστρωμα διαφοροποίησης, πλούσιο σε ιστιδίνη (HR άγαρ), για βακτηρίδια που παράγουν ή δεν παράγουν ισταμίνη. Η σύσταση του υποστρώματος (Niven και συν. 1981, Smith και συν., 1982 τροποποιημένη) είναι: L-ιστιδίνη 27gr/L, tryptone 5gr/L, yeast extract 5gr/L, NaCl 20gr/L,  $CaCO_3$  1gr/L, άγαρ 30gr/L, 10mL διαλύματος 0,6% bromocresol purple σε αιθανόλη 95%/L. Το pH ρυθμίζεται στο 5,25 πριν την αποστείρωση (121°C, 10min).

Η παραγωγή ισταμίνης από τα βακτηρίδια ελέγχθηκε στη συνέχεια με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Στην εξέταση χρησιμοποιήθηκαν 5mL καλλιέργειας εικοσιτεσσάρων ωρών σε TSBS με προσθήκη L-ιστιδίνης 1% από κάθε στέλεχος. Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των Hernandez-Jofer και συν. (1996). Ταυτόχρονα με την ισταμίνη στα δείγματα προσδιορίστηκε και η τυραμίνη, ως μάρτυρας για τη μέθοδο. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης αποτελούνταν από ένα σύστημα βαθμιαίας έκπλυσης (Shimadzu Co., Kuoto, Japan), βαλβίδα έγχυσης 20μl (Shimadzu Co., Kuoto, Japan), μία στήλη C18 (Supelco, Bellefonte, USA), κλίβανο για τη στήλη ρυθμισμένο στους 35°C (Shimadzu Co., Kuoto, Japan) και ένα φθορισμομετρικό ανιχνευτή (Shimadzu Co., Kuoto, Japan) ρυθμισμένο στα  $\lambda_x=340nm$  και  $\lambda_m=445nm$ . Ο διαχωρισμός των δύο αμινών πραγματοποιήθηκε σε στήλη C18. Ο προσδιορισμός των δύο ουσιών έγινε φθορισμομετρικά ύστερα από παραγωγοποίηση, μετά τη στήλη, με ορθοφθαλική διαλδεύδη (OPA). Η συσκευή παραγωγοποίησης μετά τη στήλη αποτελούνταν από δεύτερη αντλία (Shimadzu Co., Kuoto, Japan) και ένα αντιδραστήρα (Pickering Laboratories, Mountain View, LA, USA) ρυθμισμένο στους 35°C και συνδεδεμένο με τον ανιχνευτή φθορισμού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των δύο αμινών γινόταν με τη χρήση καμπυλών αναφοράς, οι οποίες κατασκευάστηκαν από διαλύματα αναφοράς γνωστής συγκέντρωσης. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το σύστημα Lcsolution (Release 1.22SP1, Shimadzu). Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια των εταιριών Sigma-Aldrich (Saint Luis), Merck και Alltech Ass. Inc.(Deerfield, IL).

### **Προετοιμασία των εναιωρημάτων των βακτηριδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές μολύνσεις**

Μία μεμονωμένη αποικία από το βακτηριδιακό στέλεχος, που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί σε πειραματική μόλυνση, ενοφθαλμιζόταν σε 10mL TSBS και επωαζόταν στους 23°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το εναιώρημα ενοφθαλμιζόταν σε μεγαλύτερο όγκο TSBS και μάλιστα τέτοιο, ώστε με την προσθήκη του στο λουτρό θαλασσινού νερού, στο οποίο θα εμβαπτιζόνταν τα ιχθύδια στην κάθε πειραματική μόλυνση, να επιτυγχάνεται η επιθυμητή τελική συγκέντρωση βακτηριδίων/mL λουτρού. Η επώαση της καλλιέργειας πραγματοποιούνταν στις ίδιες συνθήκες και η προσθήκη της στο λουτρό της εμβάπτισης γινόταν αμέσως μετά το τέλος του χρόνου επώασης. Από το τελικό εναιώρημα 1mL χρησιμοποιούνταν για να ελεγχθεί η καθαρότητα της καλλιέργειας και 1mL για να υπολογιστεί η συγκέντρωση των βακτηριδίων στο εναιώρημα με τη μέθοδο των υποδεκαπλάσιων αραιώσεων μόλις πριν την προσθήκη του στο λουτρό (Buller. 2004). Επιβεβαίωση της συγκέντρωσης των βακτηριδίων /mL λουτρού γινόταν και με δειγματοληψία απευθείας από το λουτρό και υπολογισμό τους με την ίδια μέθοδο.

### **Προπειραματικές μολύνσεις**

Κατά την πρώτη προπειραματική μόλυνση 20 ιχθύδια λαβρακιού βάρους 24-26g μοιράστηκαν σε τέσσερις δεξαμενές (Δ1 – Δ4) θαλασσινού νερού, χωρητικότητας 20L έκαστη. Οι δεξαμενές διέθεταν σύστημα αερισμού, καθώς και βιολογικό και μηχανικό φίλτρο. Η ανακύκλωση του νερού γινόταν με ρυθμό 0.3 m<sup>3</sup>/h, ενώ η ανανέωσή του έφθανε στο 50% ημερησίως. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού ήταν σταθερές (θερμοκρασία: T=22<sup>0</sup>C, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου: [O<sub>2</sub>]=6,3mg/L, pH=7,8, αλατότητα: S=0,039). Το νερό και η τροφή ελέγχθηκαν για την παρουσία βακτηριδίων του γένους *Vibrio*.

Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση. Τα ιχθύδια της κάθε δεξαμενής μεταφέρθηκαν κατ' αντιστοιχία και παρέμειναν για μία ώρα σε δοχεία (Δμ1 – Δμ4) χωρητικότητας 2L, στα οποία οι συγκεντρώσεις του στελέχους Van1 στο θαλασσινό νερό ήταν αντιστοίχως : Δμ1=5x10<sup>6</sup>CFU/mL, Δμ2=0CFU/mL, Δμ3=10<sup>7</sup>CFU/mL, Δμ4=2x10<sup>7</sup>CFU/mL. Στη συνέχεια επανατοποθετήθηκαν στις δεξαμενές τους. Η παρατήρηση διήρκεσε 21 ημέρες. Κατά το διάστημα αυτό τα νεκρά ιχθύδια ανά δεξαμενή ήταν: Δ1:1, Δ2:0, Δ3:2, Δ4:2.

Επαναλήφθηκε η πρώτη προπειραματική μόλυνση σε συνθήκες T=24<sup>0</sup> C, [O<sub>2</sub>]=6,2mg/L, pH=8, S=0,039 και μολύνουσες δόσεις Δμ1=3x10<sup>7</sup>CFU/mL, Δμ2=0CFU/mL, Δμ3=5x10<sup>7</sup>CFU/mL, Δμ4=7x10<sup>7</sup>CFU/mL. Τα νεκρά ιχθύδια ανά δεξαμενή ήταν: Δ1:2, Δ2:0,

Δ3:3, Δ4:3. Με την ολοκλήρωση της κάθε προπείραματικής μόλυνσης το σύνολο των ιχθυδίων που απέμεινε θυσιάστηκε.

Στην τρίτη προπείραματική μόλυνση 21 ιχθύδια λαβρακιού Μ.Σ.Β. 30gr τοποθετήθηκαν σε δεξαμενή θαλασσινού νερού χωρητικότητας 80L. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού ήταν σταθερές ( $T=18^{\circ}\text{C}$ ,  $[\text{O}_2]=6,8\text{mg/L}$ ,  $\text{pH}=8,2$ ,  $S=0,040$ ). Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε επίσης με εμβάπτιση. Τα ιχθύδια της δεξαμενής μεταφέρθηκαν και παρέμειναν για μία ώρα σε δοχείο των 5L, στο οποίο η συγκέντρωση του παραπάνω στελέχους στο θαλασσινό νερό ήταν  $5 \times 10^7$  CFU /mL. Στη συνέχεια επανατοποθετήθηκαν στη δεξαμενή τους. Διενεργήθηκαν 7 δειγματοληψίες (3 ιχθύδια / χρονικό σημείο) σε χρόνους 2, 8, 16, 24, 32, 40 και 48 ώρες μετά την μόλυνση.

### **Νεκροψία – Νεκροτομή των ιχθυδίων**

Στα νεκρά και θυσιασμένα ιχθύδια πραγματοποιήθηκε νεκροψία και νεκροτομή.

Κατά τη νεκροψία εκτιμήθηκε το σχήμα και μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ιχθυδίων. Εκτιμήθηκαν επίσης ο χρωματισμός του δέρματος, η παρουσία ή μη δερματικών αλλοιώσεων και η κατάσταση του κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού.

Η νεκροτομή διενεργήθηκε με το κάθε ιχθύδιο σε δεξιά κατάκλιση. Αρχικά γινόταν διάνοιξη της κοιλιακής του κοιλότητας με τομή από την έδρα και κεφαλικά αφενός και από την έδρα λοξώς και άνω κατά μήκος του οπισθίου και άνω ορίου της κοιλιακής κοιλότητας αφετέρου, προκειμένου να αφαιρεθεί το αριστερό πλάγιο κοιλιακό τοίχωμα και να επιτευχθεί πρόσβαση στα όργανα που φιλοξενούνται στην κοιλιακή κοιλότητα. Ακολούθως αφαιρούταν το αριστερό βραγχιακό κάλυμμα και διανοιγόταν η κρανιακή κοιλότητα. Τέλος δύο παράλληλες μεταξύ τους εγκάρσιες τομές διενεργούνταν στη ραχιαία επιφάνεια του ιχθυδίου, οπισθίως της βάσης του ραχιαίου πτερυγίου για τον έλεγχο των γραμμωτών μυών της περιοχής. Μετά την μακροσκοπική παρατήρηση των εσωτερικών οργάνων του ιχθυδίου λαμβάνονταν δείγματα για μικροβιολογικές, μοριακές και ιστοπαθολογικές εξετάσεις.

### **Μικροβιολογικές εξετάσεις ιχθύων**

Αμέσως μετά τη διάνοιξη της κοιλιακής κοιλότητας και πριν την ολοκλήρωση της νεκροτομής λαμβανόταν από κάθε ιχθύδιο, άσηπτα, ιστοτεμάχιο πρόνεφρου προκειμένου να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί το βακτηριδιακό στέλεχος, που χρησιμοποιήθηκε στην πείραματική μόλυνση. Τα ιστοτεμάχια επώζονταν σε TSBS στους  $23^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες. Στη

συνέχεια γινόταν σπορά με επίστρωση σε TSAS και επώαση για επιπλέον 24 ώρες, προκειμένου να ελεγχθεί η μορφολογία και η ομοιομορφία των αποικιών. Τέλος επιλεγμένες αποικίες επωάζονταν σε TCBS στους 23°C για 48 ώρες. Μετά την απομόνωση του βακτηριδιακού στελέχους πραγματοποιούταν ταυτοποίησή του με το βιοχημικό και μοριακό σχήμα που προαναφέρθηκε. Πρέπει να τονισθεί ότι επιτυχής θεωρούταν η μόλυνση μόνο στην περίπτωση κατά την οποία η προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης κατέληγε σε καθαρή καλλιέργεια του, προς αναζήτηση, στελέχους. Η απομόνωση και η ταυτοποίηση του *Vibrio anguillarum* από τα μολυσμένα νεκρά ιχθύδια ήταν επιτυχής.

### **Μοριακές εξετάσεις ιχθύων**

Ταυτόχρονα με τη λήψη ιστοτεμαχίου από τον πρόνεφρο για τη διενέργεια μικροβιολογικών εξετάσεων πραγματοποιούταν και άσηπτη λήψη έτερου ιστομεταχίου από το ίδιο όργανο, το οποίο τοποθετούταν σε αποστειρωμένο πλαστικό φιαλίδιο των 1,5mL και καταψυχόταν στους -20°C προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανίχνευση και ταυτοποίηση του βακτηριδιακού στελέχους απ' ευθείας από τον ιστό με τη μέθοδο της PCR. Η εκχύλιση του ολικού DNA (DNA ιχθύος και DNA βακτηριδίου) στα δείγματα που ελήφθησαν πραγματοποιήθηκε και πάλι με τη χρήση του Nucleospin Tissue Kit (Macherey – Nagel). Η περαιτέρω διαδικασία ήταν όμοια με αυτή, που προαναφέρθηκε κατά την περιγραφή της μοριακής ταυτοποίησης του Van1.

### **Ιστοπαθολογικές εξετάσεις ιχθύων**

Μετά το τέλος της νεκροψίας, νεκροτομής και λήψης δειγμάτων για μικροβιολογικές και μοριακές εξετάσεις, το κάθε ιχθύδιο (νεκρό, ετοιμοθάνατο ή ζωντανό που θυσιάστηκε) που μετείχε στις πειραματικές μολύνσεις, τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα αλατούχου φορμόλης για 24 ώρες προκειμένου να μονιμοποιηθεί σε βαθμό τέτοιο, που να επιτρέπεται η εκτομή ιστών και οργάνων, χωρίς την πρόκληση βλαβών εξαιτίας χειρισμών. Στη συνέχεια, λαμβάνονταν για ιστοπαθολογικές εξετάσεις οι εξής ιστοί, όργανα ή τμήματα οργάνων : εγκέφαλος, βράγχια (2<sup>ο</sup> και 4<sup>ο</sup> αριστερό βραγχιακό τόξο), τμήμα αριστερού νεφρού (κεφαλικός και σωματικός νεφρός), τμήμα νηκτικής κύστης, δέρμα και οι υποκείμενες μυϊκές στιβάδες γραμμωτών μυών (στο ύψος της συνέχειας των εγκάρσιων τομών, που είχαν πραγματοποιηθεί στη ραχιαία επιφάνεια του ιχθυδίου), καρδιά, τμήμα ήπατος, σπλήνας, πάγκρεας, στόμαχος, έντερο (πρόσθια και οπίσθια μοίρα) και η περιοχή της έδρας (με δύο εγκάρσιες τομές εκατέρωθεν της έδρας). Το σύνολο των

ιστών και των οργάνων μονιμοποιούταν μετά την εκτομή τους για επιπλέον 24 ώρες. Ακολουθούσε αφυδάτωση σε υδατικά διαλύματα αλκοολών, διαύγαση με ξυλόλη, και εμπότιση των ιστών με υγρή παραφίνη σε συσκευή Histokinette, και στη συνέχεια έγκλεισή τους σε κύβους παραφίνης. Από τους κύβους λήφθηκαν τουλάχιστον 3, κατά περίπτωση, μη συνεχόμενες τομές πάχους 4μm σε μικροτόμο (MICROM HM315). Η μικροσκόπηση των ιστολογικών τομών πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο κοινού φωτισμού (Nikon) έπειτα από χρώση τους με τη μέθοδο της αιματοξυλίνης – εωσίνης (H-E) (Bancroft και Gamble. 2002, Prophet και συν. 1992, “Manual” 1960).

### **Πρώτη πειραματική μόλυνση – Μελέτη κινητικής του Van1**

Συνολικά 90 ιχθύδια λαβρακιού βάρους 13-15g διανεμήθηκαν (30 ιχθύδια/ δεξαμενή) σε 3 δεξαμενές θαλασσινού νερού (A1, A2, A3) χωρητικότητας 80L έκαστη. Οι δεξαμενές διέθεταν σύστημα αερισμού, βιολογικό και μηχανικό φίλτρο. Η ανακύκλωση του νερού γινόταν με ρυθμό 0.3 m<sup>3</sup>/h ενώ η ανανέωσή του έφθανε στο 50% ημερησίως. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού ήταν σταθερές (T=13,5<sup>0</sup> C ± 0,5<sup>0</sup> C, S=0,041).

Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε στα ιχθύδια των δεξαμενών A1 και A2 με εμβάπτιση. Τα ιχθύδια των δύο αυτών ομάδων μεταφέρθηκαν και παρέμειναν αντίστοιχα για μία ώρα σε δεξαμενές A1μ και A2μ χωρητικότητας 15L, στις οποίες η συγκέντρωση του στελέχους Van1 στο θαλασσινό νερό ήταν 5x10<sup>7</sup> βακτηρίδια/mL. Η ομάδα των μαρτύρων υπέστη απλώς τη μεταφορά σε ανάλογη δεξαμενή A3μ, απουσία βακτηριδίων. Στη συνέχεια τα ιχθύδια επανατοποθετήθηκαν στις αρχικές δεξαμενές τους.

Διενεργήθηκαν 10 δειγματοληψίες (3 ιχθύδια/ δεξαμενή) σε χρόνους 2, 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 62 και 72 ώρες μετά την μόλυνση. Ως χρόνος μηδέν θεωρήθηκε ο χρόνος έναρξης της διαδικασίας μόλυνσης.

Το σύνολο των διαδικασιών και εξετάσεων, που διενεργήθηκαν μετά τη θανάτωση των ιχθυδίων, σε κάθε δειγματοληψία, περιγράφηκε παραπάνω.

### **Φθορίζων *in situ* υβριδισμός**

Για την ανίχνευση και ταυτόχρονη ταυτοποίηση των βακτηριδίων στις ιστολογικές τομές παραφίνης εφαρμόστηκε η τεχνική του φθορίζοντος υβριδισμού *in situ* (FISH) (Bancroft και Gamble. 2002). Ένα 24-μερές ολιγονουκλεοτίδιο, το VaV3, που εντοπίζεται στις θέσεις 477 έως 454 του 16S rRNA, επιλέχθηκε ως ειδικός για το *V. anguillarum* ιχθυήτης (Martinez-Picado και



συν. 1994). Ο VaV3 παρασκευάστηκε (VBC – Genomics, Austria) έτσι, ώστε να φέρει στο 3' άκρο του το φθορίζον μόριο φλουορεσεΐνη. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο Eub 338, φέρει στο 5' άκρο αντιστοίχως το μόριο CY3 και επισημαίνει μία μεγάλη σειρά κοινών βακτηριδιακών γενών (Amann και συν. 1990). Η αλληλουχία νουκλεοτιδίων των ιχνηθετών VaV3 και Eub 338, που χρησιμοποιήθηκαν, καταγράφονται στον Πίνακα 1.

Πριν την εφαρμογή της μεθόδου σε ιστολογικές τομές, η λειτουργικότητα των ιχνηθετών δοκιμάστηκε σε καθαρές καλλιέργειες βακτηριδίων (*V. anguillarum* και *V. alginolyticus* από την Greek Aquaculture Bank, Εργαστήριο Ιχθυολογίας, Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ.). Από κάθε καλλιέργεια 1,5mL φυγοκεντρήθηκε στα 8000rpm για 2min και απορρίφθηκε η υπερκείμενη υδατική φάση. Η διαδικασία επαναλείφθηκε τρεις φορές. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1mL Phosphate-Buffered Saline (PBS) και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου. Η έκπλυση επαναλήφθηκε επίσης τρεις φορές. Τέλος, προστέθηκε 1mL διαλύματος παραφορμαλδεΐδης (PFA) 4% για την μονιμοποίηση των βακτηριδιακών κυττάρων, τα οποία και αποθηκεύθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  (Buller. 2004). Από κάθε μονιμοποιημένα σε PFA βακτηρίδια 10μL ενσταλάχθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα η οποία, αφού στέγνωσε στον αέρα, εκπλύθηκε δύο φορές σε PBS για 5min και πέρασε από σειρά διαλυμάτων αιθανόλης ( $50^{\circ}$ ,  $70^{\circ}$ ,  $95^{\circ}$ , για 3min στο καθένα) προκειμένου να αφυδατωθούν και να σταθεροποιηθούν τα βακτηριδιακά κύτταρα. Στη συνέχεια οι πλάκες καλύφθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού (HB), προθερμασμένο στους  $74,5^{\circ}\text{C}$ , για 5min, και με τεμάχιο parafilm για να ελαχιστοποιηθεί η εξάτμιση. Η σύνθεση του HB ήταν: 0,9M NaCl, 100mM Tris-HCl, 0,1% SDS, pH 7,2, με την προσθήκη ενός ή και των δύο από τους ιχνηθέτες VaV3 ή Eub338. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σκοτεινό θάλαμο στους  $48^{\circ}\text{C}$  για 4h. Ακολούθως, οι πλάκες εκπλύθηκαν προσεκτικά με HPW, στη συνέχεια με προθερμασμένο ρυθμιστικό διάλυμα WB1 (0,9M NaCl, 100mM Tris-HCl, 0,01% SDS (pH:7,2)) σε κλειστό σκοτεινό θάλαμο στους  $48^{\circ}\text{C}$  για 10min και τέλος με επίσης προθερμασμένο διάλυμα WB2 (0,9M NaCl, 100mM Tris-HCl, (pH:7,2)) σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5min. Οι πλάκες αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα, καλύφθηκαν με γλυκερόλη 95% και καλυπτρίδα και αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό περιέκτη.

Το πρωτόκολλο, που εφαρμόστηκε στις ιστολογικές τομές, περιελάμβανε αποπαραφίνωση με ξυλόλη, ενυδάτωση τους σε διαλύματα αλκοόλης  $100^{\circ}$  και  $95^{\circ}$  και ξήρανση στον αέρα. Η περαιτέρω διαδικασία είναι αυτή που περιγράφηκε για τα βακτηριδιακά κύτταρα, με μόνη διαφορά ότι οι τομές αφυδατώθηκαν με αιθανόλη  $95^{\circ}$  πριν την κάλυψη τους με γλυκερόλη και καλυπτρίδα.

### **Δεύτερη πειραματική μόλυνση – Μελέτη θνησιμότητας από τα Van1 και Van731**

Στη διαδικασία περιλήφθηκαν τρεις πειραματικές ομάδες ιχθυδίων. Η πρώτη ομάδα (P+) μολύνθηκε με το φυσικό στέλεχος Van1. Η δεύτερη ομάδα (P-) μολύνθηκε με το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος Van731. Η τρίτη πειραματική ομάδα (M) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Συνολικά 240 ιχθύδια λαβρακιού βάρους 12,5-14,5g διανεμήθηκαν τυχαία σε 12 δεξαμενές (B1-B12) θαλασσινού νερού χωρητικότητας 80L (20 ιχθύδια/ δεξαμενή). Οι δεξαμενές διέθεταν σύστημα αερισμού, βιολογικό και μηχανικό φίλτρο. Η ανακύκλωση του νερού γινόταν με ρυθμό 0.3 m<sup>3</sup>/h, ενώ η ανανέωσή του έφθανε στο 50% ημερησίως. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού ήταν σταθερές (T=13<sup>0</sup> C ± 0,5<sup>0</sup> C, S=0,041). Την ομάδα P+ αποτέλεσαν τα ιχθύδια των δεξαμενών B1-B4, την P- τα ιχθύδια των δεξαμενών B5-B8 και την ομάδα M τα ιχθύδια των υπολοίπων τεσσάρων δεξαμενών (B9-B12). Η μόλυνση των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε και πάλι με εμβάπτιση. Τα ιχθύδια από κάθε δεξαμενή, μεταφέρθηκαν και παρέμειναν αντίστοιχα, για μία ώρα, σε δεξαμενές (B1μ-B4μ για την P+, B5μ-B8μ για την P- και B9μ-B12μ για την M) χωρητικότητας 15L, στις οποίες η συγκέντρωση των παθογόνων στελεχών Van1 και Van731, για τις ομάδες P+ και P- αντίστοιχα, υπολογίστηκε στα 5x10<sup>7</sup> βακτηρίδια/mL. Μετά το πέρας της πειραματικής μόλυνσης, τα ιχθύδια επανατοποθετήθηκαν στις αρχικές τους δεξαμενές. Η πειραματική διαδικασία διήρκεσε 20 ημέρες, κατά τη διάρκεια των οποίων πραγματοποιούταν κλινική παρατήρηση των πειραματόζων, και συλλογή και καταγραφή των νεκρών ιχθυδίων. Στο σύνολο των νεκρών ιχθυδίων πραγματοποιήθηκαν εξετάσεις για την απομόνωση και ταυτοποίηση του, κατά περίπτωση, παθογόνου στελέχους (Van1 ή Van731) και ιστοπαθολογικές εξετάσεις με τις τεχνικές και μεθόδους που προαναφέρθηκαν.

### **Τρίτη πειραματική μόλυνση – Παθολογοανατομική μελέτη της Δονακίωσης από Van1 και Van731**

Στην τρίτη πειραματική μόλυνση, ομοίως με τη δεύτερη μόλυνση, περιλήφθηκαν επίσης τρεις πειραματικές ομάδες. Η ομάδα P+, η οποία μολύνθηκε με το Van1, η ομάδα P-, η οποία μολύνθηκε με το Van731, και η ομάδα M που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι ομάδες P+ και P- αποτελούνταν από 80 ιχθύδια έκαστη, μοιρασμένα σε τέσσερις δεξαμενές χωρητικότητας 80L (Γ1- Γ4 και Γ5-Γ8, αντίστοιχα) με θαλασσινό νερό (20 ιχθύδια/ δεξαμενή). Η ομάδα M αποτελούνταν από 60 ιχθύδια μοιρασμένα σε δύο δεξαμενές (Γ9 και Γ10) (30 ιχθύδια/ δεξαμενή). Οι δεξαμενές διέθεταν σύστημα αερισμού, βιολογικό και μηχανικό φίλτρο. Η

ανακύκλωση του νερού γινόταν με ρυθμό  $0.3 \text{ m}^3/\text{h}$ , ενώ η ανανέωσή του έφθανε στο 50% ημερησίως. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του νερού ήταν σταθερές ( $T=13^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ,  $S=0,041$ ). Το βάρος των ιχθυδίων ήταν 13,2-15,2g.

Η πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση. Τα ιχθύδια από κάθε δεξαμενή μεταφέρθηκαν και παρέμειναν αντίστοιχα για μία ώρα σε δεξαμενές (Γ1μ-Γ4μ, Γ5μ-Γ8μ και Γ9μ-Γ10μ) χωρητικότητας 15L, στις οποίες η συγκέντρωση των παθογόνων στελεχών Van1 και Van731, για τις ομάδες P+ και P- αντίστοιχα, υπολογίστηκε στα  $5 \times 10^7$  βακτηρίδια/mL. Μετά το πέρας της πειραματικής μόλυνσης, τα ιχθύδια επανατοποθετήθηκαν στις αρχικές τους δεξαμενές.

Πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες στις ημέρες 1η, 2η, 3η, 4η, 6η, 9η και 14η από την ημέρα της μόλυνσης. Σε αυτές θυσιάζονταν δύο ιχθύδια από κάθε δεξαμενή των ομάδων P+ και P-, και τέσσερα ιχθύδια από κάθε δεξαμενή της ομάδας M (οκτώ ιχθύδια από κάθε ομάδα/δειγματοληψία). Κατά τη δειγματοληψία θυσιάζονταν με σειρά τα ετοιμοθάνατα ιχθύδια, ιχθύδια με κλινικά συμπτώματα νόσου και ιχθύδια κλινικώς υγιή μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου αριθμού ιχθυδίων για έκαστη δειγματοληψία. Επίσης συλλέγονταν τα νεκρά ιχθύδια ανεξαρτήτως χρόνου.

Στο σύνολο των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκε νεκροψία και νεκροτομή και εφαρμόστηκε των σύνολο των μικροβιολογικών, μοριακών και ιστοπαθολογικών εξετάσεων που έχουν ήδη περιγραφεί.

### **Ειδικές ιστοχημικές χρώσεις**

Πέραν της χρώσεως ρουτίνας με H-E, η οποία εφαρμόστηκε στο σύνολο των ιστολογικών τομών που λήφθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι χρώσεις: α) Gram (Brown και Hopps. 1973, τροποποίηση Prophet και συν. 1992) στο σύνολο των τομών της πρώτης πειραματικής μόλυνσης και σε επιλεγμένες τομές των έτερων δύο μολύνσεων προκειμένου να διευκολυνθεί η παρατήρηση των θέσεων εντόπισης των βακτηριδίων και η συσχέτισή τους με τις αρχόμενες αλλοιώσεις των ιστών. β) Perls' Prussian blue (Bancroft και Gamble. 2002) σε ιστολογικές τομές του σπλήνα και του πρόνεφρου των ιχθυδίων της τρίτης πειραματικής μόλυνσης για να εκτιμηθεί ο βαθμός εναπόθεσης αιμοσιδηρίνης στα μελανομακροφάγα κέντρα αυτών των οργάνων.

### Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πειραματικών μολύνσεων πραγματοποιήθηκε ως εξής:

#### α) Δεύτερη πειραματική μόλυνση – Μελέτη θνησιμότητας

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της θνησιμότητας που σημειώθηκε στις ομάδες P+ και P- χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες βιωσιμότητας της Kaplan-Meier (Kaplan και Meier, 1958). Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η  $\chi^2$  κατανομή. Η σημαντικότητα της διαφοράς μεταξύ των ομάδων ελέγχθηκε με τις δοκιμές Log-Rank και Wilcoxon.

#### β) Τρίτη πειραματική μόλυνση – Παθολογοανατομική μελέτη

Για την ανάλυση της βαθμολόγησης των μακροσκοπικών αλλοιώσεων του δέρματος, και των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που εκτιμήθηκαν στα διάφορα όργανα και το σύνολο του κάθε οργάνου, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA), με παράγοντες το χρόνο, τη μεταχείριση και την αλληλεπίδρασή τους (Steel και Torrie, 1980).

Όλα τα αποτελέσματα αφορούν μέσους όρους της υπό εξέταση παραμέτρου/ δειγματοληψία/ ομάδα. Όλοι οι έλεγχοι έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $P \leq 0,05$ ), εκτός των περιπτώσεων που δηλώνεται διαφορετικά. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο JMP & SAS inc. (Sall και συν. 2007).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Καλλιέργειες, μικροβιολογικές – βιοχημικές δοκιμές

Η ανάπτυξη των Van1 και Van731 ήταν άριστη στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Στο TSAS σχημάτισαν τις λείες, υπόλευκες αποικίες που χαρακτηρίζουν το *V. anguillarum*, ενώ στο TCBS υποκίτρινες λείες αποικίες χαρακτηριστικές του γένους *Vibrio*. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών-βιοχημικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν στα δύο στελέχη είναι ταυτόσημα και καταγράφονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4: Αποτελέσματα μικροβιολογικών-βιοχημικών δοκιμών των στελεχών Van1 και Van731**

<b>Gram</b>	-	<b>ADH</b>	+	<b>IND</b>	+-	<b>RHA</b>	-
<b>Οξειδάση</b>	+	<b>LDC</b>	-	<b>VP</b>	+-	<b>SAC</b>	+
<b>Καταλάση</b>	+	<b>ODC</b>	-	<b>GEL</b>	+	<b>MEL</b>	-
<b>OF</b>	+/+	<b>CIT</b>	+	<b>GLU</b>	+	<b>AMY</b>	-
<b>Κινητικότητα</b>	+	<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	<b>MAN</b>	+	<b>ARA</b>	-
<b>0/129</b>	+	<b>URE</b>	-	<b>INO</b>	-	<b>NO<sub>2</sub></b>	+
<b>ONPG</b>	+	<b>TDA</b>	+-	<b>SOR</b>	+		

+: Θετική δοκιμή, -: Αρνητική δοκιμή

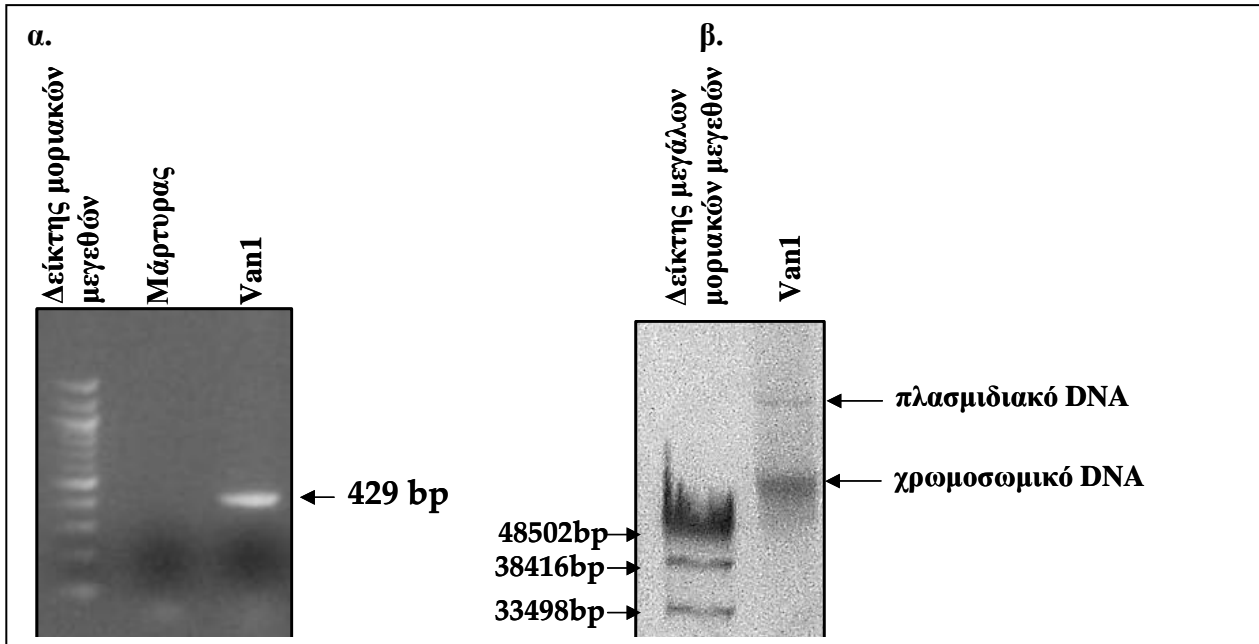
### Μοριακή ταυτοποίηση του Van1

Η ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR που πραγματοποιήθηκε στο χρωμοσωμικό DNA του Van1 με τη χρήση των εκκινητών van-am1 8 και van-am1 417 παρουσιάζεται στην εικόνα 2α. Το τμήμα μεγέθους 429bp που εμφανίζεται, ταυτοποιεί το στέλεχος Van1 ως *V. anguillarum*.

### Έλεγχος παρουσίας πλασμιδίου στο Van1

Η ηλεκτροφόρηση του εκχυλίσματος του πλασμιδιακού DNA του Van1 παρουσιάζεται στην εικόνα 2β. Το τμήμα μεγέθους 67kbp που εμφανίζεται, αντιστοιχεί σε πλασμίδιο που αποδεικνύεται ότι διαθέτει το Van1 και το οποίο ονομάσαμε pKTP. Το pKTP είναι όμοιο σε

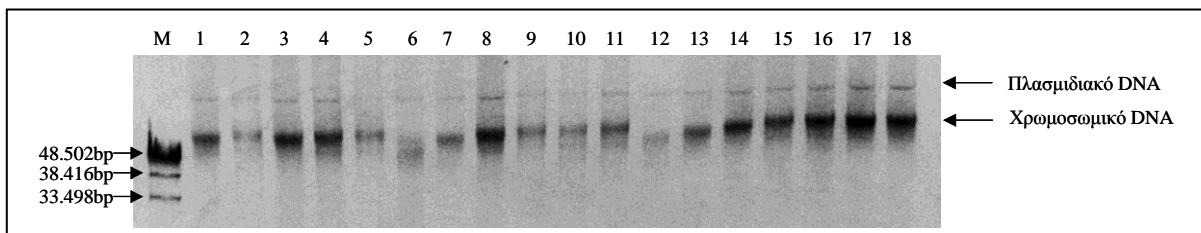
μέγεθος με το pJM1, του οποίου η παρουσία διαπιστώθηκε στο πρωτότυπο στέλεχος *V. anguillarum* 775 (ATCC).



Εικόνα 2: α. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντος PCR εκχυλίσματος DNA για τη διαπίστωση της παρουσίας του γονιδίου *ami-B*. Στήλη 1: Δείκτης μοριακών μεγεθών, Στήλη 2: Αρνητικός μάρτυρας, Στήλη 3: *Van1*, β. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης εκχυλίσματος πλασμιδιακού DNA του *Van1*. Παρουσία πλασμιδίου μεγέθους 67kbp που ονομάσαμε pKTP. Στήλη 1: Δείκτης μεγάλων μοριακών μεγεθών, Στήλη 2: Εκχύλισμα πλασμιδιακού DNA του *Van1*.

### Αφαίρεση του πλασμιδίου του *Van1* – Δημιουργία του *Van731*

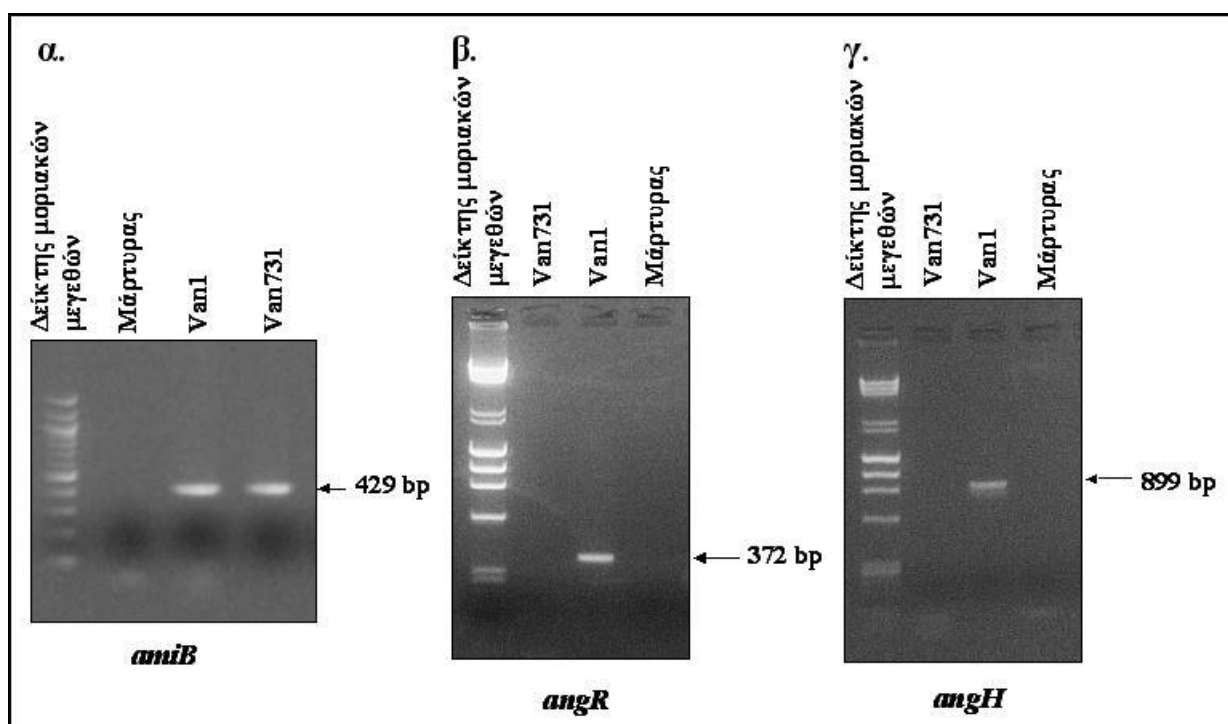
Το ποσοστό της γενετικής τροποποίησης στους κλώνους του *Van1* από τη θερμική καταπόνηση υπερέβη το 10% (δεδομένα δεν εμφανίζονται). Η χρήση του CAS agar, ως δείκτη απώλειας του πλασμιδίου από τους κλώνους, ήταν επιτυχής. Κλώνοι που απώλεσαν το pKTP δεν είχαν τη δυνατότητα να προσλάβουν το σίδηρο του υποστρώματος γεγονός που θα οδηγούσε σε μεταβολή του pH και αλλαγή του χρώματος του δείκτη σε κίτρινο. Αντίθετα η χρήση του υποστρώματος HR κρίθηκε ανεπιτυχής λόγω ψευδών θετικών αντιδράσεων.



Εικόνα 3: Διερεύνηση κλώνων του *V. anguillarum* (1-18) για την παρουσία του πλασμιδίου pKTP μετά από υποβολή σε εκλεκτική πίεση. M = Δείκτες μοριακών μεγεθών DNA.

### Επιβεβαίωση της γενετικής τροποποίησης του στελέχους Van1

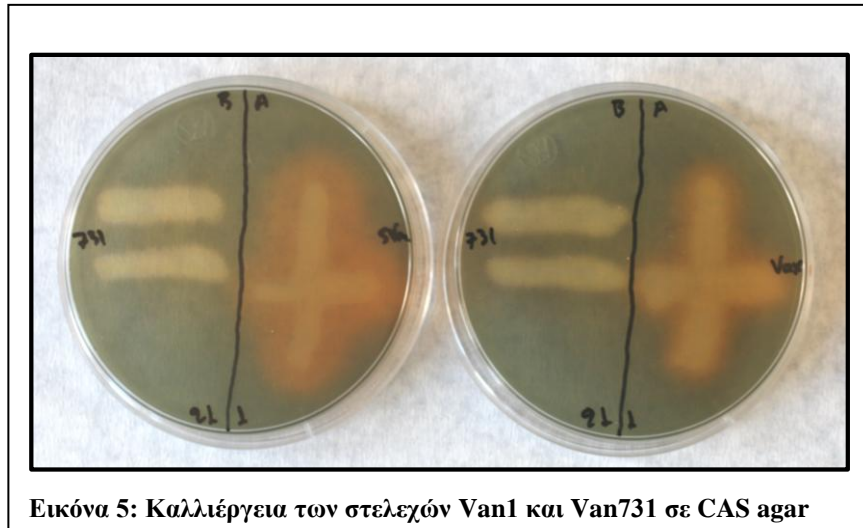
Οι ηλεκτροφορήσεις των προϊόντων των τριών PCRs που εφαρμόστηκαν στα εκχυλίσματα χρωμοσωμικού ή πλασμιδιακού, κατά περίπτωση, DNA των στελεχών Van1 και Van731, για τη διαπίστωση της παρουσίας των γονιδίων *amiB*, *angR* και *angH* παρουσιάζονται στις εικόνες 4α, 4β και 4γ. Η απουσία των χαρακτηριστικών τμημάτων μεγέθους 372bp για το *angR* και 899bp για το *angH* αποδεικνύει τη μη ικανότητα του στελέχους Van731 να συνθέσει σιδηροφόρο μόριο. Η PCR για το γονίδιο *amiB*, ταυτοποιεί το Van731 ως *V. anguillarum*.



Εικόνα 4: α. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης προϊόντος PCR εκχυλίσματος DNA για τη διαπίστωση της παρουσίας του γονιδίου *amiB*. Στήλη 1: Δείκτης μοριακών μεγεθών, Στήλη 2: Αρνητικός μάρτυρας, Στήλη 3: Van1, Στήλη 4: Van731. β και γ. Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή αγαρόζης εκχυλίσματος πλασμιδιακού DNA των Van1 και Van731. Παρουσία τμημάτων μεγέθους 899bp και 372bp αποδεικνύει την παρουσία των γονιδίων *angH* και *angR* αντίστοιχα. Στήλη 1: Δείκτης μοριακών μεγεθών, Στήλη 2: Εκχύλισμα πλασμιδιακού DNA του Van1, Στήλη 3: Εκχύλισμα πλασμιδιακού DNA του Van731, Στήλη 4: Αρνητικός μάρτυρας

### Έλεγχος παραγωγής σιδηροφόρου μορίου από τα στελέχη Van1 και Van731

Η δυνατότητα σύνθεσης σιδηροφόρου μορίου από τα στελέχη Van1 και Van731 ελέγχθηκε σε CAS άγαρ (Εικόνα 5). Η πορτοκαλόχρους άλως που εμφανίζεται γύρω από την περιοχή ανάπτυξης του Van1 στο υπόστρωμα υποδηλώνει την απελευθέρωση ισχυρού σιδηροδεσμευτικού μορίου από το βακτηρίδιο στο υπόστρωμα. Το μόριο αυτό αποσπά τα ίχνη σιδήρου που εμπεριέχονται στο υπόστρωμα, δεσμευμένα στο σύμπλεγμα CAS-Fe<sup>+</sup>. Η απουσία άλω κατά την ανάπτυξη του Van731 καταδεικνύει την αδυναμία του στελέχους να συνθέσει σιδηροφόρο μόριο.

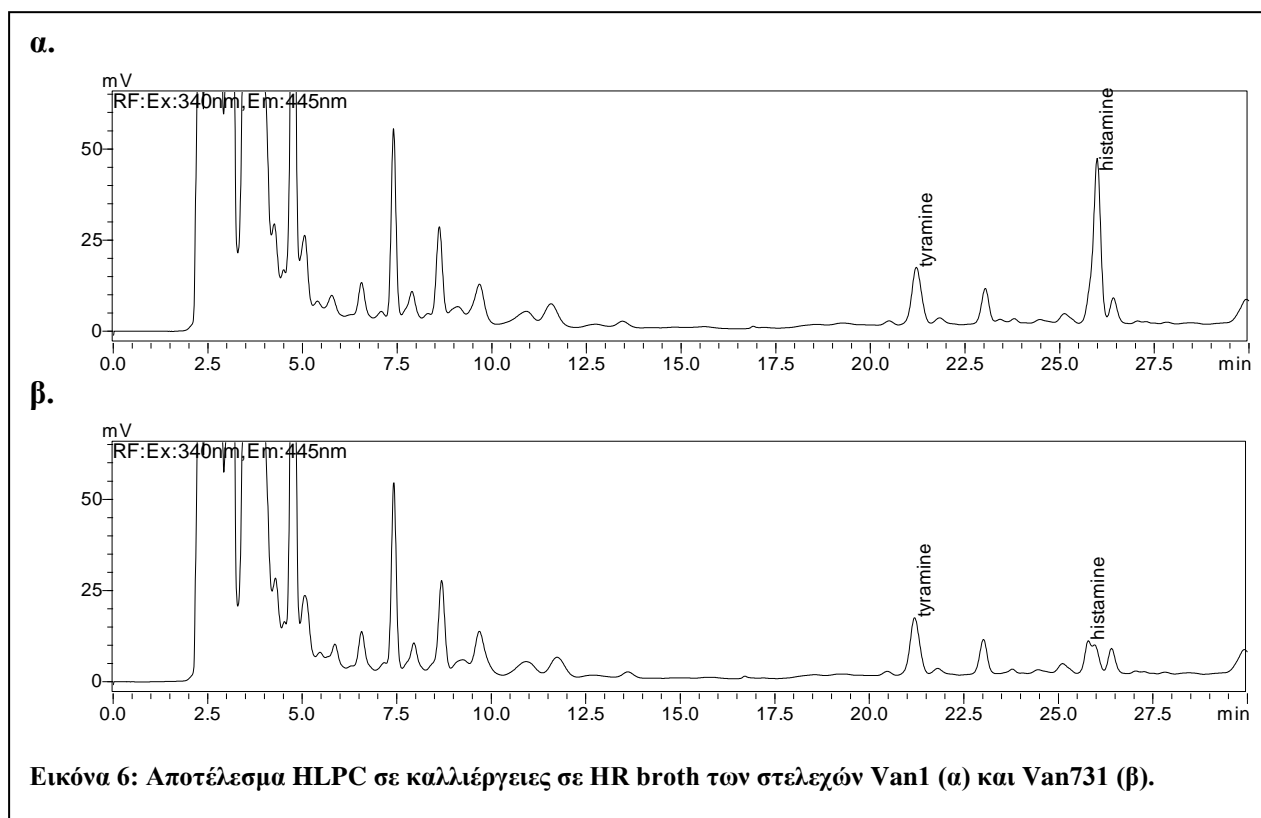


Εικόνα 5: Καλλιέργεια των στελεχών Van1 και Van731 σε CAS agar



### Έλεγχος παραγωγής ισταμίνης από τα στελέχη Van1 και Van731

Το αποτέλεσμα της εφαρμογής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης φαίνεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Αποτέλεσμα HPLC σε καλλιέργειες σε HR broth των στελεχών Van1 (α) και Van731 (β).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της τυραμίνης και της ισταμίνης στις καλλιέργειες των στελεχών, που ελέγχθηκαν, έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού της τυραμίνης και της ισταμίνης που παράχθηκαν σε καλλιέργειες των στελεχών Van1 και Van731

Εξεταζόμενο δείγμα	Τυραμίνη (μg/ml καλλιέργειας)	Ισταμίνη (μg/ml καλλιέργειας)
Th - Van731: 1 <sup>η</sup> έγχυση	9,53	2,76 (< όριο ανίχνευσης)
Th - Van731: 2 <sup>η</sup> έγχυση	9,91	3,05 (< όριο ανίχνευσης)
Th - Van1 : 1 <sup>η</sup> έγχυση	9,95	19,84

### **Κλινικές παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των πειραματισμών**

Η πρώτη κλινική ένδειξη νόσου για τα ιχθύδια ήταν η μεταβολή του χρωματισμού του δέρματός τους, το οποίο από αργυρόχροο λαμπερό γινόταν σκουρόχρωμο και θαμπό κυρίως στη ραχιαία επιφάνεια του σώματός τους. Τα ασθενή ιχθύδια εμφάνιζαν μειωμένη κινητικότητα, κολυμπώντας αργά στην επιφάνεια ή στον πυθμένα των δεξαμενών. Η απώλεια ισορροπίας και η ανικανότητα στήριξης ήταν τα τελευταία στάδια πριν τα ιχθύδια καταλήξουν. Ελάχιστα από αυτά εμφάνισαν απώλεια προσανατολισμού χωρίς περαιτέρω νευρικά συμπτώματα. Υπερκινητικότητα, καταναγκαστικές-επαναλαμβανόμενες κυκλικές κινήσεις και αταξία παρουσίασαν ορισμένα ιχθύδια στις προπειραματικές μολύνσεις. Πρέπει να σημειωθεί, ότι ορισμένα άτομα κατέληξαν αιφνίδια, χωρίς καμία προηγούμενη κλινική ένδειξη. Τέλος, η αναστολή λήψης τροφής από τα ιχθύδια στους κύριους πειραματισμούς παρατηρήθηκε και στην ομάδα των μαρτύρων, αποδίδεται στη χαμηλή θερμοκρασία του νερού των δεξαμενών και δεν αξιολογείται ως κλινικό σύμπτωμα στη συγκεκριμένη μελέτη.

Το σύνολο των δερματικών αλλοιώσεων, οι οποίες αποτέλεσαν και το κύριο κλινικό σημείο της νόσου, περιγράφονται στις μακροσκοπικές παρατηρήσεις κατά τη νεκροψία των πειραματόζωων.

### **Μελέτη κινητικής του Van1**

Τα αποτελέσματα της μελέτης της κινητικής του Van1 καταγράφονται στον Πίνακα 6. Πρέπει να σημειωθεί ότι με τον όρο έδρα περιγράφεται περιοχή που περιλαμβάνει τμήμα δέρματος της περιπρωκτικής χώρας και το τελικό τμήμα του απευθυσμένου. Η περιοχή εξετάστηκε χωριστά ως πιθανή πύλη εισόδου του βακτηριδίου.

**Πίνακας 6: Αποτελέσματα μελέτης της κινητικής του στελεχούς Van1**

Η-Ω	P+/M	Δ	ΔΕΡΜΑ	ΒΡΑΓΧΙΑ	ΕΔΡΑ	ΗΠΙΑΡ	ΣΠΛΗΝΑΣ	ΝΕΦΡΟΣ	ΚΑΡΔΙΑ	ΕΝΤΕΡΟ	Η-Ω	P+/M	Δ	ΔΕΡΜΑ	ΒΡΑΓΧΙΑ	ΕΔΡΑ	ΗΠΙΑΡ	ΣΠΛΗΝΑΣ	ΝΕΦΡΟΣ	ΚΑΡΔΙΑ	ΕΝΤΕΡΟ
1-2	P+	1	+	+	+	-	-	-	-	-	2-36	P+	1	++	+	++	+	++	+	++	-
1-2	P+	1	+	-	+	-	-	-	-	-	2-36	P+	1	+	+	-	-	+	+	+	+
1-2	P+	1	-	+	+	-	-	-	-	-	2-36	P+	1	-	+	+	+	+	++	++	+
1-2	P+	2	+	+	-	-	-	-	-	-	2-36	P+	2	++	-	+	+	-	-	+	-
1-2	P+	2	+	+	+	-	-	-	-	-	2-36	P+	2	+	-	+	+	++	++	-	+
1-2	P+	2	+	-	-	-	-	-	-	-	2-36	P+	2	++	+	+	-	++	+	-	+
1-2	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2-36	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2-36	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-2	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2-36	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4	P+	1	-	-	+	-	-	-	-	-	2-44	P+	1	+	+	-	+	-	++	-	+
1-4	P+	1	+	+	+	-	-	-	-	-	2-44	P+	1	+	+	++	-	+	++	++	+
1-4	P+	1	+	+	+	-	-	-	-	-	2-44	P+	1	++	++	+	+	++	+	+	-
1-4	P+	2	+	-	+	-	-	-	-	-	2-44	P+	2	++	+	++	+	++	+	+	-
1-4	P+	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2-44	P+	2	+	-	++	-	-	+	+	-
1-4	P+	2	+	+	-	-	-	-	-	-	2-44	P+	2	++	+	+	+	++	+++	++	+
1-4	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2-44	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2-44	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	2-44	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-12	P+	1	+	-	+	-	-	-	-	-	3-52	P+	1	++	+	++	+	++	+	+	++
1-12	P+	1	++	+	+	-	-	-	-	+	3-52	P+	1	+	-	+	+	+	+	-	+
1-12	P+	1	+	-	-	-	-	-	-	-	3-52	P+	1	++	+	+	-	++	++	++	+
1-12	P+	2	+	-	+	-	-	-	-	-	3-52	P+	2	-	-	+	-	+	-	-	-
1-12	P+	2	-	+	+	-	+	-	-	-	3-52	P+	2	+	++	-	+	+	+	+	-
1-12	P+	2	+	+	-	-	-	-	-	-	3-52	P+	2	++	+	+	+	++	+	+	-
1-12	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-52	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-12	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-52	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-12	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-52	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-20	P+	1	+	+	+	-	+	-	-	-	3-62	P+	1	++	+	+	+	++	+	+	+
1-20	P+	1	++	+	+	-	+	-	-	+	3-62	P+	1	+	-	-	+	++	-	+	-
1-20	P+	1	++	-	-	-	+	-	+	+	3-62	P+	1	++	+	-	+	+	++	+	-
1-20	P+	2	+	-	+	-	-	-	+	-	3-62	P+	2	++	+	+	+	++	++	++	+
1-20	P+	2	++	+	+	-	+	+	-	-	3-62	P+	2	+++	+	++	++	+	++	+	-
1-20	P+	2	+	-	-	-	+	-	-	-	3-62	P+	2	+	+	++	++	++	+	++	++
1-20	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-62	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-20	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-62	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
1-20	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-62	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
2-28	P+	1	+	-	+	-	+	+	-	+	3-72	P+	1	++	+	++	+	++	+	+	+
2-28	P+	1	+	+	++	-	-	-	+	-	3-72	P+	1	+	-	++	-	+	+	+	-
2-28	P+	1	++	+	+	-	++	+	+	+	3-72	P+	1	+++	+	+	++	++	++	+	++
2-28	P+	2	++	+	+	+	+	-	-	-	3-72	P+	2	+++	++	+	+	+++	+++	++	+
2-28	P+	2	++	+	+	-	+	+	+	+	3-72	P+	2	++	+	++	++	++	+	++	+
2-28	P+	2	++	-	+	+	+	+	+	-	3-72	P+	2	+++	++	++	+	+++	+++	+	++
2-28	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-72	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
2-28	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-72	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-
2-28	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3-72	M	3	-	-	-	-	-	-	-	-

+: παρουσία μικρού αριθμού βακτηριδίων με/ ή χωρίς αρχόμενες ιστολογικές αλλοιώσεις, ++: παρουσία αθροισμάτων βακτηριδίων με ταυτόχρονη παρουσία ιστολογικών αλλοιώσεων, +++: παρουσία σημαντικού αριθμού βακτηριδίων, σε αθροίσματα ή διάσπαρτα σε όλη την έκταση του ιστού ή/ και εντός αγγείων της περιοχής. Η/Ω: ημέρα/ ώρα, P+/M: ιχθύδιο που μολύνθηκε με το Van1/ ιχθύδιο μάρτυρας, Δ: δεξαμενή

### Θνησιμότητα που προκλήθηκε από τα Van1 και Van731

Ο αριθμός των νεκρών ιχθυδίων, όπως αυτός καταγράφηκε ανά ημέρα, σε κάθε δεξαμενή της δεύτερης πειραματικής μόλυνσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.

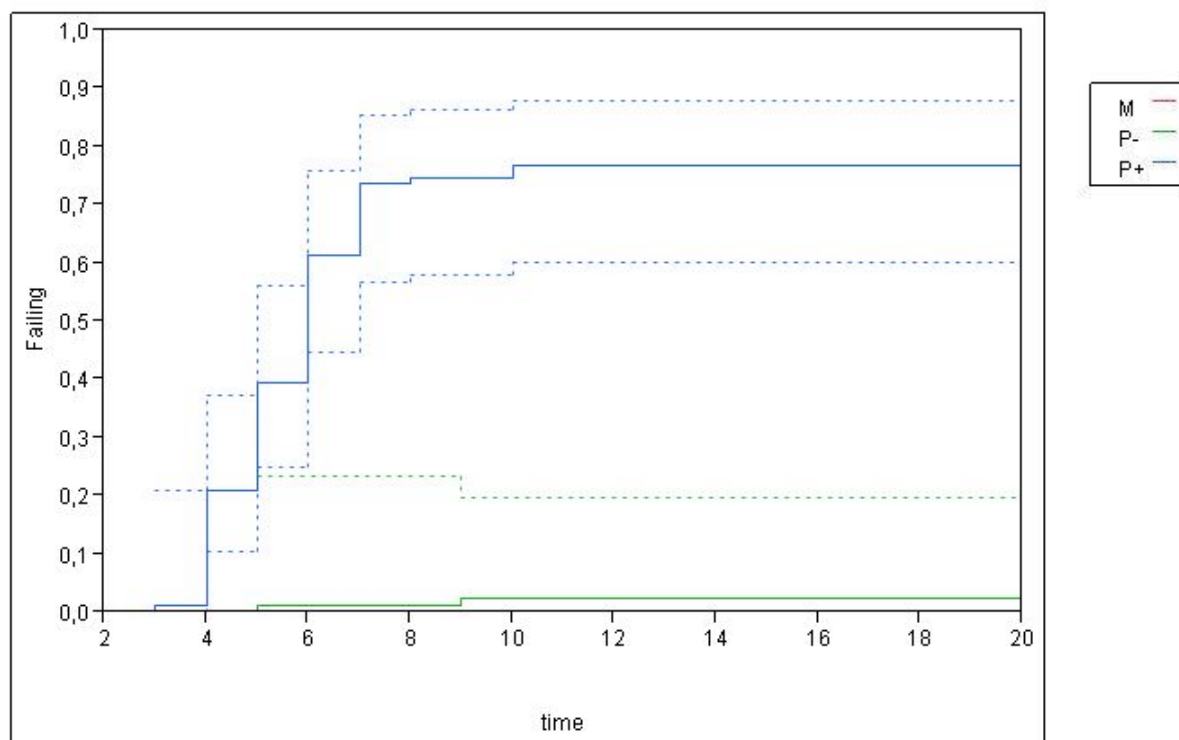
**Πίνακας 7: Τα νεκρά ιχθύδια των ομάδων P+, P- και M, ανά ημέρα κατά τη μελέτη της θνησιμότητας.**

ΟΜΑΔΑ		3η ΗΜ	4η ΗΜ	5η ΗΜ	6η ΗΜ	7η ΗΜ	8η ΗΜ	9η ΗΜ	10η ΗΜ
P+	B1	0	3	7	9	1	0	0	0
	B2	0	1	4	3	5	1	0	2
	B3	1	7	2	7	2	0	0	0
	B4	0	7	4	1	3	0	0	0
P-	B5	0	0	0	0	0	0	0	0
	B6	0	0	0	0	0	0	0	0
	B7	0	0	1	0	0	0	0	0
	B8	0	0	0	0	0	0	1	0
M	B9	0	0	0	0	0	0	0	0
	B10	0	0	0	0	0	0	0	0
	B11	0	0	0	0	0	0	0	0
	B12	0	0	0	0	0	0	0	0

Η μέση θνησιμότητα υπολογίστηκε στο 87,5% για την ομάδα P+ και 2,5% για την ομάδα P- . Οι θάνατοι στα ιχθύδια της ομάδας P+ σημειώθηκαν από την τρίτη έως την δέκατη ημέρα , στο σύνολο των είκοσι ημερών, που διήρκεσε η πειραματική μόλυνση. Οι δύο θάνατοι στα ιχθύδια της ομάδας P- σημειώθηκαν την πέμπτη και ένατη ημέρα. Τα στελέχη Van1 και Van731 απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς από το σύνολο των νεκρών ιχθυδίων των ομάδων P+ και P- αντίστοιχα.

Για την περιγραφή των αποτελεσμάτων της θνησιμότητας που σημειώθηκε στις ομάδες P+ και P- χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες βιωσιμότητας των Kaplan Meier. Ο έλεγχος έγινε σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ( $P < 0,05$ ). Το αποτέλεσμα παρουσιάζεται στο Γράφημα 1:

**Γράφημα 1: Οι καμπύλες θνησιμότητας Kaplan – Meier που παρήχθησαν από τα αποτελέσματα της δεύτερης πειραματικής μόλυνσης.**



### Παρατηρήσεις κατά τη νεκροψία και νεκροτομή των πειραματόζωων

Μετά τη θανάτωση των ιχθυδίων που λαμβάνονταν σε κάθε δειγματοληψία ή την περισυλλογή νεκρών κατά τη διάρκεια των πειραματισμών, καταγραφόταν το σωματικό τους βάρος. Στα δεδομένα του κάθε πειραματισμού, καταγράφεται το εύρος των σωματικών βαρών των ιχθυδίων που μετείχαν σε αυτόν. Στο σύνολο των ιχθυδίων δεν παρατηρήθηκαν ανωμαλίες στην διάπλαση και την ανάπτυξή τους. Δεν παρατηρήθηκαν επίσης, ενδείξεις κανιβαλισμού. Σε ελάχιστα άτομα, που μολύνθηκαν με το στέλεχος Van1, παρατηρήθηκε θόλωση του κερατοειδούς χιτώνα του οφθαλμού, κυρίως ετερόπλευρη. Σε ορισμένα ιχθύδια της ίδιας ομάδας τα βράγχια ήταν συμφορημένα και σπανίως ωχρά έως αποχρωματισμένα. Σταθερό εύρημα στα νεκρά ιχθύδια, που μολύνθηκαν με το φυσικό στέλεχος, ήταν η ανοικτή στοματική κοιλότητα, ενώ τα βραγχιακά καλύμματα ήταν σε υπερέκταση.

Οι αλλοιώσεις του δέρματος των ιχθυδίων, που μολύνθηκαν με το Van1, ποίκιλαν σε είδος, σε έκταση και ένταση. Πέραν του σκούρου χρωματισμού που προαναφέρθηκε, στα αρχικά στάδια της νόσου διαπιστώθηκαν μικρές εστίες απολέπισης στις πλάγιες επιφάνειες των ιχθύων, κυρίως στην περιοχή πλησίον και εκατέρωθεν της πλάγιας γραμμής, από το ύψος του ραχιαίου

περυγίου και έως το τέλος αυτής. Στις εστίες αυτές διαπιστώθηκαν μικροαιμορραγίες, ορατές μακροσκοπικά. Με την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε εστιακή απώλεια της επιδερμίδας και παρουσία αβαθών ελκών, ο αριθμός και η έκταση των οποίων ποίκιλαν. Σε πλέον προχωρημένο στάδιο τα έλκη εμβάθυναν και αποκαλύπτονταν μακροσκοπικά οι υποκείμενες του δέρματος, μυϊκές στιβάδες.

Έτερη δερματική αλλοίωση ήταν η παρουσία εστιακών ερυθρών κηλίδων. Οι συνήθεις θέσεις εντόπισης ήταν στην βάση των πλευρικών και λιγότερο του ουραίου, κοιλιακών και ραχιαίων περυγίων. Εντοπίστηκαν επίσης στο κεφάλι, κυρίως στην περιοχή γύρω από τη στοματική κοιλότητα, καθώς και στην περιοχή της έδρας είτε εστιακά είτε, σπανιότερα, σχεδόν σε όλη την κοιλιακή επιφάνεια των ιχθυδίων.

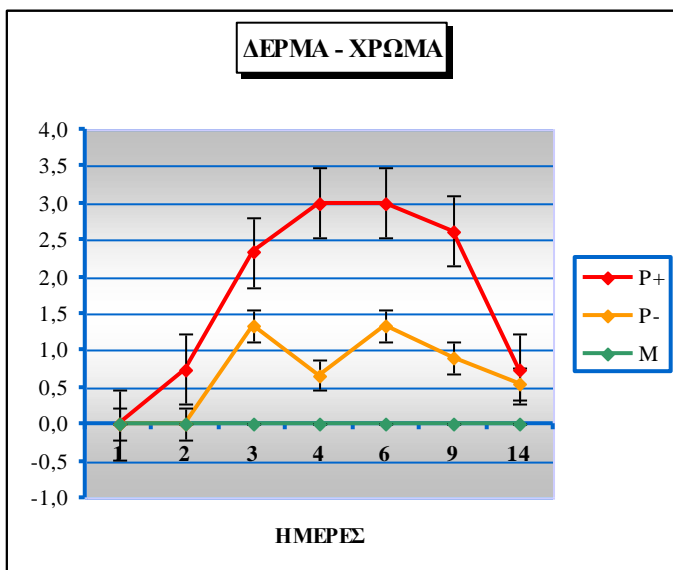
Οι δερματικές αλλοιώσεις των ιχθυδίων των ομάδων P+ και P- της τρίτης πειραματικής μόλυνσης εκτιμήθηκαν κλινικά και βαθμολογήθηκαν ως εξής:

Μεταβολή του χρώματος του δέρματος: 0 ή 3

Ερύθημα: 0 – 3

Έλκη κορμού: 0 ή 2-6 (βάθος 1-3, έκταση 1-3)

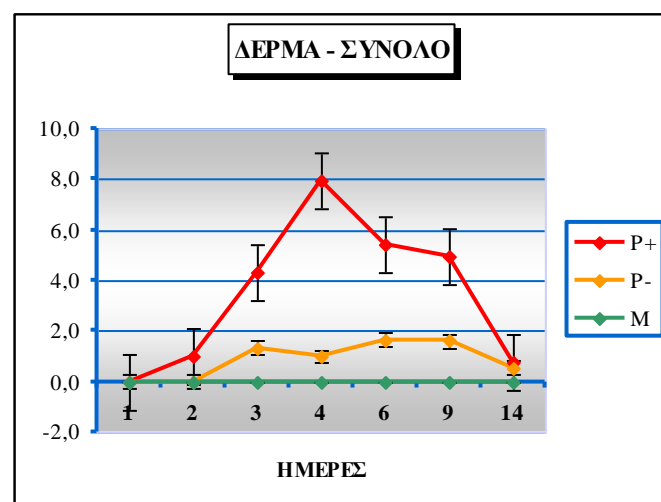
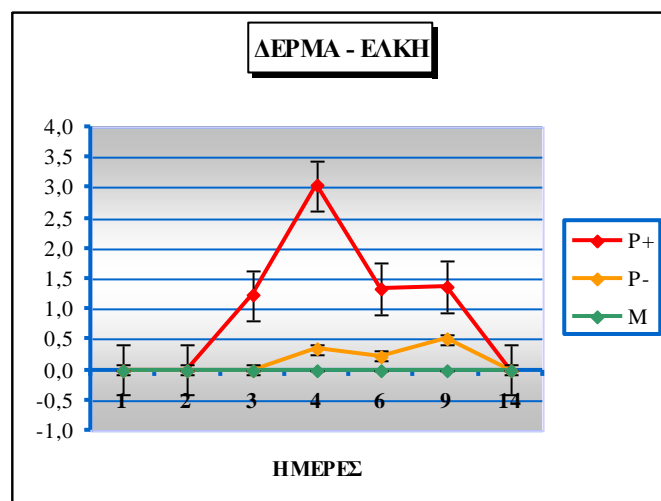
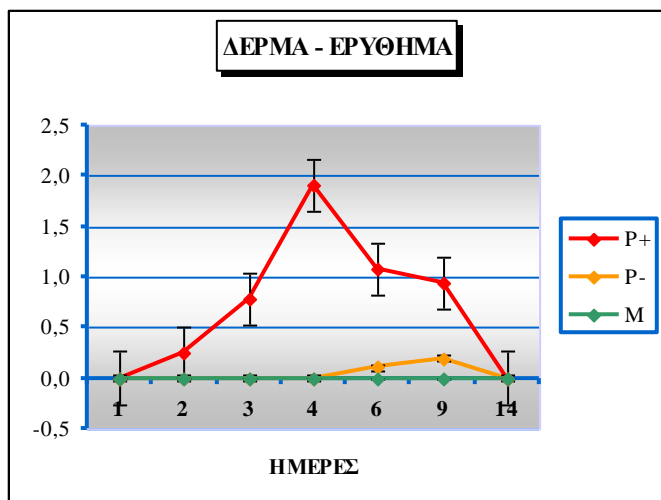
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της βαθμολόγησης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν στο δέρμα και του συνόλου αυτών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 2, 3, 4, 5 και τους αντίστοιχους Πίνακες 8, 9, 10, 11.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	e	cde	b	a	a	ab	cde
<b>P-</b>	e	e	c	cde	c	cd	de
<b>M</b>	e	e	e	e	e	e	e

**Πίνακας 8:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 2:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	c	c	b	a	b	b	c
<b>P-</b>	c	c	c	c	c	c	c
<b>M</b>	c	c	c	c	c	c	c

**Πίνακας 9:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 3:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	d	d	bc	a	b	b	d
<b>P-</b>	d	d	d	d	d	cd	d
<b>M</b>	d	d	d	d	d	d	d

**Πίνακας 10:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 4:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	d	cd	b	a	b	b	cd
<b>P-</b>	d	d	cd	cd	c	c	cd
<b>M</b>	d	d	d	d	d	d	d

**Πίνακας 11:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 5:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

Κατά τη νεκροτομή των ιχθυδίων διαπιστώθηκαν μακροσκοπικά οι ακόλουθες αλλοιώσεις.

Σε ορισμένα από τα ιχθύδια, που μολύνθηκαν με το Van1, σημειώθηκαν εκτεταμένες πετέχειες στην περιτοναϊκή κοιλότητα.

Ο σπλήνας σε αρκετές περιπτώσεις ήταν διογκωμένος, με αποστρογγυλεμένα χείλη, στα ιχθύδια και των δύο ομάδων (P+ και P-), ενώ σε ορισμένα άτομα της P+ ήταν συμφορημένος και εύθρυπτος. Οι αλλοιώσεις στο σπλήνα επιτείνονταν με την πάροδο του χρόνου από τη στιγμή της μόλυνσης.

Το ήπαρ ήταν περισσότερο ή λιγότερο αποχρωματισμένο, σε ορισμένες περιπτώσεις εύθρυπτο και σπάνια σε άτομα της P+, με πετέχειες. Σε εγκάρσια τομή καταδεικνυόταν ότι ο αποχρωματισμός αφορούσε κυρίως την εξωτερική επιφάνεια των ηπατικών λοβών.

Ο στόμαχος σπανίως εμφάνιζε διάταση, ενώ το έντερο ήταν, σε ορισμένα ιχθύδια και των δύο ομάδων, διατεταμένο κυρίως στο πρόσθιο τμήμα του και στο απευθυσμένο. Στην περίπτωση αυτή περιείχε υδαρές υποκίτρινο περιεχόμενο και υπόλευκα νημάτια ορατά μακροσκοπικά, διαμέσου του διαυγούς, λόγω της διάτασης, εντερικού τοιχώματος, πριν ακόμη από τη διάνοιξή του.

Η καρδιά εμφανίστηκε ωχρή στα ιχθύδια που μολύνθηκαν από το φυσικό στέλεχος Van1 και σε σπάνιες περιπτώσεις με ερυθρά στίγματα (πετέχειες) στο περικάρδιο. Με την αύξηση του χρόνου από το πέρας της πειραματικής μόλυνσης η σύσταση της καρδιάς γινόταν λιγότερο συνεκτική, τα χείλη της ασαφέστερα, το σχήμα κυρίως της κοιλίας εμφανιζόταν πιο πεπλατυσμένο και η καρδιά στο σύνολό της αποστρογγυλεμένη.

Σε ορισμένα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων η νηκτική κύστη εμφανίστηκε θολερή και κατά περίπτωση πεπαχυμένη.

Τέλος σε ορισμένα ιχθύδια ο κεφαλικός νεφρός ήταν διογκωμένος, συμφορημένος και εύθρυπτος και ο σωματικός νεφρός συμφορημένος, κυρίως σε αυτά της ομάδας P+. Η μακροσκοπική εικόνα των εσωτερικών οργάνων των ιχθυδίων της ομάδας P+ που επιβίωσαν της μόλυνσης, όσο και αυτών της P-, βελτιώθηκε συνολικά, προσεγγίζοντας τη φυσιολογική, κατά το τέλος της πειραματικής παρατήρησης.



## Ιστολογικές παρατηρήσεις με τη χρήση μικροσκοπίου κοινού φωτισμού

### Καρδιά

Οίδημα, ήπια φλεγμονή και περιστασιακά συμφόρηση χαρακτήρισαν την ιστολογική εικόνα της καρδιάς των μολυνθέντων ιχθυδίων. Πιο συγκεκριμένα, στον κόλπο σημειώθηκε υπενδοκάρδιο οίδημα, οίδημα των μυϊκών ινών των δοκίδων του κόλπου και υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων του, που έβαινε αυξανόμενη με την πάροδο του χρόνου. Τα υπερπλαστικά ενδοθηλιακά κύτταρα αποχωρίζονταν από τη βασική μεμβράνη, ενώ μακροφάγα εμφανίζονταν πλέον, σε αυξημένους αριθμούς στην κοιλότητα του κόλπου. Παρουσία λεμφοκυττάρων σημειώθηκε από την πέμπτη ημέρα μετά την μόλυνση στα ιχθύδια της ομάδας P- και σε αυτά της P+ που επιβίωσαν της μόλυνσης.

Το μυοκάρδιο της κοιλίας εμφάνισε διαφόρου βαθμού οίδημα των μυϊκών ινών και περιστασιακά ήπια διάχυτη μυοκαρδίτιδα, συμφόρηση κατά εστίες και μικροθρομβώσεις.

Στον αρτηριακό βολβό παρατηρήθηκε διαφόρου βαθμού οίδημα των ελαστικών και μυϊκών ινών και οξεία ενδοκαρδίτιδα χαρακτηριζόμενη από την παρουσία πολυάριθμων ετερόφιλων κυττάρων.

Τέλος το επικάρδιο εμφανίστηκε οίδηματώδες κατά θέσεις και ιδίως στο τμήμα που επαλείφει τον αρτηριακό βολβό.

Αγγειοδιαστολή, υπεραιμία και αιμορραγίες παρατηρήθηκαν περιστασιακά στο περικάρδιο. Στην ομάδα P- διαπιστώθηκαν επίσης εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης πέριξ των αγγείων του περικαρδίου, όπως επίσης και μακροφάγα πλήρη αιμοσιδηρίνης στις ίδιες θέσεις.

Τα ιστολογικά ευρήματα της καρδιάς ήταν παρόμοια και στις δύο ομάδες ιχθυδίων ,ήταν ωστόσο ηπιότερα και βραδέως εμφανιζόμενα στα ιχθύδια της ομάδας P-.

Διάχυτη παρουσία βακτηριδίων διαπιστώθηκε στο επικάρδιο και ενδοκάρδιο και των τριών τμημάτων της καρδιάς και στο χαλαρό συνδετικό ιστό πλησίον της καρδιάς.

Για την πληρέστερη παρουσίαση των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν στην καρδιά των ιχθυδίων το όργανο βαθμολογήθηκε βάσει των ακόλουθων παραμέτρων:

Εμφάνιση και εντόπιση οιδήματος: 0-6

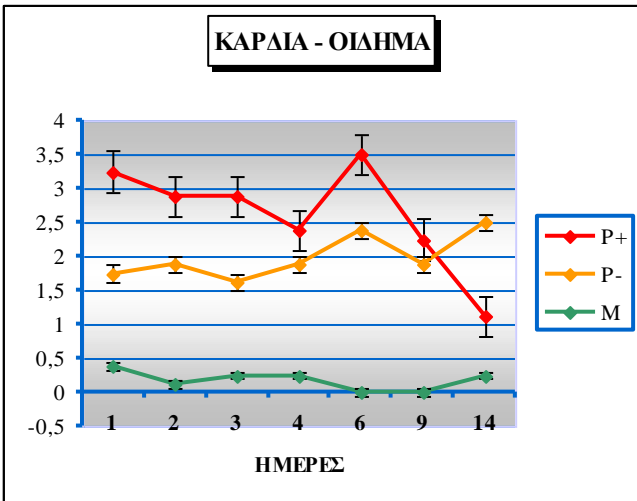
Παρουσία και έκταση υπεραιμίας: 0-6

Παρουσία και έκταση αιμορραγίας: 0-6

Παρουσία και ένταση φλεγμονής: 0-6

Παρουσία, είδος και έκταση νεκρώσεων: 0-6

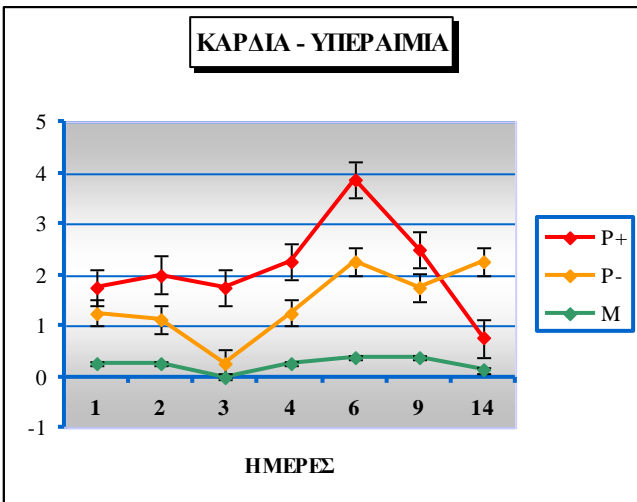
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της βαθμολόγησης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν στην καρδιά και του συνόλου αυτών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 6, 7, 8, 9, 10, 11 και τους αντίστοιχους Πίνακες 12, 13, 14, 15, 16, 17.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	ab	ab	ab	abcd	a	abcde	bcde
P-	abcde	abcde	abcde	abcde	abcd	abcde	abc
M	cde	de	cde	cde	e	e	cde

**Πίνακας 12:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

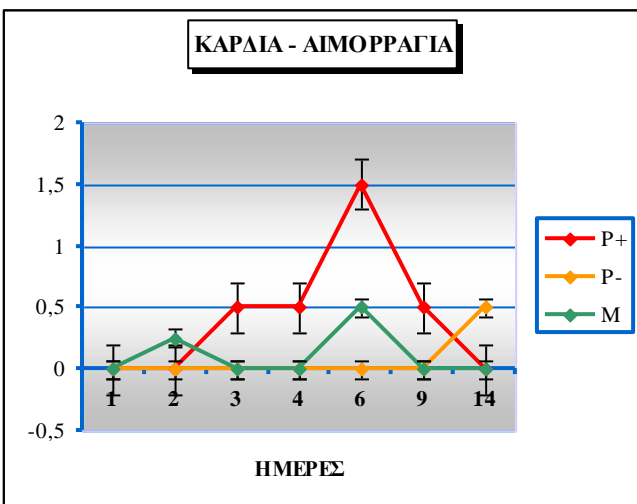
**Γράφημα 6:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	abcd	abcd	abcd	abc	a	ab	bcd
P-	bcd	bcd	cd	bcd	abc	abcd	abc
M	cd	cd	d	cd	bcd	bcd	cd

**Πίνακας 13:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

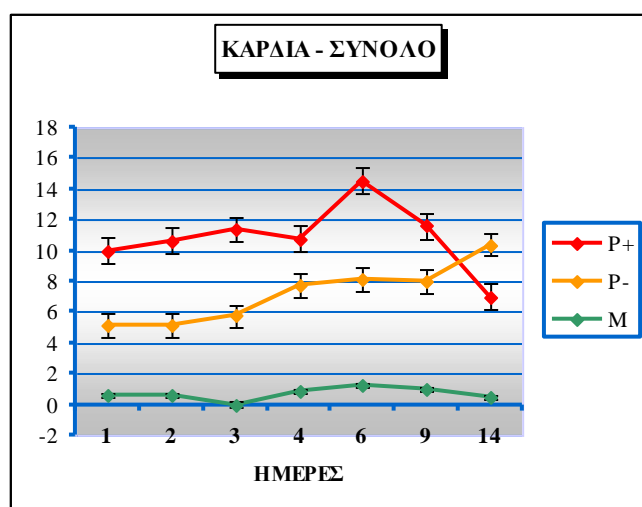
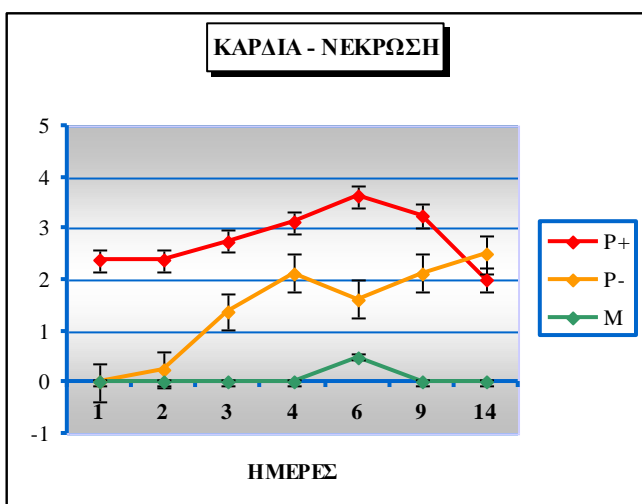
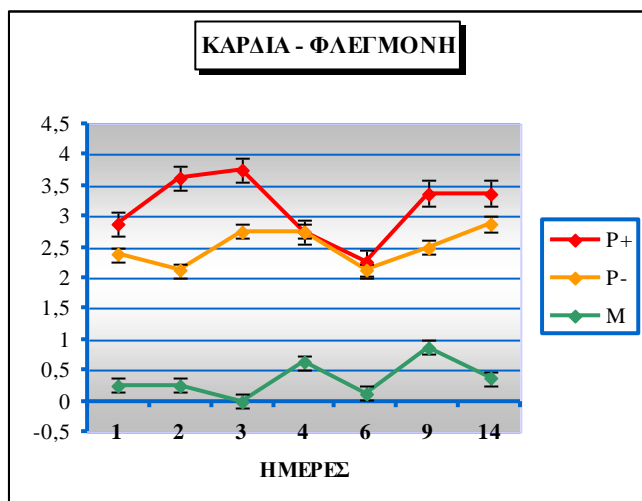
**Γράφημα 7:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	b	b	b	b	a	b	b
P-	b	b	b	b	b	b	b
M	b	b	b	b	b	b	b

**Πίνακας 14:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 8:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	abc	a	a	abcd	abcde	ab	ab
P-	abcde	abcde	abcd	abcd	abcde	abcde	abc
M	cde	cde	e	cde	de	bcde	cde

**Πίνακας 15:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 9:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
P+	abc	abc	abc	abc	a	ab	abcde
P-	f	ef	cdef	abcd	bcdef	abcd	abc
M	f	f	f	f	def	f	f

**Πίνακας 16:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 10:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
P+	ab	ab	ab	ab	a	ab	abc
P-	bc	bc	bc	abc	abc	abc	ab
M	c	c	c	c	c	c	c

**Πίνακας 17:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 11:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## Σπλήνας

Η ιστολογική εξέταση του σπλήνα κατέδειξε κυκλοφορικές διαταραχές, φλεγμονώδεις και κυτταρικές αλλοιώσεις. Πιο συγκεκριμένα, από το πρώτο μόλις εικοσιτετράωρο μετά τη μόλυνση, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των ελλειψοειδών αγγείων, είτε εξοιδαίνονται, είτε υπερπλάσσονται. Στην πρώτη περίπτωση, την εξοίδηση ακολουθούσε υδρωπική εκφύλιση και νέκρωση των κυττάρων, ενώ στη δεύτερη, αύξηση του πάχους του ενδοθηλίου των ελλειψοειδών και απελευθέρωση μακροφάγων στο σπληνικό πολφό. Παρά το γεγονός ότι οι δύο διαδικασίες φαίνεται να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα, η πρώτη επικρατεί στην ομάδα P+, ενώ η δεύτερη στην ομάδα P-. Το αποτέλεσμα για την P+ είναι η απογύμνωση των ελλειψοειδών αγγείων και εν συνεχεία η ρήξη τους. Από τη δεύτερη και περισσότερο την τρίτη ημέρα, σε αρκετές περιπτώσεις, παρατηρείται διάχυτη αιμορραγία και απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής του σπλήνα. Αντίθετα στην P-, στον ίδιο χρόνο, αρχίζει να γίνεται εμφανής η επικράτηση των ενδοθηλιακών και μακροφάγων κυττάρων με το λευκό και τον ερυθρό πολφό να εμφανίζονται στην ίδια αναλογία. Στο ίδιο χρονικό διάστημα η διάταση και η υπεραιμία που παρατηρείται στα μικρά και μεγάλα αγγεία του σπλήνα, επιδεινώνει την εικόνα στην P+. Εστίες υγροποιού νέκρωσης που εκκινούσαν από τις περιοχές των ελλειψοειδών και καταλάμβαναν σε ορισμένες περιπτώσεις μεγαλύτερη έκταση, παρατηρήθηκαν εν συνεχεία αποκλειστικά στην ομάδα P+. Στον ίδιο χρόνο διάχυτη φλεγμονή χαρακτηριζόμενη από την παρουσία κυρίως λεμφοκυττάρων και ουδετερόφιλων διαπιστώθηκε στην P- και σε ορισμένα άτομα της P+ τα οποία δεν εμφάνισαν σε έντονο βαθμό τις αλλοιώσεις στα ελλειψοειδή αγγεία που προαναφέρθηκαν. Από την έκτη ημέρα μετά τη μόλυνση και στις δύο ομάδες τα φλεγμονώδη στοιχεία υποχωρούσαν. Στα ιχθύδια της P+ που δεν κατέληξαν, άρχιζαν να εμφανίζονται στοιχεία ανάπλασης που χαρακτηρίζονταν από πλήθος μακροφάγων με φαγοκυτταρωμένα κυτταρικά υπολείμματα, πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων των ελλειψοειδών και νεοαγγειογένεση. Στην P- μειώνονταν σταδιακά ο αριθμός των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων και του λεμφικού ιστού του σπλήνα. Με τη σταδιακή αποκατάσταση της κυκλοφορίας ο σπλήνας άρχιζε να προσεγγίζει τη φυσιολογική του ιστολογική εικόνα.

Σε ότι αφορά στα μελανομακροφάγα κέντρα του σπλήνα, στην P+ αποδιοργανώνονταν πλήρως στην οξεία φάση της μόλυνσης σε βαθμό τέτοιο, όπου δεν ήταν δυνατός ο εντοπισμός τους και ανασχηματίζονταν κατά την ανάπλαση του σπληνικού παρεγχύματος.

Σημαντικές εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης, πλέον των φυσιολογικών, παρατηρήθηκαν στο σπλήνα των ιχθυδίων και των δύο ομάδων, περισσότερες δε στην P-. Διαφορά παρατηρήθηκε επίσης και στο πρότυπο εναπόθεσης της ουσίας. Έτσι ενώ στην P+ οι εναποθέσεις ήταν

περισσότερο διάχυτες σε όλο το παρέγχυμα, στην P- παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ελλειψοειδών και των λοιπών αγγείων του σπλήνα και στα μελανομακροφάγα κέντρα, όπου αυτά διατηρήθηκαν.

Παρουσία μικροβίων περισσότερο διάχυτων και λιγότερο σε αθροίσεις, διαπιστώθηκε σε μεγάλους αριθμούς στις εστίες υγροποιού νέκρωσης, αλλά και προγενέστερα, κυρίως στην περιφέρεια του παρεγχύματος και σε περιοχές πλησίον των αγγείων. Διαπιστώθηκαν επίσης μικρόβια εντός μακροφάγων κυττάρων.

Για την πληρέστερη παρουσίαση των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν στο σπλήνα των ιχθυδίων το όργανο βαθμολογήθηκε βάσει των ακόλουθων παραμέτρων:

Εμφάνιση και εντόπιση οιδήματος: 0-6

Παρουσία και έκταση υπεραιμίας: 0-6

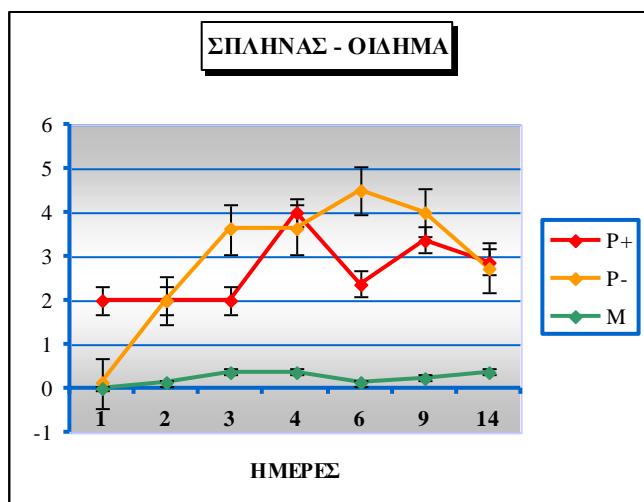
Παρουσία και έκταση αιμορραγίας: 0-6

Παρουσία και ένταση φλεγμονής: 0-6

Παρουσία, είδος και έκταση νεκρώσεων: 0-6

Εκτιμήθηκε επίσης, χωρίς να συμπεριληφθεί στο σύνολο των αλλοιώσεων του οργάνου, ο βαθμός εναπόθεσης αιμοσιδηρίνης (0-6).

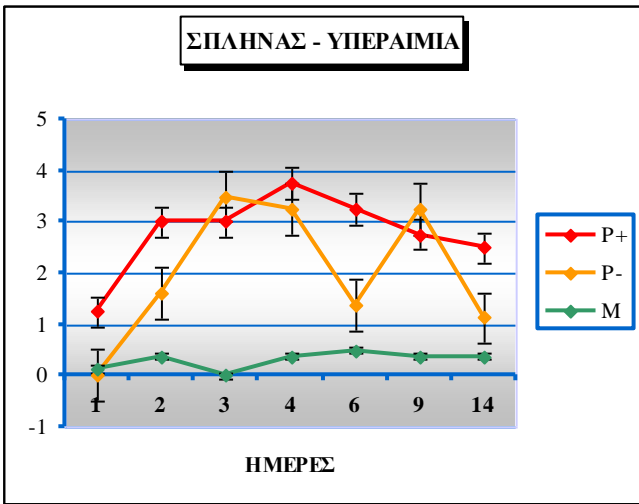
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της βαθμολόγησης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν στο σπλήνα και του συνόλου αυτών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 και τους αντίστοιχους Πίνακες 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	abcd	abcd	abcd	a	abcd	a	ab
P-	d	abcd	a	a	a	a	abc
M	d	d	bcd	bcd	d	cd	bcd

**Πίνακας 18:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

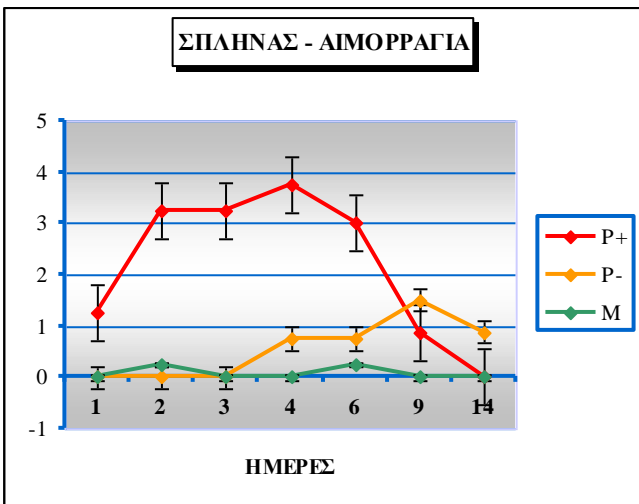
**Γράφημα 12:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	bcde	ab	ab	a	ab	abc	abcd
P-	e	abcde	ab	ab	abcde	ab	bcde
M	de	cde	e	cde	cde	cde	cde

**Πίνακας 19:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

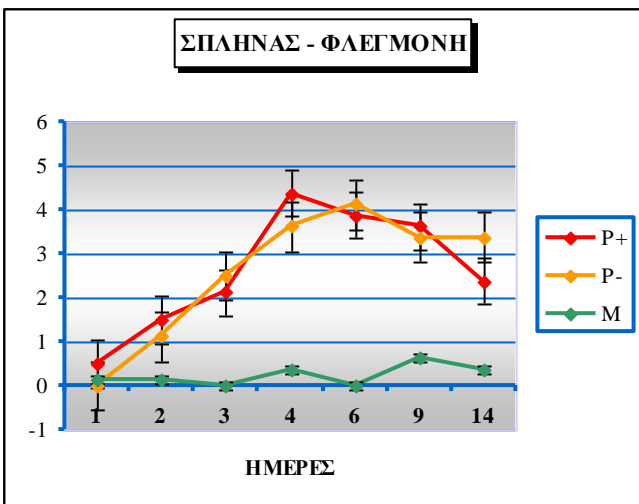
**Γράφημα 13:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	c	a	a	a	ab	c	c
P-	c	c	c	c	c	bc	c
M	c	c	c	c	c	c	c

**Πίνακας 20:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

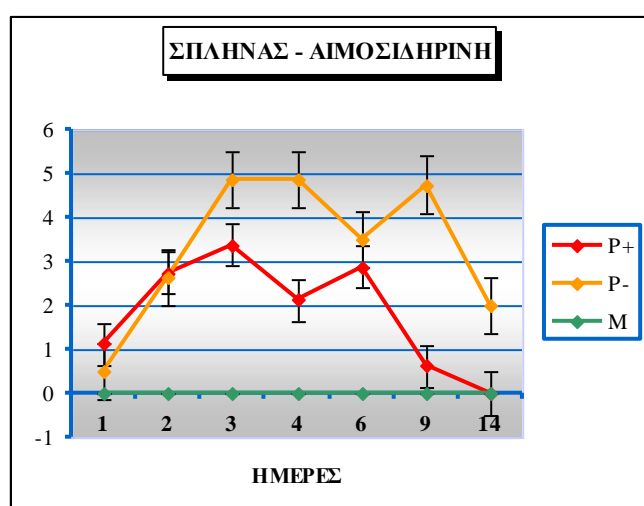
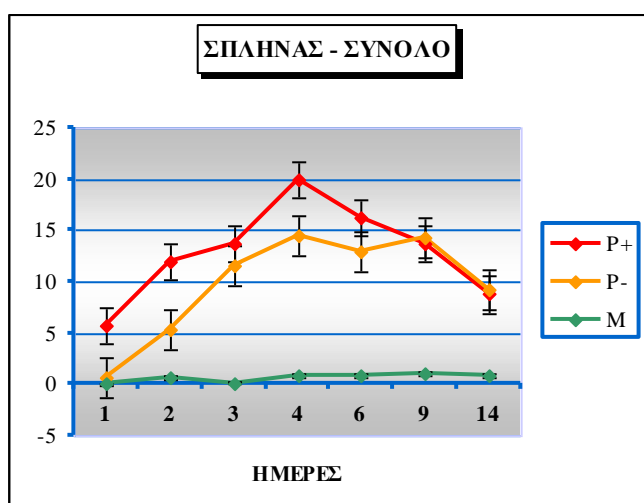
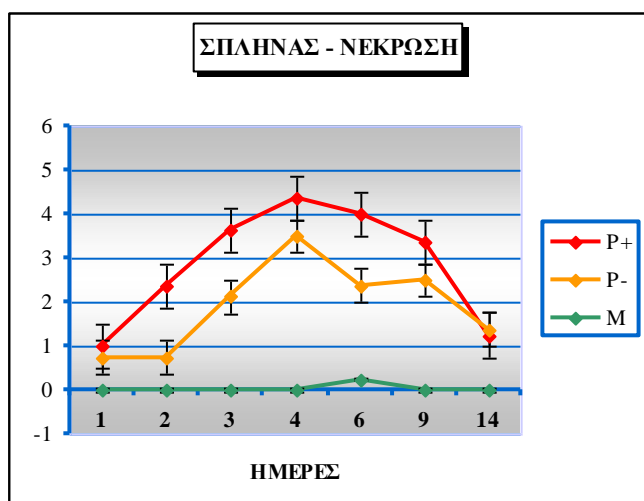
**Γράφημα 14:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	de	bcde	abcde	a	ab	ab	abcde
P-	e	cde	abcd	ab	a	abc	abc
M	de	de	e	de	e	de	de

**Πίνακας 21:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 15:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	cde	bc	ab	a	ab	ab	cde
P-	cde	cde	bcd	ab	bc	abc	cde
M	e	e	e	e	de	e	e

**Πίνακας 22:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 16:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
P+	cd	abc	abc	a	ab	abc	bcd
P-	d	cd	abc	abc	abc	abc	bcd
M	d	d	d	d	d	d	d

**Πίνακας 23:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 17:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
P+	defg	abcde	abc	cdefg	abcd	efg	g
P-	fg	bcdef	a	a	abc	ab	cdefg
M	g	g	g	g	g	g	g

**Πίνακας 24:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 18:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## Ήπαρ

Στο σύνολο των ιχθυδίων και των τριών πειραματικών ομάδων το ήπαρ εμφάνιζε σε ποικίλο βαθμό και έκταση λιπώδη εκφύλιση.

Κυκλοφορικές διαταραχές και νεκρώσεις χαρακτήριζαν την ιστολογική εικόνα του ήπατος στα ιχθύδια της ομάδας P+. Από το πρώτο μόλις εικοσιτετράωρο, διαπιστώθηκε διάταση αγγείων και αιμόλυση. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των μεγάλων κυρίως αγγείων, ήταν οιδηματικά, ενώ στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων αναγνωρίζονταν κενοτόπια με λιγότερο ή περισσότερο σαφή όρια λόγω υδρωπικής ή λιπώδους εκφύλισης. Στις επόμενες ώρες παρατηρήθηκε επιδείνωση της κατάστασης του κυτταροπλάσματος των ηπατικών κυττάρων, ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και διάχυτη πολυεστιακή εικόνα νέκρωσης με αύξηση των πυκνωτικών πυρήνων των ηπατικών κυττάρων η οποία όμως δε συνοδεύονταν από επιδείνωση των αγγειακών αλλοιώσεων. Η εικόνα αυτή αφορούσε την περιφέρεια των ηπατικών λοβίων και κυρίως τα περιπυλαία διαστήματα του ηπατικού παρεγχύματος, ενώ με την εγκατάσταση σηψαιμίας επεκτείνονταν στις περιαγγειακές περιοχές. Ενδοκυτταρικό οίδημα διαπιστώθηκε και στα ιχθύδια της ομάδας P-, χωρίς όμως να εξελιχθεί σε νέκρωση.

Από το τρίτο εικοσιτετράωρο μετά την μόλυνση σημειώθηκε νέκρωση των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων, εστιακές ρήξεις και μικροαιμορραγίες που επιτείνονταν μέχρι την έκτη ημέρα. Στο διάστημα αυτό σημαντική ήταν η αύξηση της έντασης της αιμόλυσης, με τα μεγάλα αγγεία να είναι πλήρη με γυμνούς πυρήνες ερυθρών, πυρηνικά ράκη και λίγα άωρα ερυθροκύτταρα. Στο ίδιο διάστημα διαπιστώθηκε ήπια διάχυτη φλεγμονή χαρακτηριζόμενη κυρίως από την παρουσία μακροφάγων και ουδετεροφίλων. Στο ήπαρ των ιχθυδίων της ομάδας P- η υπεραιμία και η αιμόλυση ήταν ηπιότερες, ενώ σπάνια διαπιστώθηκαν εστιακές μικροαιμορραγίες. Επίσης ήπια φλεγμονή εντοπίστηκε κυρίως περιαγγειακά.

Εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης εντοπίστηκαν και στις δύο ομάδες, από το δεύτερο εικοσιτετράωρο αρχικά ενδοκυτταρικές και στην πορεία εξωκυτταρικές, κατά εστίες, στο ηπατικό παρέγχυμα και ενδο- αγγειακά. Οι εναποθέσεις αυτές ήταν περισσότερο εκτεταμένες στα ιχθύδια της ομάδας P- από την τρίτη ημέρα μετά την μόλυνση.

Καμία αλλοίωση δε διαπιστώθηκε στους χοληφόρους πόρους.

Βακτηρίδια, σε μεγάλες αθροίσεις, διαπιστώθηκαν εντός των μεγάλων αγγείων του ήπατος κατά την εγκατάσταση σηψαιμίας. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν διαπιστώθηκαν παρόμοιες αθροίσεις εντός του ηπατικού παρεγχύματος στις περιοχές νέκρωσης που περιγράφηκαν παραπάνω.

Για την πληρέστερη παρουσίαση των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν στο ήπαρ των ιχθυδίων το όργανο βαθμολογήθηκε βάσει των ακόλουθων παραμέτρων:



Εμφάνιση και εντόπιση οιδήματος: 0-6

Παρουσία και έκταση υπεραιμίας: 0-6

Παρουσία και έκταση αιμορραγίας: 0-6

Παρουσία και ένταση φλεγμονής: 0-6

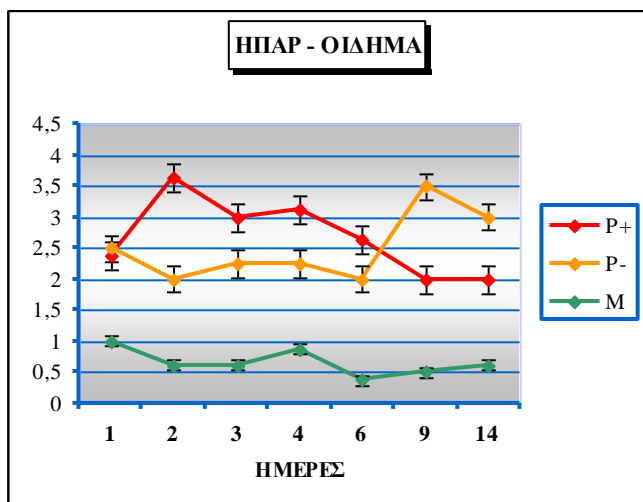
Παρουσία, είδος και έκταση νεκρώσεων: 0-6

Εκτιμήθηκαν επίσης, χωρίς να συμπεριληφθούν στο σύνολο των αλλοιώσεων του οργάνου, οι κάτωθι παράμετροι:

Βαθμός εναπόθεσης αιμοσιδηρίνης: 0-6

Αιμόλυση: 0-6

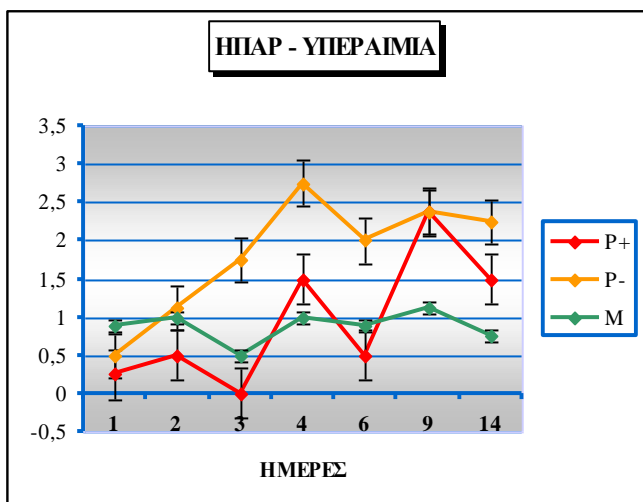
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της βαθμολόγησης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν στο ήπαρ και του συνόλου αυτών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 και τους αντίστοιχους Πίνακες 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	cd	a	abcd	abc	abcd	de	de
<b>P-</b>	bcd	de	cd	cd	de	ab	abcd
<b>M</b>	ef	f	f	f	f	f	f

**Πίνακας 25:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

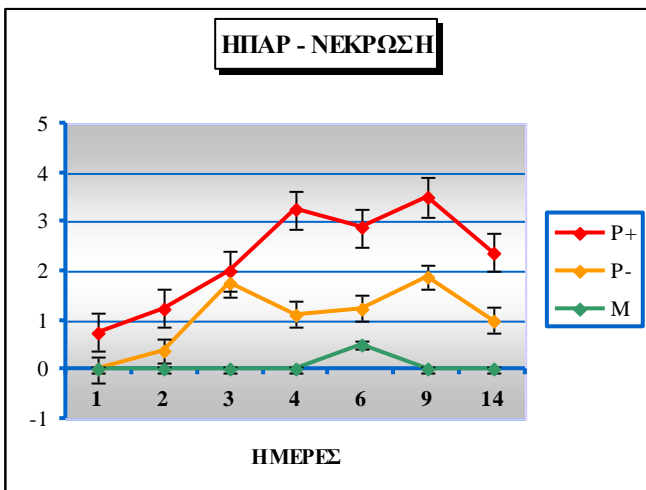
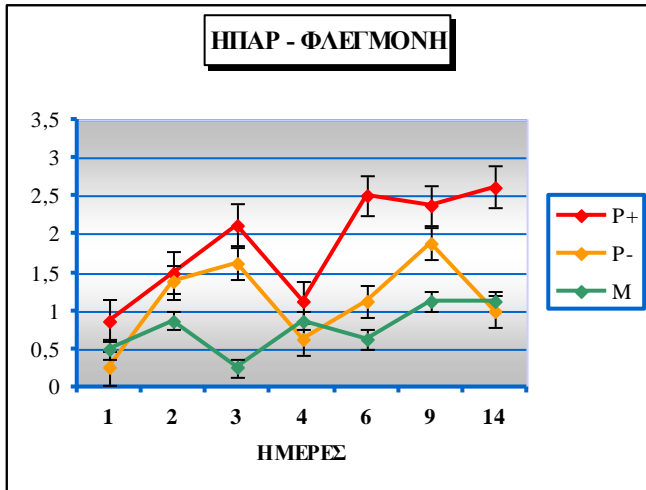
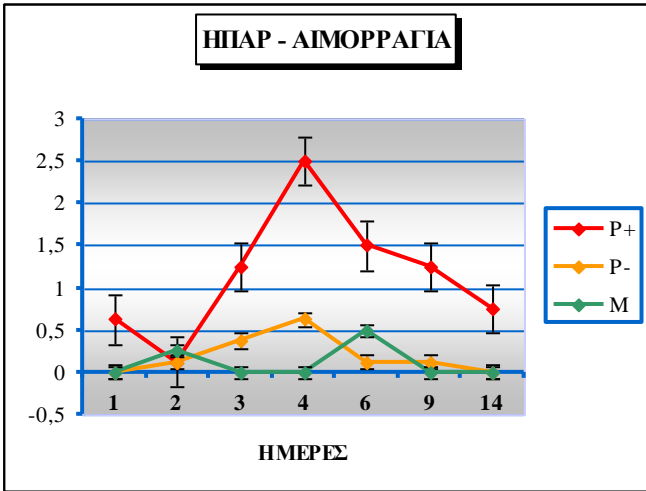
**Γράφημα 19:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	fg	efg	g	abcdef	efg	ab	abcdef
<b>P-</b>	efg	bcdefg	abcde	a	abcd	ab	abc
<b>M</b>	cdefg	bcdefg	efg	bcdefg	cdefg	bcdefg	defg

**Πίνακας 26:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 20:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	cd	d	bc	a	b	bc	bcd
<b>P-</b>	d	d	d	cd	d	d	d
<b>M</b>	d	d	d	d	cd	d	d

**Πίνακας 27:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 21:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	efgh	bcdefg	abcd	defgh	ab	abc	a
<b>P-</b>	h	cdefg	abcdef	fgh	defgh	abcde	efgh
<b>M</b>	gh	efgh	h	efgh	fgh	defgh	defgh

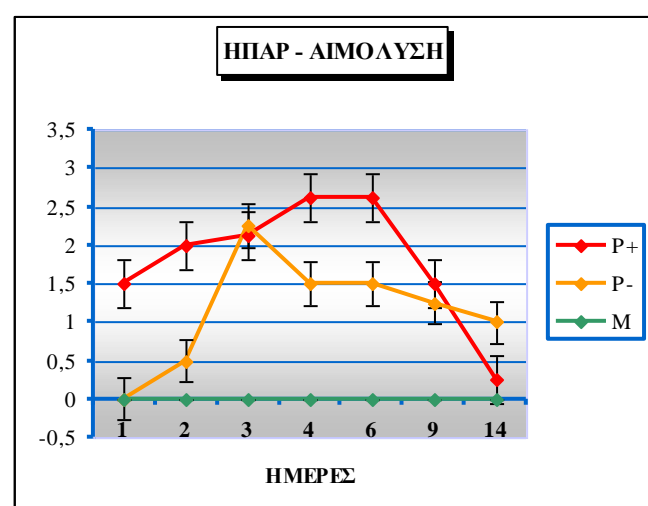
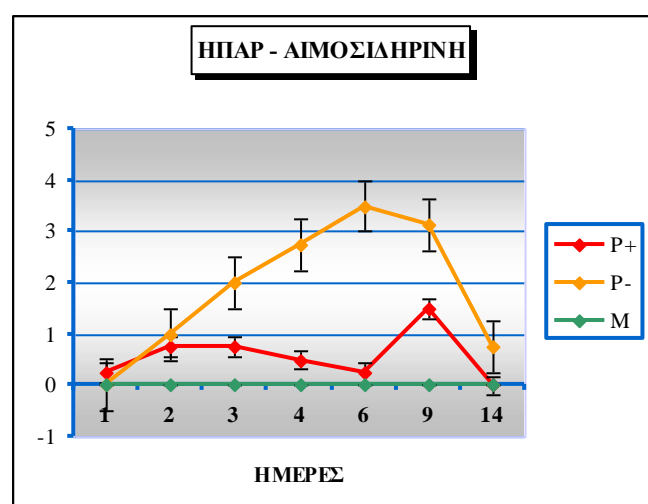
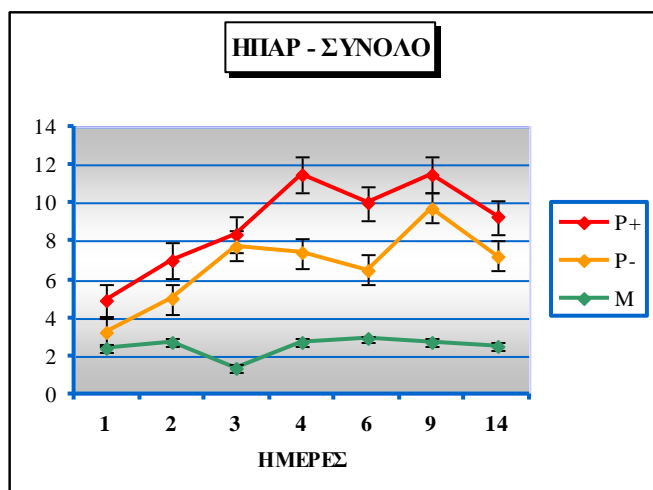
**Πίνακας 28:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g,h, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 22:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	ghi	defg	cd	a	ab	a	bc
<b>P-</b>	i	hi	cdef	efgh	defg	cde	fgh
<b>M</b>	i	i	i	i	ghi	i	i

**Πίνακας 29:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g,h,i, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 23:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	def	bcd	abc	a	ab	a	abc
<b>P-</b>	efg	def	bcd	bcd	cde	abc	bcd
<b>M</b>	fg	fg	g	fg	fg	fg	fg

**Πίνακας 30:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 24:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	ef	def	def	ef	ef	cde	f
<b>P-</b>	f	def	bcd	abc	a	ab	def
<b>M</b>	f	f	f	f	f	f	f

**Πίνακας 31:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 25:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	bcd	abc	ab	a	a	bcd	fg
<b>P-</b>	g	efg	ab	bcd	bcd	cde	def
<b>M</b>	g	g	g	g	g	g	g

**Πίνακας 32:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 26:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## **Νεφρός**

Λόγω της διαφορετικής ιστολογικής υφής και λειτουργικότητας των δύο τμημάτων του νεφρού, του κεφαλικού και του σωματικού νεφρού, το όργανο μελετήθηκε ως δύο ξεχωριστά όργανα.

### **Κεφαλικός νεφρός**

Κατά την ιστολογική εξέταση του κεφαλικού νεφρού στα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων διαπιστώθηκαν από τη δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση, έντονη υπεραιμία, εστιακή νέκρωση του ενδοθήλιου των αγγείων και μικροαιμορραγίες. Παρατηρήθηκαν επίσης εξωκυτταρικές εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης. Από την τρίτη ημέρα διαπιστώθηκε παρουσία εστιακών περιαγγειακών διηθήσεων από μακροφάγα και ουδετερόφιλα, αύξηση του αριθμού των φλεγμονωδών κυττάρων στο παρέγχυμα του οργάνου, καθώς και αύξηση της αναλογίας ‘ερυθρού’ προς ‘λευκό’ πολφό κυρίως στα ιχθύδια της P+. Εστίες υγροποιού νέκρωσης σημειώθηκαν σε ορισμένα περιστατικά. Φλεγμονώδεις διηθήσεις σε συνδυασμό με εστιακές αιμορραγίες και αθροίσεις βακτηριδίων διαπιστώθηκαν στο περινεφρικό λίπος. Με την εξέλιξη της λοίμωξης παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των φαγοκυττάρων αιμοσιδηρίνης και των λεμφοβλαστών. Από την ένατη ημέρα οι εστιακές νεκρώσεις άρχισαν να υποχωρούν και ο ιστός φάνηκε να επανέρχεται στη φυσιολογική του δομή με εξαίρεση την εμφάνιση λιπώδους διήθησης εστιακά, σε ορισμένες περιπτώσεις.

Για την πληρέστερη παρουσίαση των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν στον κεφαλικό νεφρό των ιχθυδίων το όργανο βαθμολογήθηκε βάσει των ακόλουθων παραμέτρων:

Εμφάνιση και εντόπιση οιδήματος: 0-6

Παρουσία και έκταση υπεραιμίας: 0-6

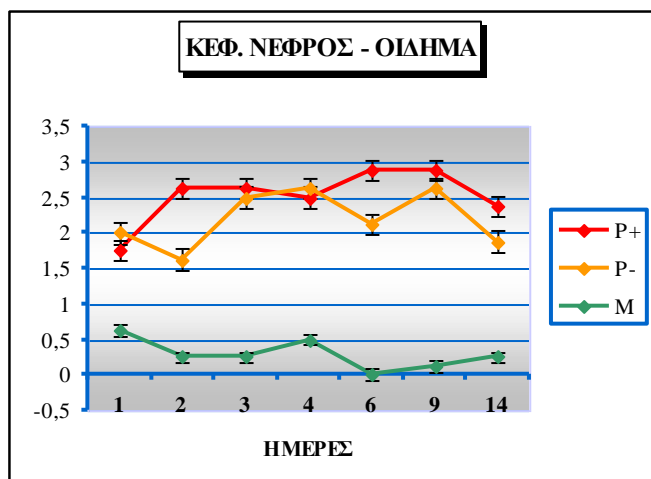
Παρουσία και έκταση αιμορραγίας: 0-6

Παρουσία και ένταση φλεγμονής: 0-6

Παρουσία, είδος και έκταση νεκρώσεων: 0-6

Εκτιμήθηκε επίσης, χωρίς να συμπεριληφθεί στο σύνολο των αλλοιώσεων του οργάνου, ο βαθμός εναπόθεσης αιμοσιδηρίνης (0-6).

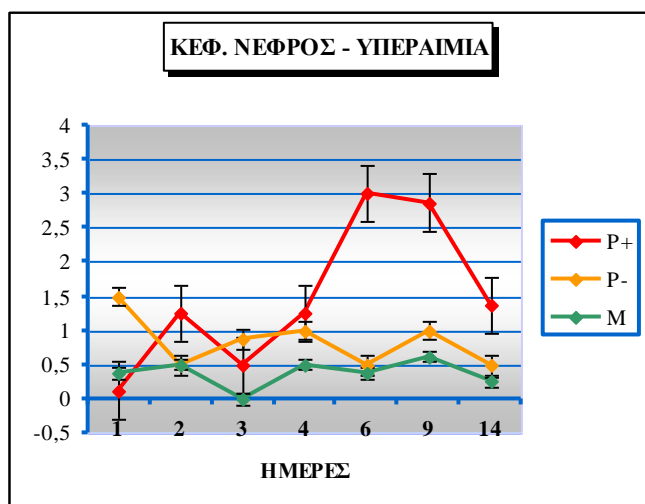
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της βαθμολόγησης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν στον κεφαλικό νεφρό και του συνόλου αυτών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 και τους αντίστοιχους Πίνακες 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	abcde	ab	ab	abc	a	a	abcd
<b>P-</b>	abcde	abcde	abc	ab	abcde	ab	abcde
<b>M</b>	abcde	cde	cde	bcde	e	de	cde

**Πίνακας 33:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

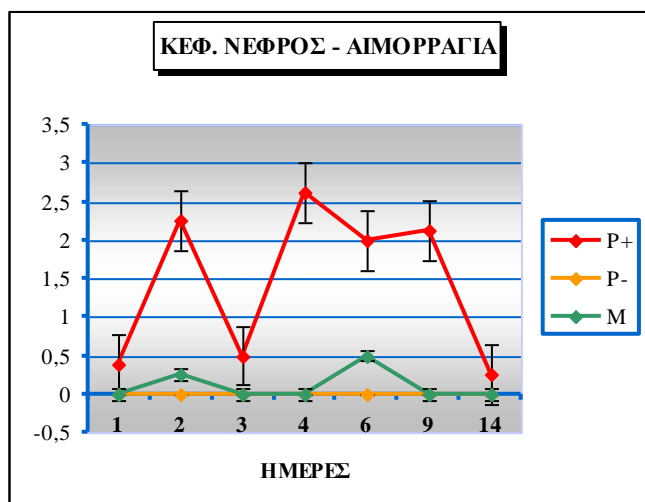
**Γράφημα 27:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	b	ab	b	ab	a	a	ab
<b>P-</b>	ab	b	b	b	b	b	b
<b>M</b>	b	b	b	b	b	b	b

**Πίνακας 34:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

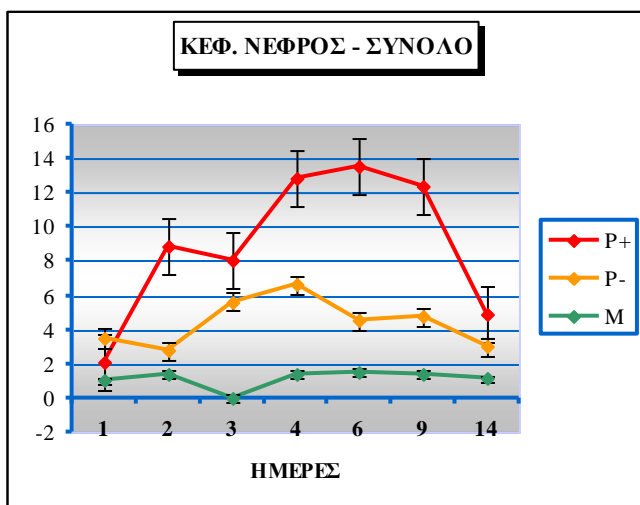
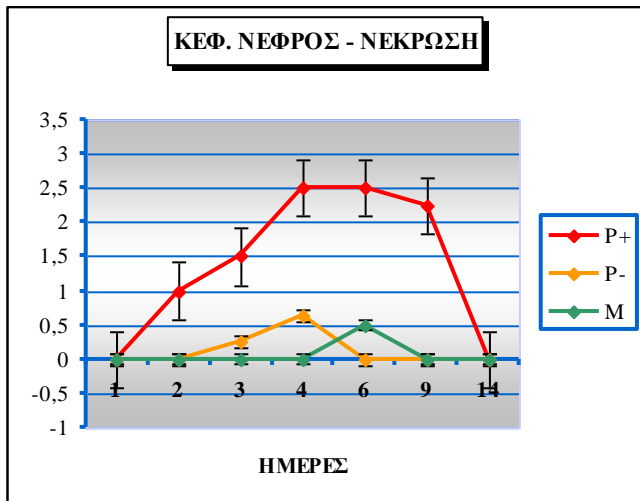
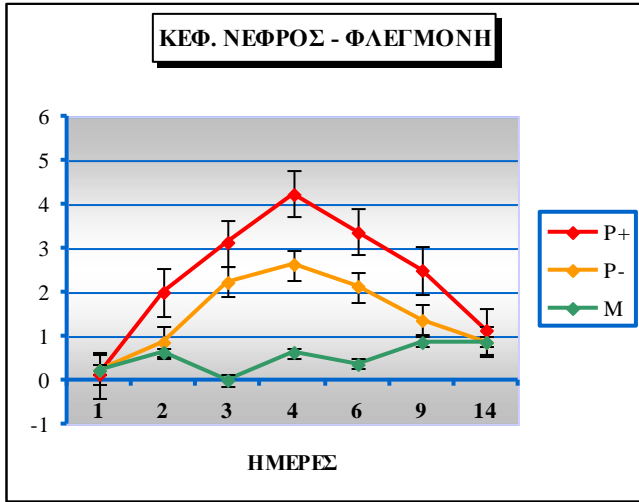
**Γράφημα 28:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	b	a	b	a	a	a	b
<b>P-</b>	b	b	b	b	b	b	b
<b>M</b>	b	b	b	b	b	b	b

**Πίνακας 35:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 29:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	fg	bcdefg	abc	a	ab	abcde	cdefg
<b>P-</b>	fg	defg	abcdef	abcd	abcdefg	bcdefg	defg
<b>M</b>	fg	defg	g	defg	efg	defg	defg

**Πίνακας 36:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 30:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	e	cd	bc	a	a	ab	e
<b>P-</b>	e	e	de	cde	e	e	e
<b>M</b>	e	e	e	e	de	e	e

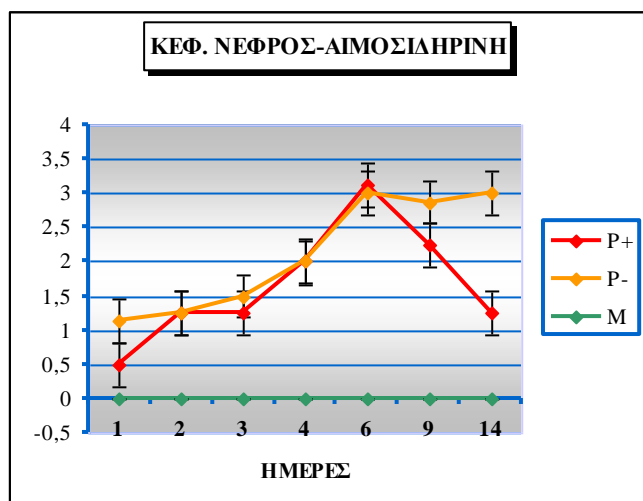
**Πίνακας 37:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 31:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	cde	abc	abcd	a	a	ab	cde
<b>P-</b>	cde	cde	bcde	abcde	cde	cde	cde
<b>M</b>	de	de	e	de	de	de	de

**Πίνακας 38:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 32:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	de	bcde	bcde	abcd	a	abcd	bcde
<b>P-</b>	cde	bcde	abcde	abcd	ab	abc	ab
<b>M</b>	e	e	e	e	e	e	e

**Πίνακας 39:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 33:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

### Σωματικός νεφρός

Η ιστολογική εξέταση του σωματικού νεφρού κατέδειξε παρόμοιες αλλοιώσεις με αυτή του κεφαλικού νεφρού. Περιορισμένης έκτασης φλεγμονώδεις εστίες διαπιστώθηκαν περιαγγειακά, από τη δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση. Μικροαιμορραγίες στο διάμεσο ιστό διαπιστώθηκαν κυρίως στην πρόσθια μοίρα του οργάνου. Από την τρίτη ημέρα παρατηρήθηκαν κυτταροπλασματικά μικροσταγονίδια στα επιθηλιακά κύτταρα των ουροφόρων σωληναρίων. Σε ορισμένα περιστατικά, τα ίδια κύτταρα εμφάνισαν θολερή εξοίδηση ή και υδρωπική εκφύλιση διαφόρου βαθμού. Από την τέταρτη ημέρα, σε ορισμένα περιστατικά, διαπιστώθηκε διάταση των ουροφόρων σωληναρίων εντονότερη επίσης, στην πρόσθια μοίρα του οργάνου. Στην εξέλιξη της νόσου σε ορισμένες περιπτώσεις διαπιστώθηκαν εστίες υγροποιού νέκρωσης στο διάμεσο λεμφικό ιστό της πρόσθιας μοίρας και ήπια διάμεση φλεγμονή στην οπίσθια μοίρα του οργάνου. Αθροίσεις βακτηριδίων παρατηρήθηκαν στο διάμεσο ιστό, από την τρίτη ημέρα μετά τη μόλυνση.

Για την πληρέστερη παρουσίαση των αλλοιώσεων που προκλήθηκαν στο σωματικό νεφρό των ιχθυδίων το όργανο βαθμολογήθηκε βάσει των ακόλουθων παραμέτρων:

Εμφάνιση και εντόπιση οιδήματος: 0-6

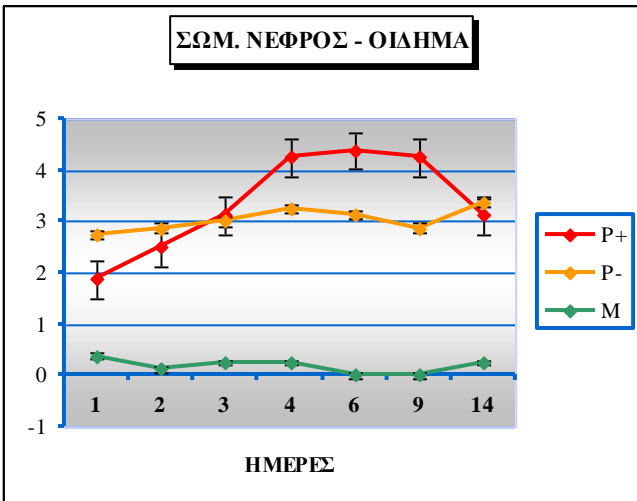
Παρουσία και έκταση υπεραιμίας: 0-6

Παρουσία και έκταση αιμορραγίας: 0-6

Παρουσία και ένταση φλεγμονής: 0-6

Παρουσία, είδος και έκταση νεκρώσεων: 0-6

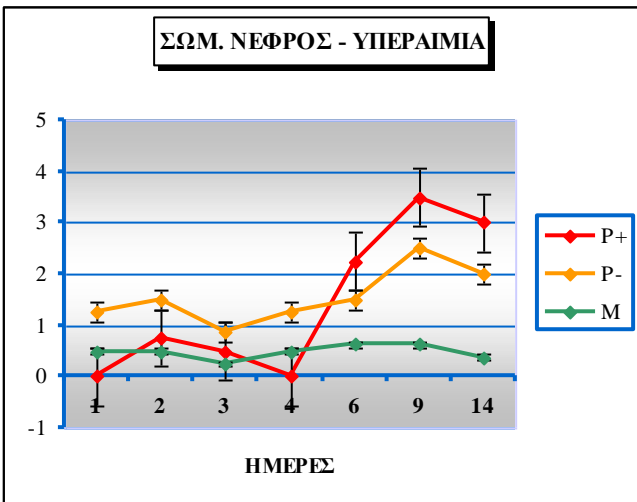
Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης της βαθμολόγησης των παραμέτρων που εκτιμήθηκαν στο σωματικό νεφρό και του συνόλου αυτών παρουσιάζονται στα Γραφήματα 34, 35, 36, 37, 38, 39 και τους αντίστοιχους Πίνακες 40, 41, 42, 43, 44, 45.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	abcde	abcde	abc	a	a	a	abc
<b>P-</b>	abcde	abcde	abcd	ab	abc	abcde	a
<b>M</b>	bcde	de	cde	cde	e	e	cde

**Πίνακας 40:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

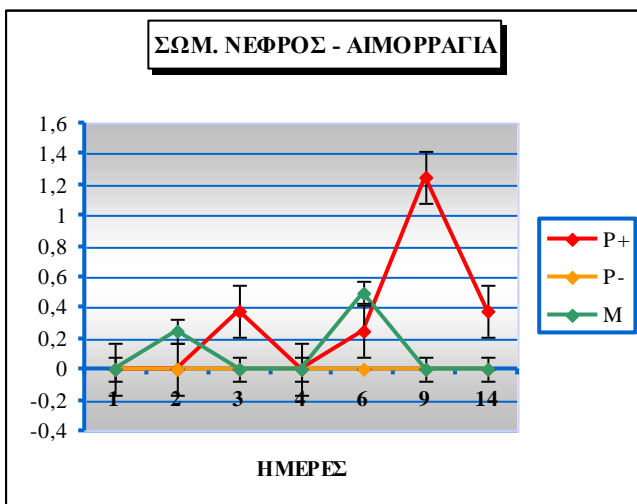
**Γράφημα 34:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	f	cdef	def	f	abcd	a	ab
<b>P-</b>	bcdef	bcdef	cdef	bcdef	bcdef	abc	abcde
<b>M</b>	def	def	ef	def	cdef	cdef	def

**Πίνακας 41:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 35:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

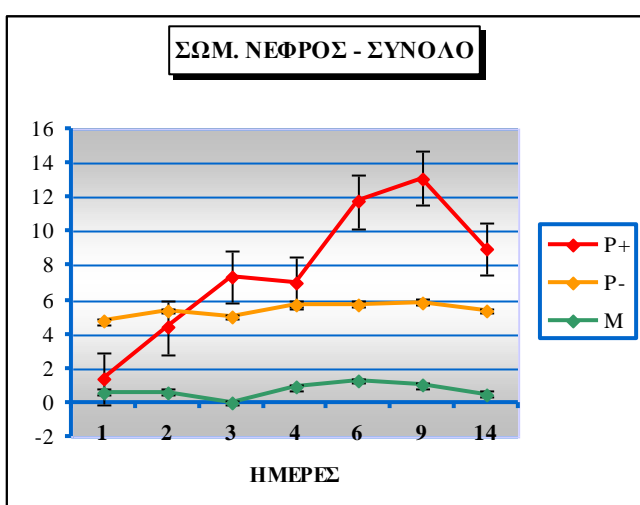
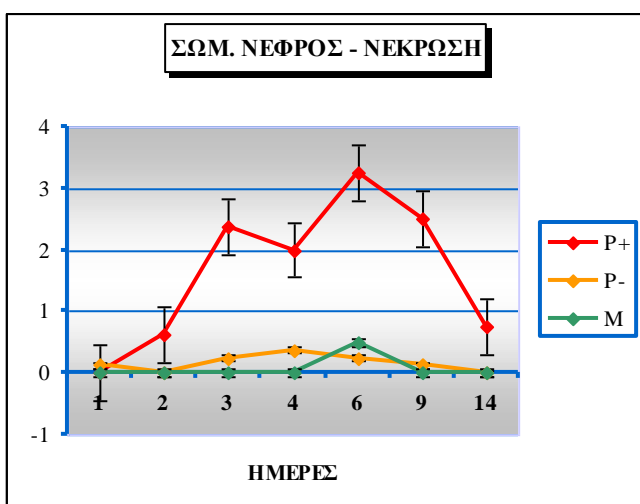
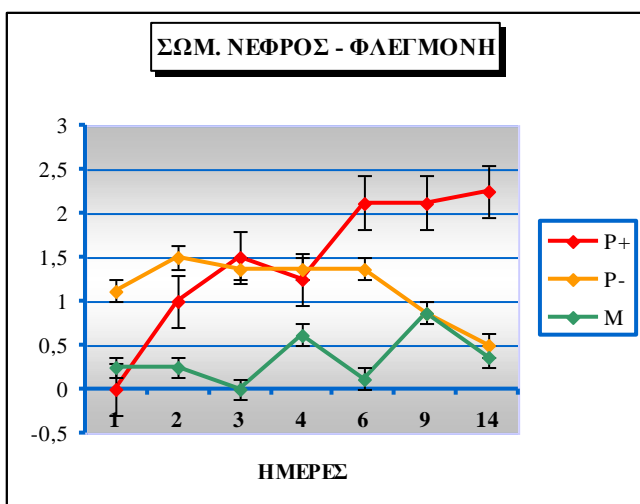


	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	b	b	b	b	b	a	b
<b>P-</b>	b	b	b	b	b	b	b
<b>M</b>	b	b	b	b	b	b	b

**Πίνακας 42:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 36:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.





	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	c	abc	abc	abc	ab	ab	a
<b>P-</b>	abc	abc	abc	abc	abc	abc	bc
<b>M</b>	c	c	c	abc	c	abc	c

**Πίνακας 43:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 37:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	c	c	ab	b	a	ab	c
<b>P-</b>	c	c	c	c	c	c	c
<b>M</b>	c	c	c	c	c	c	c

**Πίνακας 44:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 38:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	def	cdef	abcd	abcde	ab	a	abc
<b>P-</b>	cdef	bcdef	bcdef	bcdef	bcdef	bcdef	bcdef
<b>M</b>	def	def	f	def	def	def	ef

**Πίνακας 45:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 39:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

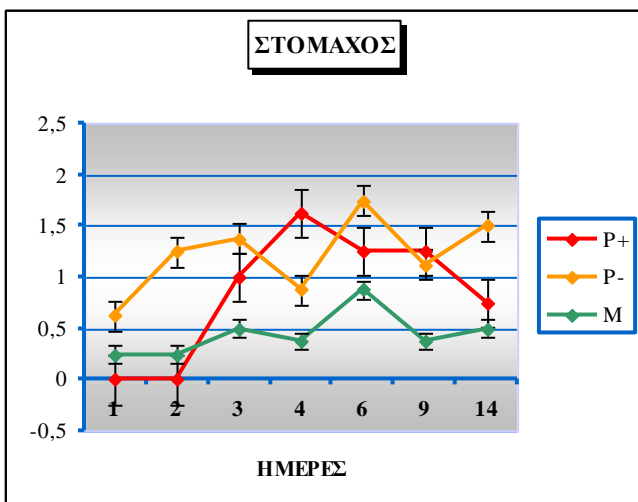
## Ενδοκρινείς αδένες

Από τη δεύτερη αλλά κυρίως την τρίτη ημέρα διαπιστώθηκαν φλεγμονώδεις και σε μικρότερο βαθμό αιμορραγικές διηθήσεις και εστίες νέκρωσης στο αδρεναλινογόνο όργανο, τα σωματίδια του Stanious και το μεσνεφρικό αδένα, στα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων, στα οποία κατέστη δυνατή η ιστολογική εξέταση των παραπάνω οργάνων.

## Στόμαχος

Στο σύνολο των ιχθυδίων και των δύο πειραματικών ομάδων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στο στόμαχο. Σε ορισμένα ιχθύδια διαπιστώθηκε η παρουσία υποεπιθηλιακού οιδήματος στον οισοφάγο και μεσοκυττάριου, ενδοκυτταρικού και υποεπιθηλιακού οιδήματος στο όριο του στομάχου με τον οισοφάγο. Σε ορισμένα περιστατικά διαπιστώθηκε μικρής έκτασης υποεπιθηλιακό οίδημα συνοδευόμενο από αποφολίδωση του επιθηλίου του στομάχου και υποβλεννογόνιο, μεσομυϊκό και ενδομυϊκό οίδημα στο λείο μυϊκό χιτώνα. Σπάνια διαπιστώθηκε πολύ περιορισμένης έκτασης νέκρωση των κορυφών των λαχνών, και κενοτοπιώδης εκφύλιση των γαστρικών αδένων.

Για την πληρέστερη περιγραφή των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν στο στόμαχο, το όργανο βαθμολογήθηκε συνολικά (0-6). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 40 και τον αντίστοιχο Πίνακα 46.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	b	b	ab	a	ab	ab	ab
<b>P-</b>	ab	ab	ab	ab	a	ab	ab
<b>M</b>	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab

**Πίνακας 46:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

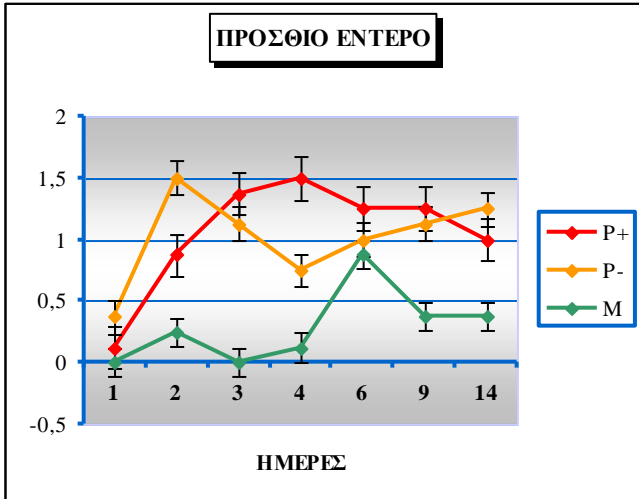
**Γράφημα 40:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύδες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## Έντερο

Κατά την ιστολογική εξέταση του εντέρου των ιχθυδίων της P+ δεν διαπιστώθηκαν εκτεταμένες αλλοιώσεις. Πιο συγκεκριμένα, στο πρόσθιο έντερο από την πρώτη ημέρα μετά την μόλυνση διαπιστώθηκε οίδημα στο χόριο των λαχνών. Ήπια διάταση και συμφόρηση των αγγείων της περιοχής παρατηρήθηκε από τη δεύτερη ημέρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις διαπιστώθηκε υποεπιθηλιακό οίδημα και αποφολίδωση των επιθηλιακών κυττάρων ή και μερική αποκόλληση του βλεννογόνου του προσθίου εντέρου. Σπανιότερα παρατηρήθηκε υπερπλασία του επιθηλίου του βλεννογόνου. Οιδηματώδης εμφανίστηκε, επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις και ο μυϊκός χιτώνας του εντέρου. Από την τρίτη ημέρα, σε λίγες περιπτώσεις, διαπιστώθηκε επιπέδωση των λαχνών ή αποκόλλησή τους. Κατά την εξέλιξη της λοίμωξης διαπιστώθηκαν σποραδικά ήπια εστιακή φλεγμονή στη βάση των λαχνών, ρήξη των αγγείων με μικροαιμορραγίες και συνένωση γειτνιαζόντων λαχνών. Σπανιότερα διαπιστώθηκε περιορισμένης έκτασης, νέκρωση σε όλο το μήκος ή στις κορυφές των λαχνών, υδρωπική εκφύλιση των επιθηλιακών κυττάρων και λεμφοκυτταρική διήθηση του υποβλεννογόνιου χιτώνα ή του χορίου των λαχνών. Οι αλλοιώσεις στο ίδιο τμήμα για τα ιχθύδια της ομάδας P- ήταν ηπιότερες. Περιορίστηκαν σε παρουσία οιδήματος στο χόριο των λαχνών και στο λείο μυϊκό χιτώνα του εντέρου, και περιορισμένης έκτασης, αποφολίδωση του επιθηλίου σε ορισμένες περιπτώσεις.

Οι αλλοιώσεις που διαπιστώθηκαν στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου και στις δύο πειραματικές ομάδες ήταν ηπιότερες. Από τη δεύτερη μέρα σε ορισμένα περιστατικά παρατηρήθηκε αποκόλληση των κροσσών των επιθηλιακών κυττάρων, νέκρωση της ψηκτροειδούς παρυφής του επιθηλίου ή και υπενδοθηλιακό οίδημα και αποφολίδωση των επιθηλιακών κυττάρων που επεκτάθηκε κατά την εξέλιξη της νόσου στο μέσο τμήμα του εντέρου. Σπανιότερα διαπιστώθηκε υπερπλασία και πύχωση του βλεννογόνου των λαχνών και αύξηση των βλεννοκυττάρων του επιθηλίου στα τελευταία στάδια της λοίμωξης.

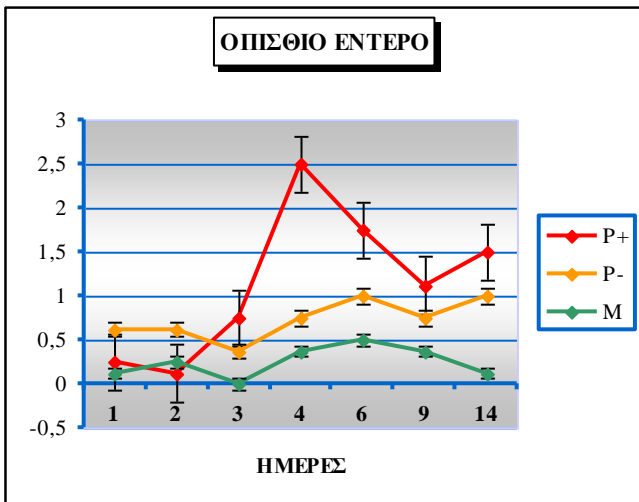
Για την πληρέστερη περιγραφή των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν, εκτιμήθηκαν και βαθμολογήθηκαν (0-6) ανεξάρτητα το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης παρουσιάζεται στα Γραφήματα 41 και 42 και τους αντίστοιχους Πίνακες 47 και 48.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	a	a	a	a	a	a	a
<b>P-</b>	a	a	a	a	a	a	a
<b>M</b>	a	a	a	a	a	a	a

**Πίνακας 47:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα, a, δεν υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 41:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	b	b	ab	a	ab	ab	ab
<b>P-</b>	b	b	b	ab	ab	ab	ab
<b>M</b>	b	b	b	b	b	b	b

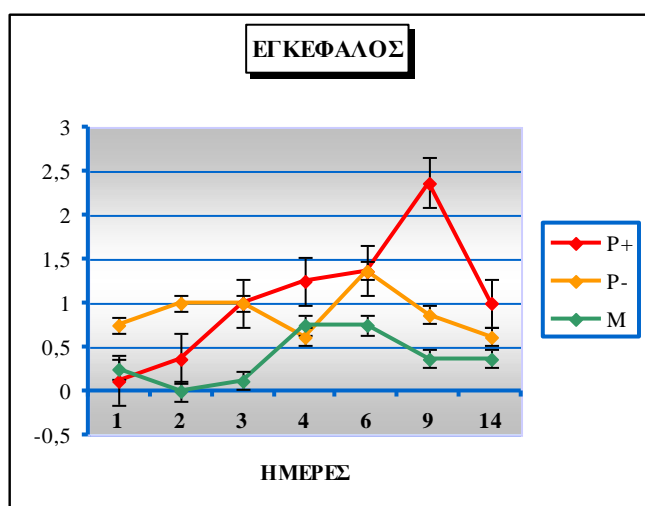
**Πίνακας 48:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 42:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## Εγκέφαλος

Η ιστολογική εξέταση τομών του εγκεφάλου των ιχθυδίων, που μετείχαν στην πειραματική μόλυνση, δεν κατέδειξε σημαντικές αλλοιώσεις. Από το δεύτερο εικοσιτετράωρο διαπιστώθηκε εστιακή διάταση και συμφόρηση των αγγείων του χοριοειδούς πλέγματος του εγκεφάλου και των αγγείων του επενδύματος της τέταρτης κοιλίας. Ακόμη σπανιότερα, διαπιστώθηκε ήπια γλοίωση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα, χωρίς σημαντική διάταση των τριχοειδών αγγείων. Δεν διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις στους νευρώνες. Οι παρατηρήσεις αφορούν τα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων.

Για την πληρέστερη περιγραφή των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν στον εγκέφαλο το όργανο βαθμολογήθηκε συνολικά (0-6). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 43 και τον αντίστοιχο Πίνακα 49.



	1	2	3	4	6	9	14
P+	b	b	ab	ab	ab	a	ab
P-	b	ab	ab	b	ab	ab	b
M	b	b	b	b	b	b	b

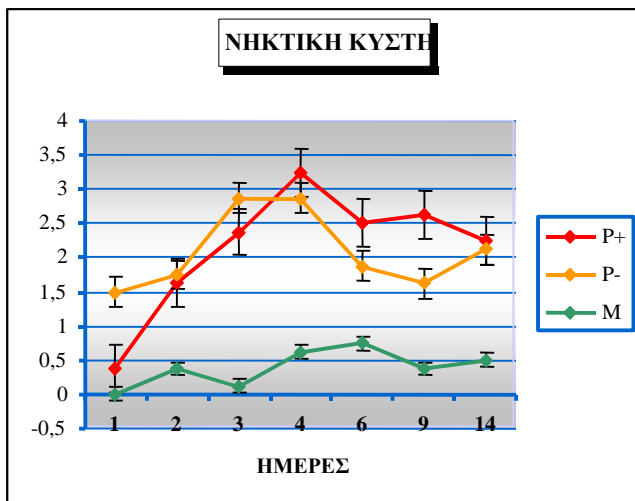
**Πίνακας 49:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλούν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 43:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## Νηκτική Κύστη

Κατά την ιστολογική εξέταση της νηκτικής κύστης των ιχθυδίων δεν διαπιστώθηκαν εκτεταμένες αλλοιώσεις στο όργανο. Ενδοκυττάριο και υποεπιθηλιακό οίδημα, που σε ορισμένες περιπτώσεις οδήγησε σε αποκόλληση του επιθηλίου του οργάνου, διαπιστώθηκε από τη δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση. Διαπιστώθηκε, επίσης σποραδικά, ενδομυϊκό και μεσομυϊκό οίδημα στο λείο μυϊκό χιτώνα του οργάνου. Τα αγγεία του οργάνου, που διατάσσονται χαρακτηριστικά παράλληλα συγκροτώντας στιβάδα, εμφάνισαν από την τρίτη ημέρα κατά θέσεις διάταση και συμφόρηση και σπανιότερα, εστιακά, ρήξεις και μικροαιμορραγίες με παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων. Οι παραπάνω αλλοιώσεις διαπιστώθηκαν στα ιχθύδια και των δύο ομάδων με ακόμη πιο περιορισμένη έκταση στην ομάδα P-. Μικρές εστίες μικροβίων διαπιστώθηκαν στα αγγεία του οργάνου κατά την εξέλιξη της λοίμωξης.

Για την πληρέστερη περιγραφή των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν στη νηκτική κύστη το όργανο βαθμολογήθηκε συνολικά (0-6). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 44 και τον αντίστοιχο Πίνακα 50.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	cde	abcde	abcd	a	abc	abc	abcde
<b>P-</b>	abcde	abcde	ab	ab	abcde	abcde	abcde
<b>M</b>	e	cde	de	bcde	bcde	cde	cde

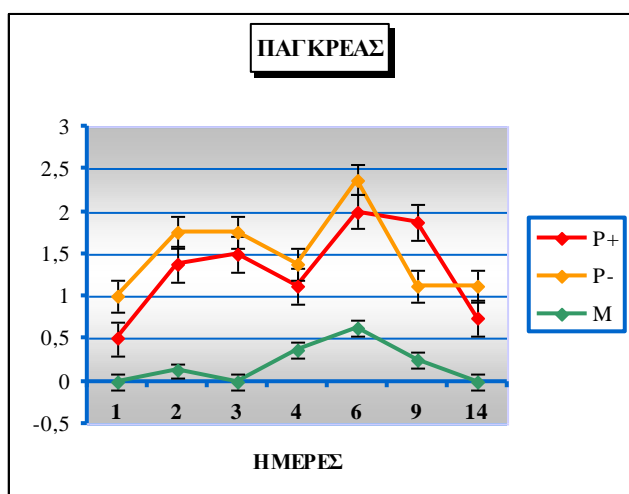
**Πίνακας 50:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσου όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 44:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

## Πάγκρεας

Η ιστολογική εξέταση του οργάνου δεν κατέδειξε σημαντικές αλλοιώσεις. Ήπια διάταση των αγγείων του οργάνου και οίδημα των ενδοθηλιακών τους κυττάρων σημειώθηκε από το τέλος της πρώτης ημέρας μετά την μόλυνση. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε συμφόρηση και παρουσία θρόμβων στα αγγεία. Τα κύτταρα της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος εμφάνιζαν σε ορισμένες περιπτώσεις αποκοκκίωση, ενώ από την τρίτη ημέρα μετά τη μόλυνση διαπιστώθηκαν και εστιακές νεκρώσεις στην ίδια μοίρα του οργάνου. Σπανιότερα εστιακές νεκρώσεις διαπιστώθηκαν και σε μεμονωμένα νησίδια του Langerhans, της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος. Μικρές εστίες φλεγμονωδών κυττάρων, κυρίως μακροφάγων και ουδετεροφίλων, διαπιστώθηκαν στο ίδιο διάστημα εντοπιζόμενες περιαγγειακά. Όμοιες εστίες, με ταυτόχρονη παρουσία μικροαιμορραγιών, εντοπίστηκαν στο λιπώδη ιστό που περιέβαλε τα παγκρεατικά νησίδια. Οι προαναφερθείσες αλλοιώσεις διαπιστώθηκαν στα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων με εξαίρεση την μερική αποκοκκίωση των παγκρεατικών κυττάρων η οποία διαπιστώθηκε σποραδικά και στους μάρτυρες. Χαρακτηριστική ήταν η παρουσία μεγάλου αριθμού βακτηριδίων, νεκρωμένων και κατακερματισμένων ερυθρών και φλεγμονωδών κυττάρων στα μεγάλα αγγεία του οργάνου, σε σημειωτικά ιχθύδια.

Για την πληρέστερη περιγραφή των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν στο πάγκρεας το όργανο βαθμολογήθηκε συνολικά (0-6). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 45 και τον αντίστοιχο Πίνακα 51.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab
<b>P-</b>	ab	ab	ab	ab	a	ab	ab
<b>M</b>	b	b	b	ab	ab	ab	b

**Πίνακας 51:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 45:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

### **Δέρμα και υποκείμενος γραμμωτός μυϊκός ιστός**

Όπως προαναφέρθηκε το δέρμα των ιχθυδίων που μετείχαν στην πειραματική μόλυνση εξετάστηκε και βαθμολογήθηκε κλινικά, με βάση τη μεταβολή του χρωματισμού, την παρουσία και την έκταση ερυθρήματος ή/και αιμορραγιών και τον αριθμό και το βάθος των ελκών που διαπιστώθηκαν μακροσκοπικά. Στη συνέχεια, διενεργήθηκε ιστολογική εξέταση του δέρματος και των υποκείμενων μυϊκών ιστών, ιδιαίτερα στα σημεία των προαναφερθέντων μακροσκοπικών αλλοιώσεων. Η αρχική αλλοίωση, που διαπιστώθηκε, ήταν ήπιο ενδοκυττάριο οίδημα των πλακωδών κυττάρων της επιδερμίδας και κατά εστίες αποκόλληση της βασικής στιβάδας από την υποκείμενη βασική μεμβράνη. Παρατηρήθηκε επίσης, υπερπλασία των χρωμοφόρων κυττάρων του χόριου. Από τη δεύτερη και κυρίως την τρίτη ημέρα, διαπιστώθηκε έντονο διάμεσο οίδημα στο χόριο και τον υποδόριο χαλαρό συνδετικό ιστό και αποκόλληση της επιδερμίδας στο σύνολό της. Σε ορισμένα περιστατικά διαπιστώθηκε συμφόρηση και σπανιότερα ρήξη των αγγείων της περιοχής. Φλεγμονώδεις διηθήσεις κυρίως από μακροφάγα και ουδετερόφιλα διαπιστώθηκαν σπάνια. Κατά την εξέλιξη της νόσου παρατηρήθηκε κατά εστίες αποκόλληση της επιδερμίδας και αποκάλυψη των υποκείμενων γραμμωτών μυών. Οι περιγραφείσες αλλοιώσεις αφορούσαν θέσεις κυρίως πέριξ της μέσης γραμμής και ήταν σημαντικά ηπιότερες για τα ιχθύδια της ομάδας P-.

Μεσομυϊκό και περιμυϊκό οίδημα παρατηρήθηκε στους, υποκείμενους των δερματικών αλλοιώσεων, γραμμωτούς μύες. Σπανιότερα παρατηρήθηκαν εστιακές μικροαιμορραγίες και φλεγμονώδεις διηθήσεις κυρίως από μακροφάγα κύτταρα. Από την τρίτη ημέρα μετά την μόλυνση, διαπιστώθηκαν εστίες εκφύλισης και νέκρωσης των μυϊκών ινών, καθώς και παρουσία μακροφάγων και βακτηριδιακών αθροίσεων μεταξύ αυτών. Οι αλλοιώσεις αφορούσαν κατά κύριο λόγο τα ιχθύδια της ομάδας P+, και εντοπιζόνταν στους ερυθρούς γραμμωτούς μύες που εκτείνονται κατά μήκος της μέσης γραμμής. Εν τω βάθει εστίες νέκρωσης των γραμμωτών μυών χωρίς συμμετοχή του υπερκείμενου δέρματος παρατηρήθηκαν σπάνια.

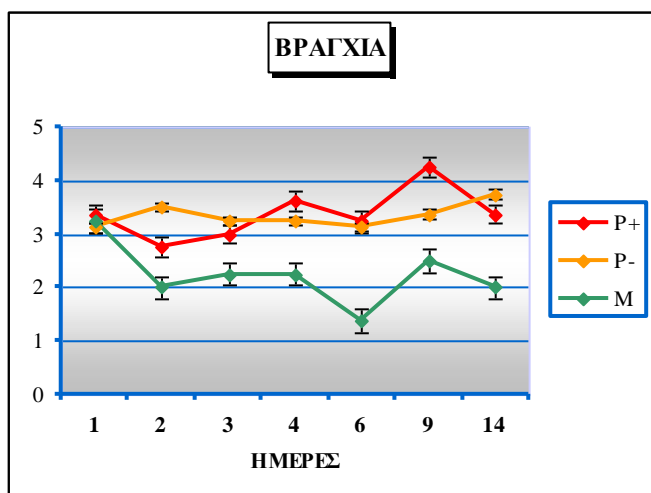
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν διαπιστώθηκε η τυπική μορφή έλκους με διακριτά χείλη και αιμορραγική στιβάδα με φλεγμονώδεις διηθήσεις, αθροίσματα βακτηριδίων και κυτταρικά ράκη.



## Βράγχια

Η ιστολογική εξέταση των βραγχίων στα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων δεν κατέδειξε σημαντικές αλλοιώσεις. Από την πρώτη ημέρα μετά την μόλυνση διαπιστώθηκε ενδοκυττάριο οίδημα στη βάση των δευτερογενών νηματίων των βραγχίων. Οίδημα στα χλωριοκύτταρα παρατηρήθηκε περιστασιακά και σε ιχθύδια της ομάδας των μαρτύρων. Μερική αποκόλληση του επιθηλίου των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων διαπιστώθηκε τη δεύτερη ημέρα, η οποία επεκτάθηκε στη συνέχεια και σε ορισμένα περιστατικά οδήγησε σε πλήρη αποφολίδωση του αναπνευστικού επιθηλίου. Σπανιότερα διαπιστώθηκαν ρήξεις των τριχοειδών αγγείων των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων, υπερπλασία των στηλοειδών κυττάρων ή νέκρωση και αποκόλληση των νηματίων στο σύνολό τους. Σπάνια επίσης, παρατηρήθηκε διεύρυνση και υπεραϊμία των αγγείων των πρωτογενών νηματίων και εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις στη βάση, τόσο των δευτερογενών, αλλά σπανιότερα, και των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων κατά την εξέλιξη της νόσου. Οι περιγραφείσες αλλοιώσεις αφορούν στα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων.

Για την πληρέστερη περιγραφή των αλλοιώσεων που παρατηρήθηκαν στα βράγχια το όργανο βαθμολογήθηκε συνολικά (0-6). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της βαθμολόγησης παρουσιάζεται στο Γράφημα 46 και τον αντίστοιχο Πίνακα 52.



	1	2	3	4	6	9	14
<b>P+</b>	abcd	cdef	bcde	abc	bcd	a	abcd
<b>P-</b>	bcde	abc	bcd	bcd	bcde	abcd	ab
<b>M</b>	bcd	fg	efg	efg	g	def	fg

**Πίνακας 52:** Τα κελιά αντιστοιχούν στους μέσους όρους βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου των ιχθύων της εκάστοτε δειγματοληψίας. Κελιά που δεν περιλαμβάνουν το ίδιο γράμμα a,b,c,d,e,f,g, υποδηλώνουν σημαντική διαφορά μεταξύ των αντίστοιχων μέσων όρων ( $P < 0.05$ ).

**Γράφημα 46:** Η μεταβολή του μέσου όρου της βαθμολόγησης της εξεταζόμενης παραμέτρου, στους ιχθύες των πειραματικών ομάδων P+, P- και M, σε συνάρτηση με το χρόνο.

**Περιτόναιο**

Το περιτόναιο εμφανίστηκε σε αρκετές περιπτώσεις οιδηματώδες από την δεύτερη ημέρα μετά την μόλυνση, ενώ από την τρίτη ημέρα διαπιστώθηκε σποραδικά περιτονίτιδα χαρακτηριζόμενη από αθροίσεις μακροφάγων και ουδετεροφίλων, κυτταρικών ρακών και βακτηριδίων. Σπανιότερα διαπιστώθηκαν εστιακές αιμορραγίες. Οι παραπάνω αλλοιώσεις αφορούσαν στα ιχθύδια και των δύο πειραματικών ομάδων. Το όργανο δεν βαθμολογήθηκε.

**Γονάδες**

Οι γονάδες των ιχθυδίων, άωρες στις περισσότερες περιπτώσεις λόγω της ηλικίας αυτών, δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτες αλλοιώσεις πέραν της παρουσίας ήπιου οιδήματος στο διάμεσο συνδετικό ιστό και εκφύλισης των γεννητικών κυττάρων, σε σπάνιες περιπτώσεις, σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Για το λόγο αυτό τα όργανα δεν βαθμολογήθηκαν.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Δονακίωση, όπως εκτενώς περιγράφηκε στο Γενικό μέρος της παρούσας μελέτης, αποτελεί το πρώτο διαγνωσμένο νόσημα των ιχθύων και ένα από τα πλέον μελετημένα βακτηριδιακά νοσήματα λόγω της παγκόσμιας γεωγραφικής του εξάπλωσης, του μεγάλου αριθμού και της ποικιλίας των υδρόβιων οργανισμών που προσβάλλει, αλλά κυρίως και σε συνδυασμό με την μεγάλη οικονομική σημασία που απέκτησε, αφού αποτέλεσε το σημαντικότερο ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη της ιχθυοτροφίας παγκοσμίως.

Το *Vibrio anguillarum* παραμένει ο σημαντικότερος αιτιολογικός παράγοντας της Δονακίωσης, παρά την απομόνωση και ταυτοποίηση πλήθους βακτηριδιακών ειδών του γένους *Vibrio*, ως αιτιολογικών παραγόντων του νοσήματος. Πολυάριθμες μελέτες, τις τελευταίες δεκαετίες, καταγράφουν τα χαρακτηριστικά των διαφόρων ειδών του γένους *Vibrio* και των ποικίλων στελεχών του είδους *V. anguillarum* σε μια προσπάθεια να περιγράψουν ένα «χαοτικό» εν πολλοίς γένος. Από τη δεκαετία του 1980 και εντεύθεν, με την ανάπτυξη των μεθόδων της μοριακής μικροβιολογίας, τμήμα της έρευνας εστιάστηκε στην προσπάθεια προσδιορισμού των παραγόντων παθογόνου δράσης του βακτηριδίου με σκοπό τη συμβολή στην κατανόηση της παθογένειας του νοσήματος.

Η κλινική εικόνα των διαφόρων μορφών του νοσήματος έχει αρκούντως περιγραφεί σε διάφορα είδη με σημαντικές ή μη παραλλαγές, ενώ οι αμιγώς ιστοπαθολογικές μελέτες που αφορούν το νόσημα είναι συγκριτικά ελάχιστες. Η αναγκαιότητα πρόληψης και καταπολέμησης της νόσου, την περίοδο της ραγδαίας ανάπτυξης των ιχθυοκαλλιεργειών παγκοσμίως, οδήγησε μεγάλο τμήμα της έρευνας στην μελέτη της ανασοπαθολογίας της νόσου, με αποτέλεσμα η πρωτογενής έρευνα στην παθογένεια του νοσήματος να υπολείπεται. Σε αυτό συνέβαλε βεβαίως και η ούτως ή άλλως υπολειπόμενη γνώση μας στη βιολογία των υδρόβιων οργανισμών λόγω της μεγάλης ετερογένειάς τους και των εγγενών δυσκολιών στη συγκριτική μελέτη και αντιστοίχιση δεδομένων από τα ανώτερα θηλαστικά.

Με αυτά τα δεδομένα η παρούσα μελέτη συγκροτήθηκε και πραγματοποιήθηκε προσανατολισμένη σε τρία κύρια επίπεδα. Την καταγραφή του συνόλου των υφιστάμενων δεδομένων για το νόσημα με ιδιαίτερο προσανατολισμό στην ιστολογική του εικόνα και την πειραματική επιβεβαίωση αυτής. Την προσπάθεια σύνδεσης της εκτεταμένης ερευνητικής εργασίας που πραγματοποιείται διεθνώς και αφορά σε χαρακτηριστικά του βακτηριδίου με την παθογένεια του νοσήματος και τις προκαλούμενες από το νόσημα αλλοιώσεις. Και τέλος την

ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου τέτοιου, που να δίνει εύκολα και αξιόπιστα τη δυνατότητα εφαρμογής του σε πλήθος ανάλογων ερευνητικών δοκιμών στο πεδίο της ιχθυοπαθολογίας.

### **Μικροβιολογικές, μοριακές και ιστοπαθολογικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν**

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε το εγχώριο στέλεχος *V. anguillarum* Van1, το οποίο είχε απομονωθεί από εμπορική ιχθυοκαλλιέργεια, και από το οποίο δημιουργήθηκε το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος Van731. Στη διεθνή βιβλιογραφία ελάχιστες είναι οι δημοσιεύσεις που περιλαμβάνουν στελέχη από τον Ελλαδικό χώρο (Pedersen και συν. 1994, Skon και συν. 1995, Pedersen και συν. 1999β). Το σύνολο των βακτηριδιακών αυτών στελεχών ανήκει στον O1 ορότυπο, διαθέτει πλασμίδιο όμοιο με το pJM1, μεγέθους 67kb, και εμφανίζει φαινοτυπική ομοιομορφία. Το Van1, έχοντας ταυτόσημα με τα παραπάνω στελέχη χαρακτηριστικά, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο στέλεχος, με εγχώριο ενδιαφέρον, σε ανάλογες με την παρούσα μελέτες.

Τα βακτηριδιακά στελέχη καλλιεργήθηκαν με επιτυχία σε κοινά υποστρώματα (TSB, TSA) με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου, ως εκ τούτου δεν κρίθηκε αναγκαία η χρήση ειδικών, για θαλάσσια βακτηρίδια, υποστρωμάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι, σε συμφωνία με τον Pedersen. (1997), δεν διαπιστώθηκε διαφορά στην ανάπτυξη των στελεχών Van1 και Van731 στα καλλιεργητικά υποστρώματα, άρα η παρουσία ή απουσία του πλασμιδίου pKTP δεν επηρέασε την ανάπτυξη αυτή.

Η δυνατότητα χρήσης της PCR για την ταυτοποίηση των στελεχών αποτέλεσε την πλέον αξιόπιστη λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα, αφού ουσιαστικά με τη σειρά των μικροβιολογικών και βιοχημικών δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν, καταγράφηκε το φαινοτυπικό προφίλ των στελεχών, χωρίς την αναγκαιότητα χρήσης ενός από το πλήθος των ταυτοποιητικών σχημάτων που αναφέρονται στην κλασική μικροβιολογία. Για την ταυτοποίηση των στελεχών επιλέχθηκε το γονίδιο *amiB* (Ahn και συν. 2006) και όχι το γονίδιο *proN* (O'Toole και συν. 1997), που έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, διότι το δεύτερο δε διαχωρίζει υπό ορισμένες συνθήκες το *V. anguillarum* με το *V. ordalii*, διάκριση απαραίτητη μεταξύ δύο στενά συγγενικών ειδών (Gonzalez και συν. 2003, Hong και συν. 2007).

Για την αφαίρεση του πλασμιδίου του Van1 και τη δημιουργία του γενετικά τροποποιημένου Van731, επιλέχθηκε η μέθοδος της θερμικής καταπόνησης (Trevors. 1986), ως ηπιότερης από αντίστοιχες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή πλασμιδίων από βακτηριδιακά στελέχη, όπως η χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας ή η επίδραση χημικών ουσιών

στα βακτηρίδια (π.χ. SDS, ethidium bromide κ.α.) (Tomoeda και συν. 1968, Rubin και Rosenblum. 1971, Sonstein και Baldwin. 1972). Με τη μέθοδο αυτή θέλαμε να αποφύγουμε τυχόν ανεπιθύμητες μεταβολές στο χρωμοσωμικό DNA του βακτηριδίου και η επιλογή επιβεβαιώθηκε, κατά το δυνατόν, αφού δεν υπήρξε καμία μεταβολή στο φαινοτυπικό προφίλ του βακτηριδίου που απώλεσε το πλασμίδιό του.

Η εφαρμογή της μεθόδου των Kado και Liu (1981) στον έλεγχο μεμονωμένων αποικιών, μετά την θερμική καταπόνηση του Van1, για την ανεύρεση γενετικά τροποποιημένου στελέχους δεν εμφάνισε σταθερά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό υποβοηθητικά χρησιμοποιήθηκε το CAS άγαρ. Με την τροποποίηση του υποστρώματος των Niven και συν. (1981) πετύχαμε, σε αντίθεση με τους Actis και συν. (1999β), την ανάπτυξη των στελεχών *V. anguillarum* στο HR άγαρ. Και το HR άγαρ όμως έδωσε, σε συμφωνία με τους Actis και συν. (1999β), ψευδή θετικά αποτελέσματα.

Η επιλογή των γονιδίων *angR* και *angH*, από μία σειρά διαθέσιμων από τη βιβλιογραφία πλασμιδιακών γονιδίων του *V. anguillarum*, όπως τα *angT*, *angM*, *angB/G*, *angN*, *angU* κ.α. (Wertheimer και συν. 1999, Welch και συν. 2000, Di Lorenzo και συν. 2004, Alice και συν. 2005), για την επιβεβαίωση της γενετικής τροποποίησης του Van1, υπήρξε στοχευμένη. Πέραν του γεγονότος ότι επιβεβαίωσε την γενετική τροποποίηση εξασφάλισε χωρίς αμφιβολία, τόσο την αδυναμία παραγωγής σιδηροφόρου μορίου, όσο και την αδυναμία σύνθεσης ισταμίνης από το γενετικά τροποποιημένο Van731.

Η αδυναμία σύνθεσης ισταμίνης από το Van731, ελλείψη λειτουργικού υποστρώματος, επιβεβαιώθηκε με τη χρήση της HPLC σε μία πρώτη εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου στην παρούσα έρευνα. Η HPLC έχει αυξημένο κόστος, απαιτεί ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό είναι όμως η πλέον αποτελεσματική και ευαίσθητη από τις υπόλοιπες αναλυτικές μεθόδους και η επίσημη τεχνική για την ανάλυση ισταμίνης στα τρόφιμα (Marcobal και συν. 2006).

Από τις χρώσεις κατά Gram, οι οποίες δοκιμάστηκαν για την κατάδειξη των θέσεων του βακτηριδίου στη μελέτη της κινητικής του, η χρώση Brown και Horps (1973) (τροποποίηση Prophet και συν. (1992)) παρουσίασε τα πιο σταθερά αποτελέσματα.

Για την πραγματοποίηση του φθορίζοντος in situ υβριδισμού χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης ένα ειδικό για το *V. anguillarum*, συμπληρωματικό του 16S rRNA, ολιγονουκλεοτίδιο, το VaV3. Ο ιχνηθέτης αυτός, μόνος ή σε συνδυασμό με εκλεκτικά υποστρώματα, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ταυτοποίηση στελεχών *V. anguillarum* με τη χρήση υβριδισμού ή υβρισμού μετά από PCR σε βακτηριδιακές αποικίες (Martinez-Picado και συν. 1996). Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιείται για πρώτη φορά για την κατάδειξη των θέσεων του

βακτηριδίου σε ιστολογικές τομές. Τα αποτελέσματα κρίθηκαν ικανοποιητικά, υπάρχουν ωστόσο περιθώρια βελτίωσης του προτεινόμενου πρωτοκόλλου.

### **Πειραματόζωα, πειραματικές μολύνσεις και μέθοδοι δειγματοληψίας**

Η επιλογή του λαβρακιού ως πειραματόζωου, όπως προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος, προέκυψε από την αναγκαιότητα μελέτης ενός είδους με εγχώριο ενδιαφέρον, αφού το λαβράκι με την τσιπούρα είναι τα συχνότερα καλλιεργούμενα είδη στην Ελλάδα, αλλά και σε ολόκληρη τη Μεσόγειο. Επιπλέον πειραματικά δεδομένα από αντίστοιχες της έρευνάς μας μελέτες στο συγκεκριμένο είδος είναι ελάχιστα, αφού το πλήθος των βιβλιογραφικών αναφορών αφορούν σε είδη που εκτρέφονται στο Βόρειο Ατλαντικό ή τον Ειρηνικό Ωκεανό (Egidius. 1987, Larsen και Olsen. 1991, Bricknell και συν. 2000, Agius και Roberts. 2003, Wang και συν. 2003).

Η επιλογή του μεγέθους των πειραματόζωων εξυπηρέτησε πολλαπλούς σκοπούς. Αφενός επέτρεψε τη συμμετοχή στους πειραματισμούς ενός ικανού αριθμού πειραματόζωων, τέτοιου που να επιτρέπει τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, αφετέρου έδωσε την δυνατότητα ιστοπαθολογικής εξέτασης για κάθε ιχθύδιο ως μεμονωμένο περιστατικό. Η δε διαχείριση τους κατά τη διάρκεια των πειραματισμών δεν ήταν ιδιαίτερος απαιτητική. Θα πρέπει να επαναληφθεί ότι τα λαβράκια προσαρμόστηκαν αρκούτως ικανοποιητικά, στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Τα ιχθύδια που μετείχαν στις μελέτες μας προήλθαν από ιχθυογεννητικό σταθμό. Αυτό είχε ως πλεονέκτημα, ότι τα ιχθύδια ήταν ανοσολογικά ώριμα, λόγω της επιλεχθείσας ηλικίας, δεν είχαν όμως άμεσα ή έμεσα ανοσοποιηθεί έναντι του νοσήματος, αφού δεν ήταν εμβολιασμένα και δεν είχαν έρθει σε επαφή με άλλα ψάρια σε θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς.

Η θερμοκρασία του νερού, στην οποία πραγματοποιήθηκαν οι κύριες πειραματικές μολύνσεις, επιλέχθηκε κυρίως βάσει των αντίστοιχων θερμοκρασιών, στις οποίες συνήθως εκδηλώνεται το νόσημα σε φυσικά περιστατικά. Η αναστολή λήψης τροφής από τα ιχθύδια σε αυτή τη θερμοκρασία δε φαίνεται να επηρέασε την εκδήλωση του νοσήματος. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις της Δονακίωσης είναι εντονότερες όταν το νόσημα εκδηλώνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Richards. 1980). Παρά το γεγονός ότι ένας εκ των στόχων της μελέτης ήταν η ιστολογική εικόνα του νοσήματος, επιλέξαμε χαμηλή θερμοκρασία στους κύριους πειραματισμούς, αφενός για να προσεγγίσουμε το φυσικό πρότυπο μόλυνσης και αφετέρου για να καταπονήσουμε το δονάκιο (Groberg και συν. 1983) προκειμένου να εκδηλώσει το σύνολο των μηχανισμών που διαθέτει για να εκδηλώσει την παθογόνο δράση του. Οι Sawyer και συν. (1979) πέτυχαν σε αντίστοιχη θερμοκρασία (10-15<sup>0</sup>C) και με εμβάπτιση, θνησιμότητα 80-100% σε πληθυσμό σολωμών του Ατλαντικού με τη χρήση στελέχους υψηλής λοιμογόνου δύναμης. Οι

θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι προπείραματικές μολύνσεις προσέγγισαν τις βέλτιστες για το βακτηρίδιο εργαστηριακές συνθήκες ανάπτυξης του και πρέπει να σημειωθεί, ότι πράγματι οι ιστολογικές εξετάσεις των ιχθυδίων των προπείραματικών μολύνσεων κατέδειξαν εντονότερες αλλοιώσεις της νόσου σε σχέση με τους κύριους πειραματισμούς (δεδομένα δεν εμφανίζονται).

Το σύνολο των πειραματικών μολύνσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εμβάπτισης. Η επιλογή της μεθόδου υπηρετούσε δύο στόχους: την προσέγγιση του τρόπου μόλυνσης των ψαριών στις φυσικές μολύνσεις και τη μικρότερη, κατά το δυνατό, καταπόνησή τους. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει περιγραφεί πλήθος μεθόδων για την πειραματική πρόκληση νόσου σε ψάρια. Στην έρευνά μας αποφύγαμε τη χρήση βοηθητικών, για την επιτυχή μόλυνση, μεταχειρίσεων, όπως για παράδειγμα την εφαρμογή υπερωσμωτικής μεθόδου (Ament και Fender. 1977) ή την πρόκληση μικροτραυματισμών (Kanno και συν. 1989) για να υποβοηθήσουμε την είσοδο του βακτηριδίου στους ιστούς των ψαριών. Οι Bricknell και συν. (2000) πραγματοποιούν μόλυνση με εμβάπτιση, με το μολυσματικό παράγοντα να τοποθετείται απευθείας στις δεξαμενές των ιχθύων. Στις μελέτες μας προτιμήθηκε η μεταφορά των ψαριών σε δεξαμενές μόλυνσης. Έτσι, ο χρόνος επίδρασης του μολυσματικού παράγοντα ήταν συγκεκριμένος, συμβάλλοντας περαιτέρω στην αξιοπιστία της συγκριτικής μελέτης των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Πρέπει να τονιστεί ότι σε κάθε περίπτωση οι χειρισμοί κατά το χρόνο των μολύνσεων, αλλά και στο σύνολο της διαχείρισης των πειραματόζωων, ήταν κατά το δυνατό ήπιοι, έτσι ώστε να μειωθεί η πιθανότητα, παράγοντες καταπόνησης να μεταβάλουν την εικόνα εκδήλωσης της νόσου.

Η διαδικασία δειγματοληψιών των ιχθύων, καθώς και η λήψη δειγμάτων από αυτούς για τη διενέργεια των προγραμματισμένων κατά περίπτωση εξετάσεων έχει περιγραφεί λεπτομερώς. Στόχος της διαδικασίας, που εφαρμόστηκε, ήταν η τυποποίηση των κινήσεων του ενεργούντος τους χειρισμούς έτσι, ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο ο χρόνος για την πραγματοποίησή τους. Στην παρούσα μελέτη, της οποίας ο κύριος στόχος ήταν η ιστοπαθολογική εξέταση των ιχθύων – πειραματοζώων, ο χρόνος από τη θανάτωση των ιχθύων μέχρι τη μονιμοποίηση των ιστών είναι κρίσιμος. Είναι διεθνώς αποδεκτό (Roberts. 2001, Ferguson. 1995) ότι πλήθος δημοσιευμένων αλλοιώσεων νοσημάτων ιχθύων, λόγω του ευαλοίωτου των ιστών τους, αφορούν πιθανά σε αυτολυτικές αλλοιώσεις. Στη συγκεκριμένη μελέτη, με την τυποποίηση των διαδικασιών που προαναφέρθηκε και τη χρησιμοποίηση μαρτύρων, αποκλείσαμε το ενδεχόμενο αυτό από τα αποτελέσματα των πειραματισμών μας.

### **Πειραματικό πρότυπο για την παθολογοανατομική μελέτη νοσημάτων των ιχθύων**

Την τελευταία δεκαετία με την πρόοδο στη μελέτη της παθολογίας των ιχθύων ανέκυψε η αναγκαιότητα διαμόρφωσης προτύπων μελέτης, ανάλογων με αυτά των ανώτερων σπονδυλωτών. Η τεράστια ποικιλία των υδρόβιων οργανισμών και η συνεχώς αυξανόμενη αναγνώριση νέων παθολογικών οντοτήτων σε αυτούς επέτεινε αυτή την αναγκαιότητα. Η διαμόρφωση ενός προτύπου αφορά στην επιλογή του πειραματόζωου (π.χ. Scarigliati και συν. 2002, O'Toole και συν. 2004), τη μεθοδολογία της μελέτης (π.χ. Planas και συν. 2005) και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αυτής (π.χ. Bernet και συν. 1999), με τρόπο ώστε να παρέχεται η δυνατότητα συγκριτικής αξιολόγησης αποτελεσμάτων διαφορετικών μελετών σε συγγενή επιστημονικά αντικείμενα.

Το σύνολο των επιμέρους αντικειμένων της παρούσας μελέτης αντιμετωπίστηκε με τη λογική της δημιουργίας ενός προτύπου πειραματικής μελέτης βακτηριδιακών νοσημάτων των ιχθύων. Η επιλογή των πειραματόζωων και των συνθηκών πειραματισμού, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε στις πειραματικές μολύνσεις, η διαδικασία δειγματοληψιών των ιχθύων και το σύνολο των εξετάσεων, που διενεργήθηκαν σε αυτούς, εξυπηρετούν, σε συσχέτιση βεβαίως με το προς μελέτη αντικείμενο, το πρότυπο αυτό. Το πειραματικό αυτό πρότυπο μπορεί να εφαρμοστεί στη μελέτη παραγόντων λοιμογόνου ικανότητας των δονακίων αλλά και να επεκταθεί στη μελέτη παθογενετικών μηχανισμών άλλων, παθογόνων για τα ψάρια, βακτηριδίων.

Με δεδομένο τον προσανατολισμό της παρούσας μελέτης στα ιστοπαθολογικά ευρήματά της, η απόδοση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτών, δίνει ένα επιπλέον έρεισμα για την δημιουργία ενός προτύπου ιστοπαθολογικής εξέτασης παθολογικών καταστάσεων των ιχθύων, το οποίο αν εξελιχθεί μπορεί να λειτουργήσει συμπληρωματικά στη διαγνωστική προσέγγιση των καταστάσεων αυτών.

### **Μελέτη της πύλης εισόδου και της κινητικής του Van1 στο λαβράκι**

Πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών υπάρχουν για τον τρόπο με τον οποίο τα δονάκια καταφέρνουν να εισδύσουν στους ιστούς των ψαριών – ξενιστών και υπερνικώντας τους αμυντικούς φραγμούς τους, να διασπαρούν στα διάφορα όργανα αυτών (Ransom. 1978, Harbell και συν. 1979, Kanno και συν. 1989, Olsson και συν. 1996 κ.α.). Οι μελέτες αυτές προσπαθούν να ελέγξουν, τόσο στη δυνατότητα που έχουν τα βακτηρίδια να μολύνουν τα ψάρια από διάφορες οδούς μόλυνσης, όσο και την πιθανότητα να συμβαίνει αυτό στο φυσικό περιβάλλον. Σε κάθε περίπτωση η μόλυνση των ψαριών από δονάκια περιλαμβάνει τον αποικισμό των ιστών τους από



το βακτηρίδιο, την ανάπτυξη του βακτηριδίου με τη χρήση μηχανισμών όπως των συστημάτων δέσμευσης σιδήρου και τέλος την πρόκληση βλαβών στα ψάρια-ξενιστές μέσω εξωκυτταρικών προϊόντων των βακτηριδίων (Austin και Austin. 1993, Thompson και συν. 2004). Στην πρώτη φάση της μόλυνσης, στο στάδιο του αποικισμού, κεντρικό ρόλο παίζει η χημειοτακτική κίνηση που εμφανίζει το *V. anguillarum* (Bordas και συν. 1996, O'Toole και συν. 1999, Larsen και συν. 2001, κ.α.).

Στην πρώτη κύρια πειραματική μόλυνση ελέγχθηκε η πιθανή πύλη εισόδου και η κινητική του φυσικού στελεχούς *V. anguillarum* Van1. Η επιλογή της εμβάπτισης ως μεθόδου μόλυνσης με τον τρόπο που εφαρμόστηκε, μας δίνει τη δυνατότητα να θεωρούμε ότι προσεγγίσαμε ικανοποιητικά το φυσικό τρόπο μόλυνσης.

Πρέπει να τονιστεί, ότι η προσέγγισή μας στο πείραμα ήταν στα πλαίσια της συνολικής μας προσπάθειας να μελετήσουμε παθολογοανατομικά το νόσημα. Κατά συνέπεια η απλή παρουσία βακτηριδίων, χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία ενδείξεων αλλοιώσεων στους ιστούς δεν αποτέλεσε αντικείμενο της μελέτης μας. Οι Spanggaard και συν. (2000) σε μία, αντίστοιχη με την παρούσα, μελέτη στην ιριδιζούσα πέστροφα ομογενοποίησαν τα δείγματα των ιστών που εξέτασαν και εξήγαγαν συμπεράσματα από τους αριθμούς των βακτηριδίων που απομόνωσαν από το κάθε όργανο σε κάθε χρονική στιγμή. Οι Kanno και συν. (1990) είχαν εφαρμόσει την ίδια μεθοδολογία συνδυάζοντάς την, όμως, με εξέταση ιστοτεμαχίων δέρματος με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στην παρούσα μελέτη η κατάδειξη των θέσεων των βακτηριδίων πραγματοποιήθηκε με ειδικές χρώσεις και με FISH ενώ η εφαρμογή της PCR σε ιστοτεμάχια πρόνεφρου των μολυσμένων ιχθύων χρησιμοποιήθηκε μόνο ως διαγνωστικό εργαλείο. Η ανίχνευση και ταυτόχρονη ταυτοποίηση με PCR δονακίων στο σύνολο των οργάνων των μολυσμένων ιχθύων που εξετάστηκαν, θα έδινε, πιθανά, λόγω της ευαισθησίας της μεθόδου, αποτελέσματα διάφορα από αυτά που παρουσιάσαμε. Τα αποτελέσματα όμως αυτά δεν θα εξυπηρετούσαν τη συγκεκριμένη μελέτη όπου αναζητήθηκε η άμεση συσχέτιση της παρουσίας του βακτηριδίου με αρχόμενες αλλοιώσεις της νόσου.

Στην παρούσα έρευνα παρουσία διάσπαρτων βακτηριδίων διαπιστώθηκε στη βλέννη του δέρματος, των βραγχίων και της έδρας από τις πρώτες 2 και 4 ώρες μετά τη μόλυνση. Αθροίσματα όμως βακτηριδίων εντοπίστηκαν από τις 12 ώρες μόνο στο δέρμα και περισσότερα στις 20 ώρες και μάλιστα και στις εσωτέρες στιβάδες του, με την ταυτόχρονη εμφάνιση αρχόμενων ιστολογικών αλλοιώσεων. Στις προαναφερθείσες μελέτες οι Spanggaard και συν. (2000) απομόνωσαν βακτηρίδια από τα πτερύγια, το δέρμα, τα βράγχια και σε ένα δείγμα από το έντερο, από την έναρξη της μόλυνσης, ενώ οι Kanno και συν. (1990) απομόνωσαν βακτηρίδια από το δέρμα 6 ώρες μετά την μόλυνση. Οι Muroga και De La Cruz (1987) χρειάστηκαν 12 ώρες

για να απομονώσουν το βακτηρίδιο από το δέρμα. Οι διαφορές μεταξύ των ερευνών προκύπτουν πιθανά από τις διαφορετικές θερμοκρασίες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι πειραματισμοί, τα διαφορετικά είδη και μεγέθη ψαριών και τα διαφορετικά στελέχη βακτηριδίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Η σταδιακά αυξανόμενη παρουσία βακτηριδίων σε συνδυασμό με την αύξηση της έντασης των αλλοιώσεων στο δέρμα, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στην τρίτη πειραματική μόλυνση, συνεχίστηκε στις επόμενες δειγματοληψίες της μελέτης μας. Σε αντίθεση με το δέρμα, αθροίσεις βακτηριδίων παρατηρήθηκαν στα βράγχια από τις 44 ώρες συνοδευόμενες από ήπιες ιστολογικές αλλοιώσεις. Σε ότι αφορά στην έδρα η παρουσία βακτηριδίων στο δέρμα της περιπρωκτικής χώρας ήταν παρόμοια με αυτή των αντίστοιχων ιστοτεμαχίων δέρματος που εξετάζονταν σε κάθε ιχθύδιο. Η παρουσία όμως βακτηριδίων στο τελικό τμήμα του απευθυμένου δεν διέφερε από αυτή στο υπόλοιπο τμήμα του εντέρου. Οι Spanggaard και συν. (2000) διαπιστώνουν σταθερά στατιστικώς σημαντική διαφορά στο αριθμό των βακτηριδίων που απομονώνουν από το δέρμα σε σχέση με τα βράγχια από τις 12 ώρες και με τις υπόλοιπες θέσεις δειγματοληψίας έως και τις 48 ώρες μετά την μόλυνση οπότε και αρχίζουν να παρατηρούν κλινικά συμπτώματα της νόσου. Βακτηρίδια από το έντερο απομόνωσαν σε ελάχιστα δείγματα και μάλιστα σε προχωρημένο στάδιο της μόλυνσης. Με βάση τα παραπάνω θεωρούν ότι κύρια θέση αποικισμού του *V. anguillarum* αποτελεί το δέρμα.

Με την άποψη των Spanggaard και συν. (2000) και προγενέστερων μελετών (Muroga και De La Cruz. 1987, Kanno και συν. 1989, 1990 κ.α.) συντάσσεται και η παρούσα έρευνα στην οποία αποδεικνύεται ότι πύλη εισόδου του *V. anguillarum* στις συνθήκες της συγκεκριμένης μελέτης αποτέλεσε το δέρμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι στη μελέτη των Kanno και συν. (1989) δεν περιλαμβάνεται εξέταση του εντέρου, ενώ αυτή των Kanno και συν. (1990) εξετάζει μόνο το δέρμα ως πιθανή πύλη εισόδου του βακτηριδίου. Αυτό όμως ισχύει και για την έρευνα των Baudin-Laurencin και Germon (1987), που προτείνουν τα βράγχια ως πύλη εισόδου του βακτηριδίου χωρίς να περιλαμβάνουν εξέταση ιστοτεμαχίων δέρματος στη μελέτη τους. Θα πρέπει λοιπόν να εκτιμηθούν διαφορετικά οι έρευνες που αναζητούν την δυνατότητα να εισδύσει το βακτηρίδιο στο ψάρι-ξενιστή από διάφορες πύλες εισόδου, με αυτές, όπως η παρούσα μελέτη, που διερευνούν αυτό που πιθανά συμβαίνει στη φυσική μόλυνση.

Το έντερο έχει επίσης αναφερθεί ως αρχική θέση μόλυνσης των ψαριών από το *V. anguillarum*. Μάλιστα οι O'Toole και συν. (1999) αναφέρουν ότι το βακτηρίδιο εμφανίζει μεγαλύτερη χημειοτακτική δραστηριότητα στην εντερική βλέννη σε σχέση με τη βλέννη του δέρματος. Στη μελέτη μας διαπιστώθηκαν από τις 20 ώρες σε ελάχιστα δείγματα διάσπαρτα βακτηρίδια στον αυλό ή/και στη βλέννη του εντέρου και σε καμία περίπτωση αθροίσματα

βακτηριδίων και αποικισμός του εντέρου. Η δυνατότητα του βακτηριδίου να προσκολληθεί και να διεισδύσει στο εντερικό επιθήλιο έχει αποδειχθεί (Olsson και συν. 1996). Οι Olsson και συν. σε μεταγενέστερη μελέτη τους (1998) με χορήγηση βακτηριδίων με την τροφή από το στόμα, διαπιστώνουν ότι ικανός αριθμός ζωντανών βακτηριδίων μπορεί να διέλθει από το στομάχο, παρά το όξινο pH του, και να εντοπισθεί στο έντερο και τα κόπρανα ιχθυδίων. Αναφέρουν την απομόνωση βακτηριδίων από το σπλήνα εικάζοντας συστηματική μόλυνση, δεν περιλαμβάνουν όμως μελέτη θνησιμότητας στο πρότυπο πειραματικής μόλυνσης που προτείνουν.

Μόλυνση με κατάποση έχει διαπιστωθεί σε λάρβες ψαριών, όπου ο στομάχος δεν είναι ακόμη λειτουργικός, ώστε το όξινο pH του, να αποτελέσει φραγμό για τη διόδο των δονακίων προς το έντερο. Στην πιο πρόσφατη από τις μελέτες αυτές οι O'Toole και συν. (2004) εντοπίζουν φθοριοσημασμένα βακτηρίδια αρχικά στον πεπτικό σωλήνα και στη συνέχεια στο δέρμα, 2 και 6 ώρες αντίστοιχα, μετά τη μόλυνση λαρβών zebrafish. Στην ίδια μελέτη μη χημειοτακτικό, με αδρανοποιημένο το *cheR* γονίδιο, ανάλογο του φυσικού, βακτηριδιακό στέλεχος δεν καταφέρνει να αποικίσει το δέρμα, αποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο της χημειοταξίας στην μόλυνση από το δέρμα. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε μελέτη των O'Toole και συν. (1997) όπου η αδρανοποίηση του *groN* γονιδίου, που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του πολικού μαστιγίου και άρα της κινητικότητας του βακτηριδίου, μείωσε σημαντικά τη λοιμογόνο δύναμη του στελέχους σε μόλυνση με εμβάπτιση, όχι όμως και σε ενδοπεριτοναϊκή μόλυνση. Οι Ringo και συν. (2006) σε μόλυνση με εμβάπτιση νεογέννητων ιχθυδίων περιγράφουν με τη χρήση TEM αλλοιώσεις στο έντερο χωρίς όμως να καταφέρνουν να εντοπίσουν το *V. anguillarum*. Τέλος οι Engelsen και συν. (2008) δεν κατάφεραν να καταλήξουν σε ασφαλές συμπέρασμα για την πύλη εισόδου του βακτηριδίου. Μολύνοντας αυγά με εμβάπτιση πέτυχαν αυξημένη θνησιμότητα σε νεογέννητες λάρβες. Χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημική μέθοδο δεν διαπίστωσαν βακτηρίδια στο δέρμα, ενώ εντόπισαν αθροίσματα βακτηριδίων στην περιοχή των βραγχίων και ελάχιστα στον αυλό του εντέρου χωρίς όμως ενδείξεις αποικισμού ή εισόδου στους ιστούς. Θεωρούν δε ότι οι Grisez και συν. (1996) στο δικό τους πρότυπο, με το οποίο πέτυχαν μόλυνση μέσω τροχοζών από το στόμα, ανιχνεύουν τον διαλυμένο βακτηριδιακό LPS, για τον οποίο είναι συνήθως ειδικοί οι αντιοροί, και όχι ολόκληρα βακτηριδιακά κύτταρα τα οποία με ενδοκύτωση εντοπίστηκαν τελικά στο χόριο του εντέρου.

Συμπεράσματα διαφόρων πρόσφατων μελετών υποστηρίζουν τη δυνατότητα ή μη του βακτηριδίου να εισέλθει στο ψάρι-ξενιστή από τις προτεινόμενες πιθανές πύλες εισόδου μέσω της διαπίστωσης συγκεκριμένων μηχανισμών. Έτσι οι Irie και συν. (2004), σε συνέχεια των Balebona και συν. (2001), που υποστηρίζουν ότι η προσκόλληση του *V. anguillarum* σε κύτταρα δε γίνεται μόνο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων αλλά και με ειδικούς υποδοχείς,

διαπιστώνει, σε *in vitro* μελέτη, ότι η γαλακτοσυλκεραμίδη (GalCer) μπορεί να δράσει ως υποδοχέας για την προσκόλληση του *V. anguillarum* στο έντερο. Οι Iijima και συν. (2003), απομονώνουν αντιβακτηριδιακές πεπτίδες από τα επιθηλιακά κύτταρα των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων της τσιπούρας. Πλήθος μελετών (Olsson και συν. 1992, Sugita και συν. 1997, Soda και συν. 1998, Spanggaard και συν. 2001 κ.α.) διαπιστώνουν την ανασταλτική, έναντι της ανάπτυξης του *V. anguillarum*, δράση στελεχών της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του δέρματος, των βραγχίων και του εντέρου διαφόρων ειδών ψαριών, δράση που φαίνεται να επηρεάζει τη δυνατότητα του βακτηριδίου να πολλαπλασιαστεί στα αντίστοιχα επιθήλια. Σε μία εκτεταμένη μελέτη όπου χρησιμοποιείται μοντέλο μόλυνσης ιριδιζουσας πέστροφας, οι Croxatto και συν. (2007), διαπιστώνουν την παρουσία του *V. anguillarum* στη βλέννη του δέρματος στις 5 ώρες, την προσκόλλησή του στα λέπια στις 12 ώρες και το σχηματισμό βιομεμβράνης, *in vitro*, στις 24 ώρες μετά την μόλυνση. Στη μελέτη αυτή εντοπίζουν δύο οπερόνια του βακτηριδίου τα οποία παίζουν ρόλο στον αποικισμό του δέρματος του ψαριού και κατά συνέπεια στη λοιμογόνο ικανότητα του στελέχους. Το πρώτο κωδικοποιεί πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας, ενώ το δεύτερο οπερόνιο κωδικοποιεί την παραγωγή σεκρετίνης, τυροσινικής κινάσης και τυροσινικής φωσφατάσης, πρωτεϊνών όμοιων με αυτές του πολυσακχαριδικού συστήματος μεταφοράς του βακτηριδίου. Με τη χρήση μεταλλαγμένων, για συγκεκριμένα γονίδια των δύο οπερονίων, στελεχών, προτείνουν την παρουσία ενός εξωπολυσακχαριδικού συστήματος μεταφοράς στο *V. anguillarum*, το οποίο είναι απαραίτητο για την προσκόλληση του βακτηριδίου στο δέρμα του ψαριού, και λειτουργεί πιθανά αποτρέποντας τη μηχανική απομάκρυνση του βακτηριδίου μέσω της φυσιολογικής αντικατάστασης της βλέννης του δέρματος. Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί μία πιθανή εξήγηση για την δυνατότητα εισόδου του βακτηριδίου στους ιστούς του ψαριού από το δέρμα, όπως παρατηρήσαμε να συμβαίνει στη δική μας έρευνα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι στη μελέτη μας οι περιοχές του δέρματος στις οποίες διαπιστώθηκε σημαντική παρουσία βακτηριδίων, ήταν συνήθως υπερκείμενες ερυθρών γραμμωτών μυών και κατά συνέπεια αυτές, που στη συνέχεια παρουσίασαν τις πλέον έντονες αλλοιώσεις στο δέρμα και τους υποκείμενους μύες. Είτε τα βακτηρίδια προσελκύθηκαν σε μεγαλύτερους αριθμούς για άγνωστο λόγο στις συγκεκριμένες περιοχές, είτε πολλαπλασιάστηκαν εντονότερα μετά την άφιξή τους, λόγω πιθανά ευνοϊκότερου ιστικού υποστρώματος, κάτι που μένει να διευκρινιστεί. Η διαφορετική φυσιολογική λειτουργία και κατά συνέπεια το διαφορετικό μικροπεριβάλλον μεταξύ ερυθρών και λευκών γραμμωτών μυών των ψαριών μπορεί να αποτελεί εξήγηση για την εκλεκτική εντόπιση των βακτηριδίων στις συγκεκριμένες θέσεις.

Στη μελέτη μας δεν κατέστη δυνατή η ακριβής διαπίστωση ενός προτύπου διασποράς του βακτηριδίου στους διάφορους ιστούς και όργανα των ψαριών. Παρουσία μικρού αριθμού

διάσπαρτων βακτηριδίων διαπιστώθηκε στο σπλήνα σε ένα δείγμα στις 12 ώρες και σε πέντε από τα έξι δείγματα στις 20 ώρες μετά την μόλυνση οπότε και εντοπίστηκαν σποραδικά βακτηρίδια στο νεφρό και την καρδιά. Η εμφάνιση αθροισμάτων βακτηριδίων στο σπλήνα ήταν σταθερή από τις 28 ώρες μετά την μόλυνση. Η εντονότερη παρουσία βακτηριδίων στο σπλήνα, και σχετικά προγενέστερα από την εντόπιση θέσεων βακτηριδίων στα υπόλοιπα εσωτερικά όργανα αυξάνει την πιθανότητα το βακτηρίδιο, μετά την επιτυχή διείσδυσή του από το δέρμα, να φθάνει μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου στο σπλήνα και από εκεί να διασπείρεται σε όλο τον οργανισμό. Παρόμοια υπόθεση διατυπώνει ο Munro ήδη από το 1982, αναφέροντας ότι μόλις ένα βακτηρίδιο διαπεράσει το επιθήλιο των βραγχίων ή του εντέρου ή εισδύσει διαμέσου του δέρματος της εξωτερικής επιφάνειας του ψαριού, μπορεί να υποτεθεί ότι έχει πλέον διεισδύσει στο αίμα, τη λέμφο του ψαριού ή και στα δύο, ενώ οι Nelson και συν. (1985β) περιγράφουν, όπως προαναφέρθηκε, όμοιο με την παρούσα μελέτη πρότυπο διασποράς του βακτηριδίου.

Τέλος πρέπει να επισημανθεί ότι στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν αθροίσματα βακτηριδίων σε θέσεις όπως στο μεσομυϊκό ιστό, στο περιτόναιο και στους ορογόνους παρεγχυματικών οργάνων των ιχθύων, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το βακτηρίδιο εξαπλώνεται πιθανά και κατά συνέχεια ιστού. Δεχόμενοι τα αποτελέσματα μελετών που προαναφέρθηκαν (O'Toole και συν. 1996, O'Toole και συν. 1997, Ormonde και συν. 2000), βάση των οποίων η χημειοτακτική κίνηση του βακτηριδίου παίζει σημαντικό ρόλο μόνο στο στάδιο της προσκόλλησης και της εισόδου του βακτηριδίου στο ψάρι και όχι στην εξέλιξη της νόσου, ο μηχανισμός, που πιθανά εξηγεί τον τρόπο αυτό εξάπλωσης της μόλυνσης στους ιστούς του ψαριού, είναι ο μηχανισμός 'αντίληψης του βακτηριδιακής απαρτίας' (quorum sensing), τον οποίο και το *V. anguillarum* μεταξύ άλλων βακτηριδίων αποδείχθηκε ότι διαθέτει (Milton και συν. 1997, 2001, Croxatto και συν. 2002, 2004). Ο μηχανισμός αυτός αποτελεί εν ολίγοις ένα σύστημα ενδοεπικοινωνίας του βακτηριδιακού πληθυσμού, ο οποίος φαίνεται να λειτουργεί ως σύνολο. Πραγματοποιείται με την ανταλλαγή μορίων-σημάτων (π.χ. N-ακυλ-ομοσεριν-λακτόνες) μεταξύ των βακτηριδιακών κυττάρων και φαίνεται να ρυθμίζει τη βακτηριδιακή ανάπτυξη επηρεάζοντας την πυκνότητα των βακτηριδίων και την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για τη λοιμογόνο ικανότητά τους, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται τα βακτηρίδια (Williams και συν. 2000, Miller και Bassler. 2001).

### Μελέτη θνησιμότητας που προκλήθηκε από τα στελέχη Van1 και Van731

Πλήθος μελετών τις τελευταίες δεκαετίες έχει συνδέσει την παρουσία πλασμιδίων, σε στελέχη του *V. anguillarum*, με τη λοιμογόνο ικανότητάς τους. Πρωτοπόρα θεωρείται αυτή των Crosa και συν. (1980), οι οποίοι για πρώτη φορά συνέδεσαν, χρησιμοποιώντας ως γενετικό δείκτη γονίδια ανθεκτικά στην αμικικιλίνη, την παρουσία του πλασμιδίου pJM1 στο 775 στέλεχος του *V. anguillarum* με τη λοιμογόνο ικανότητά του. Οι Pedersen και συν. (1997) μελετώντας στελέχη του O1 ορότυπου καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι το σύνολο των παθογόνων στελεχών φέρει πλασμίδιο, μεγέθους 67kbp ή παράγωγο αυτού, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι τα στελέχη που φέρουν το πλασμίδιο αυτό είναι απαραίτητως παθογόνα. Η προκαλούμενη δε από τα παθογόνα στελέχη θνησιμότητα ποικίλλει. Έτσι παρά το γεγονός ότι στη παρούσα μελέτη αποδείχτηκε η αναλογία του Van1 με πρότυπα στελέχη που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ήταν επιβεβλημένη η μελέτη θνησιμότητας η οποία πραγματοποιήθηκε.

Το Van731 προκάλεσε, στη μολύνουσα δόση που χρησιμοποιήθηκε, περίπου 30 φορές μικρότερη θνησιμότητα σε σχέση με το ομόλογό του φυσικό στέλεχος Van1. Σε παρόμοιες παρατηρήσεις κατέληξαν και οι προαναφερθείσες μελέτες που σημειώνουν μείωση 1000 (Crosa και συν. 1980) και 2000 (Pedersen και συν. 1997) φορές στο LD<sub>50</sub> στελεχών από τα οποία αφαιρέθηκε το μεγέθους 67kbp πλασμίδιό τους. Η σημαντική μείωση της θνησιμότητας που προκλήθηκε από το γενετικά τροποποιημένο Van731 σε σχέση με το φυσικό στέλεχος Van1 αποδίδεται, βέβαια, ευθέως στην απουσία του πλασμιδίου pKTP από το Van731, αφού δεν υπάρχει άλλη διαπιστωμένη διαφορά μεταξύ των δύο στελεχών.

Στο πλασμίδιο pKTP επιβεβαιώθηκε η παρουσία συστήματος δέσμευσης σιδήρου, ανάλογου με το σύστημα που φέρει το πλασμίδιο pJM1 του στελέχους *V. anguillarum* 775 (ATCC), την ύπαρξη του οποίου διαπίστωσε ο Crosa το 1980 σε μία επίσης πρωτοπόρα μελέτη. Άρα η προκαλούμενη από το Van1 θνησιμότητα οφείλεται κατά κύριο λόγο στη λειτουργία του μηχανισμού αυτού και την παραγωγή σιδηροφόρου μορίου από το Van1, η οποία επίσης επιβεβαιώθηκε. Πλήθος βακτηριδίων (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* κ.α.) παράγουν ενδογενή ή εξωγενή σιδηροφόρα μόρια προκειμένου να χρησιμοποιήσουν το σίδηρο των ξενιστών τους. Από τα μέχρι πρότινος γνωστά ενδογενή σιδηροφόρα μόρια, αδιαμφισβήτητη συμμετοχή στη λοιμογόνο ικανότητα των βακτηριδίων που τα διαθέτουν έχει αποδειχθεί μόνο για το aerobactin και το anguibactin (Wooldridge και Williams. 1993).

Ανάλογες με την παρούσα μελέτες ολοκληρώνονται στο σημείο αυτό με την επιβεβαίωση της σημαντικής μείωσης της θνησιμότητας της προκαλούμενης από στελέχη τα οποία, είτε δεν διαθέτουν αντίστοιχα πλασμίδια, είτε απενεργοποιήθηκε με κάποια μέθοδο ο μηχανισμός

σύνθεσης σιδηροφόρου μορίου από αυτά (Crosa και συν. 1980, Singer και συν. 1991, Pedersen και συν. 1997, Wertheimer και συν. 1999, Muino και συν. 2001, Di Lorenzo και συν. 2004, κ.α.). Στην παρούσα μελέτη και σε μία προσπάθεια να διαπιστώσουμε το αποτέλεσμα της λειτουργίας του συστήματος δέσμευσης σιδήρου του βακτηριδίου στους ιστούς των ψαριών προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση της τρίτης πειραματικής μόλυνσης.

### **Παθολογοανατομική μελέτη της Δονακίωσης από τα στελέχη Van1 και Van731**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η τρίτη πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε με πρώτο στόχο την αναλυτική καταγραφή των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων της Δονακίωσης από *V. anguillarum* στο λαβράκι. Οι μέχρι πρότινος δημοσιευμένες αντίστοιχες μελέτες είναι ελάχιστες (Chart και Munn. 1980, Ransom και συν. 1984, Lamas και συν. 1994), ενώ πλήθος άλλων αντιμετωπίζει αποσπασματικά το αντικείμενο (Hacking και Budd. 1971, McCarthy. 1974). Επιπλέον είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιείται το λαβράκι, ως πειραματόζωο σε αντίστοιχη μελέτη. Ο δεύτερος στόχος ήταν να μελετηθεί η συμμετοχή του συστήματος δέσμευσης σιδήρου του βακτηριδίου στην εκδήλωση της παθογένειας του νοσήματος μέσω της συγκριτικής καταγραφής των αλλοιώσεων των ιστών των ιχθύων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Van731, το οποίο δεν διαθέτει το εν λόγω σύστημα.

Η κλινική εικόνα της νόσου, όπως αυτή προκλήθηκε στις πειραματικές μας συνθήκες από το φυσικό στέλεχος Van1, χαρακτηρίστηκε από αιφνίδιους θανάτους χωρίς αξιόλογη κλινική συμπτωματολογία και από την παρουσία στις περισσότερες περιπτώσεις δερματικών αλλοιώσεων. Η εικόνα αυτή ταυτίζεται με τις υπάρχουσες περιγραφές με τη διαφορά ότι εμείς δεν διαπιστώσαμε βλάβες στους οφθαλμούς, νευρικά συμπτώματα και αιμορραγικές εξελκώσεις στο δέρμα, συμπτώματα όμως, που χαρακτηρίζουν χρονιότερη μορφή της νόσου. Η απουσία τυπικών ελκών διαπιστώθηκε και με την ιστολογική εξέταση του δέρματος.

Η μακροσκοπική εξέταση των οργάνων των ιχθύων, πέραν του δέρματος, δεν απέδωσε αξιόλογες παρατηρήσεις αφού σπάνια διαπιστώθηκαν μικροαιμορραγίες στην καρδιά, το ήπαρ, το νεφρό, τη νηκτική κύστη και το περιτόναιο ή/και διάταση και υδαρές περιεχόμενο στον πεπτικό σωλήνα. Η εικόνα αυτή αποδίδεται, επίσης, στην οξεία διαδρομή της νόσου.

Το δέρμα, η καρδιά και ο σπλήνας εμφάνισαν τις εντονότερες αλλοιώσεις, με το ήπαρ και τους νεφρούς να έπονται, ενώ τα βράγχια και το γαστρεντερικό σύστημα φαίνεται να επηρεάστηκαν λιγότερο από τη μόλυνση.

Οι κυκλοφορικές διαταραχές, προεξάρχοντος του οιδήματος, φαίνεται να είναι οι επικρατούσες αλλοιώσεις στο σύνολο των οργάνων. Οίδημα ενδοκυτταρικό και μεσοκυττάριο

παρατηρήθηκε στην επιδερμίδα, στο επιθήλιο των ουροφόρων σωληναρίων και ηπιότερο στο επιθήλιο των βραγχίων και του εντέρου, κυρίως του οπισθίου τμήματος. Ενδοκυτταρικό οίδημα σημειώθηκε επίσης στο ενδοθήλιο των ελλειψοειδών αγγείων του σπλήνα, το ενδοθήλιο του κόλπου της καρδιάς και των αγγείων του συνόλου σχεδόν των οργάνων που εξετάστηκαν. Διάμεσο οίδημα διαπιστώθηκε στο χόριο του δέρματος, στον καρδιακό μυϊκό ιστό, στους γραμμωτούς μύες του κορμού και στις λείες μυϊκές στιβάδες των κοίλων οργάνων. Τα περιγραφόμενα οιδήματα ακολουθούνταν από εστιακές και συνηθέστερα διάχυτες νεκρώσεις, ενώ η τυπική εικόνα της υγροποιού νέκρωσης διαπιστώθηκε σπανιότερα.

Οι αιμορραγίες που σημειώθηκαν στο σύνολο των οργάνων ήταν συνήθως εστιακές, μικρής έκτασης πλησίον ή περίξ αγγείων, το ενδοθήλιο των οποίων είχε συνήθως διαρραγεί και σπανιότερα νεκρωθεί.

Η φλεγμονώδης αντίδραση των ιστών ακόμη και στα όργανα τα οποία εμφάνισαν τις εντονότερες αλλοιώσεις ήταν χαρακτηριστικά ήπια σε σχέση με το βαθμό μόλυνσης των οργάνων. Άυξηση των μακροφάγων και των ουδετεροφίλων διαπιστώθηκε στην οξεία φάση της νόσου κυρίως στο σπλήνα και τον κεφαλικό νεφρό και λιγότερο στην καρδιά και το δέρμα, ενώ μακροφάγα διαπιστώθηκαν σταθερά σε όλους τους ιστούς κατά την πορεία εξέλιξης της νόσου και όσο επιτείνονταν τα αιμολυτικά φαινόμενα και οι νεκρώσεις.

Εκτιμώντας τη συνολική εικόνα των αλλοιώσεων της οξείας μορφής της νόσου, όπως αυτή καταγράφηκε στη μελέτη μας, οφείλουμε να εστιάσουμε σε δύο ζητήματα: την επίδραση της μόλυνσης στα επιθήλια και τα ενδοθήλια των ιστών και των οργάνων και την προκαλούμενη από το βακτηρίδιο αιμόλυση.

Σχεδόν σταθερό εύρημα ήταν η αποφολίδωση του επιθηλίου της επιδερμίδας, των δευτερογενών βραγχιικών νηματίων και των λαχνών του εντέρου, χωρίς να παρατηρείται ταυτόχρονα βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων και σε χρόνο μεταγενέστερο στην πορεία της μόλυνσης. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με τη μη εντόπιση αθροισμάτων βακτηριδίων στη βασική μεμβράνη των επιθηλίων, που προέκυψε από τη δεύτερη πειραματική μας μόλυνση, οδηγεί στην υπόθεση ότι η προκαλούμενη στα επιθήλια βλάβη δεν είναι αποτέλεσμα τοπικής δράσης των βακτηριδίων, αλλά προκαλείται πιθανά λόγω του οιδήματος και της ρήξης των συνδέσεων των επιθηλιακών κυττάρων με το βασικό πέταλο. Κατ' αναλογία προκαλούνται και οι διαπιστούμενες αιμορραγίες στα παρεγχυματικά όργανα των ιχθύων, έπειτα από εξοίδηση και ρήξη πριν ή κατόπιν νεκρώσεως των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων.

Η προκαλούμενη από το βακτηρίδιο αιμόλυση διαπιστώνεται από την παρουσία μεγάλου αριθμού κατεστραμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων στα αγγεία, παρουσία ερυθροβλαστών στο αίμα και αύξηση της δραστηριότητας του ερυθρού πολφού του σπλήνα. Χαρακτηριστική είναι η



αύξηση του αριθμού των μακροφάγων με αιμοσιδηρίνη στο σπληνικό πολφό, του μεγέθους των μελανομακροφάγων κέντρων και η αύξηση των εναποθέσεων αιμοσιδηρίνης στο σπλήνα και γύρω από μεγάλα αγγεία. Οι εναποθέσεις αυτές δεν παρατηρούνται τις πρώτες ώρες μετά τη μόλυνση και αυτό εξηγείται πιθανά από το γεγονός ότι το βακτηρίδιο, με το σύστημα δέσμευσης σιδήρου που διαθέτει, εξαντλεί τα αποθέματα αυτά στη φάση της ταχείας ανάπτυξής του. Αυξημένες εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης παρατηρήθηκαν σε όλη τη διάρκεια της μόλυνσης με το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος Van731. Η απουσία από το στέλεχος της δυνατότητας να συνθέσει σιδηροφόρο μόριο και να δεσμεύσει σίδηρο από τους ιστούς οδήγησε στην αύξηση αυτών των εναποθέσεων.

Το Van731 δεν προκάλεσε βλάβες αντίστοιχες του φυσικού του ομολόγου. Οι αλλοιώσεις που προκλήθηκαν στα ιχθύδια από τη μόλυνση με το Van731, ήταν ηπιότερες σε ένταση και πιο περιορισμένες σε έκταση σε σχέση με αυτές που προκλήθηκαν από το Van1. Η παρουσία οιδημάτων ήταν και στην περίπτωση αυτή σταθερή, αλλά μικρότερης έντασης. Οι διαπιστούμενες νεκρώσεις ήταν περιορισμένες, ενώ αιμορραγίες σημειώθηκαν σπάνια. Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις ήταν του ίδιου τύπου και εκδηλώθηκαν εντονότερα με την πάροδο των ημερών κυρίως κατά τη διαδικασία αποκατάστασης της φυσιολογικής δομής των ιστών.

Ο Crosa (1980) θεωρεί ότι το σύστημα δέσμευσης σιδήρου του βακτηριδίου του παρέχει τη δυνατότητα να αναπτυχθεί αποτελεσματικότερα στο περιβάλλον των ιστών. Οι Crosa και συν. (1980) επισημαίνουν επίσης ότι μόλυνση με στέλεχος, που δε διαθέτει σύστημα δέσμευσης σιδήρου, αν πραγματοποιηθεί με αυξημένη μολύνουσα δόση, πιθανά θα προκαλέσει μακροσκοπικές αλλοιώσεις στα ιχθύδια παρόμοιες με αυτές που θα προκαλούσε στέλεχος που διαθέτει το εν λόγω σύστημα σε μόλυνση με χαμηλή μολύνουσα δόση. Η υπόθεση αυτή θεωρείται πιθανή αφού από την παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές ποιοτικές διαφορές στις αλλοιώσεις που προκλήθηκαν από τα δύο στελέχη Van1 και Van731.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω φαίνεται να αποδεικνύεται ότι το σύστημα δέσμευσης σιδήρου που διαθέτει το *V. anguillarum* αποτελεί μηχανισμό περισσότερο κρίσιμο για το μεταβολισμό του ίδιου του βακτηριδίου, παρά για την πρόκληση βλαβών στους ιστούς των ξενιστών του.

Το πλασμίδιο του Van1, το pKTP, φέρει, όπως αποδείχθηκε εκτός των άλλων, το γονίδιο *angH*, το οποίο κωδικοποιεί την παραγωγή της δεκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης. Το ένζυμο αυτό καταλύει, όπως προαναφέρθηκε, τη μετατροπή της ιστιδίνης των ιστών σε ισταμίνη. Η ισταμίνη συμμετέχει στο τελευταίο στάδιο σύνθεσης του σιδηροφόρου μορίου *anguibactin* από το βακτηρίδιο. Στην παρούσα μελέτη η παραγωγή ισταμίνης από το Van1 *in vitro* υπολογίστηκε περί τις δέκα φορές υψηλότερη από αυτή του Van731. Οι Barancin και συν. (1998) αναφέρουν,

ότι η ισταμίνη που παράγεται από βακτηριδιακά κύτταρα που διαθέτουν γονίδιο για την δεκαρβοξυλάση της ιστιδίνης, δεν χρησιμοποιείται στο σύνολό της ως πρόδρομη ουσία για τη βιοσύνθεση του anguibactin. Η περίσσεια ισταμίνης που ελευθερώνεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον ενδέχεται να εμπλέκεται στην παθογόνο δράση του βακτηριδίου. Μέχρι πρότινος θεωρούνταν ότι αφενός τα σιτευτικά κύτταρα των ψαριών διαθέτουν μόνο σεροτονίνη και όχι ισταμίνη, όπως τα αντίστοιχα των θηλαστικών, και αφετέρου ότι η ισταμίνη δεν είναι βιολογικά ενεργή στα ψάρια (Reite. 1965, 1972, Takaya και συν. 1967, Dezfuli και συν. 2000). Η αντίληψη αυτή δεν ήταν εσφαλμένη, δεν αφορούσε όμως το σύνολο των ιχθύων. Οι Mulero και συν. (2007) διαπιστώνουν την παρουσία ισταμίνης και όχι σεροτονίνης στα σιτευτικά κύτταρα των ιχθύων της σειράς Perciformes, στην οποία ανήκουν, μεταξύ άλλων, το λαβράκι και η τσιπούρα. Αποδεικνύουν επίσης ότι η ισταμίνη έχει φαρμακολογικές επιδράσεις, και άρα είναι βιολογικά ενεργή, στα συγκεκριμένα είδη ιχθύων και επιπλέον φαίνεται να εμπλέκεται στη φλεγμονική αντίδραση μέσω ενεργοποίησης των φαγοκυττάρων. Πρόσφατες δημοσιεύσεις επιβεβαιώνουν την παρουσία H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> και H<sub>3</sub> υποδοχέων ισταμίνης σε διάφορα είδη ιχθύων (Peitsaro και συν. 2000, 2007, Choich, 2004) Τα νεότερα αυτά δεδομένα, σε συνδυασμό με τις αλλοιώσεις που διαπιστώσαμε στην πειραματική μας μελέτη, μας επιτρέπουν να διατυπώσουμε την υπόθεση, ότι η ισταμίνη ενδέχεται, πέραν του ρόλου της ως πρόδρομης ουσίας του anguibactin, να εμπλέκεται και άμεσα στην εκδήλωση της παθογένειας της νόσου, υπόθεση που μέλλει να διερευνηθεί.

Κρίσιμη, τέλος, θεωρούμε επίσης τη μελέτη του είδους των τοξινών που πιθανά παράγει το βακτηρίδιο. Παραμένει ακόμη αδιευκρίνιστη η σύνθεση εξωκυτταρικών προϊόντων που παράγονται από το βακτηρίδιο και αποδεικνύονται τοξικά για τους ξενιστές του (Toranzo και συν. 1983β, Inamura και συν. 1984, Lamas και συν. 1994), η δομή και σε πολλές περιπτώσεις, η γονιδιακή ρύθμιση αιμολυσινών (Munn. 1980, Hirano και συν. 1996, Rodkhum και συν. 2005), πρωτεασών (Traxler και Li. 1972, Kodama και συν. 1984, Inamura και συν. 1985, Stensvag και συν. 1993) και άλλων εξωτοξινών (Kodama και συν. 1985, Perez και συν. 1998) που φέρονται να εμπλέκονται στην εκδήλωση της παθογένειας της νόσου. Οι αλλοιώσεις που προκλήθηκαν στα ιχθύδια κατά τη διάρκεια των πειραματικών μολύνσεων της παρούσας μελέτης είναι συμβατές με την παρουσία και επίδραση βακτηριδιακών τοξινών. Η μεθοδολογία των πειραματικών μολύνσεων που ακολουθήθηκε, θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε αντίστοιχες τέτοιες μελέτες.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα γενικά συμπεράσματα από την παρούσα έρευνα μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

-Το λαβράκι (*D. labrax*) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πειραματόζωο – πρότυπο για την παθολογοανατομική μελέτη νοσημάτων των ιχθύων.

-Η χρήση μοριακών τεχνικών εξασφαλίζει ταχύτητα και αξιοπιστία στην ανίχνευση και ταυτοποίηση βακτηριδίων, στον έλεγχο της παρουσίας παραγόντων λοιμογόνου ικανότητάς τους και στη διάγνωση νοσημάτων των ιχθύων.

-Η εφαρμογή πειραματικών προτύπων μολύνσεων, σε αντιδιαστολή με τη μελέτη φυσικών περιστατικών, είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση αξιόπιστων και σταθερών αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα στην πραγματοποίηση πρωτογενούς έρευνας.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας εξάγονται τα παρακάτω ειδικότερα συμπεράσματα:

-Πύλη εισόδου του *V. anguillarum* στις συνθήκες του πειραματισμού μας αποτέλεσε το δέρμα. Η εξάπλωση του βακτηριδίου στους ιστούς του λαβρακιού δεν αποδείχθηκε ότι ακολούθησε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο.

-Η προκαλούμενη από το *V. anguillarum* θνησιμότητα οφείλεται σε σημαντικό βαθμό, όχι όμως αποκλειστικά, στο πλασμίδιο που αυτό φέρει.

-Το δέρμα, η καρδιά και ο σπλήνας εμφάνισαν τις εντονότερες αλλοιώσεις στην οξεία μορφή της νόσου και μπορούν να θεωρηθούν ως όργανα – στόχοι του βακτηριδίου.

-Οιδήματα και νεκρώσεις παρατηρήθηκαν σταθερά σε όλα τα όργανα που εξετάστηκαν με τις αιμορραγίες να έπονται σε έκταση και σημασία.

-Η φλεγμονώδης αντίδραση που διαπιστώθηκε στα διάφορα όργανα ήταν σε αναντιστοιχία ήπια σε σχέση με το βαθμό μόλυνσης των ιχθυδίων.

-Γενικευμένο οίδημα είναι η πιθανή αιτία θανάτου για τα μολυσμένα ιχθύδια.

-Το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος Van731 προκάλεσε ηπιότερες αλλοιώσεις και με χρονική καθυστέρηση σε σχέση με το φυσικό στέλεχος.

-Τα όργανα με τις σημαντικότερες αλλοιώσεις ήταν στην περίπτωση αυτή, η καρδιά και ο σπλήνας.

-Κυκλοφορικές διαταραχές και εντονότερη φλεγμονώδης αντίδραση χαρακτήρισαν τη νόσο, που προκάλεσε το Van731 ενώ νεκρώσεις και κυρίως αιμορραγίες σημειώθηκαν σπάνια. Στις περισσότερες των περιπτώσεων οι βλάβες που προκλήθηκαν ήταν αναστρέψιμες.

-Το σύστημα δέσμευσης σιδήρου του *V. anguillarum* φαίνεται να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό, αλλά όχι αποκλειστικά, την παθογένεια της Δονακίωσης.



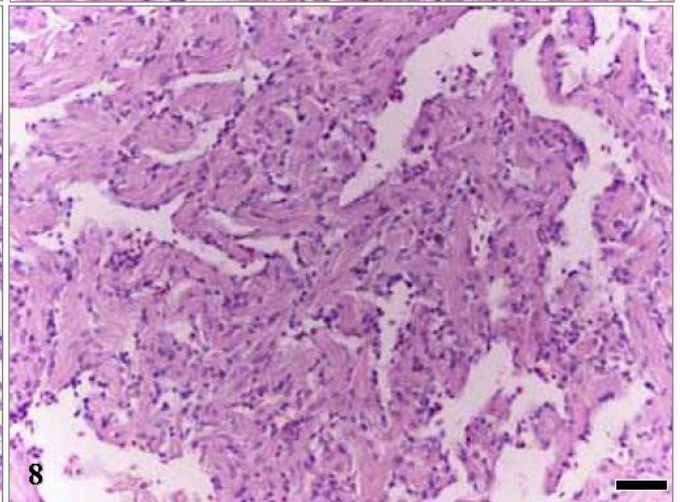
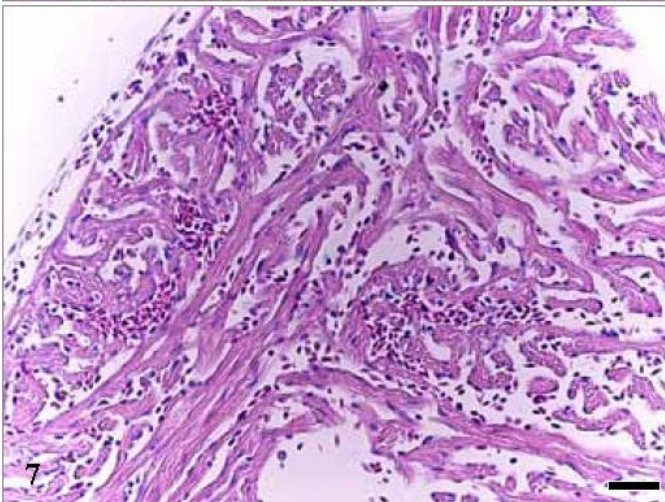
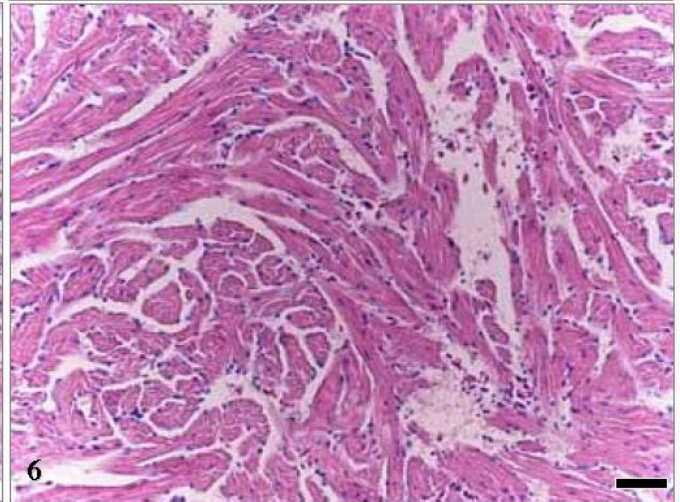
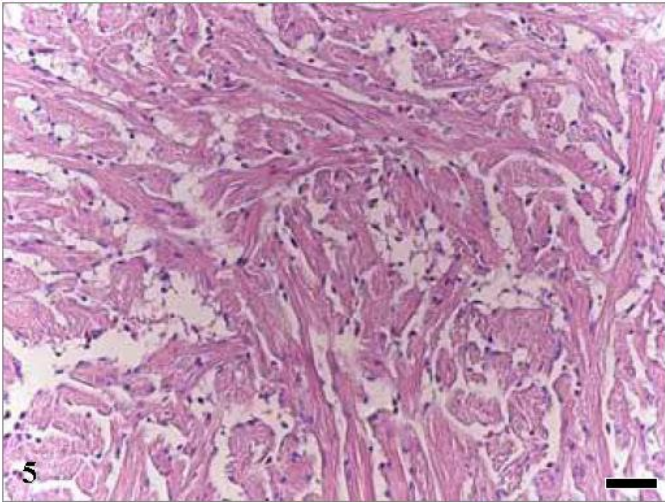
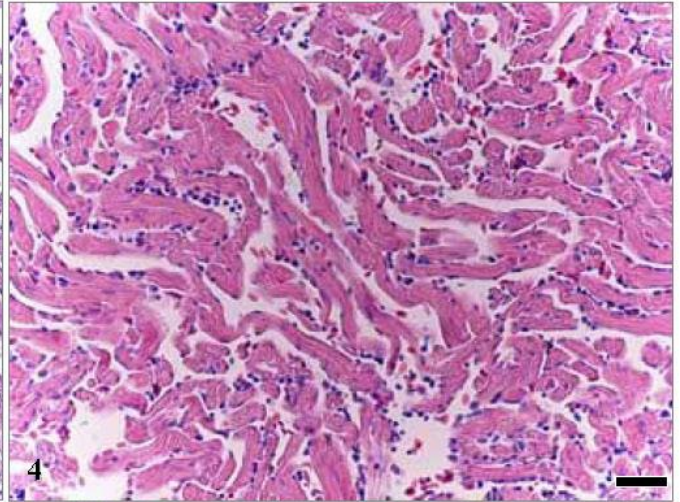
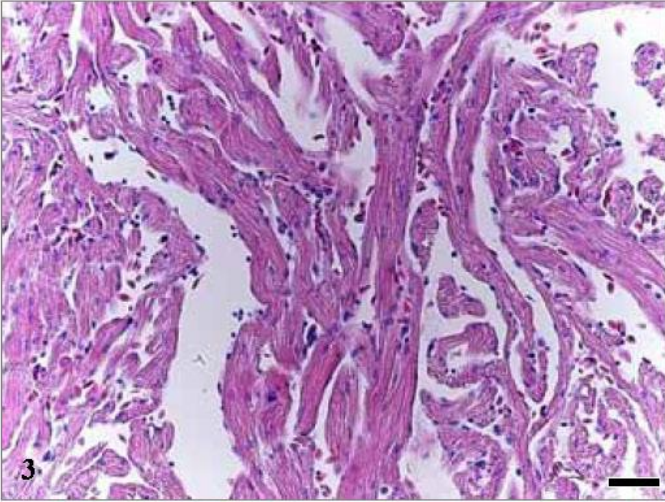
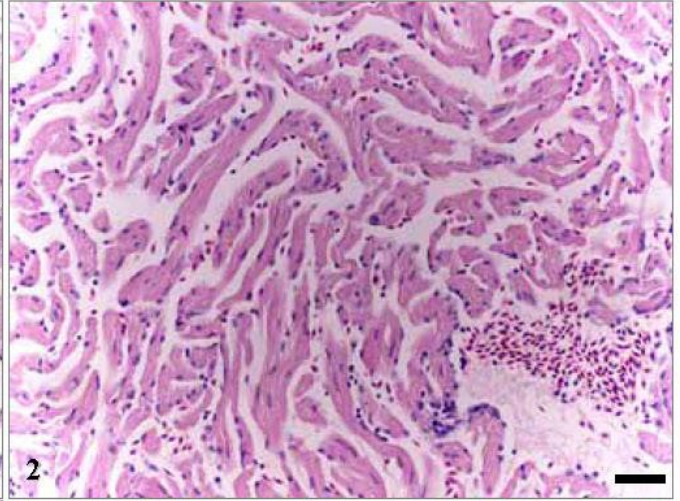
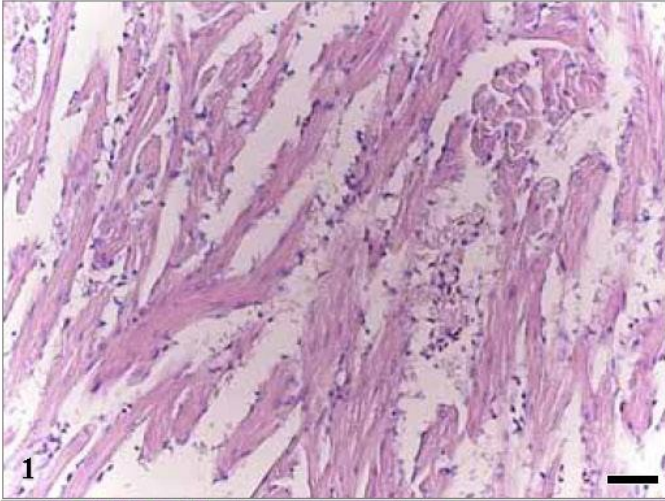
## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**Εικόνα Π1:** Ενδεικτικές μακροσκοπικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν κατά τη νεκροψία και νεκροτομή των ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V.anguillarum* (για τη συχνότητα εμφάνισής τους βλ. κείμενο). **1.** Μικροαιμορραγίες στην πλάγια – οπίσθια επιφάνεια του σώματος. **2.** Ερύθημα στην κοιλιακή χώρα και τη βάση του οπίσθιου κοιλιακού πτερυγίου. **3.** Εστίες απολέπισης στην πλάγια επιφάνεια του σώματος και **4.** Εκτεταμένα έλκη και αποκάλυψη των υποκείμενων μυϊκών στιβάδων στην ίδια περιοχή. **5.** Πετέχειες στο λιπώδη ιστό της περιτοναϊκής κοιλότητας. **6.** Πλέον εκτεταμένες αιμορραγίες στο ήπαρ. **7.** Πλήρης αποχρωματισμός των βραγχίων και του ήπατος. **8.** Έντερο διατεταμένο με υδαρές υποκίτρινο περιεχόμενο.

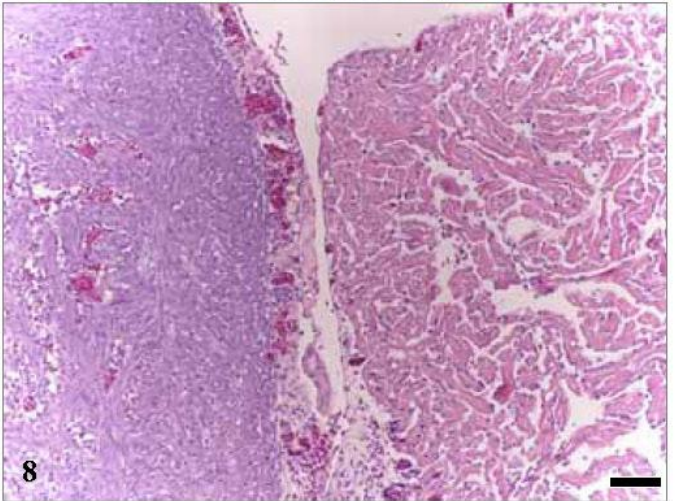
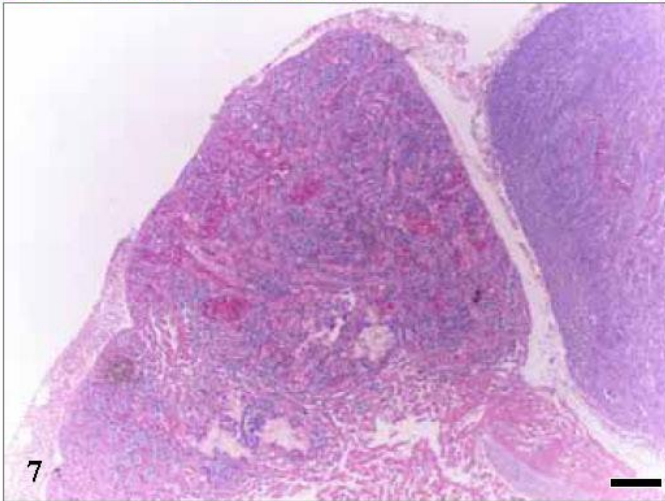
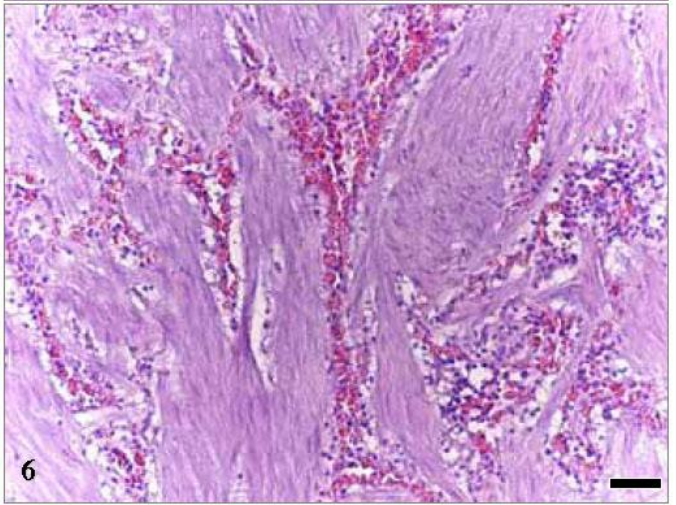
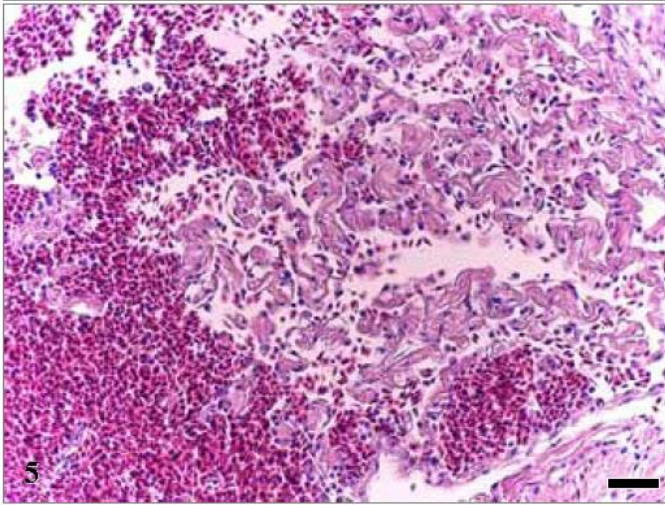
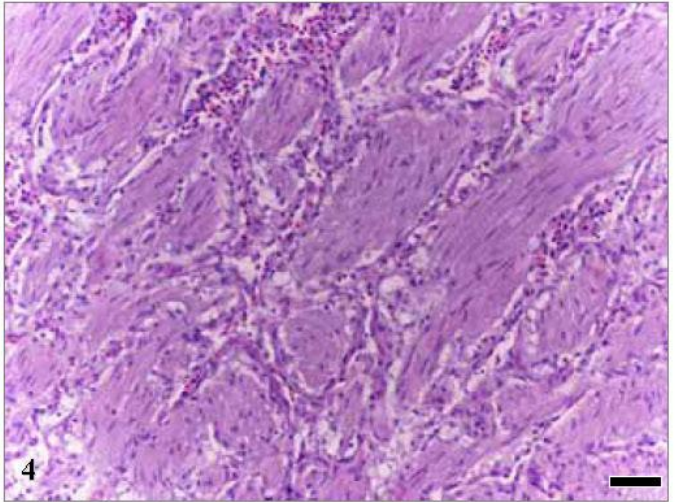
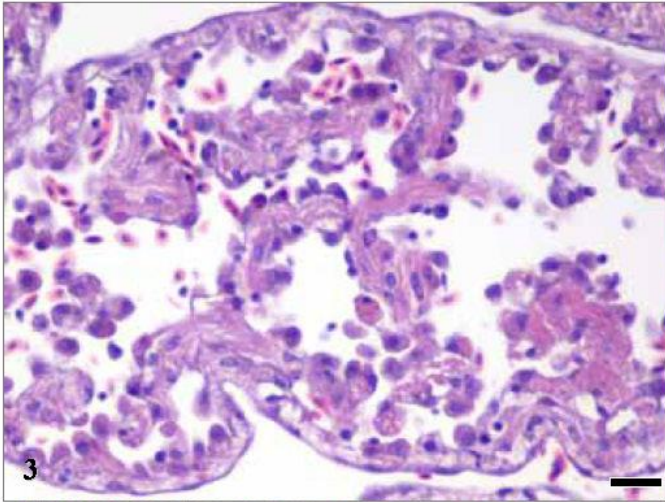
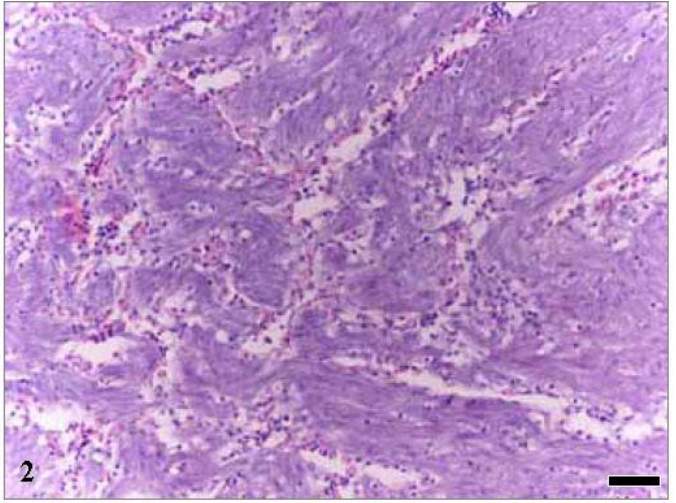
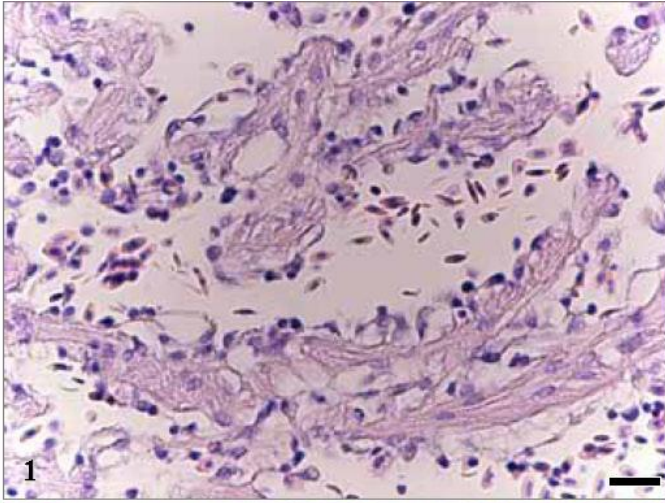


**Εικόνα Π2:** Χαρακτηριστικά πεδία που αποτυπώνουν, κατά το δυνατό, την εξέλιξη των αλλοιώσεων στην κοιλία της καρδιάς ιχθύων των ομάδων P+ (**1, 3, 5, 7**) και P- (**2, 4, 6, 8**) την πρώτη (**1, 2**), τρίτη (**3, 4**), έκτη (**5, 6**) και ένατη (**7, 8**) ημέρα, μετά την πειραματική μόλυνση με τα στελέχη *V. anguillarum* Van1 και Van731, αντίστοιχα (H-E, Ράβδος: 50μm). Το οίδημα στο μυοκάρδιο της κοιλίας είναι εντονότερο από την πρώτη ημέρα στα ιχθύδια της P+ (**1**), σε σύγκριση με την P- όπου εμφανίζονται μικροεστίες φλεγμονής (**2**), η οποία επιτείνεται την τρίτη ημέρα (**4**). Ευθαιασμός των μυϊκών ινών (**3**) και εστιακές νεκρώσεις (**5**) επιδεινώνουν την εικόνα στην P+, ενώ αντίστοιχες νεκρώσεις παρατηρούνται σπανιότερα στην P- (**6**). Μυοκάρδιο κοιλίας με εκτεταμένη νέκρωση και αιμορραγίες σε ιχθύδιο της P+ την ένατη ημέρα (**7**) ενόσω στην P- λάβαιναν χώρα αναπλαστικές εξεργασίες (**8**).

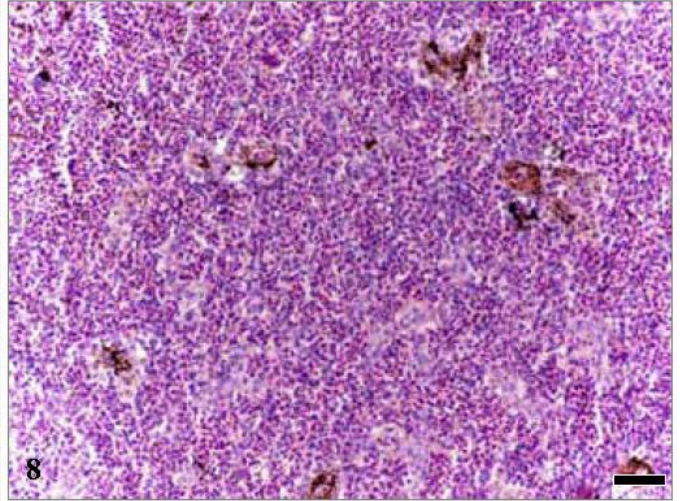
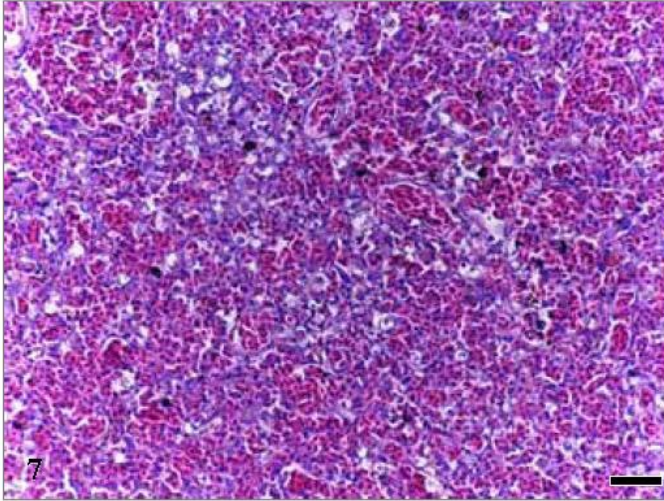
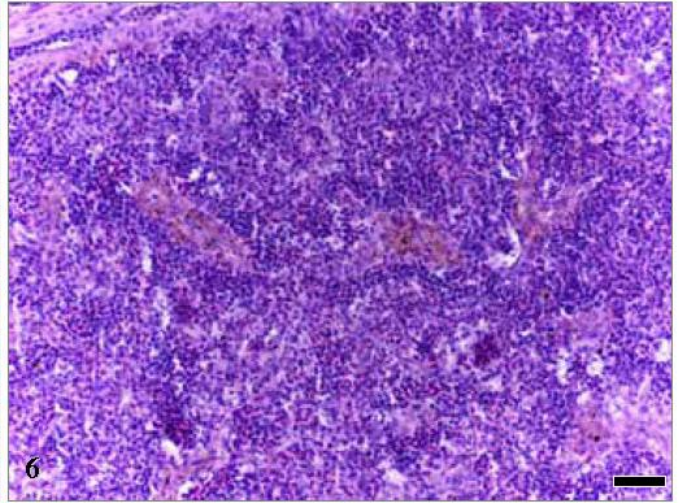
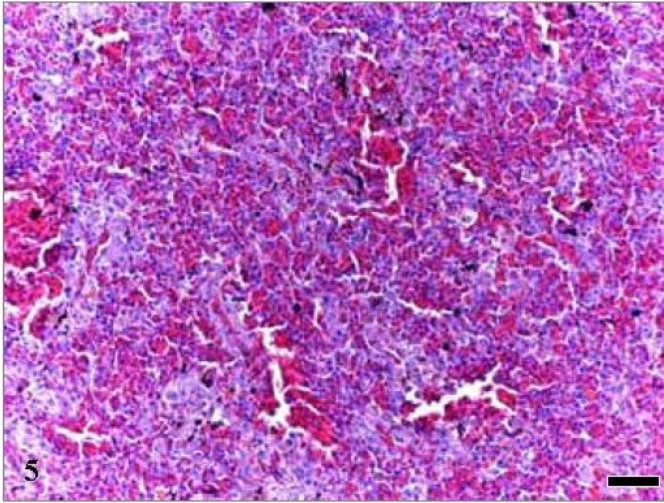
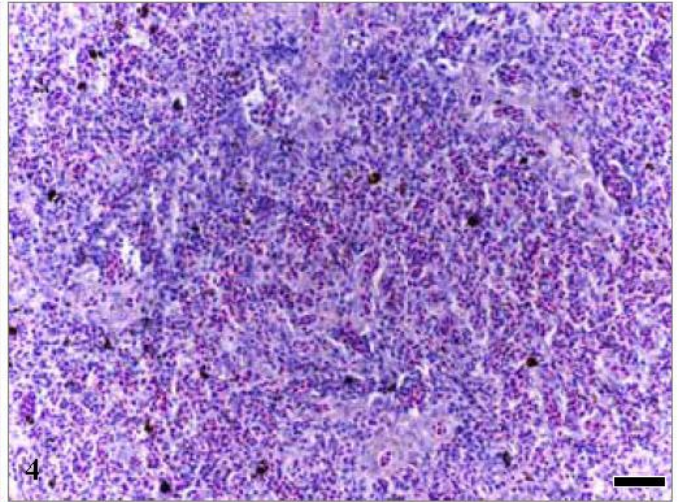
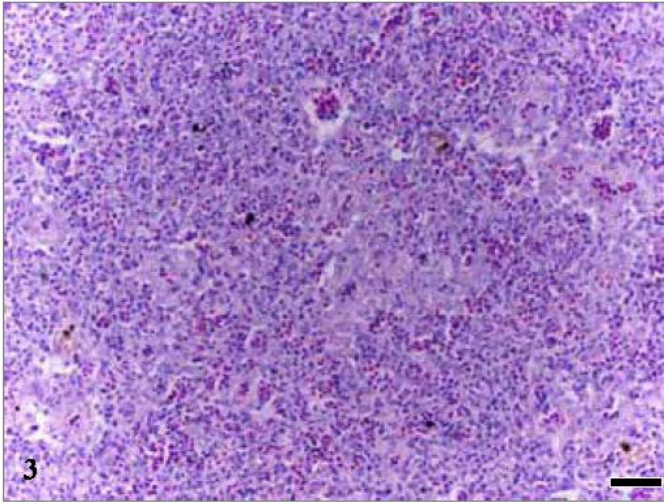
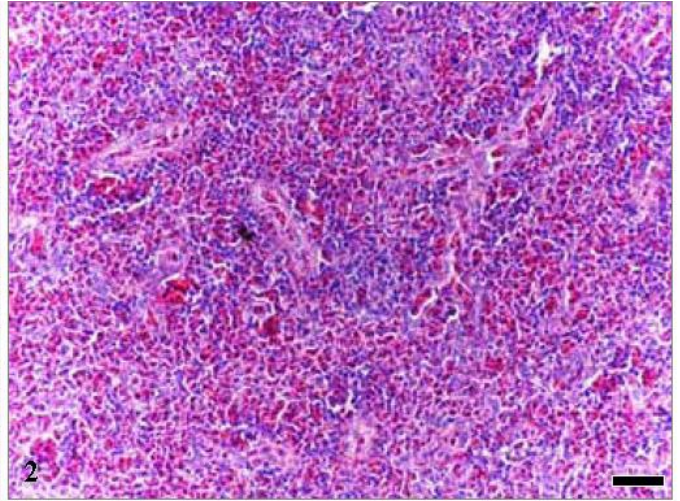
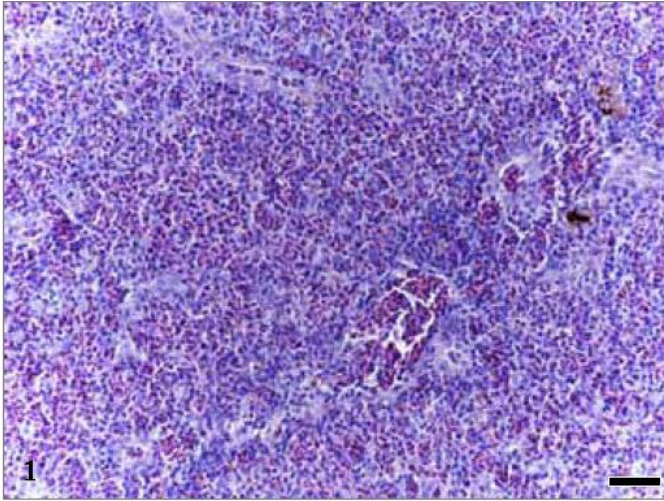




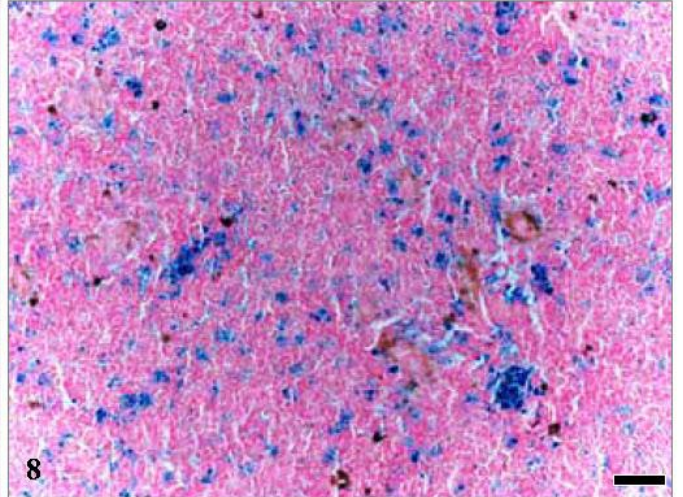
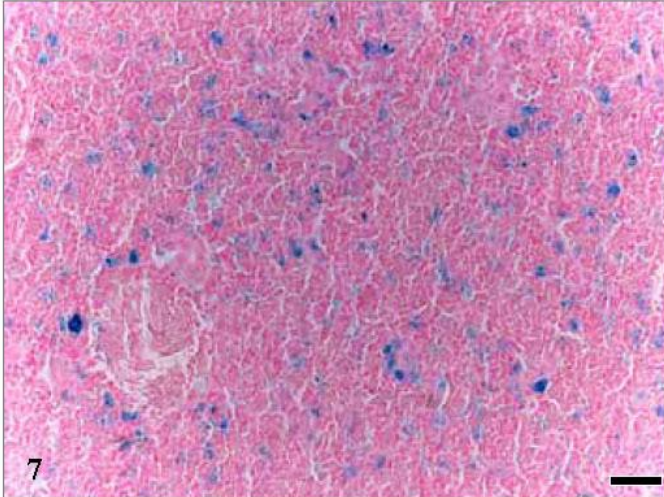
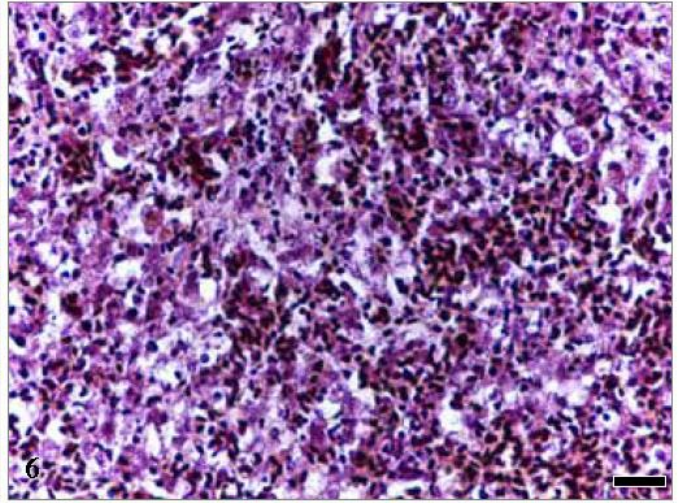
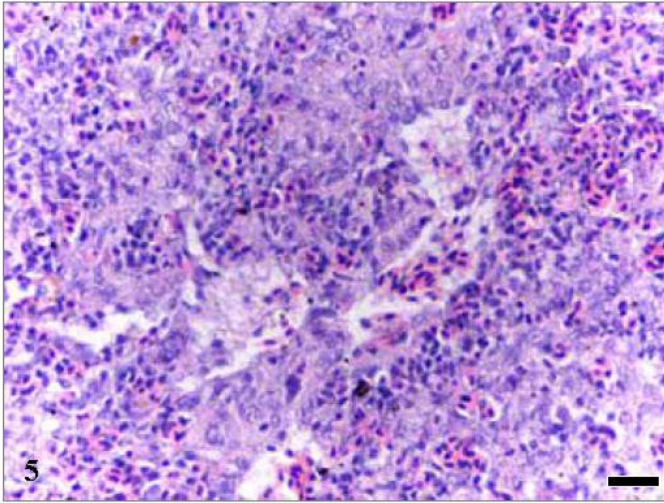
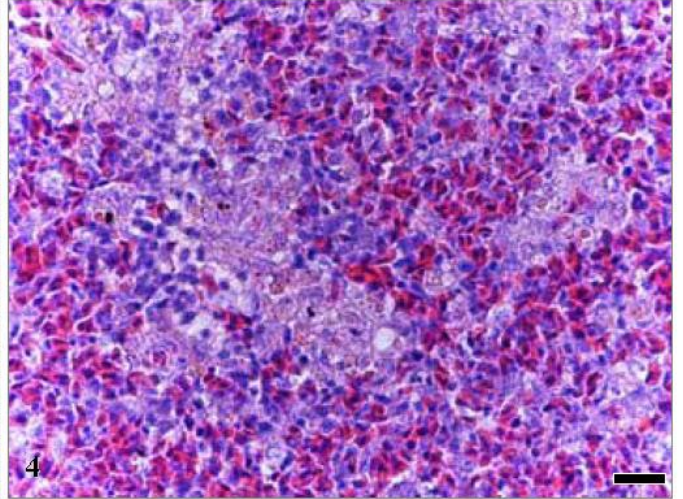
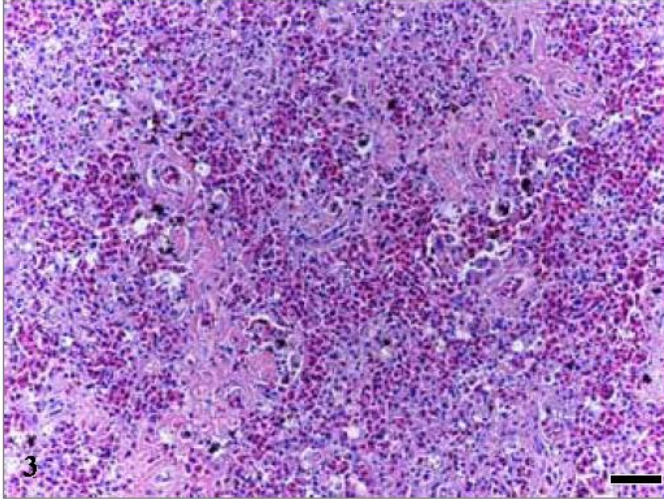
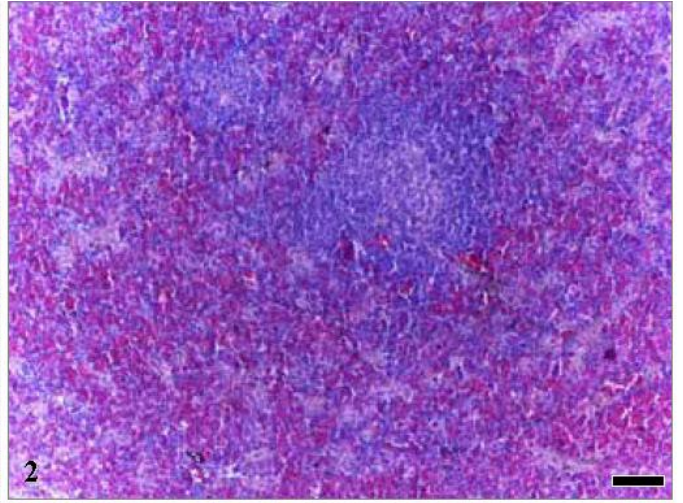
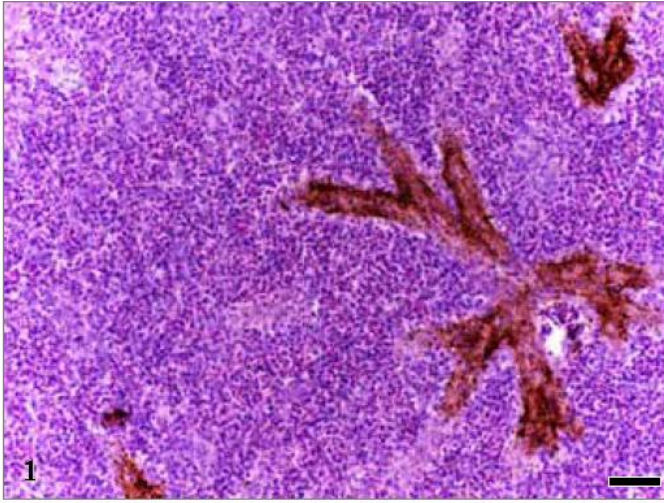
**Εικόνα Π3:** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στην καρδιά ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V. anguillarum* (H-E). **1.** Έντονο οίδημα των μυϊκών ινών του κόλπου της καρδιάς (Ράβδος=25μm). **2.** Διάταση των αγγείων του αρτηριακού βολβού και μικροεστίες φλεγμονωδών διηθήσεων (Ράβδος=50μm). **3.** Υπερπλασία των ενδοθηλιακών κυττάρων του κόλπου και αυξημένος αριθμός επιθηλιοειδών μακροφάγων (Ράβδος=25μm). **4.** Οίδημα του ενδοθηλίου των αγγείων του αρτηριακού βολβού και ήπια διάχυτη φλεγμονή (Ράβδος=50μm). **5.** Εκτεταμένη αιμορραγία στο μυοκάρδιο του κόλπου (Ράβδος=50μm), **6.** Έντονη παρουσία πολυάριθμων ετερόφιλων κυττάρων στον αρτηριακό βολβό, ενδεικτική οξείας ενδοκαρδίτιδας (Ράβδος=50μm). **7.** Εντυπωσιακή φλεγμονή, με αιμορραγικές και νεκρωτικές εστίες, καταλαμβάνει το 1/3 της κοιλίας της καρδιάς (Ράβδος=250μm). **8.** Διάταση και υπεραιμία των αγγείων του περικαρδίου που επαλείφει τον αρτηριακό βολβό (Ράβδος=100μm).



**Εικόνα Π4:** Χαρακτηριστικά πεδία που αποτυπώνουν, κατά το δυνατό, την εξέλιξη των αλλοιώσεων στο σπλήνα ιχθύων των ομάδων P+ (1, 3, 5, 7) και P- (2, 4, 6, 8) την πρώτη (1, 2), τρίτη (3, 4), έκτη (5, 6) και ένατη (7, 8) ημέρα, μετά την πειραματική μόλυνση με τα στελέχη *V. anguillarum* Van1 και Van731, αντίστοιχα (H-E, Ράβδος: 50μm). Από την πρώτη ημέρα το ενδοθήλιο των ελλειψοειδών εξοιδαίνεται εντονότερα στα ιχθύδια της P+ (1), , για να νεκρωθεί στη συνέχεια (3) οδηγώντας σε εκτεταμένες αιμορραγίες και απώλεια της αρχιτεκτονικής δομής του οργάνου (5) σε σύγκριση με την P- όπου αρχίζει σταδιακά να υπερπλάσεται (2), αυξάνονται οι διηθήσεις φλεγμονωδών κυττάρων (4) και η αναλογία λευκού/ ερυθρού πολφού (6). Ανάπλαση του σπληνικού παρεγχύματος με χαρακτηριστική νεοαγγειογένεση σε ιχθύδιο της P+ την ένατη ημέρα (7) με σχεδόν φυσιολογική την αντίστοιχη εικόνα στην P- και αυξημένες περιαγγειακές εναποθέσεις αιμοχρωστικών (8).

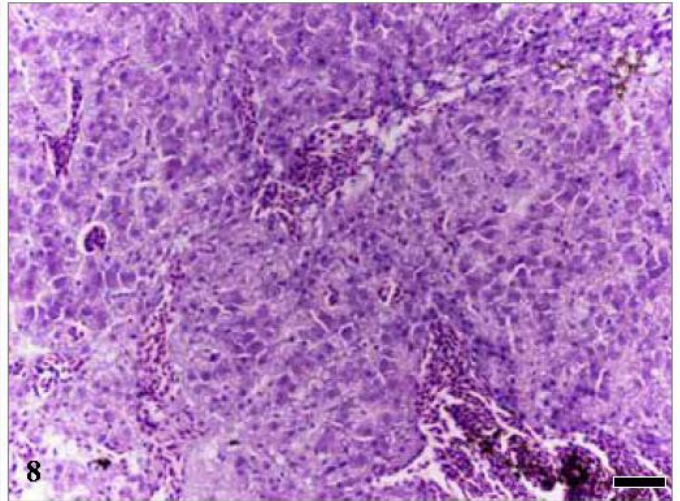
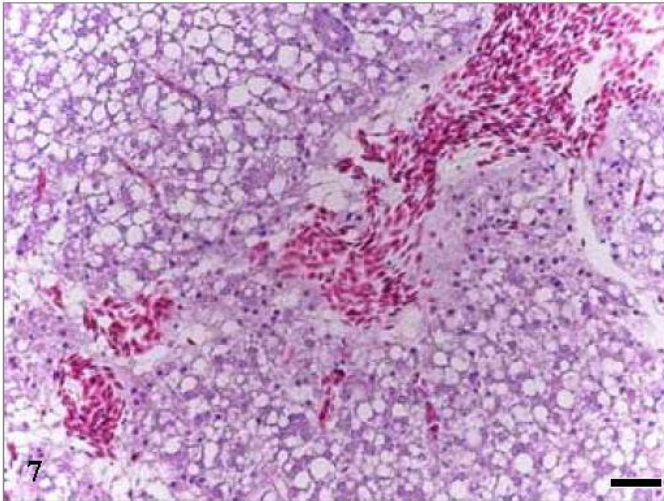
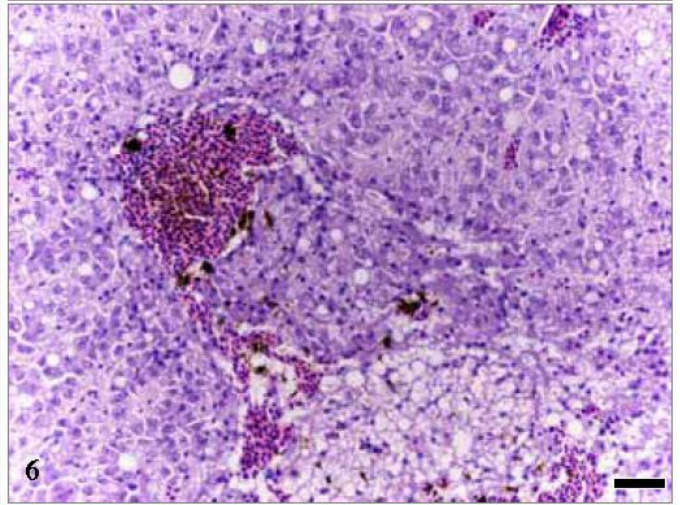
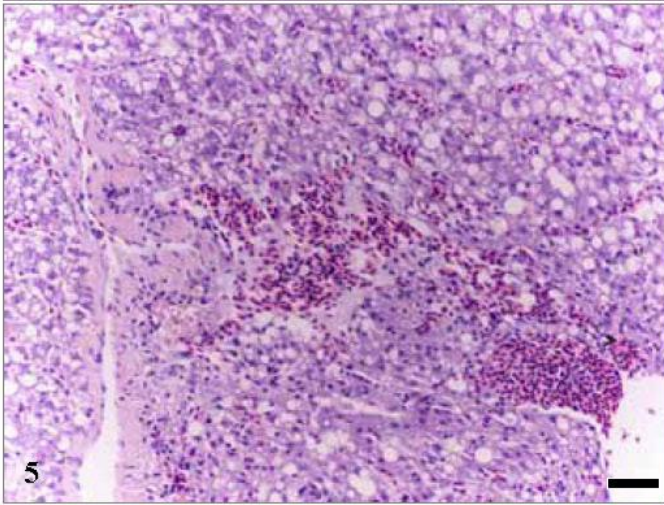
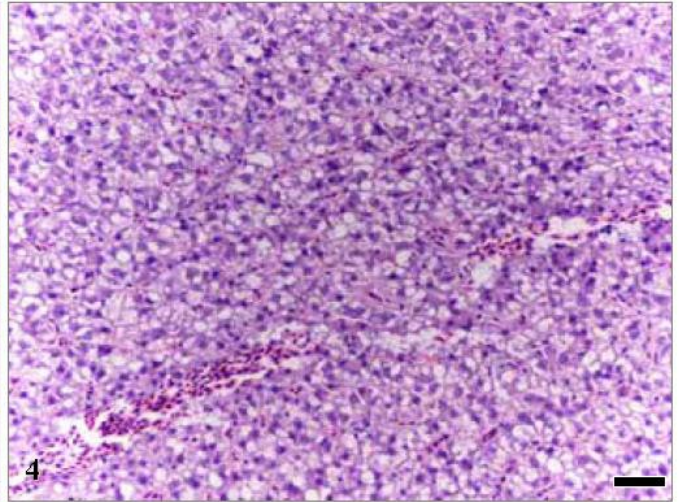
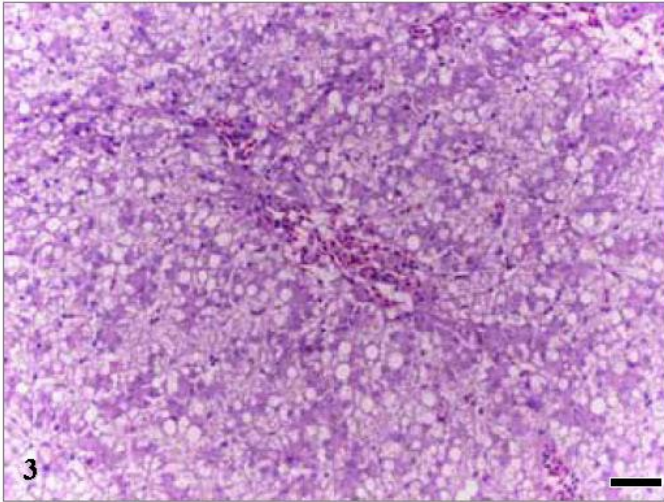
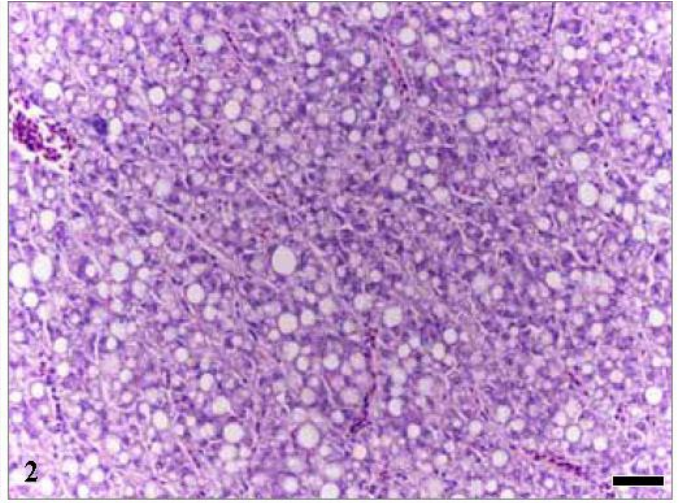
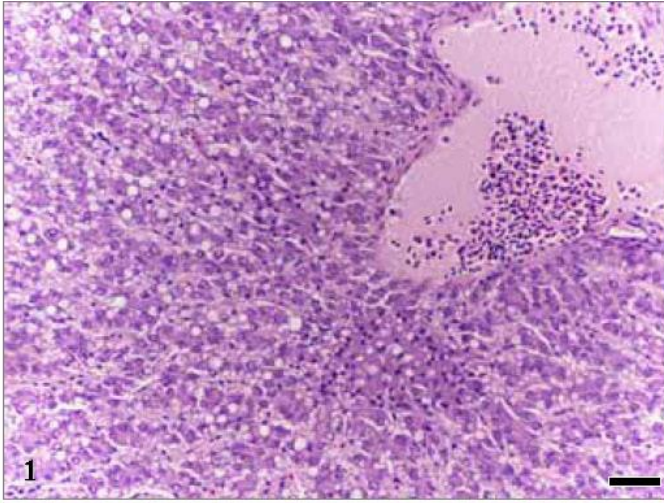


**Εικόνα Π5:** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο σπλήνα ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V.anguillarum*. **1.** Εντυπωσιακές εναποθέσεις αιμοχρωστικών στο ενδοθήλιο αγγείων (H-E, Ράβδος=50μm). **2.** Χαρακτηριστικές εστιακές φλεγμονές στο παρέγχυμα του οργάνου (H-E, Ράβδος=100μm). **3.** Εκτεταμένες εστίες υγροποιού νέκρωσης (H-E, Ράβδος=50μm). **4.** Νεοαγγειογένεση (H-E, Ράβδος=25μm). **5.** Απογύμνωση και ρήξη του ενδοθηλίου των ελλειμοειδών (H-E, Ράβδος=25μm). **6.** Διάχυτη παρουσία πολυάριθμων βακτηριδίων στο σπληνικό παρέγχυμα (B-H, Ράβδος=25μm). **7-8.** Σημαντικότερες εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης ανιχνεύθηκαν στα ιχθύδια της P- (**8**) σε σύγκριση με την P+ (**7**) (Perls' Prussian blue, Ράβδος=50μm).

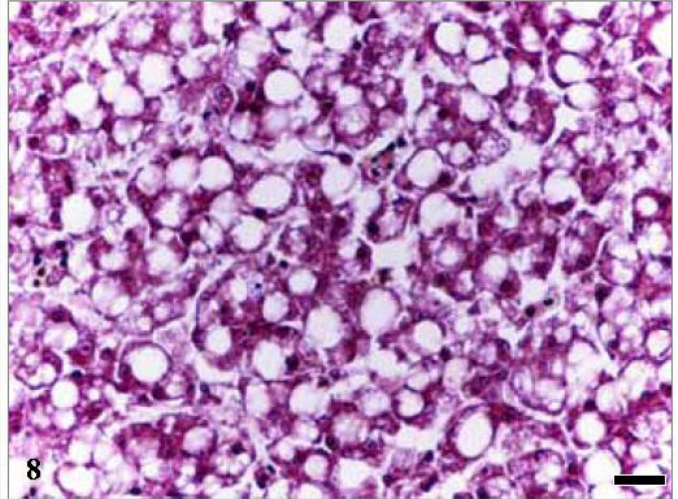
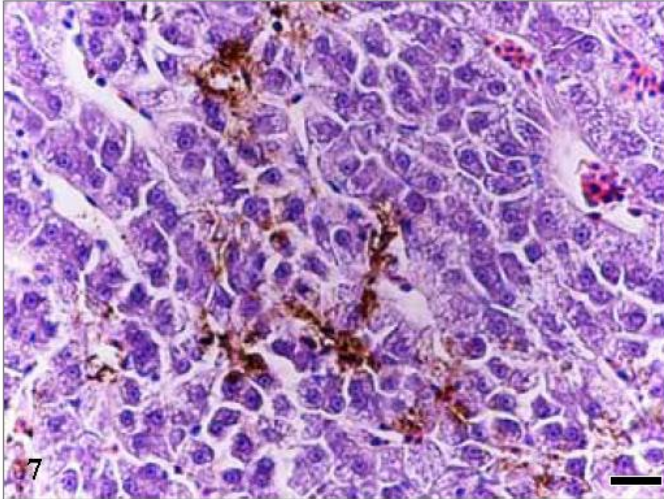
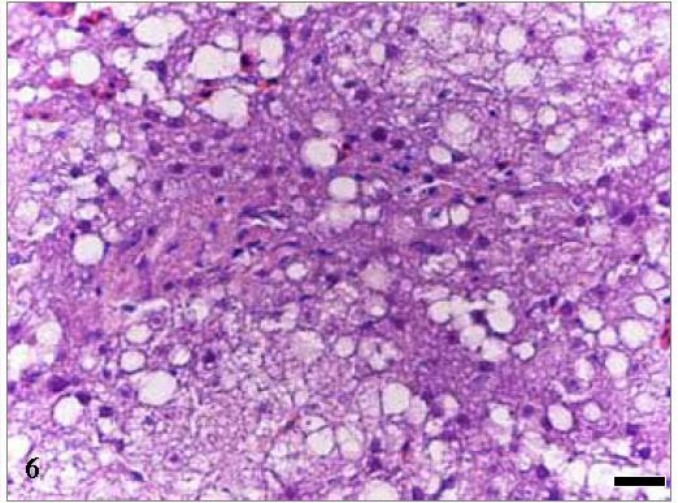
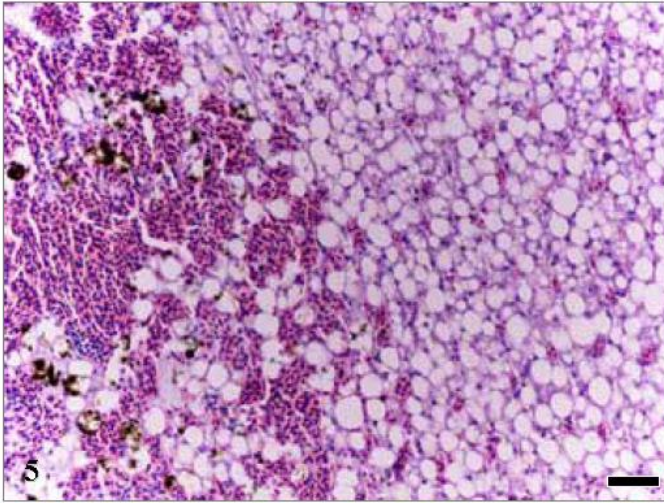
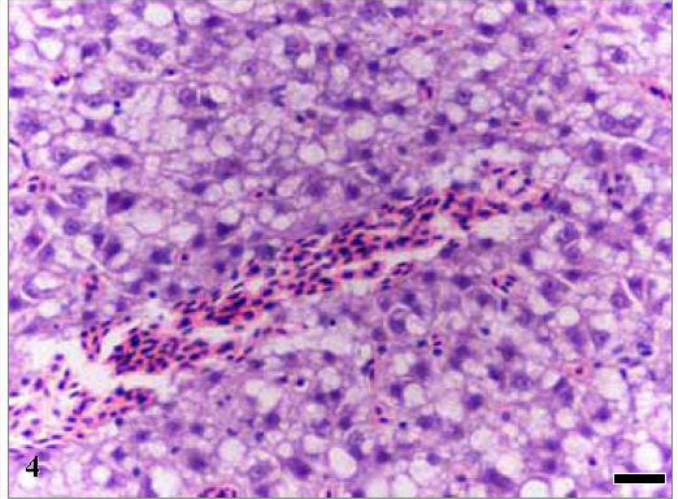
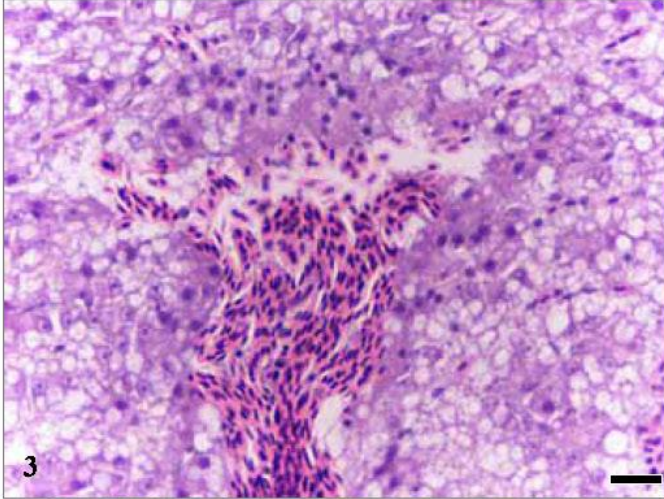
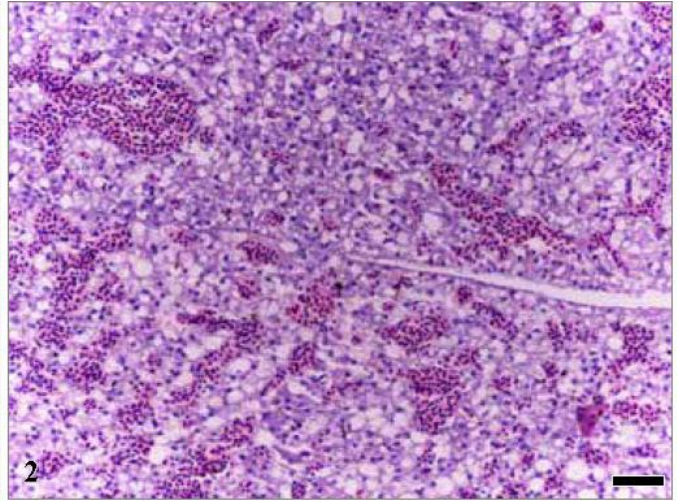
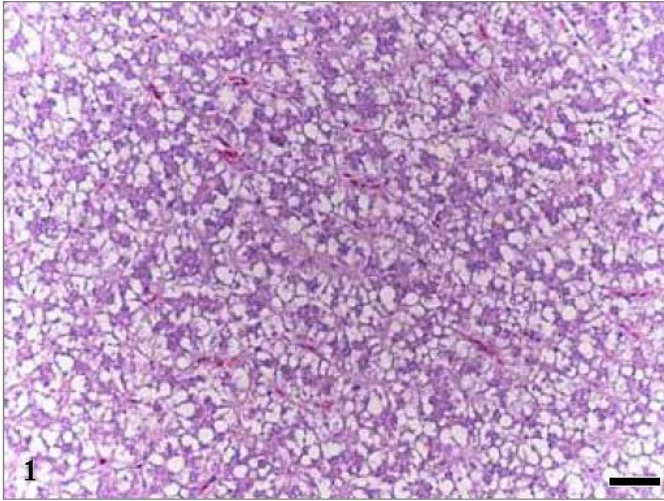


**Εικόνα Π6:** Χαρακτηριστικά πεδία που αποτυπώνουν, κατά το δυνατό, την εξέλιξη των αλλοιώσεων στο ήπαρ ιχθύων των ομάδων P+ (1, 3, 5, 7) και P- (2, 4, 6, 8) την πρώτη (1, 2), τρίτη (3, 4), έκτη (5, 6) και ένατη (7, 8) ημέρα, μετά την πειραματική μόλυνση με τα στελέχη *V. anguillarum* Van1 και Van731, αντίστοιχα (H-E, Ράβδος: 50μm). Διάταση των αγγείων και κενотоπίωση των ηπατοκυττάρων παρατηρήθηκε από την πρώτη ημέρα εντονότερη στα ιχθύδια της P+ (1), σε σύγκριση με την P- (2). Πολυεστιακές νεκρώσεις στο παρέγχυμα (3) και νέκρωση του ενδοθηλίου των αγγείων με μικροαιμορραγίες (5) επιδείνωσαν την εικόνα στην P+, σε αντίθεση με αυτή της P- που ήταν ηπιότερη με μικρή αύξηση των πυκνωτικών πυρήνων (4) και περιορισμένες μικροεστίες φλεγμονής (6). Στα ιχθύδια της P+ που επιβίωσαν της οξείας φάσης διαπιστώθηκαν εκτεταμένες νεκρώσεις (7) σε αντίθεση με τη σχεδόν φυσιολογική εικόνα στην P-, αποκατάστασης των αναστρέψιμων βλαβών που σημειώθηκαν (8).

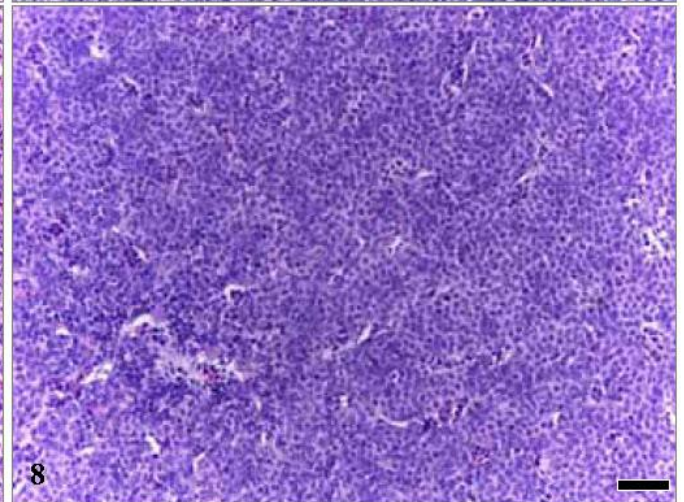
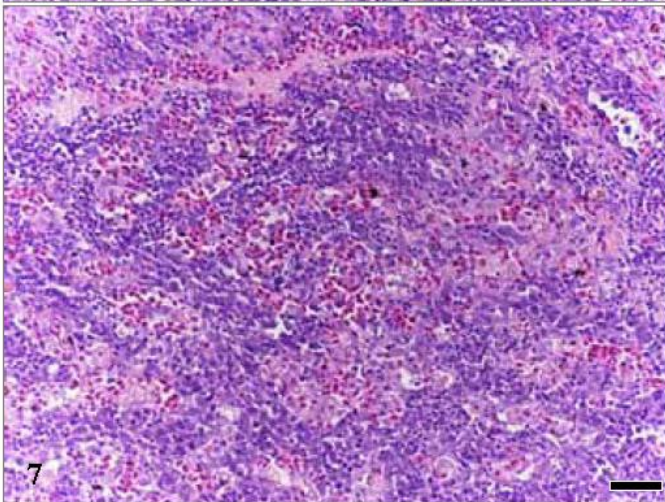
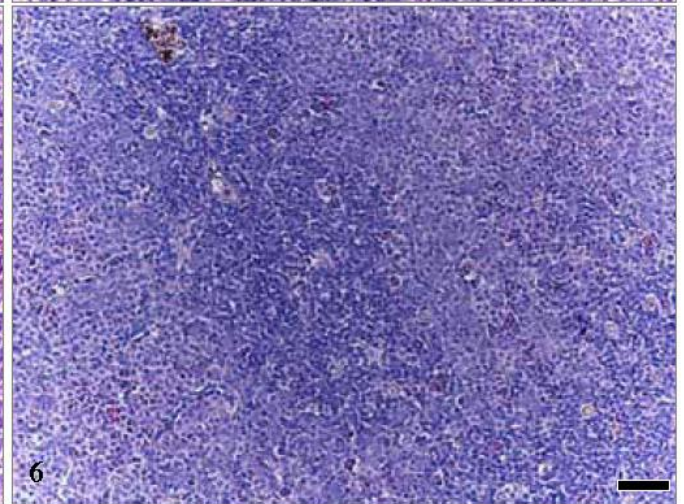
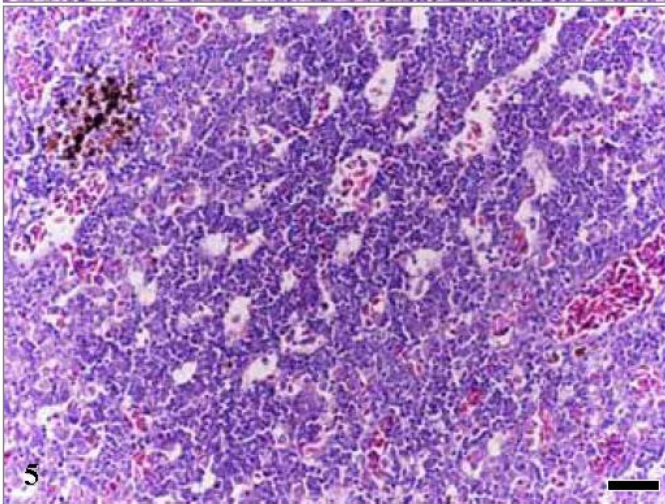
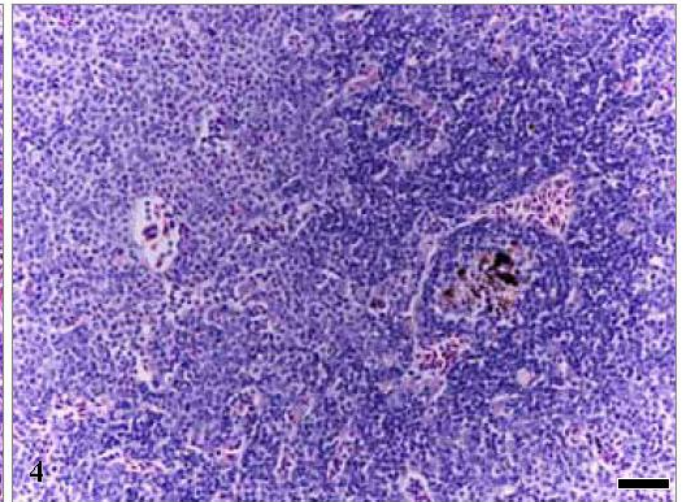
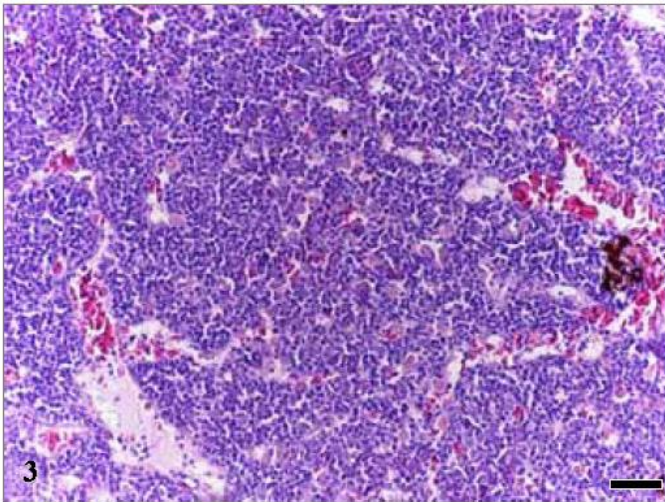
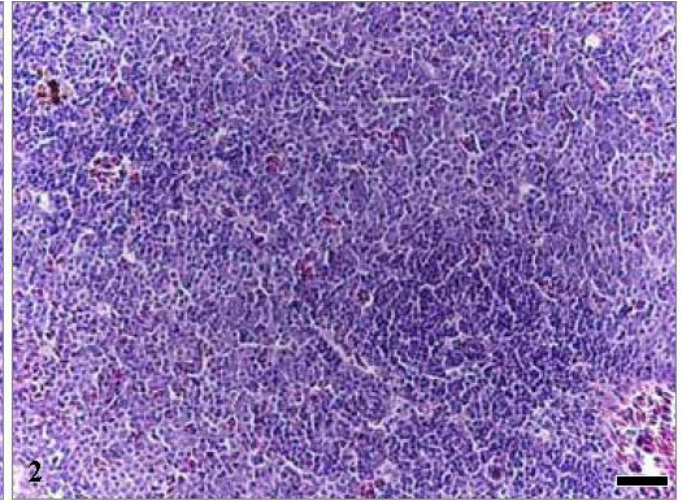
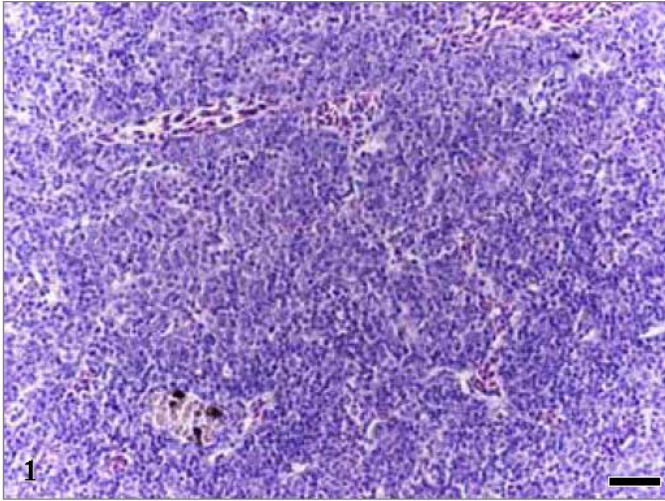




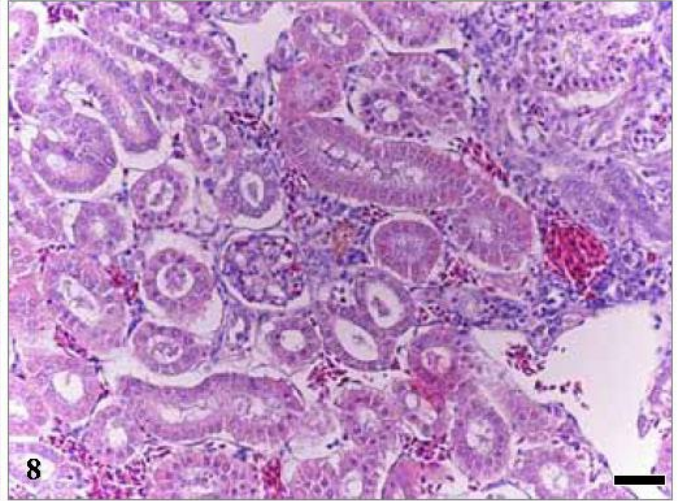
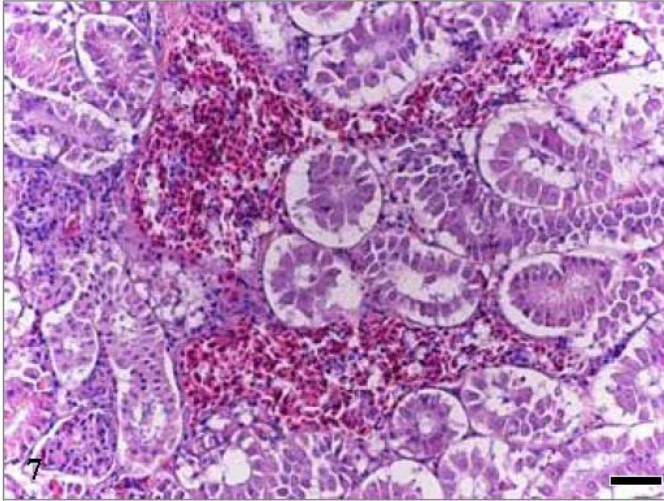
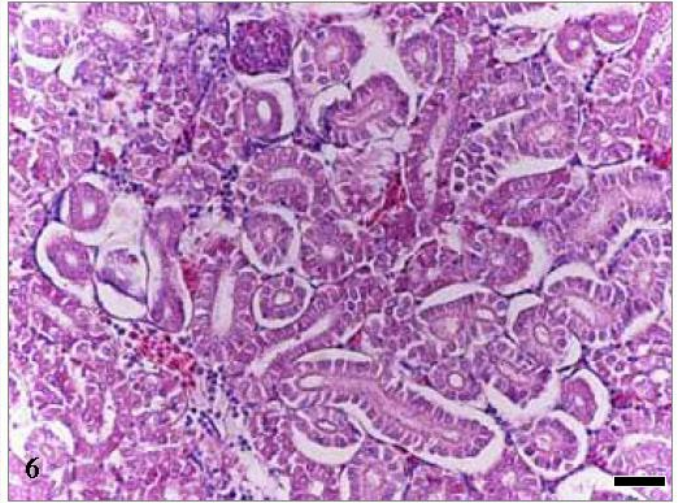
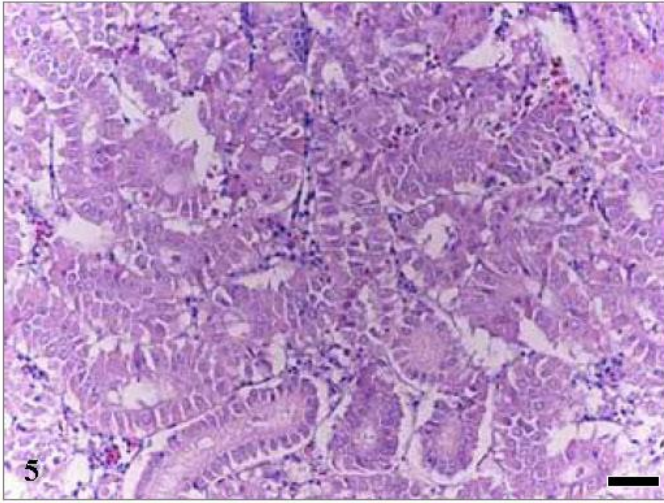
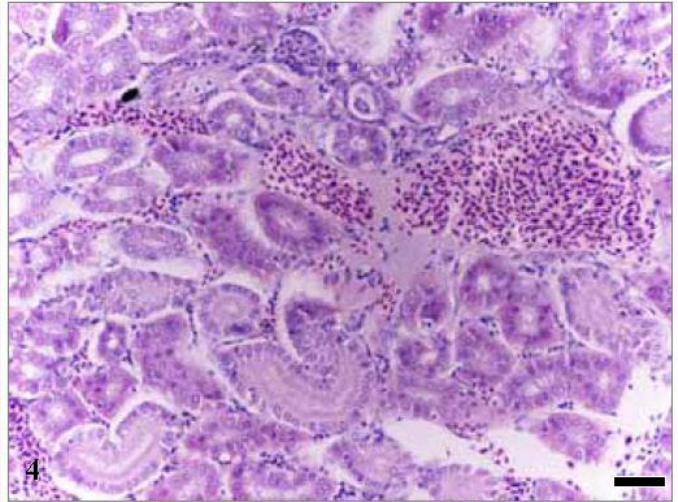
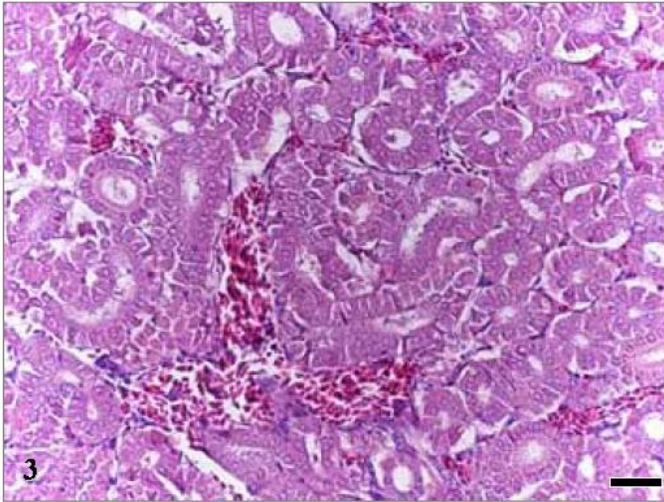
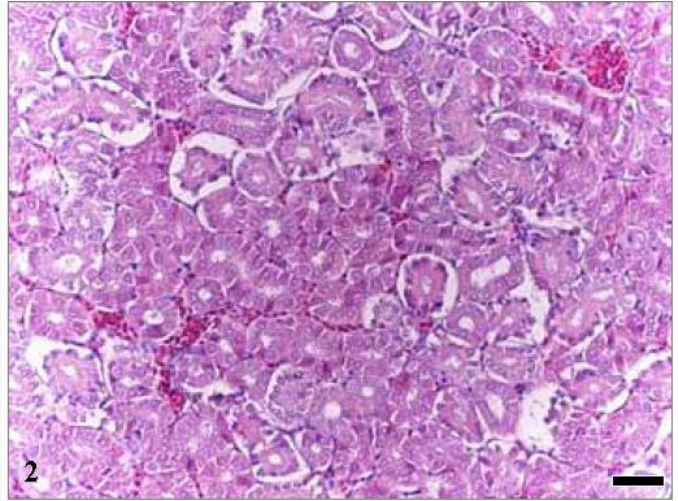
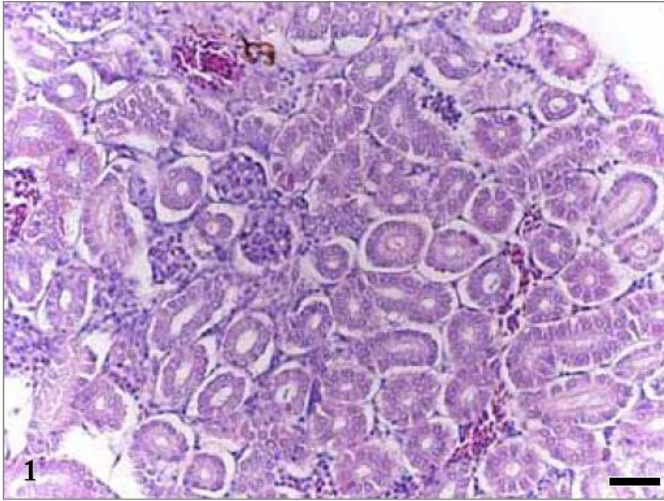
**Εικόνα Π7:** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο ήπαρ ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V.anguillarum*. **1.** Ενδοκυτταρικό οίδημα και ρήξεις κυτταρικών μεμβρανών στα ηπατοκύτταρα (H-E, Ράβδος=50μm). **2.** Διάταση και υπεραιμία των αγγείων στο ηπατικό παρέγχυμα (H-E, Ράβδος=50μm). **3.** Νέκρωση και ρήξη του ενδοθηλίου μεγάλου αγγείου (H-E, Ράβδος=25μm). **4.** Περιαγγειακή φλεγμονή χαρακτηριζόμενη από την παρουσία μακροφάγων (H-E, Ράβδος=25μm). **5.** Εκτεταμένη αιμορραγία στο παρέγχυμα (H-E, Ράβδος=50μm). **6.** Εστιακή νέκρωση (H-E, Ράβδος=25μm). **7.** Εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης σε ιχθύδιο της P- (H-E, Ράβδος=25μm). **8.** Διάχυτη παρουσία πολυάριθμων βακτηριδίων στο ηπατικό παρέγχυμα (B-H, Ράβδος=25μm).



**Εικόνα Π8:** Χαρακτηριστικά πεδία που αποτυπώνουν, κατά το δυνατό, την εξέλιξη των αλλοιώσεων στον κεφαλικό νεφρό ιχθύων των ομάδων P+ (**1, 3, 5, 7**) και P- (**2, 4, 6, 8**) την πρώτη (**1, 2**), τρίτη (**3, 4**), έκτη (**5, 6**) και ένατη (**7, 8**) ημέρα, μετά την πειραματική μόλυνση με τα στελέχη *V. anguillarum* Van1 και Van731, αντίστοιχα (H-E, Ράβδος: 50μm). Κατά την πρώτη ημέρα δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στα ιχθύδια της P+ (**1**) και της P- (**2**). Διάταση των αγγείων και οίδημα των ενδοθηλιακών τους κυττάρων διαπιστώθηκε στη συνέχεια εντονότερα στην P+ (**3,5**) με παρουσία φλεγμονωδών διηθήσεων και στις δύο ομάδες (**3,4**) και μεγαλύτερη αύξηση των λεμφοβλαστών στην P- (**6**). Παρά το γεγονός ότι δε σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων, ορισμένα ιχθύδια της P+ που επιβίωσαν της οξείας φάσης παρουσίασαν εκτεταμένες νεκρώσεις στο όργανο (**7**) σε αντίθεση με τη φυσιολογική εικόνα στην P- (**8**).

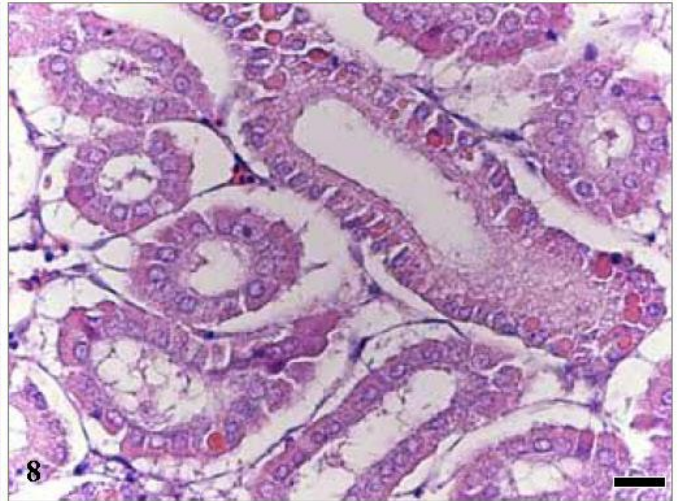
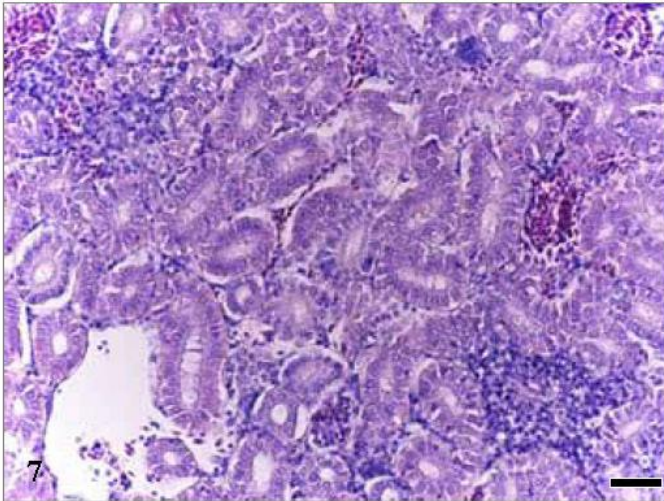
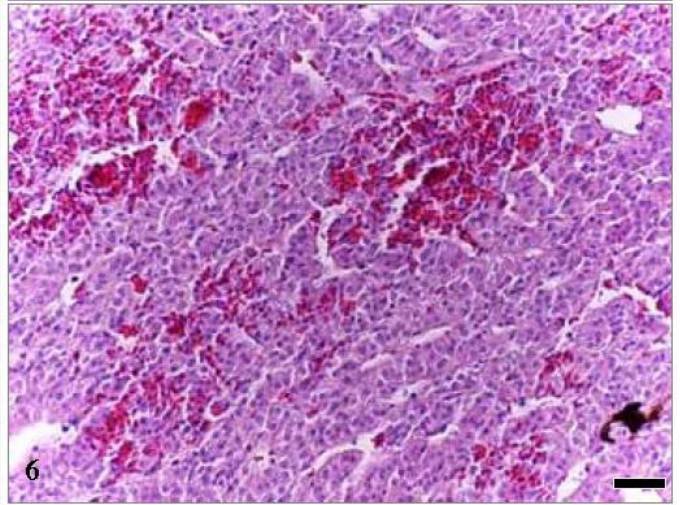
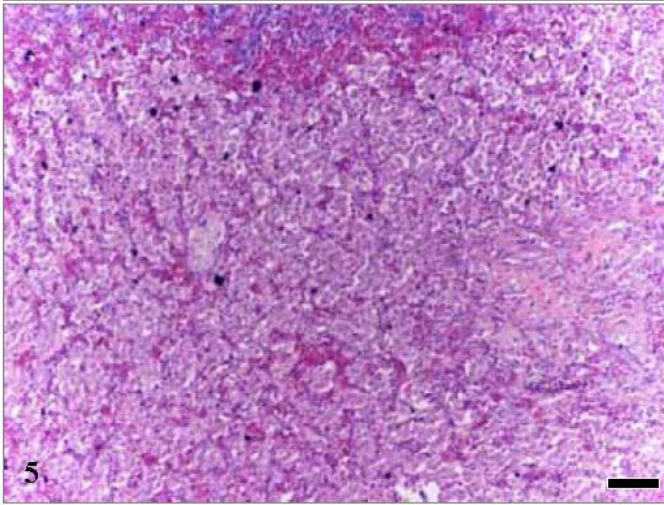
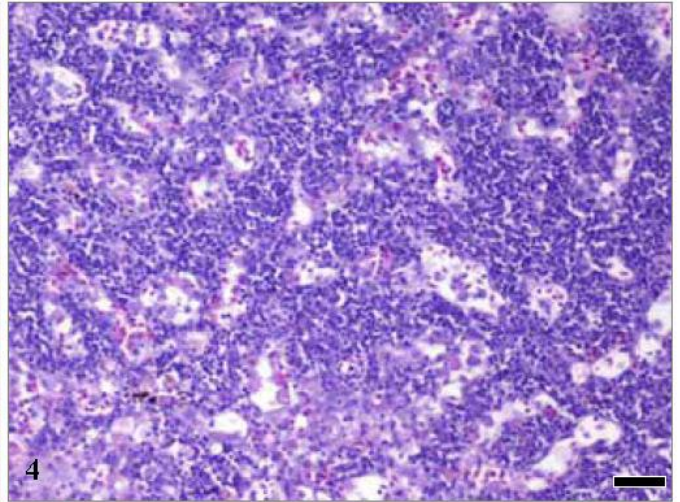
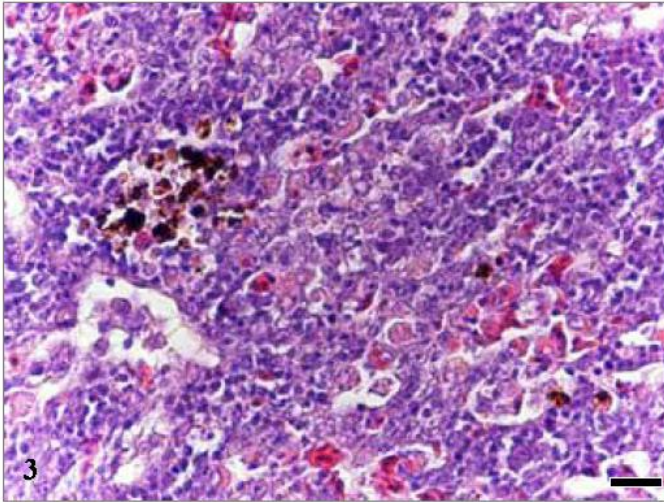
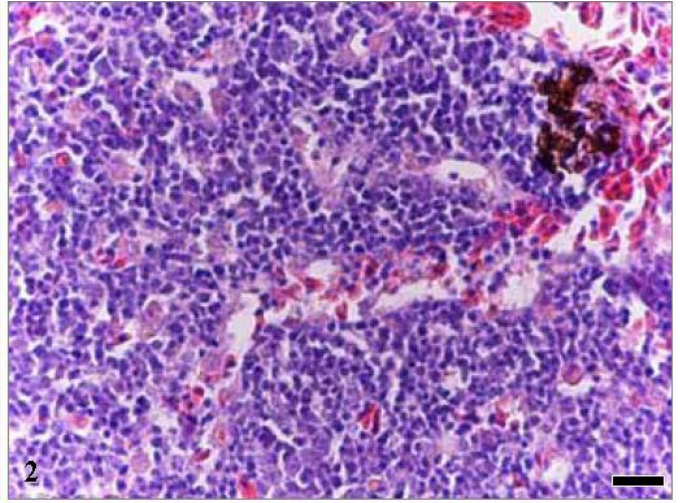
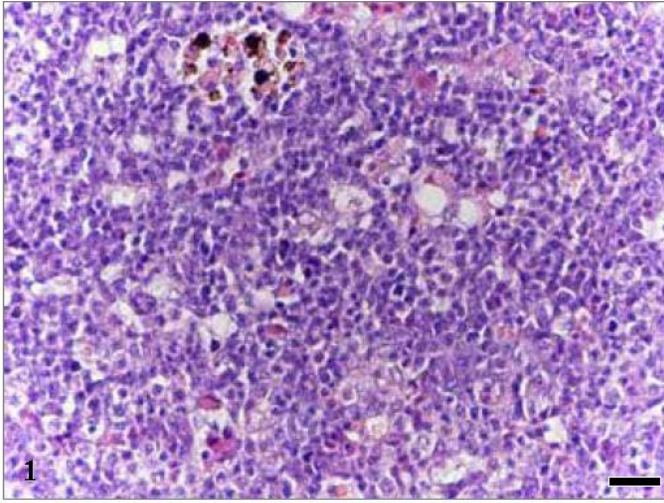


**Εικόνα Π9:** Χαρακτηριστικά πεδία που αποτυπώνουν, κατά το δυνατό, την εξέλιξη των αλλοιώσεων στο σωματικό νεφρό ιχθύων των ομάδων P+ (**1, 3, 5, 7**) και P- (**2, 4, 6, 8**) την πρώτη (**1, 2**), τρίτη (**3, 4**), έκτη (**5, 6**) και ένατη (**7, 8**) ημέρα, μετά την πειραματική μόλυνση με τα στελέχη *V. anguillarum* Van1 και Van731, αντίστοιχα (H-E, Ράβδος: 50μm). Κατά την πρώτη ημέρα δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στα ιχθύδια της P+ (**1**) και της P- (**2**). Διάταση των αγγείων και μικροαιμορραγίες στο διάμεσο ιστό διαπιστώθηκαν στη συνέχεια και στις δύο ομάδες (**3,4**) με παρουσία φλεγμονωδών μικροδιηθήσεων (**5-8**). Το επιθήλιο των ουροφόρων σωληναρίων παρουσίασε κατά τόπους διαφόρου βαθμού εξοίδηση (**4,5,6,8**), εκφύλιση (**6,8**) και επίσης εστιακά νέκρωση (**7**) κυρίως στα ιχθύδια της P+.

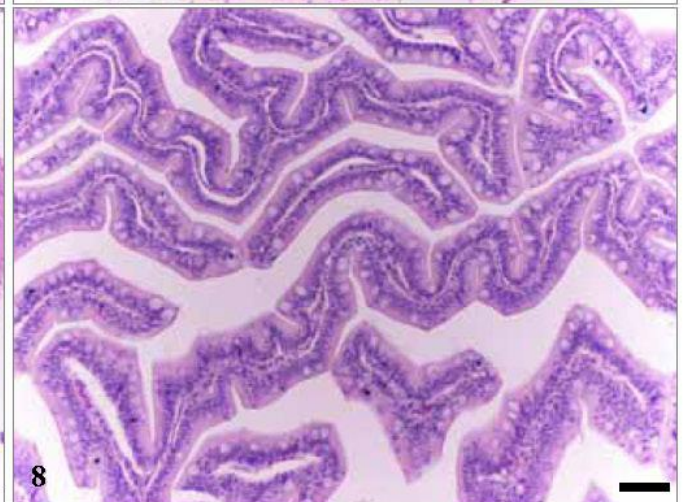
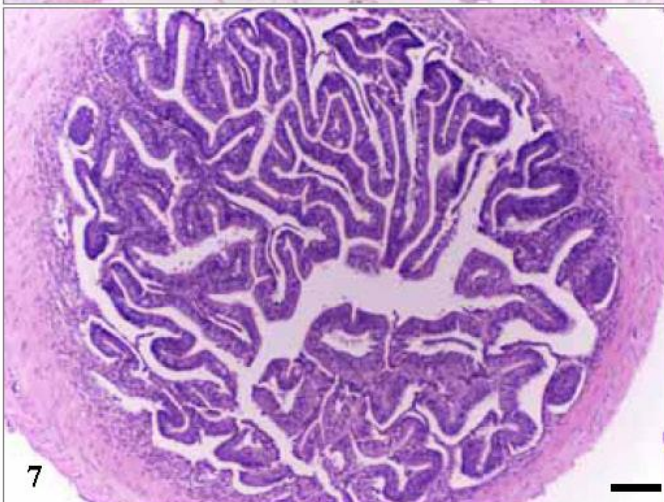
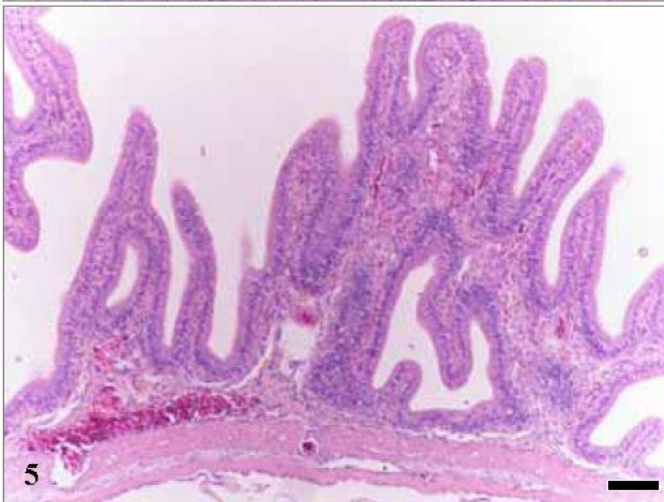
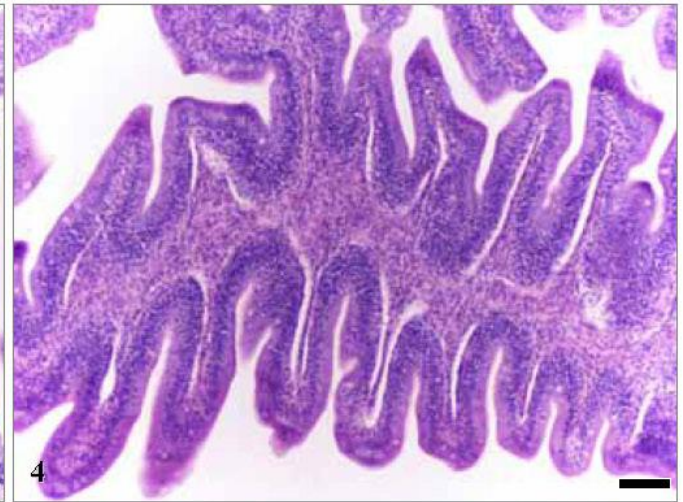
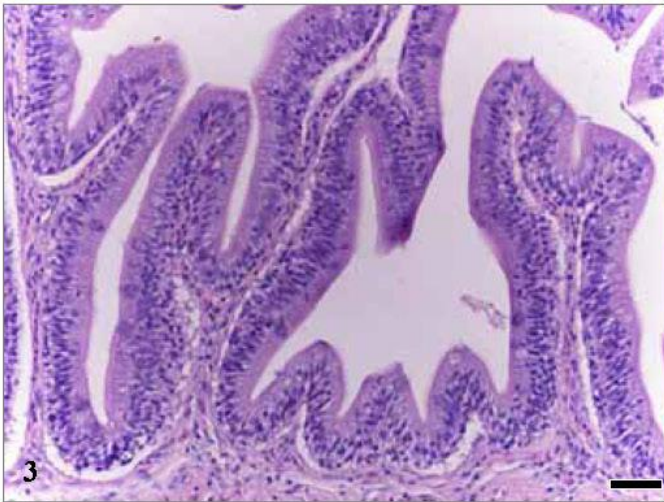
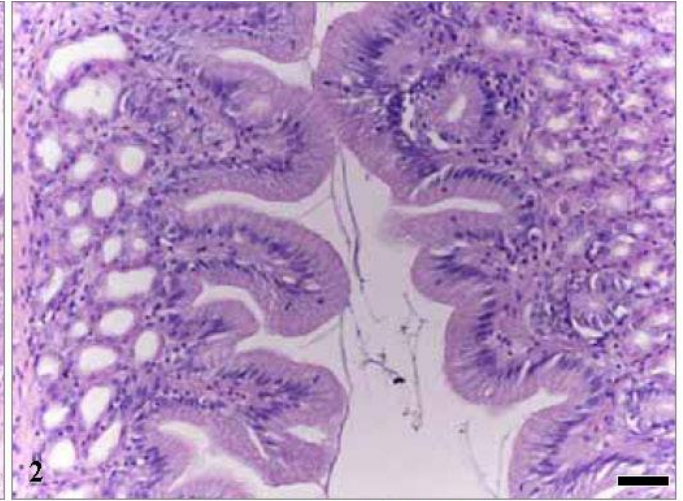
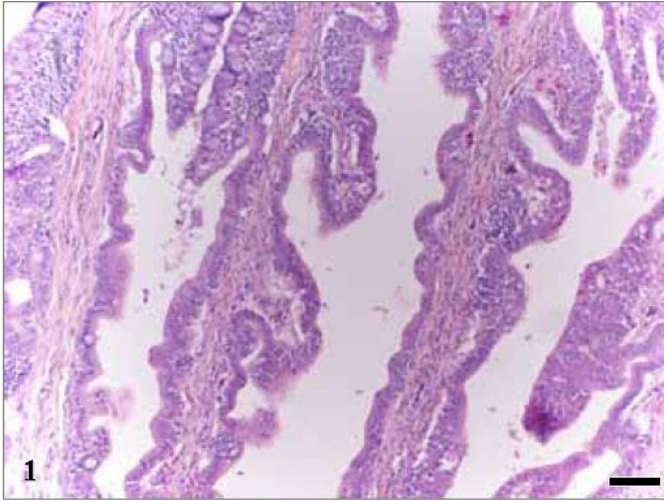


**Εικόνα Π10:** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο νεφρό ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V.anguillarum* (H-E). **1.** Οίδημα στον κεφαλικό νεφρό (Ράβδος=25μm). **2.** Ρήξη αγγείου και περιαγγειακή φλεγμονώδης διήθηση στον κεφαλικό νεφρό (Ράβδος=25μm). **3.** Εναποθέσεις αιμοσιδηρίνης στον κεφαλικό νεφρό (Ράβδος=25μm). **4.** Διάταση των αγγείων του κεφαλικού νεφρού, οίδημα και νέκρωση του ενδοθηλίου τους (Ράβδος=50μm). **5.** Διάταση και υπεραιμία των αγγείων του μεσόνεφρου και εστία υγροποιού νέκρωσης (δεξιά) (Ράβδος=100μm), **6.** Εκτεταμένη αιμορραγία στο μεσόνεφρο (Ράβδος=50μm). **7.** Εστίες φλεγμονής στο διάμεσο ιστό του σωματικού νεφρού (Ράβδος=50μm). **8.** Κυτταροπλασματικά μικροσταγονίδια στα επιθηλιακά κύτταρα ουροφόρων σωληναρίων (Ράβδος=25μm).

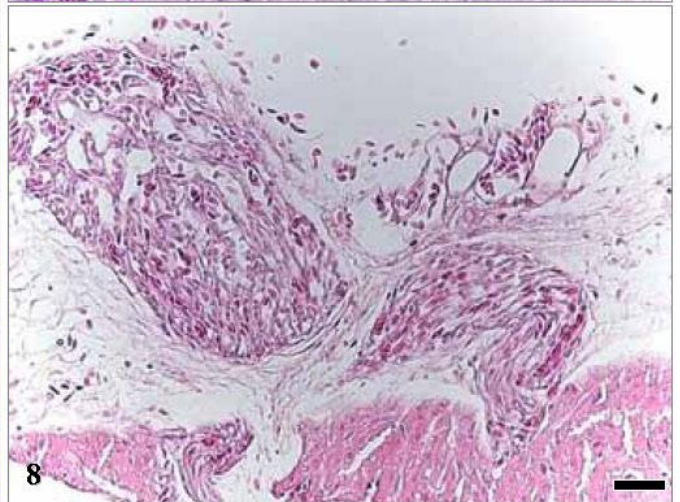
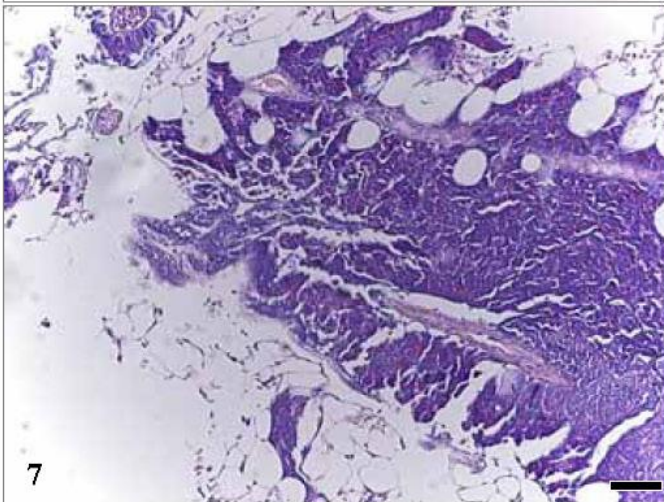
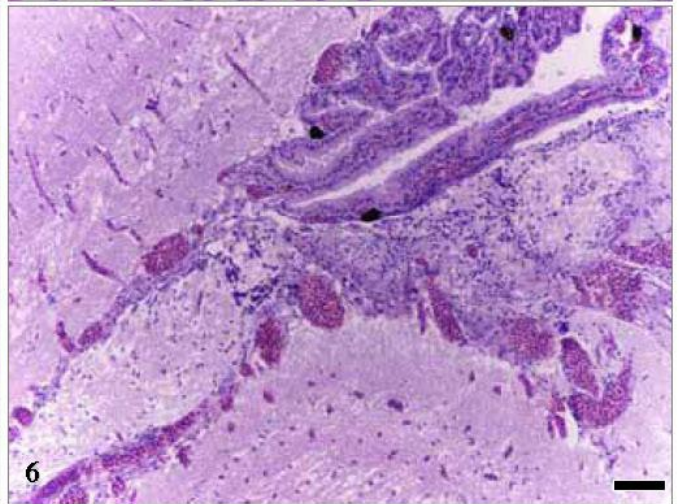
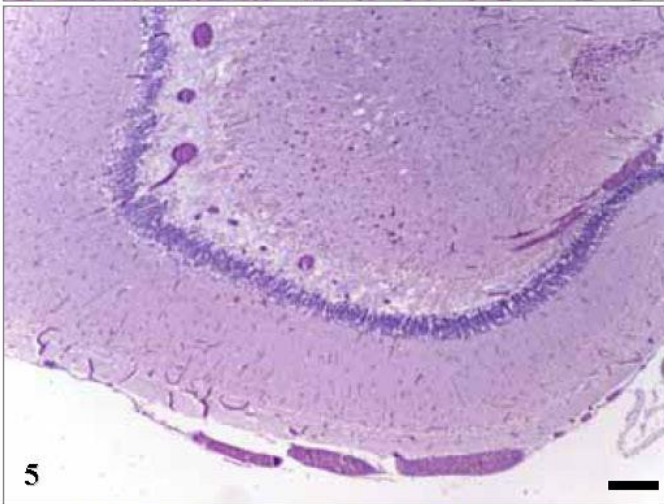
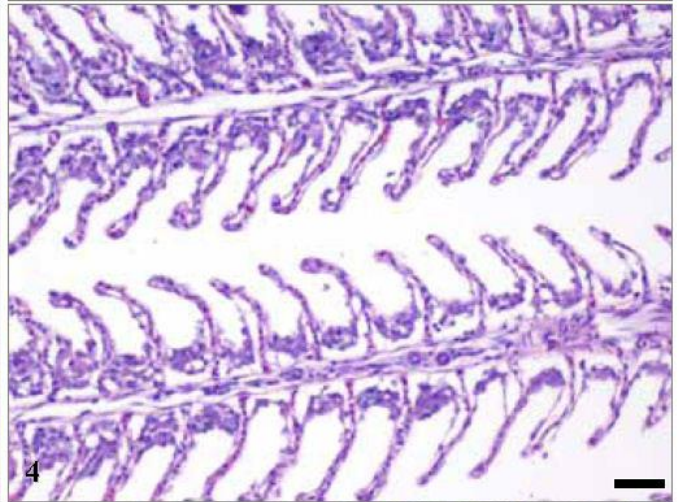
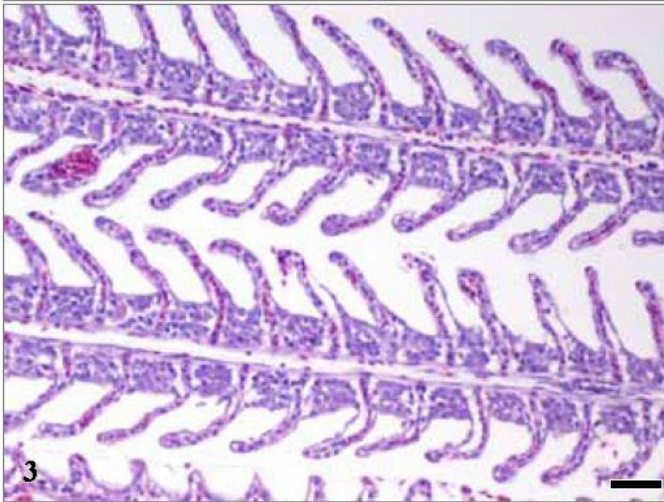
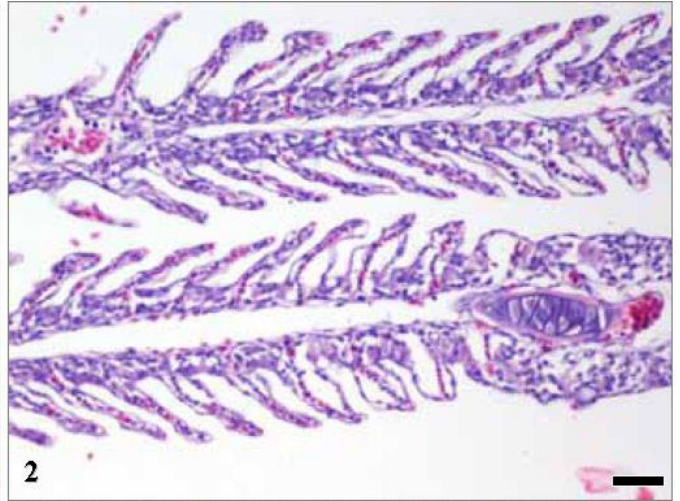
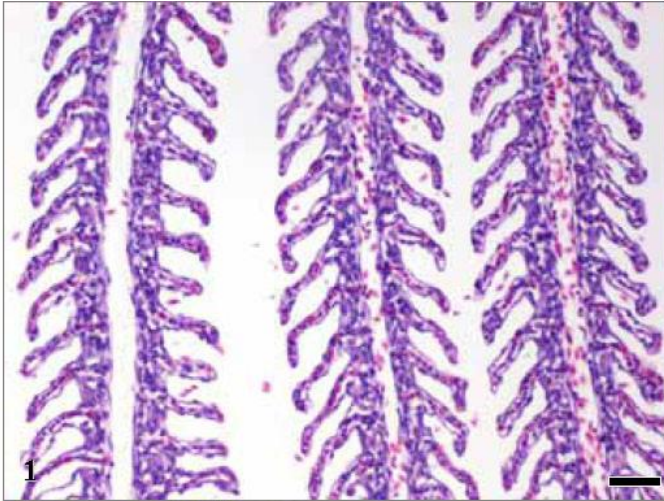




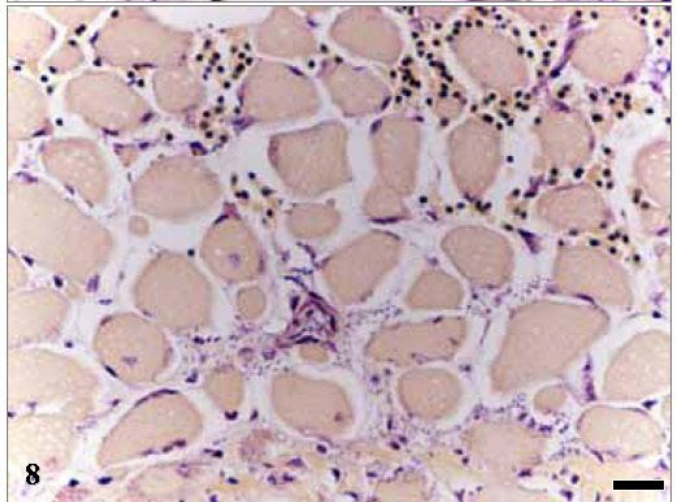
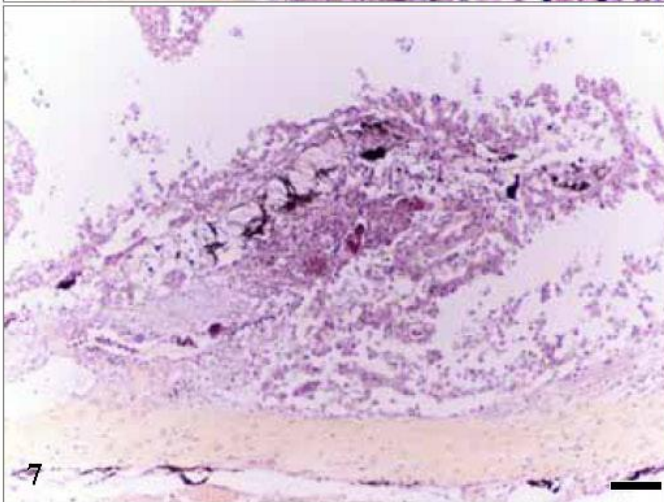
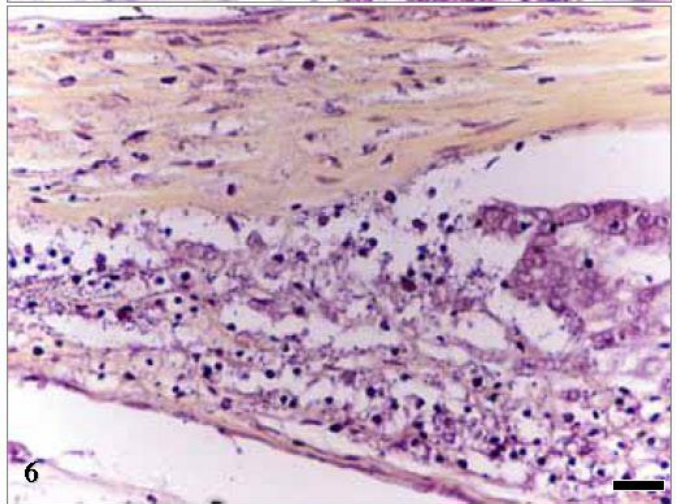
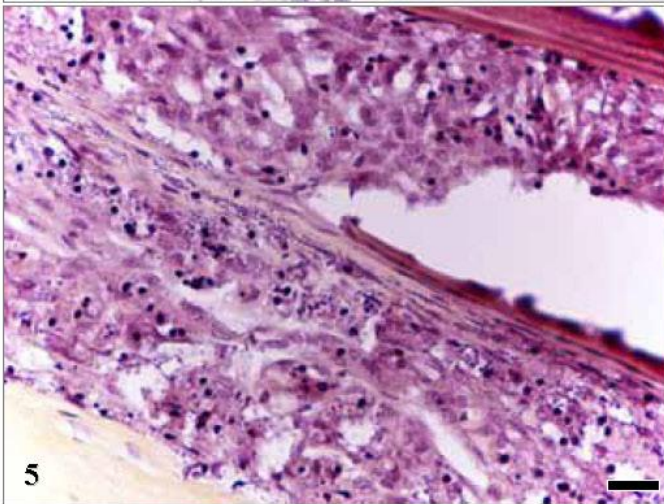
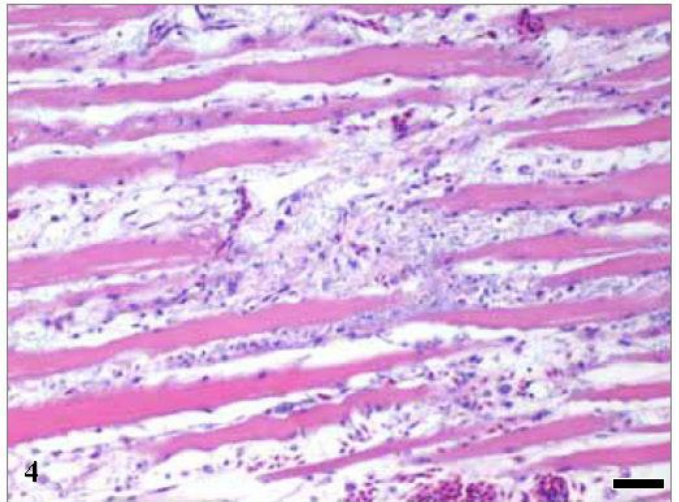
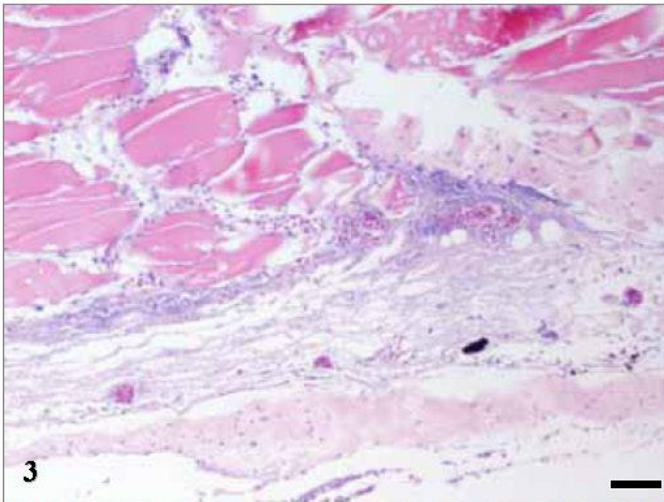
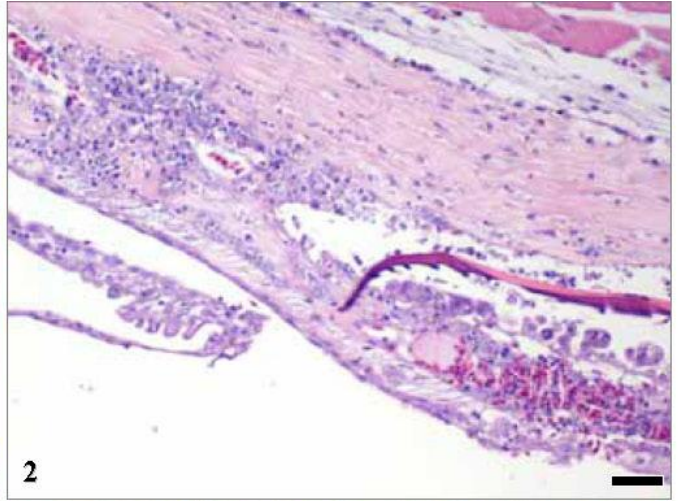
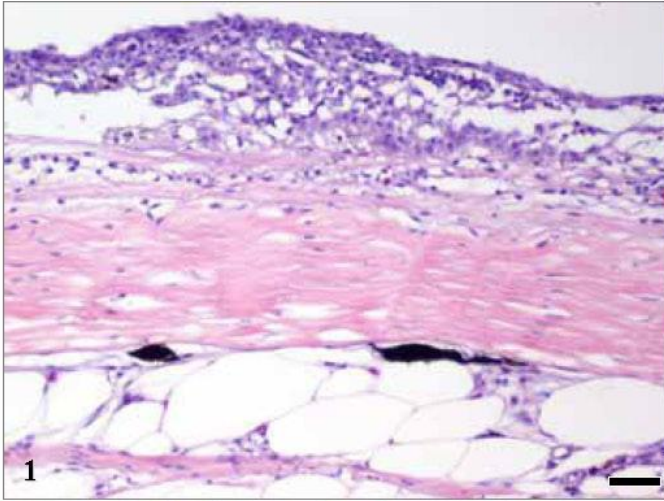
**Εικόνα Π11:** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο γαστρεντερικό σωλήνα ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V.anguillarum* (H-E). **1.** Υποεπιθηλιακό οίδημα στο όριο οισοφάγου-στομάχου (Ράβδος=100μm). **2.** Διάταση (αριστερά) και κενοδοπιώδης εκφύλιση (δεξιά) των γαστρικών αδένων (Ράβδος=50μm). Οίδημα του χορίου στο πρόσθιο έντερο (**3** Ράβδος=50μm), αποκόλληση του επιθηλίου στο ίδιο τμήμα (**4** Ράβδος=100μm), στο απευθυσμένο (**8** Ράβδος=100μm) και σε πυλωρικό τυφλό (**7** Ράβδος=100μm). Διάταση και υπεραιμία των αγγείων του χορίου και της μυϊκής στιβάδας (**5** Ράβδος=100μm) και ρήξη αυτών με μικροαιμορραγίες (**6** Ράβδος=100μm) στο πρόσθιο έντερο.



**Εικόνα Π12: 1–4.** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στα βράγχια των ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 ή με το Van731 στέλεχος *V.anguillarum*. (H-E, Ράβδος=50μm) Διάταση των αγγείων των πρωτογενών βραγχιακών νηματίων (**1**), αποκόλληση του επιθηλίου (**2**), οίδημα των κυττάρων της βάσης τους (**3**) και τελικά νέκρωση των δευτερογενών βραγχιακών νηματίων (**4**). **5–8.** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν σπάνια σε διάφορα όργανα των πειραματόζωων (H-E). Διάταση και υπεραιμία των αγγείων των μηνίγγων των εγκεφαλικών ημισφαιρίων (**5**, Ράβδος=250μm) και του συνόλου των αγγείων του εγκεφάλου και του χοριοειδούς πλέγματος στο ύψος της τρίτης κοιλίας (**6**, Ράβδος=100μm). **7.** Εστιακή νέκρωση στο πάγκρεας (Ράβδος=100μm). **8.** Εστιακές ρήξεις των αγγείων της αγγειώδους στιβάδας της νηκτικής κύστης και μικροαιμορραγίες στο όργανο (Ράβδος=50μm).

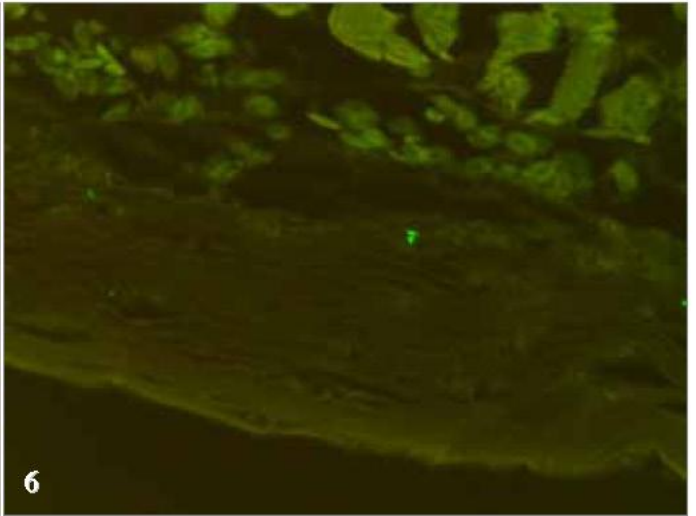
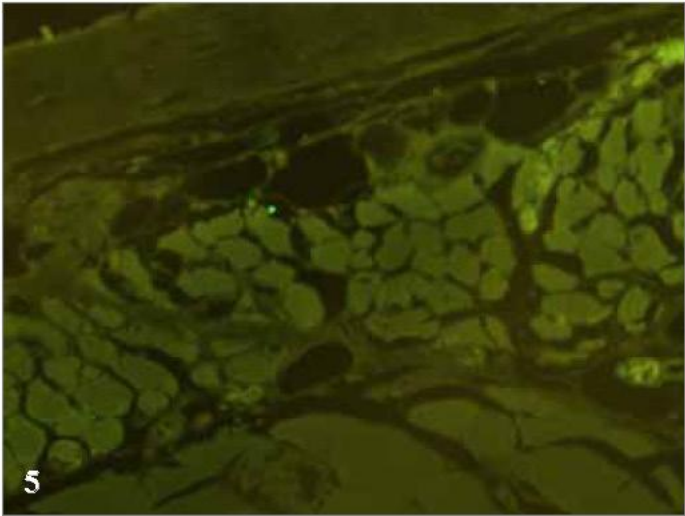
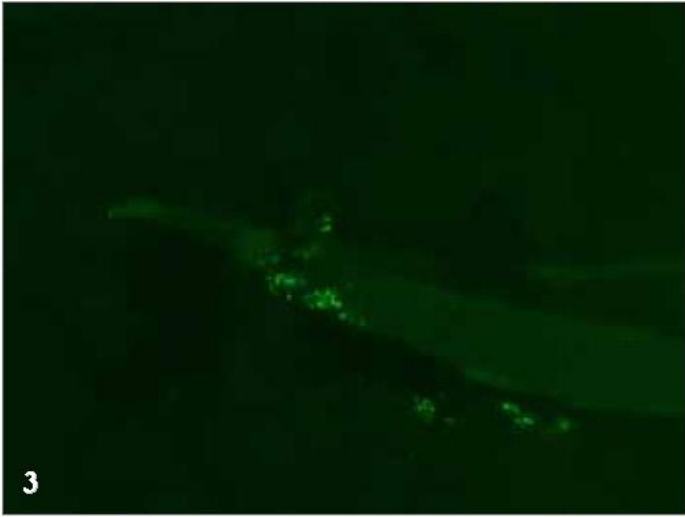
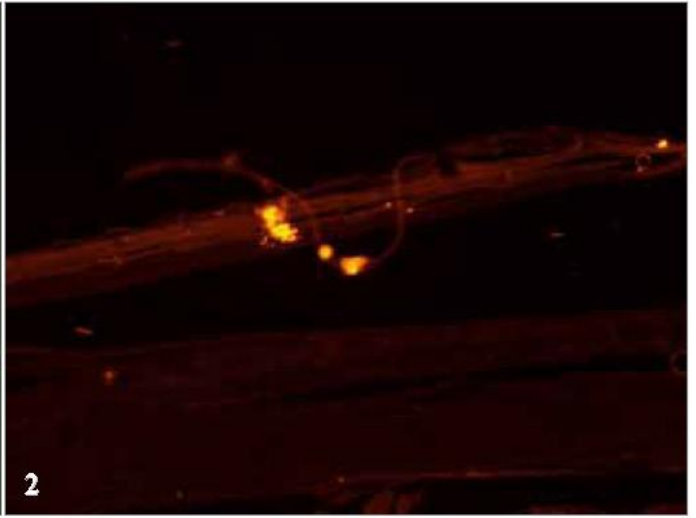
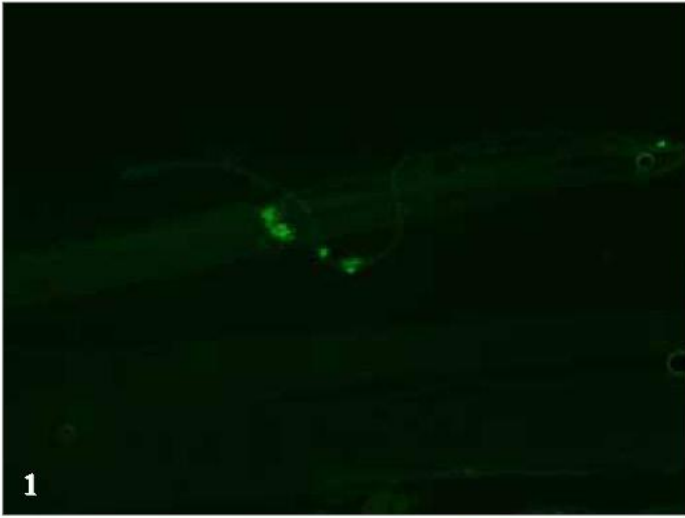


**Εικόνα Π13:** Ενδεικτικές αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στο δέρμα (1-2) και τους υποκείμενους μύες (3-4) ιχθύων που μολύνθηκαν με το Van1 στέλεχος *V.anguillarum* (H-E). **1.** Νέκρωση και αποκόλληση της επιδερμίδας (Ράβδος=50μm). **2.** Εστιακή φλεγμονώδης διήθηση στο χόριο του δέρματος (Ράβδος=50μm). **3.** Επέκταση φλεγμονής στους υποκείμενους του δέρματος γραμμωτούς μύες (Ράβδος=100μm). **4.** Έντονο οίδημα, εκφύλιση και νέκρωση των εν λόγω μυών (Ράβδος=50μm). Παρουσία πολυάριθμων βακτηριδίων στην κεράτινη στιβάδα (**5** Ράβδος=250μm), στο χόριο (**6** Ράβδος=250μm), σε όλη την έκταση του νεκρωμένου δέρματος (**7** Ράβδος=100μm) και στα μεσομυϊκά διαστήματα (**8** Ράβδος=250μm) κατά την εξέλιξη των αλλοιώσεων στο δέρμα (B-H).

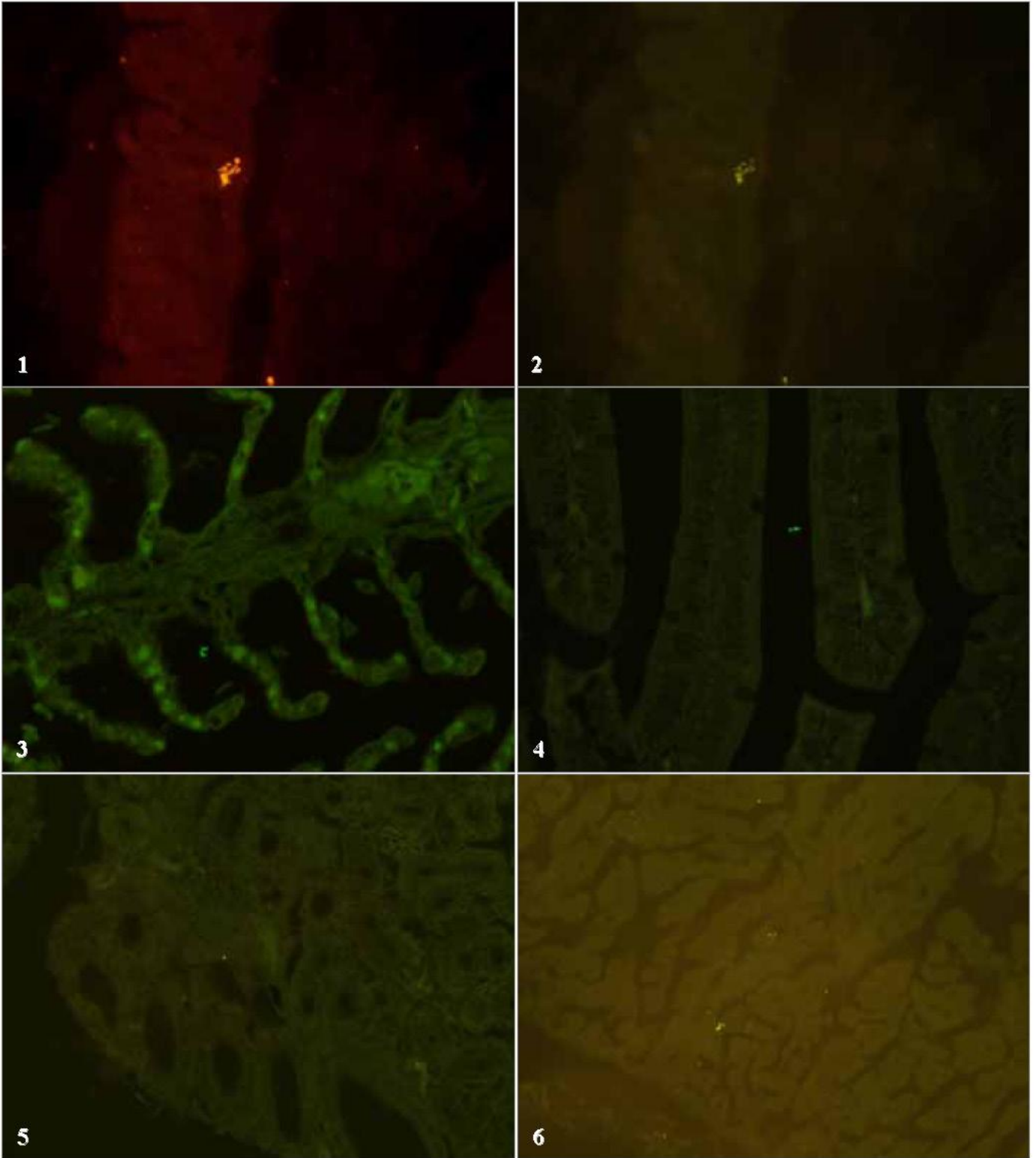


**Εικόνα Π14:** Διείσδυση του *V. anguillarum* στο δέρμα του λαβρακιού. Το βακτηρίδιο εισέρχεται (1,2) και αποικίζει τα λέπια (3) και την κεράτινη στιβάδα της επιδερμίδας (4) και προωθείται, εν συνεχεία, στις υποκείμενες του δέρματος μυϊκές στιβάδες (5,6). FISH με ιχνηθέτη το Van3 (1,3,4,5,6) και το Eub338 (2).





**Εικόνα Π15:** Ανίχνευση του *V. anguillarum* σε ορισμένα όργανα του λαβρακιού. **1,2:** Νηκτική κύστη, **3:** Βράγχια, **4:** Οπίσθιο έντερο, **5:** Σωματικός νεφρός, **6:** Καρδιά. FISH με ιχνηθέτη το Eub338 (**1**) και το Van3 (**2,3,4,5,6**).





ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

## ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΝΑΚΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΛΑΒΡΑΚΙΟΥ (*Dicentrarchus labrax*)

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ Χ. ΤΕΛΙΟΥΣΗ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν τρεις πειραματικές μολύνσεις ιχθυδίων λαβρακιού και χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριδιακά στελέχη του *V. anguillarum*, το Van1 και το Van731.

Τα ιχθύδια που επιλέχθηκαν ως πειραματόζωα προήλθαν από ιχθυογεννητικό σταθμό και προσαρμόστηκαν ικανοποιητικά στις συνθήκες του εργαστηρίου. Το σύνολο των πειραματικών μολύνσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της εμβάπτισης.

Το Van1 είναι φυσικό στέλεχος *V. anguillarum* που διαπιστώσαμε ότι διαθέτει ένα πλασμίδιο μεγέθους 67Kb, το οποίο ονομάσαμε pKTP. Το pKTP είναι πλασμίδιο όμοιο με το pJM1 και υπεύθυνο για την παραγωγή σιδηροφόρου μορίου από το στέλεχος. Το Van731 είναι γενετικά τροποποιημένο στέλεχος που δημιουργήσαμε από το Van1 με θερμική καταπόνηση. Το Van731 δεν διαθέτει το pKTP πλασμίδιο. Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε κοινά θρεπτικά υποστρώματα, ελέγχθηκαν τα μικροβιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους, τα οποία διαπιστώθηκαν ταυτόσημα, και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο της PCR, με τη χρήση του γονιδίου *amiB*. Η επιτυχής αφαίρεση του πλασμιδίου και η αδυναμία σύνθεσης σιδηροφόρου μορίου από το Van731 ελέγχθηκε σε CAS agar και επιβεβαιώθηκε με PCR με τη χρήση των γονιδίων *angR* και *angH*. Η δυνατότητα παραγωγής ισταμίνης από τα στελέχη επιβεβαιώθηκε με HPLC.

Η πρώτη πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της κινητικής του Van1. Συνολικά 90 ιχθύδια λαβρακιού βάρους 12-14g διανεμήθηκαν (30 ιχθύδια/ δεξαμενή) σε 3 δεξαμενές θαλασσινού νερού. Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε στα ιχθύδια των δύο εκ των τριών

δεξαμενών ενώ η τρίτη ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Η συγκέντρωση του στελέχους Van1 στο θαλασσινό νερό ήταν  $5 \times 10^7$  βακτηρίδια/mL. Διενεργήθηκαν 10 δειγματοληψίες (3 ιχθύδια/ δεξαμενή) σε χρόνους 2, 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 62 και 72 ώρες μετά την μόλυνση.

Ο έλεγχος της παρουσίας του βακτηριδίου στους ιστούς έγινε με χρώση κατά Gram και επιβεβαιώθηκε με FISH. Για τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκαν οι ιχνηθέτες Van3 (ειδικός για το *V. anguillarum*) και Eub338 κοινός για πολλά βακτηριδιακά γένη.

Από τα αποτελέσματα της πρώτης πειραματικής μόλυνσης προκύπτει, ότι πύλη εισόδου του βακτηριδίου στον οργανισμό του ψαριού, με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε, αποτελεί το δέρμα. Το βακτηρίδιο εντοπίστηκε σε μικρά αθροίσματα στο χόριο του δέρματος στις 20 ώρες μετά τη μόλυνση και σχεδόν ταυτόχρονα στο σπλήνα και στο περιτόναιο. Έτσι θεωρείται πιθανή η εξάπλωση του βακτηριδίου τόσο δια μέσου της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου, όσο και μέσω του χαλαρού συνδετικού ιστού. Στις 72 ώρες μετά τη μόλυνση το βακτηρίδιο διαπιστώθηκε στο παρέγχυμα και τα αγγεία του συνόλου των οργάνων που εξετάστηκαν.

Η δεύτερη πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η προκαλούμενη από τα στελέχη Van1 και Van731 θνησιμότητα. Στη διαδικασία περιλήφθηκαν τρεις πειραματικές ομάδες ιχθυδίων. Η πρώτη ομάδα (P+) μολύνθηκε με το φυσικό στέλεχος Van1. Η δεύτερη ομάδα (P-) μολύνθηκε με το μεταλλαγμένο στέλεχος Van731. Η τρίτη πειραματική ομάδα (M) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Συνολικά 240 ιχθύδια λαβρακιού βάρους 12,5-13,5g διανεμήθηκαν τυχαία σε 12 δεξαμενές θαλασσινού νερού. Τέσσερις δεξαμενές (20 ιχθύδια/ δεξαμενή) αποτέλεσαν την κάθε πειραματική ομάδα.

Η μέση θνησιμότητα υπολογίστηκε στο 87,5% για την ομάδα P+ και 2,5% για την ομάδα P-. Δεδομένου ότι τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν διαφέρουν μόνο στην παρουσία του πλασμιδίου pKTP στο Van1, αποδεικνύεται ότι η προκαλούμενη από το βακτηρίδιο θνησιμότητα οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στο πλασμίδιο που το βακτηρίδιο διαθέτει και στο σύστημα δέσμευσης σιδήρου, που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο.

Η τρίτη πειραματική μόλυνση πραγματοποιήθηκε για να περιγραφούν οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις της Δονακίωσης από *V. anguillarum* στο λαβράκι και να διερευνηθεί σε επίπεδο αλλοιώσεων ο ρόλος του συστήματος δέσμευσης σιδήρου που διαθέτει το βακτηρίδιο. Στην τρίτη πειραματική μόλυνση, περιλήφθηκαν επίσης τρεις πειραματικές ομάδες. Η ομάδα P+, η οποία μολύνθηκε με το Van1, η ομάδα P-, η οποία μολύνθηκε με το Van731, και η ομάδα M που χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι ομάδες P+ και P- αποτελούνταν από 80 ιχθύδια έκαστη, μοιρασμένα σε τέσσερις δεξαμενές (20 ιχθύδια/ δεξαμενή). Η ομάδα M αποτελούνταν από 60 ιχθύδια μοιρασμένα σε δύο δεξαμενές (30 ιχθύδια/ δεξαμενή). Η συγκέντρωση των στελεχών Van1 και Van731 στο θαλασσινό νερό των αντίστοιχων δεξαμενών μόλυνσης ήταν  $5 \times 10^7$

βακτηρίδια/mL. Πραγματοποιήθηκαν 7 δειγματοληψίες (8 ιχθύδια/ ομάδα/ δειγματοληψία) στις ημέρες 1η, 2η, 3η, 4η, 6η, 9η και 14η από την ημέρα της μόλυνσης. Στο σύνολο των ιχθυδίων εξετάστηκε και βαθμολογήθηκε κλινικά το δέρμα και παθολογοανατομικά το δέρμα με τον υποκείμενο μυϊκό ιστό, η καρδιά, ο σπλήνας, το ήπαρ, ο σωματικός και κεφαλικός νεφρός, τα βράγχια, ο στόμαχος, το πρόσθιο και οπίσθιο έντερο, το πάγκρεας, ο εγκέφαλος και η νηκτική κύστη.

Σημαντικότερες αλλοιώσεις από τη μόλυνση με το Van1 προκλήθηκαν στο δέρμα, το σπλήνα και την καρδιά, ηπιότερες στο ήπαρ, τον κεφαλικό και σωματικό νεφρό, τα βράγχια, το οπίσθιο έντερο και τη νηκτική κύστη, ενώ ελάχιστες ήταν οι αλλοιώσεις στα υπόλοιπα όργανα. Κυκλοφορικές διαταραχές που συμπεριλάμβαναν οιδήματα, διάταση και συμφόρηση αγγείων και αιμορραγίες, νεκρώσεις και ήπια φλεγμονώδη αντίδραση χαρακτήρισαν την ιστοπαθολογική εικόνα της νόσου στα διάφορα όργανα. Οι αλλοιώσεις αφορούσαν τα ίδια όργανα, αλλά ήταν σημαντικά ηπιότερες στα ιχθύδια που μολύνθηκαν με το γενετικά τροποποιημένο στέλεχος Van731.

Το σύστημα δέσμευσης σιδήρου, που διαθέτει το βακτηρίδιο αποδεικνύεται σημαντικό για την εκδήλωση της παθογένειας της νόσου. Εντούτοις στην παθογένεια πιθανώς εμπλέκονται, λειτουργώντας συνδυαστικά ή και ανεξάρτητα, και άλλοι παθογενετικοί μηχανισμοί του βακτηριδίου, όπως η παραγόμενη από αυτό ισταμίνη, οι οποίοι πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Το πειραματικό πρότυπο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτή την κατεύθυνση.

ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI  
SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE  
LABORATORY OF PATHOLOGY  
THESSALONIKI, MACEDONIA, GREECE

## **Pathological Study of Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Vibriosis**

Konstantinos C. Teliouis

### **SUMMARY OF DOCTORAL THESIS**

In this study, juvenile seabass fish were infected with two bacterial strains of *V. anguillarum*, (Van1 and Van731) in three different experiments. Juvenile fish were purchased from a commercial fish hatchery, acclimatized to laboratory conditions, and experimentally infected by immersion in sea water containing  $5 \times 10^7$  bacteria/mL.

Van1, is a naturally occurring strain of *V. anguillarum*. We found that Van1 harbours a 67kb pJM1-like plasmid, which we named pKTP. pKTP encodes the iron-sequestering system of this strain. Using the heat shock method we have also created the genetically modified plasmidless- derivative strain of Van1 designated as Van731. Both strains were cultured in appropriate nutritious substrates, and identified as *V. anguillarum* by classical microbiological and biochemical tests, and by PCR detection of the *amiB* gene. The successful curing of the plasmid evident by the incapability of Van731 to uptake iron was determined in CAS agar cultures and confirmed with *angR* and *angH* gene-specific PCR. The ability of the strain to produce histamine was tested by HPLC.

The first experimental infection aimed to study the Van1 kinetics. Juvenile 12-14g fish (n=90), were divided equally into 2 experimental groups and placed in 3 tanks of sea water (30 per tank). 60 fish were infected with Van1 and 30 remained uninfected. Sampling was performed at 2, 4, 12, 20, 28, 34, 44, 52, 62 and 72 hours post infection. At each timepoint two infected and one uninfected fish were sacrificed and examined.

The presence of the bacteria in fish tissues was examined histologically with the Gram stain and confirmed with 16rRNA fluorescent in situ hybridization (FISH). For FISH the *V.anguillarum*- specific probe Vav3 and the universal eubacterial probe *EUB 338* were used. Histological and FISH analyses showed that skin was the most probable route of *V.anguillarum*



invasion. The bacteria were found in small aggregates in dermis, as early as 20 hours post infection. At the same time point small numbers of bacteria were seen in the spleen and peritoneum. Therefore, after their initial entry bacteria may possibly spread not only through blood or lymph circulation but through the loose connective tissue as well. 72 hours post infection the bacteria were found in the parenchyma and the vessels of all the fish organs examined.

The second experimental infection was carried out in order to assess the mortality of fish infected with the strains Van1 and Van 731. For that, juvenile fish with a body weight of 22g (n=240) were divided into three experimental groups. Fish were placed in 12 sea water tanks each one containing 20 fish. The first group (P+) was infected with the naturally-occurring strain Van1. The second group (P-) was infected with the genetically modified plasmidless Van731 strain. Uninfected age-matched fish comprised the third group (M-control).

The mortality of vibriosis was significantly lower in fish infected with the plasmidless *V.anguillarum* strain. The average mortality was 87.5% for group P+ and 2.5% for group P-. This result indicates that the presence of the iron acquisition system-related pKTP plasmid is particularly important for Van1 pathogenicity.

The third experimental infection aimed to investigate the effect of the iron-binding bacterial system on the *V.anguillarum* ability to induce histopathological lesions in seabass fish. Three experimental groups of juvenile fish were analyzed. Group P+ which was infected with Van1, group P- which was infected with Van731 and group M which was the uninfected control group. Each of the groups P+ and P- consisted of 80 juvenile fish, divided into 4 tanks (20 fish per tank). Group M consisted of 60 juvenile fish divided into two tanks (30 fish per tank). At the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 6th, 9th, and 14th days post infection eight fish from each experimental group were sacrificed. The skin was examined grossly and *V.anguillarum*-induced lesions were scored. The skin with the subjacent muscles, the heart, the spleen, the liver, the head and body kidney, the gills, the stomach, the anterior and the posterior intestine, the pancreas, the brain and the swim bladder were collected and examined histopathologically.

The skin, the spleen and the heart were the organ mostly affected. Less severe lesions were seen in the liver, the head and body kidney, the gills, the posterior intestine and the swim bladder, whereas the lesions were scarce and mild in the remaining organs. The histopathological lesions that were consistently found in the organs of fish infected with both strains of *V.anguillarum* included oedema, vessel dilatation, congestion, haemorrhage, necrosis and mild inflammatory cell infiltration. Several histopathological parameters were scored and analyzed

statistically. The qualitative and quantitative analysis of *V.anguillarum*-induced lesions showed that the genetically modified strain Van731 caused significantly less pathology in fish.

Taken together the results of this study suggest that iron binding system of the Van1 strain of *V.anguillarum* is important but not essential for the pathogenesis of vibriosis of the seabass. Other pathogenetic factors of this bacterium, although less important than the iron-binding system, contribute in the pathogenesis of vibriosis.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe, P.M. (1972) Certain chemical and immunological properties of the endotoxin from *Vibrio anguillarum*. M.Sc. Dissertation. Oregon State University Corvallis, Oregon
- Acosta, F., Real, F., de Galarreta, C.M.R., Diaz, R., Padilla, D. and Ellis, A.E. (2003) Toxicity of nitric oxide and peroxyxynitrite to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 15: 241–248
- Actis, L.A. Fish, W., Crosa, J.H., Kellerman, K., Ellenberger, S.R., Hauser, F.M. and Sanders-Loehr, J. (1986) Characterization of anguibactin, a novel siderophore from *V. anguillarum* 775 (pJMI). *Journal of Bacteriology* 167: 57-65
- Actis, L.A., Potter, S. and Crosa, J.H. (1985) Iron-regulated outer membrane protein OM2 of *Vibrio anguillarum* is encoded by virulence plasmid pJMI. *Journal of Bacteriology* 161: 736-742
- Actis, L.A., Smoot, J.C., Barancin, C.E. and Findlay, R.H. (1999β) Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 39: 79–90
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Farrell, D.H. and Crosa, J.H. (1988) Genetic and molecular characterization of essential components of the *Vibrio anguillarum* plasmid-mediated iron transport system. *Journal of Biological Chemistry* 263:2853-2860
- Actis, L.A., Tomalsky, M.E. and Crosa, J.H. (1999α) Vibriosis, p. 523-557. In P.T.K. Woo and E.W. Bruno (ed.), Fish diseases and disorders, vol. 3: viral, bacterial and fungal infections. Cab International Publishing, Wallingford, United Kingdom.
- Actis, L.A., Tolmasky, M.E., Crosa, L.M. and Crosa, J.H. (1995) Characterization and regulation of the expression of FatB, an irontransport protein encoded by the pJMI virulence plasmid. *Molecular Microbiology* 17: 197-204
- Adone, R., Piccininno, G., Pistoia, C., Bianchi, R. and Giuchini, F. (1996) Detection of *Vibrio anguillarum* by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay performed with monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Medicine* 43: 579-584
- Afonso, A., Ellis, A.E. and Silva, M.T. (1997) The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 7: 335-348
- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A. E. and Silva, M. T. (1998β) Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of Aquatic Organisms* 34: 27–37

- Afonso, A., Silva, J., Lousanda, S., Ellis, A.E. and Silva, M.T. (1998) Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 8: 319-338
- Agius, C (1979) The role of melano-macrophage centers in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Diseases* 2: 337-343
- Agius, C. and Roberts, R. J. (2003) Melanomacrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26: 499-509
- Agius, C., Horne, M.T. and Ward, P. (1983) Immunisation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against vibriosis. Comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes. *Journal of Fish Diseases* 6: 129–134
- Ahn, S.H., Kim, D.G., Jeong, S.H., Hong, G.E. and Kong, I.S. (2006) Isolation of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene (*amiB*) from *Vibrio anguillarum* and the effect of *amiB* gene deletion on stress responses. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 16: 1416–1421
- Alexander, J.B., Bowers, A. and Shamshoom, S.M. (1981) Hyperosmotic infiltration of bacteria into trout: route of entry and fate of the infiltrated bacteria. In “Developments in Biological Standardisation” (Eds. D.P. Anderson and W. Henessen), Vol. 49, pp.441-445. Karger, Basel
- Alice, A.F., Lopez, C.S. and Crosa, J.H. (2005) Plasmid and Chromosome-Encoded Redundant and Specific Functions Are Involved in Biosynthesis of the Siderophore Anguibactin in *Vibrio anguillarum* 775: a Case of Chance and Necessity? *Journal of Bacteriology* 187: 2209-2214
- Alsina, M. and Blanch, A.R. (1994a) Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 719-721
- Alsina, M. and Blanch, A.R. (1994b) A set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology* 76: 79-85
- Alsina, M., Martinez-Picado, J., Jofre, J. and Blanch, A.R. (1994) A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1681-1683
- Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990) Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762–770
- Amend, D.F. and Eshenour, R.W. (1980) Development and use of commercial fish vaccines. *Salmonid* (March/April): 8-12
- Amend, D.F. and Fender, D.C. (1976) Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions: a model for vaccinating fish. *Science* 192: 793-794
- Ament, R.W. and Fender, D.C. (1977) Immersion method for treating aquatic animals. U.S. Patent 4,009,259

- Anderson, J. and Conroy, D. (1970) *Vibrio* disease in marine fishes. In: Snieszko, S.F. (ed.) *Symposium of Diseases of Fishes and Shellfishes*. Special Publication No. 5, American Fisheries Society, pp. 266-272
- André, P.G., Conroy, D.A., McGregor, D., Roberts, R.G. and Young, H. (1972) Acute haemorrhagic septicaemia in captive European eels (*Anguilla vulgaris*). A clinical and pathological study. *Veterinary Record* 90: 726–729
- Aoki, T., Hirono, I., De Castro, T. and Kitao, T. (1989) Rapid identification of *Vibrio anguillarum* by colony hybridization. *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 5:67-73
- Aoki, T., Nomura, J. and Crosa, J.H. (1985) Virulence of *Vibrio anguillarum* with particular emphasis on the outer membrane components. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51: 1249-1254
- Arason, G.J. (1996) Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology* 6: 277-289
- Arason, G.J., Gudmundsdottir, S., Elgaard, L., Thiel, S. and Jensen, J. (1994) An opsonin with mannan-binding protein (MBP)-like activity in the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Scandinavian Journal of Immunology* 40: 692
- Arnesen, S.M., Schroder, M.B., Dalmo, R.A. and Bogwald, J. (2002) Antigen uptake and immunoglobulin production in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology* 13: 159-170
- Austin, B. and Austin, D.A. (1993) *Bacterial fish pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish*. 2nd edn. Chichester: Ellis Horwood Ltd.
- Austin, B., Alsina, M., Austin, D.A., Blanch, A.R., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Pedersen, K., Tiainen, T., Verdonck, L. and Swings, J. (1995) Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: A comparison of different methods. *Systematic and Applied Microbiology* 18: 285-302
- Austin, B., Austin, D., Sutherland, R., Thompson, F. and Swings, J. (2005) Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. *Environmental Microbiology* 7: 1488-1495
- Austin, B., Austin, D.A., Blanch, A.R., Cerda, M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J.L., Pedersen, K., Tiainen, T., Verdonck, L. and Swings, J. (1997) A comparison of methods for the typing of fish pathogenic *Vibrio* Spp. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 89-101

- Bagge, J. and Bagge, O. (1956) *Vibrio anguillarum* som arsaag til ulcussygdom hos torsk (*Gadus callaris* Linne). *Nordisk Veterinarmedicin* 8: 481-492
- Balado, M., Osorio, C.R. and Lemos, M.L. (2008) Biosynthetic and regulatory elements involved in the production of the siderophore vancomycin in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 154: 1400–1413
- Balebona, M.C., Morinigo, M.A. and Borrego, J.J. (2001) Hydrophobicity and adhesion to fish cells and mucus of *Vibrio* strains isolated from infected fish. *Int. Microbiol.* 4: 21–26
- Bancroft, J.D. and Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th edn. Churchill Livingstone, London.
- Banoub, J.H., Michon, F. and Hodder, H.J. (1987) Structural elucidation of the O-specific polysaccharide of the phenol phase soluble lipopolysaccharide of *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 65:19-26
- Barancin, C.E., Smoot, J.C., Findlay, R.H. and Actis, L.A. (1998) Plasmid-Mediated Histamine Biosynthesis in the Bacterial Fish Pathogen *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* 39: 235-244
- Barazi-Yeroulanos, L. (2010) Synthesis of Mediterranean marine finfish aquaculture – a marketing and promotion strategy. *Studies and Reviews*. General Fisheries Commission for the Mediterranean. No. 88 Rome, FAO.
- Barrow, G.I., and Feltham, R.K.A. (1993) *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Baudin-Laurencin, F. and Germon, E. (1987) Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum*: ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity. *Aquaculture* 67: 203-205
- Baudin-Laurencin, F. and Tangtrongpiros, J. (1980) Some results of vaccination against vibriosis in Brittany. In "Fish Diseases" (Ed. W. Ahne), pp.60-68. Springer-Verlag, Berlin
- Baumann, P., Bang, S. and Baumann, L. (1978) Phenotypic characterization of *Beneckeia anguillara* biotypes I and II. *Current Microbiology* 1: 85-88
- Baumann, P., Baumann, L., Bang, S. S. and Woolkalis, M. J. (1980) Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Current Microbiology* 4: 127-132
- Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. (1984) Genus *Vibrio*, p518-538. In Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- Ben-Haim, Y., Thompaon, F.L., Thompson, C.C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J. and Rosenberg, E. (2003) *Vibrio coralliilyticus* sp. Nov., a temperature-dependent pathogen of the

- coral *Pocillopora damicornis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 53: 309-315
- Bercz, I., Bertok, I. and Berezna, D. (1966) Comparative studies of the toxicology of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Canadian Journal of Microbiology* 12: 1070-1071
- Bergman, A. (1909) Die rote Beulenkrankheit des Aals. *Berichte aus der Koniglichen Bayerischen Biologischen Versuchsstation* 2: 10-54
- Bergman, A.M. (1912) Eine ansteckende Augenkrankheit, Keratomalacie, bei Dorschen an der Sudkuste Schwedens (An infectious eye disease, keratomalacia, among cod fishes on the south coast of Sweden). *Zbl. Bakteriol. I. Orig.* 62: 200-212
- Berner, A.F. and Mattheis, T. (1959) Geschwurdorsche in der Fangen der Sassnitzer Kutterflotte (Ulcerous codfish in the catches of the cutter fleet at Sassnitz). *Dt. Fisherei-Ztg.* 6(7): 224-229
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P. and Wahli, T. (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* 22: 25-34
- Boesen, H.T., Pedersen, K., Larsen, J.L., Koch, C. and Ellis, A.E. (1999) *Vibrio anguillarum* resistance to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum: Role of O-antigen structure of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity* 67: 294-301
- Bogwald, J., Stensvag, K., Stuge, T.B. and Jorgensen, T.O. (1994) Tissue localisation and immune responses in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., after oral administration of *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* antigens. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 353-368
- Bolinches, J., Lemos, M.L., Fouz, B., Cambra, M., Larsen, J.L. and Toranzo, A.E. (1990) Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. *Journal of Aquatic Animal Health* 2: 21-29
- Bolinches, J., Toranzo, A.E., Silva, A., Barja, J.L. (1986) Vibriosis as the main causative factor of heavy mortalities in the oyster culture industry in Northwestern Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 6: 1-4
- Bolivar, F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of Eco RI-generated recombinant DNA molecules. *Gene* 4: 121-126
- Bonaveri, G. F. (1761) quoted by Drouin de Bouville (1907)
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Rodriguez-Maroto, J.M. Borrego, J.J. and Morinigo, M.A. (1998) Chemotaxis of pathogenic *Vibrio* strains towards mucus surfaces of Gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1573-1575

- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Zorilla, I., Borrego, J.J. and Morinigo, M.A. (1996) Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of Gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3650-3654
- Bowser, P.R., Rosemar, R., Reiner, C.R. (1981) A preliminary report of vibriosis in cultured american lobster. *Homarus americanus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37:80-85
- Bowser, P.R., Wooster, G.A., Chen, C-Y. and Mo, R.S. (2004) Polymicrobial infection of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) with three bacterial pathogens: a case report. *Journal of fish diseases* 27: 123-127
- Braun, R., Arnesen, J.A., Rinne, A. and Hjelmeland, K. (1990) Immunohistological localization of trypsin in mucus-secreting layers of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Diseases* 13: 233-238
- Bricknell, I.R., Bowden, T.J., Verner-Jeffreys, D.W., Bruno, D.W., Shields, R.J. and Ellis, A.E. (2000) Susceptibility of juvenile and sub-adult Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) to infection by *Vibrio anguillarum* and efficacy of protection induced by vaccination. *Fish and Shellfish Immunology* 10: 319-327
- Brown, C. (1981) A study of two shellfish-pathogenic *Vibrio* strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. *Journal of Shellfish Research* 1: 83-87
- Brown, C., Losee, E. (1978) Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 31: 41-47
- Brown, R. C. and Hopps, H. C. (1973) Staining of bacteria in tissue sections: A reliable Gram stain method. *American Journal of Clinical Pathology* 60: 234-240
- Brunn, A. and Heiberg, B. (1932) The red disease of the eel in Danish waters. *Medd Komm Havundersog KBH Ser Fish* 9: 1-19
- Bruno, D. W. and Poppe, T. T. (1996) A colour atlas of salmonid diseases. London: Academic Press.
- Bryant, T.N., Lee, J.V., West, P.A. and Colwell, R.R. (1986a) Numerical classification of species of *Vibrio* and related genera. *Journal of Applied Bacteriology* 61:437-467
- Bryant, T.N., Lee, J.V., West, P.A. and Colwell, R.R. (1986b) A probability matrix for the identification of species of *Vibrio* and related genera. *Journal of Applied Bacteriology* 61:469-480
- Bullen, J.J. and Griffiths, E. (1987) Iron and Infection-Molecular, Physiological and Clinical Aspects. Chichester: Wileybit
- Bullen, J.J. and Wallis, S.N. (1977) Reversal of the bacteriocidal effect of polymorphs by a ferritin-antibody complex. *FEMS Microbiology Letters* 1: 117-120



- Bullen, J.J., Rogers, H.J. and Griffiths, E. (1978) Role of iron in bacterial infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 80: 1-35
- Buller, N.B. (2004) Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. CABI Publishing, Wallingford, UK
- Bullock, G.L., Conroy, D.A. and Sniezko, S.F. (1971) Bacterial diseases of fishes. In "Diseases of Fishes" (Eds. S. F. Sniezko and H.R. Axelrod). TFH Publications, Neptune City, New Jersey
- Cahill, M.M. (1990) Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology* 19: 21-41
- Cammarata, M., Vazzana, M., Cervello, M., Arizza, V. and Parrinello, N. (2000) Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology* 10: 143-154
- Campbell, A.C. and Bushwell, J.A. (1983) The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at three different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology* 35: 215-223
- Canestrini, G. (1893) La malattia dominante delle anguille. *Atti Istituto delle Scienze* 7: 809-817
- Chair, M., Dehasque, M., Van Poucke, S., Nelis, H., Sorgeloos, P. De Leenheer, A.P. (1994) An oral challenge for turbot with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture International* 2: 270-272
- Chart, H. (1983) Multiflagellate variants of *Vibrio anguillarum*. *Journal of General Microbiology* 129: 2193-2197
- Chart, H. and Munn, C.B. (1980) Experimental vibriosis in the eel (*Anguilla anguilla*) In "Fish Diseases" (Ed. W. Ahne), pp.39-44. Springer-Verlag, Berlin
- Chen, D. and Hanna, P. J. (1992) Attachment of vibrio pathogens to cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 15: 331-337
- Chen, D., Hanna, P.J., Altmann, K., Smith, A., Moon, P. and Hammond, L.S. (1992) Development of monoclonal antibodies that identify *Vibrio* species commonly isolated from infections of humans, fish and shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3694-3700
- Chen, Q., Actis, L.A., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1994) Chromosome-mediated 2,3-dihydroxybenzoic acid is a precursor in the biosynthesis of the plasmid-mediated siderophore anguibactin in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 176: 4226-4234
- Chen, T.M., Tsai, S.S., Chen, S.C. (1985) Study on *Vibrio anguillarum* infection in cultured milkfish (*Chanos chanos*) in Taiwan. Council of Agriculture (COA). *Fish Ser No. 4, Fish Dis. Res. (VII), Taipei* p. 27-37
- Choich, J.A., El-Nabawi, A. and Silbergeld, E.K. (2004) Evidence of histamine receptors in fish brain using an in vivo [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose autoradiographic method and an in vitro receptor-binding autoradiographic method. *Environmental Research* 94: 86-93

- Cipriano, R.C., Pyle, J.B., Starliper, C.E. and Pyle, S.W. (1985) Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 211-218
- Cisar, J.O. and Fryer, J.L. (1969) An epizootic of vibriosis in chinook salmon. *Bulletin of Wildlife Disease Association* 5: 73-75
- Claire, M., Holland, H. and Lambris, J.D. (2002) The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology* 12: 399-420
- Cole, A.M., Darouiche, R.O., Legarda, D., Connell, N. and Diamond, G. (2000) Characterization of a fish antimicrobial peptide: gene expression, subcellular localization, and spectrum of activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 2039-2045
- Cole, A.M., Weis, P. and Diamond, G. (1997) Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *Journal of Biological Chemistry* 272: 12008-12013
- Coloni, A., Paperna, I. and Gordin, H. (1981) Bacterial infections in gilthead sea bream *Sparus aurata* cultured in Elat. *Aquaculture* 23: 257-267
- Conchas, R., Lemos, M., Barja, J. and Toranzo, A. (1991) Distribution of plasmid- and chromosome-mediated iron uptake systems in *Vibrio anguillarum* strains of different origins. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2956-2962
- Cooke, E.M. and Ewins, S.P. (1975) Properties of strains of *Escherichia coli* isolated from a variety of sources. *Journal of Medical Microbiology* 8: 107-111
- Crosa, J.H. (1980) A plasmid associated with virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* specifies an iron-sequestering system. *Nature* 284: 566-568
- Crosa, J.H. (1984) The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence. *Annual Review of Microbiology* 38: 69-89
- Crosa, J.H. (1987) Bacterial iron metabolism, plasmids and other virulence factors. In: Bullen, J. and Griffiths, E. (eds). *Iron and Infection*. John Wiley and Sons, London, pp. 139-170
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and Molecular Biology of Siderophore-Mediated Iron Transport in Bacteria. *Microbiological Reviews* 53: 517-530
- Crosa, J.H. and Hodges, L.L. (1981) Outer membrane proteins induced under conditions of iron limitation in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 31: 223-227
- Crosa, J.H. and Walsh, C.T. (2002) Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 223-249
- Crosa, J.H., Actis, L.A., Mitoma, Y., Perez, J., Tolmasky, M. and Valvano, M. (1985) Plasmid-mediated iron sequestering systems in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum* and *Escherichia*

- coli*. In: Helinski, D., Cohen, S., Clewell, D., Jackson, D. and Hollaender, A. (eds). *Plasmids in Bacteria*, Plenum, New York, pp. 759-774
- Crosa, J.H., Hodges, L.L. and Schiewe, M.H. (1980) Curing of a plasmid is correlated with an attenuation of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 27: 897-902
- Crosa, J.H., Schiewe, M. and Falkow, S. (1977) Evidence for plasmid contribution to the virulence of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 18: 509-513
- Crosa, J.H., Walter, M. and Potter, S. (1983) Iron-uptake deficient mutants of *Vibrio anguillarum* 775 generated by insertional inactivation of the virulence plasmid pJM1. In: D. Schlessinger (ed.) *Microbiology-1983*, American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 354-358
- Croxatto, A., Chalker, V.J., Lauritz, J., Jass, J., Hardman, A., Williams, P., Camara, M. and Milton, D.L. (2002) *VanT*, a homologue of *Vibrio harveyi LuxR*, regulates serine, metalloprotease, pigment, and biofilm production in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 184: 1617-1629
- Croxatto, A., Lauritz, J., Chen, C. and Milton, D.L. (2007) *Vibrio anguillarum* colonization of rainbow trout integument requires a DNA locus involved in exopolysaccharide transport and biosynthesis. *Environmental Microbiology* 9: 370-382
- Croxatto, A., Pride, J., Hardman, A., Williams, P., Camara, M. and Milton, D.L. (2004) A distinctive dual-channel quorum-sensing system operates in *Vibrio anguillarum*. *Molecular Microbiology* 52: 1677-1689
- Croy, T.R. and Amend, D.F. (1977) Immunisation of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using hyperosmotic infiltration. *Aquaculture* 12: 317-325
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bogwald, J. (1997) Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases* 20: 241-273
- David, H. (1927) Ueber eine durch choleraähnliche Vibrionen hervorgerufene Fischseuche. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk.* 102: 46-60
- Davidson, G.A., Ellis, A.E. and Secombes, C.J. (1993) Route of immunisation influences the generation of antibody secreting cells in the gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology* 17: 373-376
- Davidson, G.A., Lin, S.H., Secombes, C.J. and Ellis, A.E. (1997) Detection of specific and constitutive antibody secreting cells in the gills, head, kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58: 363-374
- Deane, E.E., Li, J. and Woo, N.Y.S. (2001) Hormonal status and phagocytic activity in sea bream infected with vibriosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 129: 687-693

- Dec, C., Angelidis, P. and 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
- Denkin, S.M. and Nelson, D.R. (1999) Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3555-3560
- Denkin, S.M., Sekaric, P. and Nelson, D.R. (2004) Gel shift analysis of the empA promoter region in *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 4: 42
- Devesa, S., Toranzo, A.E., Barja, J.L. (1985) First report of vibriosis in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in Northwestern Spain. In: Ellis, A. E. (ed.). *Fish and shellfish pathology*. Academic Press, London, p. 131-140
- Dezfuli, B.S., Arrighi, S., Domeneghini, C. and Bosi, G. (2000) Immunohistochemical detection of neuromodulators in the intestine of *Salmo trutta* L. naturally infected with *Cyathocephalus truncatus* Pallas (Cestoda). *Journal of Fish Diseases* 23:265-273
- Di Lorenzo, M., Poppelaars, S., Stork, M., Nagasawa, M., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (2004) A nonribosomal peptide synthetase with a novel domain organization is essential for siderophore biosynthesis in *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 186: 7327-7336
- Di Lorenzo, M., Stork, M., Tolmasky, M.E., Actis, L.A., Farrell, D., Welch, T.J., Crosa, L.M., Wertheimer, A.M., Chen, Q., Salinas, P., Waldbeser, L. and Crosa, J.H. (2003) Complete sequence of virulence plasmid pJM1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain 775. *Journal of Bacteriology* 185: 5822-5830
- Di Salvo, L.H., Bleoka, J., Zebal, R. (1978) *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Applied and Environmental Microbiology* 35: 2219-2221
- do Vale, A., Afonso, A. and Silva, M.T. (2002) The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish and Shellfish Immunology* 13: 183-198
- Dorsch, M., Lane, D. and Stackebrandt, E. (1992) Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16s ribosomal RNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42:58-63
- Drechsel, H. and Jung, G. (1998) Peptide siderophores. *Journal of Peptide Science* 4: 147-181
- Drouin de Bouville, R. de (1907) Les maladies des poissons d'eau douce d'Europe. *Annales des Sciences Agronomiques* 1: 120-250
- Egidius, E. (1987) Vibriosis: Pathogenicity and pathology. A review. *Aquaculture* 67: 15-28
- Egidius, E. and Andersen, K. (1977) Norwegian reference strains of *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 10(3): 215-219

- Egidius, E. and Andersen, K. (1978) Host-specific pathogenicity of strains of *Vibrio anguillarum* isolated from rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson and saithe *Pollachius virens* (L.). *Journal of Fish Diseases* 1: 45-50
- Egidius, E. and Andersen, K. (1984) Disease problems in cod rearing. In: Dahl, E., Danielsen, D., Moksness, E., Solemdal, P. (eds.). The propagation of cod *Gadus morhua*, L. vol. 1 Flodevigen Rapp., Bergen, p.761-769
- Egidius, E., Andersen, K., Causen, E. and Raa, J. (1981) Cold water vibriosis or “Hitra disease” in Norwegian salmonid farming. *Journal of Fish Diseases* 4: 353-354
- Egidius, E., Wiik, R., Andersen, K., Hoff, K.A. and Hjeltnes, B. (1986) *Vibrio salmonicida*, sp. nov., a new fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 10-18
- Egusa, S. (1982) Disease problems in Japanese yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) culture: a review. In “Special Meeting on Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish”, Copenhagen, 1-3 October 1980 (Ed. J. Stewart). Rapports et Proces-Verbaux des Reunions Council International pour l’Exploration de la Mer
- Ellis, A.E. (1987) Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by a2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microbial Pathogenesis* 3: 167-177
- Ellis, A.E. (1998) Meeting the requirements for delayed release of oral vaccines for fish. *Journal of Applied Ichthyology* 14: 149-152
- Ellis, A.E. (1999) Immunity to bacteria in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 291-308
- Ellis, A.E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25: 827–839
- Elston, R. (1979) Economically important bivalve diseases and their control. *Riv. Ital. Piscic. Ittiopat.* 14: 47-51
- Elston, R., Leibovitz, L., Relyea, D., Zatlila (1981) Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and managements features. *Aquaculture* 24: 53-62
- Engelsen, A.R., Sandlund, N., Fiksdal, I.U. and Bergh, O. (2008) Immunohistochemistry of Atlantic cod larvae *Gadus morhua* experimentally challenged with *Vibrio anguillarum*. *Diseases of aquatic organisms* 80: 13–20
- Esteban, M.A. and Meseguer, J. (1997) Factors influencing phagocytic response of macrophages from the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural and quantitative study. *The Anatomical Record* 248: 533-541
- Esteban, M.A., Munoz, J. and Meseguer, J. (2000) Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *The Anatomical Record* 258: 80-89

- Etlinger, H.M., Hodgins, H.O. and Chiller, J.M. (1976) Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by the organ distribution of mitogenic response. *Journal of Immunology* 116: 1547-1553
- Evelyn, T. P. T. (1984) Immunization against pathogenic vibriosis, p. 121-150. In P. De Kinkelin (ed.), Symposium on fish vaccination. Office international des epizooties, Paris, France
- Evelyn, T.P.T. (1971) First records of vibriosis in Pacific salmon cultured in Canada, and taxonomic studies of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 28: 517-525
- Ezura, Y., Tajima, K., Yoshimizu, M. and Kimura, T. (1980) Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis. *Fish Pathology* 14:167-179
- FAO: <http://www.fao.org/fishery/species/2291/en>
- Farrell, D.H. and Crosa, J.H. (1991) Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry* 30: 3432-3436
- Farrell, D.H., Mikesell, P., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1990) A regulator gene, *angR*, of the iron uptake system of *Vibrio anguillarum*: similarity with phage P22 *cro* and regulation by iron. *Gene* 86: 45-51
- Fender, D.C. and Amend, D.F. (1978) Hyperosmotic infiltration: factors influencing uptake of bovine serum albumin by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35: 871-874
- Ferguson, H. W. (1995) Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Finn, J.P. and Nielson, N.O. (1971) The inflammatory response of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 3: 463-478
- Freedman, S.J. (1991) The role of  $\alpha$ 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* 98B: 549-553
- Freter, R. and Jones, G.W. (1976) Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with intact mucosal surfaces. *Infection and Immunity* 14: 246-256
- Fryer, J.L., Nelson, J.S., Garrison, R.L. (1972) Vibriosis in fish. *Prog. Fish. Fd. Sci.* 5: 129-133
- Funahashi, N., Miyazaki, T., Kodera, K. and Kubota, S. (1974) Histopathological studies on vibriosis in ayu. *Fish Pathology* 8: 136-143
- Garcia, T., Otto, K., Kjelleberg, S. and Nelson, D.R. (1997) Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1034-1039

- Garland, C.D., Nash, G.V., Summer, C.E., McMeekin, T.A. (1983) Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 34: 483-487
- George, C.J., Ellis, A.E. and Bruno, D.W. (1982) On remembrance of the abdominal pores in rainbow trout and some other salmonid spp. *Journal of Fish Biology* 21: 643-647
- Gercken, J. and Renwantz, L. (1994) A new mannan-binding lectin from the serum of the eel (*Anguilla anguilla* L): isolation, characterization and comparison with the fucose-specific serum lectin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 10B: 449-461
- Giorgetti, G., and Ceschia, G. (1982) Vibriosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in fresh water in northeastern Italy. *Journal of Fish Diseases* 5: 125-130
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., Garcia-Gasca, A., Roque, A., Vasquez-Juarez, R., Thompson, F.L. and Swings, J. (2004) Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150: 1769-1777
- Gomez-Gil, B., Thompson, F.L., Thompson, C.C. and Swings, J. (2003 $\alpha$ ) *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 239-243
- Gonzalez, S.F., Osorio, C.R. and Santos, Y. (2003) Development of a PCR-based method for the detection of *Listonella anguillarum* in fish tissues and blood samples. *Diseases of Aquatic Organisms* 55: 109-115
- Gonzalez, S.F., Osorio, C.R. and Santos, Y. (2004) Evaluation of AQUARAPID-Va, AQUAEIA-Va and Dot-Blot assays for the detection of *Vibrio anguillarum* in fish tissues. *Journal of Fish Diseases* 27: 617-621
- Gould, R.W., Antipa, R. and Amend, D.F. (1979) Immersion vaccination of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with two pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36: 222-225
- Grimes, D., Stemmler, J., Hada, J., May, E., Maneval, D., Hetrick, F., Jones, R., and Stoskopf, M. (1984) *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial Ecology* 10: 271-282
- Grinde, B. (1989) Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an anti-bacterial agent against fish pathogens. *Journal of Fish Diseases* 12: 95-104
- Grisez, L. and Ollevier, F. (1995) Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 4367-4373
- Grisez, L., Ceusters, R. and Ollevier, F. (1991) The use of API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 14: 359-365

- Grisez, L., Chair, M., Sorgeloos, P. and Ollevier, F. (1996) Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. *Diseases of Aquatic Organisms* 26: 181-187
- Groberg, W.J., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1983) The effect of water temperature on infection and antibody formation induced by *Vibrio anguillarum* in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of World Mariculture Society* 14:240–248
- Gudmundsdottir, B. and Magnadottir, B. (1997) Protection of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against an experimental infection of *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes*. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 55-69
- Hacking, M.A. and Budd, J. (1971) *Vibrio* infection in tropical fish in a freshwater aquarium. *Journal of Wildlife Diseases* 7: 273-280
- Hada, H.S., West, P.A., Lee, J. and Stemmler, J. and Colwell, R.R. (1984) *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve molluscs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 1-4
- Harbell, S.C. (1976) The pathology of vibriosis in coho salmon. MSc Thesis, Washington
- Harbell, S.C., Hodgins, H.O. and Schiewe, M.H. (1979) Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Fish Diseases* 2: 391-404
- Harrell, L., Novotny, A.J., Schiewe, M.H. and Hodgins, H. (1976a) Isolation and description of two vibrios pathogenic to Pacific salmon in Puget Sound, Washington. *Fisheries Bulletin* 74: 447-449
- Harrell, L.W., Etlinger, H.M. and Hodgins, H.O. (1975) Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial diseases. I. Serum antibody protection of rainbow trout (*salmo gairdneri*) against vibriosis. *Aquaculture* 6: 211-220
- Harrell, L.W., Etlinger, H.M. and Hodgins, H.O. (1976b) Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquaculture* 7: 863-870
- Hastein, T. and Bergsjø, T. (1976) The salmon lice (*Lepeopheirus salmonis*) as the cause of disease in farmed salmonids. *Riv. Ital. Piscic. Ittiopat.* 11: 3-5
- Hastein, T. and Holt, G. (1972) The occurrence of *Vibrio* disease in wild Norwegian fish. *Journal of Fish Biology* 4: 33-37
- Hastein, T. and Smith, J.E. (1977) A study of *Vibrio anguillarum* from farmed and wild fish using principal component analysis. *Journal of Fish Biology* 11: 69-75
- Hayashi, K., Kobhayashi, S., Kamata, T. and Ozaki, H. (1964) Studies on the *Vibrio* disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Therapeutic effect of the nitrofurans derivatives. *J. Fac. Fisheries, Prefectural Univ. Miesu, Mie Prefecture/Japan* 6(2): 171-180



- Heller, K., Kadner, R. and Gutner, K. (1988) Suppression of the *btu451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* 73: 217-224
- Hernandez-Jofer, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C. (1996) Ion-pair-high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 2710-2715
- Heyningen, W E. van, Carpenter, C.C.J., Pierce, N.F. and Greenough, W.B. (1971) Deactivation of cholera toxin by ganglioside. *Journal of Infectious Disease* 124: 415-418
- Hirono, I., Masuda, T. and Aoki, T. (1996) Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis* 21:173-182
- Hjelmeland, K., Christie, M. and Raa, J. (1983) Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology* 23:13-22
- Hjeltnes B. and Roberts R.J. (1993) Vibriosis. In: Bacterial Diseases of Fish (ed. by V.M. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), pp. 109–121. Blackwell Ltd, Oxford.
- Hoff, K.A. (1989) Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1775-1786
- Holmgren J. (1978) Cholera toxin and the cell membrane. In: Jeljaszewicz, J, Wadstrom T (eds) Bacterial toxins and the cell membranes. Academic Press, London New York, pp 333-366
- Holmgren, J. (1981) Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature, London* 292: 413-417
- Holt, G. (1970) Vibriosis (*Vibrio anguillarum*) as an epizootic disease in rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Acta Veterinaria Scandinavica* 11: 600-603
- Hong, G.E., Kim, D.G., Bae, J.Y., Ahn, S.H., Bai, S.C. and Kong, I.S. (2007) Species-specific PCR detection of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*, using the *amiB* gene, which encodes N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiology Letters* 269: 201-206
- Horne, M.T. (1982) The Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* (Bergman) In: Roberts, R.J. (ed.) Microbial Diseases of Fish. pp. 171-187 Society for General Microbiology, Academic Press, London.
- Horne, M.T. and Baxendale, A. (1983) The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *Journal of Fish Diseases* 6: 461-471
- Horne, M.T., Richards, R.H., Roberts, R.J. and Smith, P.C. (1977) Peracute vibriosis in juvenile turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fish Biology* 11: 355-361
- Hoshina, T. (1956) An epidemic disease affecting rainbow trout in Japan. *Journal of Tokyo University of Fisheries* 42: 15-16

- Hoshina, T. (1957) Further observations on the causative bacteria of the epidemic disease like furunculosis of rainbow trout. *Journal of Tokyo University of Fisheries* 43: 59–66
- Huang, Y.H. (1977) Preliminary report of studies on bacterial disease of milkfish, *Chanos chanos* during winter. *Joint Commission for Rural Reconstruction. Fish Ser.* 29: 50-54
- Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T. and Nakai, T. (2003) Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *European Journal of Biochemistry* 270: 675–686
- Inamura, H., Muroga, K. and Nakai, T. (1984) Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*. *Fish Pathology* 19: 89-96
- Inamura, H., Nakai, T. and Muroga, K. (1985) An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 51: 1915-1920
- Irie, T., Watarai, S., Iwasaki, T. and Kodama, H. (2004) Binding of *Vibrio anguillarum* to neutral Glycosphingolipids from intestinal mucosa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Veterinary Medical Science* 66: 205-208
- Ishimura, K., Akagawa-Matsushita, M. and Muroga K. (1996) *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 155-159
- Itami, I., Ishida, Y., Endo, F., Kawazoe, N. and Takahashi, Y. (1993) Hemmagglutinins in the skin mucus of ayu. *Fish Pathology* 23: 41-47
- Ito, H., Ito, H., Uchida, I., Sekizaki, T. and Terakodo, N. (1995) A specific oligonucleotide probe based on 5S rRNA sequences for identification of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Veterinary Microbiology* 43:167-171
- Jatal, M.A., Hossain, M.B., van der Helm, D.G., Sanders-Loehr, J., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1989) Structure of anguibactin, a unique plasmid-related bacterial siderophore from the fish pathogen *V. anguillarum*. *Journal of the American Chemical Society* 111: 292-296
- Jeffries, V.E. (1982) Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29: 201-226
- Ji, N., Peng, B., Wang, G., Wang, S. and Peng, X. (2004) Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods* 57: 409-413
- Jo. Y., Ohnishi, K., Muroga, K. (1979) *Vibrio anguillarum* isolated from cultured yellowtail. *Fish Pathology* 14: 43-47

- Jones, G.W., Abrams, G.D. and Freter, R. (1976) Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: adhesion to isolated rabbit brush border membranes and haemagglutinating activity. *Infection and Immunity* 14: 232-234
- Joosten, P.H.M., Aviles-Trigueros, M., Sorgeloos, P. and Rombout, J.H.W. (1995) Oral vaccination of juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) with bioencapsulated *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 289-299
- Joosten, P.H.M., Kruijer, W.J. and Rombout, J.H.W. (1996) Anal immunisation of carp and rainbow trout with different fractions of a *Vibrio anguillarum* bacterin. *Fish and Shellfish Immunology* 6: 541-551
- Joosten, P.H.M., Tiemersma, E., Threels, A., Caumartin-Dhieux, C. and Rombout, J.H.W.M. (1997) Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 471-485
- Kado, C.I. and Liu, S. T. (1981) Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *Journal of Bacteriology* 145: 1365-1373
- Kanno, T., Nakai, T. and Muroga, K. (1990) Scanning electron microscopy on the skin surface of ayu *Plecoglossus altivelis* infected with *Vibrio anguillarum*. *Diseases of Aquatic organisms* 8: 73-75
- Kanno, T., Nakai, T., and Muroga, K. (1989) Mode of transmission of vibriosis among ayu *Plecoglossus altivelis*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1: 2-6
- Kaper, J.B., Lockman, H., Remmers, E.F., Kristensen, K. and Colwell, R.R. (1983) Numerical taxonomy of *Vibrios* isolated from estuarine environment. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 229-255
- Kaplan, E. L. and Meier, P.(1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53:457-481
- Kato, T., Obara, Y., Tchinoe, H., Nagashima, K., Akiyama, S., Takizawa, K., Matsushima, A., Yami, S. and Miyamoto, Y. (1965) Grouping of *Vibrio Parahaemolyticus* with haemolytic reactions. *Shokuhin Eisei Kenkyn* 15: 83-86
- Kawai, K., Kusuda, R. and Itami, T. (1981) Mechanisms of protection in ayu orally vaccinated for vibriosis. *Fish Pathology* 15: 257-262
- Kent, M.L. (1982) Characteristics and identification of *Pasteuralla* and *Vibrio* species pathogenic to fish using API20E (Analytab Products) multiple test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 1725-1729
- King, C.A. and Heyningen, W.E. van (1973) Deactivation of cholera toxin by a sialidase-resistant, monosialosyl-ganglioside. *Journal of Infectious Disease* 127: 639-647

- Kitao, T., Aoki, T., Fukudome, M., Kawano, K., Wada, Y. and Mizuno, Y. (1983) Serotyping of *Vibrio anguillarum* isolated from diseased freshwater fish in Japan. *Journal of Fish Diseases* 6:175-181
- Klebanoff, S.J. and Clark, R.D. (1978) *The Neutrophil: Function and Clinical Disorders*. Amsterdam: North Holland
- Knauff, V. and Nester, E. (1982) Wide host range cloning vectors: a cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8: 45-54
- Knudsen, G., Sorum, H., Press, C. M. and Olafsen, J. A. (1999) In situ adherence of *Vibrio* spp. to cryosections of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., tissue. *Journal of Fish Diseases* 22: 409-418
- Kodama, H., Moustafa, M., Ishiguro, S., Mikami, T. and Izawa, H. (1984) Extracellular virulence factors of fish *Vibrio*: relationships between toxic material, hemolysin, and proteolytic enzyme. *American Journal of Veterinary Research* 45: 2203-2207
- Kodama, H., Moustafa, M., Mikami, T. and Izawua, H. (1985) Characterization of extracellular substances of *Vibrio anguillarum* toxic for rainbow trout and mice. *Microbiology and Immunology* 29: 909-920
- Kodama, H., Yamada, F., Murai, T., Nakanishi, Y., Mikami, T. and Izawa, H. (1989) Activation of trout macrophages and production of CRP after immunization with *Vibrio anguillarum*. *Developmental and Comparative Immunology* 13: 123-132
- Koster, W., Actis, L.A., Waldbeser, L., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1991) Molecular characterization of the iron transport system mediated by the pJM1 plasmid in *Vibrio anguillarum* 775. *Journal of Biological Chemistry* 266: 23829-23833
- Kubota, S.S. and Takakuwa, M. (1963) Studies on the disease of marine culture fishes. 1. General description and preliminary discussion of fish diseases at Mie Prefecture. *Journal of the Faculty of Fisheries of the Prefectural University of Mie* 6: 107-124
- Kuo, S.C., Chung, H.Y., Kou. (1976) *Vibrio anguillarum* isolated from a vibrio disease of freshwater cultured ayu. *Plecoglossus altivelis*. *J. Fish. Soc. Taiwan* 4: 21-24
- Kusuda, R. (1966) Studies on the ulcer disease of marine fishes. Proceedings of the 1<sup>st</sup> US-Japan Joint Conference on Marine Biology, Tokyo, pp. 1-13
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, A. E. and Anadon, R. (1994) A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology* 29: 79-89
- Lanzkowsky, P. (1976) Iron metabolism in the new-born infant. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 5: 149-173

- Larsen, J.L. (1982) *Vibrio anguillarum*: prevalence in three carbohydrate loaded marine recipients and a control. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene. 1. Abteilung Originale C3*: 519-530
- Larsen, J.L. (1983) *Vibrio anguillarum*: A comparative study of fish pathogenic, environmental and reference strains. *Acta Veterinaria Scandinavica* 24: 456-476
- Larsen, J.L. (1984) *Vibrio anguillarum*: Influence of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. *Journal of Applied Bacteriology* 57: 237-246
- Larsen, J.L. and Jensen, N.L. (1979) The Ulcus syndrome in cod (*Gadus morhua*) II. A bacteriological investigation. *Nord. Vet. Med.* 31: 289-296
- Larsen, J.L. and Mellergaard, S. (1984) Agglutination typing of *Vibrio anguillarum* isolates from diseased fish and from the environment. *Applied and Environmental Microbiology* 47: 1261-1265
- Larsen, J.L. and Olsen, J.E. (1991) Occurrence of plasmid in Danish isolates of *Vibrio anguillarum* serovars O1&O2 and association of plasmids with phenotypic characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2158-2163
- 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, J.L., Rasmussen, H.B. and Dalsgaard, I. (1988) Study of *Vibrio anguillarum* strains from different sources with emphasis on ecological and pathobiological properties. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2264-2267
- Larsen, M.H., Larsen, J.L. and Olsen, J.E. (2001) Chemotaxis of *Vibrio anguillarum* to fish mucus: role of the origin of the fish mucus, the fish species and the serogroup of the pathogen. *FEMS Microbiology Ecology* 38: 77-80
- Lauth, X., Shike, H., Burns, J.C., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Olst, J.C.V., Nizet, V., Taylor, S.W., Shimizu, C. and Bulet, P. (2002) Discovery and characterization of two isoforms of Moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass. *Journal of Biological Chemistry* 277: 5030-5039
- Lazarovici, P. and Loew, L.M. (1986) Purification and pore-forming activity of two hydrophobic polypeptides from the secretion of red sea moose sole, (*Pardachirus marmoratus*). *Journal of Biological Chemistry* 261: 16704-16713
- Lee, J.V and Bryant, T.N. (1984) A numerical taxonomic study of *Aeromonas*. *Journal of Applied Bacteriology* 57: xvii
- Lee, J.V., Shread, P., Furniss, A.L. and Bryant, T.N. (1981) Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym Group F *Vibrios*, Group EF6). *Journal of Applied Bacteriology* 50:73-94

- Lemaitre, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, I. and Molle, G. (1996) Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *European Journal of Biochemistry* 240: 143-149
- Lemos, M., Salinas, P., Toranzo, A., Barja, J. and Crosa, J.H. (1988) Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 170: 1920-1925
- Lemos, M.L. and Osorio, C.R. (2007) Heme, an iron supply for vibrios pathogenic for fish. *Biometals* 20: 615-626
- Levin, M.A., Wolke, R.E. and Cabelli, V.J. (1972) *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Microbiology* 18: 1585-1592
- Lewis, D.H. (1979) Serology of shrimp pathogenic vibrios. In: Lewis, D. H., Leong, J. K. (eds.) Proc. 2<sup>nd</sup> Bien Crust. Hlth. Workshop. Texas A&M University, Texas, p. 132-136
- Lewis, D.H. (1985) Vibriosis in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 8: 539-545
- Lin, S.H., Davidson, G.A., Secombes, C.J. and Ellis, A.E. (1998) A morphological study of cells isolated from the perfused gills of dab and Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology* 53: 560-568
- Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P., Toranzo, A.E. (1987) Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65: 15-29
- Lopez, C.S. and Crosa, J.H. (2007) Characterization of ferric-anguibactin transport in *Vibrio anguillarum*. *Biometals* 20: 393-403
- Lopez, C.S., Alice, A.F., Chakraborty, R. and Crosa, J.H. (2007) Identification of amino acid residues required for ferric-anguibactin transport in the outer-membrane receptor FatA of *Vibrio anguillarum*. *Microbiology* 153: 570-584
- Love, M., Teebeken-Fisher, D., Hose, J., Farmer, J., Hickman, F. and Fanning, G. (1981) *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214: 1139-1140
- Lumsden, J.S., Ostland, V.E., MacPhee, D.D. and Ferguson, H.W. (1995) Production of gill-associated and serum antibody by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following immersion immunization with acetone-killed *Flavobacterium branchiophilum* and the relationship to protection from experimental challenge. *Fish and Shellfish Immunology* 5: 151-165
- Lunder, T., Evensen, O., Holstad, G. and Hastein, T. (1995) 'Winter ulcer' in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. *Diseases of Aquatic Organisms* 23:39-49

- Lupiani, B., Dopazo, C.P., Ledo, A., Fouz, B., Barja, J.L., Hetrick, F.M. and Toranzo, A.E. (1989) New syndrome of mixed bacterial and viral etiology in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Aquatic Animal Health* 1: 197-204
- MacDonell, M.T., Singleton, F.L. and Hood, MA. (1982) Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44(2): 423-427
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Noya, M., Barja, J.L. and Toranzo, A.E. (1996) Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiology Letters* 138: 29-34
- Manual of Histologic and Special Staining Technics (1960) Blakiston Division, New York: McGraw-Hill Book Co.
- Marcobal, A., de las Rivas, B. and Munoz, R. (2006) Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: A survey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety* 1: 187-196
- Martinez, I., Espelid, S., Johansen, A., Welsh, J. and McClelland, M. (1994) Fast identification of species and strains of *Vibrio* by amplification of polymorphic DNA. *Journal of Fish Diseases* 17: 297-302
- Martinez-Picado, J., Alsina, M., Blanch, A.R., Cerda, M. and Jofre, J. (1996) Species-specific detection of *Vibrio anguillarum* in marine aquaculture environments by selective culture and DNA hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 443-449
- Martinez-Picado, J., Blanch, A.R. and Jofre, J. (1994) Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 723-737.
- Masumura, K., Yasunobu, H., Okada, N., Muroga, K. (1989) Isolation of *Vibrio* sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae. *Fish Pathology*. 24: 135-141
- Mattheis, T. (1964a) Das Vorkommen von *Vibrio anguillarum* in Ostseefischen. *Zentralblatt für Fischerei N.F.* XII: 259-263
- Mattheis, T. (1964b) Okologie der bakterien in Darm von Süßwassernutzfischen. *Zeitschrift für Fischerei* 12: 507-600
- Mattheis, Th. (1960) Das Aalsterben an der Ostseeküste zwischen Usedom und Wismar im Sommer 1959 (Mortality of eels on the Baltic Sea coast between Usedom and Wismar in the summer of 1959). *Dt. Fischerei-Ztg.* 1: 23-25
- Mazoy, R. and Lemos, M.L. (1991) Iron-binding proteins and heme compounds as iron sources for *Vibrio anguillarum*. *Current Microbiology* 23: 221-226

- Mazoy, R. and Lemos, M.L. (1996) Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiology Letters* 135: 265-270
- Mazoy, R., Osorio, C.R. and Toranzo, A.E. (2003) Isolation of mutants of *Vibrio anguillarum* defective in haeme utilisation and cloning of *huvA*, a gene coding for an outer membrane protein involved in the use of haeme as iron source. *Archives of Microbiology* 179: 329-338
- McCarthy, D.H. (1974) Vibriosis in rainbow trout. *Journal of Wildlife Diseases* 10: 2-7
- McDowell, M. and Colwell, R.R. (1985) Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology* 6: 171-182
- McGee, K., Horstedt, P. and Milton, D.L. (1996) Identification and characterization of additional flagellin genes from *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 178: 5188-5198
- Mifuchi, I., Yanagihara, Y., Shimizu, T., Ushiyama, M. (1983) Epidemiological studies of vibriosis of young ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Hamana-lake. I. Identification and incidence of *Vibrio anguillarum* and their serotypes. *Fish Pathology* 18: 19-25
- Mikkelsen, H., Lund, V., Martinsen, L.C., Gravningen, K. and Schroder, M.B. (2007) Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterization and vaccination studies. *Aquaculture* 266:16-25
- Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165-199
- Miller, V.L., Taylor, R.K. and Mekalanos, J.J. (1987) Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* 48: 271-279
- Milton, D., Norqvist, A. and Wolf-Watz, H. (1995) Sequence of a novel virulence-mediating gene, *virC*, from *Vibrio anguillarum*. *Gene* 164: 95-100
- Milton, D., O'Toole, R., Horstedt, P. and Wolf-Watz, H. (1996) Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 178: 1310-1319
- Milton, D.L., Chalker, V.J., Kirke, D., Hardman, A., Camara, M. and Williams, P. (2001) The *LuxM* homologue *VanM* from *Vibrio anguillarum* directs the synthesis of N-(3-hydroxyhexanoyl)homoserine lactone and N-hexanoylhomoserine lactone. *Journal of Bacteriology* 183: 3537-3547
- Milton, D.L., Hardman, A., Camara, M., Chhabra, S.R., Bycroft, B.W., Stewart, G.S. and Williams, P. (1997) Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterization of the *vanI/vanR* locus and identification of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *Journal of Bacteriology* 179: 3004-3012
- Milton, D.L., Norqvist, A. and Wolf-Watz, H. (1992) Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 174: 7235-7244



- Minishew, B.H., Jorgensen, J., Swanstrum, M., Grootes-Reuvecamp, G.A. and Falkow, S. (1978) Some characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections of humans. *The Journal of Infectious Diseases* 137: 648-654
- Mitoma, Y., Aoki, T. and Crosa, J.H. (1984) Phylogenetic relationships among *Vibrio anguillarum* plasmids. *Plasmid* 12: 143-148
- Miwatani, T., Sakuri, J., Takeda, Y. and Shinoda, S. (1974). Studies on direct haemolysins of *Vibrio parahaemolyticus* "International Symposium on *Vibrio Parahaemolyticus*". Saikon Publishing Co., Tokyo
- Miyamoto, Y., Kato, T., Obara, Y., Akiyama, S., Takizawa, K. and Yamai, S (1969) *In vitro* haemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 100: 1147-1149
- Moller, G. (1972) Lymphocyte activation by mitogens. *Transplantation Review* 11: 53-75
- Montes, M., Farto, R., Perez, M.J., Nieto, T.P., Larsen, J.L. and Christensen H. (2003) Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison. *Journal of Applied Microbiology* 95: 693-703
- Mourino, S., Osorio, C.R. and Lemos, M.L. (2004) Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 186: 6159-6167
- Mourino, S., Osorio, C.R., Lemos, M.L. and Crosa, J.H. (2006) Transcriptional organization and regulation of the *Vibrio anguillarum* heme uptake gene cluster. *Gene* 374: 68-76
- Mourino, S., Rodriguez-Ares, I., Osorio, C.R. and Lemos, M.L. (2005) Genetic variability of the heme uptake system among different strains of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*: identification of a new heme receptor. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8434-8441
- Moustafa, M., Kodama, H., Ishiguro, S., Mikami, T. and Izawa, H. (1984) Partial purification of extracellular toxic material of fish *Vibrio*. *American Journal of Veterinary Research* 45: 2208-2210
- Muino, L., Lemos, M.L. and Santos, Y. (2001) Presence of high-affinity iron uptake systems in fish-isolated and environmental strains of *Vibrio anguillarum* serotype O3. *FEMS Microbiology Letters* 202: 79-83
- Muir, R. (1964) Muir's textbook of pathology, 8<sup>th</sup> edn. Arnold, London
- Mulero, I., Sepulcre, M.P., Meseguer, J., García-Ayala, A. and Mulero V. (2007) Histamine is stored in mast cells of most evolutionarily advanced fish and regulates the fish inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 19434-19439

- Munn, C B. (1980) Production and properties of a haemolytic toxin by *Vibrio anguillarum*. In "Fish Diseases" (Ed. W. Ahne), pp.69-74. Springer-Verlag, Berlin
- Munn, C.B. (1978) Haemolysin production by *Vibrio anguillarum*. *FEMS Microbiology Letters* 3: 265-268
- Munro, A.L.S. (1982) The pathogenesis of Bacterial Diseases of Fishes In: Roberts, R.J. (ed.) *Microbial Diseases of Fish*. pp. 131-149 Society for General Microbiology, Academic Press, London.
- Murai, T., Kodama, H., Nakai, M., Mikami, T. and Izawa, H. (1990) Isolation and characterization of rainbow trout C-reactive protein. *Developmental and Comparative Immunology* 14: 49-58
- Muroga, K. (1975) "Studies on *Vibrio anguillarum* and *Vibrio anguillarum* Infection". Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University, 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. and Egusa, S. (1967) *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu in Lake Hamana. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 33: 636-640
- Muroga, K. and Egusa, S. (1970) *Vibrio anguillarum* isolated from Ayu in fresh-water farm-ponds. *Fish Pathology* 5: 16-20
- Muroga, K. and Egusa, S. (1973) Studies on *Vibrio anguillarum* isolated from salt water and fresh water fishes. *Fish Pathology* 8: 9-25
- Muroga, K. and Tatani, M. (1982) Isolation of *Vibrio anguillarum* from juvenile red sea-bream (*Pagrus major*). *Fish Pathology* 16: 211-214
- Muroga, K. and Yasunobu, H. (1987) Uptake of bacteria by rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 2091
- Muroga, K., Higashi, M. and Keetoku, H. (1987) The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65: 79-88
- Muroga, K., Iida, M., Matsumoto, H. and Nakai, T. (1986) Detection of *Vibrio anguillarum* from waters. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 52: 641-647
- Muroga, K., Jo, Y. and Nishibuchi, M. (1976) *Vibrio anguillarum* isolated from the European eel (*Anguilla anguilla*) cultured in Japan. *Journal of the Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University* 15: 29-34
- Muroga, K., Takahashi, S. and Yamanoi, H. (1979) Non-cholera *Vibrio* isolated from diseased ayu. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 45: 829-834

- Muroga, K., Yasunobu, H., Okada, N. and Masumura, K. (1990) Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 9: 121-125
- Murray, C.K. and Fletcher, T.C. (1976) The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology* 9: 329-334
- Murray, H.M., Gallant, J.W. and Douglas, S.E. (2003) Cellular localization of pleurocidin gene expression and synthesis in winter flounder gill using immunohistochemistry and in situ hybridization. *Cell and Tissue Research* 312: 197-202
- Mutharia, L.M. and Amor, P.A. (1994) Monoclonal antibodies against *Vibrio anguillarum* O2 and *Vibrio ordalii* identify antigenic differences in lipopolysaccharide O-antigens. *FEMS Microbiology Letters* 123: 289-298
- Myhr, E., Larsen, J., Lillehaug, A., Gudding, R., Heum, M. and Hastein, T. (1991) Characterization of *Vibrio anguillarum* and closely related species isolated from farmed fish in Norway. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2750-2757
- Nakanishi, Y., Kodama, H., Murai, T., Mikami, T. and Izawa, H. (1991) Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American Journal of Veterinary Research* 52: 397-401
- Nearhos, S.P. and Fuerst, J.A. (1987) Reanalysis of 5S rRNA sequence data for the Vibrionaceae with the clustan program suite. *Current Microbiology* 15: 329-335
- Neilands, J.B. (1993) Siderophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 302: 1-3
- Nelson, E.T., Clements, J.D. and Finkelstein, R.A. (1976) *Vibrio cholerae*; adherence and colonisation in experimental, electron microscope studies. *Infection and Immunity* 14: 527-547
- Nelson, J., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1985a) Tissue location of *Vibrio* bacterin delivered by intraperitoneal injection, immersion and oral routes to *Salmo gairdneri*. *Fish Pathology* 19: 263-269
- Nelson, J., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1985b) Location of *Vibrio anguillarum* in tissues of infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) using the fluorescent antibody technique. *Fish Pathology* 20: 229-235
- Niven, C.F., Jeffrey, M.B. and Corlett, D.A. (1981) Differential Plating Medium for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 321-322
- Nomura, J. and Aoki, T. (1985) Morphological analysis of lipopolysaccharide from Gram negative fish pathogenic bacterium. *Fish Pathology* 20: 193-197
- Norqvist, A. and Wolf-Watz, H. (1993) Characterization of a novel chromosomal virulence locus involved in expression of a major surface flagellar sheath antigen of the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 61: 2434-2444

- Norqvist, A., Norman, B. and Wolf-Watz, H. (1990). Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 58: 3731-3736
- Novotny, A.J. (1975) Vibriosis: A common disease of Pacific salmon cultured in marine waters of Washington. Ext. Bull. Wash. State Univ. Coop. Ext. Serv. (No. 663) p8
- Nybelin, O. (1935) Untersuchungen uber den bei Fischen krankheitserregenden Spaltpilz *Vibrio anguillarum* (Investigations on the schizomycetous bacteria *Vibrio anguillarum* causing diseases among fishes). *Mitt. d. Anst. f. Binnenfischerei bei Drottningholm*, Stockholm 8: 5-62
- O'Toole, R., Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. and Wolf-Watz, H. (2004) Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis* 37: 41-46
- O'Toole, R., Lundberg, S., Fredriksson, S., Jansson, A., Nilsson, B. and Wolf-Watz, H. (1999) The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *Journal of Bacteriology* 181: 4308-4317
- O'Toole, R., Milton, D.L. and Wolf-Watz, H. (1996) Chemotactic motility is required for invasion of the host by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Molecular Microbiology* 19: 625-637
- O'Toole, R., Milton, D.L., Horstedt, P. and Wolf-Watz, H. (1997) RpoN of the fish pathogen *Vibrio (Listonella) anguillarum* is essential for flagellum production and virulence by the water-born but not intraperitoneal route of inoculation. *Microbiology* 143:3849-3859
- Ohta, M., Okada, M. and Yamashita, I. (1990) The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannose-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 265: 1980-1984
- Olafsen, J.A. and Hansen, G.H. (1992) Intact antigen uptake in the intestinal epithelial cells of marine fish larvae. *Journal of Fish Biology* 40: 141-156
- Olsen, J. and Larsen, J. (1990) Restriction fragment length polymorphism of the *Vibrio anguillarum* serovar O1 virulence plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3130-3132
- Olsen, J.E. and Larsen, J.L. (1993) Ribotypes and plasmid contents of *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Applied and Environmental Microbiology* 59:3863-3870
- Olsson, J.C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. and Conway, P. L. (1996) Is the turbot, *Scophthalmus maximus* (L), intestine a portal of entry for the fish pathogen *Vibrio anguillarum*? *Journal of Fish Diseases* 19: 225-234
- Olsson, J.C., Joborn, A., Westerdahl, A., Blomberg, L., Kjelleberg, S. and Conway, P.L. (1998) Survival, persistence and proliferation of *Vibrio anguillarum* in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), intestine and faeces. *Journal of Fish Diseases* 21: 1-9

- Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L. and Kjelleberg, S. (1992) Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*)- and dab (*Limanda limanda*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 551-556
- Oppenheimer, C.H. (1962) Marine fish diseases. In: *Fish as Food*, Vol. 2. New York, Academic Press, p. 541-572
- Oren, Z. and Shai, Y. (1996) A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from moose sole fish *Pardachirus marmoratus*. *European Journal of Biochemistry* 237: 303-310
- Ormonde, P., Horstedt, P., O'Toole, R. and Milton, D.L. (2000) Role of motility in adherence to and invasion of a fish cell line by *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology* 182: 2326-2328
- Pacha, R.E. and Kiehn, E.D. (1969) Characterization and relatedness of marine *Vibrios* pathogenic to fish: Physiology, serology and epidemiology. *Journal of Bacteriology* 100: 1242-1247
- Paperna, I., Colomi, A., Gordin, H. and Kissel, G.W. (1977) Diseases of *Sparus aurata* in marine culture at Eilat. *Aquaculture* 10: 195-213
- Park, I.Y., Park, C.B., Kim, M.S. and Kim, S.C. (1998) Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Letters* 437: 258-262
- Paterson, W.D. and Fryer, J.L. (1974) Effect of temperature and antigen dose on the antibody response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *Aeromonas salmonicida* endotoxin. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31: 1743-1749
- Pazos, F., Santos, Y., Magarinos, B., Bandin, I., Nunez, S. and Toranzo, A.E. (1993) Phenotypic characteristics and virulence of *Vibrio anguillarum* related organisms. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2969-2976
- Pedersen, K. (1997) Viability during storage and stability of plasmids during storage and subculturing in strains of *Vibrio anguillarum*. *Acta Veterinaria Scandinavica* 38: 315-22
- Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1993) rRNA gene restriction patterns of *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Diseases of Aquatic Organisms* 16: 121-126
- Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1995) Evidence for the existence of distinct populations of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 based on plasmid contents and ribotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2292-2296
- Pedersen, K., Ceschia, G. and Larsen, J.L. (1994) Ribotypes of *Vibrio anguillarum* O1 from Italy and Greece. *Current Microbiology* 28: 97-99

- Pedersen, K., Gram, L., Austin, D.A. and Austin, B. (1997) Pathogenicity of *Vibrio anguillarum* serogroup O1 strains compared to plasmids, outer membrane protein profiles and siderophore production. *Journal of Applied Microbiology* 82: 365-371
- Pedersen, K., Grisez, L., Van Houdt, R., Tianinem, T., Ollevier, F. and Larsen, J.L. (1999a) Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current Microbiology* 38:183-189
- Pedersen, K., Kuhn, I., Seppanen, J., Hellstrom, A., Tiainen, T., Rimaila-Parnanen, E. and Larsen, J.L. (1999b) Clonality of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish from the Scandinavian countries, Sweden, Finland and Denmark. *Journal of Applied Microbiology* 86: 337-347
- Pedersen, K., Tiainen, T. and Larsen, J.L. (1996) Plasmid profiles, restriction fragment length polymorphisms and O-serotypes among *Vibrio anguillarum* isolates. *Epidemiology and Infection* 117: 471-478
- Peitsaro, N., Anichtchik, O.V. and Panula, P. (2000) Identification of a Histamine H3-like Receptor in the Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *Journal of Neurochemistry* 75: 718–724
- Peitsaro, N., Sundvik, M., Anichtchik, O.V., Kaslin, J. and Panula, P. (2007) Identification of zebrafish histamine H1, H2 and H3 receptors and effects of histaminergic ligands on behavior. *Biochemical Pharmacology* 73: 1205–1214
- Perez, M.J., Rodriguez, L.A. and Nieto, T.P. (1998) The acetylcholinesterase ichthyotoxin is a common component in the extracellular products of Vibrionaceae strains. *Journal of Applied Microbiology* 84: 47–52
- Planas, M., Perez-Lorenzo, M., Vazquez, J.A. and Pintado, J. (2005) A model for experimental infections with *Vibrio (Listonella) anguillarum* in first feeding turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae under hatchery conditions. *Aquaculture* 250: 232-243
- Press, C. M. and Evensen, O. (1999) The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 309-318
- Pressler, U., Staudenmaier, H., Zimmermann, L. and Braun, V. (1988) Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170: 2716-2724
- Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B. and Sobin, L.H. (1992) Laboratory methods in histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology-American Registry of Pathology, Washington, DC.
- Ransom, D.P. (1978) Bacteriologic, immunologic and pathologic studies of *Vibrio* sp. pathogenic to salmonids. PhD thesis, Oregon State University, Corvallis

- Ransom, D.P., Lannan, C.N., Rohovec, J.S. and Fryer, J.L. (1984) Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. *Journal of Fish Diseases* 7: 107-115
- Rasmussen, H.B. (1987a) Evidence for two new *Vibrio anguillarum* K antigens. *Current Microbiology* 16: 105-107
- Rasmussen, H.B. (1987b) Subgrouping of lipopolysaccharide O-antigens from *Vibrio anguillarum* serogroup O2 by immunoelectrophoretic analysis. *Current Microbiology* 16: 39-42
- Rehnstam, A.S., Norqvist, A., Wolfwatz, H. and Hagstrom, A. (1989) Identification of *Vibrio anguillarum* in fish by using partial 16S rRNA sequences and a specific 16S rRNA oligonucleotide probe. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1907-1910
- Reite, O.B. (1965) A phylogenetical approach to the functional significance of tissue mast cell histamine. *Nature* 206: 1334-1336
- Reite, O.B. (1972) Comparative physiology of histamine. *Physiological Reviews* 52: 778-819
- Reite, O.B. (1997) Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 567-584
- Reite, O.B. (1998) Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish and Shellfish Immunology* 8: 489-513
- Reynolds, W.W., Covert, J.B. and Casterlin, M.E. (1978) Febrile response of goldfish *Carassius auratus* (L.) to *Aeromonas hydrophila* and to *Escherichia coli* endotoxin. *Journal of Fish Diseases* 1: 271-273
- Richards, R.H. (1980) Observations on Vibriosis in Cultured Flatfish. In "Fish Diseases" (Ed. W. Ahne), pp.75-81. Springer-Verlag, Berlin
- Ringo, E., Mikkelsen, H., Kaino, T., Olsen, R.O., Mayhew, T.M. and Myklebust, R. (2006) Endocytosis of indigenous bacteria and cell damage caused by *Vibrio anguillarum* in the foregut and hindgut of spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) fry: an electron microscopical study. *Aquaculture Research* 37: 647-651
- Roberts, R. (1989) The bacteriology of teleosts. In: Roberts, R.J. (ed.) *Fish Pathology*, 2<sup>nd</sup> edn. Bailliere Tindall, London, pp. 289-319
- Roberts, R. J. (2001) *Fish pathology*. 3rd edn, W.B.Saunders, Harcourt Publishers Ltd, London.
- Roberts, R.J. and Bullock, A.M. (1976) The dermatology of marine teleost fish. 2. Dermatology of the integument. *Oceanography and Marine Biology* 14: 227-246
- Roberts, R.J. (1973) The histopathology of salmon tagging, III. Secondary infections associated with tagging. *Journal of Fish Biology* 5: 621-623

- Roberts, R.J. (1976) Bacterial diseases of farmed fishes. In: Skinner F.A., Carr, J.G. (eds) *Microbiology in agriculture fisheries and food*. Academic Press, London New York. pp 55-61
- Rodgers, L.J. and Burke, J.B. (1981) Seasonal variation in the prevalence of "red spot" disease in estuarine fish with particular reference to the sea mullet, *Mubil cephalus L.* *Journal of Fish Diseases* 4: 297-307
- Rodkhum, C., Hirono, I., Crosa, J.H. and Aoki, T. (2005) Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microbial Pathogenesis* 39: 109-119
- Rodseather, M.C., Olafsen, J., Raa, J., Myhre, K. and Steen, J.B. (1977) Copper as an initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*) in eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Fish Biology* 10: 17-21
- Romalde, J.L., Magarinos, B., Fouz, B., Bandin, I., Nunez, S. and Toranzo, A.E. (1995) Evaluation of BIONOR monokits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 21: 25-34
- Romano, N., Abelli, L., Mastrolia, L. and Scapigliati, G. (1997) Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Cell and Tissue Research* 289: 163-171
- Rombout, J.H.W.M., Taverne, N., Van de Kamp, M. and Taverne-Thiele, A.J. (1993) Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio L.*). *Developmental and Comparative Immunology* 17: 309-317
- Ross, A.J., Martin, J.E. and Bressler, V. (1968) *Vibrio anguillarum* from an epizootic in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in the USA. *Bull. Off. Int. Epiz.* 69: 1139-1148
- Rubin, S.J. and Rosenblum, E.D. (1971) Effects of ethidium bromide on growth and on loss of the penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 108: 1200-1204
- Rucker, P.R. (1959) *Vibrio* infections among marine and freshwater fish. *Prog. Fish Cult.* 21:22-25
- Rucker, R.R. (1963) Status of fish diseases and relation to production. *Report of the Second Governor's Conference on Pacific Salmon*, Seattle, January 1963, p. 98-101
- Rucker, R.R., Earp, B.J. and Ordal, E.J. (1954) Infectious diseases of the Pacific salmon. *Transactions of the American Fisheries Society* 83: 297-312
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M. and Christen, R. (1994) Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small subunit ribosomal RNA sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 416-426
- Saito, Y., Otsuru, M., Furukawa, T., Kanda, K. and Sato, A. (1964) Studies on infectious diseases of rainbow trout. *Acta Medica et Biologica* 11: 267-295



- Sakazaki, R., Tamura, K., Kato, T., Obara, Y., Yamei, S. and Hobo, K. (1968) Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 21: 325-331
- Salinas, P., Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1989) Regulation of the iron uptake system in *Vibrio anguillarum*: evidence for a cooperative effect between two transcriptional activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 3529-3533
- Salinas, P., Waldbeser, L. and Crosa, J.H. (1993) Regulation of the expression of bacterial iron transport genes: possible role of an antisense RNA as a repressor. *Gene* 132: 33-38
- Sall, J., Creighton, L. and Lehman, A. (2007) JMP start statistics: A guide to statistics and data analysis using JMP. Cary, NC: SAS Publications.
- Santos, Y., Pazos, F., Bandin, I. and Toranzo, A.E. (1995) Analysis of antigens present in the extracellular products and cell-surface of *Vibrio anguillarum* serotypes O1, O2, and O3. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2493-2498
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandin, I., Magarinos, B., Nunez, S., Barja, J.L. and Toranzo, A.E. (1993) Usefulness of the API20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116: 111-120
- Saunders, J. R. (1981) Plasmids and bacterial pathogens. *Nature, London* 290: 362
- Sawabe, T., Hayashi, K., Moriwaki, J., Fukui, Y., Thompson, F.L., Swings, J. and Christen, R. (2004 $\beta$ ) *Vibrio neonatus* sp. nov. and *Vibrio ezuriae* sp. nov. isolated from the gut of Japanese abalones. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 527-534
- Sawyer, E.S., Strout, R.G. and Coutermarsh, B.A. (1979) Comparative susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and coho (*Oncorhynchus kisutch*) salmon to three strains of *Vibrio anguillarum* from the Maine-New Hampshire coast. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36: 280-282
- Scapigliati, G., Romano, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M.R., Prugnoli, D., Qalice, A., Meloni, S., Secombes, C.J., Mazzini, M. and Abelli, L. (2002) The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental and Comparative Immunology* 26: 151-160
- Schaperclaus, W. (1927) Krebssterben und Kerbskrankheiten in der Mark (Mortality and diseases of crayfishes in Germany). *Mitt. Der Fischereivereine* 19
- Schaperclaus, W. (1928) Wieder ein pestartiges Krebssterben in der Mark (Recurrence of pestilential mortality of crayfish in Germany). *Mitt. Der Fischereivereine* 32: 76-78

- Schaperclaus, W. (1991) Fish diseases. (Eds) Schaperclaus, W., Kulow, H. and Schreckenbach, K. (translated from German) Published for the U.S. Dept. of the Interior and the National Science Foundation, Washington, D.C., by Amerind Pub. Co. New Delhi.
- Schiewe, M. (1983) *Vibrio ordalii* as a cause of vibriosis in salmonid fish. In: Crosa, J.H. (ed.) *Bacterial and Viral Diseases of Fish*. Washington Sea Grant, Seattle, pp. 31-40
- Schiewe, M., Crosa, J.H. and Ordal, E. (1977) Deoxyribonucleic acid relationships among marine vibrios pathogenic to fish. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 954-958
- Schiewe, M.H. and Crosa, J.H. (1981) Molecular characterization of *Vibrio anguillarum* biotype 2. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 1011-1018
- Schiewe, M.H. and Hodgins, H.O. (1977) Specificity of protection induced in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by heat-treated components of two pathogenic vibrios. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 1026-1028
- Schiewe, M.H., Trust, T. and Crosa, J.H. (1981) *Vibrio ordalii* sp. nov.: a causative agent of vibriosis in fish. *Current Microbiology* 6: 343-348
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987) Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores *Analytical Biochemistry* 160: 47-56
- Secombes, C.J. (1996) The nonspecific immune system: cellular defenses. In the Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment (G. Iwama and T. Nakanishi, eds.) pp. 63-103. San Diego: Academic Press Inc.
- Shewan, J.M., Hobbs, G. and Hodgkiss, W. (1960) A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadaceae. *Journal of Applied Microbiology* 23: 379-390
- Shewan, J.M. and Veron, M. (1974) Genus *Vibrio*. In: Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. Williams and Wilkins Company, Baltimore
- Singer, J.T., Schmidt, K.A. and Renot, P.W. (1991) Polypeptides p40, pOM2, and pAngR are required for iron uptake and for virulence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* 775. *Journal of Bacteriology* 173: 1347-1352
- Skov, M.N., Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1995) Comparison of pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, and plasmid profiling for typing of *Vibrio anguillarum* serovar O1. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1540-1545
- Smith, A.M., Hayden, A.M., McCay, S.G., Zapatka, F.A. and Hamdy, M.K. (1982) Detection and Confirmation of Histamine-producing Bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 29: 618-623

- Smith, H. (1977) Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriological Reviews* 41: 475-500
- Smith, H. and Taylor, J. (1964) "Microbial Behaviour *in Vivo* and *in Vitro*". Cambridge University Press, Cambridge, U. K
- Smith, H.W. (1974) A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid controlled toxin and a plasmid controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *Journal of General Microbiology* 83: 95-111
- Smith, H.W. and Huggins, M.B. (1976) Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. *Journal of General Microbiology* 92: 335-350
- Smith, I.H. (1961) A disease of finnock due to *Vibrio anguillarum*. *Journal of General Microbiology* 74: 247-252
- Soda, S., Watatani, H., Ike, M. and Fugita, M. (1998) Factors affecting the survival of exogenous bacteria in microbial ecosystems: existence of indigenous bacteria with antagonistic activity. *Biocontrol Sci* 3: 63-72
- Soengas, R. G., Anta, C., Espada, A., Paz, V., Ares, I. R., Balado, M., Rodriguez, J., Lemos, M. L. and Jimenez, C. (2006) Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Letters* 47: 7113-7116
- Song, Y.L., Chen, S.N. and Kou, G.H. (1988) Serotyping of *Vibrio anguillarum* strains isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathology* 23: 185-189
- Sonstein, S.A. and Baldwin, J.N. (1972) Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulfate. *Journal of Bacteriology* 109: 262-265
- Sorensen, U.B.S. and Larsen, J.L. (1986) Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 593-597
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Sick, E.B., Pipper, C.B., Martinussen, T., Slierendrecht, W.J. and Gram, L. (2001) The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environmental Microbiology* 3: 755-765
- Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, T. and Gram, L. (2000) Proliferation and location of *Vibrio anguillarum* during infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Waldbaum). *Journal of Fish Diseases* 23: 423-427

- Sparagano, O.A.E., Robertson, P.A.W., Purdom, I., McInnes, J., Li, Y., Yu, D.H., Du, Z.J., Xu, H.S. and Austin B. (2002) PCR and molecular detection for differentiating *Vibrio* species. *Annals of the New York Academy of Sciences* 969: 60-65
- Stachel, S.E., An, G., Flores, C. and Nester, E. (1985) A Tn3 *lacZ* transposon for the random generation of  $\beta$ -galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. *EMBO Journal* 4: 891-898
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980) Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd ed. McGraw-Hill, Auckland.
- Stensvag, K., Jorgensen, T.O., Hoffman, J., Hjelmeland, K. and Bogwald, J. (1993) Partial purification and characterization of extracellular metalloproteases with caseinolytic, aminopeptidolytic and collagenolytic activities from *Vibrio anguillarum*. *Journal of Fish Diseases* 16: 525-539
- Stork, M., Di Lorenzo, M., Welch, T.J. and Crosa, J.H. (2007) Transcription Termination with the Iron Transport-Biosynthesis Operon of *Vibrio anguillarum* Requires an Antisense RNA. *Journal of Bacteriology* 189: 3479-3488
- Strout, R., Sawyer, E. and Counterdash, B.A. (1978) Pathogenic vibrios in confinement-reared and feral fishes of the Maine-New Hampshire coast. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35: 403-408
- Sugita, H., Shibuya, K., Hanada, H. and Deguchi, Y. (1997) Antibacterial abilities of intestinal microflora of river fish. *Fisheries Science* 63: 378-383
- Svendsen, Y. S. and Bogwald, J. (1997) Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 7:317-325
- Szalai, A.J., Bly, J.E. and Clem, L.W. (1994) Changes in serum concentration of channel catfish (*Ictalurus punctatus Rafinesque*) phosphorylcholine-reactive protein (PRP) in response to inflammatory agents, low temperature, shock and infection by the fungus *Saprolegnia sp.* *Fish and Shellfish Immunology* 4: 323-336
- Tajima, K., Ezura, Y. and Kimura, T. (1985) Studies on the taxonomy and serology of causative organisms of fish vibriosis. *Fish Pathology* 20: 131-142
- Tajima, K., Yoshimizu, M., Ezura, Y. and Kimura, T. (1981) Studies on the causative organisms of vibriosis among the pen-cultured coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in Japan. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47: 37-42
- Takaya, K., Fujita, T. and Endo, K. (1967) Mast Cells free of Histamine in *Rana catesbiana*. *Nature* 215:776-777

- Takeda, Y., Takeda, T., Honda, T. and Miwatani T (1976) Inactivation of the biological activities of the thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* by ganglioside GT1. *Infection and Immunity* 14: 1-5
- Tanaka, J. (1974) *Vibrio* infection of marine fish. Proceedings of 3<sup>rd</sup> US-Jpn. Meeting Aquacult. Spec. Publ. Jpn. Fisheries Agencies and Sea Regional Fish Res. Lab., Migato, Jpn., pp 113-114
- Tareen, I.U. (1984) Vibriosis in *Oreochromis aureus* acclimatized to seawater: control and prophylaxis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 4: 47-49
- Tassin, M.G., Siebeling, R.J., Roberts, N.C. and Larson, A.D. (1983) Presumptive identification of *Vibrio* species with H antiserum. *Journal of Clinical Microbiology* 18: 400-407
- Tatani, M., Muroga, K., Sugiyama, T. and Hiramoto, Y. (1985) Detection of *Vibrio anguillarum* from reared fry and fingerlings of ayu. *Aquaculture* 33: 59-66
- Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B. and Swings, J. (2005) Phylogeny and molecular identification of *Vibrios* on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5107-5115
- Thompson, F.L., Iida, T. and Swings, J. (2004) Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 403-431
- Thompson, F.L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Hoste, I.B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G.S., Pereira, A., De Bem, M.M., Sorgeloos, P. and Swings, J. (2003 $\alpha$ ) *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 245-252
- Thompson, F.L., Thompson, C.C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gullian, M., and Swings, J. (2003 $\gamma$ ) *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1495-1501
- Thompson, F.L., Thompson, C.C., Li, Y., Gomez-Gil, B., Vandenberghe, J., Hoste, I.B., and Swings, J. (2003 $\beta$ ) *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 753-759
- Tiainen, T., Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1995) Ribotyping and plasmid of *Vibrio anguillarum* serovar O2 and *Vibrio ordalii*. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 384-392
- Tiainen, T., Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1997a) Immunological reactivity of *Vibrio anguillarum* sero-subgroups O2 and O2b, and comparison of their lipopolysaccharide profiles. *Current Microbiology* 34:38-42

- Tiainen, T., Pedersen, K. and Larsen, J.L. (1997b) *Vibrio anguillarum* serogroup O3 and *V. anguillarum*-like serogroup O3 cross-reactive species: Comparison and characterization. *Journal of Applied Microbiology* 82: 211-218
- Tierney, K.B., Farrell, A.P. and Kennedy, C.J. (2004) The differential leucocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology* 65: 906-919
- Tison, D.L., Nishibuchi, M., Greenwood, J.D., Seidler, R.M. (1982) *Vibrio vulnificus* biogroup II: new biogroup pathogenic for eels. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 640-646
- Tolmasky M.E., Actis, L.A., Toranzo A., Barja, A. and Crosa, J.H. (1985) Plasmids mediating iron uptake in *Vibrio anguillarum* strains isolated from turbot in Spain. *Journal of General Microbiology* 131: 1989-1997
- Tolmasky M.E., Roberts M., Woloj, M. and Crosa, J.H. (1986) Molecular cloning of amikacin resistance determinants from a *Klebsiella pneumonia* plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30: 315-320
- Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1984) Molecular cloning and expression of genetic determinants for the iron-uptake system mediated by the *V. anguillarum* plasmid pJM1. *Journal of Bacteriology* 160: 860-866
- Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1990) Plasmid-mediated iron transport and virulence in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. In: Olsvik, O. and Bukholm, G. (eds.). *Application of Molecular Biology in Diagnosis of Infectious Diseases*. Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway, pp. 49-54
- Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1991) Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biology of Metals* 4: 33-35
- Tolmasky, M.E. and Crosa, J.H. (1995) Iron transport genes of the pJM1- mediated iron uptake system of *Vibrio anguillarum* are included in a transposonlike structure. *Plasmid* 33: 180-190
- Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1988a) Genetic analysis of the iron uptake region of the *Vibrio anguillarum* plasmid: molecular cloning of genetic determinants encoding a novel *trans*-activator of siderophore biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 170: 1913-1919
- Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1993) A single amino acid change in AngR, a protein encoded by pJM1 –like virulence plasmids, results in hyperproduction of anguibactin. *Infection and Immunity* 61: 3228-3233
- Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1995) A histidine decarboxylase gene encoded by the *Vibrio anguillarum* plasmid pJM1 is essential for virulence: histamine is a precursor in the biosynthesis of anguibactin. *Molecular Microbiology* 15: 87-95

- Tolmasky, M.E., Salinas, P., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1988b) Increased production of the siderophore anguibactin mediated by pJM1-like plasmids in *Vibrio anguillarum*. *Infection and Immunity* 56: 1608-1614
- Tolmasky, M.E., Wertheimer, A., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1994) Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *Journal of Bacteriology* 176: 213-220
- Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kuba, N. and Nakamura, S. (1968) Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Bacteriology* 95: 1078-1089
- Toranzo, A., Barja, J., Colwell, R.R., Hetrick, F. and Crosa, J.H. (1983b) Haemagglutinating, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic coast. *FEMS Microbiology Letters* 18: 257-262
- Toranzo, A., Barja, J., Potter, S., Colwell, R.R., Hetrick, F. and Crosa, J.H. (1983a) Molecular factors associated with virulence of marine vibrios isolated from striped bass in Chesapeake bay. *Infection and Immunity* 39: 1220-1227
- Toranzo, A.E. and Barja, J.L. (1990) A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 9: 73-82
- Toranzo, A.E. and Barja, J.L. (1993) Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Rev. of Fish Diseases*. 3: 5-36
- Toranzo, A.E., Baya, A.M., Roberson, B.S., Barja, J.L., Grimes, D.J. and Hetrick, F.M. (1987) Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 61: 81-97
- Tortonese, E. (1986) Moronidae. p.793-796. In P.J.P. Whitehead, M.-L. Bauchot, J.-C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.) Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. vol. 2. UNESCO, Paris.
- Traxler, G.S. and Li, M.F. (1972) *Vibrio anguillarum* isolated from a nasal abscess of the cod fish (*Gadus morhua*). *Journal of Wildlife Diseases* 8: 207-214
- Trevors, J.T. (1986) Plasmid curing in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 149-157
- Trust, T. (1986) Pathogenesis of the infectious diseases of fish. *Annual Review of Microbiology* 40: 479-502
- Trust, T.J., Courtice, I.D., Khouri, A.G., Crosa, J.H. and Schiewe, M.H. (1981) Serum resistance and haemagglutination ability of marine vibrios pathogenic for fish. *Infection and Immunity* 34: 702-707

- Tubiash, H.S., Chanley, P.E. and Leifson, E. (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve molluscs. I. Etiology and epizootiology. *Journal of Bacteriology* 90: 1036-1044
- Tubiash, H.S., Colwele, R.R. and Sakazaki, R. (1970) Marine vibrios associated with bacillary necrosis: a disease of larval and juvenile molluscs. *Journal of Bacteriology* 103: 271-272
- Umbreit, T.H. and Ordal, E.J. (1972) Infection of goldfish with *Vibrio anguillarum*. *American Society for Microbiology News* 32: 93-96
- Umbreit, T.H. and Tripp, M.R. (1975) Characterization of the factors responsible for death of fish infected with *Vibrio anguillarum*. *Canadian Journal of Microbiology* 21: 1272-1274
- Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J. and Dunlap, P.V. (2007) Reclassification of *Vibrio fisheri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fisheri* gen. nov., *Aliivibrio logei* comp. nov., *Aliivibrio salmonicida* comp. nov. and *Aliivibrio wodanis* comp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2823-2829
- Viele, P., Kerstetter, T.H. and Sullivan, J. (1980) Adoptive transfer of immunity against *Vibrio anguillarum* in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson, vaccinated by the immersion method. *Journal of Fish Biology* 17: 379-386
- Vigneulle, M. and Baudin-Laurencin, F. (1991) Uptake of *Vibrio anguillarum* bacterin in the posterior intestine of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, sea bass *Dicentrarchus labrax* and turbot *Scophthalmus maximus* after oral administration or oral intubation. *Diseases of Aquatic Organisms* 11: 85-92
- Villamil, L., Figueras, A., Toranzo, A. E., Planas, M. and Novoa, B. (2003) Isolation of highly pathogenic *Vibrio pelagus* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases* 26: 293-303
- Vivian, A. (1991) Genetic organization of *Acinetobacter*. In: Towner, K.J., Bergogne-Berenzin, E. and Fewson, C.A. (eds.). *The Biology of Acinetobacter*. Plenum Press, New York, pp. 191-200
- Voss, Jr., E.W., Fryer, J.L. and Banowetz, G.M. (1978) Isolation, purification and partial characterization of a lectin from chinook salmon ova. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 186: 25-34
- Wagatsuma, S. (1968) A medium for the test of haemolytic activity of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle* 13: 159-161
- Waldbeser, L. and Crosa, J.H. (1991) The regulatory mechanism of the expression of the iron transport proteins P40 and POM2 in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid* 25: 239
- Waldbeser, L., Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1993) Mechanisms for negative regulation by iron of the *fatA* outer membrane protein gene expression in *Vibrio anguillarum* 775. *Journal of Biological Chemistry* 268: 10433-10439



- Walter, M., Potter, S. and Crosa, J.H. (1983) Iron uptake system mediated by *Vibrio anguillarum* plasmid pJMI. *Journal of Bacteriology* 156: 880-887
- Wang, S.Y., Lauritz, J., Jass, J. and Milton, D.L. (2003) Role for the major outer-membrane protein from *Vibrio anguillarum* in bile resistance and biofilm formation. *Microbiology* 149: 1061–1071
- Wedemeyer, G., Ross, A.J. and Smith, L. (1969) Some metabolic effects of bacterial endotoxins in salmonid fishes. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 26: 115-122
- Weinberg, E.D. (1978) Iron and infection. *Microbiology Reviews* 42: 45-86
- Welch, R.A., Dellinger, E.P., Minshew, B. and Falkow, S. (1981) Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature, London* 294: 665-667
- Welch, T.J., Chai, S. and Crosa, J.H. (2000) The overlapping *angB* and *angG* genes are encoded within the *trans*-acting factor region of the virulence plasmid in *Vibrio anguillarum*: Essential role in siderophore biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 182: 6762-6773
- Wells, N.A. and ZoBell, C.E. (1934) *Achromobacter ichthyodermis*, n. sp., the etiological agent of an infectious dermatitis of certain marine fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 20: 123–126
- Wertheimer, A. M., Verweij, W., Chen, Q., Crosa, L. M., Nagasawa, M., Tolmasky, M. E., Actis, L. A. and Crosa, J. H. (1999) Characterization of the *angR* gene of *Vibrio anguillarum*: essential role in virulence. *Infection and Immunity* 67: 6496–6509
- Wertheimer, A., Tolmasky, M.E., Actis, L.A. and Crosa, J.H. (1994) Structural and functional analyses of mutant Fur proteins with impaired regulatory function. *Journal of Bacteriology* 176: 5116-5122
- West, P.A. and Lee, J.V. (1982) Ecology of *Vibrio* species, including *Vibrio cholerae*, in natural waters of Kent, England. *Journal of Applied Bacteriology* 52: 435-448
- West, P.A., Brayton, P.R., Bryant, T.N. and Colwell, R.R. (1986) Numerical taxonomy of *Vibrios* isolated from aquatic environments. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36: 531-543
- West, P.A., Lee, J.V. and Bryant, T.N. (1983) A numerical taxonomic study of species of *Vibrios* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 263-282
- Whittington, R.J., Munday, B.L., Akhlaghi, M., Reddacliff, G.L. and Carson, J. (1994) Humoral and peritoneal cell responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to ovalbumin, *Vibrio anguillarum* and Freund's complete adjuvant following intraperitoneal and bath immunisation. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 475-488

- Wiik, R., Andersen, K., Daae, F. and Hoff, K. (1989a) Virulence studies based on plasmids profiles of the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 819-825
- Wiik, R., Hoff, K., Andersen, K. and Daae, F. (1989b) Relationships between plasmids and phenotypes of presumptive strains of *Vibrio anguillarum* isolated from different fish species. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 826-835
- Williams, P., Camara, M., Hardman, A., Swift, S., Milton, D., Hope, V.J., Winzer, K., Middleton, B., Pritchard, D.I. and Bycroft, B.W. (2000) Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biologic* 355: 667-680
- Williams, P.H. (1979) Novel iron uptake system specified by Col V plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 26: 925-932
- Winkelhake, J.L. and Chang, R.J. (1982) Acute phase (C-reactive) protein-like macromolecules from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Developmental and Comparative Immunology* 6: 481-489
- Winter, G. W., Schreck, C.B. and McIntyre, J.D. (1980) Resistance of different stocks and transferrin genotypes of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, and steelhead trout, *Salmo gairdneri*, to bacterial kidney disease and vibriosis. *Fishery Bulletin* 77: 795-802
- Winton, J., Rohovec, J. and Fryer, J. (1983) Bacterial and viral diseases of cultured salmonids in the Pacific Northwest. In: Crosa, J.H. (ed.) *Bacterial and Viral Diseases of Fish*. Washington Sea Grant. Seattle, pp. 1-20
- Wolf, M. and Crosa, J.H. (1986) Evidence for the role of a siderophore in promoting *V. anguillarum* infections. *Journal of General Microbiology* 132: 2949-2952
- Wolke, R.E. (1975) Pathology of bacterial and fungal disease affecting fish. In: Ribelin W.E. Magaki G (eds.) *Pathology of fishes*. Univ. Wisconsin Press, p 33-117
- Woodland, J. (2004) Bacteriology: in NWFHS Laboratory Procedures Manual 2<sup>nd</sup> ed, chapter 5, Pinetop, Arizona
- Wooldridge, K.G. and Williams, P.H. (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 325-348
- Wu, H., Ma, Y., Zhang, Y. and Zhang, H. (2004) Complete sequence of virulence plasmid pEIB1 from the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* strain MVM425 and location of its replication region. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1021-1028
- Yamamoto, S., Okujo, N. and Sakakibara, Y. (1994) Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Archives of Microbiology* 162: 249-252

- Yamanoi, H., Muroga, K. and Takahashi, S. (1980) Physiological characteristics and pathogenicity of NAG *Vibrio* isolated from diseased ayu. *Fish Pathology* 15: 69-73
- Yanagase, Y., Inoue, K., Ozaki, M., Ochi, T., Amano, T. and Chazono, M. (1970) Haemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus* 1. Identification and partial purification of enzymes. *Biken Journal* 13: 77-92
- Yano, T. (1996) The nonspecific immune system: Humoral defence. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment* (G. Iwama and T. Nakanishi, eds.) pp.105-157. San Diego: Academic Press
- Yiagnisis, M., Vatsos, I.N., Kyriakou, C. and Alexis, M. (2007) First report of *Vibrio anguillarum* isolation from diseased big scale sand smelt, *Atherina boyeri* Risso 1810, in Limnos, Greece. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 27: 61-69
- Yousif, A.N., Albright, L.J. and Evelyn, T.P.T. (1994) Purification and characterization of a galactose-specific lectin from the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and its interaction with fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 20: 127-136
- ZoBell, C. E. and Upham, H. C. (1944) A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bulletin of the Scripps Institute of Oceanography, University of California*. 5: 239-292